

ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測

所属 千葉大学大学院薬学研究院
研究者 小林カオル

研究要旨 核内レセプターPXRを活性化する医薬品の構造的特徴について検討し、PXRの活性化に重要となる化合物の構造を明らかにした。また、構造安定化計算によりえられた化合物の構造とPXRとのドッキングを行い相互作用するPXRのアミノ酸残基を推定した。

A. 研究目的

医薬品あるいは食品による薬物代謝酵素や薬物トランスポーター遺伝子の発現変動は、医薬品の体内動態や治療効果の個人内変動を引き起こす重要な要因の一つである。本研究では、臨床的に重要かつ薬物により強く誘導され治療効果に影響を与えるP450分子種(CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9)および薬物トランスポーター(P糖タンパク、OATP-C)の発現に関与する核内タンパクをターゲットとし、誘導を引き起こす可能性のある化合物と核内タンパクの相互作用について、培養細胞を用いたインビトロ実験結果とコンピューター解析を組み合わせることによるインシリコ予測法の確立を行い、ヒトの薬物体内動態の予測を向上させることを目的とした。

平成16年度は、誘導に関わる核内受容体のうち、Pregnane X receptor (PXR)を活性化する医薬品の構造的特徴について、培養細胞を用いたインビトロ実験系と分子動力学的手法によるコンピューター解析を組み合わせ、医薬品による誘導作用を化学構造とタンパク構造の視点から検討を行うこととした。

B. 研究方法

レポーターアッセイは以下の方法で行った。ヒト

肝がん由来細胞(FLC7)の培養は10% FBSと抗生物質を加えたDMEM/F12を培地とし、37°C、5% CO₂の条件下で行った。細胞を24-wellプレートに播種し、約24時間後レポーターベクターであるpGL3-Basic-XREM/prPXRE(200 ng/well)、核内受容体発現ベクターであるpTarget™-PXR(20 ng/well)および内標ベクターであるphRL-TK vector(4 ng/well, Promega)を細胞にトランスフェクションした。4時間incubateした後、培地をDMEM/F12に交換し、その直後に誘導剤を添加した。誘導剤はdimethyl sulfoxide(DMSO)溶液として調製し、DMSOの最終濃度が0.1%となるように加えた。誘導剤曝露は24時間とし、その後Luciferase活性を測定した。誘導剤として、8種のバルビツール酸誘導体とCYP3A4の代表的な誘導剤であるrifampicinを用いた。

ヒトヘパトサイトを用いた検討は以下の方法で行った。凍結ヒト肝細胞は、融解後マトリゲルコートされたプレートに専用培地とともに播種し、接着させた。播種後5日目に誘導剤を添加し、3日間曝露した。その後、細胞を回収し、total RNAを抽出したのちに、real-time PCR法によりCYP3A4 mRNA量を定量した。誘導剤としては、バルビツール酸誘導体であるmephobabital、phenobarbitalおよびバル

ビタールを用いた。

バルビツール酸誘導体 8 種に関する構造安定化計算は、gaussian98 および Amber7 を用いて行い、X 線結晶解析により得られた PXR 構造とのドッキングを行った。

(倫理面への配慮)

ベクター構築などの組換え DNA 実験については、組換え DNA 実験指針に基づき実施されており、市販されているヒト肝細胞あるいは培養細胞より抽出した DNA および mRNA の解析については、その取り扱いについて「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従った措置を講じているため。倫理面での問題はないと判断した。

C. 研究結果

レポーターアッセイ系では、検討した 8 種のバルビツール酸誘導体のうち、phenobarbital を含む 6 種の化合物により濃度依存的に有意な活性の上昇が見られた。バルビツール酸誘導体 100 μM を添加した場合、コントロールに対する活性の上昇は、mephobarbital が最も強く 10 倍以上であった。次いで pentobarbital および hexobarbital が 5-10 倍の活性上昇を示し、cyclobarbital、amobarbital および phenobarbital は 5 倍以下の弱い活性上昇であった。Barbital および primidone は 300 μM を添加した場合においても活性上昇を示さなかった。

さらに、ヒトヘパトサイトにおける CYP3A4 mRNA 発現量に関しては、mephobarbital、phenobarbital および barbital の曝露により、コントロールに比べ、それぞれ約 10 倍、6 倍、および 1.5 倍の mRNA 量の増加が見られた。

バルビツール酸誘導体 8 種に関する構造安定化計算を行い、X 線結晶解析により得られた PXR の構造とのドッキングを行った。その結果、PXR のリガンド結合ドメイン内に存在する Ser²⁴⁷ の水酸基と phenobarbital の酸素原子との水素結合、Gln²⁸⁵ の

カルボキシル基と phenobarbital の水素原子との水素結合、His⁴⁰⁷ の窒素原子と phenobarbital の水素原子との水素結合が推測された。また、Phe²⁵¹ および Phe⁴²⁹ はそれぞれ phenobarbital のフェニル基と π π 相互作用およびエチル基と CH- π 相互作用を示すと推測された。

D. 考察

本研究では、バルビツール酸誘導体による PXR の転写活性化と化合物の構造的特徴との関係を検討した。その結果、PXR の転写活性化は化合物の構造と大きく関連することが示唆された。

今回検討した 8 種のバルビツール酸誘導体では、barbital および primidone を除くバルビツール酸誘導体により、PXR を介した転写が活性化した。バルビツール酸誘導体の化学構造は、barbital の R₃ 側鎖がエチル基であるのに対して、barbital を除く他のバルビツール酸誘導体では炭素数 5 個以上のアルキル基、シクロヘキセン基またはフェニル基である。PXR のリガンド結合ポケットは非常に疎水性が高いこと (Watkins *et al.*, 2001) を考えあわせると、炭素数の少ないエチル基は疎水性が低く、このことが barbital による PXR の活性化が認められない原因と考えられた。また、primidone と phenobarbital は非常に類似した構造であるにもかかわらず、phenobarbital は PXR を活性化したのに対し primidone は活性化しなかった。Primidone と phenobarbital の化学構造は、いずれもピリジン環 5 位の炭素にフェニル基 (R₃) を持ち、4 位および 6 位の炭素はカルボニル基である。しかし、2 位の炭素に関しては、phenobarbital のみがカルボニル基である。12 種のヒト PXR のリガンドより構築した PXR のリガンドモデルによると、PXR のリガンドは 4 つの疎水領域と、水素結合を形成する官能基を一つ含んでおり、疎水領域と水素結合領域の距離は 3.6~7.6 Å である (Ekins and Erickson., 2002)。

Phenobarbital では、フェニル基 (R₃) と 4 位ある
いは 6 位のカルボニル基との距離は約 4 Å であり、
2 位のカルボニル基との距離は約 6 Å である。つまり、
primidone には遠位 (2 位) のカルボニル基が存在
しない。従って、phenobarbital による PXR の活性化
には、遠位のカルボニル基が重要であることが示
唆された。以上から、primidone が PXR を活性化し
ない原因は、PXR の活性化に必要な遠位のカルボニ
ル基を欠くことと考えられた。

また、レポーターアッセイにおける PXR 活性化作
用の強さが異なる 3 種のバルビツール酸誘導体に関
しては、PXR 活性化作用とヒトヘパトサイトにおけ
る CYP3A4 mRNA 発現量の誘導率との間に関連性が認
められたことから、CYP3A4 の誘導評価系としてレ
ポーターアッセイが有用であると考えられた。

さらに、少なくともバルビツール酸誘導体に関し
ては、PXR との結合に 3 つの水素結合形成基 (Ser²⁴⁷
の水酸基、Gln²⁸⁵ のカルボキシル基、His⁴⁰⁷ の窒素
原子) および 2 つの疎水性残基であるフェニルアラ
ニン (Phe²⁵¹、Phe⁴²⁹) が重要であることが示唆され
た。

E. 結論

核内レセプターである PXR を介して CYP3A4 を誘
導するバルビツール酸誘導体について化合物の構造
的特徴と PXR の活性化作用との関係について検討し、
PXR の活性化に重要となる化合物の構造を明らかに
した。また、化合物の構造安定化計算を行い、X 線
結晶解析により得られた PXR の構造とのドッキング
を行った結果、相互作用する PXR のアミノ酸残基を
推定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi K., Yamagami S., Higuchi T.,
Hosokawa M., Chiba K. Key structural
features of ligands for activation of
human pregnane X receptor. *Drug Metab
Dispos* 32:468-472 (2004)

Morita J., Kobayashi K., Wanibuchi A.,
Kimura M., Irie S., Ishizaki T., Chiba
K. A novel single nucleotide
polymorphism (SNP) of the CYP2C19
gene in a Japanese subject with
lowered capacity of mephobarbital
4'-hydroxylation. *Drug Metabolism and
Pharmacokinetics*, 19: 236-238
(2004).

Kobayashi K., Morita J., Wanibuchi A.,
Kimura M., Irie S., Urae A., Chiba K.,
Ishizaki T. Pharmacogenetic roles of
CYP2C19 and CYP2B6 in the metabolism of R-
and S-mephobarbital in humans.
*Pharmacogenetics*14: 549-556 (2004).

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし