

平成18年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

政策創薬総合研究

課題番号

KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川端健二 …… 1
KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増田智先 …… 12
KH23304	Toll様受容体 (TLR3) を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中道一生 …… 26
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊澤晴彦 …… 37
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大喜多 肇 …… 50
KH23331	寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中野由美子 …… 60
KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋本亮太 …… 66
KH33309	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	小林カオル …… 79
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田辺公一 …… 92
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディーの基礎的および応用的研究	川上浩司 …… 101
KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊豫田 淳 …… 105
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡田直貴 …… 116
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小島伸介 …… 126
KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 136
KH53333	治療ターゲットとしてのFcγ受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村上恭子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵原耕一郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥平桂一郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の 解明	藤室雅弘 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼ二量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

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
研究期間 平成16年4月ー平成19年3月

研究要旨 核内レセプターPXRを介してCYP3A4などを誘導するバルビツール酸誘導体について、PXRの活性化に重要な化合物の構造を明らかにした。また、PXRの活性化に対するアミノ酸置換の影響を調べた結果に基づき、PXRのリガンド結合様式を推定した。

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）の発現に関与する核内タンパクである pregnane X receptor (PXR) 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結果を組み合わせた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。

B. 研究方法

(1) 置換型PXRの作成

置換型PXRは、野生型PXR発現ベクターをtemplateとしたsite-directed mutagenesis法により、PXRのリガンド結合ポケット内のアミノ酸残基を置換することにより作成した。

(2) レポーターアッセイによるPXR活性の測定

CYP3A4遺伝子の5'上流に存在するPXR結合領域を含むレポーターベクター（pGL3-Basic-XREM/prPXRE, 200 ng/well）、PXR発現ベクター（10 ng/well）および内標ベクター（phRL-TK vector, 4 ng/well, Promega）をヒト肝がん由来細胞（FLC7）にトランスフェクションし、誘導剤あるいは溶媒曝露後のルシフェラーゼ活性を測定した。誘導剤には、CYP3A4誘導剤（リガンド化合物）として良く知られている13種類の化合物（amlodipine, clotrimazole, hyperforin, lansoprazole, lithocholic acid, nifedipine, paclitaxel, phenobarbital, rifampicin, ritonavir, RU486, simvastatin およびSR12813）を用いた。なお、hyperforinはmethanol溶液、phenobarbitalは水溶液、その他の活性化剤はDMSO溶液として調製し、DMSOまたはmethanolの最終濃度が0.1%となるように加えた。

(3) Mammalian two-hybrid assayによるPXRとcoregulatorの相互作用解析

GAL4-DNA結合ドメインを持つpBINDベクターにcoregulatorであるSRC-1eあるいはNcoRのreceptor interacting domain (RID)を組み込んだベクター、VP16活性化ドメインを持つpACTに野生型あるいは置換型PXRのligand binding domain (LBD)

を組み込んだベクターおよびレポーターベクター (pG5) をヒト肝がん由来細胞 (FLC7) にトランスフェクションし、誘導剤である rifampicin (5 μM) あるいは溶媒である DMSO 曝露後のルシフェラーゼ活性を測定した。

(4) PXR のリガンド結合ポケットへのリガンド化合物のドッキング

リガンド化合物の安定構造は、Gaussian98 を用い、Hartree-Fock 法により作成した。基底関数系には 6-31G**を用いた。ドッキングには MOL-FS ソフトウェアを用い、化合物を PXR のリガンド結合ポケット内に配置した。次に、ドッキングさせたモデルの周囲約 15 Å に水分子を発生させ、分子力場計算によるエネルギー極小化計算をおこなった。PXR のリガンド結合ドメインの構造は、X 線結晶構造 (PDB ID: 1NRL) の chain A および chain C を用いた。分子力場計算には AMBER7.0 を用い、力場パラメータには parm99 を使用した。

(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、倫理面での問題はないと判断した。

C. 研究結果

(1) 8 種のバルビツール酸誘導体による PXR 活性化作用の差異

8 種のバルビツール酸誘導体 (amobarbital、barbital、cyclobarbital、hexobarbital、mephobarbital、pentobarbital、phenobarbital および primidone) について PXR 活性化作用を調べたところ、phenobarbital を含む 6 種の化合物により濃度依存的に有意な活性上昇が見られた。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。

(2) バルビツール酸誘導体の PXR への結合に関与するアミノ酸残基の推定

バルビツール酸誘導体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。その結果、PXR のリガンド結合ポケット内に存在する 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。

(3) PXR のアミノ酸置換が coregulator との相互作用に与える影響

PXR と SRC-1 との相互作用を mammalian two-hybrid assay により検討したところ、野生型 PXR と SRC-1 との間に相互作用が認められ、PXR リガンドである rifampicin の曝露により約 2 倍の活性上昇が認められた。そこで、バルビツール酸誘導体との水素結合に関与することが推測された PXR の Ser²⁴⁷、Gln²⁸⁵、His⁴⁰⁷ について水素結合形成基を持たないアミノ酸に置換し、SRC-1 との相互作用に及ぼす影響を検討した。S247A、Q285I、H407A および H407I については、SRC-1 との相互作用は野生型に比較してわずかに強まったものの、rifampicin 曝露による活性上昇の程度は低下した。一方、NCoR については検討した 4 種の置換型 PXR はいずれも、野生型に比較して NCoR との相互作用は小さいものであった。また、野生型 PXR に比較して置換型 PXR では、rifampicin 曝露による活性低下の程度も小さいものであった。

(4) リガンド依存的な PXR 活性化に対するアミノ酸置換の影響

PXRのリガンド結合ポケットを構成する28種のアミノ酸残基のうち、Ala244を除く27種についてそれぞれのアミノ酸置換体を作成し、13種のPXRリガンドによる活性化に対するアミノ酸置換の影響を検討した。その結果、9種の置換型PXRは野生型PXRと同様のリガンドによる活性化を示し、2種の置換型PXRはリガンドによる活性化を完全に消失した。その他16種の置換型PXRでは、リガンドによる活性化作用に差異が認められた。16種の置換型PXRのうち、rifampicinによる活性化が野生型に比較して著しく低下したのはF429Aのみであったのに対し、phenobarbitalによる活性化は13種もの置換型PXRにおいて著しい低下を示した。

(5) PXRのリガンド結合に関与するアミノ酸残基の推定

アミノ酸置換により化合物による活性化が著しく低下した箇所のアミノ酸残基が化合物と相互作用すると仮定し、clotrimazoleおよびnifedipineと相互作用するPXRのアミノ酸残基をドッキングにより推定した。

ClotrimazoleによるPXRの活性化はLeu²⁴⁰、Leu⁴¹¹、Ile⁴¹⁴、Phe⁴²⁰およびPhe⁴²⁹のアミノ酸置換により著しく低下した。これらのアミノ酸残基はPhe⁴²⁰を中心にリガンド結合ポケット内の比較的近い位置にあることから、clotrimazoleは、リガンド結合ポケットのPhe⁴²⁰を中心とした部位に配置した。エネルギー極小化計算の結果、Ser²⁴⁷がclotrimazoleと2.56 Åの水素結合を形成し、Phe⁴²⁰が π/π 相互作用に、Leu²⁴⁰、Leu⁴¹¹、Ile⁴¹⁴およびMet⁴²⁵がCH/ π 相互作用に関与することが推定された。さらに、Ala²⁴⁴、Phe²⁵¹、Phe²⁸¹およびPhe⁴²⁹もclotrimazoleとの相互作用に関与すると考えられた。

NifedipineによるPXRの活性化は、Val²¹¹、Leu²⁴⁰、Trp²⁹⁹、His³²⁷、Leu⁴¹¹、Phe⁴²⁰およびPhe⁴²⁹のアミノ酸置換により著しく低下した。これらのアミノ酸残基はリガンド結合ポケットの複数の箇所に分布して

おり、分子サイズの小さいnifedipineは全ての残基と同時に相互作用することは困難であったため、nifedipineはPhe⁴²⁰またはTrp²⁹⁹を中心とした二つの部位に配置した。エネルギー極小化計算の結果、Phe⁴²⁰を中心とした結合様式では、Ser²⁴⁷がnifedipineと2.93 Åの水素結合を形成し、Phe⁴²⁹が π/π 相互作用に、Leu⁴¹¹およびPhe⁴²⁰がCH/ π 相互作用に関与すると推定された。さらに、Ala²⁴⁴、Phe²⁵¹、Phe²⁸¹、Gln²⁸⁵、Phe²⁸⁸、His⁴⁰⁷およびMet⁴²⁵もnifedipineとの相互作用に関与すると考えられた。一方、Trp²⁹⁹を中心とした結合様式では、His³²⁷がnifedipineと2.83 Åの水素結合を形成し、Val²¹¹、Trp²⁹⁹およびHis⁴⁰⁷がCH/ π 相互作用に関与すると推定された。さらに、Leu²⁰⁹、Gln²⁸⁵、Tyr³⁰⁶、Met³²³およびLeu³²⁴もnifedipineとの相互作用に関与すると考えられた。

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。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4Åであり、2位のカルボニル基との距離は約6Å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であると考えられた。

PXR活性化作用を有するバルビツール酸誘導体とPXRのドッキングにより、バルビツール酸誘導体はSer²⁴⁷、Gln²⁸⁵およびHis⁴⁰⁷と水素結合していることが推測された。しかし、これら3種のアミノ酸残基について水素結合形成基を持たないアミノ酸に置換し、phenobarbitalによるPXR活性化への影響を調べたところ、いずれの置換型PXR (S247G、Q285AおよびH407I)においても活性化の低下はわずかであった。このことより、バルビツール酸誘導体とSer²⁴⁷、Gln²⁸⁵およびHis⁴⁰⁷との水素結合はリガンド認識において重要性はあまり高くない可能性が考えられた。これら3種の置換型PXRにおいては、リガンド非存在化における活性が野生型の2-3倍高い値を示しており、バルビツール酸誘導体による活性化がマスクされた可能性も考えられた。S247A、Q285IおよびH407Iに関しては、SRC-1との相互作用は野生型よりも強いのに対し、rifampicinによる相互作用の増強作用は野生型に比較して弱いものであった。さらに、検討した3種の置換型PXRはいずれも野生型に比較してNCoRとの相互作用は弱く、rifampicin

による相互作用の減弱作用も弱いものであった。これらの結果より、Ser²⁴⁷、Gln²⁸⁵およびHis⁴⁰⁷の置換はPXRとcoregulatorの相互作用を変化させ、リガンドによる作用を減弱させると考えられた。一般に、リガンド結合により活性化する核内レセプターは、リガンドが結合していない状態ではNCoRやSMRTなどのcorepressorと相互作用し、リガンドが結合するとcorepressorを解離してSRC1などのcoactivatorをリクルートすることが知られている。これらのcoregulatorsは核内レセプターのC末端側に存在するAF2ドメインと相互作用する。このことから、Ser²⁴⁷、Gln²⁸⁵およびHis⁴⁰⁷については、アミノ酸置換により、PXRのAF2ドメインをcoactivatorとの相互作用に有利なコンフォメーションに大きく変化させた可能性が考えられた。一方、その他の置換型PXRにおいては、phenobarbitalによる活性化が著しく低下した。PhenobarbitalはPXRのリガンドであるが、親和性は他のリガンドに比べて非常に弱いことから、アミノ酸置換によるリガンド結合への影響を受けやすいと考えられた。

バルビツール酸誘導体に関しては、PXRのどのアミノ酸残基を介して結合するかを明確にできなかったため、他の12種類のPXRリガンドについて検討を加えた。その結果、PXRの活性化に関与するアミノ酸残基は化合物により異なることが明らかとなった。さらに、PXRの活性化に対して特徴的なアミノ酸置換の影響を示した化合物のうち、clotrimazoleおよびnifedipineに関して、PXRとのドッキングをおこない、それぞれのリガンド結合様式を推定した。Clotrimazoleに関しては、PXRの活性化がLeu²⁴⁰、Leu⁴¹¹、Ile⁴¹⁴、Phe⁴²⁰およびPhe⁴²⁹のアミノ酸置換により著しく低下したことから、これらのアミノ酸残基がclotrimazoleと相互作用すると仮定し、ドッキングによりclotrimazoleと相互作用するPXRのアミノ酸残基を推定した。その結果、Ser²⁴⁷、Leu⁴¹¹、Ile⁴¹⁴、Leu²⁴⁰およびPhe⁴²⁰がclotrimazoleとの重要な相互

作用に関与することが示唆された。Nifedipine に関しては、PXR の活性化が Val²¹¹、Leu²⁴⁰、Trp²⁹⁹、His³²⁷、Leu⁴¹¹、Phe⁴²⁰ および Phe⁴²⁹ のアミノ酸置換により著しく低下したことから、これらのアミノ酸残基が nifedipine による活性化に重要であることが示唆された。分子サイズの小さい nifedipine は、活性化に重要であると考えられた全ての残基と同時に相互作用することは困難であるため、nifedipine については Phe⁴²⁰ または Trp²⁹⁹ を中心としてドッキングをおこなった。その結果、二つの結合様式が推定され、一つの結合様式では Ser²⁴⁷、Leu⁴¹¹、Phe⁴²⁰ および Phe⁴²⁹ が nifedipine との重要な相互作用に関与し、もう一つの結合様式では Val²¹¹、Trp²⁹⁹、His³²⁷ および His⁴⁰⁷ が重要な相互作用に関与することが示唆された。

本研究では、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することにより、PXR の活性化に重要となる化合物の構造を明らかにした。さらに、リガンド結合ポケット内のアミノ酸残基をほぼ全て置換し、化合物による PXR 活性化への影響を検討することにより、PXR の活性化におけるアミノ酸置換の影響は化合物により大きく異なることを初めて明らかにした。本研究において行った PXR のリガンド結合様式の推定は、実験結果に基づいた手法であり、PXR のリガンド結合を予測する上で有用な知見になると考えられた。

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、リガンド結合ポケット内のアミノ酸残基をほぼ全て置換し、化合物による PXR 活性化への影響を検討することにより、PXR の活性化におけるアミノ酸置換の影響は化合物により大きく異なることを初めて明らかにした。さらに、2 種のリガンドについて PXR への結合様式を推定した。本研究において行った PXR のリガンド結合様式の推定は、実験結果に基づいた手法であり、PXR のリガンド結合を予測する上で有用な知見になると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Toshiyuki Shimizu, Kei Akimoto, Takuya Yoshimura, Takuro Niwa, Kaoru Kobayashi, Michio Tsunoo and Kan Chiba: Autoinduction of MKC-963 [(R)-1-(1-cyclohexylethylamino)-4-phenylphthalazine] metabolism in healthy volunteers and its retrospective evaluation using primary human hepatocytes and cDNA-expressed enzymes. *Drug Metab Dispos* 34:950-954, 2006.

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

平成18年度

政策創薬総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社