

氏名	こつま 古妻 まさかつ 正勝
(論文内容の要旨) CYP2D6 は薬物代謝酵素の中で高頻度に遺伝子多型を有していることが知られており、CYP2D6 の機能を欠損した poor metabolizer (PM) においては、本酵素によって代謝される薬物の体内からのクリアランスが大きく変動するため、薬物の治療効果や安全性に個体差が生じ、問題となっている。 最近、apoE KO マウスあるいは WHHL ウサギなどの動脈硬化病態モデルを用いた検討から、[7-(2,2-dimethylpropionylamino)-4,6-dimethyl-1-octyl-2,3-dihydro-1<i>H</i>-indol-5-yl]-acetic acid (pactimibe (pac)) が良好な経口吸収性を示すと同時に、強い Acyl CoenzymeA:Cholesterol Acyltransferase (ACAT) 阻害作用を有することが見出され、その抗動脈硬化治療薬としての可能性が期待された。そこで、臨床試験を行った結果、CYP2D6 の PM 群ではコントロール群 (extensive metabolizer (EM)) に比べて、pac の C_{max}、AUC_{0-inf} はやや上昇する程度であったが、pac の血漿中代謝物であるインドール酸化体 [7-(2,2-dimethylpropionylamino)-4,6-dimethyl-1-octyl-1<i>H</i>-indol-5-yl]-acetic acid (R-125528) の AUC_{0-72h} は大きく増加し、また 72 時間までの採血時点では明確な消失相は確認できず、AUC_{0-inf} を算出することが出来なかった。また、CYP3A4 阻害剤ケトコナゾールあるいは CYP2D6 阻害剤キニジンを併用した場合、pac ではどちらの場合も AUC がわずかに増加した程度であったが、R-125528 の血漿中濃度は、キニジン併用時に著しく増加し、体内からの消失も大きく遅延した。以上のことから、pac の代謝には CYP2D6 が関与している可能性が示された。 そこで、pac の代謝経路を検討した結果、代謝物として pac の N-オクチル基 ω-1 位水酸化体 (R-130567)、R-125528、R-125528 の N-オクチル基 ω-1 位水酸化体 (R-142515) が見出された。さらに、pac と R-125528 の未変化体での尿中及び胆汁中への排泄は認められず、代謝クリアランスが体内動態の重要な変動因子であることが示された。そこで pac 及び R-125528 の代謝経路に対する CYP2D6 の寄与率 (f_{mCYP2D6}) を求めるために、CYP450 発現系マイクロゾームを用いた検討を行ったところ、pac の代謝においては、R-125528 の生成は CYP3A4 によって起こり、CYP2D6 は関与しないが、ω-1 位水酸化反応には主に CYP2D6 が関与していることが認められた。また、この試験で得られた f_{mCYP2D6} の値より算出した CYP2D6 の EM に対する PM の AUC 増加率は、臨床試験で得られた PM での pac の AUC 増加率とよく一致していた。一方、R-125528 の ω-1 位水酸化反応は CYP2D6 発現系マイクロゾームによってのみ進行することが認められた。また、ヒト肝マイクロゾームにおいて、CYP2D6 活性の指標である dextromethorphan <i>O</i>-脱メチル化の反応速度と R-125528 の ω-1 水酸化反応速度との間には高い相関性が認められ、R-125528 は CYP2D6 の良好な基質となりえることが示唆された。以上の結果から、pac は複数の代謝経路を有するために CYP2D6 遺伝子多型の影響をあまり受けなかったが、R-125528 は CYP2D6 が関与する単一の代謝反応を受けるため、体内からの消失が CYP2D6 の PM で著しく遅延したものと考えられた。	

次に、pac 及び R-125528 の CYP2D6 に対する親和性を求めたところ、それらの K_m 値は代表的な CYP2D6 の基質である metoprolol や dextromethorphan のそれと同等であることが明らかとなった。CYP2D6 の基質認識に関するこれまでの研究においては、CYP2D6 の基質は塩基性アミン及びそこから 5-7 Å 離れた位置に芳香環等の疎水性部を有しており、その疎水性部の近傍が酸化代謝を受けることが報告されている。しかし、pac 及び R-125528 は塩基性アミンを有しない酸性化合物であること、代謝位置が芳香環の近傍ではなく *N*-オクチル基の $\omega-1$ 位であることから、従来報告されているものとは異なる様式で基質認識されている可能性が考えられた。そこで、pac 及び R-125528 の CYP2D6 への結合様式に関する知見を得るために、報告されている CYP2D6 結晶構造に対して計算化学手法を用いて両化合物を induced fit docking (IFD) することを試みた。その結果、得られた最安定構造は、インドリン/インドール環と Phe483 との疎水性相互作用、並びにカルボン酸と Arg221 との静電的相互作用を有するものであり、代謝部位である $\omega-1$ 位はヘムの上部に位置していた。また、pac の側鎖長(C8)と CYP2D6 代謝安定性に関する検討を行ったところ、C8、C10 は代謝的に不安定であったが、C6、C12 の化合物は安定であった。これらの構造類似体を CYP2D6 結晶構造に IFD したところ、C6 では側鎖末端がヘムに届かず、C12 では *N*-アルキル側鎖部位が嵩高く結合ポケットに入りきらないため、代謝的に安定であることが考えられた。従来想定されている結合様式では、CYP2D6 の基質認識には塩基性アミンと Glu216/Asp301 との静電的相互作用が必須であるとされていたが、pac のような酸性化合物では、塩基性化合物とは異なる様式で結合する可能性が示された。

上記結果より、CYP2D6 基質認識には pac の *N*-アルキル側鎖とヘムとの距離及びカルボン酸と Arg221 の静電的相互作用が関与していると考えられる。そこで、CYP2D6 の基質とならない ACAT 阻害剤を開発するために、側鎖長を短くしカルボン酸をスルファモイル ア ミ ン 基 に 置 換 し た *N*-(1-(2-ethoxyethyl)-4,6-dimethyl-5-(sulfamoylamino)indolin-7-yl)-2,2-dimethylpropanamide を設計した。本化合物を合成し、その代謝・動態を調べたところ、予想通り CYP2D6 による代謝は受けず、主に CYP3A4 で代謝されると同時に高い水溶性のために尿中排泄を受けることを認め、薬理活性は保持したまま CYP2D6 による代謝を回避した分子を創生することができた。

以上、本研究は、酸性化合物インドリン/インドール-5-酢酸誘導体が CYP2D6 により代謝されることを初めて見出し、その結果に基づき CYP2D6 による代謝を回避した新しい ACAT 阻害剤の開発に基礎的な成果をおさめたものであり、今後の医薬品設計に有益な情報を提供するものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

CYP2D6 は薬物代謝酵素の中で高頻度に遺伝子多型を有していることが知られており、CYP2D6 の機能を欠損した poor metabolizer (PM) においては、本酵素によって代謝される薬物の体内からのクリアランスが大きく変動するため、薬物の治療効果や安全性に個体差が生じ、問題となっている。

著者は、最近、apoE K0 マウスあるいは WHHL ウサギなどの動脈硬化病態モデルを用いた検討から、良好な経口吸収性と強い Acyl CoenzymeA:Cholesterol Acyltransferase (ACAT) 阻害作用が見出された [7-(2, 2-dimethylpropionylamino)-4, 6-dimethyl-1-octyl-2, 3-dihydro-1*H*-indol-5-yl]-acetic acid (pactimibe (pac)) について、抗動脈硬化治療薬としての可能性を期待し、臨床試験を行った結果、CYP2D6 の PM 群ではコントロール群 (EM) に比べて、pac の $C_{\max}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ はやや上昇する程度であったが、pac の血漿中代謝物であるインドール酸化体 [7-(2, 2-dimethylpropionylamino)-4, 6-dimethyl-1-octyl-1*H*-indol-5-yl]-acetic acid (R-125528) の AUC_{0-72h} は大きく増加し、また 72 時間迄では血中からの消失相は確認できず、 $AUC_{0-\infty}$ を算出できなかった。さらに、CYP2D6 阻害剤キニジンを併用した場合、pac では AUC の微増、R-125528 では血漿中濃度の著しい増加、体内からの消失の著しい遅延を認め、pac の代謝には CYP2D6 が関与している可能性を見出した。

そこで、著者は pac の代謝挙動を検討した結果、代謝物として pac の *N*-オクチル基 $\omega-1$ 位水酸化体 (R-130567)、R-125528、R-125528 の *N*-オクチル基 $\omega-1$ 位水酸化体 (R-142515)、さらに pac と R-125528 は未変化体では尿中及び胆汁中へ排泄されないことを認めた。さらに、CYP450 発現系ミクロゾームを用いて pac 及び R-125528 の代謝経路に対する CYP2D6 の寄与率 ($f_{mCYP2D6}$) を求めたところ、pac から R-125528 の代謝には CYP3A4、pac の $\omega-1$ 位水酸化反応には主に CYP2D6 が関与していること、一方、R-125528 の $\omega-1$ 位水酸化反応は CYP2D6 によってのみ進行することを認めた。また、ヒト肝ミクロゾームにおいて、CYP2D6 活性の指標である dextromethorphan *O*-脱メチル化の反応速度と R-125528 の $\omega-1$ 水酸化反応速度との間には高い相関性を認め、R-125528 は CYP2D6 の良好な基質となりえることを認めた。

著者は、次に、pac 及び R-125528 の CYP2D6 に対する親和性を求めたところ、それらの K_m 値は代表的な CYP2D6 の基質である metoprolol や dextromethorphan のそれと同等であることを認めた。これまでの研究では、CYP2D6 の基質は塩基性アミン及びそこから 5-7 Å 離れた位置に芳香環等の疎水性部を有しており、その疎水性部の近傍が酸化代謝を受けることが報告されている。しかし、pac 及び R-125528 は塩基性アミンを有しない酸性化合物であること、代謝位置が芳香環の近傍ではなく *N*-オクチル基の $\omega-1$ 位であることから、従来報告されているものとは異なる様式で基質認識されている可能性が考えられた。そこで、著者は pac 及び R-125528 の CYP2D6 への結合様式に関する知見を得るために、CYP2D6 結晶構造に対する計算化学手法 (induced fit docking) による検討および pac の側鎖長 (C8) と CYP2D6 代謝安定性に関する検討結果から、CYP2D6 基質認識には pac の *N*-アルキル側鎖とヘムとの距離及びカルボン酸と Arg221 の静電的相互作用が関与している可能性を見出した。

そこで、著者は CYP2D6 の基質とならない ACAT 阻害剤を開発するために、側鎖長を短くしカルボン酸をスルファモイルアミン基に置換した *N*-(1-(2-ethoxyethyl)-4,6-dimethyl-5-(sulfamoylamino)indolin-7-yl)-2,2-dimethyl propanamide を設計、合成し、その代謝・動態を調べたところ、予想通り CYP2D6 による代謝は受けず、主に CYP3A4 で代謝されると同時に高い水溶性のために尿中排泄を受けることを認め、薬理活性は保持したまま CYP2D6 による代謝を回避した化合物を創生することに成功した。

以上、本研究は、酸性化合物インドリン/インドール-5-酢酸誘導体が CYP2D6 により代謝されることを初めて見出し、その結果に基づき CYP2D6 による代謝を回避した新しい ACAT 阻害剤の開発に基礎的な成果をおさめたものであり、今後の医薬品設計に有益な情報を提供するものと評価される。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成 21 年 1 月 28 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。