

学位論文

薬物動態予測のための  
CYP 酵素阻害及び誘導に関する  
*in silico* 研究

氏名 半 田 耕 一



## 謝辞

本研究では北里大学薬学部生命創薬科学研究科創薬物理化学教室 広野修一教授，山乙教之講師，中込泉助教及び昭和大学薬学部 合田浩明教授に多大なご指導とご協力を戴いた。ここに感謝の意を表す。

## 目次

謝辞 .....	3
目次 .....	4
学位論文内容要旨 .....	5
略号説明 .....	12
序論 .....	15
第1章 薬物の CYP3A4 阻害に関する <i>in silico</i> 研究.....	31
1.1 緒論 .....	33
1.2 材料と方法 .....	36
1.3 結果 .....	41
1.4 考察 .....	49
第2章 薬物の PXR 活性化による CYP3A4 誘導に関する <i>in silico</i> 研究 .....	53
2.1 緒論 .....	55
2.2 材料と方法 .....	59
2.3 結果 .....	66
2.4 考察 .....	75
第3章 薬物の CYP2D6 の遺伝子多型阻害に関する <i>in silico</i> 研究 .....	83
3.1 緒論 .....	85
3.2 材料と方法 .....	90
3.3 結果 .....	96
3.4 考察 .....	108
結論 .....	117
引用文献 .....	119

# 學位論文內容要旨



新薬開発の成功率は、最初の化合物合成の段階から考えて 0.01%以下と言われており、成功を収めるのは非常に困難である。毎年全世界で米国食品医薬品局（Food and Drug Administration, FDA）に承認される新薬の数は約 20 個であるが、画期的医薬品と呼ばれる、アンメットニーズを満たすようなものはたった 3 個か 4 個程度しか登場していない。また、一つの化合物の合成から新薬の上市に至るまでの期間は平均で約 13.5 年かかり、新薬を上市するまでのコストは平均で約 1 千 8 百億円と報告されている。さらに、多くの先進国では医療費抑制のため、現在国策としてジェネリック医薬品の導入を推奨しており、アメリカでは既に約 7 割がジェネリック医薬品の処方にとって代わられている。新薬の特許切れに伴う、ジェネリック医薬品の置換により、米国では 2010–2014 年度に約 10 兆円の売り上げが転換されると試算されている。これらのことから、今後画期的な新薬開発を成功させるには、開発期間の短縮及び開発コストの低減を目指した、研究開発の劇的な効率化が急務である。

新規医薬品の開発過程を考えると、順に化合物シード探索、リード化合物最適化、非臨床動物試験、臨床試験と続いて行くが、この過程の初期段階では、バーチャルスクリーニング、簡単な化合物合成及び *in vitro* 実験などが主に行われ、必要となるコストは比較的小さい。一方で、後期の段階になるとそれまでにかかったコストに加え、例えば臨床試験に必要なコストは莫大であるため、絶対に失敗できないような状況になって行く。したがって、新薬開発を効率的に行うには、初期段階での正しい研究判断が必要なのはもちろんであるが、現実には開発後期の臨床試験における失敗の例が数多く知られている。これについて、薬物動態の観点から見てみると、その原因として薬物による CYP（Cytochrome P450）阻害、CYP 誘導及び CYP が持つ遺伝子多型への影響などが

考えられ、FDA による非臨床薬物動態相互作用試験ガイダンスや ICH-E5 ガイドラインには、その回避またはそれに関する十分なデータの提示を求める旨が記載されている。これらによる新薬開発の失敗を防ぐには、研究開発の初期段階で薬物動態を考慮して候補化合物を正確に評価し、絞り込むことが重要である。研究の現場では *in vitro* 実験として、LogD 測定、タンパク質結合測定、ミクロソームまたは肝細胞を用いた薬物代謝に関する実験及び Caco-2 細胞または Parallel Artificial Membrane Permeability Assay を用いた膜透過性実験などが実施されているが、探索すべき化合物空間は膨大であるため、これら優れた実験系を用いても十分な数の化合物を評価し切れない。

そこで、本研究では *in silico* 創薬技術を活用して、まず (1) “薬物の CYP3A4 に対する阻害作用に関する *in silico* 研究”，次に (2) “薬物の CYP3A4 に対する誘導作用に関する *in silico* 研究”，最後に (3) “薬物の CYP2D6 の遺伝子多型に対する阻害作用に関する *in silico* 研究”を行い、創薬初期段階における医薬品候補化合物の薬物動態予測手法の確立を目指した。

(1) “薬物の CYP3A4 に対する阻害作用に関する *in silico* 研究”では、薬物による CYP3A4 阻害の定量的な予測を試みた。CYP3A4 はほとんどの医薬品の代謝に関与することが知られており、医薬品候補化合物がこの酵素の働きを阻害する場合、併用され得る既存の医薬品の薬物動態に大きな影響を与えるため、創薬初期段階において可能な限り CYP3A4 阻害活性を持つ化合物をスクリーンアウトすることが望まれる。しかしながら、CYP3A4 の基質結合部位は大きくかつ柔軟性に富んでいるため、様々な化学タイプの化合物の阻害活性を正確に予測することは難しく、これまでに有効な 3 次元定量的構造活性相関 (3D-QSAR) モデルは得られていない。そこで、この研究では分子ドッキングを用いた CYP3A4 阻害予測のための 3D-QSAR モデルの作成を目指した。本研究



では、CYP3A4 阻害活性が定量されている複数の化合物を用いて Glide プログラムによるコンピュータドッキングを行い、評価関数として PMF スコアを用いることによって化合物アライメントを得た。この時、ドッキングには、大きく柔軟な基質結合部位を考慮して、Protein Data Bank に登録されている、複数のヒト CYP3A4 タンパク質を用いた。ドッキングによって得られた化合物アライメントを用いて、Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) を実施した。その結果、 $q^2$  値が 0.565、テストデータセットの  $r^2$  値が 0.986 の統計的に妥当なモデルを得ることができた。これらの結果から、本研究において作成されたモデルを用いることによって、多種多様な構造を持った医薬品候補化合物群であっても、創薬の初期段階で CYP3A4 阻害を定量的に予測することが可能であると考えられた。

(2) “薬物の CYP3A4 に対する誘導作用に関する *in silico* 研究”では、薬物による Pregnane X receptor (PXR) の活性化を介した CYP3A4 誘導の定量的な予測を試みた。PXR はアゴニストによる活性化によって CYP3A4 などの代謝酵素や P-gp などの排出系トランスポーターの発現を誘導することが知られている。そのため、医薬品候補化合物が PXR を活性化する場合、併用され得る既存の医薬品の薬物動態に大きな影響をあたえるため、創薬初期段階において可能な限り PXR アゴニスト活性を持つ化合物をスクリーンアウトすることが望まれる。しかしながら、PXR の基質結合部位は柔軟性に富んでいるため、様々な化学タイプの化合物の CYP3A4 誘導活性を正確に予測することは難しく、これまでに有効な 3D-QSAR モデルは得られていない。そこで、この研究では分子ドッキングを用いた PXR 活性化による CYP3A4 誘導活性予測のための 3D-QSAR モデルの作成を目指した。本研究では、分子動力学 (Molecular Dynamics, MD) シミュレーションのトラジェクトリからサンプリングした PXR タンパク質構造に対して、

CYP3A4 誘導活性が定量されている複数のリガンドを Glide プログラムによってコンピュータドッキングし、結合自由エネルギーを表す Molecular Mechanics-Generalized Born/Surface Area (MM-GB/SA) スコアによって評価、選択されたリガンドアライメントを用いて CoMFA を実施した。作成された 3D-QSAR モデルによって予測された CYP3A4 誘導活性は、実験値と良く一致しており、 $q^2$  値及びテストデータセットの  $r^2$  値はそれぞれ 0.518 及び 0.969 であった。また、化学構造が似ているにも関わらず、CYP3A4 誘導活性が異なる化合物群に関して、その要因をドッキングポーズと CoMFA 等高線から説明することが可能となった。これらの結果から、本研究で得られた 3D-QSAR モデルは多様な構造を持つ化合物の CYP3A4 誘導活性を予測することができ、このモデルを用いることによって、創薬の初期段階において新規な候補化合物の PXR 活性化による CYP3A4 誘導の評価を行うことができると考えられた。

(3) “薬物の CYP2D6 の遺伝子多型に対する阻害作用に関する *in silico* 研究”では、医薬品候補化合物の薬物動態に大きな影響を与える遺伝子多型に注目し、CYP の中でも特に多くの遺伝子多型を持つことが知られている CYP2D6 に対する薬物の阻害作用に焦点を当てた。CYP2D6.17 (自然変異体) は主にアフリカ系の人種に多く見られ、CYP2D6.1 (野生型) に比べて三つのアミノ酸残基の変異 (T107I/R296C/S486T) を持ち、CYP2D6.17 は CYP2D6.1 とは異なった、薬物による阻害活性を持つことが知られている。そこで、この研究ではまず、六つの薬物を用いて、MD シミュレーションのトラジェクトリからサンプリングした複数の CYP2D6.1 構造へ Glide プログラムによるコンピュータドッキングを行い、MM-GB/SA スコアを計算した。次に、薬物の CYP2D6.1 阻害を予測するため、MM-GB/SA スコアに基づく回帰分析を行った。用いた六つの薬物での回帰式による計算値は実験値とよく一致した ( $r^2$  値 : 0.81)。さらに、それら薬物の

CYP2D6.17 阻害を CYP2D6.1 と同様の手法で解析した。これについても回帰式による計算値は実験値とよく一致した ( $r^2$  値: 0.92)。また, 本研究では, CYP2D6.1 と CYP2D6.17 とで薬物による阻害活性が異なる原因について, タンパク質 3 次元構造の違いによって推測することが可能となった。これらの結果から, 本研究の計算手法を用いることによって, CYP2D6 が持つ遺伝子多型による医薬品候補化合物の薬物動態への影響を, 創薬の初期段階で評価することができると考えられた。

最後に, 本研究によって確立された (1), (2), (3) における計算モデルは, 創薬の初期段階であっても, それぞれ医薬品候補化合物の CYP3A4 阻害, CYP3A4 誘導, CYP2D6 遺伝子多型に対する作用を正確に見積もり, その薬物動態予測を可能にするため, 効率的な新薬研究開発の実現に大きく貢献するものと考えられる。

## 略号説明

3D	: Three dimensional
AChE	: Acetylcholinesterase
AUC	: Area Under the Concentration Curve, 薬物血中濃度－時間曲線下面積
C <sub>max</sub>	: Maximum Concentration, 最高血中濃度
CoMFA	: Comparative Molecular Field Analysis
CoMSIA	: Comparative Molecular Similarity Index Analysis
CYP	: Cytochrome P450, チトクローム P450
DDIs	: Drug-Drug Interactions, 薬物間相互作用
EM	: Extensive Metabolizers
FDA	: Food and Drug Administration, 米国食品医薬品局
GSK-3	: glycogen synthase kinase-3
HNF- $\alpha$	: hepatocyte nuclear factor $\alpha$
ICH	: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IFD	: Induced Fit Docking, インデューズフィットドッキング
IM	: Intermediate Metabolizers
JNK-1	: c-Jun N-terminal kinase-1
LBD	: Ligand Binding Domain

MD	: Molecular Dynamics, 分子動力学
MM-GB/SA	: molecular mechanics-generalized Born/surface area
MM-PB/SA	: molecular mechanics-Poisson Boltzmann/surface area
nsec	: nano seconds
P-gp	: P-glycoprotein
PAMPA	: Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
PDB	: Protein Data Bank
PLS	: Partial Least Squares
PM	: Poor Metabolizers
PPAR $\gamma$ -1 $\alpha$	: peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ coactivator-1 $\alpha$
psec	: pico seconds
PXR	: pregnane X receptor
QSAR	: Quantitative Structure-Activity Relationship, 定量的構造活性相關
RMS	: Root Mean Square
RMSD	: Root Mean Square Deviation
RXR	: retinoid X receptor
SAR	: Structure-Activity Relationship, 構造活性相關
SB	: Structure Based
SRC-1	: steroid receptor coactivator-1
UM	: Ultrarapid Metabolizers
vdW	: van der Waals

VEGFR-2 : vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase-2

XREM : xenobiotic responsive enhancer molecule

# 序論

新薬開発の成功率は、化合物合成（化合物シード探索）の最初の段階から考えて 0.01%以下と言われており、成功に至るには非常に狭き門より入らなければならない。

毎年全世界で米国食品医薬品局（FDA, Food and Drug Administration）に承認される新薬の数は 20 個程度であるが、画期的医薬品と呼ばれる、アンメットニーズを満たすようなものはたった 3 個か 4 個程度である。<sup>1</sup> 一つの化合物の合成から新薬の上市に至るまでの期間は平均で約 13.5 年かかると言われている。また新薬開発には膨大なコストがかかり、一つの化合物の上市には平均で約 1 千 8 百億円かかると試算されている。<sup>1</sup> さらに、多くの先進国では医療費抑制のため、現在国策としてジェネリック医薬品の導入を推奨しており、アメリカでは既に約 7 割がジェネリック医薬品の処方にとって代わられている。<sup>2</sup> 新薬の特許切れに伴うジェネリック医薬品の置換により、米国では 2010–2014 年度に約 10 兆円の売り上げが転換される。<sup>3</sup> 日本国においてもジェネリック医薬品の推奨が行われており、特許期間を長く保つために迅速な研究開発が求められている。以上より、今後新薬開発に根ざした製薬企業が生き残って行くには、時間及び費用のかからない、研究開発の劇的な効率化が必要不可欠である。<sup>1</sup>

まず新薬承認に至るまでのプロセスについて考えてみる。新薬開発は幾つかの段階に分けて考えられており、順に化合物シード探索、リード化合物最適化、非臨床動物試験、臨床試験と続く。そして、臨床試験が成功すると晴れて規制当局より販売承認を得ることができる。この新薬開発プロセスの各段階で必要なコストと事業判断について考えてみると、プロセスの初期段階では、簡単な化合物合成や *in vitro* 実験などが主に行われ、ここにかかるコストは小さく、仮に成功に至らなかったとしても事業方針の転換をはかりやすい。一方で、プロセスの後期になるとそれまでの累積コストに加え、臨床研究に



かかるコストは莫大であり、失敗できないような状況になって行く。いずれの製薬企業でもこういった認識を持っているにもかかわらず、実際には候補化合物開発後期の臨床試験及び上市後間もない薬物の失敗は後を絶たない。<sup>4, 5</sup>

この原因について、1990年代には臨床試験失敗の約四割が薬物動態に起因すると報告されていたが、その後薬物動態試験の重要性が見直され、製薬企業における創薬の初期段階には薬物動態探索試験が組み入れられるようになった。現在は徐々に改善されてきている。<sup>6</sup> 今日では、創薬における薬物動態研究は、化合物シード探索に始まり、リード化合物最適化、非臨床動物実験、臨床試験に至る全過程に関わっており、新薬開発に重要な役割を果たしている。<sup>7</sup> 効率的な新薬創出のために、創薬の初期段階に導入されている *in vitro* 実験として、LogD 測定<sup>8</sup>、タンパク質結合率測定<sup>9</sup>、ミクロソームまたは肝細胞を用いた薬物代謝に関する実験<sup>10</sup> 及び Caco-2 細胞または Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) を用いた膜透過性に関する実験<sup>11</sup> などがある。これら *in vitro* 実験を用いることによって、創薬初期段階での候補化合物の薬物動態学的特性に関するスクリーニングが可能となり、評価できる化合物数が格段に増えた。<sup>12</sup> しかしながら、探索すべき化合物空間は膨大であるため、これら優れた実験系を用いても十分な数の化合物を評価し切れない。事実、依然として開発中止になる候補化合物は多く、上市後でも販売停止になる薬剤が見られる。この理由の大きな部分を占めるのが、薬物による代謝酵素阻害及び代謝酵素誘導である。

薬物による代謝酵素阻害及び代謝酵素誘導が問題となるのは、それらが近年注目を集めている薬物間相互作用 (DDIs, Drug-Drug Interactions) を引き起こすためである。DDIs は、ある薬が自分自身または他の薬の薬物動態に影響を与えるために生じる。そのため、個々の患者が複数の薬を処方される場合に DDIs を起こす確率が増える。加齢に伴う多

疾病罹患の増加によって一人の患者に複数の薬を処方する必要性が生じており、結果として平均 65 歳の患者で同時に五つの薬を処方されている。<sup>13</sup> また、ヨーロッパでは、平均 81 歳の 34% から 68% で六つ以上の薬を同時に処方されている、との報告がある。<sup>14</sup> したがって、DDIs は加齢によって、高い確率で起こり得る現象であり、高齢化の進んでいる日本などでは特に注意が必要である。この DDIs の分子メカニズムのほとんどの場合は、薬物が cytochrome P450 (CYP) へ影響を与えるために起こる。<sup>15</sup> CYP は様々な生物種における化合物の代謝過程に大きな役割を担っており、内因的な生物活性分子だけではなく、薬などの外因的な生物活性化合物の代謝にも関わっている。<sup>16, 17, 18, 19</sup> DDIs のほとんどは薬物による CYP 阻害に起因し、一部は CYP 誘導に起因することが知られている。これらに關与する代表化合物の一覧を Table 1 に示す。ここから、多数の薬剤が DDIs に關与することが分かる。<sup>20</sup> CYP 酵素阻害に関する有名な例としては、抗高血圧薬であるミベフラジルが知られている。これは医薬品市場から撤退させられた薬物であり、この薬物は CYP を阻害し、多くの薬剤と DDIs を引き起こしてしまった。<sup>21</sup> ヒト臨床研究では、単独投与に比べてこのミベフラジル同時投与がトリアゾラムの AUC (Area Under the Concentration Curve, 薬物血中濃度-時間曲線下面積) を 900% に上昇させている。<sup>22</sup> また、CYP 酵素誘導に関する有名な例として、抗マイコバクテリウム薬リファンピシンが知られており、リファンピシンが CYP 誘導作用を持つため、抗真菌薬ボリコナゾールと併用された場合にボリコナゾールの AUC 及び C<sub>max</sub> (Maximum Concentration, 最高血中濃度) を 90% 以上減少させ、その薬効を消失させてしまう。<sup>23</sup> このためリファンピシンとボリコナゾールの併用は禁忌となっている。<sup>24</sup>

Table 1 CYP が関連する DDIs に関与する薬剤

Substrates					
CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5	
Clozapine	<b>NSAIDs</b>	<b>Proton pump inhibitors</b>	<b>Beta-blockers</b>	<b>Macrolide antibiotics</b>	<b>Statins</b>
Imipramine	Celecoxib	Omeprazole	Metoprolol	Clarithromycin	Atorvastatin
Mexiletine	Diclofenac	Lansoprazole	Propafenon	Erythromycin	Lovastatin
Naproxen	Ibuprofen		Timolol		Simvastatin
Tacrine	Naproxen	<b>Miscellaneous</b>		<b>Benzodiazepines</b>	
Theophylline	Piroxicam	Amitriptyline	<b>Antidepressants</b>	Alprazolam	<b>Anticoagulants</b>
		Clomipramine	Amitriptyline	Diazepam	Apixaban
	<b>Antidiabetics</b>	Clodogrel	Clomipramine	Midazolam	Rivaroxaban
	Glipizide	Cyclophosphamide	Desipramine	Triazolam	Phenprocoumon
	Tolbutamide	Diazepam	Duloxetine		
		Phenytoin	Imipramine	<b>Calcium channel blockers</b>	<b>Miscellaneous</b>
	<b>Angiotensin receptor blockers</b>		Paroxetine	Amlodipine	Aripiprazole
	Irbesartan		Venlafaxine	Diltiazem	Buspirone
	Lorsartan			Felodipine	Quinidine
			<b>Antipsychotics</b>	Nifedipine	Quinine
	<b>Miscellaneous</b>		Aripiprazole	Nisoldipine	Ethinylestradiol
	Cyclophosphamide		Haloperidol	Nitrendipine	Imatinib
	Fluvastatin		Risperidone	Verapamil	Sildenafil
	Phenytoin		Thioridazine		Tamoxifen
	Sulfamethoxazole			<b>Immunosuppressants</b>	Vincristine
	Torsemide		<b>Opioids</b>	Ciclosporin	
	Warfarin		Codeine	Tacrolimus	
			Dextromethorphan	Sirolimus	
			Tramadol		
			<b>Miscellaneous</b>	<b>HIV protease inhibitors</b>	
			Ondansetron	Indinavir	
			Tamoxifen	Ritonavir	
				Saquinavir	
Inhibitors					
<b>Fluoroquinolones</b>	Amiodarone	<b>SSRIs</b>	<b>SSRIs</b>	<b>HIV protease inhibitors</b>	<b>Azole antimicrobials</b>
Ciprofloxacin	Fluconazole	Fluoxetine	Duloxetine	Indinavir	Fluconazole
Ofloxacin	Isoniazide	Fluvoxamine	Fluoxetine	Nelfinavir	Itraconazole
Levofloxacin			Paroxetine	Ritonavir	Ketoconazole
		<b>PPIs</b>			Voriconazole
		Lansoprazole	<b>Miscellaneous</b>	<b>Macrolides</b>	
<b>Miscellaneous</b>		Omeprazole	Amiodarone	Clarithromycin	<b>Miscellaneous</b>
Amiodarone			Bupropion	Erythromycin	Aprepitant
Cimetidine		<b>Miscellaneous</b>	Cimetidine		Amiodarone
Fluvoxamine		Ketoconazole	Quinidine		Cimetidine
Ticlopidine		Ticlopidine	Chlorphenamine		Diltiazem
			Clomipramine		Naringin
			Ritonavir		Verapamil
Inducer					
Tobacco smoke	Rifampicin			Carbamazepine	
Omeprazole				Efavirenz	
				Hyperforin	
				Phenobarbital	
				Phenytoin	
				Rifampicin	

この他にも様々な薬物で CYP 阻害及び誘導について多数の例が報告されている。<sup>25, 26,</sup>

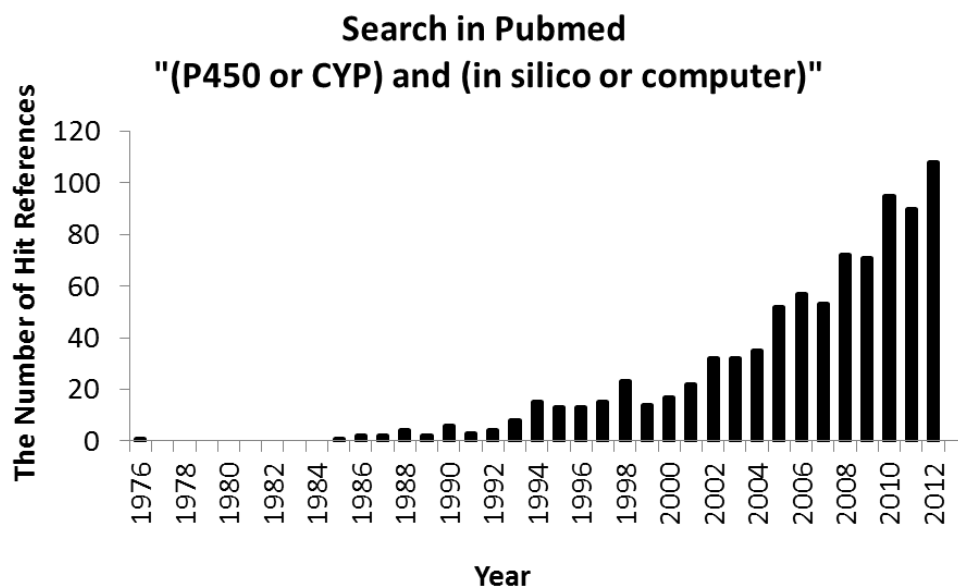
27, 28, 29, 30, 31, 32

この時、新薬を開発する製薬企業の立場から考えると、新薬開発において、より後期

の段階または上市して間もない段階での失敗は事業として致命的な失敗であり、非効率な要素を多く含んでいる。本研究では、CYP 阻害及び CYP 誘導による薬物動態に関する問題を創薬の初期段階において回避できる方法を考え、新薬開発の効率化を目指すことにした。先に挙げた臨床研究の事例から明らかなように、CYP 阻害による DDIs は薬物の血中濃度を極端に上昇させるので、思いもよらぬ毒性発現の機会を与え、このような薬剤は、時に市場からの撤退を余儀なくされる。したがって、様々な背景で起こる CYP 阻害についての予測を、創薬の初期段階で可能にすることが重要である。そこで、本論文では既販医薬品の代謝の大半に CYP3A4 が関与することを踏まえ<sup>33</sup>、第 1 章では薬物の CYP3A4 阻害についての研究を行った。次に、CYP 誘導による DDIs は薬物の血中濃度を極端に下げ、その有効性を減じる可能性があり、薬剤申請の段階においても酵素誘導に関するデータは必須とされる。<sup>34</sup> よって、本論文の第 2 章ではヒトにおける化合物の PXR 活性化による CYP3A4 誘導についての研究を行った。<sup>35</sup> CYP3A4 は、薬物の結合によって活性化された pregnane X receptor (PXR) が発現を誘導し、これが他の薬物の動態に影響を与えるので、薬物が PXR に結合するかどうかを予測することで、DDIs を起こしにくい候補化合物を創薬の初期段階に選ぶことができる。最後に、CYP3A4 の次に医薬品代謝に大きく関わる CYP2D6 では様々な遺伝子多型が知られており、DDIs との関係においても重要である。<sup>36</sup> 例えば、同じ薬剤であっても投薬対象となる人種によって阻害作用が異なる場合、様々な人種の患者に薬剤が用いられると、思わぬ DDIs が現れることが考えられる。したがって、第 3 章では特に薬物による CYP2D6 遺伝子多型阻害について深く掘り下げることにした。現在、自国のデータを国外の申請資料として用いる際に、ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) ガイドラインに

は人種差を調べることが求められており、この点からも新薬開発プロセスにおける人種間差の検討は重要である。<sup>37</sup>

これら CYP 阻害及び CYP 誘導に関する挑戦的な研究課題を、実験によって解決する場合には、数多くの試験を実施する必要がある、非常に長い年月と多くの費用がかかってしまうので、本研究の目的である新薬開発プロセスの効率化を達成できない。さらに、一般的に実験で扱える化合物数は、人的及び財政的要因のために限りがある。そこで近年では、扱える化合物数に制限のない、*in silico* 手法に注目が集まっており、薬物動態の分野にも同手法が登場してきている。<sup>38, 39, 40</sup> 実際、年代と共に発表されている文献数について文献検索サイト PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) でキーワードに「(P450 or CYP) and (in silico or computer)」を用いて調べた所、1970, 80 年代までは年に 1, 2 報であったのに対して、1990 年代から徐々に増え始め、2000 年代には飛躍的にその数を伸ばし、2012 年には年間に 100 以上の報告がされるようになっている (Figure 1)。このことは、計算機自体の性能が向上したこと及び計算手法が発展しているという背景によるものと考えられる。本研究では近年進展し続けている、*in silico* 手法を駆使して、先に挙げた三つの研究課題に取り組み、CYP 阻害及び誘導に関する問題の解決を導くことで、劇的な新薬開発プロセスの効率化を目指す。ここで、まず本研究での中心的な手法となる薬物動態予測に関する *in silico* 手法について Gleeson らの分類を参考にして、まとめていく。<sup>38</sup>



**Figure 1** 発表論文数

a) 類似性探索手法：これは最も単純な手法の一つとしてリガンド自身の類似原理を採用した手法であり，化合物セットの類似性をフィンガープリントやフラグメントベース記述子を用いて計算する。<sup>41</sup> この手法は，化学構造の似ている（例えば，谷本係数で 0.95 以上の）分子は似た活性を示す，という仮説に基づく。この手法の長所は計算の単純さとそのスピードである。一方で，この手法の欠点はその根幹となる仮説にある。すなわち，この仮説は似た分子は似た活性を示す，というものであるが，多くのそうではない事例が報告されており，少しの化学構造変化でも劇的に生物活性が変わることがある。この現象はアクティブクリフと呼ばれている。<sup>42, 43, 44</sup> したがって，この手法が適用可能なのはアクティブクリフの現れないような，単純な生物システムに限られると言える。

b) 質的構造活性相関 (SAR, Structure-Activity Relationship) 手法：次に質的 SAR を

用いた文字通り質的なリガンドに基づいた手法が挙げられる。これは既知活性化合物を解析し、活性と不活性を分ける分子特徴を、主観的に同定するという手法である。<sup>45</sup> この手法は、実験的アッセイにて試験されていない化合物の質的なリスク評価に用いられる。<sup>46, 47</sup> この手法の長所は、分子特性や置換基またはフラグメントに基づいて解析する方法なので、活性と分子構造との関係を理解しやすいことにある。しかしながら、この手法の欠点は、その理論的背景の脆弱性にある。この手法では分子の前後関係情報を欠いてしまう。すなわち、ある官能基の存在が他の分子特徴との存在下でのみ受け入れられるという場合である。<sup>43</sup> また、もちろん定量的な見積もりは難しく、多くの場合は不可能である。

c) 定量的構造活性相関 (QSAR, Quantitative Structure-Activity Relationship) 手法 : SAR モデルの拡張版として、生物活性レベルの予測を目指した QASR 手法が知られている。<sup>48, 49</sup> この手法によって作成されるモデルは、生物活性値と分子記述子セットとを関連づける量的志向に基づく。これらモデルは各記述子の値を用いて、線形回帰, PLS (Partial Least Squares) 回帰または様々な機械学習アルゴリズムによって、生物活性値を予測するようにフィッティングされる。QSAR モデルには同属の化合物を用いた場合のローカルモデルと、多様な化学構造の化合物を用いたグローバルモデルがある。<sup>50, 51, 52</sup> この手法の長所は、トレーニングデータセットを用いて、統計的なフィッティングを行うので、予測精度の高いモデルを提唱できることである。さらに、質的 SAR とは異なり、定量的な値として、生物活性予測値を提供できる。一方で、この手法の短所は、モデル作成に用いた化合物と構造の大きく異なる化合物の予測ができないことである。この問題は Applicability Domains (AD) としてよく知られている。<sup>53</sup> また、モデル作成において機械学習アルゴリズムを用いた場合には、高い精度が期待される反面、予測結果

と化合物の化学構造との関係を解釈することが困難か、または不可能である。これは機械学習には多くの分子記述子が用いられ、またその計算アルゴリズムが複雑過ぎることによる。さらに、必要以上に多くの記述子を用いると、オーバーフィッティングを起こしてしまう。<sup>54</sup> したがって、この手法では常に厳密な統計手法によるモデル検証を行う必要がある。

d) Three dimensional-structure based (3D-SB) 手法： 3D-SB 手法はタンパク質の3次元構造情報を用いる方法であり、代表的な例としてタンパク質構造モデルへのリガンドのドッキング研究が挙げられる。<sup>55</sup> この手法の長所は、リガンドとタンパク質の相互作用を見ることができるので、生物活性と構造の関係を解釈しやすく、ドラッグデザインに適していることである。また、タンパク質構造を元になっているので、ある程度多様な化学構造のリガンド群であってもこの手法を適用することができ、前述した QSAR モデルで問題となった AD とは無縁な予測モデルを作成することができる。一方で、この手法の短所はタンパク質の X 線結晶構造などから得られる 3 次元構造情報がない場合には、この手法の適用が難しいことが挙げられる。また、タンパク質の 3 次元構造情報が得られている場合でも、薬物動態に関わるタンパク質がしばしばそうであるように、(1) タンパク質構造が柔軟である場合、すなわちインデュースフィットを起こすような場合には、正確なドッキング計算をすることが非常に難しくなる。<sup>56</sup> さらに、(2) この手法で定量的な予測をする多くの場合、すなわち 3D-QSAR モデルへと発展させる場合には、スコア関数から得られるエネルギー値（例えばドッキングスコア）との相関を調べ利用するが、必ずしも良い相関が得られないことが知られている。<sup>57</sup>

さてここで、薬物動態予測のため、本研究課題にどういった *in silico* 手法が適するかについて、前述の a) 類似性探索手法、b) 質的 SAR 手法、c) QSAR 手法及び d) 3D-SB



手法を踏まえて考えてみる。まず、創薬の初期プロセスにおいても、生物活性予測値の正確性は欠かせないので、アクティブクリフの問題を考えると a) 類似性探索手法は適していないと考えられる。次に、定量性が化合物の順位を付けるのに役立つ場面が、創薬の初期プロセスであっても多いため、定量性のない b) 質的 SAR 手法も適していないと考えられた。統計手法は近年様々なものが提案されてきているものの、機械学習アルゴリズムの複雑性には変わりはなく、機械学習を用いた c) QSAR 手法は予測結果と化合物の化学構造との関係を解釈することが困難であるため、化合物デザインの指針となりにくい。最後に d) 3D-SB 手法については、リガンド-タンパク質間の相互作用を視覚的に得ることができるので、化合物デザインの指針を得ることができ、新薬開発プロセスでは有用な手法と考えられる。また、近年薬物動態に関するタンパク質として CYP やトランスポーターなどの X 線結晶構造が次々に解かれており、3D-SB 手法を薬物動態学の分野に適用することがますます可能となってきた。したがって、3D-SB 手法の短所として先に挙げた、(1) タンパク質の柔軟性と、(2) 定量化のためのスコア関数の問題を解決することができれば、これが薬物動態予測に最も適した *in silico* 手法となり得るものと考えられた。そこで、次に d) 3D-SB 手法の問題 (1), (2) を解決する方法について考えた。

まず、(1) 3D-SB 手法におけるタンパク質の柔軟性の問題に関しては、これを扱うのにいくつかの方法が提案されている。一つ目は、X 線結晶構造が最も確かな生物構造情報であるので、対象のタンパク質に関して、複数の X 線結晶構造が既に解かれている場合には、それら総てをそのままドッキング研究に用いる、という方法がある。この手法を X 線結晶構造に基づく複数タンパク質構造手法と呼ぶ。X 線結晶構造などの実験的構造を用いる大きな利点は、それらが全タイプのコンフォメーション変化を含んでい

ることであり、側鎖の小さなものから、ループの大きな動きまで考慮できることにある。

しかしながら、残念なことに多くの臨床的に興味をもたれているタンパク質では、あったとしてもたった一つの実験的構造が得られているのみである。そこで、二つ目として、普遍的に適用できる手法である、分子動力学 (MD, Molecular Dynamics) シミュレーションがタンパク質の動きを研究するのに、広く用いられている。MD は分子 (リガンド、タンパク質及び水など) の物理的な動きのコンピュータシミュレーションである。ここでは、分子はある時間の間に他の分子と相互作用することができ、その時の原子の動きを見ることができる。多くの場合、分子のトラジェクトリは相互作用粒子システムの動きについてのニュートン方程式を数値的に解くことで得られる。MD トラジェクトリから得られたスナップショットアンサンブルはドッキング研究でのタンパク質構造として直接用いることができる。<sup>58</sup> 一般的に MD シミュレーションの結果は、ピコからナノ秒の時間スケールにおいてタンパク質構造変化が実験結果と良く一致する。<sup>59, 60</sup> この方法を MD シミュレーションに基づく複数タンパク質構造サンプリングと呼ぶ。三つ目としては、インデュースフィットドッキング (IFD, Induced Fit Docking) 手法を用いる方法がある。<sup>61, 62, 63</sup> これは、ドッキング処理の最中に直接タンパク質とリガンドの動きの自由度を計算し、それを利用する方法である。一般的に、もしこのタンパク質とリガンドの全自由度が計算され、正確なスコア関数を利用できたなら、IFD は最も正確なドッキング手法と言える。しかしながら、実際にはインデュースフィットの効果を小さなものも含めて総て考慮することはリガンド-タンパク質相互作用の機構が著しく複雑なために困難であり、インデュースフィットの効果が簡略化されてしまうことにより、IFD は何も考慮しない単なるリジットドッキングにすら劣ることがある。<sup>56</sup> したがって、本研究ではタンパク質の柔軟性を考慮するために、IFD は用いず、対象タンパク質の X

線結晶構造が多数解かれている場合には、X 線結晶構造に基づく複数タンパク質構造手法を用い、対象タンパク質の X 線結晶構造が小数個だけ解かれている場合には、MD シミュレーションに基づく複数構造サンプリング手法を用いることが望ましいと考えた。

次に、(2) 3D-SB 手法における定量的予測 (3D-QSAR モデル化) を可能にするためのスコア関数の問題について考える。多くの分子ドッキング手法において、大抵のスコア関数はドッキングポーズ生成プログラムに付随しており、二つの目的で用いられる。一つはリガンドの正しい結合ポーズを同定することであり、もう一つは予測されたスコア (相互作用エネルギー) 値を用いてリガンドの結合親和性を順位付け予測することにある。手順は状況に応じて変わり、例えばある計算コストのかからないドッキングプログラムに付随したスコア関数が、リガンドの結合ポーズを予測するために用いられ、その後でトップスコアのリガンドポーズに与えられたスコア値を、そのまま結合親和性の順位付け予測に用いる場合がある。また例えば、結合ポーズ予測までは同じ手順であるが、その後でトップスコアまたはトップ数%以内のスコアを持つリガンドポーズに対して計算コストのかかる、より正確なスコア関数で再度計算して、結合親和性をこのスコア値を用いて順位付け予測するのに用いる場合などがある。分子ドッキングにおけるスコア関数は大きくに三つのタイプに分けられ、力場的関数、経験的関数及び知識的関数がある。力場的関数は伝統的な力場に基づいて非結合相互作用を計算することで結合親和性を見積もるもので、DOCK<sup>64</sup> や Autodock<sup>65</sup> などがある。経験的関数はファンデルワールスエネルギー、静電エネルギー、溶媒和エネルギーなどの相互作用項をスコアリングのための可変パラメータによって経験的に重み付けしたものであり、Ludi<sup>66</sup>, FlexX<sup>67</sup>, ChemScore<sup>68</sup>, Xscore<sup>69</sup> 及び Glide<sup>70</sup> などがある。これらパラメータは、結晶複合体セットの実験的結合自由エネルギーからフィッティングによって決定されている。知識的関

数はリガンド-タンパク質複合体で見られる原子間距離の統計解析から開発されたものであり、SMoG<sup>71</sup>、PMF<sup>72</sup> 及び DrugScore<sup>73</sup> などがある。さらに、2000 年前後から分子力学的エネルギーと露でない溶媒モデルである molecular mechanics-Poisson Boltzmann/surface area (MM-PB/SA) 法及び molecular mechanics-generalized Born/surface area (MM-GB/SA) 法が自由エネルギー計算と分子ドッキング研究に登場した。<sup>74, 75, 76</sup> 計算コストはかかるが、MM-PB/SA 法と MM-GB/SA 法は大抵のスコア関数よりも正確である。多数の研究においてタンパク質-リガンド結合の実験データを用いて、分子ドッキングでの多くのスコア関数と MM-GB/SA 法を比較した所、結合ポーズ及び結合親和性予測で、MM-GB/SA 法がより優れていることが示されている。<sup>77, 78</sup> しかしながら、スコア関数として用いた場合の MM-GB/SA スコアを含むドッキングに用いられるスコア関数の不断の改良にも関わらず、それぞれのスコア関数の単独での能力はタンパク質-リガンドシステム依存性があり必ずしも高いとは言えない。<sup>57, 79</sup> それゆえ近年では、複数のスコア関数を組み合わせて用いたドッキング研究の成功例が増えている。<sup>80, 81, 82, 83, 84, 85</sup> この手法によって、共結晶化されたタンパク質中のリガンドの X 線結晶構造位置を高確率で再現できるが、一般的に X 線結晶構造位置の再現よりも結合親和性予測がはるかに困難であることが知られている。スコア関数の中では、MM-GB/SA 法が最も結合親和性予測に優れているとの報告があるので、これを用いるのが第一選択であると思われるが、それでも困難な場合があると言わざるを得ない。<sup>77</sup>

そのような場合には、ドッキングで得られた複数のリガンドの分子アライメントを用いて Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) モデルを作成し、結合親和性予測を行うのが最も信頼のおける方法であると考えられる。しかしながら、CoMFA 法は統計計算に基づいた手法であり、トレーニングデータセット化合物が 10 個かそれよりもっ

と多く必要となる。したがって、生物活性値が得られており、トレーニングデータセットとして用いることができる化合物の数が充分である場合にのみ、この手法は適用可能である。CoMFA 法の詳細は次の通りである。まず対象とする活性化合物群の分子アライメントを、それ囲む三次元格子点上に配置し、次にそれぞれの格子点において、プロンプ原子 (+1 に荷電した  $sp^3$  炭素) と各アライメントされた活性化合物との立体相互作用エネルギー (レナードジョーンズポテンシャル) 及び静電相互作用エネルギーを計算する。そして、この各格子点のエネルギー値と化合物の活性値を用いて PLS 解析を行い、化合物の活性値を予測する、という方法である。<sup>86</sup> 本研究のように、3D-SB 手法を用いる場合、この CoMFA 法を適用する際、リガンドの分子アライメントは分子ドッキングの結果を用いることになる。この時、この手法を SB CoMFA 法と呼ぶ。<sup>87</sup> これまでに、SB CoMFA 法では多くの成功例が報告されており、例えば acetylcholinesterase (AChE)<sup>88</sup>, glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)<sup>89</sup>, c-Jun N-terminal kinase-1 (JNK-1)<sup>90</sup> 及び vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase-2 (VEGFR-2)<sup>91</sup> などがある。また、このドッキング計算を用いた、ストラクチャーベースでのリガンドの分子アライメントの取得は、リガンドベースでの分子アライメントよりも CoMFA モデルの統計結果が優れたものになると報告されている。<sup>92, 93, 94, 95</sup> さらに、CoMFA モデルはリガンドの位置について立体及び静電的に好ましい場所と好ましくない場所についての等高線を与えるので、リガンドデザインに大きく役立つものと考えられる。

以上を踏まえて、本論文では、*in silico* 創薬技術を活用して、薬物動態予測を新薬開発プロセスの初期段階に利用することで、新薬開発期間の短縮及び開発費用の低減による、研究開発の効率化を目指すことにした。具体的な手法として、3D-SB 手法を用い、タンパク質の柔軟性に対する処置として、対象タンパク質の X 線結晶構造が多数解か

れている場合には、X 線結晶構造に基づく複数タンパク質構造手法を用い、対象タンパク質の X 線結晶構造が小数個だけ解かれている場合には、MD シミュレーションに基づく複数構造サンプリング手法を用いることにした。また、予測の定量化にともなうスコア関数に対する処置としては、データセット化合物が少ない場合にはスコア関数を組み合わせる用い、データセット化合物が十分な場合には CoMFA 法を用いることにした。まず第一章では“薬物の CYP3A4 阻害に関する *in silico* 研究”，第二章では“薬物の PXR 活性化による CYP3A4 誘導に関する *in silico* 研究”，第三章では“薬物の CYP2D6 の遺伝子多型阻害に関する *in silico* 研究”を行い、創薬初期段階における医薬品候補化合物の薬物動態予測手法の確立を目指した。

## 第 1 章 薬物の CYP3A4 阻害に関する *in silico* 研究





## 1.1 緒論

CYP3A4 は高い発現レベルを保ち、幅広く基質を認識するので、CYP ファミリーの中でも、特に重要な酵素である。<sup>96, 97, 98</sup> また、上市された薬物の約 40% は CYP3A4 の代謝を受けることが知られている。<sup>99</sup> それゆえ、CYP3A4 の代謝活性を阻害する化合物は他の CYP3A4 基質の体内動態に影響を与え、DDIs を引き起こし、重篤な副作用を招く可能性がある。<sup>100, 101, 102, 103, 104</sup> 仮に、候補化合物に DDIs を引き起こす疑いがあった場合には、ヒト臨床試験を行う価値があるかどうかを判断するため、FDA などの規制当局からこれに関する試験を求められる。<sup>34</sup> したがって、候補化合物の CYP3A4 との相互作用は創薬の初期段階に調べておくことが懸命であり、これを調べるのにしばしば肝ミクロソームを用いた CYP 阻害実験が実施されている。<sup>105</sup> しかしながら、こういった実験には費用と人材が要請されるので、試験可能な化合物数には限界がある。この時、*in silico* 手法を用いて CYP 阻害の予測を行うことができれば、評価できる化合物数が飛躍的に伸びる。実際これまでに、CYP3A4 阻害に関する多くの計算予測モデルが発表されている。<sup>106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116</sup>

2010 年までにヒト CYP3A4 の X 線結晶構造が既にいくつか解かれており、これら X 線結晶構造の PDB (Protein Data Bank) コードは、1TQN, 1W0E, 1W0F, 1W0G, 2J0D, 2V0M 及び 3NXU である。<sup>117, 118, 119, 120</sup> 1TQN と 1W0E の構造はリガンドなしのアポ構造である。<sup>117, 118</sup> 1W0G は Metyrapone が結合した複合体構造であるが、この Metyrapone は分子量が 226 と比較的小さいため、アポ構造とほとんど変わらなかった。<sup>118</sup> 1W0F は

Progesterone との複合体構造であるが、この Progesterone が結合しているサイトはタンパク質表面であり、この構造もアポ構造とほとんど変わらなかった。この結合サイトが真のサイトであるのかアーティファクトであるのかについては議論される所ではあるが、このサイトは代謝反応が起こるヘム上にはないことは確かである。<sup>118</sup> 2J0D は Erythromycin との複合体であるが、この Erythromycin の結合ポーズでは代謝されることが分かっている化合物部分構造は、代謝反応が起こるヘムに向いておらず、この結合ポーズは活性コンフォメーションではないことが示唆されている。<sup>119</sup> 2V0M の構造は Ketoconazole との複合体構造であり、F-G 領域及び C 末端のループ構造において、リガンドがないアポ構造の CYP3A4 に比べて劇的なコンフォメーション変化を起こしていた。アポ構造にこの Ketoconazole 複合体構造を重ね合わせると、総ての C $\alpha$  原子に関しての RMSD (Root Mean Square Deviation) は 1.6 Å に達した。<sup>119</sup> 3NXU の構造は Ritonavir との複合体構造であり、この構造でも F-G 領域及び C 末端のループ構造において劇的なコンフォメーション変化を起こしていた。<sup>120</sup> これら構造のリガンド結合空間を観察した結果、二つの重要なアミノ酸グループの存在が注目されてきた。一つ目は親水性アミノ酸に関わるものであり、二つ目は Phe に関わるものである。一つ目の親水性アミノ酸のグループは Tyr53, Asp61, Asp76, Arg106, Arg372 及び Glu374 から成り、これらはリガンド結合空間の片側に集中しており、水素結合形成に重要な役割を果たしていると考えられている。<sup>117</sup> ここではこれを”親水性に富んだ領域”と呼ぶ。二つ目のアミノ酸グループは Phe108, Phe213, Phe215, Phe219, Phe220, Phe241 及び Phe304 から成り、これらはリガンド結合空間の天井部分に集中しており、リガンドとの疎水性相互作用に重要な役割を果たしていると考えられている。<sup>118</sup> ここではこれを”Phe クラスター”と呼ぶ。

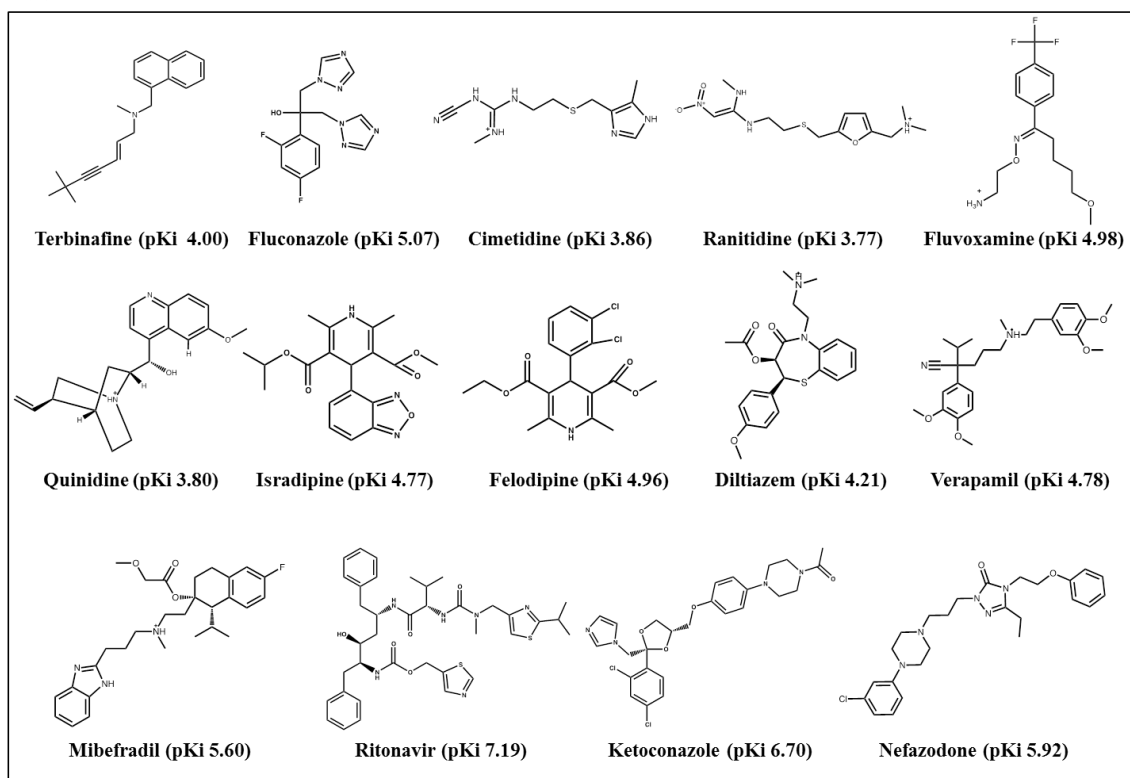
この研究では、薬物によるヒト CYP3A4 阻害を予測するために、コンピュータドッキングに基づいた SB CoMFA 手法により 3D-QSAR モデルを作成した。この SB CoMFA モデルは単に阻害活性値を予測するだけでなく、リガンドの結合ポーズを予測することができるので、CYP3A4 阻害回避のための構造展開として広く用いることができる。<sup>86</sup> しかしながら、今日までに SB CoMFA 手法を CYP ファミリーに適用した例は非常に少ない。<sup>87</sup> CYP タンパク質は構造が柔軟性に富んでいるためにドッキング研究を行うことが難しく、CYP ファミリーに関して発表されている予測モデルはほとんどがリガンドベースアプローチである。<sup>121, 122, 123, 124, 125</sup> この CYP の柔軟性の問題を克服するために、本研究ではドッキングタンパク質として複数の X 線結晶構造を用い、いわゆる X 線結晶構造に基づく複数タンパク質構造サンプリング-ドッキング手法を用いた。<sup>56</sup> さらに、タンパク質-リガンド相互作用エネルギー計算のために、知識的スコア関数である PMF スコア関数を用いることにした。<sup>72</sup> 最後に代表的な化合物のドッキングポーズを観察することで、CYP3A4 で考えられるリガンド - タンパク質相互作用についての考察を行った。

## 1.2 材料と方法

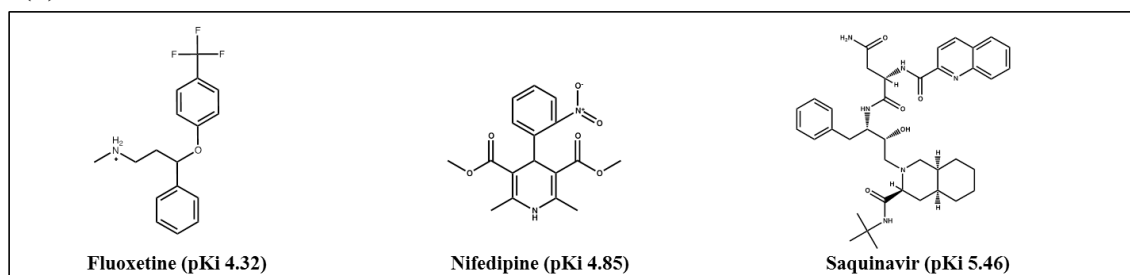
**リガンドデータ：**ヒト CoMFA モデル作成のために使用したリガンドの化学構造を Figure 2 に示した。これら構造的に多様な化合物は、一つの文献に記載されているものから取得した。それぞれの  $K_i$  値の自然対数 ( $pK_i$  値) もまた同じ文献に記載されているものを使用した。なお、この実験では肝ミクロソームを用いて  $K_i$  値の測定が行われていた。<sup>100</sup> この研究では、CYP3A4 タンパク質には大きすぎてドッキングされなかったいくつかの化合物 (macrolide antibiotics 及び Itraconazole) は用いなかった。得られた 17 個の化合物を二つのグループに分け、一つは CoMFA モデル作成のためのトレーニングデータセットとして用い [Figure 2 (a)], 残りのグループは CoMFA モデル評価のためのテストデータセットとして用いた [Figure 2 (b)]。テストデータセットとして無作為に選ばれた三つの化合物は、Fluoxetine (弱活性阻害剤), Nifedipine (中程度活性阻害剤) 及び Saquinavir (強活性阻害剤) である。

**リガンドの準備：**リガンドの二次元化学構造を Ligprep プログラム [Schrödinger Suite 2010 (Schrödinger Inc), NY, USA] を用いて三次元化学構造に変換した。Ligprep プログラムでは最終的に三次元化学構造を OPLS2005 力場によってエネルギー極小化した。化合物のイオン化状態は ADMET Predictor (Simulations Plus Inc., Lancaster, CA) を用いて決定し、化合物のコンフォメーション探索は ConfGen プログラム [Schrödinger Suite 2010 (Schrödinger Inc)] を用いて実施した。

(a)



(b)



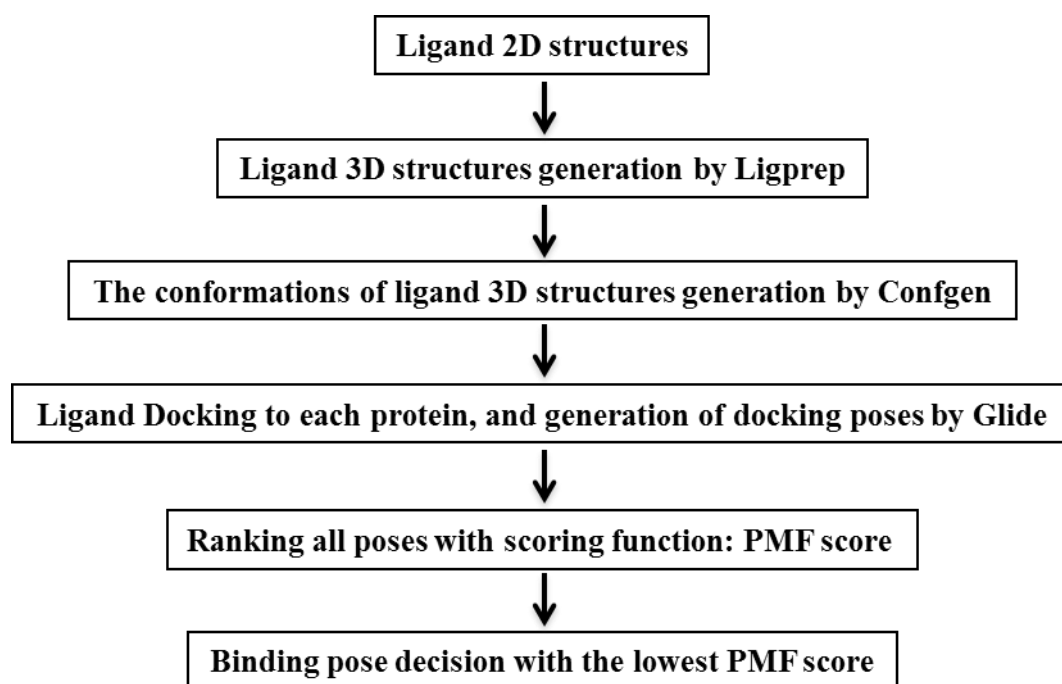
**Figure 2** 研究に用いられた CYP3A4 阻害剤

(a) CYP3A4 阻害剤 CoMFA モデルのトレーニングデータセット, (b) CYP3A4 阻害剤 CoMFA モデルのテストデータセット

**CYP3A4 構造の準備**：ヒト CYP3A4 の X 線結晶構造は 2010 年までに複数のものが PDB に登録されていた (PDB コード 1TQN, 1W0E, 1W0F, 1W0G, 2J0D, 2V0M 及び 3NXU)。<sup>117, 118, 119, 120</sup> 活性コンフォメーションではない可能性があるもの (1W0F 及び 2J0D) を除き、残った五つの構造を Maestro clustering module [Schrödinger Suite 2010 (Schrödinger Inc)] にて得られた系統樹を用いてクラスタリングした。この解析には共結晶阻害剤周辺 4 Å 以内に位置するアミノ酸残基を用いて行った。マージ距離 1.5 Å の所で剪定を行い、各クラスターの平均構造に最も近いものを代表構造として選んだ。選ばれた構造は 1W0G, 2V0M 及び 3NXU であった。これら構造から結晶水は取り除いた。また、アミノ酸配列の内、末端部分の欠損を考慮して、30 番目から 496 番目までのアミノ酸を用い、30 番目から 496 番目までのアミノ酸で欠損のあるものは Prime プログラム [Schrödinger Suite 2010 (Schrödinger Inc.)] を用いて補った。最終的にこの構造は OPLS2005 力場にてエネルギー極小化を行った。

**コンピュータドッキング**：ドッキングには Glide SP ドッキングプログラム [Schrödinger Suite 2008 (Schrödinger Inc)] を用いた。ドッキングパラメータは、タンパク質 van der Waals (vdW) 半径スケールを 0.7, リガンド vdW 半径スケールを 0.9, グリッドサイズはリガンド周辺 4 Å のアミノ酸に重心を置いた 10 Å<sup>3</sup> とした。

**ポーズ決定プロセス**：ポーズ決定のための全プロセスは Figure 3 に示した。CoMFA で用いる分子アライメントを取得するためには、正確なリガンド結合コンフォメーションが必要である。一つのリガンドに対してドッキング計算によりいくつかのポーズが得られ、そのポーズ数が十分であった場合、それらポーズの中に正しいポーズが含まれていると考えることができる。それぞれの阻害剤のドッキングの結果から真のポーズを同定するために、ここでは PMF スコア [SYBYL 8.1 (*Tripos Inc.*), *St. Louis, Missouri, USA*] を用いた。つまり、Glide ドッキングによって生成された総てのポーズに対して PMF スコアを計算し、スコアが最も低かった (最低エネルギー値) ポーズを、それぞれの阻害剤において真の結合ポーズに最も近い決定ポーズとした。このポーズ決定プロセスの妥当性を検証するため、X 線共結晶構造中のリガンドの決定ポーズを、このプロセスにしたがって生成し、これを X 線結晶構造解析での位置と比較した。



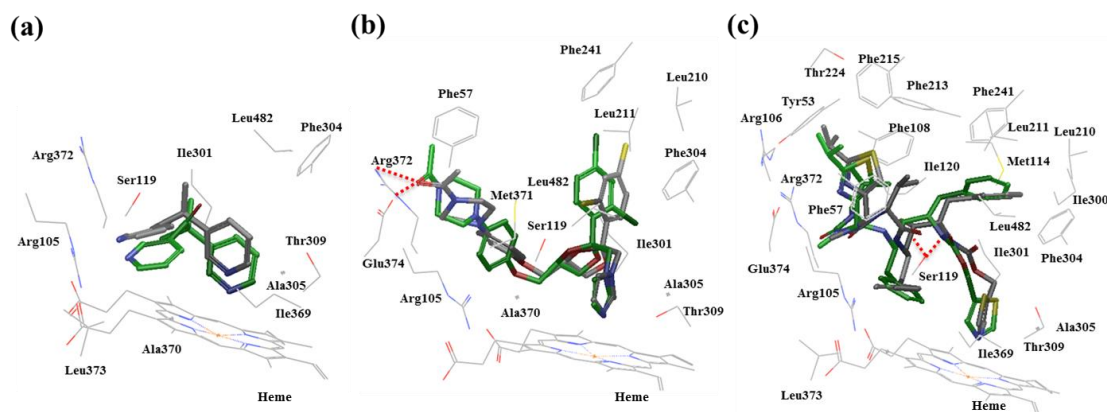
**Figure 3** ポーズ決定プロセス

**CoMFA モデリング**：分子アライメントは、まずポーズ決定されたリガンド周辺 4 Å のアミノ酸でリガンド-タンパク質複合体を重ね合わせ、次にヘムとタンパク質を取り除くことで取得した。計算は CoMFA module [SYBYL 8.1 (*Tripos Inc.*)] を用いた。ここでの CoMFA はすべて標準的な初期パラメータを用いた。QSAR モデルは pK<sub>i</sub> 値に対する CoMFA 静電場と立体場の PLS 解析によって得られる。<sup>126</sup> 得られた CoMFA モデルにはトレーニングデータセットの交雑検定及びテストデータセットの外部検証を実施した。



### 1.3 結果

**ポーズ決定プロセスの妥当性検証:** ポーズ決定プロセスが妥当であることを検証するため, CYP3A4 の X 線構造中に含まれる共結晶リガンドである Metyrapone, Ketoconazole 及び Ritonavir の決定ポーズをポーズ決定プロセス (Figure 3) にしたがって生成した。その結果, X 線結晶構造解析によって決定されている位置とのずれが, いずれも RMSD で 2Å 以内であったので, 本研究で用いたポーズ決定プロセスは妥当であると判断した (Figure 4)。



**Figure 4** ポーズ決定プロセスの妥当性検証

共結晶リガンドは Metyrapone (a), Ketoconazole (b) 及び Ritonavir (c) であり, 灰色が X 線結晶構造解析によって決定されたりガンド位置, 緑色がポーズ決定プロセスにしたがって得られたりガンド位置。赤点線は水素結合。

**CoMFA モデル:** CoMFA 法に基づく 3D-QSAR モデル作成のために必要なリガンドの分子アライメントは、ポーズ決定プロセス (Figure 3) にしたがって決定した。決定ポーズからなる分子アライメントはいずれもへム上に配置され、台形状の構造を示した (Figure 5)。次に、この分子アライメントを用いて CoMFA モデルを作成した。このモデルの統計結果を Table 2, 予測結果を Table 3, そして実験値に対して予測値をプロットしたものを Figure 6 に示した。これらの結果より、作成された CoMFA モデルから得られる予測値は実験値と良く一致していた。

**Table 2 CYP3A4 阻害 CoMFA モデルの統計結果**

CoMFA Model	Cross-validated			No. of components	Conventional					Test Dataset	
	n <sub>training</sub> <sup>a</sup>	q <sup>2</sup> <sup>b</sup>	Sp <sub>ress</sub> <sup>c</sup>		r <sup>2</sup> <sup>d</sup>	s <sup>e</sup>	F <sup>f</sup>	Contribution		n <sub>test</sub> <sup>i</sup>	r <sup>2</sup> <sup>j</sup>
								ST <sup>g</sup>	EL <sup>h</sup>		
Human CYP3A4	14	0.565	0.804	3	0.974	0.197	124.578	0.487	0.513	3	0.986

<sup>a</sup> The number of ligands used as training data set. <sup>b</sup> Predicted correlation coefficient in leave-one-out cross validation.

<sup>c</sup> Standard deviation for the sum of square predicted errors. <sup>d</sup> The conventional values of correlation coefficient.

<sup>e</sup> Standard deviation. <sup>f</sup> F value. <sup>g</sup> The contribution values of steric contribution. <sup>h</sup> The contribution values of electrostatic contribution. <sup>i</sup> The number of ligands used as test data set. <sup>j</sup> Predicted correlation coefficient in external-validation.

**Table 3 CYP3A4 阻害実験値と CoMFA モデルによる予測値**

Training data set	Experimental pKi	Predicted pKi	Test data set	Experimental pKi	Predicted pKi
Terbinafine	4.00	4.45	Fluoxetine	4.32	3.97
Fluconazole	5.07	4.84	Nifedipine	4.85	4.73
Cimetidine	3.86	3.81	Saquinavir	5.46	6.08
Ranitidine	3.77	3.77			
Fluvoxamine	4.98	5.13			
Quinidine	3.80	3.87			
Isradipine	4.77	4.80			
Felodipine	4.96	4.68			
Diltiazem	4.21	4.12			
Verapamil	4.78	4.78			
Mibefradil	5.60	5.58			
Ritonavir	7.19	7.27			
Ketoconazole	6.70	6.65			
Nefazodone	5.92	5.86			

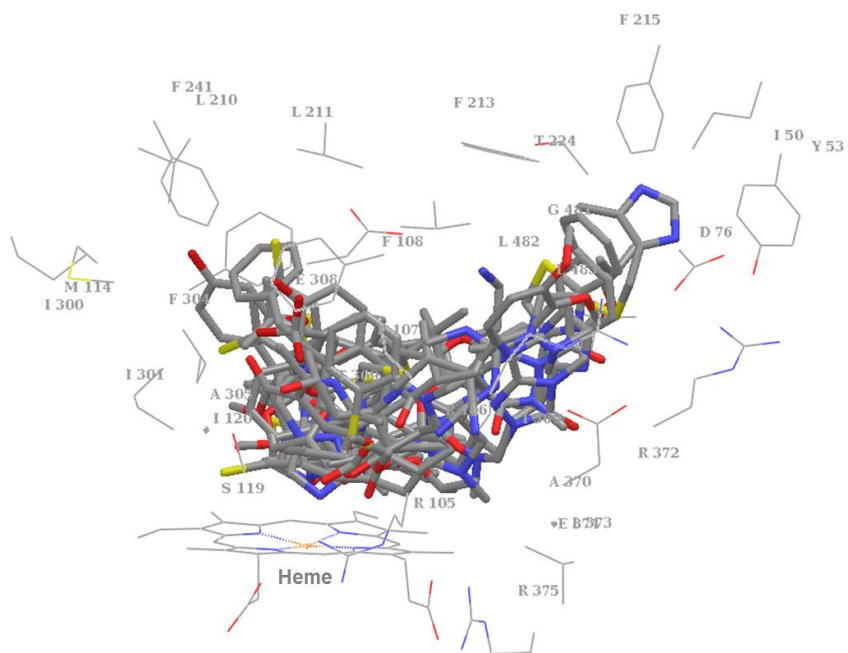


Figure 5 分子アライメント

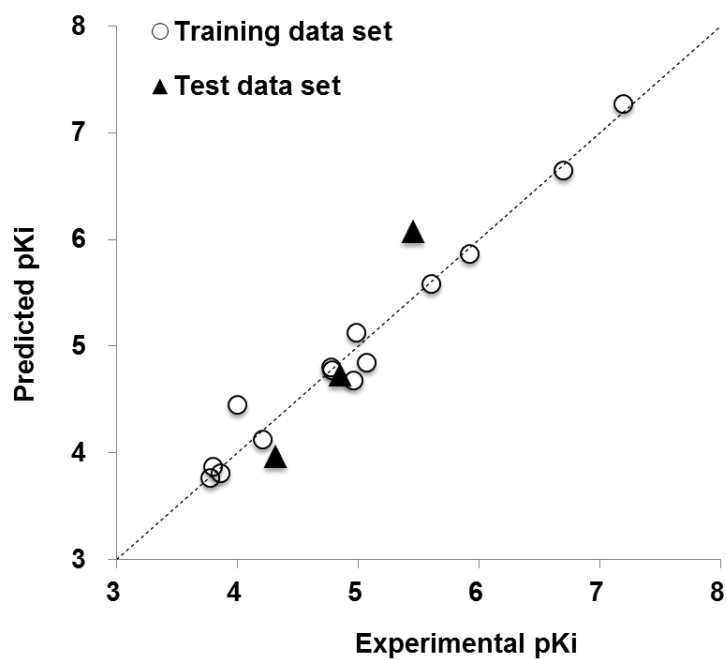
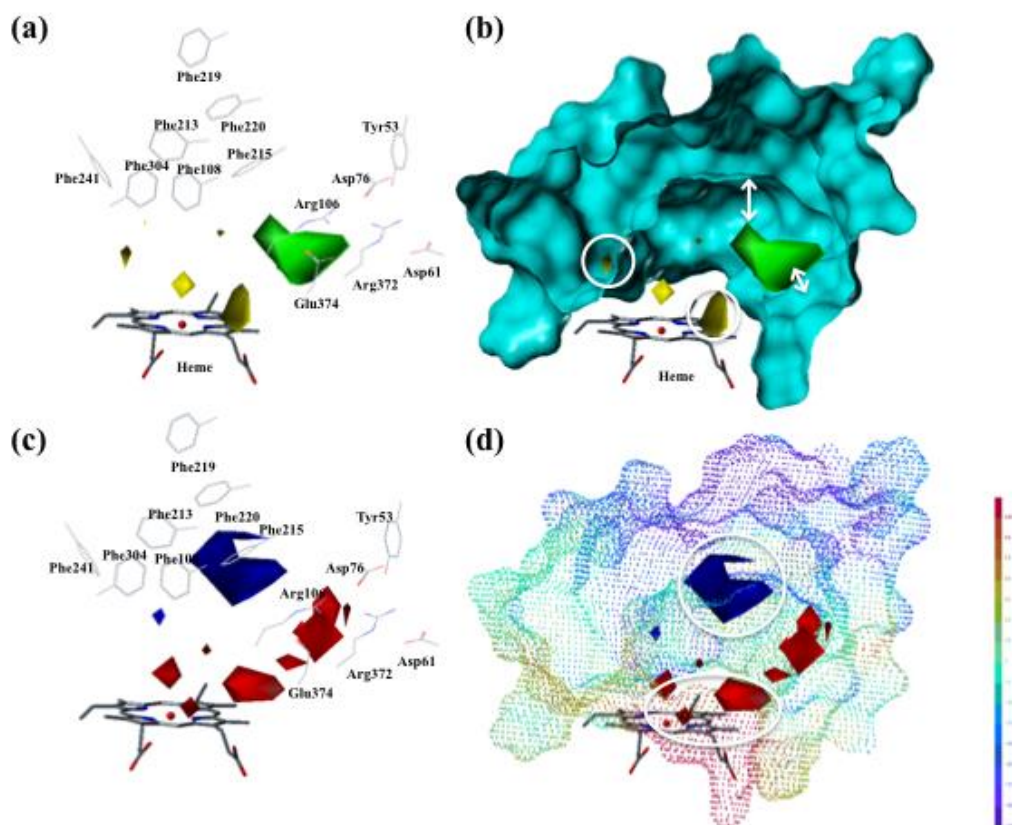


Figure 6 CYP3A4 阻害実験値と CoMFA モデルによる予測値

CoMFA 立体及び静電場等高線の様子を Figure 7 に示した。なお、CoMFA 等高線では等高線の色によって、リガンドが阻害活性へ果たす役割が以下のように決まっている。緑色はリガンドに立体的に嵩高い置換基がある場合に活性が高くなる領域、黄色はリガンドに立体的に嵩高い置換基がある場合に活性が低くなる領域、赤色はリガンドに負の電荷をもつ置換基がある場合または水素原子受容基がある場合に活性が高くなる領域、青色はリガンドに正の電荷をもつ置換基がある場合または水素原子供与基がある場合に活性が高くなる領域である。これら等高線図では、大きな緑の等高線がリガンド結合空間の親水性に富んだ領域及び Phe クラスターを含む領域の近くに見られ、黄色の等高線がヘム周辺及びタンパク質と衝突し得るような領域に見られた [Figure 7 (a), (b)]。また、赤色の等高線は正に帯電しているアミノ酸の近くに見られ、青色の等高線は負に帯電しているアミノ酸の近くに見られた [Figure 7 (c), (d)]。したがって、CYP3A4 のリガンド結合空間における環境が、CoMFA 等高線によく反映されていると考えられた。

**代表的な化合物の決定ポーズ比較：**本研究で作成した CoMFA モデルのデータセットに含まれている、阻害活性の異なる代表的な化合物の決定ポーズを観察して、CYP3A4 の相互作用点の解析を行った。阻害活性の低い化合物として Quinidine、阻害活性中程度の化合物として Nefazodone、阻害活性が高い化合物として Ketoconazole を調べ、これら 3 化合物の決定ポーズを比較した。その結果、阻害活性の低い Quinidine はヘム上に位置したものの、vdW 相互作用及び静電相互作用の他には、周りのアミノ酸と大きな疎水性相互作用及び水素結合は見られなかった [Figure 8 (a)]。一方で、阻害活性中程度である Nefazodone では、vdW 相互作用及び静電相互作用の他に、Arg372 と Nefazodone のエーテル基との間で水素結合が観察された [Figure 8 (b)]。また、阻害活性が高い Ketoconazole では、vdW 相互作用及び静電相互作用の他に、Nefazodone と同様に Arg372

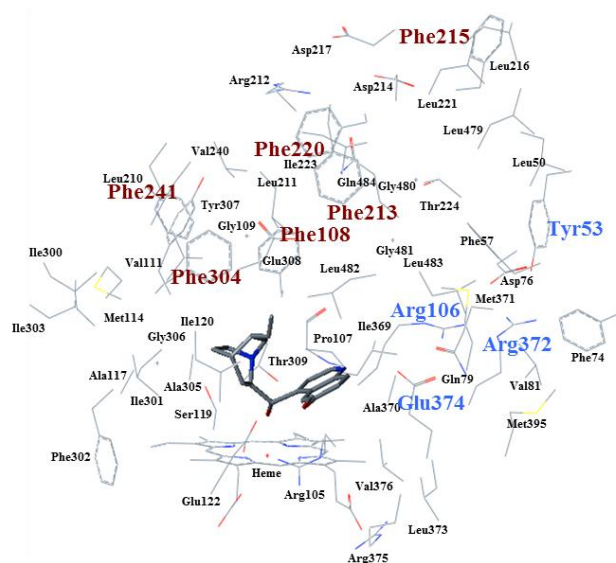
との間に Ketoconazole のカルボニル基が水素結合を持っており，さらに Ketoconazole のジクロロベンゼン環が Phe108, Phe304 などと疎水性相互作用を持っていた [Figure 8 (c)]。



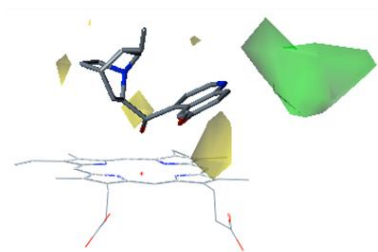
**Figure 7** CoMFA 等高線とリガンド結合部位周辺のアミノ酸の様子

(a) 立体場, (b) 立体場とリガンド結合部位周辺アミノ酸の表面, (c) 静電場及び (d) 静電場とリガンド結合部位周辺アミノ酸の静電表示。(a), (b) では Phe クラスター (Phe108, Phe213, Phe215, Phe219, Phe220, Phe241 及び Phe304) と親水性に富んだ領域 (Tyr53, Asp61, Asp76, Arg106, Arg372 及び Glu374) が線画で示されている。(d)では紫は負, 赤は正により帯電していることを示している。

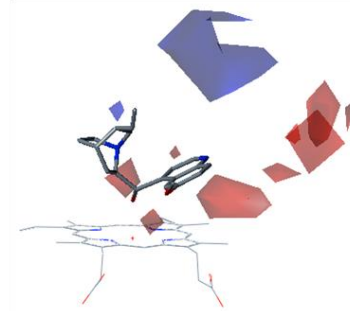
**(a) Quinidine**



**Steric Field**

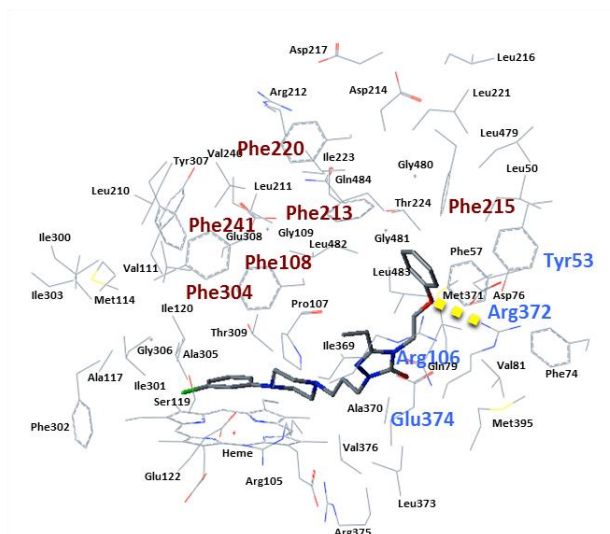


**Electro Static Field**

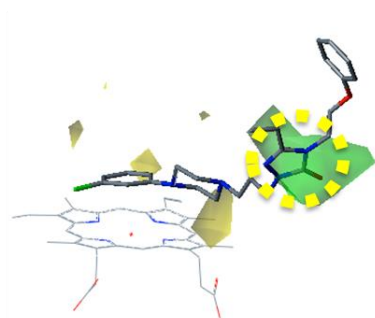


**Figure 8 CYP3A4 代表阻害剤の決定ポーズ**

**(b) Nefazodone**



**Steric Field**



**Electro Static Field**

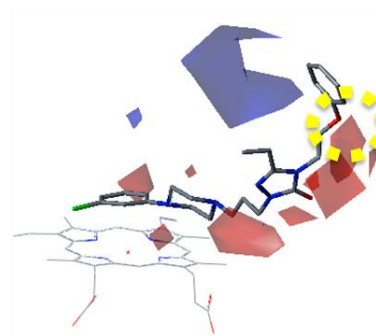
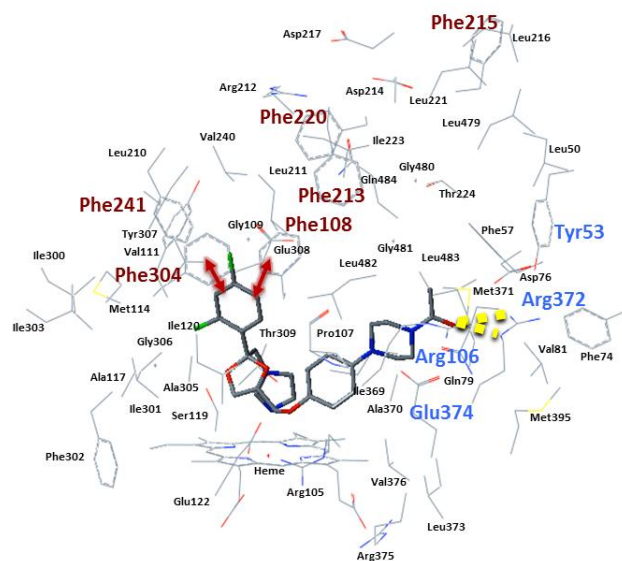
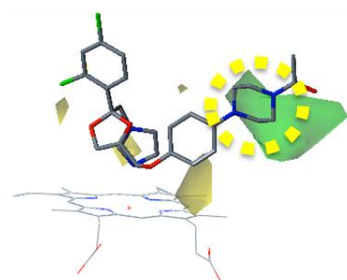


Figure 8 続き

**(c) Ketoconazole**



**Steric Field**



**Electro Static Field**

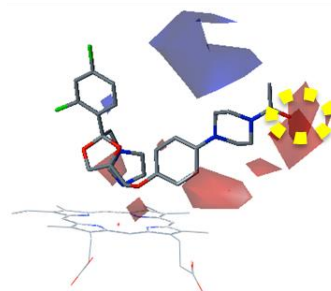


Figure 8 続き



## 1.4 考察

**ドッキングプログラム及びスコア関数:**最も良いドッキングプログラム及びスコア関数の選択は、適用する系に大きく依存する。一般的に、着目する系に対してドッキングプログラムとスコア関数の様々な組み合わせを試して、最適なプロトコルを探ることが望ましい。<sup>56, 57</sup> 本研究では、CYP タンパク質の柔軟性を考慮するために、ドッキングレセプターとして複数のタンパク質構造を用意した。また、リガンドドッキングポーズの決定には、Glide ドッキングプログラムと PMF スコア関数を組み合わせて用いた。作成された CoMFA モデルは良好な統計結果を示したので (Table 2), X 線結晶構造に基づいた複数タンパク質構造サンプリング-ドッキング手法及び Glide ドッキングプログラムと PMF スコア関数の組み合わせは、CYP3A4 の研究に適しているものと考えられた。PMF スコア関数は水素原子を総て考慮しないため、相対的に疎水性相互作用に重点を置いたスコア関数であり、この特徴が CoMFA に良好な結果をもたらす理由の一つであると考えられた。<sup>127</sup> CYP 酵素の基本的な機能は、疎水性化合物を極性化合物に変換して、化合物を水溶性にし、腎臓から体外に排泄しやすくさせることであると考えられ、これは PMF スコア関数が CYP のドッキング研究に適していることに矛盾しない。<sup>16, 99</sup>

**CoMFA モデルの予測性能:** Table 2 に示したように、CYP3A4 阻害予測のための CoMFA モデルでは統計的に良好な結果が得られた。Table 3 に示した pKi 予測値を実験値に対してプロットすると、予測値と実測値との間には強い相関が見られた (Figure 6)。さらに、CYP3A4 リガンド結合空間の環境は CoMFA 等高線図に良く反映されていた

(Figure 7)。

本章の研究では、モノトロピックな競合阻害の場合、すなわち CYP3A4 の阻害剤として一つの化合物だけが働く場面を対象とした。したがって、Phe クラスタが位置するリガンド結合空間の真上の天井には等高線が現れなかったが、ヘテロトロピックの場合、すなわち CYP3A4 の阻害剤として複数の化合物が同時に働く場面で CoMFA モデルを作成できたならば、この部分にも等高線が現れてくる可能性が高い。<sup>128</sup> また、本研究では扱わなかったが、近年では競合阻害とは異なる機構で酵素を阻害する Mechanism based inhibition にも注目が集まっている。<sup>129</sup> 現段階では、その詳細な阻害機構が総ての化合物で明らかではないので、これを計算モデル化することは非常に困難ではあるが、近い将来この機構の解明がさらに進むことで、これに関する計算予測モデルの作成も重要な課題となってくるであろう。

CoMFA モデルに関する結果をまとめると、本研究で作成したヒト CYP3A4 阻害剤 3D-QSAR (SB CoMFA) モデルは様々な化合物に対して pKi を正確に予測することが可能であり、このモデルを用いることによって、創薬の初期段階において化合物の CYP3A4 阻害活性を評価することができると考えられた。

**CYP3A4 阻害相互作用点の解析：**代表的な化合物 (阻害活性の低い化合物：Quinidine, 阻害活性中程度の化合物：Nefazodone, 阻害活性が高い化合物：Ketoconazole) の決定ポーズを比較したところ、まず Quinidine では vdW 相互作用及び静電相互作用以外の疎水性相互作用及び水素結合のいずれも見られなかった。この時、CoMFA 等高線との重なりを調べても、やはり大きな重なりは見られなかった。これらのことから、Quinidine はアミノ酸との相互作用が多くないため、CYP3A4 阻害活性が強くないと考えられた [Figure 8 (a)]。次に、Nefazodone では vdW 相互作用及び静電相互作用以外に

水素結合が見られており、この時 CoMFA 等高線との位置の重なりを見ると、水素結合を持つ Nefazodone のエーテル部分は、立体場では緑色の（リガンドに立体的に嵩高い置換基がある場合に活性が高くなる）領域に重なりが見られ、同様に静電場では赤色の（リガンドに負の電荷をもつ置換基がある場合または水素原子受容基がある場合に活性が高くなる）領域に近い配置が見られた。これらのことから、Nefazodone はこの水素結合を持つため、CYP3A4 阻害が中程度にまで達していると考えられた。また、この水素結合を担うアミノ酸は Arg372 であったが、これは“親水性に富んだ領域”に位置しており、これまでに提唱されている、この部分との相互作用が CYP3A4 とリガンドとの結合親和性を決める一要因である、という仮説を支持するものであった [Figure 8 (b)]。

<sup>117</sup> 最後に、Ketoconazole では、Nefazodone と同様に“親水性に富んだ領域”に位置した Arg372 との間で Ketoconazole のカルボニル基が水素結合を持っており、この時 CoMFA 等高線との重なりを見ると、立体場では緑色の領域に重なりが見られ、静電場では赤色の領域に重なりが見られた。さらに、Ketoconazole ではジクロロベンゼン環が Phe108, Phe304 との間に疎水性相互作用を持っていたが、この Phe108, Phe304 は基質結合部位の天井部分に存在する“Phe クラスター”の一部であり、これまでに提唱されているこの部分との相互作用が CYP3A4 とリガンドとの結合親和性を決める一要因である、という仮説を支持するものであった [Figure 8 (c)]。<sup>118</sup>

以上より、本研究では CoMFA 等高線とリガンド結合空間にあるアミノ酸との様子から、阻害剤の活性の強弱は、親水性に富んだ領域にあるアミノ酸 (Arg106, Arg373 及び Glu374) との水素結合及び Phe クラスター (Phe108, Phe215, Phe241 及び Phe304) を含むリガンド結合空間の天井部分にあるアミノ酸との疎水性相互作用によって、大部分が決定されるものと考えられた。なお、この考察はこれまでに発表されている研究結果と一

致している。<sup>117, 118</sup>

結論として、本研究ではコンピュータドッキングに基づき、予測精度の高い CYP3A4 に対する阻害活性予測 3D-QSAR (SB CoMFA) モデルを作成することができた。また、異なる阻害活性を持つ代表化合物の決定ポーズの比較から、“親水性に富んだ領域”にあるアミノ酸との水素結合及び“Phe クラスタ”を含むリガンド結合空間にあるアミノ酸との疎水性相互作用が、化合物の CYP3A4 酵素の阻害活性の強弱に重要であることが示唆された。本研究で構築したヒト CYP3A4 阻害剤 3D-QSAR モデルは pKi を正確に予測することが可能であり、このモデルを用いることによって、創薬の初期段階において薬物阻害を評価することが可能となり、効率的な創薬に貢献できるものと考えられた。

## 第 2 章 薬物の **PXR** 活性化による **CYP3A4** 誘導に関する *in silico* 研究



## 2.1 緒論

PXR (NR1I2) は化合物によって活性化され、CYP3A4 や P-glycoprotein (P-gp) などの化合物の代謝やトランスポーターの発現を誘導する核内受容体である。<sup>130, 131</sup> CYP 酵素は薬物の代謝に重要な役割を果たしており、市販薬剤の約 40% は CYP3A4 によって代謝される。<sup>99</sup> また、P-gp は重要な多剤排出トランスポーターとして知られている。<sup>132</sup> 製薬企業や規制当局は、候補薬物である新規化合物が PXR を活性化させることを望まない。なぜならば、そのような化合物は DDIs を引き起こす可能性が高いからである。実際、候補化合物に PXR の活性化による酵素誘導を起こす可能性が考えられた場合、引き続きヒト臨床試験を継続実施することが妥当かどうかを評価するため、FDA などの規制当局から追加の試験を求められる。<sup>34</sup> それゆえ、新薬開発の初期段階では酵素誘導活性を調べることが重要である。

PXR のアゴニストは化学構造的に広い多様性を持つことが良く知られており、プレグナン化合物、抗真菌薬及び糖質グルコシルコイド群などがある。<sup>133</sup> 酵素誘導の詳細な機構は次の通りである。まず、リガンドが PXR に結合し、核内へ移動する。次に、リガンド-PXR 複合体は retinoid X receptor (RXR) に結合する。さらに、リガンド-PXR-RXR 複合体は steroid receptor coactivator-1 (SRC-1), hepatocyte nuclear factor  $\alpha$  (HNF- $\alpha$ ) 及び peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PPAR $\gamma$ -1 $\alpha$ ) などのコアクチベーターによって安定化される。最後に、リガンド-PXR-RXR-コアクチベーター複合体が、CYP3A4 上流の xenobiotic responsive enhancer molecule (XREM) プロモータ

一領域に結合することで酵素誘導を開始する。<sup>134, 135, 136</sup> これまでに **PXR** リガンド結合領域 (**LBD**, **Ligand Binding Domain**) の X 線結晶構造は多数解かれている。化合物の **PDB** コードを以下に列挙する。**PXR LBD** 構造では, **1ILG** (アポ構造)<sup>137</sup>, **1ILH** (**SR12813** との共結晶構造)<sup>137</sup>, **1M13** (**Hyperforin** との共結晶構造)<sup>138</sup>, **1SKX** (**Rifampicin** との共結晶構造)<sup>139</sup> 及び **3R8D** (**PNU142721** との共結晶構造)<sup>140</sup> がある。**PXR LBD-SRC-1** 複合体構造では, **1NRL** (**SR12813** との共結晶構造)<sup>141</sup>, **2O9I** (**T-1317** との共結晶構造)<sup>142</sup> 及び **3CTB** (アポ構造)<sup>143</sup> がある。また, **PXR** のリガンド結合空間はほとんどが疎水的なアミノ酸によって構成されており<sup>137</sup>, ほとんどの **PXR** アゴニストは高い脂溶性を示すことが知られている。<sup>144</sup> この事実は, **CYP3A** 酵素の基本的な機能が, 疎水性化合物を極性化合物に変換して, 化合物を水溶性にし, 腎臓から体外に排泄しやすくさせると考えられることに一致しており, その **CYP3A** 酵素をアゴニストによって活性化された **PXR** が発現誘導するのであるから, この機構は理にかなっている。<sup>16, 99</sup>

現在, 候補化合物の **PXR** 活性化による酵素誘導は, レポーター遺伝子アッセイや肝細胞を用いた *in vitro* 実験を用いて調べられている。<sup>145, 146, 147</sup> しかしながら, これら実験には財政的及び人材的コストがかかるため, この実験で評価できる化合物の数は限られている。それゆえ, 候補化合物の **PXR** 活性化による酵素誘導を予測する *in silico* 手法は, 評価できる化合物の数に制限がなく, 創薬に有用であるものと考えられる。今日では, **PXR**-リガンド親和性に関するコンピュータ研究がますます注目されつつある。あるドッキング研究では, リガンドと疎水性相互作用を持つ重要なアミノ酸として **Phe288**, **Trp299** 及び **Tyr306** が示唆されており, またリガンドと水素結合を持つアミノ酸として **Gln285** が示唆されている。<sup>148</sup> さらに, 漢方薬を用いたドッキング研究では, リガンドとの水素結合に **Ser247**, **Gln285**, **His407** 及び **Arg410** が重要な役割を果たすこ

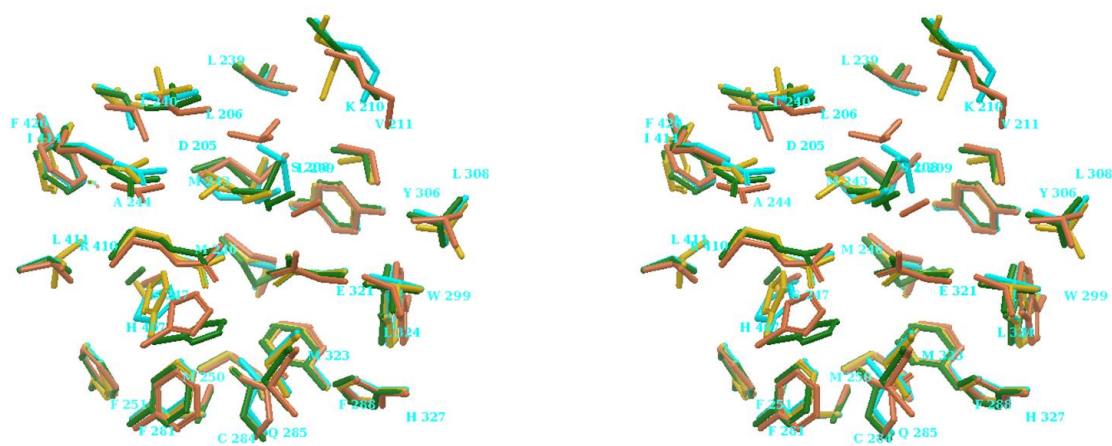


とが示唆されている。<sup>149</sup> いくつかの研究では、化合物の PXR 活性化による酵素誘導活性の定量的計算予測に挑戦しており、機械学習を用いた手法や、化学構造の似た同属の化合物のみを対象にした場合の定量的予測では成功が収められているが、様々な化学構造を持つ化合物を対象とした CoMFA 法や Comparative Molecular Similarity Index Analysis (CoMSIA) 法などの 3D-QSAR モデルでは、全く良好な結果が得られていない。<sup>150, 151, 152, 153</sup> 研究者らは PXR へのドッキングは、PXR タンパク質の柔軟性、幅広いリガンド選択性のため困難であると主張している。<sup>153</sup> しかしながら、創薬プロセスでは有望な薬剤候補化合物を得るために、ある程度幅広い化学構造を持つ化合物を取り扱わねばならない。

本研究の目的は、多様な化学構造を持つ化合物の PXR 活性化による酵素誘導活性を定量的に予測し、効率的な創薬に貢献することである。ここでは、PXR へのリガンド結合による酵素誘導活性を予測するため、第 1 章で用いた手法と同様に、コンピュータドッキングに基づいた CoMFA 法による 3D-QSAR モデルを作成した。SB CoMFA モデルでは酵素誘導活性を予測するだけでなく、リガンドの結合ポーズを得ることもでき、また化学構造の似た同属の化合物だけでなく、様々な化学構造を持つ化合物を扱うことができる。<sup>86, 87</sup>

先行研究から、PXR LBD-SRC-1 のコンフォメーションは PXR LBD とは異なることが示唆されている。<sup>154</sup> そこで本章の研究では、PXR LBD へのリガンド結合が酵素誘導活性を決めることから、ドッキングに用いるタンパク質構造として PXR LBD-SRC-1 ではなく、PXR LBD のみを用いることにした。<sup>131, 136</sup> まず、これまでに構造が解かれている PXR LBD のリガンド結合部位を重ね合わせた所、いくつかのアミノ酸で構造にずれがあることが分かった (Figure 9)。このアミノ酸のずれは、X 線の結晶化プロセスで

生じたものであるか、またはリガンドのインデュースフィットによるものかのいずれかであると考えられる。これらの影響を考慮して、ドッキング研究には水中での MD シミュレーションのトラジェクトリからサンプリングした、複数のタンパク質構造を用いた。すなわち、この MD シミュレーションに基づく複数タンパク質構造サンプリングによって、タンパク質構造の柔軟性をドッキングに考慮した。<sup>56</sup> さらにここで、正しいドッキングポーズを選択するため、リガンド-PXR 複合体の結合自由エネルギーを表す、MM-GB/SA スコアの計算を行った。次に、決定されたリガンドドッキングポーズの分子アライメントを用いて、3D-QSAR (SB CoMFA) モデルを作成した。最後に、二次元化学構造が似ているにも関わらず、酵素誘導活性の異なる化合物について、それらのドッキングポーズを比較することにした。その結果から、酵素誘導活性の差の原因について考察した。



**Figure 9 PXR LBD リガンド周辺アミノ酸 X 線結晶構造の重ね合わせ図**

水色：1ILG (apo-type), オレンジ：1ILH (holo-type), 緑色：1M13 (holo-type) 及び黄色：3R8D (holo-type)

## 2.2 材料と方法

**リガンドデータ：**CoMFA モデル作成のために用いたリガンドの化学構造を Figure 10 に示し，酵素誘導活性（レポーター遺伝子アッセイでの  $pEC_{50}$  値）を Table 4 に示した。これら化合物は構造的多様性を持ち，一つの論文から選んだ [この研究では，同文献において検出限界のために  $EC_{50}$  値が 200  $\mu M$  以上であったものは， $EC_{50}$  値を 200  $\mu M$  であるものとして取り扱った ( $pEC_{50}$  値：3.70)]。<sup>154</sup> また，いくつかのマクロライド系化合物は用意した PXR タンパク質構造へドッキングするには大き過ぎたので用いなかった。まず，34 個の化合物を酵素誘導活性実験値にしたがって，順に六つのグループに分けた。次に，各グループの中央付近の酵素誘導活性値を持つ化合物をテストデータセットに選んだ。すなわち，CoMFA モデル作成のために，トレーニングデータセットとして 28 化合物を用意し，テストデータセットとして 6 化合物を用意した (Table 4)。

**リガンドの準備：**リガンドの二次元化学構造を Ligprep プログラム [Schrödinger Suite 2010 (Schrödinger Inc)] を用いて三次元化学構造に変換した。Ligprep プログラムでは最終的に三次元化学構造を OPLS2005 力場によってエネルギー極小化した。化合物のイオン化状態は ADMET Predictor (Simulations Plus Inc.) を用いて決定し，化合物のコンフォメーション探索は ConfGen プログラム [Schrödinger Suite 2010 (Schrödinger Inc)] を用いて実施した。

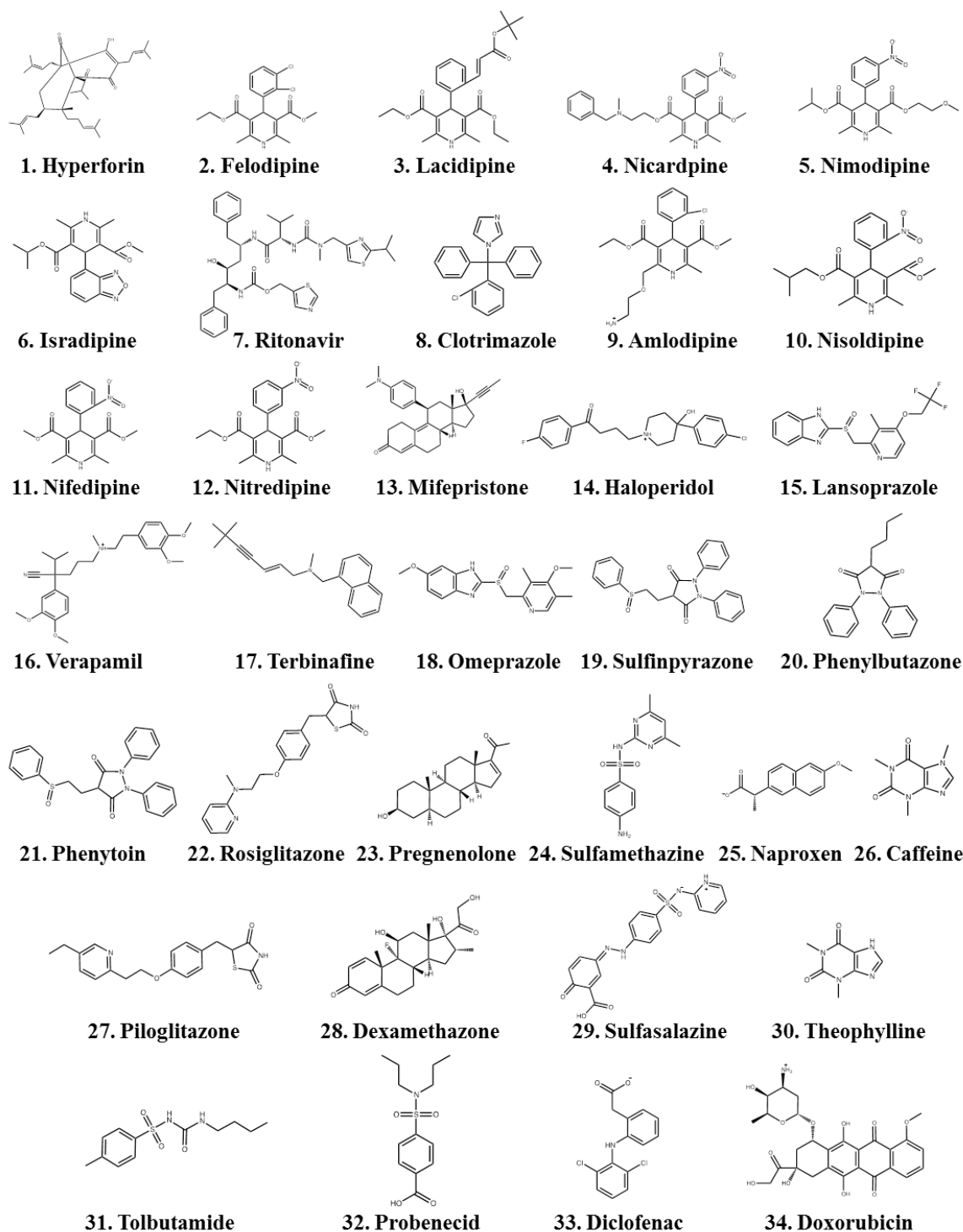


Figure 10 研究に用いられた PXR リガンド

Table 4 実験的 pEC<sub>50</sub> 値と CoMFA データセットカテゴリー

Compounds	pEC <sub>50</sub>	CoMFA Data Set Category
Hyperforin	6.70	Training
Felodipine	6.60	Training
Lacidipine	6.49	Training
Nicardipine	6.40	Test
Nimodipine	6.35	Training
Isradipine	6.17	Training
Ritonavir	6.10	Training
Clotrimazole	5.89	Training
Amlodipine	5.80	Training
Nisoldipine	5.72	Test
Nifedipine	5.66	Training
Nitredipine	5.52	Training
Mifepristone	5.51	Training
Haloperidol	5.38	Training
Lansoprazole	5.19	Test
Verapamil	5.02	Training
Terbinafine	4.80	Training
Omeprazole	4.68	Training
Sulfinpyrazone	4.55	Training
Phenylbutazone	4.44	Test
Phenytoin	4.35	Training
Rosiglitazone	4.31	Training
Pregnenolone	4.00	Training
Sulfamethazine	3.72	Training
Naproxen	3.70	Training
Caffeine	3.70	Test
Pioglitazone	3.70	Training
Dexamethazone	3.70	Training
Sulfasalazine	3.70	Training
Theophylline	3.70	Training
Tolbutamide	3.70	Training
Probenecid	3.70	Test
Diclofenac	3.70	Training
Doxorubicin	3.70	Training

**PXR タンパク質構造の準備**：本章の研究で用いた PXR LBD の X 線結晶構造の PDB コードは 1ILG, 1ILH, 1M13 及び 3R8D である。まず、結晶水を総て取り除き、これら構造のアミノ酸配列の内、末端部分の欠損を考慮して、198 から 420 番目までのアミノ酸を使用した。次に、198 から 420 番目までのアミノ酸の間で欠損のあるものは Prime プログラム [Schrödinger Suite 2010 (*Schrödinger Inc*)] を用いて補った。最終的にこの構造は OPLS2005 力場にてエネルギー極小化を行った。

**分子動力学シミュレーション**：水中での活性コンフォメーションを得るため、準備した PXR タンパク質構造 [1ILG (アポ構造), 1ILH (SR12813 との共結晶構造), 1M13 (hyperforin との共結晶構造) 及び 3R8D (PNU142721 との共結晶構造)] を用いて MD シミュレーションを実施した。計算は OPLS2005 力場を用いた露な溶媒下で実施され、Desmond プログラム [Schrödinger Suite 2010 (*Schrödinger Inc*)] の初期パラメータを用いて実施した。水分子モデルは TIP3P モデルとし、系は Cl<sup>-</sup>で中和した。周期境界条件及び非結合相互作用のカットオフ値 9.0 Å を、許容誤差  $10^{-8}$  の Particle Mesh Ewald 法を用いた静電相互作用の下で用いた。MD シミュレーションの実施前に Desmond の初期緩和プロトコルを用い、それに引き続き、4.5 nsec (nano seconds) のシミュレーションを NPT 条件の下で Nosé-Hoover thermostat 及び Martyna-Tobias-Klein barostat を用いて実施した [T = 310.5 K, thermostat relaxation time = 1.0 psec (pico seconds); P = 1 atm; barostat relaxation time = 2.0 psec]。原子座標トラジェクトリデータは 20 psec 毎に記録した。リガンド結合空間 (リガンドの周囲 4 Å) のアミノ酸のコンフォメーションの 3.5 から 4.5 nsec のトラジェクトリを、Maestro clustering module [Schrödinger Suite 2010 (*Schrödinger Inc*)] で得られた距離マトリクスを用いてクラスタリングした。次に、距離マトリクスでそれぞれのクラスターサイズを視覚的に判断し、クラスター領域内の平均 RMS (Root

Mean Square) 値に最も近いものを、それぞれのクラスターの代表構造として選んだ。

最後に、これら代表構造を Desmond プログラムにおいて極小化し、リガンド、Cl<sup>-</sup>及び水分子を除いた後に、コンピュータドッキングに用いた。

**コンピュータドッキング：**ドッキングには Glide SP ドッキングプログラム

[Schrödinger Suite 2010 (Schrödinger Inc)] を用いた。ドッキングパラメータは、タンパク質 vdW 半径スケールを 1.0, リガンド vdW 半径スケールを 0.8, グリッドサイズはリガンド周辺 4 Å のアミノ酸に重心を置いた 10 Å<sup>3</sup> とした。

**MM-GB/SA スコアによるポーズ決定：**ポーズ決定プロセスは Figure 11 に示した。第 1 章で述べたのと同様に、一つのリガンドに対してドッキング計算でいくつかのポーズが得られ、そのポーズ数が十分であった場合、それらのポーズの中に正しいポーズが含まれていると考えることができる。それぞれのリガンドのドッキングの結果から、真のポーズを同定するため、リガンド-タンパク質複合体の結合自由エネルギーの一点計算を表す MM-GB/SA スコアを利用すべく、Prime/MM-GB/SA プログラム [Schrödinger Suite 2010 (Schrödinger Inc)] を用いて計算を行った。ここでは、それぞれのリガンドで、ドッキングポーズの Glide スコア上位 10 ポーズについて、MM-GB/SA スコア計算を実施した。<sup>155</sup> OPLS2005 力場及び generalized-Born surface area (GBSA) continuum solvent モデルを用いて複合体のエネルギー計算を行った。結合自由エネルギー ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) は次の式を用いて推定した。

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{solv}} + \Delta G_{\text{SA}}$$

$\Delta E_{\text{MM}}$  は OPLS2005 力場を用いて計算された、リガンド-タンパク質複合体エネルギーと、リガンドとリガンドなしのタンパク質のエネルギー合計の差である。 $\Delta G_{\text{solv}}$  はリガンド-タンパク質複合体の GBSA 溶媒和エネルギーと、リガンドとリガンドなしのタンパク

質の溶媒和エネルギー合計の差である。 $\Delta G_{SA}$  はリガンド-タンパク質複合体の表面積エネルギーと、リガンドとリガンドなしのタンパク質の合計表面積エネルギーの差である。なお、エントロピー補正は行わなかった。誘電率は 1.0 とし、最も低いエネルギーのポーズを決定ポーズとした。このポーズ決定プロセスの妥当性を検証するため、X 線共結晶構造中のリガンドの決定ポーズを、このプロセスにしたがって生成し、これを X 線結晶構造解析での位置と比較した。

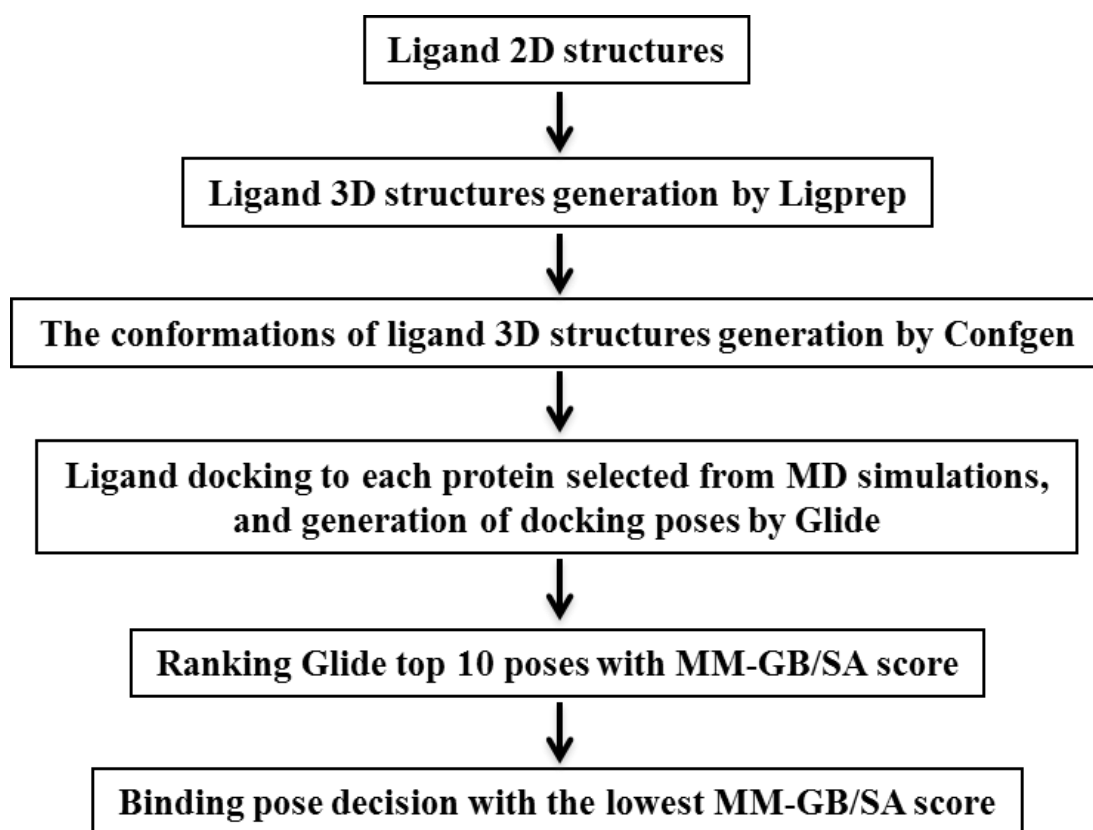


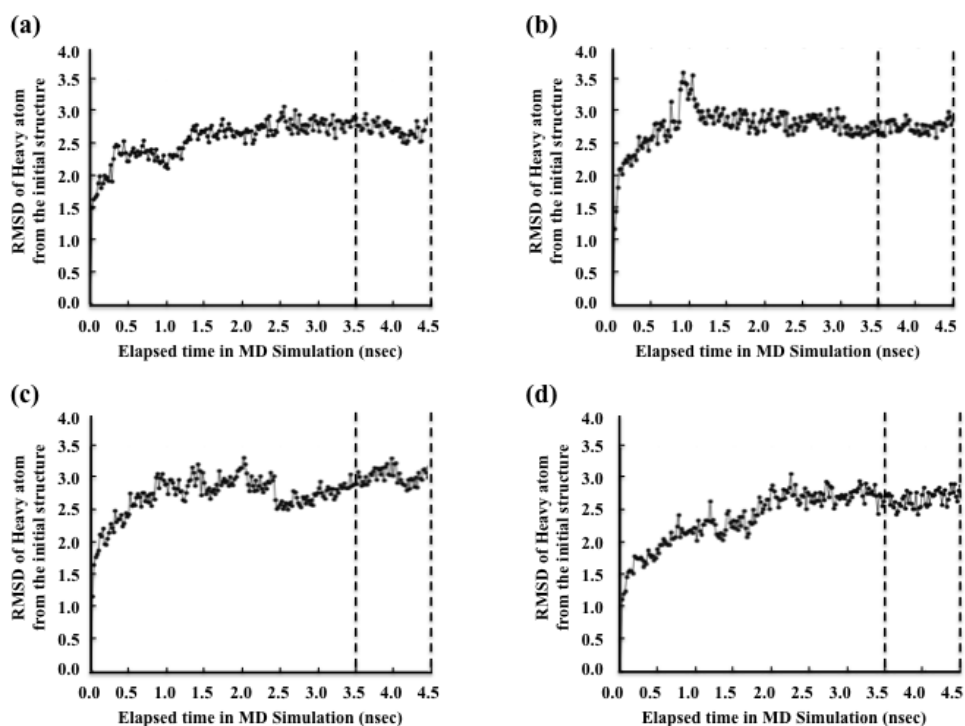
Figure 11 ポーズ決定プロセス.



**CoMFA モデリング**：分子アライメントは、まずリガンド周辺 4 Å のアミノ酸でリガンド-タンパク質複合体を重ね合わせ、次に、タンパク質を取り除くことで取得した。計算は CoMFA module [SYBYL 8.1 (*Tripos Inc.*)] を用いた。ここでの CoMFA は、すべて標準的な初期パラメータを用いた。QSAR モデルは pEC<sub>50</sub> 値に対する CoMFA 静電場と立体場の PLS 解析によって得られる。<sup>126</sup> 得られた CoMFA モデルにはトレーニングデータセットの交雑検定及びテストデータセットの外部検証を実施した。

## 2.3 結果

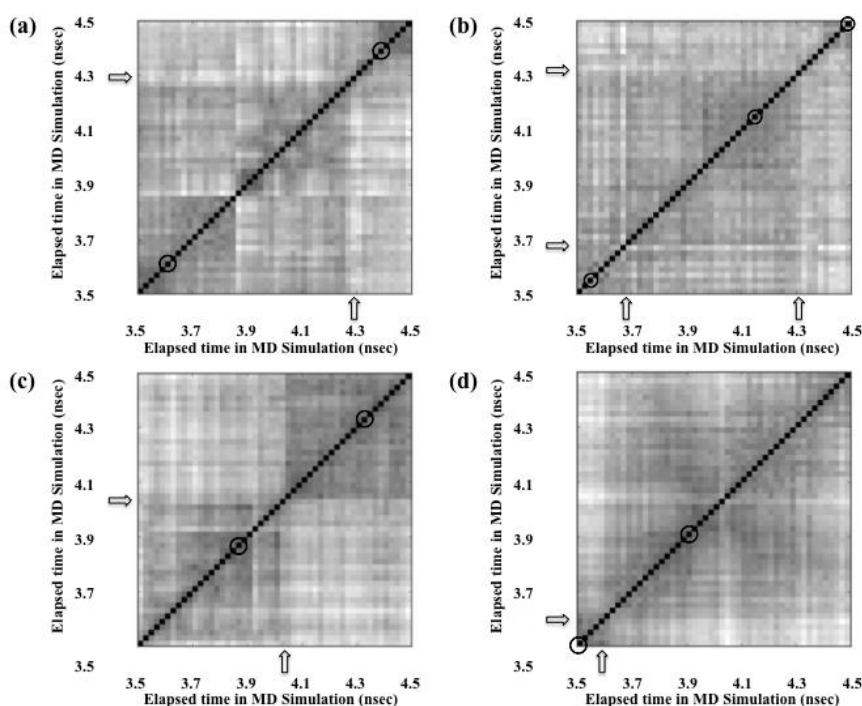
**PXR タンパク質構造コンフォメーション**：MD シミュレーションの初期構造にある重原子に対する RMSD のトラジェクトリを調べた所、構造の変動が 3.5 から 4.5 nsec で平衡に達している様子が観察された (Figure 12)。



**Figure 12** MD シミュレーションでの初期構造からの重原子のずれ

MD シミュレーション初期構造の PDB code は 1ILG (a), 1ILH (b), 1M13 (c) 及び 3R8D (d)である。

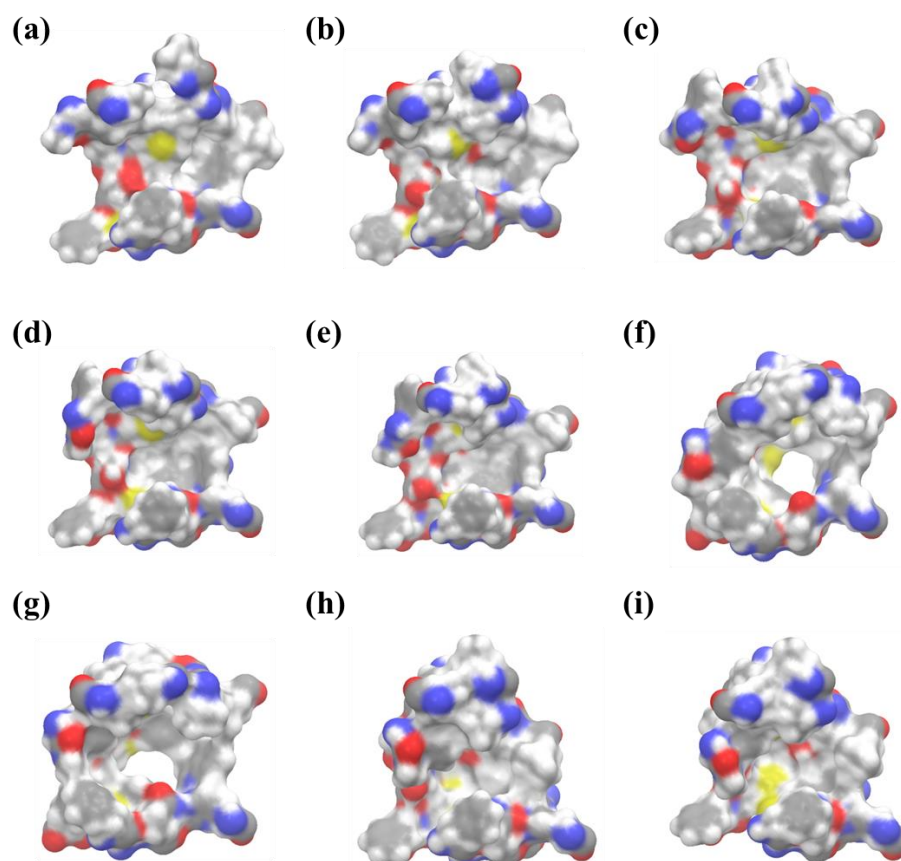
MD シミュレーション時間 3.5 から 4.5 nsec における、各タンパク質構造のリガンド結合空間のアミノ酸コンフォメーションについてのトラジェクトリを Maestro clustering of conformers module (*Schrödinger Suite 2010*) にてクラスタリングし、クラスタリングによって得られた距離マトリクスを Figure 13 に示した。距離マトリクスを視覚的に判断し、1ILG, 1ILH, 1M13 及び 3R8D の構造スナップショットをそれぞれ 2, 3, 2 及び 2 個のクラスターに分けた。それぞれのクラスターから選ばれた代表構造の MD シミュレーション経過時間は、1ILG では 3.60 及び 4.40 nsec, 1ILH では 3.66, 4.16 及び 4.50 nsec, 1M13 では 3.88 及び 4.32 nsec, 3R8D では 3.62 及び 3.92 nsec であった。



**Figure 13** 距離マトリクス

MD シミュレーション初期構造の PDB code は 1ILG (a), 1ILH (b), 1M13 (c) 及び 3R8D (d)である。矢印はクラスターの境界。○は代表構造。

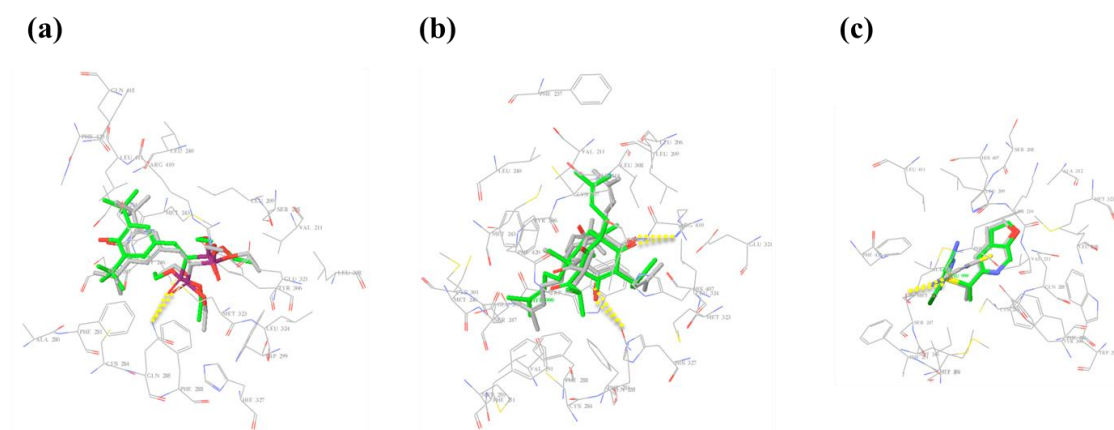
次に、これら MD シミュレーションのトラジェクトリから選ばれた、PXR 代表構造のリガンド結合空間を Figure 14 に示す。この様子から、代表 PXR タンパク質構造のリガンド結合空間は、多様性に富んでいることが分かった。



**Figure 14 MD シミュレーション代表構造のリガンド結合部位表面**

MD シミュレーションの初期構造は 1ILG [(a) and (b)], 1ILH [(c-e)], 1M13 [(f) and (g)]及び 3R8D [(h) and (i)]  
であり、MD シミュレーション経過時間は 3.60 (a), 4.40 (b), 3.56 (c), 4.16 (d), 4.50 (e), 3.88 (f), 4.32 (g),  
3.52 (h) 及び 3.92 ns (i) である。

ポーズ決定プロセスの妥当性検証：Figure 11 で示したポーズ決定プロセスが妥当であることを検証するため、用いた PXR X 線結晶構造中に含まれる共結晶リガンドである SR12813 (PDB, 1ILH), Hyperforin (PDB, 1M13) 及び PNU-142721 (PDB, 3R8D) をポーズ決定プロセスにしたがって、その決定ポーズを生成した。このポーズと X 線結晶構造解析での位置を比較した。その結果、いずれの共結晶リガンドも X 線結晶構造解析での位置を RMSD 2Å 以内で再現したので、このポーズ決定プロセスは妥当であると判断した (Figure 15)。

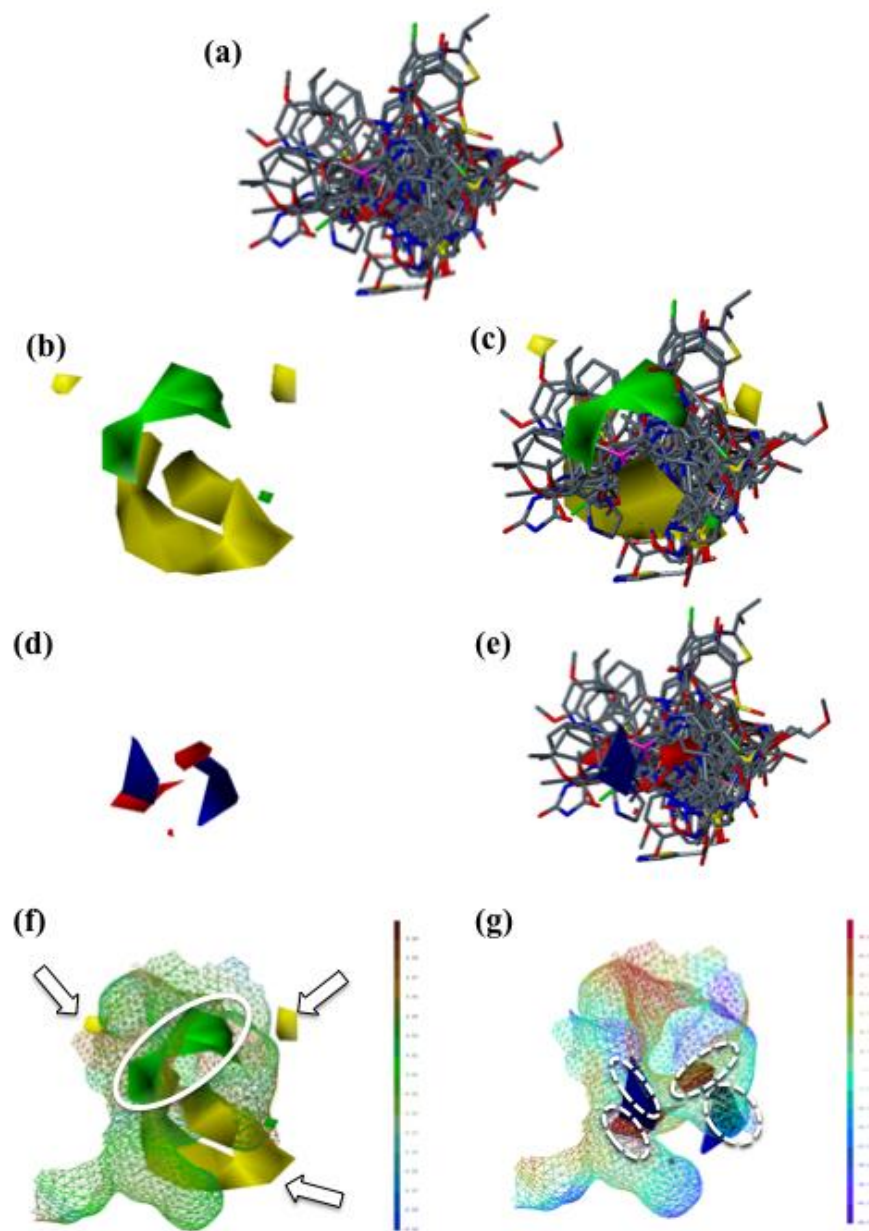


**Figure 15** ポーズ決定プロセスの妥当性検証

X 線共結晶リガンドは SR12813 (a), Hyperforin (b) 及び PNU-142721 (c)であり、緑色が X 線結晶構造解析で決定された位置、灰色がポーズ決定プロセスによって決定されたポーズである。黄色点線は水素結合。

**PXR CoMFA モデル:** タンパク質構造に基づいた分子アライメントがポーズ決定プロセス (Figure 11) にしたがって生成された。得られたアライメントは Figure 16 (a) に示した。この分子アライメントを用いて、CoMFA モデルを作成した。得られたモデルの

統計結果を Table 5, 予測  $pEC_{50}$  値を Table 6, この予測値を実験値に対してプロットした図を Figure 17 に示した。これらの結果より, 作成した CoMFA モデルでの予測値は実験値と良く一致していた。CoMFA 等高線と分子アライメントの様子を Figure 16 (b) – (e), CoMFA 等高線とリガンド結合空間周辺のタンパク質 (PDB コード 1ILG, 3.60 nsec) 表面の様子をキャビティーとして Figure 16 (f), (g) に示した。なお, 第 1 章でも述べたが, CoMFA 等高線は等高線の色によって, リガンドが阻害活性へ果たす役割が以下のように決まっている。緑色はリガンドに立体的に嵩高い置換基がある場合に活性が高くなる領域, 黄色はリガンドに立体的に嵩高い置換基がある場合に活性が低くなる領域, 赤色はリガンドに負の電荷をもつ置換基がある場合または水素原子受容基がある場合に活性が高くなる領域, 青色はリガンドに正の電荷をもつ置換基がある場合または水素原子供与基がある場合に活性が高くなる領域である。本研究で得られた CoMFA モデルの等高線図では, 緑色の等高線がキャビティーの内側にあり, 黄色の等高線がキャビティーの外側に存在した [Figure 16 (f)]。また, 赤色の等高線は正に帯電しているアミノ酸の近くに見られ, 青色の等高線は負に帯電しているアミノ酸の近くに見られた [Figure 16 (g)]。したがって, PXR のリガンド結合空間における環境が CoMFA 等高線によく反映されていると考えられた。



**Figure 16** 分子アライメントと CoMFA 等高線

(a) 分子アライメント, (b) CoMFA 等高線立体場, (c) 分子アライメントと CoMFA 等高線立体場, (d) CoMFA 等高線静電場, (e) 分子アライメントと CoMFA 等高線静電場, (f) CoMFA 等高線立体場とリガンド周辺アミノ酸脂溶性キャビティ, (g) CoMFA 等高線静電場とリガンド周辺アミノ静電キャビティ

Table 5 PXR CoMFA モデルの統計結果

CoMFA Model	Cross-validated			No. of component	Conventional					Test Dataset	
	n <sub>training</sub> <sup>a</sup>	q <sup>2</sup> <sup>b</sup>	Spres <sup>c</sup>		r <sup>2</sup> <sup>d</sup>	s <sup>e</sup>	F <sup>f</sup>	Contribution		n <sub>test</sub> <sup>i</sup>	r <sup>2</sup> <sup>j</sup>
								ST <sup>g</sup>	EL <sup>h</sup>		
PXR	28	0.518	0.815	4	0.971	0.202	189.385	0.450	0.550	6	0.969

<sup>a</sup> The number of ligands used as training data set. <sup>b</sup> Predicted correlation coefficient in leave-one-out cross validation.

<sup>c</sup> Standard deviation for the sum of square predicted errors. <sup>d</sup> The conventional values of correlation coefficient.

<sup>e</sup> Standard deviation. <sup>f</sup> F value. <sup>g</sup> The contribution values of steric contribution. <sup>h</sup> The contribution values of electrostatic contribution. <sup>i</sup> The number of ligands used as test data set. <sup>j</sup> Predicted correlation coefficient in external-validation.

Table 6 実験的 pEC<sub>50</sub> 値と CoMFA による pEC<sub>50</sub> 予測値

Training compounds	Observed pEC <sub>50</sub>	Predicted pEC <sub>50</sub>	Test compounds	Observed pEC <sub>50</sub>	Predicted pEC <sub>50</sub>
Hyperforin	6.70	6.79	Nicardipine	6.40	6.29
Felodipine	6.60	6.19	Nisoldipine	5.72	5.87
Lacidipine	6.49	6.46	Lansoprazole	5.19	4.94
Nimodipine	6.35	6.21	Phenylbutazone	4.44	4.14
Isradipine	6.17	6.03	Caffeine	3.70	3.63
Ritonavir	6.10	6.29	Probenecid	3.70	3.87
Clotrimazole	5.89	6.00			
Amlodipine	5.80	5.72			
Nifedipine	5.66	5.95			
Nitredipine	5.52	5.73			
Mifepristone	5.51	5.39			
Haloperidol	5.38	5.38			
Verapamil	5.02	4.81			
Terbinafine	4.80	4.69			
Omeprazole	4.68	4.83			
Sulfinpyrazone	4.55	4.40			
Phenytoin	4.35	4.35			
Rosiglitazone	4.31	4.07			
Pregnenolone	4.00	4.23			
Sulfamethazine	3.72	3.84			
Naproxen	3.70	3.67			
Pioglitazone	3.70	3.92			
Dexamethazone	3.70	3.99			
Sulfasalazine	3.70	3.97			
Theophylline	3.70	3.44			
Tolbutamide	3.70	3.62			
Diclofenac	3.70	3.63			
Doxorubicin	3.70	3.62			



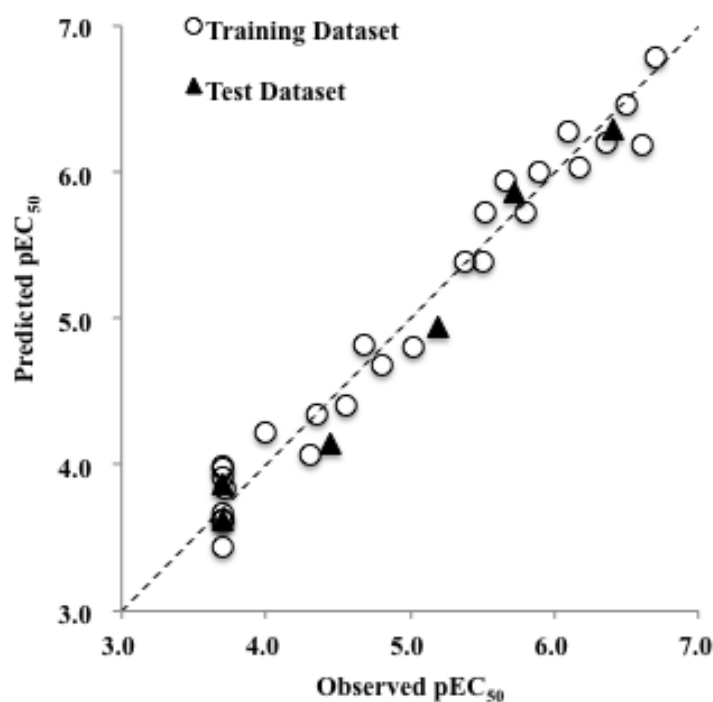


Figure 17 実験的  $pEC_{50}$  値と CoMFA モデルによる予測値

ドッキングポーズの観察とリガンド-タンパク質相互作用: この研究で用いたリガンドと PXR タンパク質のアミノ酸との相互作用について、いくつかのリガンドを取り上げる。この研究では構造が多様な化合物を用いたので、ドッキングポーズを観察した所、その相互作用様式も多様であった (Figure 18)。先行研究では、PXR のリガンドとの疎水性相互作用には Phe288, Trp299 及び Tyr306 重要な役割を果たし、水素結合には Ser247, Gln285, His407 及び Arg410 が重要な役割を果たすことが示唆されていた。<sup>148, 149</sup> この研究によって、様々なリガンドで疎水性相互作用に関しては、Phe288, Trp299 及び Tyr306 だけではなく、Leu209, Val211, Met243, Met246, Leu308, Met323, Leu324, His327, His407, Leu411 及び Phe420 など多くのアミノ酸がリガンドと相互作用することが示唆された

(Table 7)。また、水素結合に関しても、Ser247, Gln285, His407 及び Arg410 に加えて、Ser208 が重要な役割を果たしている可能性が示唆された (Table 7)。

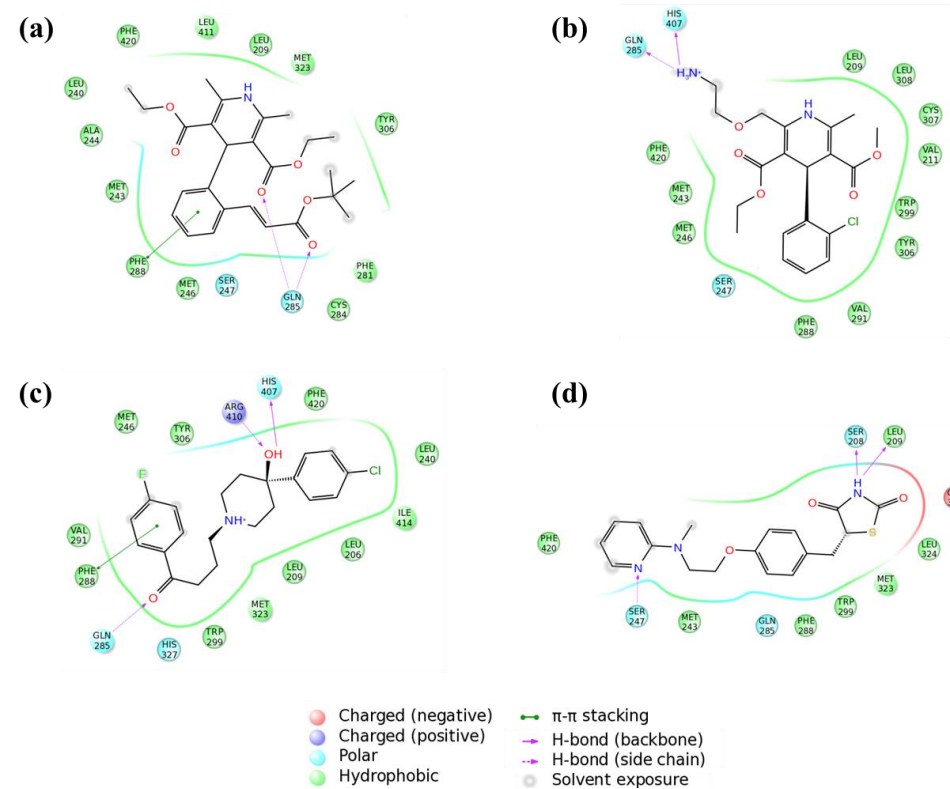


Figure 18 PXR リガンドとアミノ酸の相互作用の様子

リガンドは Lacidipine (a), Amlodipine (b), Haloperidol (c) 及び Rosiglitazone (d) である。

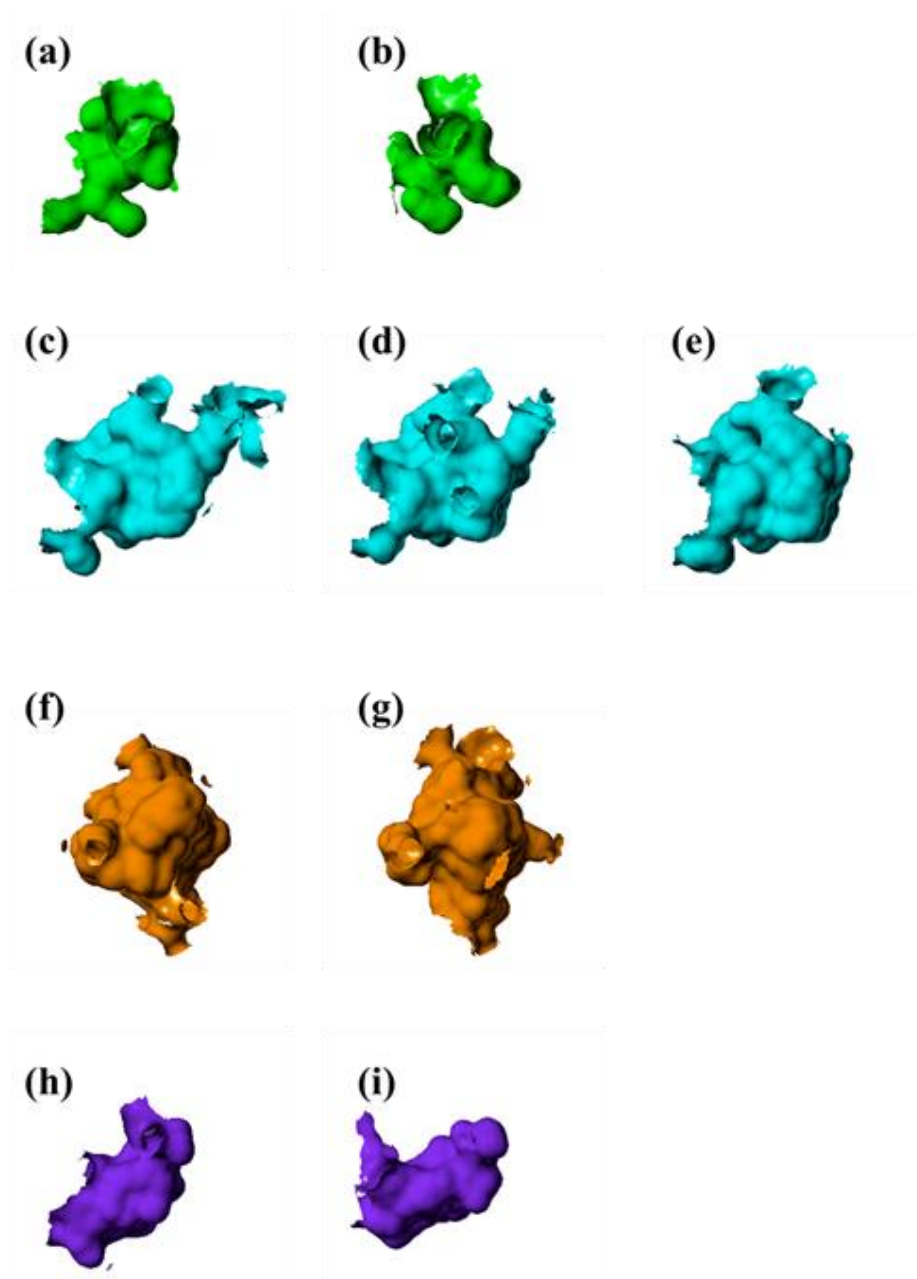
Table 7 PXR リガンドと相互作用するアミノ酸

Key amino acids for ligand-protein interaction		
Enzyme	Hydrogen bond: Amino acids observed more than three times in used ligands	Hydrophobic interaction: Amino acids observed in more than 50% of used ligands
PXR	Ser208, Ser247, Gln285, His407, Arg410	Leu209, Val211, Met243, Met246, Phe288, Trp299, Tyr306, Leu308, Met323, Leu324, His327, His407, Leu411, Phe420

## 2.4 考察

**PXR 代表タンパク質構造の多様性** : PXR LBD の X 線構造を比較した所, X 線結晶化プロセスでのひずみまたはリガンドのインデュースフィットによる, アミノ酸のずれを認めた (Figure 9)。そこで, 水中での PXR LBD の活性コンフォメーションを得るため, MD シミュレーションを実施した。MD シミュレーションから得られた PXR の代表構造は多様性に富んでいることが, リガンド結合部位の表面表示から明らかであり (Figure 14), さらにそのキャビティー表面を観察すると一目瞭然であった (Figure 19)。このことは, タンパク質の柔軟性がこの研究では十分に考慮されており, たとえリガンドの化学構造が多様であったとしても, 正確なドッキングポーズを生成できる可能性が高いことを示唆していた。<sup>56</sup>

**3D-QSAR (SB CoMFA) モデルの予測性能** : Table 5 に示したように, 本研究にて構築された CoMFA モデルの統計結果は良好であった。予測  $pEC_{50}$  値を実験値に対してプロットすると, これら二つの間に強い相関性が見られた (Figure 17)。さらに, PXR リガンド結合空間の環境が CoMFA 等高線によく反映されていると考えられた [Figure 16 (f), (g)]。これらをまとめると, 本研究で得られた 3D-QSAR モデルは, 多様な構造を持つ化合物の酵素誘導活性を予測することができ, このモデルを用いることによって, 創薬の初期段階で新規な候補化合物の, PXR 活性化による酵素誘導の評価を行うことができると考えられた。



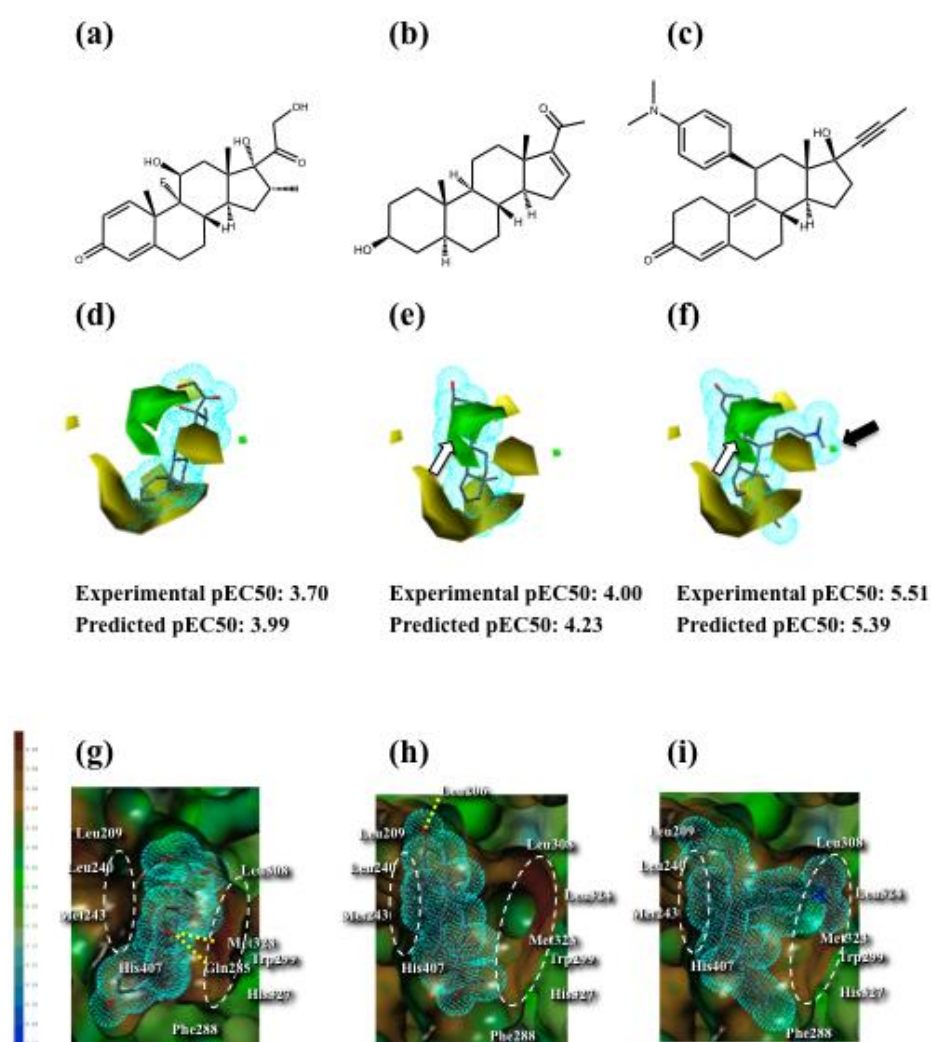
**Figure 19 MD シミュレーション代表 PXR 構造の基質結合部位キャビティ**

(a) 及び (b) の初期構造 : PDB code 1ILG (緑色), (c–e) の初期構造 : PDB code 1ILH (水色), (f) 及び (g) の初期構造 : PDB code 1M13 (オレンジ), (h) 及び (i) の初期構造 : PDB code 3R8D (紫色). MD シミュレーション経過時間は 3.60 (a), 4.40 (b), 3.56 (c), 4.16 (d), 4.50 (e), 3.88 (f), 4.32 (g), 3.52 (h) 及び 3.92 ns (i) である。

同属化合物のドッキングポーズ解析：本研究にて作成された 3D-QSAR モデルを用いて、二次元化学構造が似ているにも関わらず、酵素誘導活性の異なる化合物について、それらのドッキングポーズを比較した。この結果から、酵素誘導活性の差の原因について考察を行うことにした。以下に示す、二つのデータセットについて、ドッキングポーズと CoMFA 等高線または MOLCAD プログラム [SYBYL8.1 (Tripos Inc.)] によって作成したリガンド結合空間周辺のタンパク質表面とを合わせて観察した。

(1) ステロイド系化合物：一つ目のデータセットとして、Dexamethasone, Pregnenolone 及び Mifepristone から成るステロイド系化合物を用いた。これらの化合物は本研究の CoMFA トレーニングデータセットに含まれており、決定ポーズはポーズ決定プロセス (Figure 11) にしたがって生成した [Figure 20 (a) – (i)]。これら化合物の酵素誘導活性  $pEC_{50}$  実験値の順番は次の通りである。Dexamethasone ( $pEC_{50}$ : 3.70) < Pregnenolone ( $pEC_{50}$ : 4.00) < Mifepristone ( $pEC_{50}$ : 5.51)。この時、本研究で作成された CoMFA モデルによる、これら化合物の予測  $pEC_{50}$  値は、Dexamethasone ( $pEC_{50}$ : 3.99) < Pregnenolone ( $pEC_{50}$ : 4.23) < Mifepristone ( $pEC_{50}$ : 5.39) であった (Table 6)。これら化合物の決定ポーズを観察すると、二つの主要なリガンド-タンパク質相互作用部位が存在することが分かった。第一の部位は、Leu209, Leu240 及び Met243 の疎水性アミノ酸残基から成っていた。これらのアミノ酸は Dexamethasone ではリガンド-タンパク質相互作用に用いられていなかったが、Pregnenolone 及び Mifepristone では用いられていた [Figure 20 (g) – (i)]。この部位の相互作用は、CoMFA 等高線図における大きな緑色の等高線 (リガンドに立体的に嵩高い置換基がある場合に活性が高くなる領域) に反映されているものと考えられた [Figure 20 (d) – (f)]。第二の部位は、Phe288, Trp299, Leu308, Met323, Leu324 及び His327 の疎水性アミノ酸残基から成っていた。これらアミノ酸は Dexamethasone 及び

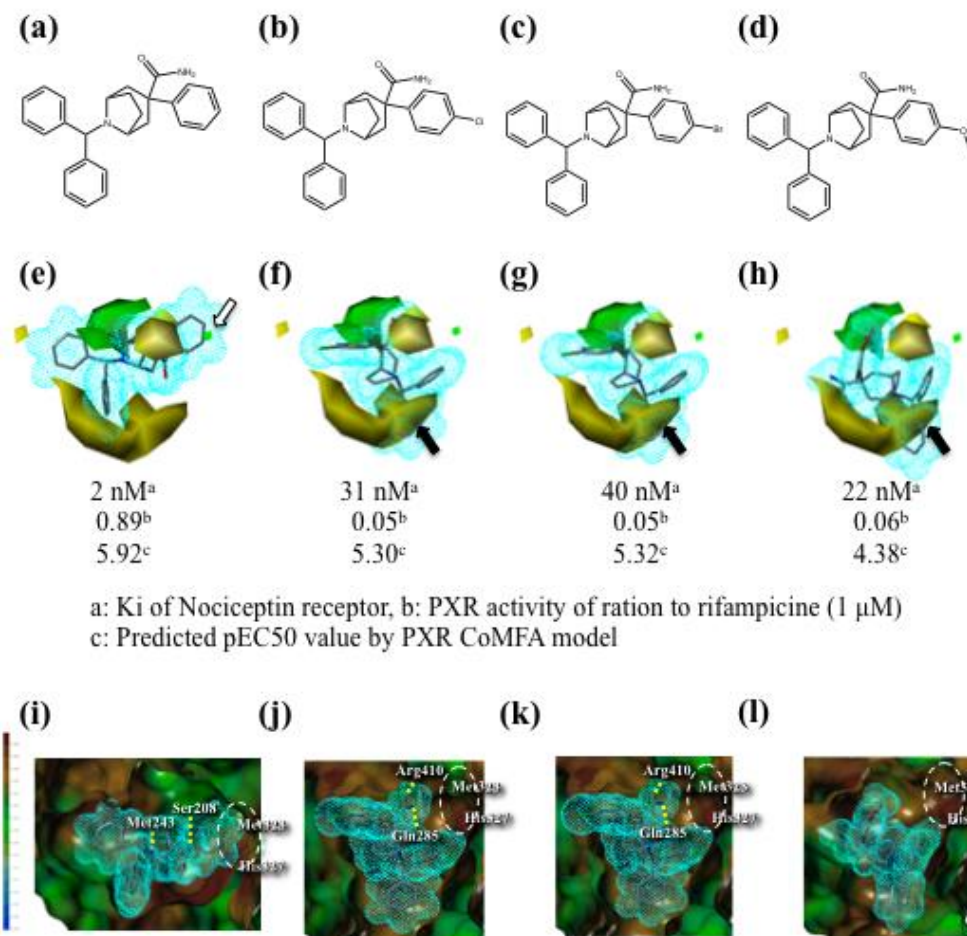
Pregnenolone ではリガンド-タンパク質相互作用に用いられていなかったが, Mifepristone では用いられていた [Figure 20 (g) – (i)]。この部位の相互作用は, CoMFA 等高線図における小さな緑色の等高線に反映されているものと考えられた [Figure 20 (d) – (f)]。これらの結果から, 本研究で用いた三つのステロイド系化合物の酵素誘導活性の差異は, この二つの疎水性相互作用の有無によるものであるという可能性が示唆された。



**Figure 20** ステロイド系化合物の決定ポーズ

リガンドは, (a), (d), (g) Dexamethasone, (b), (e), (h) Pregnenolone, (c), (f), (i) Mifepristone である。

(2) **Tropane 同属化合物**：二つ目のデータセットとして、Schering-Plough 社により開発された、ノシセプチンフルアゴニストを目指した、四つの二次元化学構造の似た Tropane 同属化合物を用いた。<sup>156</sup> これら化合物は本研究の CoMFA モデルのデータセットには含まれていない。また pEC<sub>50</sub> 値のデータは得られていないが、Rifampicin 1 μM による PXR 活性化に対する相対的な PXR 活性値が得られている。化合物 24 番 [8-benzhydryl-3-phenyl-8-azabicyclo [3. 2. 1] octane-3-carboxamide] はノシセプチン受容体に対する親和性を持つヒット化合物であるが、PXR 活性化による酵素誘導活性も同時に持っていた。そこで開発者らは、ノシセプチン受容体親和性を保ちながら、PXR 活性の弱い、新規な Tropane 同属化合物として、化合物 33 番 [8-benzhydryl-3-(4-chlorophenyl)-8-azabicyclo [3. 2. 1] octane-3-carboxamide]、化合物 34 番 [8-benzhydryl-3-(4-bromophenyl)-8-azabicyclo [3. 2. 1] octane-3-carboxamide] 及び化合物 35 番 [8-benzhydryl-3-(4-methoxyphenyl)-8-azabicyclo [3. 2. 1] octane-3-carboxamide] を、化合物 24 番のフェニル基への化学官能基の導入によって開発した。本研究では、これら化合物のポーズをポーズ決定プロセス (Figure 11) にしたがって生成した [Figure 21 (a) – (l)]。これら化合物の CoMFA モデルによる予測 pEC<sub>50</sub> 値は、pEC<sub>50</sub> 値の実験データがないので、値それ自体の検証はできない。しかしながら、予測 pEC<sub>50</sub> 値は実測されたこれら化合物の PXR 活性の順番を反映したものであった (Figure 21)。



**Figure 21 Tropan 化合物の決定ポーズ**

リガンドは, (a), (e), (i) 化合物 24 番, (b), (f), (j) 化合物 33 番, (c), (g), (k) 化合物 34 番, (d), (h), (l) 化合物 35 番である。



まず、化合物 24 番の決定ポーズでは、化合物のフェニル基と Met323 及び His327 との特異的な疎水性相互作用が見られた [Figure 21 (i)]。この相互作用は CoMFA 等高線における小さな緑色の等高線に反映されているものと考えられた [Figure 21 (e)]。一方で、化合物 33, 34 及び 35 番のドッキングポーズの配向は化合物 24 番と大きく異なり、化合物 33, 34 及び 35 番はこの疎水性相互作用を持たず、大きな黄色の等高線（リガンドに立体的に嵩高い置換基がある場合に活性が低くなる領域）との重なりを持っていた [Figure 21 (f) – (h), (j) – (l)]。この結果から、Tropane 同属化合物で PXR 活性化の程度が異なっていたのは、化合物 24 番のフェニル基への新たな化学官能基の導入によってドッキングポーズ配向の変化が引き起こされ、リガンド-タンパク質相互作用に変化を起こした、という可能性が示唆された。さらに、この結果は、本研究にて作成された CoMFA モデルが、外部の様々なデータセットの予測に対しても信頼が置けるということも示唆した。

結論として、本章の研究によって、MD シミュレーションに基づく複数タンパク質構造サンプリング手法と、ドッキングポーズの MM-GB/SA スコアによる再スコア化によって、統計結果に優れた、酵素誘導活性を予測するための CoMFA モデルを構築することができた。また、ドッキング結果から、リガンド-タンパク質相互作用にとって重要と考えられる多くのアミノ酸が示唆された。さらに、決定ポーズと CoMFA 等高線図との観察から、二次元化学構造が良く似ている同属化合物の酵素誘導活性の差異を説明することができた。最後に、本研究で得られた 3D-QSAR モデルは多様な構造を持つ化合物の酵素誘導活性を予測することができ、このモデルを用いることによって、創薬の初期段階で新規な候補化合物の PXR 活性化による酵素誘導の評価を行うことができると

考えられた。したがって、この手法は酵素誘導に起因する特別な薬物動態の予測を可能とした、効率的な新薬開発プロセスに貢献するものと考えられる。

### 第3章 薬物の CYP2D6 の遺伝子多型阻害に関する *in silico* 研究



### 3.1 緒論

今日、製薬企業にとって機能的な変化を引き起こす遺伝子多型を理解することは、個人毎の DDIs への対応が可能となるであろうオーダーメイド医療を見据えると、ますます重要になってきている。したがって、遺伝子多型を考慮した薬剤開発が必要になってくることは間違いない。本章では、薬物代謝に関して CYP3A4 に次いで二番目に重要な役割を果たしている CYP2D6 の遺伝子多型に焦点を当てた。

CYP 酵素は薬物の約 90% の代謝に関与しており、それぞれのタンパク質アイソフォームの代謝寄与率 (全 CYP 寄与に対する%) は、CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP2D6 及び CYP3A4 においてそれぞれ 4%, 2%, 10%, 2%, 2%, 30% 及び 50% である。<sup>19</sup> 肝臓の CYP2D6 は肝 CYP タンパク質の全量に対してたった 1-2% しか存在していないにもかかわらず、多くの薬物でその代謝に大きな寄与を果たしている。<sup>157</sup> CYP2D6 はその基質に対して高い親和性を持っている一方で、小さな受け入れ体積しか持っていないと考えられており、比較的低い濃度であっても代謝の飽和を迎える。そのため、CYP2D6 は多くの薬物によって競争的な阻害を受けやすく、結果として臨床での重篤な DDIs を引き起こす。<sup>158</sup> DDIs を正しく見積もるためには、総ての関連する代謝酵素の能力を把握することが重要である。これらを考慮に入れなかった場合、ある薬物の臨床試験では極端に低い血中濃度のために有効性が得られない、または極端に高い血中濃度のために毒性が発現してしまうことなどが考えられる。ここで、CYP2D6 遺伝子多型のフェノタイプを分類すると、Ultrarapid Metabolizers (UM), Extensive Metabolizers

(EM), Intermediate Metabolizers (IM) 及び Poor Metabolizers (PM) の四つのグループに分類される。UM のフェノタイプは CYP2D6 遺伝子の複数コピーが原因であり, PM のフェノタイプは二つとも機能を失ったヌルアリの存在が原因である。また, EM は一つまたは二つの正常なアリが存在している。一方で, IM のフェノタイプは大抵一つのアリともう一つの機能が減弱したアリが原因である。<sup>158</sup> 例えば PM のように完全に機能を失った酵素での代謝及びその阻害の場合には, 酵素の能力を単にゼロと考えると良い。しかし, IM のように部分的に機能を失った酵素の代謝及びその阻害の場合には, その酵素活性能力の程度を正確に見積もらなければ, DDIs を正しく評価することはできない。IM の遺伝子多型は人種によって大きく異なることが知られており, 主要な二つの遺伝子多型 CYP2D6.10 及び CYP2D6.17 がある。CYP2D6.10 は日本人, 中国人及び韓国人などのアジア人に見られる二つのアミノ酸変異 (P34S/S486T) を持つ多型である。<sup>158, 159</sup> しかしながら, CYP2D6.10 は高温で不安定であることが知られているため, 単純に CYP2D6.1 (野生体型) と CYP2D6.10 を構造とフェノタイプで比較することはできない。<sup>160</sup> 一方で, CYP2D6.17 は正常に発現しており, 構造モデル解析の研究対象となり得るものと考えた。CYP2D6.17 はアフリカ人に分布しており, 三つのアミノ酸変異 (T107I/R296C/S486T) を持つ多型である。<sup>158, 159</sup> CYP2D6.17 のそれぞれのアフリカの国々での正確な分布は次の通り (各国における CYP2D6.17 をもつ国民の割合を示す), ジンバブエで 34%<sup>161</sup>, エチオピアで 9%<sup>162</sup>, タンザニアで 18%<sup>163</sup>, ガボンで 24%<sup>164</sup> 及びガーナで 28%<sup>165</sup> である。また, CYP2D6.17 の基質特異性は CYP2D6.1 とは異なることが良く知られており, 多くの場合, CYP2D6.17 の代謝能力は CYP2D6.1 に劣ることが示されている。<sup>166, 167, 168, 169</sup>

最近では、新薬の開発はしばしば世界中で行われており、臨床試験は様々な地域で実施されている。得られた臨床データは、そのデータが得られた国への申請資料としてだけでなく、それ以外の国への申請資料として用いることができる。このデータの外挿性についてのガイドラインは ICH から発表されており、ICH-E5 ガイドラインとして知られている。<sup>37</sup> ICH-E5 ガイドラインは基本的に三つのステップを踏むことで、国外データの受け入れ可能性の判断を行うことを提案している。第一ステップとして、治療薬の臨床データパッケージの完全性を評価し、もし臨床データパッケージが完全であれば、次に第二ステップとして、人種に関する因子への治療薬の感受性を評価する。そして第三ステップとして、治療薬の人種に関する因子への感受性が治療薬の安全性、有効性及び用量反応性に与える影響の確率に基づいた橋渡し試験の必要性を判断する。<sup>37, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176</sup> したがって、医薬品の代謝が人種の影響を受けやすいかどうかを見積もることは、国外の臨床データが受け入れられるものかどうかを判断するのに重要である。

ここでは、薬物動態予測のための CYP2D6.1 及び CYP2D6.17 に対する阻害作用の計算を通して、人種の薬物阻害への影響についての研究を行った。ある研究では、CYP2D6 阻害剤 [(S)-Fluoxetine, (S)-Norfluoxetine, Imipramine, Cocain, Quinidine 及び Thioridazine] の CYP2D6.1 及び CYP2D6.17 の阻害定数 ( $K_i$  値) が、スーパーソーム発現系を用いて報告されている。<sup>177</sup> この研究では、これら阻害剤の阻害活性は、CYP2D6.1 阻害の方が CYP2D6.17 阻害よりも大きかった。しかしながら、阻害の程度には差があり、これら阻害剤は二つのグループに分けることができた。一つのグループは、(S)-Fluoxetine 及び (S)-Norfluoxetine を含む、CYP2D6.1 阻害と CYP2D6.17 阻害とで、あまり大きな差が見られなかったものである。もう一つのグループは、Imipramine, Cocaine, Quinidine 及

び Thioridazine を含む, CYP2D6.1 阻害と CYP2D6.17 阻害とで, 大きな差が見られたものである。このような CYP 阻害の変異体間の差については, CYP3A4 自然変異体に関する別の研究で, タンパク質発現量が野生体型と比べて変わらない場合, こういった差の原因はリガンドの酵素中での結合ポーズの違いによるのではないかと示唆されている。<sup>178</sup> ここで, 変異アミノ酸による CYP2D6 タンパク質構造の違いに着目すると, ある研究では *in vitro* 代謝実験及び変異導入実験の結果から, T107I 及び R296C は阻害に差をもたらすのに大きな役割を果たしているが, 一方で S486T は影響を与えていないと報告している。<sup>179</sup> この報告の中で, 著者らは S486T の位置はリガンド結合部位から遠いのに対し, T107I 及び R296C の位置はリガンド結合部位に近いためである, と結論づけていた。これらアミノ酸変異箇所以外では, CYP2D6 の基質認識にいくつかのアミノ酸が重要であると考えられており, ドッキング研究及び変異導入実験の結果から, Phe120 及び Phe483 がリガンドの  $\pi$ - $\pi$  相互作用などの疎水性相互作用に重要であり, Glu216, Asp301 及び Ser304 がリガンドの水素結合に重要であると主張されている。<sup>180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188</sup> しかしながら, これらの研究ではドッキング方法に CYP2D6.1 のアポ構造 (PDB コード 2F9Q) を用いていた。<sup>189</sup> 最近, CYP2D6 の Prinomastat との共結晶 (PDB コード 3QM4) が解かれ, リガンドによって CYP2D6 は大きなコンフォメーション変化を起こすことが明らかとなり, また新たに F'ヘリックスの存在が明らかになっている。<sup>190</sup>

この研究の目的は, 化合物の薬物動態予測のために CYP2D6 薬物阻害の人種差を CYP2D6.1 と CYP2D6.17 との 3 次元構造の差異とともに見積もることである。この研究では, ドッキング用タンパク質構造として CYP2D6 の Prinomastat との共結晶 (PDB code 3QM4) を用いることとし, CYP2D6.1 及び CYP2D6.17 の水中での活性コンフォメーシ



オンを得るために、MD シミュレーションのトラジェクトリからいくつかの構造をサンプリングした。この MD シミュレーションに基づく複数タンパク質構造サンプリング手法により、本研究のドッキングではタンパク質の柔軟性が考慮できるものと考えた。まず、六つの薬物を MD シミュレーションのトラジェクトリからサンプリングした複数の CYP2D6.1 構造にドッキングし、結合自由エネルギーを表す MM-GB/SA スコアの計算を行った。次に、薬物の CYP2D6.1 阻害を予測するために、MM-GB/SA スコアに基づく回帰分析を行った。さらに、CYP2D6.1 と同様の方法で CYP2D6.17 阻害の解析を行った。

## 3.2 材料と方法

**CYP2D6.1 構造の準備** : PDB コード 3QM4 の X 線 (Prinomastat 共) 結晶構造を用い、まず結晶水を取り除いた。次に、アミノ酸配列の内、末端部分の欠損を考慮して、34 番目から 497 番目までのアミノ酸を用い、34 番目から 497 番目までのアミノ酸で欠損のあるものは Prime プログラム [Schrödinger Suite 2010 (*Schrödinger Inc*)] を用いて補った。最終的にこの構造は OPLS2005 力場にてエネルギー極小化を行った。

**CYP2D6.1 へのコンピュータドッキング** : ドッキングには Glide SP ドッキングプログラム [Schrödinger Suite 2010 (*Schrödinger Inc*)] を用いた。ドッキングパラメータは、タンパク質 vdW 半径スケールを 1.0, リガンド vdW 半径スケールを 0.8, グリッドサイズはリガンド周辺 4 Å のアミノ酸に重心を置いた 10 Å<sup>3</sup> とした。

**CYP2D6.17 構造の準備** : PDB code 3QM4 の X 線 (Prinomastat 共) 結晶構造にアミノ酸変異 (T107I/R296C/S486T) を Maestro fragment tool [Schrödinger Suite 2010 (*Schrödinger Inc*)] を用いて導入した。また、CYP2D6.1 構造の準備にしたがい、アミノ酸配列の内、末端部分の欠損を考慮して、34 番目から 497 番目までのアミノ酸を用い、34 番目から 497 番目までのアミノ酸で欠損のあるものは Prime プログラム [Schrödinger Suite 2010 (*Schrödinger Inc*)] を用いて補った。最終的にこの構造は OPLS2005 力場にてエネルギー極小化を行った。

**CYP2D6.17 へのコンピュータドッキング** : ドッキングには Glide SP ドッキングプログラム [Schrödinger Suite 2010 (*Schrödinger Inc*)] を用いた。ドッキングパラメータは、

タンパク質 vdW 半径スケールを 1.0, リガンド vdW 半径スケールを 0.75, グリッドサイズはリガンド周辺 4 Å のアミノ酸に重心を置いた 10 Å<sup>3</sup> とした。

**分子動力学シミュレーション:** 水中での活性コンフォメーションを得るため, 準備した Prinomastat 結合 CYP2D6.1 複合体及び Prinomastat 結合 CYP2D6.17 複合体を用いて, MD シミュレーションを実施した。計算は OPLS2005 力場を用いた露な溶媒下で実施し, Desmond プログラム [Schrödinger Suite 2010 (*Schrödinger Inc*)] の初期パラメータを用いて実施した。水分子モデルは TIP3P モデルとし, 系は Na<sup>+</sup> で中和した。周期境界条件及び非結合相互作用のカットオフ値 9.0 Å を, 許容誤差 10<sup>-8</sup> の Particle Mesh Ewald 法を用いた静電相互作用の下で用いた。MD シミュレーションの実施前に Desmond の初期緩和プロトコルを用い, それに引き続き, 5 nsec のシミュレーションを NPT 条件の下で Nosé-Hoover thermostat 及び Martyna-Tobias-Klein barostat を用いて実施した (T = 310.5 K, thermostat relaxation time = 1.0 psec; P = 1 atm; barostat relaxation time = 2.0 psec)。原子座標トラジェクトリデータは 20 psec 毎に記録した。リガンド結合空間 (リガンドである Prinomastat の周囲 4 Å) のアミノ酸のコンフォメーションの 4 から 5 nsec のトラジェクトリを, Maestro clustering module [Schrödinger Suite 2010 (*Schrödinger Inc*)] にて得られた距離マトリクスを用いてクラスタリングした。次に, 距離マトリクスでそれぞれのクラスターサイズを視覚的に判断し, クラスター領域内の平均 RMS 値に最も近いものを, それぞれのクラスターの代表構造として選んだ。最後に, これら代表構造を Desmond プログラムで極小化し, Prinomastat, Na<sup>+</sup> 及び水分子を除いた後に, コンピュータドッキングに用いた。

**リガンドデータセット:** 用いたリガンドの化学構造は Figure 22 に示し, それらの阻害活性を Table 8 に示した。これら化合物は全体的に構造的多様性に富んでおり, これ

ら化合物の構造及びCYP2CD6.1とCYP2D6.17に対する阻害活性は一つの文献から取得した。<sup>177</sup>

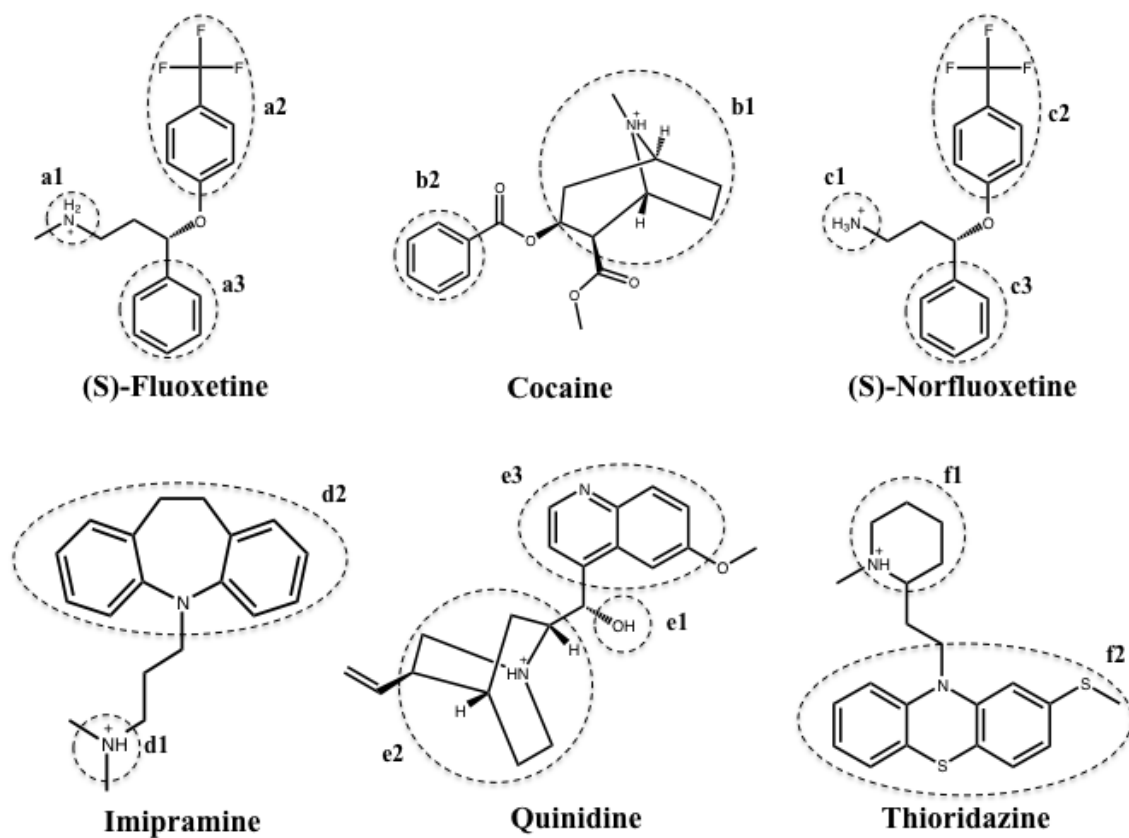


Figure 22 研究に用いた CYP2D6 阻害剤

**Table 8 CYP2D6.1 及び CYP2D6.17 に対する各阻害剤の実験的 pKi 値.**

Inhibitor	pKi value		$\Delta$ pKi value
	CYP2D6.1 (wild type)	CYP2D6.17 (natural variant)	
(S)-Fluoxetine	6.01	5.89	0.12
(S)-Norfluoxetine	6.03	5.82	0.20
Imipramine	5.50	5.03	0.47
Cocaine	6.12	5.26	0.86
Quinidine	7.98	7.17	0.81
Thioridazine	7.66	6.87	0.79

$\Delta$ pKi value was calculated from pKi<sub>CYP2D6.1 (wild type)</sub> minus pKi<sub>CYP2D6.17 (natural variant)</sub>.

**リガンドの準備**：リガンドの二次元化学構造を Ligprep プログラム [Schrödinger Suite 2010 (Schrödinger Inc)] を用いて三次元化学構造に変換した。Ligprep プログラムでは最終的に三次元化学構造を OPLS2005 力場によってエネルギー極小化した。化合物のイオン化状態は ADMET Predictor (Simulations Plus Inc) を用いて決定し、化合物のコンフォメーション探索は ConfGen プログラム [Schrödinger Suite 2010 (Schrödinger Inc)] を用いて実施した。

**MM-GB/SA スコアによるポーズ決定**：ポーズ決定プロセスは Figure 23 に示した。第 1, 2 章で述べたのと同様に、通常一つのリガンドに対してドッキング計算でいくつかのポーズが得られ、そのポーズ数が十分であった場合、それらのポーズの中に正しいポーズが含まれていると考えることができる。それぞれの阻害剤のドッキングの結果から真のポーズを同定するため、リガンド-タンパク質複合体の結合自由エネルギーの一点計算を表す MM-GB/SA スコアを利用すべく、Prime/MM-GB/SA プログラム [Schrödinger Suite 2010 (Schrödinger Inc)] を用いて計算を行った。ここでは、それぞれのリガンドで、ドッキングポーズの Glide スコア上位 30% について MM-GB/SA スコアの計算を実施し

た。<sup>155</sup> ドッキングポーズは Prime プログラムを用いてリガンド周辺 101 個のアミノ酸のエネルギー極小化を行い、OPLS2005 力場及び GBSA continuum solvent モデルを用いて複合体のエネルギー計算を行った。結合自由エネルギー ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) は次の式を用いて推定した。

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{solv}} + \Delta G_{\text{SA}}$$

$\Delta E_{\text{MM}}$  は OPLS2005 力場を用いて計算された、リガンド-タンパク質複合体エネルギーと、リガンドとリガンドなしのタンパク質のエネルギー合計の差である。 $\Delta G_{\text{solv}}$  はリガンド-タンパク質複合体の GBSA 溶媒和エネルギーと、リガンドとリガンドなしのタンパク質の溶媒和エネルギー合計の差である。 $\Delta G_{\text{SA}}$  はリガンド-タンパク質複合体の表面積エネルギーと、リガンドとリガンドなしのタンパク質の合計表面積エネルギーの差である。なお、エントロピー補正は行わなかった。誘電率は 1.0 とし、最も低いエネルギーのポーズを決定ポーズとした。

**ポーズ決定プロセスの検証：**決定ポーズの妥当性を検証するため、ポーズ決定プロセス (Figure 23) にしたがって決定した Prinomastat (PDB コード 3QM4 の共結晶リガンド) の決定ポーズの位置と、CYP2D6.1 複合体の X 線結晶構造 (PDB コード 3QM4) 解析から得られている Prinomastat の位置を比較した。<sup>190</sup> さらに、CYP2D6.17 には X 線結晶構造が得られていないので、参照化合物の CYP2D6.1 及び CYP2D6.17 における決定ポーズを比較した。この参照化合物には Debrisoquine を用いた。Debrisoquine は CYP2D6.1 と CYP2D6.17 における代謝速度論パラメータに大きな差異がなく、それぞれの代謝サイトも同一であることが知られている。<sup>177</sup> それゆえ、もし Debrisoquine の CYP2D6.1 と CYP2D6.17 における決定ポーズに差異がなければ、CYP2D6.17 での決定ポーズは、CYP2D6.1 における決定ポーズの妥当性と同等であると言える。

#### **MM-GB/SA スコアを用いた薬物の CYP2D6.1 及び CYP2D6.17 阻害予測のための回帰**

**分析：**本研究で扱えるリガンドの数は六つであり，CoMFA を行える程十分な数ではない。そこで，薬物の CYP2D6.1 及び CYP2D6.17 阻害予測のため，阻害活性に対するそれぞれのリガンドの MM-GB/SA スコアの回帰分析 (*Microsoft® Excel® for Mac 2011*) を行った。

**MD シミュレーションのトラジェクトリからサンプリングした代表構造の解析：**薬物の CYP2D6.1 と CYP2D6.17 との阻害活性の差異について調べるため，MD シミュレーションのトラジェクトリからサンプリングした CYP2D6.1 及び CYP2D6.17 の代表構造のリガンド結合部位周辺について，タンパク質脂溶性表面を MOLCAD プログラム (SYBYL8.1) にて作成し，表示した。

### 3.3 結果

**CYP2D6.1** での決定ポーズの妥当性検証：CYP2D6.1 のドッキング研究での、ポーズ決定プロセスの妥当性を検証するため、ポーズ決定プロセス (Figure 23) にしたがって決定された Prinomastat (PDB コード 3Q4M の共結晶) のポーズ位置と、X 線結晶構造 (PDB コード 3Q4M) 解析によって決定されている Prinomastat の位置を比較した [Figure 24 (a)]。

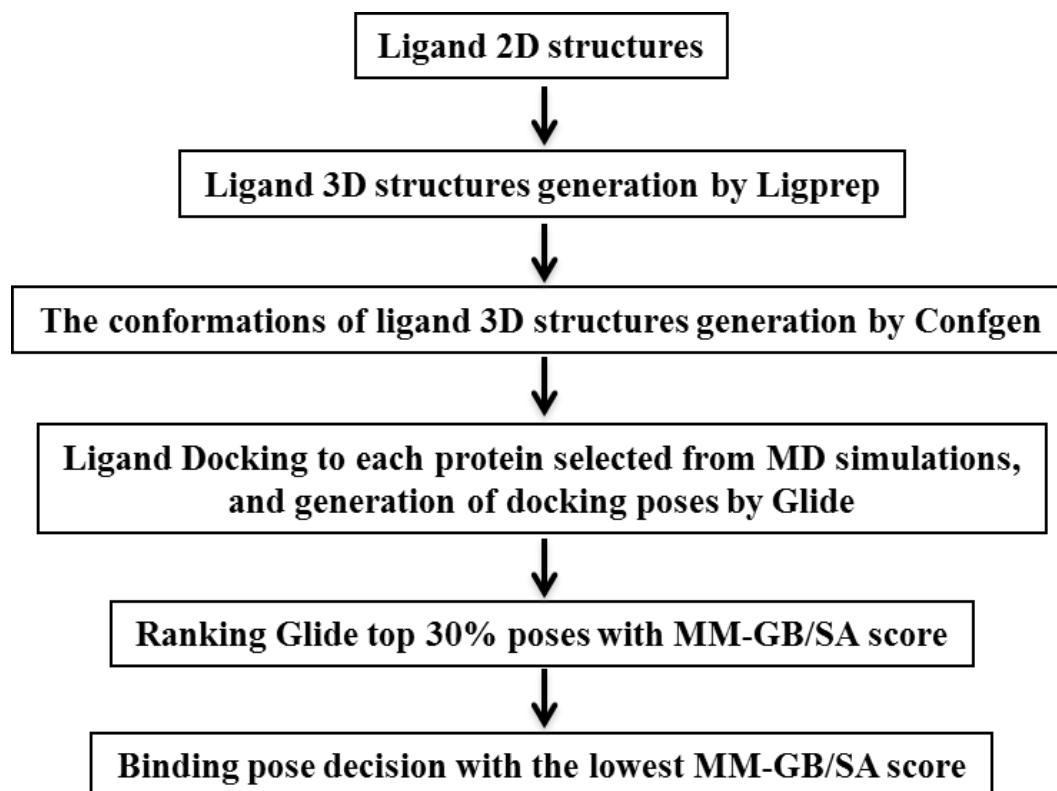


Figure 23 ポーズ決定プロセス



その結果, 決定ポーズの位置は X 線結晶構造中の位置とほぼ同様であり [リガンド重原子の RMSD: 1.23 Å], リガンドとアミノ酸の相互作用部位はお互いにほぼ同様であった [Figure 24 (b)]。

**CYP2D6.1 に対する阻害活性計算** : CYP2D6.1 の MD シミュレーションの初期構造重原子に対する RMSD に関するトラジェクトリを見ると, 構造の変動が 4 から 5 nsec で平衡に達している様子が観察された [Figure 25 (a)]。そこで, 4 から 5 nsec でのリガンド結合部位のアミノ酸コンフォメーションに関するトラジェクトリを, Maestro clustering of conformers module [Schrödinger Suite 2010 (*Schrödinger Inc*)] にてクラスター解析した。クラスタリングにより得られた距離マトリクスを Figure 26 (a) に示した。距離マトリクスを視覚的に判断して, 構造スナップショットを二つのクラスターに分けた。それぞれのクラスターから選ばれた代表構造の MD シミュレーション経過時間は, 4.24 及び 4.84 nsec であった。検証されたポーズ決定プロセス (Figure 23) にしたがって, 六つの阻害剤を MD シミュレーションのトラジェクトリからサンプリングされた CYP2D6.1 代表構造へドッキングし, MM-GB/SA スコアを計算した [Table 9 (a)]。

MM-GB/SA スコアが薬物の CYP2D6.1 阻害活性評価に妥当かどうかを調べるため, MM-GB/SA スコアに対する実験的  $pK_i$  [ $= -\log(K_i)$ ] 値をプロットした [Figure 27 (a)]。

ここで, MM-GB/SA スコアに対する阻害活性の回帰式を作成した。得られた回帰式は次の通り [Table 9 (a)]。

### Predicted pKi in CYP2D6.1

$$= -0.11 \times \text{MM-GB/SA score (kcal/mol)} + 1.07 \quad (n=6, r^2 = 0.81)$$

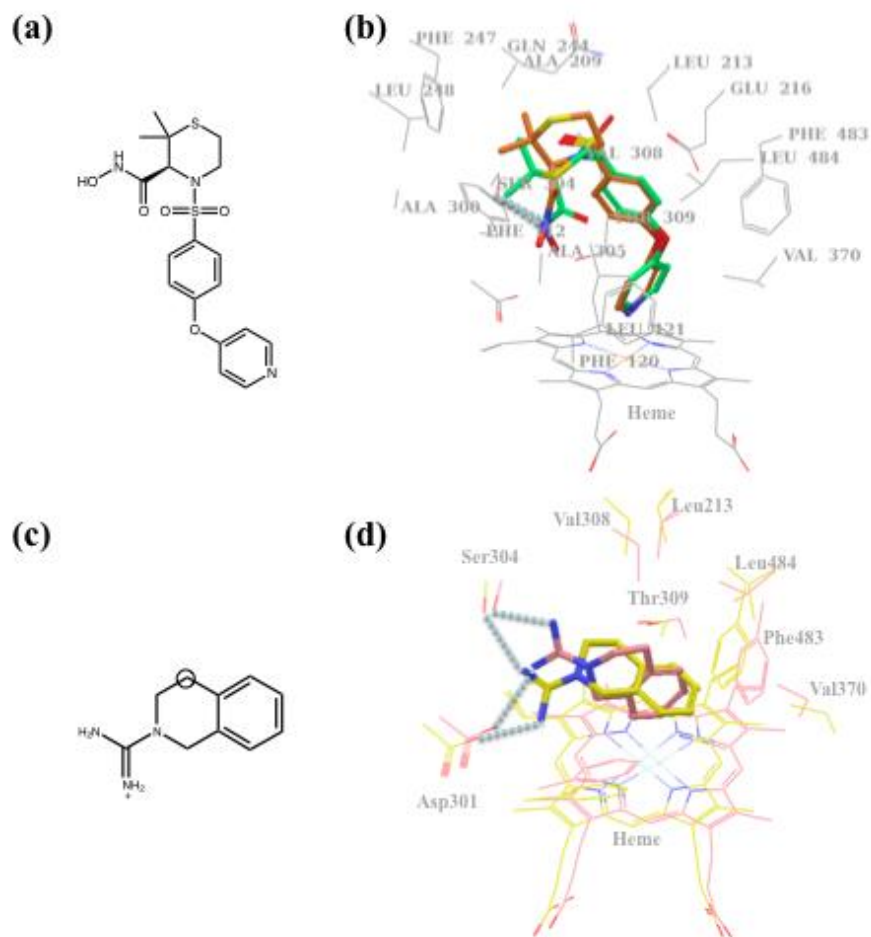
**CYP2D6.17 での決定ポーズの妥当性検証：**CYP2D6.17 のドッキング研究において、ポーズ決定プロセスの妥当性を検証するため、ポーズ決定プロセス (Figure 23) にしたがって決定された Debrisoquine の、CYP2D6.1 と CYP2D6.17 での決定ポーズの位置の違いを比較した [Figure 24 (c)]。既に述べたように、Debrisoquine の代謝速度論的パラメータは CYP2D6.1 と CYP2D6.17 で大きな差はなく、代謝サイトは互いに一致している。<sup>177</sup> 結果として、Debrisoquine の CYP2D6.17 での決定ポーズは、CYP2D6.1 での決定ポーズとほぼ同様であり (リガンド重原子の RMSD: 1.88 Å), リガンドとアミノ酸の相互作用部位もほぼ同様であった。また、Debrisoquine の代謝サイトはヘム鉄に対する距離が CYP2D6.1 (6.57 Å) 及び CYP2D6.17 (7.07 Å) と、いずれにおいても代謝反応が十分に起こりうる近さであった [Figure 24 (d)]。

**CYP2D6.17 に対する阻害活性計算：**薬物の CYP2D6.1 に対する阻害活性計算にしたがい、同じ六つの薬物の CYP2D6.17 に対する阻害活性計算を行った。まず、MD シミュレーションで平衡に達した 4 から 5 nsec の CYP2D6.17 リガンド結合部位のアミノ酸コンフォメーションのトラジェクトリを、三つのクラスターに分けた [Figure 25 (b), Figure 26 (b)]。それぞれのクラスターから選ばれた代表構造の MD シミュレーション経過時間は、4.50, 4.72 及び 4.88 nsec であった。ポーズ決定プロセス (Figure 23) にしたがって、六つの阻害剤を MD シミュレーションのトラジェクトリからサンプリングされた CYP2D6.17 の代表構造へドッキングし、MM-GB/SA スコアを計算した [Table 9 (b)]。

MM-GB/SA スコアが薬物の CYP2D6.17 阻害活性評価に妥当かどうかを調べるため、  
MM-GB/SA スコアに対する実験的 pKi 値をプロットした [Figure 27(b)]。ここで、  
MM-GB/SA スコアに対する阻害活性の回帰式を作成した。得られた回帰式は次の通り  
[Table 9 (b)]。

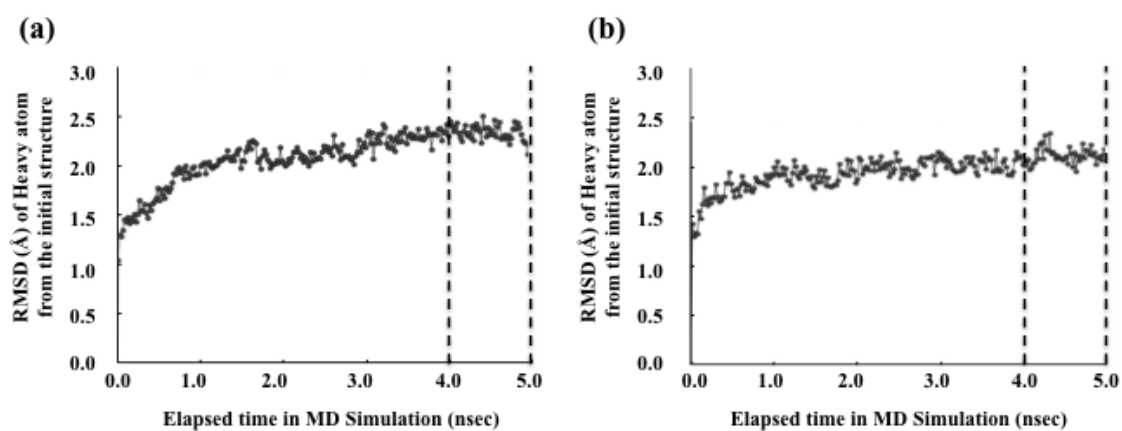
**Predicted pKi in CYP2D6.17**

$$= -0.09 \times \text{MM-GB/SA score (kcal/mol)} + 0.81 \quad (n=6, r^2 = 0.92)$$



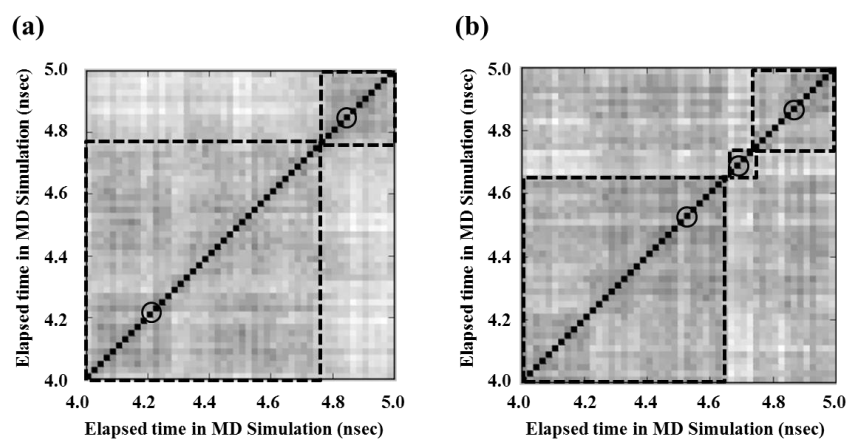
**Figure 24 ポーズ決定プロセスの妥当性検証**

(a) Prinomastat (co-crystal of PDB code 3QM4), (b) Prinomastat の X 線結晶構造解析 (3QM4) によって決定された位置 (緑色)とポーズ決定プロセスにしたがって得られた決定ポーズ (オレンジ), (c) Debrisoquine, (d) ポーズ決定プロセスにしたがって得られた Debrisoquine の CYP2D6.1 での決定ポーズ (ピンク)と CYP2D6.17 での決定ポーズ (黄色) が示されている。なお, Debrisoquine の薬物動態速度論パラメータは次の通り。CYP2D6.1; Km:  $73.7 \pm 7.0$  ( $\mu\text{M}$ ), Vmax:  $1.32 \pm 0.04$  (pmol/min/pmol P450), CLint (= Vmax/Km): 0.0179, CYP2D6.17; Km:  $108 \pm 8$  ( $\mu\text{M}$ ) (1.47), Vmax:  $1.24 \pm 0.03$  (pmol/min/pmol P450) (0.94), CLint: 0.0115, (0.64), (): ratio of CYP2D6.17/CYP2D6.1.<sup>177</sup>



**Figure 25** MD シミュレーションでの初期構造からの重原子のずれ

(a) CYP2D6.1, (b) CYP2D6.17



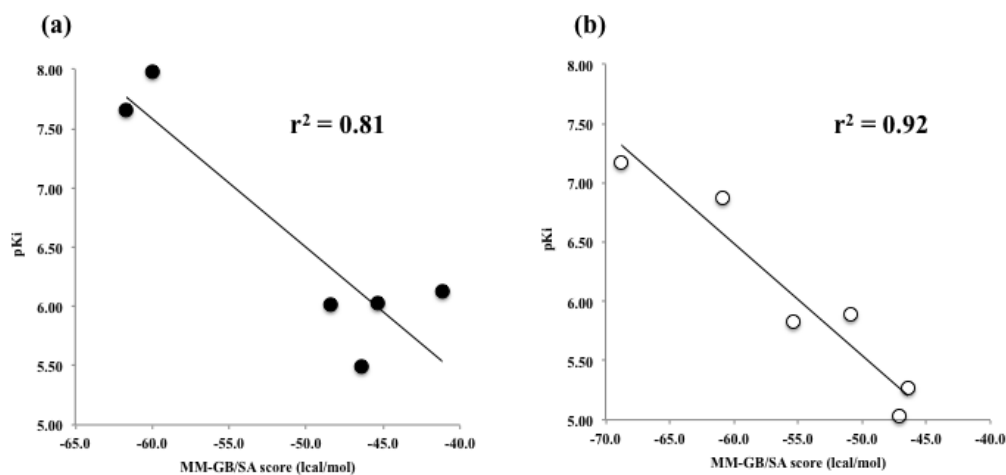
**Figure 26** 距離マトリクス

(a) CYP2D6.1, (b) CYP2D6.17

点線は各クラスター，○はクラスター中の代表構造を示している。

**Table 9 MM-GB/SA スコアと回帰式**

(a)			
Inhibitors against CYP2D6.1 (Wild type)	MM-GB/SA score (kcal/mol)	Observed pKi value	Predicted pKi value
(S)-Fluoxetine	-48.4	6.01	6.32
(S)-Norfluoxetine	-45.3	6.03	5.99
Imipramine	-46.4	5.50	6.10
Cocaine	-41.2	6.12	5.53
Quinidine	-60.0	7.98	7.58
Thioridazine	-61.7	7.66	7.76
Regression equation: Predicted pKi in CYP2D6.1 = $-0.11 \times \text{MM-GB/SA score (kcal/mol)} + 1.07$ ( $r^2 = 0.81$ )			
(b)			
Inhibitors against CYP2D6.17 (Natural variant)	MM-GB/SA score (kcal/mol)	Observed pKi value	Predicted pKi value
(S)-Fluoxetine	-51.0	5.89	5.63
(S)-Norfluoxetine	-55.4	5.82	6.05
Imipramine	-47.2	5.03	5.27
Cocaine	-46.4	5.26	5.20
Quinidine	-68.8	7.17	7.32
Thioridazine	-60.9	6.87	6.58
Regression equation: Predicted pKi in CYP2D6.17 = $-0.09 \times \text{MM-GB/SA score (kcal/mol)} + 0.81$ ( $r^2 = 0.92$ )			



**Figure 27 MM-GB/SA スコアと実験的 pKi 値**

(a) CYP2D6.1, (b) CYP2D6.17

代表阻害剤のドッキングポーズ：CYP2D6.1 と CYP2D6.17 での薬物による阻害活性の違いについて調べるため、二つの代表化合物のドッキングポーズを調べた。

(S)-Fluoxetine はこの研究で用いられた化合物の中で、CYP2D6.1 と CYP2D6.17 に対する阻害活性の差が最も少ない化合物であり、これを一つ目の代表化合物とした。次に、Cocaine はこの研究で用いられた化合物の中で、CYP2D6.1 と CYP2D6.17 に対する阻害活性の差が最も大きい化合物であり、これを二つ目の代表化合物とした。その他の化合物 [(S)-Norfluoxetine, Imipramine, Quinidine 及び Thioridazine] も含めた全決定ポーズは Figure 28 に示した。

**Fluoxetine** : CYP2D6.1 及び CYP2D6.17 に対する Fluoxetine のドッキングポーズの配向はお互いに良く似ていた [Figure 28 (a)]。CYP2D6.1 と CYP2D6.17 の両方に対して、水素結合は Fluoxetine のアミン基 (Figure 28a1) と Asp301/Ser304 との間で形成された。また、CYP2D6.1 ではトリフルオロメチルフェニル基 (Figure 28a2) と Gln244 の間でも水素結合が形成された。CYP2D6.1 と CYP2D6.17 の両方に対して、疎水性相互作用は Fluoxetine の二つのフェニル基 (Figure 28a2, a3) において観察された。CYP2D6.1 と CYP2D6.17 の両方に対して、一つのフェニル基 (Figure 28a2) はリガンド結合空間の天井部分に隣接しており、もう一つのフェニル基 (Figure 28a3) はヘムに隣接していた。

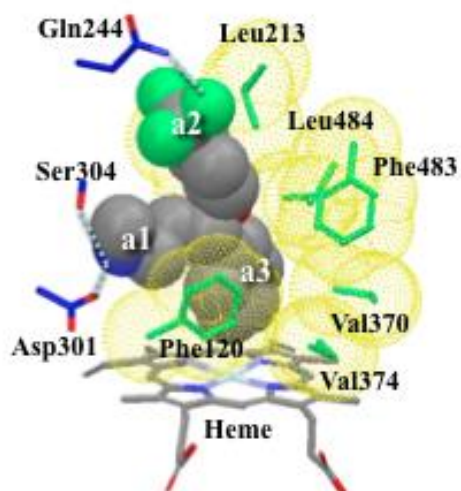
**Cocaine** : CYP2D6.1 に対する Cocaine のドッキングポーズの配向は、CYP2D6.17 に対するドッキングポーズの配向と大きく異なっていた [Figure 28 (b)]。CYP2D6.1 では、水素結合はアザビシクロオクタン基 (Figure 28b1) と Ser304 の間に形成され、疎水性相互作用はアザビシクロオクタン基 (Figure 28b1) 及びフェニル基 (Figure 28b2) で観察さ

れた。アザビシクロオクタン基 (Figure 28b1) とフェニル基 (Figure 28b2) の位置は、それぞれリガンド結合空間の天井部分とヘムに隣接していた。CYP2D6.17 では、水素結合は見られなかったが、疎水性相互作用はアザビシクロオクタン基 (Figure 28b1) とフェニル基 (Figure 28b2) で観察された。しかしながら、CYP2D6.17 でのフェニル基 (Figure 28b2) の位置は、CYP2D6.1 での位置よりもヘムに近接していなかった。また、CYP2D6.17 でのフェニル基 (Figure 28b2) とアミノ酸との疎水性相互作用の数は、CYP2D6.1 よりも少なかった。

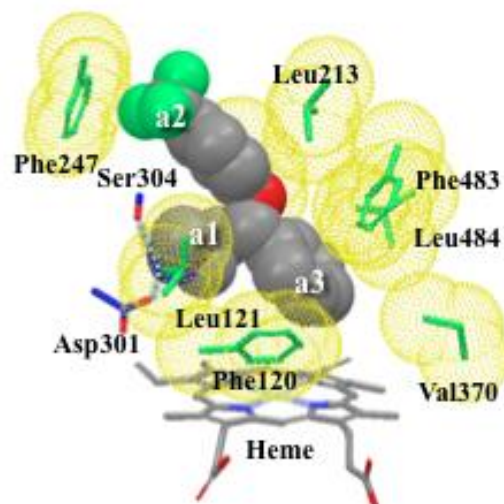


(a)

Fluoxetine in CYP2D6.1 (pKi: 6.01)

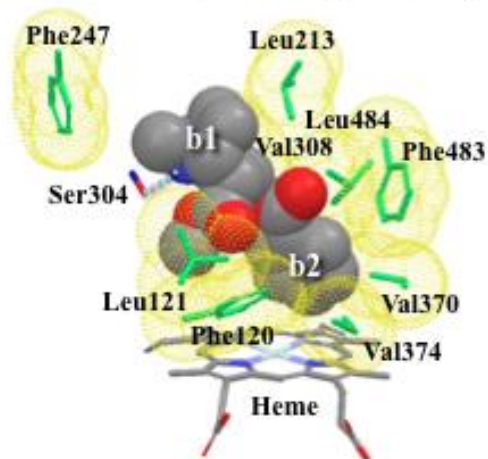


Fluoxetine in CYP2D6.17 (pKi: 5.89)



(b)

Cocaine in CYP2D6.1 (pKi: 6.12)



Cocaine in CYP2D6.17 (pKi: 5.26)

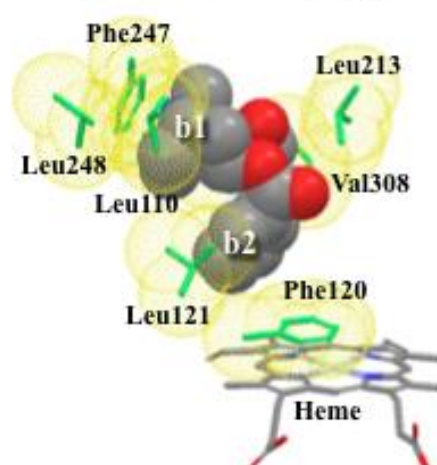
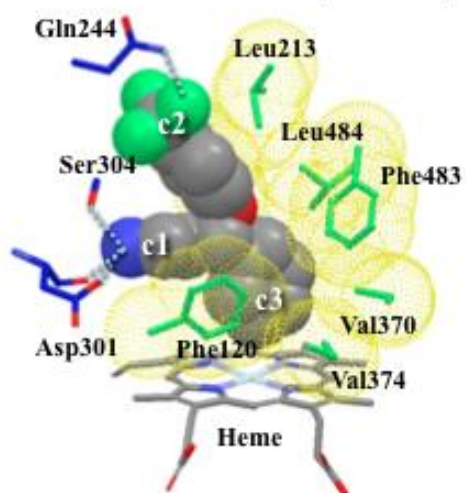


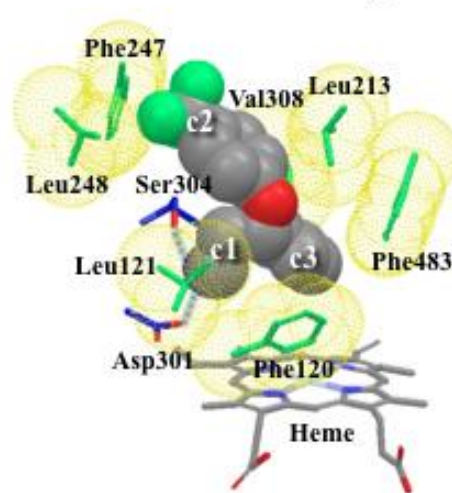
Figure 28 CYP2D6 阻害剤の CYP2D6.1 と 1CYP2D6.17 とでの決定ポーズ

(c)

Norfluoxetine in CYP2D6.1 (pKi: 6.03)

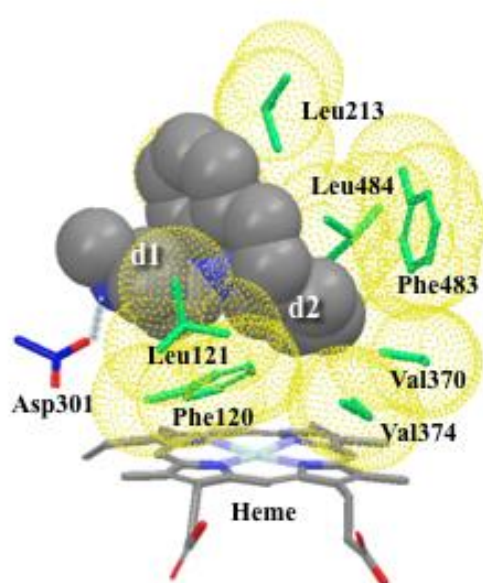


Norfluoxetine in CYP2D6.17 (pKi: 5.82)



(d)

Imipramine in CYP2D6.1 (pKi: 5.50)



Imipramine in CYP2D6.17 (pKi: 5.03)

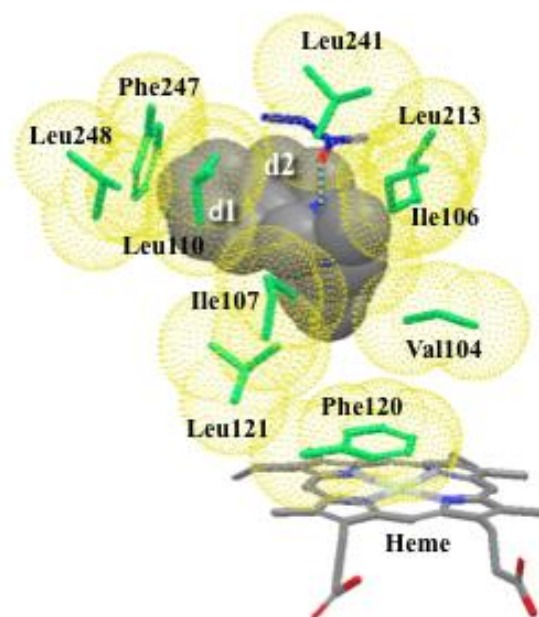
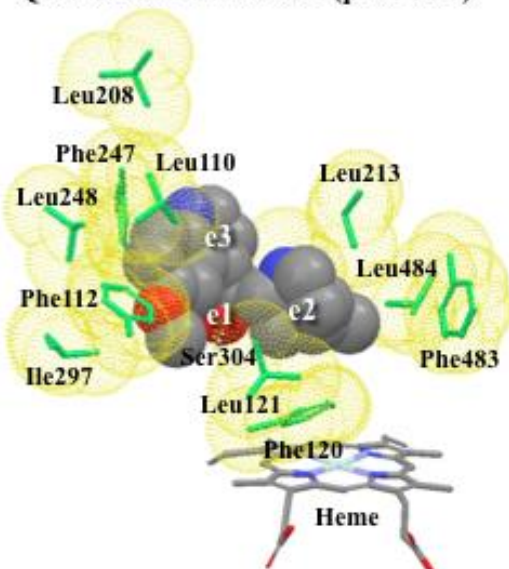
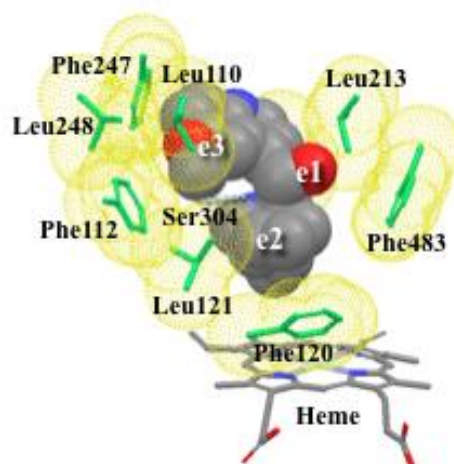


Figure 28 続き

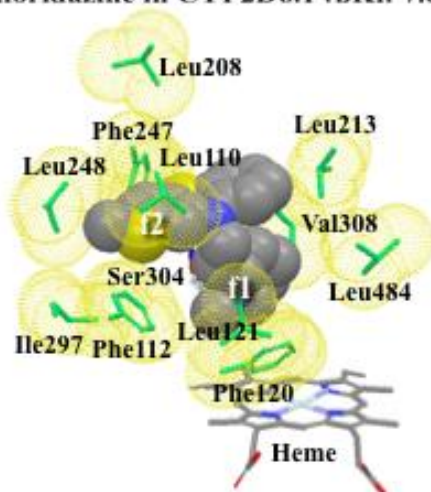
(e)  
Quinidine in CYP2D6.1 (pKi: 7.98)



Quinidine in CYP2D6.17 (pKi: 7.17)



(f)  
Thioridazine in CYP2D6.1 (pKi: 7.66)



Thioridazine in CYP2D6.17 (pKi: 6.87)

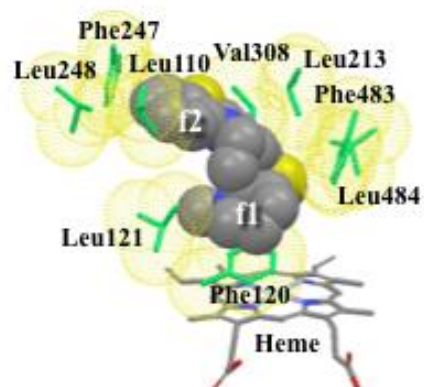


Figure 28 続き

### 3.4 考察

**MM-GB/SA スコアに基づく阻害活性計算**：Prinomastat と Debrisoquine を用いたポーズ決定プロセスの妥当性検証結果から、ポーズ決定プロセス (Figure 23) は妥当であると考えられ、この研究に用いられたリガンドの決定ポーズは、CYP2D6.1 及び CYP2D6.17 のいずれにおいても活性コンフォメーションに近いものと考えられた (Figure 24)。また、このドッキング研究で用いられた六つのリガンドの  $K_i$  値は同一のスーパーソームを用いた実験から得られており、CYP2D6.1 及び CYP2D6.17 に対する阻害の比較に適したものであると考えられた (Table 8)。<sup>177</sup>

MM-GB/SA スコアと実験による  $pK_i$  値が高い相関を示したことは、MM-GB/SA スコアが実験による  $pK_i$  値を反映していることを示唆している。しかしながら、CYP2D6.1 及び CYP2D6.17 における MM-GB/SA スコアの絶対値は、実験値と一致していなかった。すなわち、CYP2D6.17 での絶対値が CYP2D6.1 での絶対値よりも大きくなる傾向があった (Table 9)。そこには二つの理由が考えられる。第一に、Prime/MM-GB/SA 計算は高速であるものの、さらに高い精度を持つスコア関数となるためには、まだ依然として改善される必要がある、ということである。<sup>191</sup> 第二としては、MM-GB/SA スコアの絶対値の不一致は、CYP2D6.1 と CYP2D6.17 では、アミノ酸組成 (すなわち、T107I/R296C/S486T) が異なるために、正味の電荷が両者で異なっており、結合自由エネルギー計算の比較が困難になるためと考えられた。それゆえ、現時点において、MM-GB/SA スコアの絶対値のこのような不一致は避けられないものと考えられる。そ

ここで本研究では、薬物の CYP2D6.1 及び CYP2D6.17 に対する阻害活性の回帰式をそれぞれに立てた所、良好な回帰式が得られた (Table 9)。最終的に、この研究で実施された回帰分析により、候補薬物の MM-GB/SA スコアを計算するだけで人種毎に異なる代謝阻害活性を推定することができるものと考えられた。

**決定ポーズとその阻害活性との関係:** この研究で用いられたリガンドの決定ポーズを解析した所、CYP2D6.1 と CYP2D6.17 に対する阻害活性の差異の程度は、それぞれのリガンドの決定ポーズに大きく依存することが示唆された。<sup>178</sup>

Fluoxetine 及び Norfluoxetine は CYP2D6.1 及び CYP2D6.17 に対する阻害活性にほとんど差が見られない化合物であり (Table 8), その阻害活性の類似は決定ポーズに CYP2D6.1 と CYP2D6.17 とで差異がないことに由来するものと考えられた [Figure 28 (a), (c)]。

CYP2D6.1 と CYP2D6.17 に対する阻害活性が大きく異なる Cocaine では (Table 8), Cocaine の決定ポーズの配向が CYP2D6.1 と CYP2D6.17 とで異なっていた。すなわち、CYP2D6.1 でのフェニル基 (Figure 28b2) の位置が、CYP2D6.17 での位置と異なっていた [Figure 28 (b)]。CYP2D6.1 では、水素結合があり、Val370 や Val374 のような多くの疎水性アミノ酸との疎水性相互作用が見られた。一方で、CYP2D6.17 では、Val370 及び Val374 との疎水性相互作用は見られなかった。したがって、Cocaine の CYP2D6.17 阻害よりも強い CYP2D6.1 阻害は、Val370 や Val374 のような疎水性アミノ酸との疎水性相互作用による可能性が考えられた。Cocaine と同様に CYP2D6.1 阻害と CYP2D6.17 阻害に大きな差のある Imipramine, Quinidine 及び Thioridazine においても、CYP2D6.1 と CYP2D6.17 での決定ポーズに大きな差が認められた [Figure 28 (d), (e), (f)]。さらに、

Impramine でも CYP2D6.17 では見られなかった, CYP2D6.1 に特異的な Val370 と Val374 との疎水性相互作用が, Cocaine と同様に認められた [Figure 28 (d)]。

また, この研究で用いた化合物の全体的な決定ポーズから, Gln244, Asp301 及び Ser304 が水素結合に重要な役割を果たしており, Phe120 及び Phe483 が疎水性相互作用に重要な役割を果たしていることが観察された (Table 10)。この結果は, 以前に実施された研究の結果と一致していた。<sup>180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187</sup>

**Table 10 CYP2D6.1 と CYP2D6.17 の代表構造の比較**

(a)		RMSD (Å)					
CYP2D6.1 versus CYP2D6.17	B'-C loop	$\alpha$ F-helix	$\alpha$ F'-helix	$\alpha$ G-helix	$\alpha$ I-helix	K- $\beta$ 1-4 loop	
	3.06	1.69	3.38	1.89	1.07	3.07	

(b)		RMSD (Å)									
CYP2D6.1 versus CYP2D6.17	B'-C loop			$\alpha$ F'-helix			K- $\beta$ 1-4 loop				
	Val119	Phe120	Leu121	Phe219	Leu220	Arg221	Val370	Pro371	Leu372	Gly373	Val374
	1.76	1.79	3.26	5.63	3.04	2.93	2.53	2.67	2.68	3.73	5.83

These RMSD values [secondary structure (a), amino acid residues (b)] represent the average of all the combination of the representative CYP2D6.1 and CYP2D6.17 structures, those were as follows, at 4.24 nsec (MD simulation elapsed time, and so forth) in CYP2D6.1 versus at 4.50 nsec in CYP2D6.17, at 4.24 nsec in CYP2D6.1 versus at 4.72 nsec in CYP2D6.17, at 4.24 nsec in CYP2D6.1 versus at 4.88 nsec in CYP2D6.17, at 4.84 nsec in CYP2D6.1 versus at 4.50 nsec in CYP2D6.17, at 4.84 nsec in CYP2D6.1 versus at 4.72 nsec in CYP2D6.17, at 4.84 nsec in CYP2D6.1 versus at 4.88 nsec in CYP2D6.17.

**MD シミュレーションのトラジェクトリからサンプリングしたタンパク質代表構造の解析：**薬物による CYP2D6.1 及び CYP2D6.17 に対する, 阻害活性の差を引き起こすタンパク質構造について理解するために, MD シミュレーションのトラジェクトリからサンプリングした代表構造の解析を行った。それぞれの代表構造のリガンド結合空間のタンパク質表面を, Figure 29 に示した。ここで, CYP2D6.1 と CYP2D6.17 とでは大きな構造的差異があることを発見した。それぞれの代表構造のタンパク質表面を見ると,

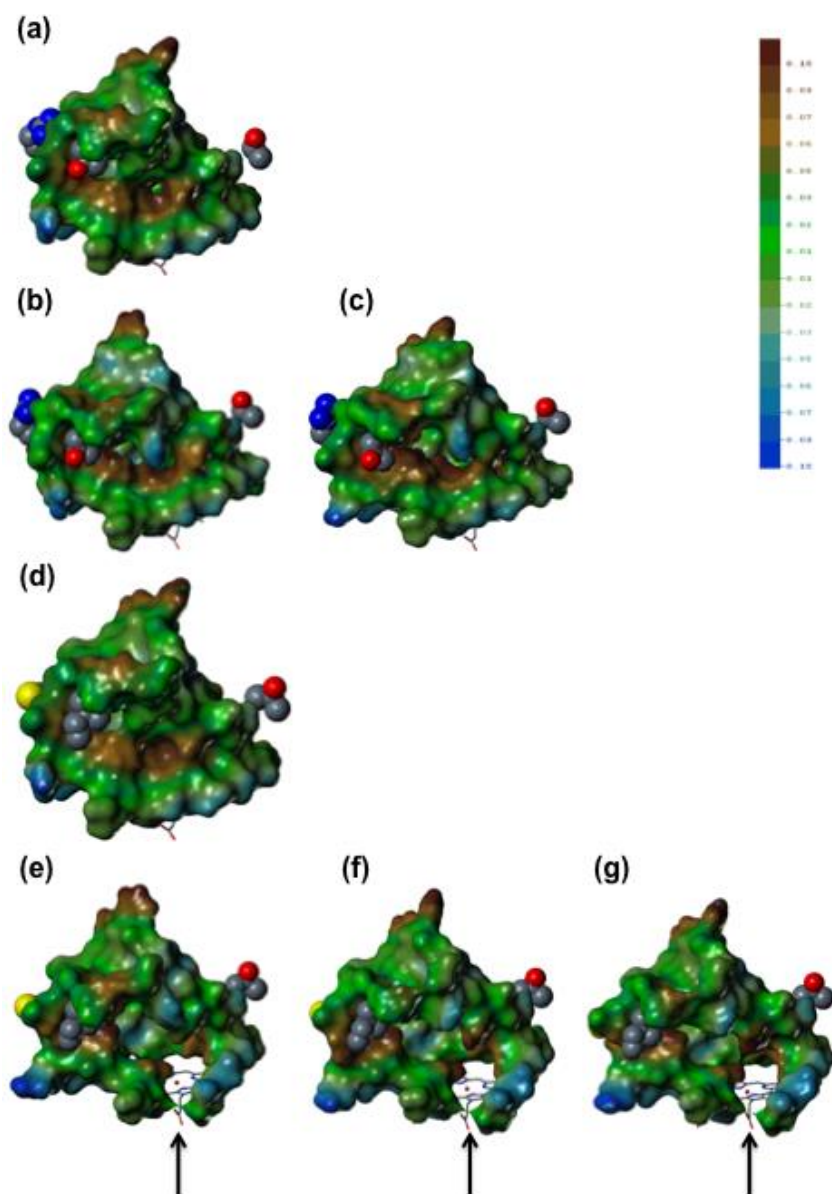
ヘム周辺のアミノ酸は、CYP2D6.1 の代表構造ではリガンド結合空間を囲んでいたが [Figure 29 (a) – (c)], CYP2D6.17 の代表構造では、リガンド結合空間表面に溝が形成されていた [Figure 29 (d) – (g)]。

まず、CYP2D6.1 から CYP2D6.17 への変異に関与する三つのアミノ酸の位置を調べた。第一に、T107I は  $\alpha$ B'ヘリックスに属しており、CYP2D6.1 では Thr107 と B'-C ループに属する Leu110/Gly111/Phe112 との水素結合、また Thr107 と  $\alpha$ B'ヘリックスに属する Val104 との水素結合が見られた [Figure 30 (a), (b)]。一方で、CYP2D6.17 では Ile107 と Gly111/Phe112 との水素結合が見られた [Figure 30 (c) – (e)]。第二に、R296C は  $\alpha$ I ヘリックスに属しており、CYP2D6.1 では Arg296 と  $\alpha$ G ヘリックスに属する Asp252 との間に水素結合が見られた [Figure 30 (a), (b)]。一方で、CYP2D6.17 では Cys296 との間に水素結合は見られなかった [Figure 30 (c) – (e)]。第三に、S486T は  $\beta$ 4-2 シートに属しており、CYP2D6.1 と CYP2D6.17 においてそれぞれ Ser486 と Thr486 とで、 $\beta$ 4-1 シートに属する Val480 との水素結合が見られた [Figure 30 (a) – (e)]。これらをまとめると、CYP2D6.1 では CYP2D6.17 で変異を受ける三つのアミノ酸 (Thr107, Arg296 及び Ser486) の総てが水素結合を形成していた [Figure 30 (a), (b)]。一方で、CYP2D6.17 では Cys296 では水素結合が見られず、Ile107 は CYP2D6.1 の Thr107 と比較すると水素結合の数が少なくなっていた [Figure 30 (c) – (e)]。これとは逆に、S486T では CYP2D6.1 及び CYP2D6.17 のいずれにおいても、Val480 との水素結合が認められた。これらの結果は、T107I 及び R296C が CYP2D6.1 から CYP2D6.17 へのコンフォメーション変化に大きな役割を果たしており、S486T はそうではない、ということを示唆しており、これは以前に実施されている *in vitro* 代謝実験及び変異導入実験の結果と良く一致していた。<sup>179</sup>



さらに, MD シミュレーションのトラジェクトリからサンプリングされた CYP2D6.17 の代表構造で見られた溝を形成するアミノ酸は, B'-C ループ, K- $\beta$ 1-4 ループ及び  $\alpha$ F' ヘリックスに属しており, これら二次構造のコンフォメーションは CYP2D6.1 の代表構造と CYP2D6.17 の代表構造とで異なっていた [Table 10 (a), Figure 30 (f)]. 次に, CYP2D6.1 において溝を形成したアミノ酸のコンフォメーションを調べると, Phe219 と Val374 のコンフォメーションが, CYP2D6.1 の代表構造と CYP2D6.17 の代表構造とで異なっていた [Table 10 (b), Figure 30 (g)]. また, この溝を形成していたアミノ酸はほとんどが疎水的なものであった (Val119, Phe120, Leu121, Phe219, Leu220, Arg221, Val370, Pro371, Leu372, Gly373 及び Val374)。Cocaine のドッキングポーズで見られたように, Val370 及び Val374 は CYP2D6.1 においてリガンドとの相互作用に大きな役割を果たしていたが, CYP2D6.17 ではこれらアミノ酸は相互作用に関与しないものと考えられた [Figure 28 (b)]. すなわち, これらアミノ酸は CYP2D6.17 では溝を形成する程遠く離れているので, CYP2D6.1 ではリガンド-タンパク質の疎水性相互作用に寄与するが, CYP2D6.17 では寄与しないのであろう。これらの結果は, それぞれの化合物の阻害活性が CYP2D6.17 よりも CYP2D6.1 で高いという事実を反映している。<sup>177</sup> また, CYP2D6 の Prinomastat 共結晶が発表されるまで  $\alpha$ F'ヘリックスの存在は知られていなかったもので, この新規なヘリックスの発見はこの溝の発見に必要なものであったと言える。<sup>190</sup>





**Figure 29 CYP2D6.1 と CYP2D6.17 の代表構造の脂溶性表面表示**

それぞれ MD シミュレーション経過時間は、(a) CYP2D6.1, 0 nsec (初期構造), (b) CYP2D6.1, 4.24 nsec, (c) CYP2D6.1, 4.84 nsec, (d) CYP2D6.17, 0 nsec (初期構造), (e) CYP2D6.17, 4.50 nsec, (f) CYP2D6.17, 4.72 nsec 及び(g) CYP2D6.17, 4.88 nsec。ボール表示は (a) から (c) で, T107, R296, S486, (d) から(g) で I107, C296, T486 である。

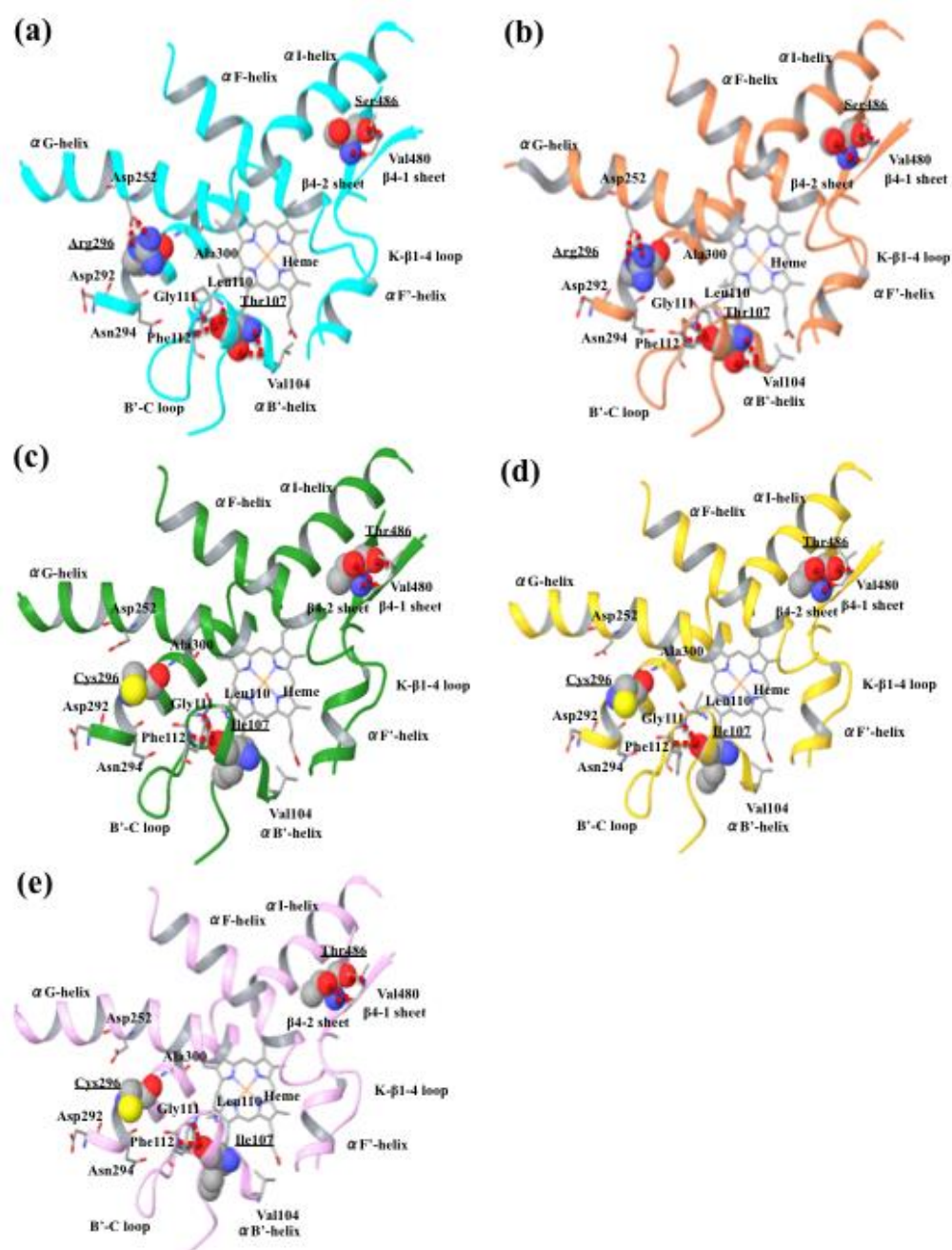
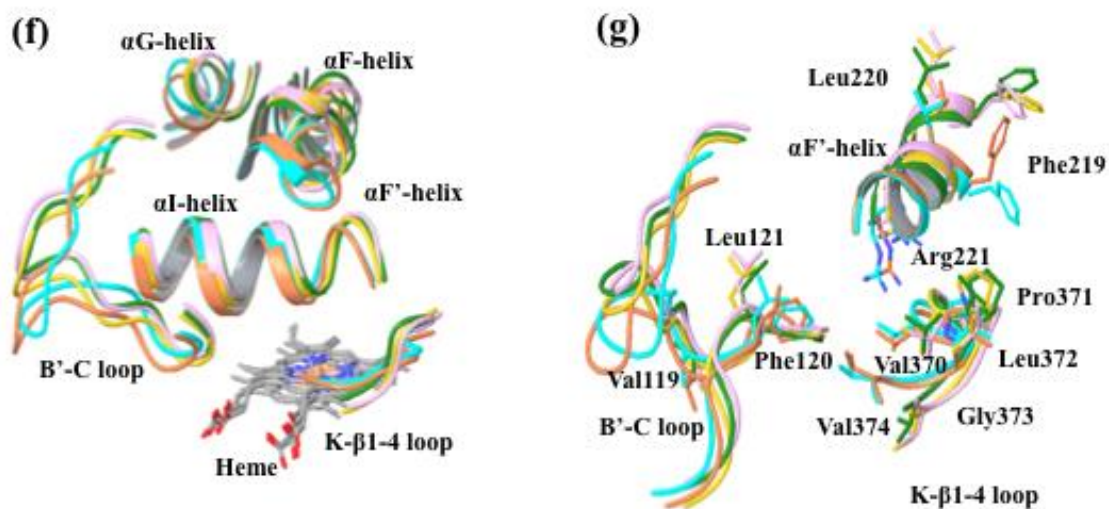


Figure 30 CYP2D6.1 と CYP2D6.17 の代表構造の基質結合部位二次構造



**Figure 30 続き**

リボンの色は次の通り。水色：CYP2D6.1 代表構造 (MD シミュレーション経過時間：4.24 nsec)，オレンジ：CYP2D6.1 代表構造 (MD シミュレーション経過時間：4.84 nsec)，緑色：CYP2D6.17 代表構造 (MD シミュレーション経過時間：4.50 nsec)，黄色：CYP2D6.17 代表構造 (MD シミュレーション経過時間：4.72 nsec)，桃色：CYP2D6.17 代表構造 (MD シミュレーション経過時間：4.88 nsec)。ボール表示は (a)，(b) で T107，R296，S486 であり (c) から (e) で I107，C296，T486 ある。赤色点線は水素結合を示している。

結論として、本研究では、人種差の薬物阻害への影響を CYP2D6.1 と CYP2D6.17 の 3 次元構造の違いとともに解析することに成功した。まず、MD シミュレーションのトラジェクトリからの複数タンパク質構造サンプリングを行った。次に、コンピュータドッキングの後に、六つの薬物の阻害活性を MM-GB/SA スコアに基づく回帰式から計算した。計算された値は実験値と良く一致していた ( $r^2 = 0.81$ )。さらに、それら薬物の CYP2D6.17 に対する阻害活性を CYP2D6.1 と同じ方法で計算した。計算された値は実験値と良く一致していた ( $r^2 = 0.92$ )。最後に、この手法は、人種間差が原因で起こる CYP2D6 阻害を、創薬の初期段階で評価することができ、効率的な新薬開発プロセスの実現に貢献するものと考えられた。

## 結論

本論文では、*in silico* 創薬技術を活用して、酵素阻害及び酵素誘導に関する薬物動態予測を新薬開発プロセスの初期段階に適用することで、新薬開発期間の短縮及び開発費用の低減による、研究開発の劇的な効率化を目指した。第 1 章において薬物の CYP3A4 阻害に関する *in silico* 研究、第 2 章においては薬物の PXR 活性化による CYP3A4 誘導に関する *in silico* 研究、第 3 章では薬物の CYP2D6 の遺伝子多型阻害に関する *in silico* 研究を行った。いずれの研究もターゲットタンパク質の構造を考慮した 3D-SB 手法、CoMFA 法及び各種組み合わせのスコア関数を用いることによって、創薬初期のスクリーニングに適用可能な手法を確立できた。計算手法に関しては、第 3 章の MM-GB/SA スコアの絶対値が活性値を必ずしも反映しなかったことを考えると、化合物データセットが十分に得られる場合には、第 1, 2 章で行った SB CoMFA 法がより正確な予測には適していると考えられた。本研究によって確立された、これら手法によって得られる活性値を、これまでに提案されている様々な薬剤との評価が可能な一般式や生理学的モデルとともに用いることによって、さらに臨床面で実践的なものになるであろう。<sup>192, 193, 194</sup> 最後に、本研究の成果によって、医薬品研究開発の効率化を推進できるものと考えられる。

## 引用文献

- <sup>1</sup> Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, Schacht AL. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(3):203–214.
- <sup>2</sup> Aitken M, Berndt ER, Cutler DM. Prescription drug spending trends in the United States: looking beyond the turning point. *Health Aff (Millwood).* 2009;28(1):w151–160.
- <sup>3</sup> EvaluatePharma Alpha World Preview 2014. Evaluate Pharma report. 2009.
- <sup>4</sup> Arrowsmith J. Trial watch: phase III and submission failures: 2007–2010. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(2):87.
- <sup>5</sup> Arrowsmith J. Trial watch: Phase II failures: 2008–2010. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(5):328–329.
- <sup>6</sup> MacCoss M, Baillie TA. Organic chemistry in drug discovery. *Science.* 2004;303(5665):1810–1813.
- <sup>7</sup> Ballard P, Brassil P, Bui KH, Dolgos H, Petersson C, Tunek A, Webborn PJ. The right compound in the right assay at the right time: an integrated discovery DMPK strategy. *Drug Metab Rev.* 2012;44(3):224–252.
- <sup>8</sup> van de Waterbeemd H, Smith DA, Jones BC. Lipophilicity in PK design: methyl, ethyl, futile. *J Comput Aided Mol Des.* 2001;15(3):273–286.
- <sup>9</sup> Smith DA, Di L, Kerns EH. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(12):929–939.
- <sup>10</sup> Baranczewski P, Stańczak A, Sundberg K, Svensson R, Wallin A, Jansson J, Garberg P, Postlind H. Introduction to in vitro estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol Rep.* 2006;58(4):453–472.
- <sup>11</sup> Avdeef A, Bendels S, Di L, Faller B, Kansy M, Sugano K, Yamauchi Y. PAMPA-critical factors for better predictions of absorption. *J Pharm Sci.* 2007;96(11):2893–2909.
- <sup>12</sup> Pereira DA, Williams JA. Origin and evolution of high throughput screening. *Br J Pharmacol.* 2007;152(1):53–61.
- <sup>13</sup> Gallagher PF, Barry PJ, Ryan C, Hartigan I, O'Mahony D. Inappropriate prescribing in an acutely ill population of elderly patients as determined by Beers' Criteria. *Age Ageing.* 2008;37(1):96–101.
- <sup>14</sup> Fialová D, Topinková E, Gambassi G, Finne-Soveri H, Jónsson PV, Carpenter I, Schroll M,

- Onder G, Sørbye LW, Wagner C, Reissigová J, Bernabei R; AdHOC Project Research Group. Potentially inappropriate medication use among elderly home care patients in Europe. *JAMA*. 2005;293(11):1348–1358.
- <sup>15</sup> Kumar S, Sharma R, Roychowdhury A., Modulation of cytochrome-P450 inhibition (CYP) in drug discovery: a medicinal chemistry perspective. *Curr Med Chem*. 2012;19(21):3605–3621.
- <sup>16</sup> Brown CM, Reisfeld B, Mayeno AN. Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug Metab Rev*. 2008;40(1):1–100.
- <sup>17</sup> Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*. 2002;360(9340):1155–1162.
- <sup>18</sup> Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43:149–173.
- <sup>19</sup> Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev*. 2002;34(1–2):83–448.
- <sup>20</sup> Cascorbi I. Drug interactions--principles, examples and clinical consequences. *tsch Arztebl Int*. 2012;109(33–34):546–555.
- <sup>21</sup> SoRelle R. Withdrawal of Posicor from market. *Circulation*. 1998;98(9):831–832.
- <sup>22</sup> Backman JT, Wang JS, Wen X, Kivistö KT, Neuvonen PJ. Mibefradil but not isradipine substantially elevates the plasma concentrations of the CYP3A4 substrate triazolam. *Clin Pharmacol Ther*. 1999;66(4):401–407.
- <sup>23</sup> Geist MJ, Egerer G, Burhenne J, Riedel KD, Mikus G. Induction of voriconazole metabolism by rifampin in a patient with acute myeloid leukemia: importance of interdisciplinary communication to prevent treatment errors with complex medications. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(9):3455–3456.
- <sup>24</sup> 医薬品医療機器総合機構，添付文書情報，一般名・販売名「リファンピシン」  
[http://www.info.pmda.go.jp/psearch/html/menu\\_tenpu\\_base.html](http://www.info.pmda.go.jp/psearch/html/menu_tenpu_base.html)
- <sup>25</sup> Hondeghem LM, Dujardin K, Hoffmann P, Dumotier B, De Clerck F. Drug-induced QTC prolongation dangerously underestimates proarrhythmic potential: lessons from terfenadine. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;57(5):589–597.
- <sup>26</sup> Quigley EM. Cisapride: what can we learn from the rise and fall of a prokinetic?. *J Dig Dis*. 2011;12(3):147–156.
- <sup>27</sup> Park JY, Kim KA, Kang MH, Kim SL, Shin JG. Effect of rifampin on the pharmacokinetics of rosiglitazone in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;75(3):157–162.



- <sup>28</sup> Pithavala YK, Tong W, Mount J, Rahavendran SV, Garrett M, Hee B, Selaru P, Sarapa N, Klamerus KJ. Effect of ketoconazole on the pharmacokinetics of axitinib in healthy volunteers., *Invest New Drugs*. 2012;30(1):273–281.
- <sup>29</sup> Grönlund J, Saari TI, Hagelberg NM, Neuvonen PJ, Olkkola KT, Laine K. Exposure to oral oxycodone is increased by concomitant inhibition of CYP2D6 and 3A4 pathways, but not by inhibition of CYP2D6 alone. *Br J Clin Pharmacol*. 2010;70(1):78–87.
- <sup>30</sup> Grimm SW, Richtand NM, Winter HR, Stams KR, Reece SB. Effects of cytochrome P450 3A modulators ketoconazole and carbamazepine on quetiapine pharmacokinetics. *Br J Clin Pharmacol*. 2006;61(1):58–69.
- <sup>31</sup> Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ, Kivistö KT. Pharmacokinetic interactions with rifampicin: clinical relevance. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(9):819–850.
- <sup>32</sup> Pithavala YK, Tortorici M, Toh M, Garrett M, Hee B, Kuruganti U, Ni G, Klamerus KJ. Effect of rifampin on the pharmacokinetics of Axitinib (AG-013736) in Japanese and Caucasian healthy volunteers. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;65(3):563–570.
- <sup>33</sup> Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58(5–6):737–747.
- <sup>34</sup> U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Clinical Pharmacology Guidance for Industry Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations DRAFT GUIDANCE. 2012.
- <sup>35</sup> Waxman DJ. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys*. 1999;369(1):11–23.
- <sup>36</sup> Ingelman-Sundberg M. Implications of polymorphic cytochrome p450-dependent drug metabolism for drug development. *Drug Metab Dispos*. 2001;29(4 Pt 2):570–573.
- <sup>37</sup> ICH E5 (R1): Ethnic Factors in the Acceptability of Foreign Clinical Data. 1998.
- <sup>38</sup> Gleeson MP, Montanari D. Strategies for the generation, validation and application of in silico ADMET models in lead generation and optimization. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2012;8(11):1435–1446.
- <sup>39</sup> van Westen GJ, Wegner JK, Ijzerman AP, van Vlijmen HW, Bender A. Proteochemometric modeling as a tool to design selective compounds and for extrapolating to novel targets. *Med Chem Commun*. 2011;2:16–30
- <sup>40</sup> Gleeson MP, Modi S, Bender A, Robinson RL, Kirchmair J, Promkatkaew M, Hannongbua S, Glen RC. The challenges involved in modeling toxicity data in silico: a review. *Curr Pharm Des*. 2012;18(9):1266–1291.

- <sup>41</sup> Nikolova N, Jaworska J. Approaches to Measure Chemical Similarity - a Review. *QSAR Comb Sci.* 2004;22(9–10):1006–1026
- <sup>42</sup> Maggiora GM. On outliers and activity cliffs-why QSAR often disappoints. *J Chem Inf Model.* 2006;46(4):1535.
- <sup>43</sup> Wassermann AM, Bajorath J. Chemical substitutions that introduce activity cliffs across different compound classes and biological targets. *J Chem Inf Model.* 2010;50(7):1248–1256.
- <sup>44</sup> Leung CS, Leung SS, Tirado-Rives J, Jorgensen WL. Methyl effects on protein-ligand binding. *J Med Chem.* 2012;55(9):4489–4500.
- <sup>45</sup> Stepan AF, Walker DP, Bauman J, Price DA, Baillie TA, Kalgutkar AS, Aleo MD. Structural alert/reactive metabolite concept as applied in medicinal chemistry to mitigate the risk of idiosyncratic drug toxicity: a perspective based on the critical examination of trends in the top 200 drugs marketed in the United States. *Chem Res Toxicol.* 2011;24(9):1345–1410.
- <sup>46</sup> Gleeson MP, Bravi G, Modi S, Lowe D. ADMET rules of thumb II: A comparison of the effects of common substituents on a range of ADMET parameters. *Bioorg Med Chem.* 2009;17(16):5906–5919.
- <sup>47</sup> Gleeson MP. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. *J Med Chem.* 2008;51(4):817–834.
- <sup>48</sup> Roy K, Mitra I. On various metrics used for validation of predictive QSAR models with applications in virtual screening and focused library design. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2011;14(6):450–474.
- <sup>49</sup> Tropsha A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. *Mol Inform.* 2010;29(6–7):476–488.
- <sup>50</sup> Feher M, Ewing T. Global or local QSAR: is there a way out?. *QSAR Comb Sci.* 2009;28(8):850–855.
- <sup>51</sup> Wood DJ, Buttar D, Cumming JG. Automated QSAR with a hierarchy of global and local models. *Mol Inform.* 2011;30(11–12):960–972.
- <sup>52</sup> Stouch TR, Kenyon JR, Johnson SR, Chen XQ, Doweiko A, Li Y. In silico ADME/Tox: why models fail. *J Comput Aided Mol Des.* 2003;17(2–4):83–92.
- <sup>53</sup> Dragos H, Gilles M, Alexandre V. Predicting the predictability: a unified approach to the applicability domain problem of QSAR models. *J Chem Inf Model.* 2009;49(7):1762–1776.
- <sup>54</sup> Sallantin J, Dartnell C, Afshar M. Interactive Learning from Contradictions in a Paraconsistent Logic, 16th international Conference on Inductive Logic Programming 51. 2006.
- <sup>55</sup> Kirchmair J, Williamson MJ, Tyzack JD, Tan L, Bond PJ, Bender A, Glen RC. Computational prediction of metabolism: sites, products, SAR, P450 enzyme dynamics, and

mechanisms. *J Chem Inf Model*. 2012;52(3):617–648.

<sup>56</sup> Kokh DB, Wade RC, Wenzel W. Receptor flexibility in small-molecule docking calculations. *Comp Mol Sci*. 2011;1(2):298–314.

<sup>57</sup> Perola E, Walters WP, Charifson PS. A detailed comparison of current docking and scoring methods on systems of pharmaceutical relevance. *Proteins*. 2004;56(2):235–249.

<sup>58</sup> Alonso H, Bliznyuk AA, Gready JE. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Med Res Rev*. 2006;26(5):531–568.

<sup>59</sup> Zacharias M. Rapid protein-ligand docking using soft modes from molecular dynamics simulations to account for protein deformability: binding of FK506 to FKBP. *Proteins*. 2004;54(4):759–767.

<sup>60</sup> Eyrisch S, Helms V. Transient pockets on protein surfaces involved in protein-protein interaction. *J Med Chem*. 2007;50(15):3457–3464.

<sup>61</sup> Schnecke V, Kuhn LA. Virtual screening with solvation and ligand-induced complementarity. *Persp Drug Discov Des*. 2000;20:171–190.

<sup>62</sup> Claussen H, Buning C, Rarey M, Lengauer T. FlexE: efficient molecular docking considering protein structure variations. *J Mol Biol*. 2001;308:377–395.

<sup>63</sup> Sherman W, Day T, Jacobson MP, Friesner RA, Farid R. Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. *J Med Chem*. 2006;49:534–553.

<sup>64</sup> Kuntz ID, Blaney JM, Oatley SJ, Langridge R, Ferrin TE. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol*. 1982;161(2):269–288.

<sup>65</sup> Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comp Chem*. 1998;19(14):1639–1662.

<sup>66</sup> Böhm HJ. The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J Comput Aided Mol Des*. 1994;8(3):243–256.

<sup>67</sup> Rarey M, Kramer B, Lengauer T, Klebe G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol*. 1996;261(3):470–489.

<sup>68</sup> Eldridge MD, Murray CW, Auton TR, Paolini GV, Mee RP. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J Comput Aided Mol Des*. 1997;11(5):425–445.

<sup>69</sup> Wang R, Lai L, Wang S. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *J Comput Aided Mol Des*. 2002;16(1):11–26.

<sup>70</sup> Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, Repasky MP, Knoll

- EH, Shelley M, Perry JK, Shaw DE, Francis P, Shenkin PS. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem.* 2004;47(7):1739–1749.
- <sup>71</sup> DeWitte RS, Shakhnovich EI. SMOG: de Novo Design Method Based on Simple, Fast, and Accurate Free Energy Estimates. 1. Methodology and Supporting Evidence. *J. Am. Chem. Soc.* 1996;118,11733–11744.
- <sup>72</sup> Muegge I, Martin YC. A general and fast scoring function for protein-ligand interactions: a simplified potential approach. *J Med Chem.* 1999;42(5):791–804.
- <sup>73</sup> Gohlke H, Hendlich M, Klebe G. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J Mol Biol.* 2000;295(2):337–356.
- <sup>74</sup> Wang JM, Hou TJ, Xu XJ. Recent advances in free energy calculations with a combination of molecular mechanics and continuum models. *Curr Comput-Aided Drug Des.* 2006;2:287.
- <sup>75</sup> Kollman PA, Massova I, Reyes C, Kuhn B, Huo S, Chong L, Lee M, Lee T, Duan Y, Wang W, Donini O, Cieplak P, Srinivasan J, Case DA, Cheatham TE 3rd. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc Chem Res.* 2000;33(12):889–897.
- <sup>76</sup> Wang W, Donini O, Reyes CM, Kollman PA. Biomolecular simulations: recent developments in force fields, simulations of enzyme catalysis, protein-ligand, protein-protein, and protein-nucleic acid noncovalent interactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2001;30:211–243.
- <sup>77</sup> Hou T, Wang J, Li Y, Wang W. Assessing the performance of the molecular mechanics/Poisson Boltzmann surface area and molecular mechanics/generalized Born surface area methods. II. The accuracy of ranking poses generated from docking. *J Comput Chem.* 2011;32(5):866–877.
- <sup>78</sup> Guimarães CR, Cardozo M. MM-GB/SA rescoring of docking poses in structure-based lead optimization. *J Chem Inf Model.* 2008;48(5):958–970.
- <sup>79</sup> Wang R, Lu Y, Wang S. Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. *J Med Chem.* 2003;46(12):2287–2303.
- <sup>80</sup> Bissantz C, Folkers G, Rognan D. Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations. *J Med Chem.* 2000;43(25):4759–4767.
- <sup>81</sup> Schulz-Gasch T, Stahl M. Binding site characteristics in structure-based virtual screening: evaluation of current docking tools. *J Mol Model.* 2003;9(1):47–57.
- <sup>82</sup> Abu Hammad AM, Afifi FU, Taha MO. Combining docking, scoring and molecular field analyses to probe influenza neuraminidase-ligand interactions. *J Mol Graph Model.*

2007;26(2):443–456.

<sup>83</sup> Fujimoto T, Matsushita Y, Gouda H, Yamaotsu N, Hirono S. In silico multi-filter screening approaches for developing novel beta-secretase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008;18(9):2771–2775.

<sup>84</sup> Li Y, Zhou B, Wang R. Rational design of Tamiflu derivatives targeting at the open conformation of neuraminidase subtype 1. *J Mol Graph Model*. 2009;28(3):203–219.

<sup>85</sup> Cheng T, Liu Z, Wang R. A knowledge-guided strategy for improving the accuracy of scoring functions in binding affinity prediction. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:193.

<sup>86</sup> Zhang L, Tsai KC, Du L, Fang H, Li M, Xu W. How to generate reliable and predictive CoMFA models. *Curr Med Chem*. 2011;18(6):923–930.

<sup>87</sup> Yasuo K, Yamaotsu N, Gouda H, Tsujishita H, Hirono S. Structure-based CoMFA as a predictive model - CYP2C9 inhibitors as a test case. *J Chem Inf Model*. 2009;49(4):853–864.

<sup>88</sup> Bernard PP, Kireev DB, Pintore M, Chrétien JR, Fortier PL, Froment D. A CoMFA Study of Enantiomeric Organophosphorus Inhibitors of Acetylcholinesterase, *J Mol Model*. 2000;6:618–629.

<sup>89</sup> Dessalew N, Patel DS, Bharatam PV. 3D-QSAR and molecular docking studies on pyrazolopyrimidine derivatives as glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitors. *J Mol Graph Model*. 2007;25(6):885–895.

<sup>90</sup> Yi P, Qiu M. 3D-QSAR and docking studies of aminopyridine carboxamide inhibitors of c-Jun N-terminal kinase-1. *Eur J Med Chem*. 2008;43(3):604–613.

<sup>91</sup> Du J, Lei B, Qin J, Liu H, Yao X. Molecular modeling studies of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors using QSAR and docking. *J Mol Graph Model*. 2009;27(5):642–654.

<sup>92</sup> Wichapong K, Lindner M, Pianwanit S, Kokpol S, Sippl W. Receptor-based 3D-QSAR studies of checkpoint Wee1 kinase inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2009;44(4):1383–1395.

<sup>93</sup> Datar PA, Coutinho EC. A CoMFA study of COX-2 inhibitors with receptor based alignment. *J Mol Graph Model*. 2004;23(3):239–251.

<sup>94</sup> Huang H, Pan X, Tan N, Zeng G, Ji C. 3D-QSAR study of sulfonamide inhibitors of human carbonic anhydrase II. *Eur J Med Chem*. 2007;42(3):365–372.

<sup>95</sup> Ma X, Zhou L, Zuo Z, Liu J, Yang M, Wang R. Molecular Docking and 3-D QSAR Studies of Substituted 2,2-Bisaryl-Bicycloheptanes as Human 5-Lipoxygenase-Activating Protein (FLAP) Inhibitors. *QSAR. Comb. Sci*. 2008;27(9):1083–1091.

<sup>96</sup> Li AP, Kaminski DL, Rasmussen A. Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology*. 1995;104(1–3):1–8.

- <sup>97</sup> Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:1–17.
- <sup>98</sup> Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. 1999;286(5439):487–491.
- <sup>99</sup> Guengerich FP. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(1):70–83.
- <sup>100</sup> Ito K, Brown HS, Houston JB. Database analyses for the prediction of in vivo drug-drug interactions from in vitro data. *Br J Clin Pharmacol*. 2004;57(4):473–486.
- <sup>101</sup> Li AP, Maurel P, Gomez-Lechon MJ, Cheng LC, Jurima-Romet M. Preclinical evaluation of drug-drug interaction potential: present status of the application of primary human hepatocytes in the evaluation of cytochrome P450 induction. *Chem Biol Interact*. 1997;107(1–2):5–16.
- <sup>102</sup> Li AP, Lu C, Brent JA, Pham C, Fackett A, Ruegg CE, Silber PM. Cryopreserved human hepatocytes: characterization of drug-metabolizing enzyme activities and applications in higher throughput screening assays for hepatotoxicity, metabolic stability, and drug-drug interaction potential. *Chem Biol Interact*. 1999;121(1):17–35.
- <sup>103</sup> Wang RW, Newton DJ, Liu N, Atkins WM, Lu AY. Human cytochrome P-450 3A4: in vitro drug-drug interaction patterns are substrate-dependent. *Drug Metab Dispos*. 2000;28(3):360–366.
- <sup>104</sup> Lau WC, Waskell LA, Watkins PB, Neer CJ, Horowitz K, Hopp AS, Tait AR, Carville DG, Guyer KE, Bates ER. Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction. *Circulation*. 2003;107(1):32–37.
- <sup>105</sup> Youdim KA, Zayed A, Dickins M, Phipps A, Griffiths M, Darekar A, Hyland R, Fahmi O, Hurst S, Plowchalk DR, Cook J, Guo F, Obach RS. Application of CYP3A4 in vitro data to predict clinical drug-drug interactions; predictions of compounds as objects of interaction. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;65(5):680–692.
- <sup>106</sup> Itokawa D, Yamauchi A, Chuman H. Quantitative Structure-Activity Relationship for Inhibition of CYP2B6 and CYP3A4 by Azole Compounds-Comparison with Their Binding Affinity. *QSAR Comb. Sci*. 2009;28(6–7):629–636.
- <sup>107</sup> Choi I, Kim SY, Kim H, Kang NS, Bae MA, Yoo SE, Jung J, No KT. Classification models for CYP450 3A4 inhibitors and non-inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2009;44(6):2354–2360.
- <sup>108</sup> Ahlström MM, Zamora I. Characterization of type II ligands in CYP2C9 and CYP3A4. *J Med Chem*. 2008;51(6):1755–1763.
- <sup>109</sup> Gleeson MP, Davis AM, Chohan KK, Paine SW, Boyer S, Gavaghan CL, Arnby CH, Kankkonen C, Albertson N. Generation of in-silico cytochrome P450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6,

- and 3A4 inhibition QSAR models. *J Comput Aided Mol Des.* 2007;21(10–11):559–573.
- <sup>110</sup> Jensen BF, Vind C, Padkjaer SB, Brockhoff PB, Refsgaard HH. In silico prediction of cytochrome P450 2D6 and 3A4 inhibition using Gaussian kernel weighted k-nearest neighbor and extended connectivity fingerprints, including structural fragment analysis of inhibitors versus noninhibitors. *J Med Chem.* 2007;50(3):501–511.
- <sup>111</sup> Mao B, Gozalbes R, Barbosa F, Migeon J, Merrick S, Kamm K, Wong E, Costales C, Shi W, Wu C, Froloff N. QSAR modeling of in vitro inhibition of cytochrome P450 3A4. *J Chem Inf Model.* 2006;46(5):2125–2134.
- <sup>112</sup> Marechal JD, Yu J, Brown S, Kapelioukh I, Rankin EM, Wolf CR, Roberts GC, Paine MJ, Sutcliffe MJ. In silico and in vitro screening for inhibition of cytochrome P450 CYP3A4 by comedications commonly used by patients with cancer. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(4):534–538.
- <sup>113</sup> Kriegl JM, Arnhold T, Beck B, Fox T. A support vector machine approach to classify human cytochrome P450 3A4 inhibitors. *J Comput Aided Mol Des.* 2005;19(3):189–201.
- <sup>114</sup> Kriegl JM, Eriksson L, Arnhold T, Beck B, Johansson E, Fox T. Multivariate modeling of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Eur J Pharm Sci.* 2005;24(5):451–463.
- <sup>115</sup> Ekins S, Berbaum J, Harrison RK. Generation and validation of rapid computational filters for cyp2d6 and cyp3a4. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(9):1077–1080.
- <sup>116</sup> Ekins S, Bravi G, Binkley S, Gillespie JS, Ring BJ, Wikel JH, Wrighton SA. Three- and four-dimensional quantitative structure activity relationship analyses of cytochrome P-450 3A4 inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;290(1):429–438.
- <sup>117</sup> Yano JK, Wester MR, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF. The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution. *J Biol Chem.* 2004;279(37):38091–38094.
- <sup>118</sup> Williams PA, Cosme J, Vinkovic DM, Ward A, Angove HC, Day PJ, Vonrhein C, Tickle IJ, Jhoti H. Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science.* 2004;305(5684):683–686.
- <sup>119</sup> Ekroos M, Sjögren T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(37):13682–13687.
- <sup>120</sup> Sevrioukova IF, Poulos TL. Structure and mechanism of the complex between cytochrome P450 3A4 and ritonavir. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(43):18422–18427.
- <sup>121</sup> Korhonen LE, Turpeinen M, Rahnasto M, Wittekindt C, Poso A, Pelkonen O, Raunio H, Juvonen RO. New potent and selective cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) inhibitors based on three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) analysis. *Br J*

Pharmacol. 2007;150(7):932–942.

<sup>122</sup> Locuson CW 2nd, Suzuki H, Rettie AE, Jones JP. Charge and substituent effects on affinity and metabolism of benzbromarone-based CYP2C19 inhibitors. *J Med Chem.* 2004;47(27):6768–6776.

<sup>123</sup> Korhonen LE, Rahnasto M, Mähönen NJ, Wittekindt C, Poso A, Juvonen RO, Raunio H. Predictive three-dimensional quantitative structure-activity relationship of cytochrome P450 1A2 inhibitors. *J Med Chem.* 2005;48(11):3808–3815.

<sup>124</sup> Haji-Momenian S, Rieger JM, Macdonald TL, Brown ML. Comparative molecular field analysis and QSAR on substrates binding to cytochrome p450 2D6. *Bioorg Med Chem.* 2003;11(24):5545–5554.

<sup>125</sup> Lesigiarska I, Pajeva I, Yanev S. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) and three-dimensional QSAR analysis of a series of xanthates as inhibitors and inactivators of cytochrome P450 2B1. *Xenobiotica.* 2002;32(12):1063–1077.

<sup>126</sup> Clark M, Cramer RD III. The Probability of chance correlation using partial least squares (PLS). *Quant. Struct. Act. Relat.* 1993;12(2):137–145.

<sup>127</sup> CScore<sup>™</sup> Manual SYBYL<sup>®</sup> 8.1 Late 2008.

<sup>128</sup> Roberts AG, Yang J, Halpert JR, Nelson SD, Thummel KT, Atkins WM. The structural basis for homotropic and heterotropic cooperativity of midazolam metabolism by human cytochrome P450 3A4. *Biochemistry.* 2011;50(50):10804–10818.

<sup>129</sup> Grime KH, Bird J, Ferguson D, Riley RJ. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 enzymes: an evaluation of early decision making in vitro approaches and drug-drug interaction prediction methods. *Eur J Pharm Sci.* 2009;36(2–3):175–191.

<sup>130</sup> Jones SA, Moore LB, Shenk JL, Wisely GB, Hamilton GA, McKee DD, Tomkinson NC, LeCluyse EL, Lambert MH, Willson TM, Kliewer SA, Moore JT. The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol Endocrinol.* 2000;14(1):27–39.

<sup>131</sup> Kliewer SA, Goodwin B, Willson TM. The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev.* 2002;23(5):687–702.

<sup>132</sup> Aszalos A. Drug-drug interactions affected by the transporter protein, P-glycoprotein (ABCB1, MDR1) II. Clinical aspects. *Drug Discov Today.* 2007;12(19–20):838–843.

<sup>133</sup> Moroy G, Martiny VY, Vayer P, Villoutreix BO, Miteva MA. Toward in silico structure-based ADMET prediction in drug discovery. *Drug Discov Today.* 2012;17(1–2):44–55.

<sup>134</sup> Stanley LA, Horsburgh BC, Ross J, Scheer N, Wolf CR. PXR and CAR: nuclear receptors which play a pivotal role in drug disposition and chemical toxicity. *Drug Metab Rev.*



2006;38(3):515–597.

<sup>135</sup> Sinz MW, Pray D, Raucy J. The utility of stable cell lines to assess species differences in PXR transactivation. *Drug Metab Lett.* 2007;1(2):147–152.

<sup>136</sup> Shukla SJ, Sakamuru S, Huang R, Moeller TA, Shinn P, Vanleer D, Auld DS, Austin CP, Xia M. Identification of clinically used drugs that activate pregnane X receptors. *Drug Metab Dispos.* 2011;39(1):151–159.

<sup>137</sup> Watkins RE, Wisely GB, Moore LB, Collins JL, Lambert MH, Williams SP, Willson TM, Kliewer SA, Redinbo MR. The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science.* 2001;292(5525):2329–2333.

<sup>138</sup> Watkins RE, Maglich JM, Moore LB, Wisely GB, Noble SM, Davis-Searles PR, Lambert MH, Kliewer SA, Redinbo MR. 2.1 Å crystal structure of human PXR in complex with the St. John's wort compound hyperforin. *Biochemistry.* 2003;42(6):1430–1438.

<sup>139</sup> Chrencik JE, Orans J, Moore LB, Xue Y, Peng L, Collins JL, Wisely GB, Lambert MH, Kliewer SA, Redinbo MR. Structural disorder in the complex of human pregnane X receptor and the macrolide antibiotic rifampicin. *Mol Endocrinol.* 2005;19(5):1125–1134.

<sup>140</sup> Cheng Y, Redinbo MR. Activation of the human nuclear xenobiotic receptor PXR by the reverse transcriptase-targeted anti-HIV drug PNU-142721. *Protein Sci.* 2011;20(10):1713–1719.

<sup>141</sup> Watkins RE, Davis-Searles PR, Lambert MH, Redinbo MR. Coactivator binding promotes the specific interaction between ligand and the pregnane X receptor. *J Mol Biol.* 2003;331(4):815–828.

<sup>142</sup> Xue Y, Chao E, Zuercher WJ, Willson TM, Collins JL, Redinbo MR. Crystal structure of the PXR-T1317 complex provides a scaffold to examine the potential for receptor antagonism. *Bioorg Med Chem.* 2007;15(5):2156–2166.

<sup>143</sup> Wang W, Prosser WW, Chen J, Taremi SS, Le HV, Madison V, Cui X, Thomas A, Cheng KC, Lesburg CA. Construction and characterization of a fully active PXR/SRC-1 tethered protein with increased stability. *Protein Eng Des Sel.* 2008;21(7):425–433.

<sup>144</sup> Kliewer SA. The nuclear pregnane X receptor regulates xenobiotic detoxification. *J Nutr.* 2003;133(7 Suppl):2444S–2447S.

<sup>145</sup> Raucy J, Warfe L, Yueh MF, Allen SW. A cell-based reporter gene assay for determining induction of CYP3A4 in a high-volume system. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;303(1):412–423.

<sup>146</sup> Cui X, Thomas A, Han Y, Palamanda J, Montgomery D, White RE, Morrison RA, Cheng KC. Quantitative PCR assay for cytochromes P450 2B and 3A induction in rat precision-cut liver slices: correlation study with induction in vivo. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2005;52(2):234–243.

- <sup>147</sup> Chen J, Tran C, Xiao L, Palamanda J, Klapmuts T, Kumari P, Lin X, Wang EJ, Gu YZ, Humphries M, Uss AS, Cheng KC. Co-induction of CYP3A12 and 3A26 in dog liver slices by xenobiotics: species difference between human and dog CYP3A induction. *Drug Metab Lett.* 2009;3(1):61–66.
- <sup>148</sup> Ngan CH, Beglov D, Rudnitskaya AN, Kozakov D, Waxman DJ, Vajda S. The structural basis of pregnane X receptor binding promiscuity. *Biochemistry.* 2009;48(48):11572–11581.
- <sup>149</sup> Liu YH, Mo SL, Bi HC, Hu BF, Li CG, Wang YT, Huang L, Huang M, Duan W, Liu JP, Wei MQ, Zhou SF. Regulation of human pregnane X receptor and its target gene cytochrome P450 3A4 by Chinese herbal compounds and a molecular docking study. *Xenobiotica.* 2011;41(4):259–280.
- <sup>150</sup> Ung CY, Li H, Yap CW, Chen YZ.: In silico prediction of pregnane X receptor activators by machine learning approaches. *Mol Pharmacol.* 2007;71(1):158–168.
- <sup>151</sup> Khandelwal A, Krasowski MD, Reschly EJ, Sinz MW, Swaan PW, Ekins S. Machine learning methods and docking for predicting human pregnane X receptor activation. *Chem Res Toxicol.* 2008;21(7):1457–1467.
- <sup>152</sup> Kortagere S, Chekmarev D, Welsh WJ, Ekins S. Hybrid scoring and classification approaches to predict human pregnane X receptor activators. *Pharm Res.* 2009;26(4):1001–1011.
- <sup>153</sup> Ekins S, Kortagere S, Iyer M, Reschly EJ, Lill MA, Redinbo MR, Krasowski MD. Challenges predicting ligand-receptor interactions of promiscuous proteins: the nuclear receptor PXR. *PLoS Comput Biol.* 2009;5(12):e1000594.
- <sup>154</sup> Xiao L, Nickbarg E, Wang W, Thomas A, Ziebell M, Prosise WW, Lesburg CA, Taremi SS, Gerlach VL, Le HV, Cheng KC. Evaluation of in vitro PXR-based assays and in silico modeling approaches for understanding the binding of a structurally diverse set of drugs to PXR. *Biochem Pharmacol.* 2011;81(5):669–679.
- <sup>155</sup> Lyne PD, Lamb ML, Saeh JC. Accurate prediction of the relative potencies of members of a series of kinase inhibitors using molecular docking and MM-GBSA scoring. *J Med Chem.* 2006;49(16):4805–4808.
- <sup>156</sup> Ho GD, Anthes J, Bercovici A, Caldwell JP, Cheng KC, Cui X, Fawzi A, Fernandez X, Greenlee WJ, Hey J, Korfmacher W, Lu SX, McLeod RL, Ng F, Torhan AS, Tan Z, Tulshian D, Varty GB, Xu X, Zhang H. The discovery of tropane derivatives as nociceptin receptor ligands for the management of cough and anxiety. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009;19(9):2519–2523.
- <sup>157</sup> Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and

toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;270(1):414–423.

<sup>158</sup> Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin. Pharmacokinet.* 2009;48(11):689–723.

<sup>159</sup> Wan YJ, Poland RE, Han G, Konishi T, Zheng YP, Berman N, Lin KM. Analysis of the CYP2D6 gene polymorphism and enzyme activity in African-Americans in southern California. *Pharmacogenetics.* 2001;11(6):489–499.

<sup>160</sup> Nakamura K, Ariyoshi N, Yokoi T, Ohgiya S, Chida M, Nagashima K, Inoue K, Kodama T, Shimada N, Kamataki T. CYP2D6.10 present in human liver microsomes shows low catalytic activity and thermal stability. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293(3):969–973.

<sup>161</sup> Masimirembwa C, Persson I, Bertilsson L, Hasler J, Ingelman-Sundberg M. A novel mutant variant of the CYP2D6 gene (CYP2D6\*17) common in a black African population: association with diminished debrisoquine hydroxylase activity. *Br J Clin Pharmacol.* 1996;42(6):713–719.

<sup>162</sup> Aklillu E, Persson I, Bertilsson L, Johansson I, Rodrigues F, Ingelman-Sundberg M. Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;278(1):441–446.

<sup>163</sup> Wennerholm A, Johansson I, Massele AY, Lande M, Alm C, Aden-Abdi Y, Dahl ML, Ingelman-Sundberg M, Bertilsson L, Gustafsson LL. Decreased capacity for debrisoquine metabolism among black Tanzanians: analyses of the CYP2D6 genotype and phenotype. *Pharmacogenetics.* 1999;9(6):707–714.

<sup>164</sup> Panserat S, Sica L, Gérard N, Mathieu H, Jacqz-Aigrain E, Krishnamoorthy R. CYP2D6 polymorphism in a Gabonese population: contribution of the CYP2D6\*2 and CYP2D6\*17 alleles to the high prevalence of the intermediate metabolic phenotype. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;47(1):121–124.

<sup>165</sup> Griese EU, Asante-Poku S, Ofori-Adjei D, Mikus G, Eichelbaum M. Analysis of the CYP2D6 gene mutations and their consequences for enzyme function in a West African population. *Pharmacogenetics.* 1999;9(6):715–723.

<sup>166</sup> Wennerholm A, Dandara C, Sayi J, Svensson JO, Abdi YA, Ingelman-Sundberg M, Bertilsson L, Hasler J, Gustafsson LL. The African-specific CYP2D6\*17 allele encodes an enzyme with changed substrate specificity. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;71(1):77–88.

<sup>167</sup> Marcucci KA, Pearce RE, Crespi C, Steimel DT, Leeder JS, Gaedigk A. Characterization of cytochrome P450 2D6.1 (CYP2D6.1), CYP2D6.2, and CYP2D6.17 activities toward model CYP2D6 substrates dextromethorphan, bufuralol, and debrisoquine. *Drug Metab Dispos.*

2002;30(5):595–601.

<sup>168</sup> Bogni A, Monshouwer M, Moscone A, Hidestrand M, Ingelman-Sundberg M, Hartung T, Coecke S. Substrate specific metabolism by polymorphic cytochrome P450 2D6 alleles. *Toxicol In Vitro*. 2005;19(5):621–629.

<sup>169</sup> Cai WM, Nikoloff DM, Pan RM, de Leon J, Fanti P, Fairchild M, Koch WH, Wedlund PJ. CYP2D6 genetic variation in healthy adults and psychiatric African-American subjects: implications for clinical practice and genetic testing. *Pharmacogenomics J*. 2006;6(5):343–350.

<sup>170</sup> Liu JP, Chow SC. Bridging studies in clinical development. *J Biopharm Stat*. 2002;12(3):359–367.

<sup>171</sup> Matsui H. Global drug development based on ICH-E5 guideline. *Xenobiotic Metab Dispos*. 2000;15(4):381–385.

<sup>172</sup> Hsiao CF, Xu JZ, Liu JP. A two-stage design for bridging studies. *J Biopharm Stat*. 2005;15(1):75–83.

<sup>173</sup> Goto M, Hamasaki T. Practical issues and observations on the use of foreign clinical data in drug development. *J Biopharm Stat*. 2002;12(3):369–384.

<sup>174</sup> Hsiao CF, Xu JZ, Liu JP. A group sequential approach to evaluation of bridging studies. *J Biopharm Stat*. 2003;13(4):793–801.

<sup>175</sup> Naito C. Necessity and requirements of bridging studies and their present status in Japan. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2000;38(2):80–86.

<sup>176</sup> Gupta SK. Implications of ICH-E5: Assessment of drug's sensitivity to ethnic factors and necessity of a bridging study for global drug development. *Perspect Clin Res*. 2011;2(4):121–123.

<sup>177</sup> Shen H, He MM, Liu H, Wrighton SA, Wang L, Guo B, Li C. Comparative metabolic capabilities and inhibitory profiles of CYP2D6.1, CYP2D6.10, and CYP2D6.17. *Drug Metab Dispos*. 2007;35(8):1292–1300.

<sup>178</sup> Akiyoshi T, Saito T, Murase S, Miyazaki M, Murayama N, Yamazaki H, Guengerich FP, Nakamura K, Yamamoto K, Ohtani H. Comparison of the inhibitory profiles of itraconazole and cimetidine in cytochrome P450 3A4 genetic variants. *Drug Metab Dispos*. 2011;39(4):724–728.

<sup>179</sup> Oscarson M, Hidestrand M, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. A combination of mutations in the CYP2D6\*17 (CYP2D6Z) allele causes alterations in enzyme function. *Mol Pharmacol*. 1997;52(6):1034–1040.

<sup>180</sup> Zhou X, Wang Y, Or PM, Wan DC, Kwan YW, Yeung JH. Molecular docking and enzyme kinetic studies of dihydrotanshinone on metabolism of a model CYP2D6 probe substrate in human liver microsomes. *Phytomedicine*. 2012;19(7):648–657.

- <sup>181</sup> Mo SL, Liu WF, Li CG, Zhou ZW, Luo HB, Chew H, Liang J, Zhou SF. Pharmacophore, QSAR, and binding mode studies of substrates of human cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) using molecular docking and virtual mutations and an application to chinese herbal medicine screening. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(9):1640–1704.
- <sup>182</sup> VandenBrink BM, Foti RS, Rock DA, Wienkers LC, Wahlstrom JL. Prediction of CYP2D6 drug interactions from in vitro data: evidence for substrate-dependent inhibition. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(1):47–53.
- <sup>183</sup> Mo SL, Liu WF, Chen Y, Luo HB, Sun LB, Chen XW, Zhou ZW, Sneed KB, Li CG, Du YM, Liang J, Zhou SF. Ligand- and protein-based modeling studies of the inhibitors of human cytochrome P450 2D6 and a virtual screening for potential inhibitors from the Chinese herbal medicine, *Scutellaria baicalensis* (Huangqin, Baikal Skullcap). *Comb Chem High Throughput Screen.* 2012;15(1):36–80.
- <sup>184</sup> Schyman P, Usharani D, Wang Y, Shaik S. Brain chemistry: how does P450 catalyze the O-demethylation reaction of 5-methoxytryptamine to yield serotonin? *J Phys Chem B.* 2010;114(20):7078–7089.
- <sup>185</sup> Kotsuma M, Hanzawa H, Iwata Y, Takahashi K, Tokui T. Novel binding mode of the acidic CYP2D6 substrates pactimibe and its metabolite R-125528. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(9):1938–1943.
- <sup>186</sup> Ito Y, Kondo H, Goldfarb PS, Lewis DF. Analysis of CYP2D6 substrate interactions by computational methods. *J Mol Graph Model.* 2008;26(6):947–956.
- <sup>187</sup> McLaughlin LA, Paine MJ, Kemp CA, Maréchal JD, Flanagan JU, Ward CJ, Sutcliffe MJ, Roberts GC, Wolf CR. Why is quinidine an inhibitor of cytochrome P450 2D6? The role of key active-site residues in quinidine binding. *J Biol Chem.* 2005;280(46):38617–38624.
- <sup>188</sup> Bapiro TE, Hasler JA, Ridderström M, Masimirembwa CM. The molecular and enzyme kinetic basis for the diminished activity of the cytochrome P450 2D6.17 (CYP2D6.17) variant. Potential implications for CYP2D6 phenotyping studies and the clinical use of CYP2D6 substrate drugs in some African populations. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(9):1387–1398.
- <sup>189</sup> Rowland P, Blaney FE, Smyth MG, Jones JJ, Leydon VR, Oxbrow AK, Lewis CJ, Tennant MG, Modi S, Eggleston DS, Chenery RJ, Bridges AM. Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *J Biol Chem.* 2006;281(11):7614–7622.
- <sup>190</sup> Wang A, Savas U, Hsu MH, Stout CD, Johnson EF. Crystal structure of human cytochrome P450 2D6 with prinomastat bound. *J Biol Chem.* 2012;287(14):10834–10843.
- <sup>191</sup> Du J, Sun H, Xi L, Li J, Yang Y, Liu H, Yao X. Molecular modeling study of checkpoint kinase 1 inhibitors by multiple docking strategies and prime/MM-GBSA calculation. *J Comput*

Chem. 2011;32(13):2800–2809.

<sup>192</sup> Hisaka A, Ohno Y, Yamamoto T, Suzuki H. Prediction of pharmacokinetic drug-drug interaction caused by changes in cytochrome P450 activity using in vivo information. *Pharmacol Ther.* 2010;125(2):230–248.

<sup>193</sup> Lutz JD, Isoherranen N. In vitro-to-in vivo predictions of drug-drug interactions involving multiple reversible inhibitors. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2012;8(4):449–466.

<sup>194</sup> Ito K, Sugiyama Y. Use of clearance concepts and modeling techniques in the prediction of metabolic drug-drug interactions. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31(8):351–355.