

異物応答性核内受容体 CAR による CYP2B6 発現誘導に関する

in silico 予測研究

北里大学大学院薬学研究科

創薬物理化学教室

DP-14101 加藤 晴敏

目次

学位論文要旨	5
略語一覧	12
第一章 序論	15
第二章 方法	25
第一節 CAR 活性化データセットの整備	26
第一項 CAR 活性化評価の概要	26
第二項 化合物	27
第三項 ヒト CAR レポータージーンアッセイ	29
第四項 データセットの分割	31
第二節 <i>In silico</i> ドッキングプロトコルの確立	32
第一項 <i>In silico</i> ドッキングプロトコルの概略	32
第二項 リガンド構造の準備	32
第三項 CAR 蛋白構造の準備	33
第四項 分子動力学 (Molecular dynamics, MD) シミュレーション	33
第五項 コンピュータリガンドドッキング	34
第六項 ポーズ決定	34
第三節 Structure-based 3D-QSAR モデルの構築	36
第一項 Structure-based 3D-QSAR モデルの概略	36
第二項 CoMFA モデルの構築	36

第三章	結果	39
第一節	CAR 活性化データセットの整備	40
第一項	ヒト CAR レポータージーンアッセイ	40
第二項	データセットの分割	42
第二節	<i>In silico</i> ドッキングプロトコルの確立	44
第一項	鍵穴構造サンプリング	44
第二項	ドッキングプロトコルの確立	47
第三節	Structure-based 3D-QSAR モデルの構築	49
第一項	CoMFA モデルの構築	49
第二項	CoMFA 等高線図	53
第三項	リガンドとヒト CAR 蛋白の相互作用が観察されるアミノ酸情報..	56
第四章	考察	59
第一節	3D-QSAR モデルの予測性能に関する考察	60
第二節	3D-QSAR モデルを用いたヒダントイン誘導体のヒト CAR 活性化能の 比較	67
第三節	本研究における 3D-QSAR モデルの課題	70
第五章	総括	73
論文目録	77
謝辞	79
引用文献	81

學位論文要旨

近年、医薬品開発の成功確率は低下傾向にあり、新薬創出は厳しさを増している。新薬となる化合物には、優れた薬効ならびに十分な安全性が求められるだけでなく、併用薬に重大な影響を及ぼす、いわゆる薬物相互作用のリスクを回避する必要がある。薬物相互作用で問題となる多くは薬物代謝に関連し、特に薬物代謝において重要な役割を果たすシトクロム P450 (CYP) の阻害と誘導がその大部分を占めている。中でも、酵素誘導は化合物により薬物代謝酵素含量および活性が増加する現象としてよく知られ、酵素誘導が引き起こされると、併用薬または投与薬剤自身の代謝が亢進することで血中濃度が低下し、治療効果が減弱する危険性がある。酵素誘導は主に遺伝子発現レベルで調節されており、異物応答性の核内受容体であるプレグナン X 受容体 (pregnane X receptor, PXR)、構成的アンドロスタン受容体 (constitutive androstane receptor, CAR) および芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor, AHR) が中心的に働く。CAR はシトクロム P450 (CYP) 2B, CYP2C, CYP3A, グルタチオン転移酵素, 硫酸転移酵素, UDP-グルクロン酸転移酵素 1A1, OATP1, MRP2 および MRP3 を含む、多くの薬物代謝酵素およびトランスポーターの発現を制御している。特に CYP2B6 の発現誘導に関与しており、カルバマゼピン、エファビレンツおよびネビラピン等薬剤による CAR 活性化を介する CYP2B6 誘導が知られている。また、臨床薬物相互作用の事例として、CAR 活性化能を持つ抗てんかん薬フェニトインと併用した抗腫瘍薬シクロフォスファミドの血中濃度低下が報告されている。そのため、平成 26 年に厚生労働省より公表された「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン (最終案)」の中で、医薬品開発化合物の CYP2B6 誘導評価が義務付けられている。従って、創薬の早期段階から CYP2B6 誘導ポテンシャルを確認する必要性はかなり高いと言え、誘導ポテ

ンシヤルが低いと予測される化合物をデザイン・合成することで、将来的な開発コストの縮小ならびに新薬創出の成功確度向上へ繋がると同時に、本来の目的である安全で使い易い薬剤を患者さんに届けることが可能となる。創薬研究での CYP2B6 誘導リスク評価として、ヒト肝細胞または不死化細胞を用いた *in vitro* 試験が多くの製薬企業で導入されているが、試験コストおよびスループットの制限から、CYP2B6 誘導に繋がる CAR 活性化化合物の十分な構造活性相関情報を得るのは難しい。一方、コンピュータを用いた計算化学技術である *in silico* 手法は、これら制限を回避することが可能な魅力的なアプローチである。ただし CAR 活性化化合物を同定するための効果的な計算化学アプローチの報告は今日まで少ない。従って、本研究では、創薬プロセスで利用できる CYP2B6 誘導予測のための有効的な *in silico* 手法の確立を目的とし、CAR 活性化能を指標とした 3 次元定量的構造活性相関 (3D-QSAR) モデルの開発を行った。

以下に、3D-QSAR モデル開発の概略を示す。

1. CAR 活性化データセットの整備

生体内またはヒト初代肝細胞とは異なり、HepG2 細胞のような不死化細胞株では CAR は恒常的に活性化し、通常存在する細胞質からリガンドの刺激無しに核内へ移行するため、これまで不死化細胞株を用いた高感度の CAR 活性評価が困難であった。本研究では、Chen らの報告 [1] に基づき、ヒト CAR リガンド結合部位近傍にアラニンを一残基挿入した変異コンストラクト (hCAR1+A) を HepG2 細胞に導入した、高感度のレポーター遺伝子評価系を作成し、試験に供した。次に、市販薬剤、ステロイド、天然物、可塑剤、産業物質および合成化合物を含む幅広い CAR 活性化剤の報告の中から、

化学構造の多様性を考慮して 35 化合物を選抜し, hCAR1+A レポーター遺伝子評価を行った. 35 化合物の CAR 活性化能は, $EC_{2\text{-fold}}$ (コントロールの 2 倍の活性となる濃度) で表すと, 0.02 μM ~100 μM の範囲の幅広い活性を示し, 本研究において, CAR 活性化能評価の同一試験プロトコルとしては多様な化学構造ならびに活性からなる最大級のデータセットを整備した.

2. *In silico* ドッキングプロトコルの確立

ドッキングスタディにおいてヒト CAR 蛋白のフレキシビリティを考慮し, かつリガンドの正確な結合ポーズを明らかにするために, Fig. 1 に示す X 線結晶構造 (PDB: 1XVP) から作成した hCAR1+A の蛋白構造を用いた分子動力学 (Molecular Dynamics, MD) シミュレーションを行い, MD トラジェクトリから 10 個の多様なヒト CAR 蛋白構造のサンプリングを実施した. 次に, X 線結晶構造のある, 2 つのリガンド; 6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde O-(3,4-dichloro-benzyl)oxime (CITCO, 1XVP) および 5 β -pregnane-3,20-dione (1XV9) について, Glide (Schrödinger Suite 2014) を用い 10 個のヒト CAR 蛋白構造とのアンサンブルドッキングを行った. ドッキングにより得られた Glide トップスコアの結合ポーズと X 線結晶構造の結合ポーズを比較した結果, 両化合物ともに RMSD は 2Å 以内であり, 本ドッキングプロトコルを用いて得られた結合ポーズが, X 線結晶構造の結合ポーズを再現することを確認した (Fig.2).

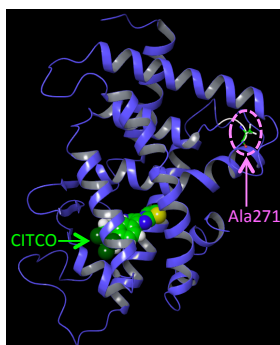


Fig. 1 hCAR1+Aの構造(1XVP)

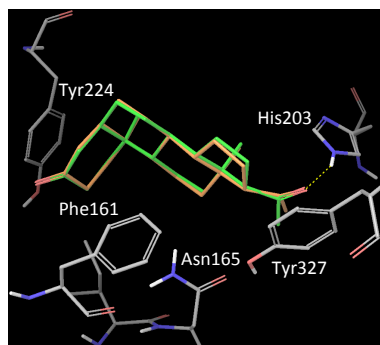


Fig. 2 5β-pregnane-3, 20-dioneの結合ポーズ
ドッキングプロトコルによる決定構造(橙), X線結晶構造(緑)

3. 3D-QSAR モデルの構築

CAR 活性化データセット 35 化合物を、モデル構築用のトレーニングセット 28 化合物、およびモデル検証用のテストセット 7 化合物に分割後、先に確立したドッキングプロトコルに従い、トレーニングセット 28 化合物のヒト CAR 蛋白構造に対する分子アライメントを得た。得られた分子アライメントと CAR 活性化データから comparative molecular field analysis (CoMFA) モデルを構築し、その後、テストセット 7 化合物を用いたモデルの検証を実施した。また、ヒト CAR リガンド結合部位には疎水性アミノ酸が多く存在し、リガンドとの間の疎水性相互作用の重要性が知られていることから、標準の CoMFA モデルでは十分に考慮されていない脂溶性パラメータの追加検証を行った。脂溶性パラメータには $\log D_{7.4}$ の計算値として ADMET predictor (Simulations Plus) で算出した $S+\log D_{7.4}$ 記述子を使用し、 $S+\log D_{7.4}$ を追加した改良型 CoMFA モデルの構築ならびに検証を行った。構築した標準 CoMFA および改良 CoMFA モデルの統計値を比較した結果、両 CoMFA モデルにより予測された CAR 活性化能は実験値と良く一致しており (Fig. 3)、トレーニングセットの r^2 はいずれのモデルも 0.99 であった。一方、トレ

ーニングセットを用いたクロスバリデーションの r^2 (q^2) およびテストセットの予測 r^2 は、標準 CoMFA モデルでそれぞれ、0.48 および 0.50、また改良 CoMFA モデルでそれぞれ、0.74 および 0.71 であり、改良 CoMFA モデルにおいてより優れた統計値を示した。また、改良 CoMFA モデルで得られた等高線図は、CAR 蛋白リガンド結合部位の環境をよく説明できるものであった (Fig. 4)。

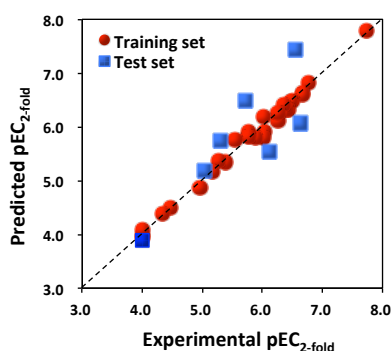


Fig. 3 実験 pEC_{2-fold} 値と改良CoMFAモデルにおける予測 pEC_{2-fold} 値の相関プロット

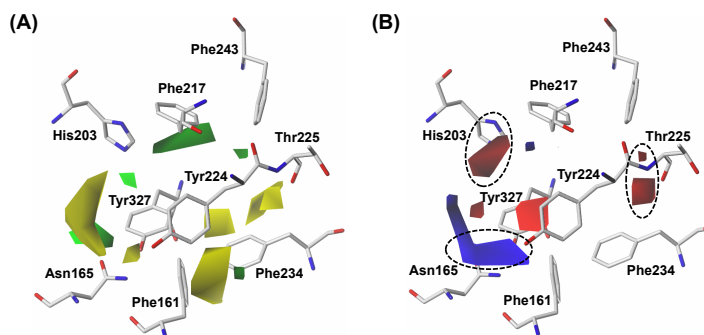


Fig. 4 改良CoMFAモデルにおけるの立体的場(A)および静電場(B)の等高線図

以上の結果、標準 CoMFA モデルへ脂溶性パラメータを追加することによる予測精度の向上が示された。最後に、改良 CoMFA モデルを用いて、臨床で使用する類似の 2 次元構造を持つヒダントイン誘導体に対する CAR 活性化能の考察を行った。臨床で CYP2B6 誘導を介した薬物相互作用の報告があるフェニトイン、および CYP2B6 誘導に関する報告の無いエトトインの異なるヒト CAR 活性化能について考察した結果、両化合物のヒト CAR 蛋白への結合ポーズおよび CoMFA 等高線図から、活性化能の差異を説明可能であった。

以上，本研究では，まず多様な化学構造ならびに CAR 活性化能を持つ独自の化合物データセットの整備，および 3D-QSAR モデル構築に必要な CAR 蛋白へのドッキングプロトコルの確立を行った．次に，CAR 蛋白とリガンドの相互作用に重要な脂溶性パラメータを考慮した改良型 CoMFA により，ヒト CAR 活性化能を精度高く予測する 3D-QSAR モデルを開発した．本モデルは，創薬研究へ適した幅広い化合物群の予測が可能であり，創薬早期ステージから，CYP2B6 誘導に関連する薬物相互作用リスクを低減した医薬品候補の選択に有益な知見を提供できると考える．

[1] Chen T, et al. J Pharmacol Exp Ther 2010;332:106–15.

略語一覧

2D	: Two Dimensional
3D	: Three Dimensional
ADME	: Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion
AHR	: Aryl Hydrocarbon Receptor
AUC	: Area Under the Curve
CAR	: Constitutive Androstane Receptor
CITCO	: 6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde O-(3,4-dichloro-ben-zy) oxime
CoMFA	: Comparative Molecular Field Analysis
CYP	: Cytochrome P450
DDIs	: Drug-Drug Interactions
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
FDA	: Food and Drug Administration
GOLPE	: Generating Optimal Linear PLS Estimations
MD	: Molecular Dynamics
MRP	: Multidrug Resistance-associated Protein
NLS2	: Nuclear Localization Signal 2
OATP	: Organic Anion Transporting Polypeptide
PBREM	: Phenobarbital-Responsive Enhancer Module

PDB	: Protein Data Bank
PLS	: Partial Least Squares
PPAR α	: Peroxisome Proliferator Activated Receptor α
PXR	: Pregnane X Receptor
QSAR	: Quantitative Structure Activity Relationship
ROC	: Receiver Operator Curve
RMSD	: Root Mean Square Deviation
RXR α	: Retinoid X Receptor α
UDP	: Uridine Diphosphate
XREM	: Xenobiotic-Responsive Enhancer Module

第一章 序論

近年、医薬品開発の成功確率は低下傾向にあり、新薬創出は厳しさを増している。国内製薬企業 27 社を対象とした調査によると、2000 年から 2008 年の期間に国内外で開発された医薬品 471 プロジェクトの臨床開発から承認に至る成功確率は 15%であり[1]、さらに、世界的に過去最低レベルと言われる 2009 年から 2010 年の成功確率に至ってはわずか 6%であった[2]。医薬品開発の中止理由として、1990 年代初頭、候補化合物の薬物動態面の課題、すなわち、吸収 (Absorption)、分布 (Distribution)、代謝 (Metabolism) および排泄 (Excretion) からなる ADME 特性の問題が全体の約 40%に達していたが、その後、ADME 課題の少ない化合物を選抜するために開発初期から薬物動態評価を拡充した製薬企業の努力により、2000 年には中止理由の約 10%まで改善した[3]。しかしながら、医薬品開発における薬物動態面の課題には、純粋な ADME 特性以外の問題として、薬剤の併用により見かけ上の薬効不足または副作用が発現する、いわゆる薬物相互作用 (Drug-Drug Interactions, DDIs) も含まれるため、依然対策は必要である。医薬品相互作用ハンドブック (改訂 2 版) に収載された薬物相互作用 256 例の内訳を見ると、全体の約半分の薬物動態に関係し、最も多い 37%が薬物代謝に関連した薬物相互作用であった。中でも、薬物代謝において重要な役割を果たす、第 I 相代謝酵素であるシトクロム P450 (CYP) 代謝の相互作用が 96%と圧倒的な割合であり、その CYP 代謝に関わる薬物相互作用として、酵素阻害 (70%) と並び酵素誘導 (23%) がその要因となっている[4]。

酵素誘導は化合物により CYP をはじめとする薬物代謝酵素含量および活性が増加する現象としてよく知られている。酵素誘導が引き起こされると、併用薬または投与薬剤自身の代謝が亢進することで血中濃度が低下し、治療効果が減弱する、または毒性代謝

物が増加するため予期せぬ副作用が発現するという危険に繋がる。1997 年に報告されたリファンピシンとトリアゾラムの臨床薬物相互作用試験では、CYP3A4 の誘導剤であるリファンピシンを 600 mg の用量で 5 日間反復経口投与後、CYP3A4 の基質であるトリアゾラムを 0.5 mg 経口投与した結果、リファンピシン併用群では酵素誘導に因るトリアゾラム代謝の亢進が起こり、トリアゾラムの血中濃度はリファンピシン非併用群と比較して約 10 分の 1 まで劇的に低下した[5]。こうした酵素誘導は主に遺伝子発現レベルで調節されており、異物応答性の核内受容体であるプレグナン X 受容体 (pregnane X receptor, PXR)、構成的アンドロスタン受容体 (constitutive androstane receptor, CAR)、芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor, AHR) およびペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 α (peroxisome proliferator activated receptor α , PPAR α) が中心的に働き、PXR, CAR, AhR および PPAR α は主に、CYP3A4, CYP2B6, CYP1A1/2 および CYP4A の発現誘導にそれぞれ関与している[6-8]。酵素誘導に関わる核内受容体の中でも、PXR と CAR は幅広い薬物によって活性化されるため特に重要であるが、CAR に関する酵素誘導の研究報告は PXR の約半数と少ない。その一因として、CAR は PXR と異なり不死化細胞系にて恒常的に活性化しているため、CAR 活性化を指標とした簡便な *in vitro* 評価の困難さがある。また、CAR 活性化の *in vitro* 評価難易度と相関する形で、これまでの *in silico* 研究の範囲も限定的なものとなっている。従って、創薬における適切な酵素誘導評価を行う上で、その一翼を担う CAR 活性化研究を深める意義は非常に高いと考えられる。CAR のターゲット遺伝子は、CYP2B, CYP2C, CYP3A, グルタチオン転移酵素, 硫酸転移酵素, UDP-グルクロン酸転移酵素 1A1, OATP1, MRP2 および MRP3 を含む、多くの薬物代謝酵素およびトランスポーターの発現を制御しており、

その中でも、ヒトにおいて CYP2B6 の発現誘導への関与が特に重要とされている[9-14].

最近の報告によると、CYP2B6 のヒト肝臓 CYP に占める含量の割合は 2～10%, また、市販薬剤の代謝への CYP2B6 の寄与は CYP 全体の約 15%となっている (Fig. 1). そのため、酵素誘導評価が必要な 4 つの CYP 分子種 (CYP1A2, 2B6, 2C, 3A4) の中で、CYP2B6 の寄与率は CYP3A4 に次ぐ高さを示しており、以前と比べ CYP2B6 のヒト薬物代謝における役割の大きさが見直されている[15].

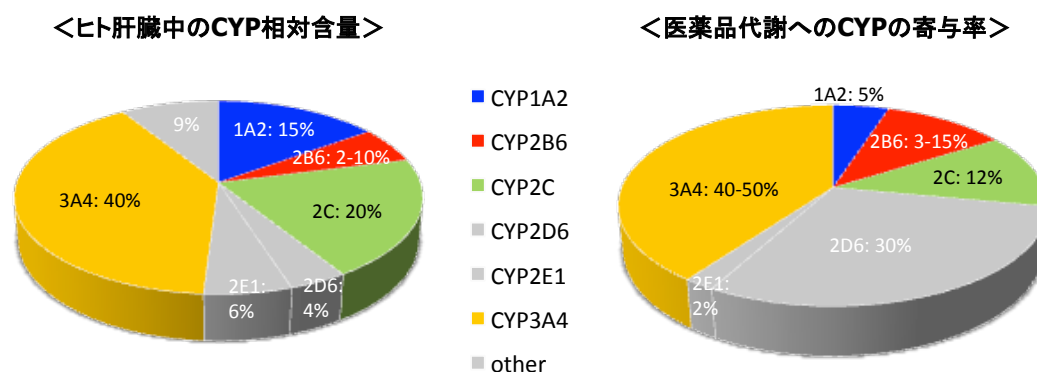


Fig. 1 ヒト CYP 分子種の相対含量および医薬品代謝への寄与率 (*酵素誘導評価の必要な 4 分子種 ; CYP1A2, 2B6, 2C および 3A4)

次に、CYP2B6 で代謝される代表的薬剤を Table 1 に示す。CYP2B6 の基質となる薬剤は幅広い医薬品クラスに数多く存在していることから、CYP2B6 で代謝される薬剤と CYP2B6 誘導の原因となる CAR 活性化能を持つ薬剤を併用した場合、酵素誘導に伴う重大な薬物相互作用が引き起こされる危険性が高まっている[16].

Table 1 臨床で使用する CYP2B6 基質となる医薬品（引用文献 16）

Drug Class	Substrate	Contribution of CYPs
Anesthetic	Ketamine	CYP3A4 > CYP2B6, 2C9
	Lidocaine	CYP2B6, 2A6 > CYP2B6
	Propofol	CYP2B6 > CYP2C9
Antiarrhythmic	Mexiletine	CYP2A1 > CYP2B6, 2E1
Anticoagulant	Coumarins	CYP2B6 > CYP2E1, 2C19
Anticonvulsant	Mephenytoin	CYP2B6 > CYP2C9
Antidepressant	Bupropion	CYP2B6 > CYP2D6, 3A4
Antiepileptic	Mephobarbital	CYP2B6
	Valproic Acid	CYP2A6 > CYP2B6, 1A1
	Aminopyrine	CYP2B6, 2C19 > CYP2C8, 2D6
Anti-inflammatory	Antipyrine	CYP3A4, 2C > CYP2B6, 1A2
	Tazofelone	CYP3A4 > CYP2B6
	Artemether	CYP2B6 > CYP3A4
Antimalarial	Artemisinin	CYP2B6 > CYP3A4
	Efavirenz	CYP2B6 > CYP3A
Antiretroviral	Nevirapine	CYP2B6, 3A4 > CYP2D6
	Cyclophosphamide	CYP2B6 > CYP3A4, 2C9
Chemotherapeutic	Ifosfamide	CYP2B6, 3A4 > CYP2C9, 2C19
	Tamoxifen	CYP2E1, 2D6 > CYP2B6, 3A4
	Selegiline	CYP2B6, 2C19 > CYP3A4, 1A2
MAOI	Methadone	CYP2B6, 3A4
Opioid	Pethidine	CYP2B6 > CYP3A4, 2C19
	Clotiazepam	CYP2B6, 3A4 > CYP2C18, 2C19
Psychotropic	Diazepam	CYP2B6, 2C19 > CYP3A4
	Temazepam	CYP2B6 > CYP2C, 3A
	Testosterone	CYP2B6 > CYP3A

実際、臨床薬物相互作用の事例として、CAR 活性化能を持つ抗てんかん薬フェニトインと併用した抗腫瘍薬イフォスファミドおよびシクロフォスファミドの血中濃度低下 [17, 18], また、CYP2B6 の基質かつ誘導剤である抗マラリア薬アルテミシニンを反復投与した際に、アルテミシニン自身の血中濃度が低下するいわゆる自己誘導が報告されている [19]. そのため、平成 26 年に厚生労働省より公表された「医薬品開発と適正な情

報提供のための薬物相互作用ガイドライン（最終案）」の中で、医薬品開発化合物の CYP2B6 誘導評価が義務付けられている。従って、製薬企業が創薬の早期段階から CYP2B6 誘導ポテンシャルを確認する必要性はかなり高いと言え、誘導ポテンシャルが低いと予測される化合物をデザイン・合成することで、将来的な開発コストの縮小ならびに新薬創出の成功確度向上へ繋がると同時に、本来の目的である安全で使い易い薬剤を患者さんに届けることが可能となる。

創薬研究での酵素誘導リスク評価として、ヒト肝細胞または不死化細胞を用いた *in vitro* 試験が多く、製薬企業で導入されており、CYP2B6 誘導評価についても、近年、ヒト肝細胞より簡便な評価法である、CAR レポータージーンアッセイ、および CAR ツーハイブリッドアッセイ等の報告が、CAR 活性化化合物を見出す手法として増加している[7]。しかしながら、CAR 活性化評価を *in vitro* 試験で行う上で、実験コストおよびスループットの制限は避けられず、CYP2B6 誘導に繋がる CAR 活性化化合物の十分な構造活性相関情報を得るのは難しい状況にある。一方、コンピュータを用いた計算化学技術である *in silico* 手法は、これら制限を回避することが可能な魅力的なアプローチであり、ADME 分野においても幅広く活用されている[20-21]。CYP2B6 誘導評価に関して、これまでの *in silico* 手法を用いたヒト CAR 活性化評価の代表的報告を Table 2 に示す。

Table 2 CAR 活性化能の *in silico* 予測モデルの報告

Methods		Number of compounds		Accuracy	Ref.
		Training set	Test set		
Pharmacophore (2 ligands)	Unity	—	30	56.6%	22)
Pharmacophore (17 ligands)	Catalyst	—	—	36.8% (virtual screening)	23)
Bayesian	DS 3.0	26	—	ROC AUC=0.951	24)
QSAR	GRID/GLOPE (3D)	27 (congeneric)	—	R ² =0.95, q ² =0.73	25)

Küblbeck らは、ヒト CAR 活性化能を持つクロトリマゾールおよび TMPP のヒト CAR X 線結晶構造へのドッキングポーズをもとに、Unity を用いたファーマコフォアモデルを構築した。次に、テストセット 30 化合物を用いて検証したモデルの予測精度は 56.6% であった [22]。また Lnych らは、2196 個の FDA 承認薬について、ヒト CAR 蛋白への *in silico* ドッキングスタディおよび 17 化合物で構築したリガンドベースのファーマコフォアモデルを用いたバーチャルスクリーニングを実施し、得られた 19 化合物の活性評価を行うことで、新規に CAR 活性化能を持つ 7 化合物を見出した（ファーマコフォアモデルの予測精度：36.8%）[23]。同じく Lnych らは、26 個の CAR 活性化化合物および非活性化化合物を用いて、Bayesian による判別モデルを構築し、モデルの妥当性として ROC (receiver operator curve) の AUC が 0.95 であることを確認した[16]。一方、ヒト CAR 蛋白のフレキシビリティ、およびリガンドの構造多様性が原因で CAR の定量的構造活性相関 (Quantitative Structure Activity Relationship, QSAR) 研究には課題があると言われている[24]。実際、QSAR モデルに関しての報告は、Jyrkkärinne らによる 27 個の

類縁化合物を用いた GRID/GOLPE 手法によるモデル構築事例のみであった[25]. このように, CAR 活性化能の *in silico* モデルは複数報告されているにもかかわらず, テストセットを用いた検証が十分に行われていないモデル報告の事例が多く, また検証を実施されたモデルに関しても, その予測精度は 60%以下と創薬の実用レベルに達していないと判断された. 従って, ヒト CAR 活性化化合物を同定するための効果的な計算化学アプローチの報告は今日までほとんどない状況と考えられる.

ADME 予測の *in silico* 手法として, これまで知識ベースまたは二次元の化合物構造情報と実験値を用いた QSAR (2D-QSAR) の報告が多く存在している [26]. この理由として, 溶解度, 肝ミクロソームを用いた代謝安定性, Caco-2 膜透過性および CYP 阻害等, ADME 関連の *in vitro* 試験のハイスループット化が近年急速に拡大し, 各試験のデータ蓄積が進んだ点, また, 蓄積したビッグデータを解析するための機械学習をはじめとする *in silico* 解析手法, ならびに解析ツールの普及が考えられる. Rule of five に代表される drug-likeness および lead-likeness 等の知識ベースは, 主に化合物ライブラリー設計に用いられており, 2D-QSAR アプローチは創薬初期のリード化合物探索, および hit-to-lead プロセスにおいて利用価値が高い. しかしながら, これらの手法は化合物系統毎の大きな方向付け, あるいは化合物間の順位付けに適している反面, リード最適化で求められる化合物の細かい構造変換の予測に関して課題を残す. また, 化合物情報のみを使用して, ターゲットとなる蛋白情報を考慮していない問題も指摘されている[27]. 一方, 蛋白構造に基づいた, いわゆる structure-based *in silico* アプローチは, 上記手法を補完可能と考えられており, ドッキングスコア, ファーマコフォア, および 3D-QSAR が創薬で活用される代表的な手法として知られる. ADME 分野に限ると, 異物の解毒

代謝，および排泄という進化過程での役割上，ADME 関連蛋白の多くがブロードな化合物選択性を示し，かつ親和性は μM のレンジであるため，ごく限られた化合物を認識する薬効ターゲットと比較して基質認識性は非常に低い．そのため，ADME に関する structure-based *in silico* アプローチを行う上で，蛋白と化合物の正確な結合ポーズの取得がより一層重要であり，加えて QSAR またはリガンドベース手法との組み合わせが有効的であると推奨されている[28]．

以上の背景をもとに，本研究では，創薬プロセスで利用できる CYP2B6 誘導予測のための有効的な *in silico* 手法の確立を目的とした．手法として，CYP2B6 誘導に重要な役割を果たす CAR に対する structure-based アプローチを採用し，ヒト CAR 活性化能を指標とした三次元定量的構造活性相関（3D-QSAR）モデルの開発を行った．第一に，多様な化学構造を持つ 35 化合物のヒト CAR 活性化能を評価し，独自の化合物データセットを整備し，第二に，3D-QSAR モデル構築に必要なヒト CAR 蛋白への *in silico* ドッキングプロトコルの確立を行い，最後に，整備した化合物データベースおよび *in silico* ドッキングプロトコルを用いて，ヒト CAR 活性化能を精度高く予測する 3D-QSAR モデルを開発した．

第二章 方法

第一節 CAR 活性化データセットの整備

第一項 CAR 活性化評価の概要

創薬における CYP2B6 発現誘導の *in vitro* 評価として、ヒト初代肝細胞、および CAR 活性化化合物を見出すための、不死化細胞を用いた方法が知られている[29-31]. 最初に、評価手法を理解する上で必要な、CAR を介した CYP2B6 発現誘導機構について記述する. CAR 活性化能を持つ化合物は、医薬品、ステロイド、天然物、農薬、産業物質、および合成化合物等、幅広く存在している[32-35]. 生体内、またはヒト初代肝細胞において、CAR は通常細胞質に存在し、6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde O-(3,4-dichloro-benzyl)oxime (CITCO) のようなリガンド、または活性化剤の刺激の後に核内へ移行する. 核内移行後、CAR はレチノイド X 受容体 α (retinoid X receptor α , RXR α) とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子に結合する[7, 36]. CAR の結合配列として、CYP2B6 遺伝子のプロモーター領域には、phenobarbital-responsive enhancer module (PBREM)、および xenobiotic-responsive enhancer module (XREM) の二つが特定されている[37-38]. 従って、このような CAR 結合配列を含むベクターを不死化細胞に導入した、レポータージーンアッセイ系の評価が数多く試みられてきた. しかしながら、CYP2B6 発現誘導に関わる CAR 活性化能の評価には課題がある. その理由として、生体内またはヒト初代肝細胞とは異なり、HepG2 細胞のような不死化細胞で CAR は恒常的に活性化し、リガンドの刺激無しに通常存在する細胞質から核内へ移行するため、不死化細胞を用いた高感度な CAR 活性化評価の困難さが挙げられている[39]. その様な中、最近の Chen らの報告では、ヒト CAR リガンド結合部位近傍にアラニン

を一残基挿入した変異コンストラクト (hCAR1+A) を HepG2 細胞に導入することで、リガンドに依存した高感度のレポータージーンアッセイを可能とした[29]。その他、ヒト CAR にアラニン を 3 残基挿入した変異コンストラクトの導入[40]、また、ヒト CAR のインバースアゴニストまたはアンタゴニストを加えることで、基準活性を抑える試みが報告されている[41]。上記報告の中から、本研究では、hCAR1+A を用いたレポータージーンアッセイ系の手法を導入し、35 化合物の CAR 活性化データを取得した上で、独自のデータセットを構築した。

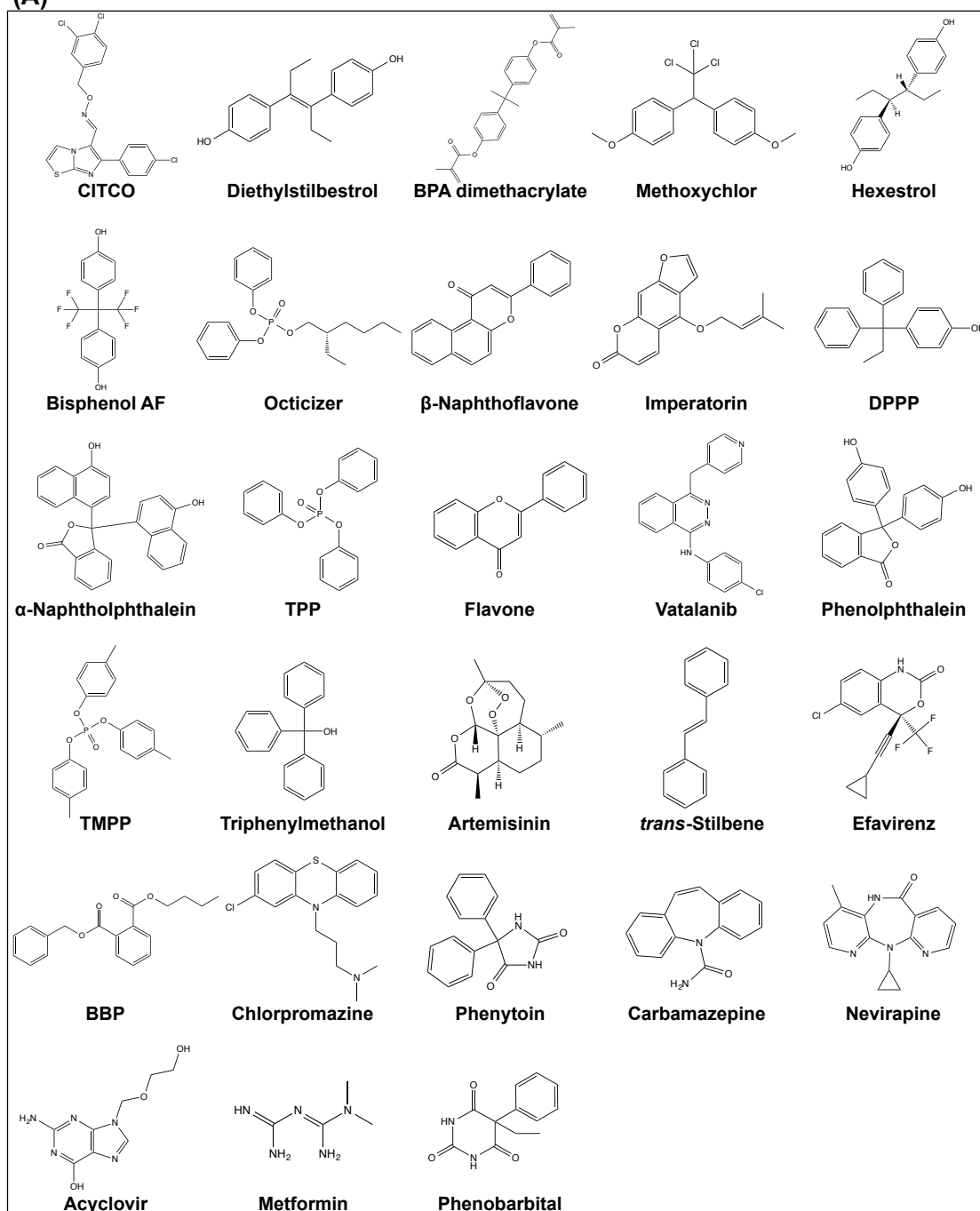
第二項 化合物

3D-QSAR モデル構築に使用する 35 化合物は、報告されている化合物のヒト CAR 活性化能の幅広さ、および構造の多様性を考慮して、文献[13, 19, 21, 22, 23, 26]より選択し、以下の通り入手した。また、化合物の二次元構造式を Fig. 2 に示した。

CITCO, bisphenol A (BPA), dimethacrylate, 4-(1,1-diphenylpropyl)phenol (DPPP), octicizer, β -naphthoflavone, artemisinin, efavirenz, chlorpromazine, phenytoin, carbamazepine および chlorothiazide は Sigma-Aldrich より購入した。Clotrimazole, diethylstilbestrol, *cis*-permethrin, imperatorin, flavone, *trans*-stilbene, diazepam, benzyl butyl phthalate (BBP), acyclovir および phenobarbita は和光純薬工業（株）より購入した。Methoxychlor, hexestrol, bisphenol AF, α -naphtholphthalein, 2-ethylanthraquinone, triphenyl phosphate (TPP), phenolphthalein, tri-*p*-cresyl phosphate (TMPP), triphenylmethanol, 4-isopropylaminodiphenylamine (4IPDPA) および nevirapine は東京化成工業（株）より購入した。Vatalanib は Shanghai Haoyuan

Chemexpress より購入した。 Butylated hydroxyanisole (BHA) は LKT Laboratories より購入した。 Metformin は MP Biomedicals より購入した。 Ethotoin は Toronto Research Chemicals より購入した。

(A)



(B)

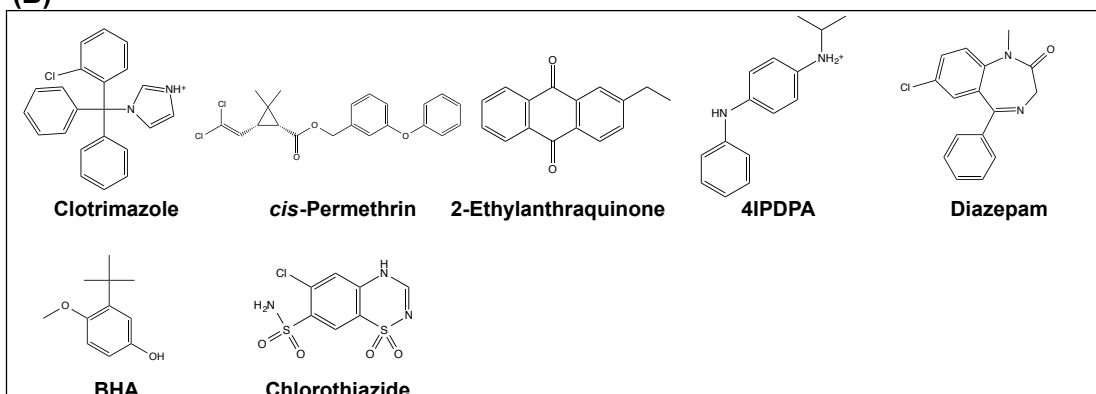


Fig. 2 CAR リガンドの化学構造

(A) 3D-QSAR モデルの構築に使用したトレーニングセット化合物

(B) 3D-QSAR モデルの検証に使用したテストセット化合物

第三項 ヒト CAR レポータージーンアッセイ

(ア) プラスミド作成

ルシフェラーゼ活性のノーマライズに使用する pGL4.10[luc2] レポーターベクター, および pGL4.74[hRluc/TK] Renilla reniformis ルシフェラーゼベクターからなる, pTARGET Mammalian Expression vector system はプロメガから購入した. pTARGET-hCAR1 発現ベクターは, 以下のプライマーを用いて作成した.

5'-GATCACGCGTGTTCATGGCCAGTAGGGAAGATGAG-3'

5'-GATCGTCGACTCAGCTGCAGATCTCCTGGAGCAG-3'

次に, ヒト CAR キメラコンストラクト (hCAR1+A) は, site-directed mutagenesis 法にて pTARGET-hCAR1 発現ベクターへアラニンを一残基挿入して (ヒト CAR の 270 お

および 271 残基の間) 作成した. 使用した変異導入 (下線部位) プライマーの配列を以下に示す.

5'-TCTCCTGCTGACCGACCTGGAGTTACC-3'

5'-TCGGTCAGCAGGAGAGAAGAGGGCCAT-3'

その後, 得られたクローンの配列はシーケンスにて確認した. また, CYP2B6 遺伝子 5' 上流に存在する近位 CAR 応答配列である PBREM (-1869/-1), および遠位 XREM (-8770/-8230) を含む pGL4.10-PBREM/XREM ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを作成した.

(イ) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

HepG2 細胞における全てのトランスフェクションは Invitrogen の Lipofectamine® LTX transfection reagent を用いる lipofection により実施した. 96 ウェルプレートに HepG2 細胞を播種し (3.5×10^4 / well), pGL4.10-PBREM/XREM レポーターベクター, pTARGET-hCAR1+A 発現ベクター, および pGL4.74[hRluc/TK] 内部標準ベクターの細胞へのトランスフェクトを実施した. 24 時間後, 培地を 6 濃度 (0.01 – 100 μ M) となるように化合物を加えた新しい培地に交換し, さらに 24 時間インキュベートした. 次に, PBS で細胞を 2 回洗い, Dual-Glo luciferase assay system (プロメガ) にてルシフェラーゼ活性を定量した. データはコントロールの 2 倍となるルシフェラーゼ活性を示す濃度を EC_{2-fold} として表した.

第四項 データセットの分割

3D-QSAR モデル構築に使用する 35 化合物から計算した, MACCS keys フィンガープリントに基づく構造情報, および第三項で測定したヒト CAR 活性化データの多様性が考慮されるように, Molecular Operating Environment software (Chemical Computing Group, Quebec) の Diverse Subset プログラムを使用して, 全化合物をモデル構築用のトレーニングセット, およびモデル検証用のテストセットに分割した. 一般的に QSAR モデルの予測適用範囲は, モデル構築に使用したトレーニングセットに依存することが知られている. 従って, 分割プログラムを実行する際, 使用する化合物の構造情報および活性情報を網羅可能な, 35 化合物の 80%に当たる 28 化合物をトレーニングセットに割り付け, 全体の 20%に当たる残りの 7 化合物をテストセットとした.

第二節 *In silico* ドッキングプロトコルの確立

第一項 *In silico* ドッキングプロトコルの概略

3D-QSAR は三次元空間上の化合物群の特徴、および生物学的活性の相関を解析する手法であり、記述子の元となる三次元空間上の化合物情報は、化合物配置に依存する。本研究で用いた 3D-QSAR の代表的手法である CoMFA (comparative molecular field analysis) について、Kim らが 364 個の CoMFA モデルのレビューを行った結果、化合物の活性コンフォメーションの選択、およびそれらの分子アライメントがモデル構築の重要な 2 つのステップであると報告している[42]。また、ヒト CAR 活性化能を予測する *in silico* 研究について、ヒト CAR の多様なリガンドに対する選択性の曖昧さ、および CAR 蛋白の柔軟性のために、QSAR モデル構築には課題があるとされている[7]。

以上の情報を基に、ヒト CAR 活性化化合物の 3D-QSAR モデル構築には、使用する化合物のヒト CAR への正確な結合ポーズを取得することが重要であると考えられた。従って、そのためのドッキングプロトコルの確立を目指し、具体的には、ドッキングに用いるヒト CAR 蛋白の柔軟性を考慮するため、ヒト CAR 蛋白の MD シミュレーションに基づく鍵穴構造サンプリングを行い、得られた複数の蛋白構造を用いたアンサンブルドッキングをドッキングプロトコル確立に採用した。

第二項 リガンド構造の準備

リガンドとなる化合物の二次元構造は LigPrep プログラム (Schrödinger Suite 2014;

Schrödinger Inc.) を使用し, OPLS2005 力場を用いたエネルギー極小化の三次元構造へ変換した. また化合物のイオン化状態は ADMET PredictorTM Version 7.2 (Simulations Plus Inc.) を用いて決定した. 最後に, ConfGen プログラム (Schrödinger Suite 2014; Schrödinger Inc.) を使用し, 化合物のコンフォメーションサーチを実施した.

第三項 CAR 蛋白構造の準備

ヒト CAR の X 線結晶構造は Protein Data Bank (PDB) より入手した (PDB ID: 1XVP). また, 1XVP の B 鎖および D 鎖について, 全て結晶水を除いた上で用いた. 本研究で使
用した CAR 蛋白リガンド結合部位のアミノ酸残基番号は 103 から 348 であり, CAR 活性化能の *in vitro* 評価に使用したキメラコンストラクト (hCAR1+A) に合わせるため, 残基番号 270 および 271 の間にアラニンを一残基挿入した構造を, Prime プログラム (Schrödinger Suite 2014; Schrödinger Inc.) を使用して作成した. 最後に, 作成した hCAR1+A の構造について, OPLS 2005 力場を用いたエネルギー極小化を行った.

第四項 分子動力学 (Molecular dynamics, MD) シミュレーション

水中におけるヒト CAR 蛋白の活性コンフォメーションをサンプリングするために, 前項で準備した hCAR1+A 蛋白構造 (1XVP) を用いた MD シミュレーションを行った. シミュレーションの系は, 水分子モデルとして TIP3P モデルを用いた露な溶媒下において, Na⁺イオンによる系の中和を行い, OPLS 2005 力場を用いて構築した. 用意した系に Desmond プログラム (Schrödinger Suite 2014; Schrödinger Inc.) の初期設定の平衡プロ

トコルを適用した．周期境界条件および非結合相互作用のカットオフ値 9\AA は，許容誤差 10^{-9} の Particle mesh Ewald 法を用いた静電相互作用の下で使用された．Desmond 緩和における初期平衡プロトコルの後，系に対し 20 nsec (nano seconds) のシミュレーションを，NPT 条件下で 310.15 K の Nos'e-Hoover thermostat [relaxation time = 1.0 psec (pico seconds)], および 1.01325 bar pressure の Martyna-Tobias-Klein barostat (relaxation time = 2.0 psec) を使用して実施した．原子座標のトラジェクトリデータは 240 psec 毎に記録した．リガンド結合空間 (共結晶リガンドの 4\AA 以内) のアミノ酸に対して MD トラジェクトリの 15 から 20 nsec の間の構造を Conformer Cluster プログラム (Schrödinger Suite 2014; Schrödinger Inc.) を用いてクラスタリングした．最後に，クラスタリング後の樹形図を使用し代表構造を選択した．

第五項 コンピュータリガンドドッキング

化合物のドッキングは，選択した 10 個の hCAR1+A 蛋白構造に対して Glide プログラム (Schrödinger Suite 2014; Schrödinger Inc.) の standard precision (SP) モードを用いて実施した (アンサンブルドッキング)．ドッキングパラメータとして，蛋白の van der Waals (vdW) 半径スケールを 1.0，リガンドの 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\AA のアミノ酸に重心を置いた $10*10*10\text{\AA}^3$ とした．

第六項 ポーズ決定

ポーズ決定手順を Fig. 3 に示した．

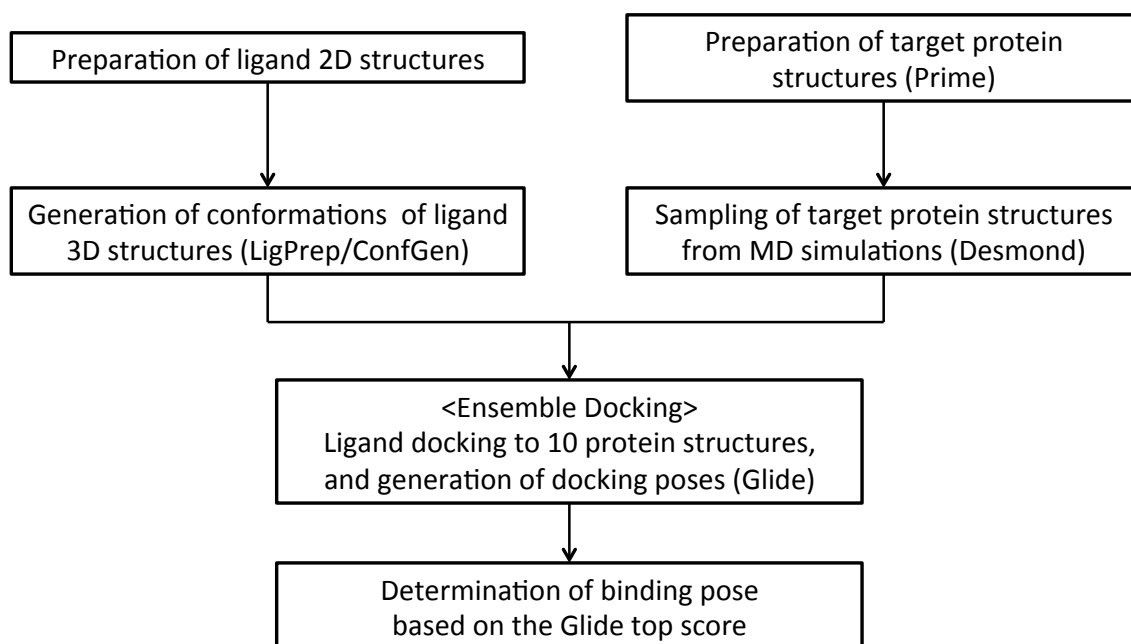


Fig. 3 ドッキングポーズ決定の概略手順

各々のリガンドについて数多くの結合ポーズが生成され、それらの中に真の結合ポーズが含まれていると考え選択した。具体的には、ドッキング計算結果から、各リガンドの真の結合ポーズを同定するため、Glide スコアのトップを最終的な結合ポーズとした。このポーズ決定手順の妥当性を検証するため、ヒト CAR X 線結晶構造の二つの結合したリガンド[CITCO および 5 β -pregnane-3,20-dione (PDB: 1XV9)]について、各々の X 線における結合ポーズを本ドッキングプロトコルで決定した結合ポーズと比較することで、再現性を検証した。

第三節 Structure-based 3D-QSAR モデルの構築

第一項 Structure-based 3D-QSAR モデルの概略

3D-QSAR モデル構築のために、本研究で用いた CoMFA 法について、その解析手順を簡潔に記述する。最初に、第二節で確立したドッキングプロトコルに従って得た化合物群の分子アライメントを、2Å 間隔の格子付き三次元空間上に置き、各格子点には、プローブ原子として、+1 に荷電した SP³ 炭素原子を配置した。次に、各格子点において、アライメントされた各化合物とプローブ原子との立体相互作用（立体場）、および静電相互作用（静電場）のエネルギーを計算し、最後に、全分子について計算された格子点毎のエネルギーと、生物学的活性値を用いて部分最小二乗法（PLS）解析を行った。

CoMFA 手法の中で、分子アライメントの作成時に蛋白構造とのドッキング情報を利用する場合、特に structure-based CoMFA 法と呼ばれている。Structure-based 手法は、ligand-based 手法よりもトレーニングセットへの依存度が低く、より構造的に多様な化合物への適用の可能性が高いと言われている[43]。また、structure-based CoMFA は、リガンド情報のみで分子アライメントを作成した ligand-based CoMFA と比較して、統計結果が良好という複数の報告がある [44-45]。従って、本研究においても structure-based CoMFA 法を採用し、モデル構築を行った。

第二項 CoMFA モデルの構築

最初に、第一節にて準備した 35 化合物について、structure-based 3D-QSAR モデル構

築で重要となる分子アライメントを作成した。詳細に記述すると、第二節で構築したドッキングプロトコルに従い、35 化合物の結合ポーズを得た後、化合物周辺 4Å の hCAR1+A 蛋白のアミノ酸を用いて、化合物および蛋白複合体を重ね合わせ、蛋白構造を取り除くことで取得した。CoMFA モデルは SYBYL 10.2 program package (Tripos Inc.) の QSAR モジュールにより、トレーニングセット 28 化合物を用いて構築した。その際、全て標準的な初期パラメータを用いた。標準 CoMFA モデル構築の PLS 解析は、生物活性（ヒト CAR 活性化能）と CoMFA 立体場および静電場に対して実施した。

次に、標準の CoMFA パラメータである立体場および静電場に、脂溶性パラメータである $\log D_{7.4}$ の計算値 $S+\log D_{7.4}$ を追加した、改良 CoMFA モデルを構築した。QSAR モデル構築は標準 CoMFA モデル同様に PLS 解析によって実施した。尚、脂溶性パラメータである $S+\log D_{7.4}$ は ADMET PredictorTM (Version 7.2) により算出した。構築した二つの CoMFA モデルについて、トレーニングセットを用いた leave-one-out 法によるクロスバリデーション、およびテストセット 7 化合物を用いた外部検証をそれぞれ実施した。

第三章 結果

第一節 CAR 活性化データセットの整備

第一項 ヒト CAR レポータージーンアッセイ

ヒト CAR 活性化能の指標として hCAR1+A レポータージーンアッセイによって得られたルシフェラーゼ活性は、 $EC_{2\text{-fold}}$ の逆数の対数値である $pEC_{2\text{-fold}}$ として表し、Table 3 および Fig. 4 に示した。レポータージーンアッセイにて最も強力なヒト CAR 活性化能を示した化合物は CITCO であり、 $pEC_{2\text{-fold}}$ は 7.73 ($EC_{2\text{-fold}} = 0.02 \mu\text{M}$) であった。他の強力な活性剤として、 $pEC_{2\text{-fold}}$ が 6 より大きい化合物 ($EC_{2\text{-fold}} < 1 \mu\text{M}$) は, diethylstilbestrol, BPA, dimethacrylate, methoxychlor, clotrimazole, *cis*-permethrin, hexestrol, bisphenol AF, octicizer, β -naphthoflavone, imperatorin, DPPP, α -naphtholphthalein, 2-ethylanthraquinone, TPP, flavone, および vatalanib であり、中程度の活性化能として、 $pEC_{2\text{-fold}}$ が 5 から 6 を示す化合物 ($1 \mu\text{M} \leq EC_{2\text{-fold}} < 10 \mu\text{M}$) は, phenolphthalein, TMPP, artemisinin, triphenylmethanol, 4IPDPA, *trans*-stilbene, efavirenz, diazepam, BBP, chlorpromazine, および BHA であった。そして、 $pEC_{2\text{-fold}}$ が 4 から 5 を示す化合物 ($10 \mu\text{M} \leq EC_{2\text{-fold}} < 100 \mu\text{M}$) は, phenytoin, carbamazepine および nevirapine であり、活性化能の非常に弱い $pEC_{2\text{-fold}}$ が 4 以下の化合物 ($100 \mu\text{M} \leq EC_{2\text{-fold}}$) は, acyclovir, chlorothiazide, metformin, および phenobarbital であった。尚、 $EC_{2\text{-fold}}$ が $100 \mu\text{M}$ 以上の化合物は、 $pEC_{2\text{-fold}} = 4$ としてその後の計算に用いた。

Table 3 実験的 pEC_{2-fold} 値および改良 CoMFA モデルを用いた予測 pEC_{2-fold} 値

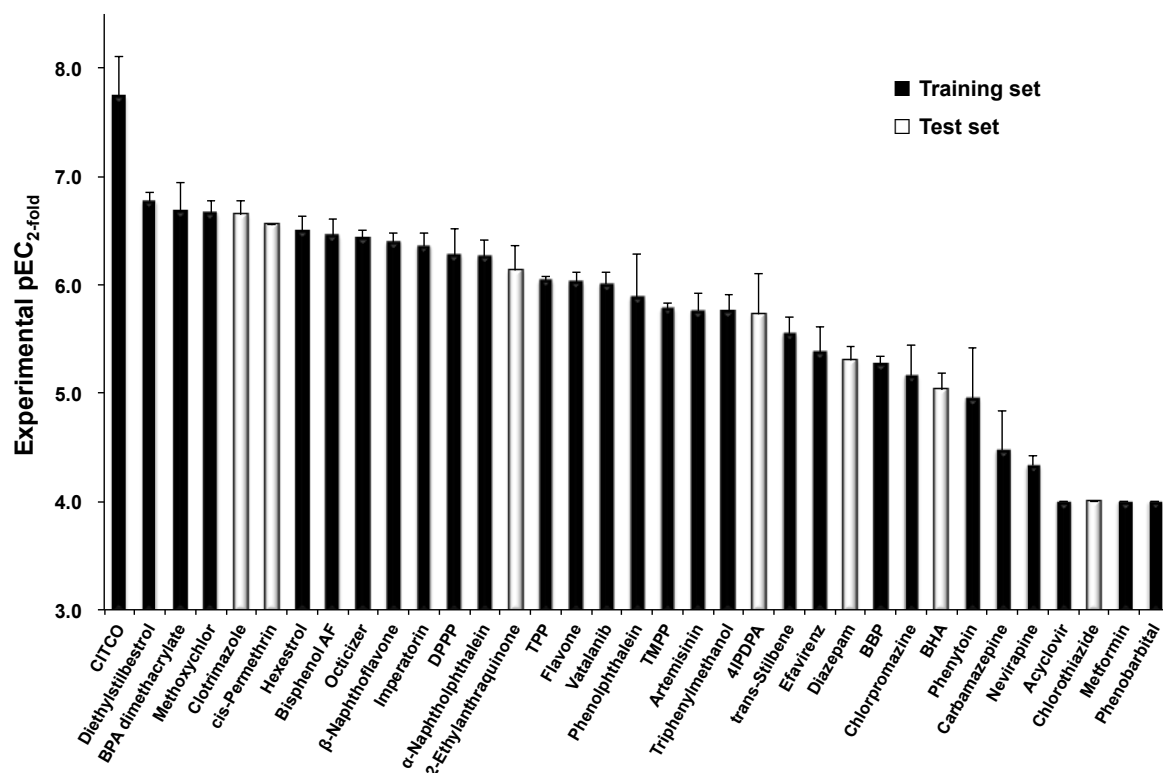
(A) Training set

No.	Compound	Experimental pEC _{2-fold} ^a	Predicted pEC _{2-fold}	Residues	<i>S</i> +log <i>D</i> _{7.4}
1	CITCO	7.73 ± 0.38	7.80	−0.07	6.16
2	Diethylstilbestrol	6.77 ± 0.08	6.81	−0.04	4.82
3	BPA dimethacrylate	6.67 ± 0.27	6.63	0.04	5.71
4	Methoxychlor	6.66 ± 0.12	6.59	0.07	5.52
5	Hexestrol	6.50 ± 0.14	6.49	0.01	4.49
6	Bisphenol AF	6.45 ± 0.15	6.46	−0.01	4.54
7	Octicizer	6.43 ± 0.08	6.32	0.11	5.49
8	β-Naphthoflavone	6.39 ± 0.09	6.32	0.07	4.92
9	Imperatorin	6.35 ± 0.12	6.41	−0.06	3.46
10	DPPP	6.27 ± 0.25	6.11	0.16	5.38
11	α-Naphtholphthalein	6.26 ± 0.15	6.26	0.00	6.01
12	TPP	6.04 ± 0.04	5.91	0.13	4.24
13	Flavone	6.02 ± 0.09	5.80	0.22	3.54
14	Vatalanib	6.01 ± 0.11	6.19	−0.18	3.98
15	Phenolphthalein	5.88 ± 0.40	5.80	0.08	3.95
16	TMPP	5.77 ± 0.06	5.83	−0.06	5.53
17	Artemisinin	5.76 ± 0.16	5.91	−0.15	2.42
18	Triphenylmethanol	5.76 ± 0.16	5.81	−0.05	3.67
19	<i>trans</i> -Stilbene	5.55 ± 0.15	5.77	−0.22	4.82
20	Efavirenz	5.38 ± 0.24	5.33	0.05	4.19
21	BBP	5.27 ± 0.07	5.36	−0.09	4.69
22	Chlorpromazine	5.16 ± 0.28	5.18	−0.02	3.83
23	Phenytoin	4.95 ± 0.46	4.86	0.09	1.99
24	Carbamazepine	4.47 ± 0.36	4.49	−0.02	2.40
25	Nevirapine	4.33 ± 0.10	4.39	−0.06	1.53
26	Acyclovir	4.00	3.98	0.02	−0.66
27	Metformin	4.00	3.94	0.06	−2.27
28	Phenobarbital	4.00	4.09	−0.09	1.41

(B) Test set

No.	Compound	Experimental pEC _{2-fold} ^a	Predicted pEC _{2-fold}	Residues	<i>S</i> +log <i>D</i> _{7.4}
1	Clotrimazole	6.64 ± 0.13	6.06	0.58	5.09
2	<i>cis</i> -Permethrin	6.56 ± 0.01	7.45	−0.89	6.97
3	2-Ethylantraquinone	6.13 ± 0.23	5.55	0.58	3.86
4	4IPDPA	5.73 ± 0.37	6.49	−0.76	4.07
5	Diazepam	5.30 ± 0.13	5.74	−0.44	2.80
6	BHA	5.03 ± 0.15	5.20	−0.17	3.25
7	Chlorothiazide	4.00	3.88	0.12	−0.79

^a Data represent mean ± S.D (N = 3).



Data represent mean + S.D (N = 3).

Fig. 4 35 化合物のヒト CAR 活性化能データ

第二項 データセットの分割

ヒト CAR 活性化データを取得した 35 化合物について、MACCS keys フィンガープリントに基づく構造情報, およびヒト CAR 活性化データの多様性を考慮して, 全体の 80% をモデル構築用のトレーニングセットおよび 20% をモデル検証用のテストセットに分割した. Fig. 5 に構造情報から階層型クラスタリング実施後の樹形図を示した. その結果, トレーニングセットおよびテストセットの化合物は, 生成した 11 クラスターから幅広く選択されていることを確認した.

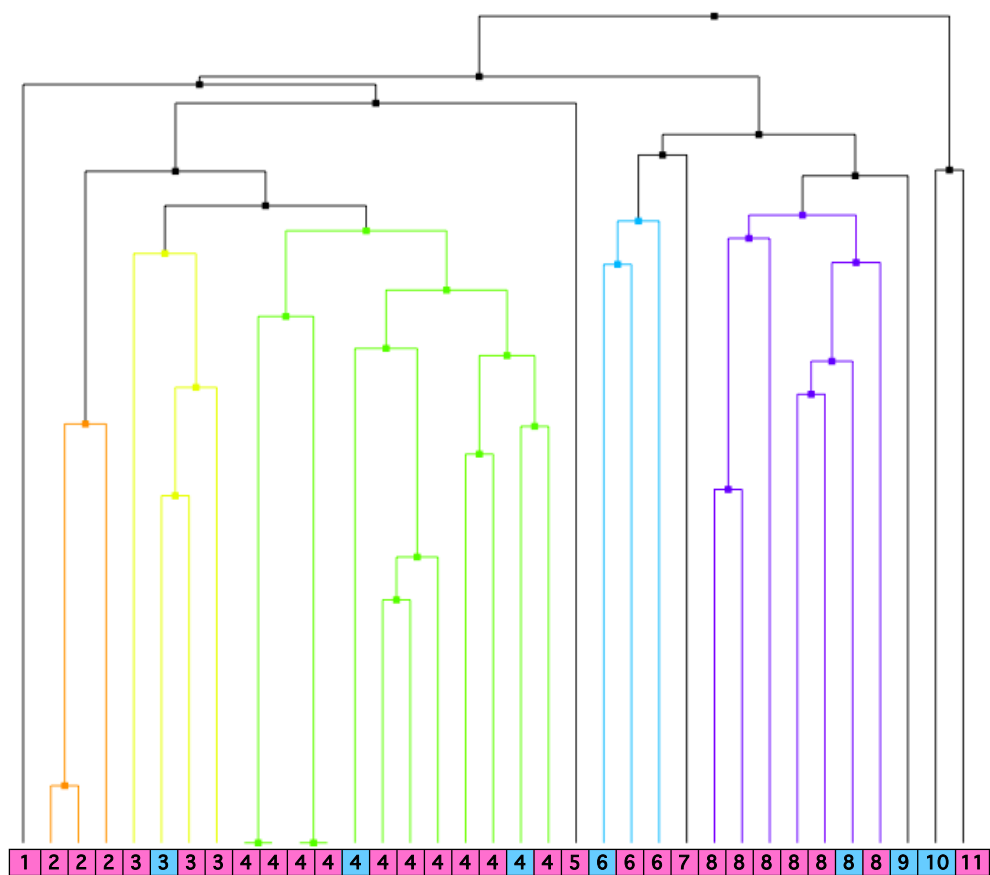


Fig. 5 35化合物を用いた階層型クラスタリング樹形図
 クラスターの色：トレーニングセット（桃），テストセット（青）

第二節 *In silico* ドッキングプロトコルの確立

第一項 鍵穴構造サンプリング

MD シミュレーションにおいて、初期の二つの蛋白構造 (hCAR1+A; 1XVP の B 鎖および D 鎖にアラニンを一残基挿入, Fig. 6) からの重原子のトラジェクトリを確認した結果, 15 から 20 nsec の間で両蛋白ともに構造的揺らぎが平衡に達していることが観察された (Fig. 7A, B).



Fig. 6 1XVP の B 鎖 (緑) および D 鎖 (青) にアラニンを一残基挿入したヒト CAR1+A 構造

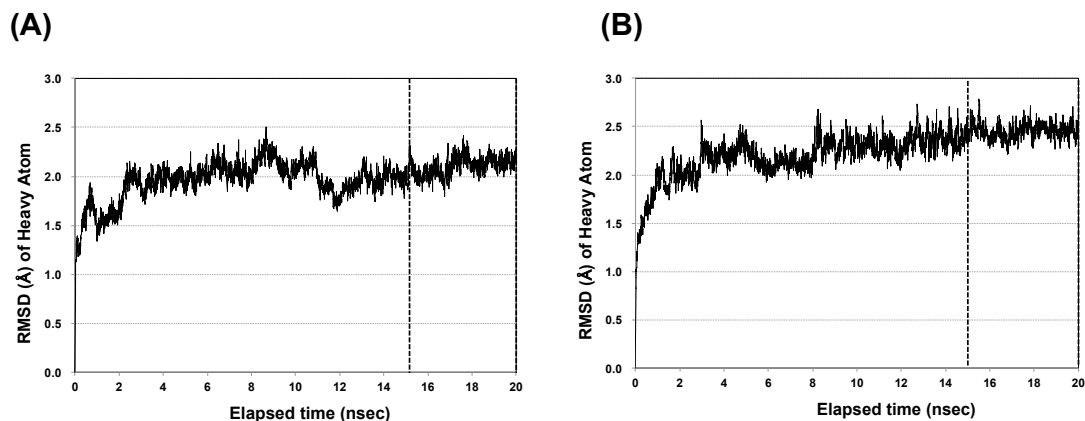


Fig. 7 MD シミュレーションにおける初期構造からの重原子の RMSD 変化
 (A) 初期構造：1XVP の B 鎖にアラニンを一残基挿入したヒト CAR1+A 構造
 (B) 初期構造：1XVP の D 鎖にアラニンを一残基挿入したヒト CAR1+A 構造

次に、リガンド結合部位のアミノ酸について、15 から 20 nsec の間の MD シミュレーションにおけるトラジェクトリから得られた構造をクラスタリングし、階層型クラスタリング樹形図の Merge Distance = 0.9 の条件にて全クラスターの中から代表 10 構造 (A ~J) を選択した (Fig. 8).

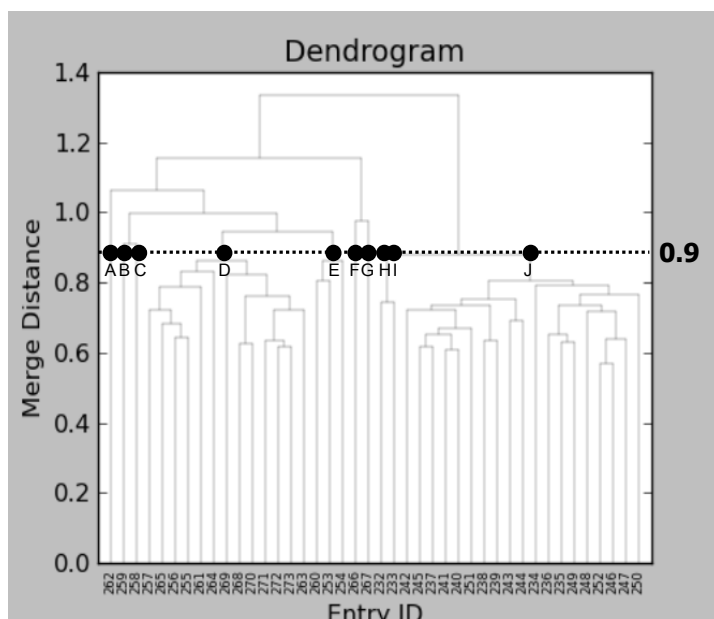


Fig. 8 階層型クラスタリングの樹形図

MD シミュレーションから選択した 10 構造のトラジェクトリの緩和時間は、1XVP の B 鎖に対して、15.12, 16.32, 16.56, 17.28, 18.24, 18.48, および 19.92 nsec, また、D 鎖に対して 15.12, 15.36, および 19.92 nsec であった。選択した 10 構造のヒト CAR リガンド結合空間の表面形状を Fig. 9 に示した。これら形状から、ヒト CAR のリガンド結合空間は多様な構造的コンフォメーションを示すことが確認された。

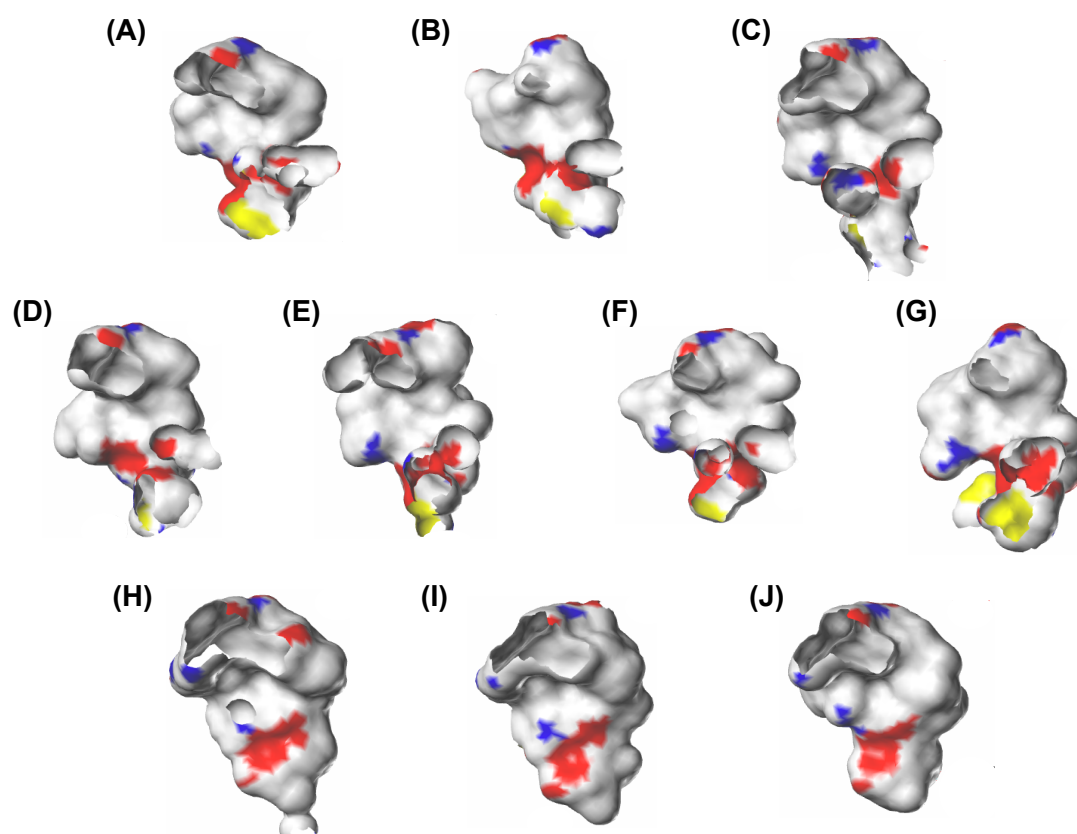


Fig. 9 MD シミュレーション代表構造の CAR リガンド結合空間の表面
CAR リガンド結合空間表面の色：炭素（灰）、窒素（青）、酸素（赤）、スルホン（黄）
MD シミュレーション経過時間を以下に示す。

- 初期構造として 1XVP の B 鎖を使用：15.12 (A), 16.32 (B), 16.56 (C), 17.28 (D), 18.24 (E), 18.48 (F), および 19.92 (G) nsec
- 初期構造として 1XVP の D 鎖を使用：15.12 (H), 15.36 (I), および 19.92 (J) nsec

第二項 ドッキングプロトコルの確立

ドッキングプロトコルの妥当性検証のため、X 線結晶構造のある二つのリガンド CITCO (1XVP) および 5 β -pregnane-3,20-dione (1XV9) について、ヒト CAR 蛋白への結合ポーズをドッキングプロトコルに従い決定した。まず、CITCO および 5 β -pregnane-3,20-dione のドッキングプロトコルから得た結合ポーズと、X 線結晶構造における両リガンドの結合ポーズの比較を行った (Fig. 10)。その結果、CITCO および 5 β -pregnane-3,20-dione の両結合ポーズ間における RMSD は、それぞれ 1.34 および 0.20 Å といずれも 2 Å 以内であり、良好な重なりを示した。また、ドッキングにより観察されたりガンドとヒト CAR 蛋白アミノ酸との相互作用も、X 線結晶と同様であった。

以上より、本ドッキングプロトコルにより X 線結晶構造の結合ポーズを再現できることが明らかとなった。

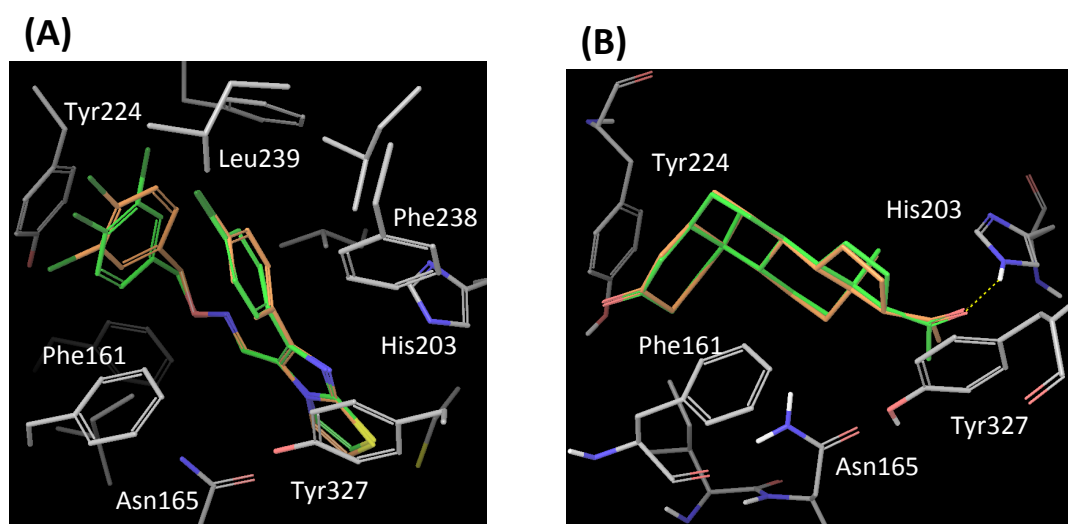


Fig. 10 CITCO (A) および 5 β -pregnane-3, 20-dione (B) の結合ポーズ
ドッキングプロトコルにより決定した構造 (橙), X 線結晶構造 (緑)

また、CITCO および 5 β -pregnane-3,20-dione の結合ポーズ確認に使用した、鍵穴構造 I および J と X 線結晶構造 (1XVP にアラニンを一残基挿入) のリガンド結合部位周辺のアミノ酸の重なりを比較した。その結果、全体的に重なりのずれは小さかったが、X 線結晶構造と比較して、鍵穴構造 I または J の Asn165, Phe234, および Tyr327 等、一部アミノ酸側鎖のずれが観察された (Fig. 11)。

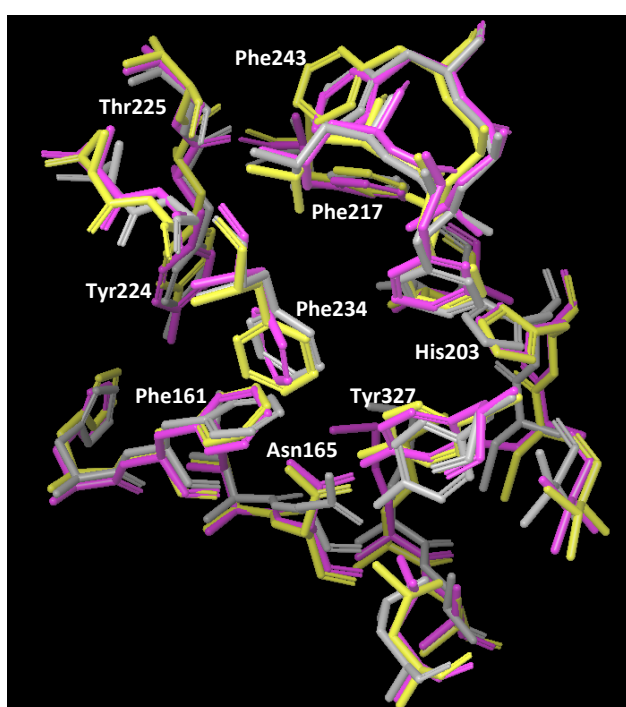


Fig. 11 鍵穴構造 I, J および X 線結晶構造 (1XVP; hCAR1+A) のリガンド結合部位周辺アミノ酸

鍵穴構造 I (黄), J (桃), X 線結晶構造 (灰)

第三節 Structure-based 3D-QSAR モデルの構築

第一項 CoMFA モデルの構築

前節で確立した *in silico* ドッキングプロトコルに従い, hCAR1+A の 10 個の鍵穴構造に対する 35 化合物のアンサンブルドッキングを行い, Glide スコアを算出した (Table 4).

Table 4 35 化合物の hCAR1+A 10 構造に対する Glide ドッキングスコア

Structures ^a	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Elapsed time (ns)	15.12	16.32	16.56	17.28	18.24	18.48	19.92	15.12	15.36	19.92
CITCO	-8.57	N.C. ^b	N.C.	N.C.	-7.38	-7.94	N.C.	-10.45	<u>-11.11</u> ^c	-10.51
Diethylstilbestrol	-8.88	-8.14	-5.73	-6.58	<u>-9.54</u>	-8.01	-6.19	-7.34	-8.42	-8.02
BPA dimethacrylate	-7.08	-7.27	N.C.	N.C.	N.C.	-8.13	N.C.	-9.27	<u>-9.98</u>	-8.32
Methoxychlor	-7.51	-6.81	-6.08	-6.97	-7.97	<u>-9.13</u>	N.C.	-7.76	-8.41	-8.16
Clotrimazole	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	-7.54	<u>-9.89</u>	-9.16
cis-Permethrin	-9.20	-8.61	-6.80	-5.64	-9.22	-9.20	N.C.	-8.95	<u>-9.61</u>	-9.34
Hexestrol	<u>-9.21</u>	-8.97	-7.66	-7.10	-8.36	-8.78	-6.43	-8.97	-8.95	-8.59
Bisphenol AF	-8.19	-7.89	N.C.	N.C.	-7.42	-8.45	N.C.	<u>-9.72</u>	-9.24	-9.10
Octicizer	-8.18	-7.81	-7.40	-7.58	-8.52	-8.62	-6.90	-9.03	<u>-9.20</u>	-9.03
β-Naphthoflavone	-8.35	-8.26	-7.58	-8.44	<u>-8.98</u>	-7.14	N.C.	-8.73	-8.97	-8.42
Imperatorin	-7.98	-6.98	-7.28	-8.35	-8.26	<u>-8.61</u>	-7.37	-8.29	-8.10	-8.10
DPPP	-6.33	-6.99	N.C.	N.C.	-6.72	-8.96	N.C.	-9.06	<u>-9.17</u>	-9.03
α-Naphtholphthalein	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	-9.38	-10.58	<u>-11.17</u>
2-Ethylanthraquinone	-8.71	-8.26	-8.25	-8.21	-8.65	<u>-9.15</u>	-7.38	-8.36	-8.32	-8.57
TPP	-8.38	-7.60	-7.55	-7.76	-8.78	-8.85	-6.41	-8.80	<u>-9.25</u>	-8.82
Flavone	-8.02	-8.04	-7.52	-7.15	<u>-8.34</u>	-8.09	-8.02	-7.73	-7.99	-7.83
Vatalanib	-8.39	-7.67	-6.96	-7.52	-7.34	-7.99	N.C.	-8.82	<u>-9.60</u>	-9.05
Phenolphthalein	-8.00	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	-8.12	N.C.	-8.40	-9.12	<u>-9.15</u>
TMPP	-7.16	-6.87	-6.49	-7.23	-6.86	-8.16	N.C.	-8.51	<u>-9.20</u>	-8.81
Artemisinin	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	-6.98	<u>-8.06</u>	N.C.	-5.99	-7.93	-7.55
Triphenylmethanol	-7.08	N.C.	-6.44	-6.59	-7.95	-8.42	N.C.	-8.34	-8.77	<u>-8.79</u>

4IPDPA	-7.80	-7.88	-8.03	-8.00	-7.81	<u>-8.56</u>	-6.68	-7.74	-7.94	-7.65
<i>trans</i> -Stilbene	-6.95	-5.98	-6.09	-6.24	<u>-7.23</u>	-7.10	-6.44	-6.59	-6.73	-6.77
Efavirenz	-6.95	-5.98	-6.09	-6.24	<u>-7.23</u>	-7.10	-6.44	-6.59	-6.73	-6.77
Diazepam	-7.97	-5.90	N.C.	-7.38	-8.09	<u>-9.07</u>	N.C.	-8.27	-7.41	-8.07
BBP	-8.93	-8.50	-8.38	-7.42	-8.92	-8.57	-7.13	-8.56	-8.81	<u>-8.94</u>
Chlorpromazine	-9.00	-8.01	-9.30	-8.89	-8.82	-8.86	-7.23	<u>-9.64</u>	-9.58	-8.96
BHA	-7.10	-7.36	-6.70	<u>-7.89</u>	-7.25	-7.25	-6.70	-7.26	-7.66	-7.30
Phenytoin	-7.13	-7.14	N.C.	-7.49	-8.14	-7.38	N.C.	-8.24	<u>-8.40</u>	-8.18
Carbamazepine	-8.74	-8.33	-6.83	N.C.	-8.73	-9.03	N.C.	-9.20	<u>-9.78</u>	-9.58
Nevirapine	-7.21	-6.07	N.C.	-6.19	-7.15	-8.35	N.C.	-8.25	-8.38	<u>-8.57</u>
Acyclovir	<u>-6.80</u>	-5.96	-6.01	-6.73	-6.73	-6.71	-6.76	-6.67	-6.46	-5.97
Metformin	-6.78	-7.17	-6.39	-7.46	-7.07	<u>-8.15</u>	-6.36	-6.52	-6.59	-6.80
Phenobarbital	-3.27	-3.33	-3.15	<u>-4.04</u>	-2.73	-3.44	-3.42	-3.20	-3.61	-2.95
Chlorothiazide	-7.64	-7.09	-5.78	<u>-8.48</u>	-7.48	-7.06	N.C.	-7.48	-7.35	-7.41

^a Structures of A, B, C, D, E, F, G and H, I, J are obtained from 1XVP chain B and chain D, respectively.

^b Not calculated

^c Underscored values represent Glide top score of each compound.

Glide トップスコアに基づく各化合物のコンフォメーションを決定後, CoMFA モデル構築のための分子アライメントを得た (Fig. 12).

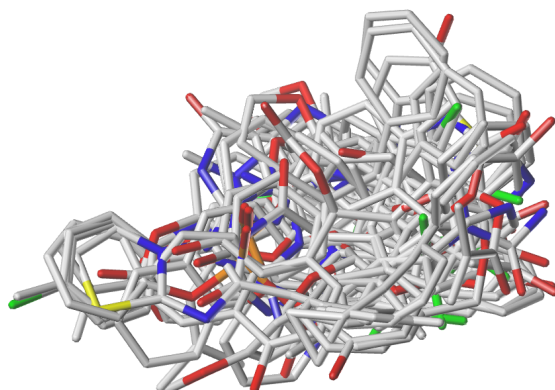


Fig. 12 ドッキングプロトコルから得られた分子アライメント

次に、トレーニングセット化合物の分子アライメントを用いて計算した CoMFA 立体場および静電場と CAR 活性化データより、PLS 解析にて二種類の CoMFA モデルを構築した。第一のモデルは CoMFA 標準の立体場および静電場のみを使用し、標準 CoMFA モデルと名付けた。また、第二のモデルは CoMFA 立体場および静電場以外に $\log D_{7.4}$ の計算値 ($S+\log D_{7.4}$) を使用し、改良 CoMFA モデルと名付けた。二つの CoMFA モデルの統計パラメータを Table 5 に示した。

Table 5 CoMFA モデルの統計結果

	Standard CoMFA model	Modified CoMFA model
1) CoMFA fields	1) Steric, electrostatic	1) Steric, electrostatic
2) Descriptors	2) N/A ⁱ	2) $S+\log D_{7.4}$
Statistics		
r^2 ^a	0.99	0.99
q^2 ^b	0.48	0.74
No. of components	5	5
S_{press} ^c	0.11	0.11
F ^d	414	380
r^2_{pred} ^e	0.50	0.71
Contribution		
ST ^f	0.55	0.35
El ^g	0.45	0.43
$S+\log D_{7.4}$ ^h		0.22

^a Conventional correlation coefficient.

^b Leave-one-out cross-validated correlation coefficient.

^c Standard deviation for the sum of square-predicted errors.

^d F value.

^e Predicted correlation coefficient for the test set.

^f The contribution value of steric field.

^g The contribution value of electrostatic field.

^h The contribution value of calculated $\log D_{7.4}$.

ⁱ Not applicable

標準 CoMFA および改良 CoMFA モデルのトレーニングセットの相関係数 r^2 はいずれのモデルにおいても 0.99 以上と非常に良好であった。一方、トレーニングセットによるクロスバリデーションの r^2 (q^2) は、最適な 5 成分で、標準 CoMFA および改良 CoMFA モデルについて、それぞれ 0.48 および 0.74 であり、また、テストセットを用いた相関係数 r^2_{pred} は、それぞれ 0.50 および 0.71 であった。このように、改良 CoMFA モデルの q^2 および r^2_{pred} 値は標準 CoMFA より高かったことから、標準 CoMFA モデルに脂溶性パラメータを追加することは、モデルの予測精度改善に効果的であることが明らかとなった (Table 5)。次に、改良 CoMFA モデルの予測 $\text{pEC}_{2\text{-fold}}$ 値を Table 3 に示し、実験値と予測値のプロットを Fig. 13 に示した。

以上の結果、改良 CoMFA モデルにおいて、 $\text{pEC}_{2\text{-fold}}$ の予測値は実測値と良い相関を示すと結論付けられた。

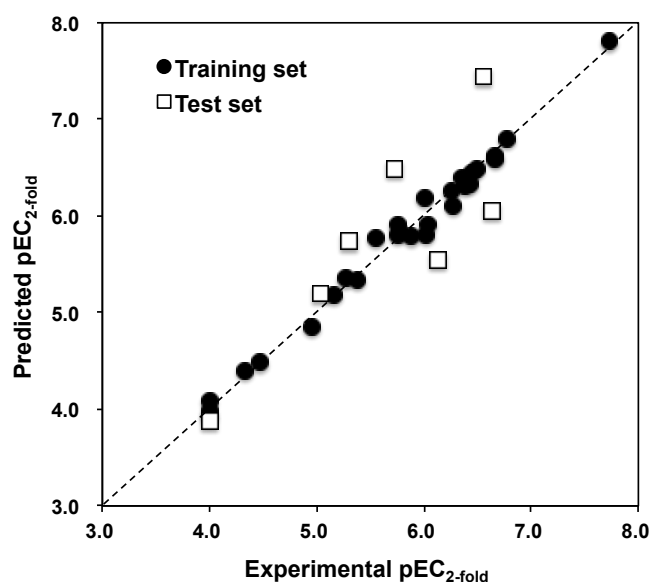


Fig. 13 実験的 $\text{pEC}_{2\text{-fold}}$ 値と改良 CoMFA モデルにおける予測 $\text{pEC}_{2\text{-fold}}$ 値の相関プロット

第二項 CoMFA 等高線図

改良 CoMFA モデルの等高線図を Fig. 14A-D に示した。詳細には、CoMFA 等高線ならびに CAR リガンド結合部位の代表的アミノ酸を Fig. 14A および B に示し、リガンド結合空間の蛋白の表面領域を Fig. 14C および D に示した。CoMFA 立体場である緑色および黄色の等高線は、それぞれリガンド構造が近くに配置することが CAR 活性化に好ましい領域、および構造配置が好ましくない領域を表している (Fig. 14A, C)。また、CoMFA 静電場である赤色および青色の等高線は、それぞれリガンドの負電荷を持つ構造配置が CAR 活性化に好ましい領域、および正電荷を持つ構造配置が好ましい領域を表している (Fig. 14B, D)。本研究で得られた CoMFA 等高線図において、リガンドの構造配置が好ましい立体場の領域 (緑色) はリガンド結合空間の比較的疎水性の表面領域に観察された (Fig. 14C)。また、リガンドの負電荷を持つ構造配置が好ましい領域 (赤色) は、近くに正の電荷をもつアミノ酸の部分構造が、また正電荷を持つ構造配置が好ましい領域 (青色) は、近くに負の電荷をもつアミノ酸の部分構造が観察された (Fig. 14B)。

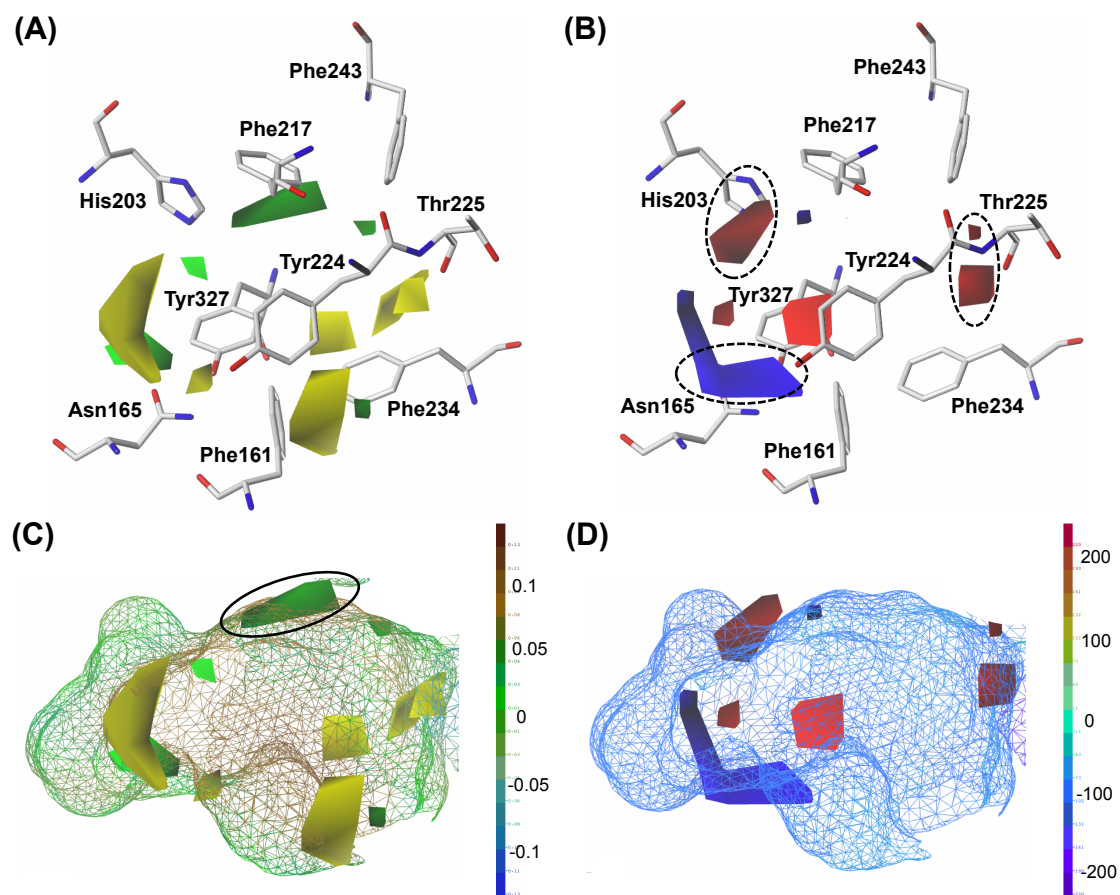


Fig. 14 改良 CoMFA の等高線図

(A) CoMFA 等高線の立体場と周辺のアミノ酸

(B) CoMFA 等高線の静電場と周辺のアミノ酸

(C) CoMFA 等高線の立体場とリガンド結合部位周辺の脂溶性キャビティー

(D) CoMFA 等高線の静電場とリガンド結合部位周辺の静電キャビティー

一例として、 α -naphtholphthalein ($pEC_{2\text{-fold}} = 6.26$) の結合ポーズと CoMFA 等高線を

Fig. 15 に示した。 α -Naphtholphthalein とヒト CAR 蛋白の相互作用が確認されたアミノ

酸の中で、立体場の緑色領域付近にて、Phe217 との間の π - π 相互作用を、また、静電

場の赤色領域付近にて、His203 との間の水素結合が観察された。

以上の結果，本研究で構築したモデルの CoMFA 等高線図は，ヒト CAR 蛋白のリガ
ンド結合領域の環境をよく反映していると考えられた．

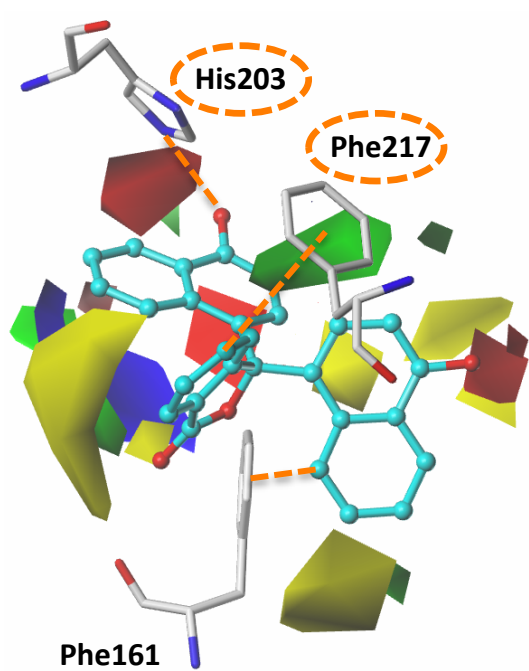


Fig. 15 α -Naphtholphthalein のドッキングポーズと CoMFA 等高線図

第三項 リガンドとヒト CAR 蛋白の相互作用が観察されるアミノ酸情報

モデル構築に使用した分子アライメントのリガンド結合ポーズの中から, CITCO, α -naphtholphthalein, diethylstilbestrol, および TPP の 4 化合物について, これら化合物とヒト CAR 蛋白 (hCAR1+A) の間の相互作用が観察されたアミノ酸を Fig. 16 に示した. CITCO および 5 β -pregnane-3,20-dione の X 線結晶構造の情報から, 疎水性相互作用, および His160, His203 との水素結合が重要であると報告されている[46]. しかしながら, それ以外, リガンド結合に関与するヒト CAR の重要なアミノ酸残基はほとんど知られていない.

本研究結果から, これら 4 つのリガンドと hCAR1+A のアミノ酸残基との相互作用を示すと, Phe161, His203, Phe217, Tyr224, Phe234, Phe243, および Tyr327 と間で π - π 相互作用が観察された. また, 水素結合については, 既に報告のある His203 に加えて, Asn165, および Thr225 との間で新たに観察された.

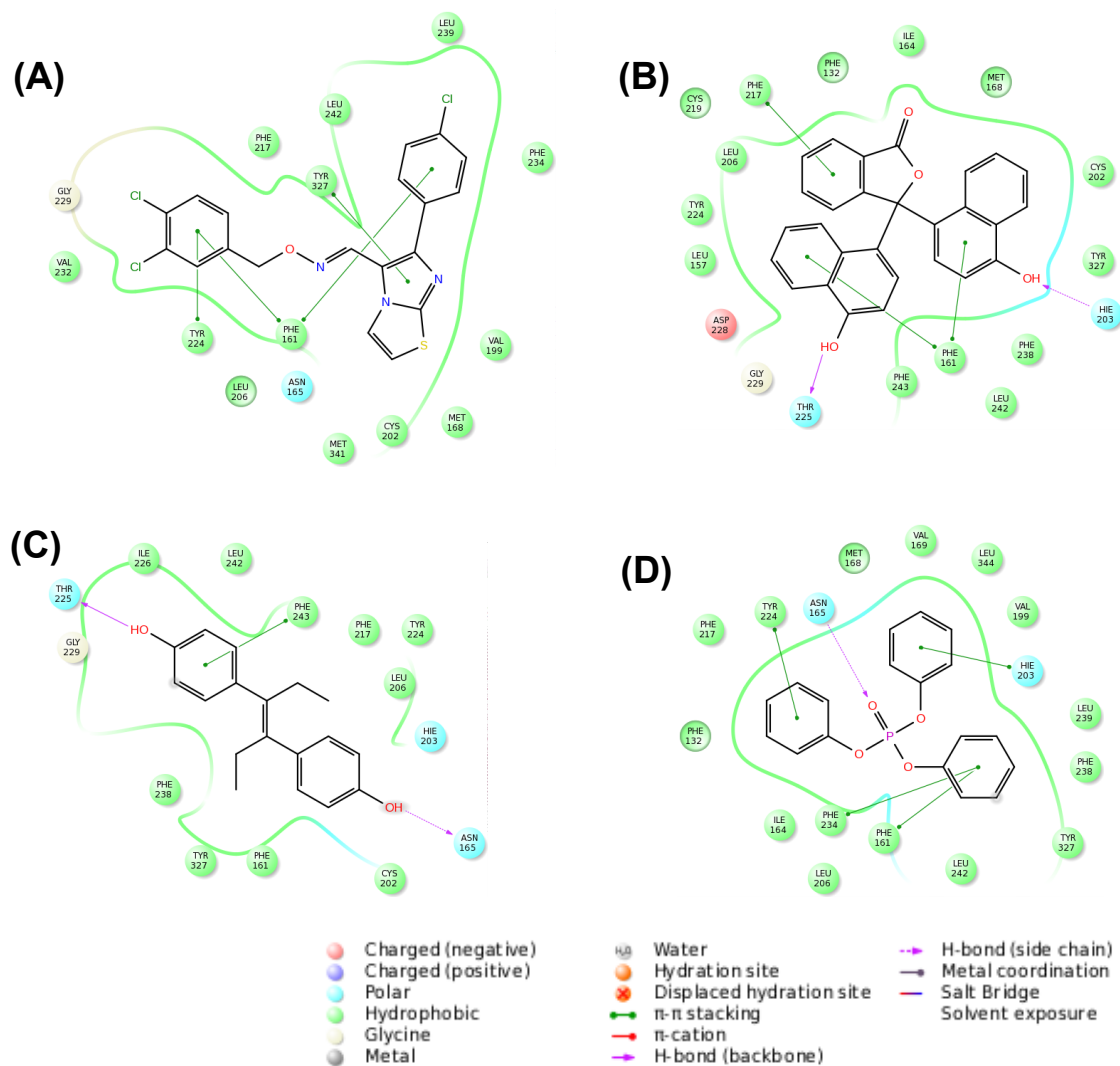


Fig. 16 CAR リガンドとリガンド結合部位周辺アミノ酸間の相互作用

- (A) CITCO
- (B) α -naphtholphthalein
- (C) diethylstilbestrol
- (D) TPP

第四章 考察

第一節 3D-QSAR モデルの予測性能に関する考察

本研究では、CoMFA 手法を使用し、化合物のヒト CAR 活性化能を評価するための 3D-QSAR モデルを構築した。Table 5 に示す通り、構築した改良 CoMFA モデルの統計値は優れた値であり、予測と実測の $\text{pEC}_{2\text{-fold}}$ 値の間には高い相関が確認された。一般的に、QSAR モデルは以下の条件「トレーニングセットの相関係数 r^2 が 0.6 より大きく、かつクロスバリデーションの q^2 が 0.5 より大きい」を満たす場合、予測性があると考えられている[47]。また、他の報告では、 q^2 およびテストセットを用いた r^2_{pred} の両方について 0.6 が妥当な閾値であると推奨している[48]。これらのクライテリアに従うと、本研究にて構築した改良 CoMFA モデル ($r^2 = 0.99$, $q^2 = 0.74$, $r^2_{\text{pred}} = 0.71$) は高い予測性能を有していると考えられた。

本研究にて構築した改良 CoMFA モデルに関し、ヒト CAR 活性化能の高い予測性能を得られた理由として、以下の三点が考えられる。

- (1) 質の高いヒト CAR 活性化データセットの構築
- (2) 化合物の正確な結合ポーズを取得可能なドッキングプロトコルの確立
- (3) 脂溶性パラメータの追加効果

最初に、「(1) 質の高いヒト CAR 活性化データセットの構築」について述べる。大部分の核内受容体とは異なり、CAR は不死化細胞において化合物の刺激無しに恒常的に活性化しているため、化合物添加に対するレスポンスが低く、簡便かつ高感度な CAR 活性化の検出が困難とされていた[39]。そうした中、ヒト CAR1 のスプライシングバリエントであり、同じく肝臓に多く存在する CAR3 ベースの変異コンストラクト

(hCAR1+A) が、ヒト CAR の化合物反応性のサロゲートとして確立された[29]. そこで、本研究にて、hCAR1+A を用いた高感度のレポータージーン評価系を導入し、試験に供した. 次に、医薬品、ステロイド、天然物、可塑剤、産業物質および合成化合物を含む幅広い CAR 活性化剤の報告の中から、化学構造の多様性を考慮して 35 化合物を選抜し、hCAR1+A レポータージーン評価を行った結果、活性のダイナミックレンジは、 pEC_{2-fold} が 7.73 ($EC_{2-fold} = 0.02 \mu M$) から 4.00 ($100 \mu M$) と広いものであった. ヒト CAR の *in silico* 研究の大部分は、ヒト CAR 活性化能を単一濃度 ($10 \mu M$) における溶媒コントロールに対する倍率で表しているため、本研究と比較してその活性のダイナミックレンジは狭い[23, 25, 49]. また、QSAR モデル構築のために、同一のアッセイプロトコルから得られるデータを使うことは特に重要であり、かつ活性は 2 から 3 オーダーの幅を示すのが望ましいと言われている[42]. 従って、本研究で整備したヒト CAR 活性化化合物データセットは、医薬品を含む 35 個の構造的に多様な化合物を用いた、同一プロトコルとしては最大級の CAR 活性化ダイナミックレンジを持っており、このような質の高いデータセットを使用することが、優れた予測性の要因の一つと考えられた.

次に、「(2) 化合物の正確な結合ポーズを取得可能なドッキングプロトコルの確立」について述べる. ヒト CAR 活性化能を予測する QSAR モデル構築において、ヒト CAR の多様なリガンドに対する選択性の曖昧さ、および蛋白の柔軟性が課題であり [7, 50], 一方、structure-based 3D-QSAR アプローチの性能は、ターゲット蛋白構造の質に強く依存するといわれている[51-52]. 従って、ヒト CAR 蛋白の柔軟性を考慮し、蛋白の活性コンフォメーションを得る鍵穴構造サンプリングを目的として、水中における MD シミュレーションを実施した. MD シミュレーション後のトラジェクトリ解析から 10 個の

ヒト CAR 蛋白構造を選択し、それら 10 構造を用いたアンサンブルドッキングにより、CITCO および 5 β -pregnane-3,20-dione の X 線結晶構造を再現する結合ポーズを得るためのドッキングプロトコルを確立した。興味深いことに、確立したドッキングプロトコルに従い、35 化合物のドッキングを実施した結果、Glide トップスコアを示す化合物の結合ポーズに使用されたヒト CAR 蛋白構造（鍵穴構造）は、10 個中 7 個にわたることが明らかとなった（Table 4, 6）。従って、ヒト CAR 蛋白に対し、多様な構造からなる化合物群の正確な結合ポーズを評価するには、本研究にて実施した、ヒト CAR 蛋白構造の柔軟性を考慮し、多数の鍵穴構造を用いたアンサンブルドッキングが有用であると考えられた。また、Table 6 に、10 個の鍵穴構造に対して Glide トップスコアを示した 35 化合物の数の内訳、ヒト CAR 活性化能の平均値、および化合物との間で相互作用の観察されたアミノ酸を示した。

Table 6 Glide トップスコア化合物と相互作用する hCAR1+A 10 構造のアミノ酸

Struct-ures ^a	Elapsed time (ns)	Number of ligands (Glide top score)	pEC _{2-fold} (mean)	Amino acids interacted with ligands (Glide top score)
A	15.12	2	5.25	His203, Tyr224, Thr225
B	16.32	0	N.C. ^b	
C	16.56	0	N.C.	
D	17.28	3	4.34	
E	18.24	5	6.02	Asn165, His203, Phe217, Tyr224, Thr225, Phe243
F	18.48	7	5.70	His203, Phe217, Tyr224, Phe243
G	19.92	0	N.C.	
H	15.12	2	5.97	Phe161, Asn165, Tyr224
I	15.36	11	6.14	Phe161, Asn165, His203, Phe217, Tyr224, Thr225, Phe243, Tyr327
J	19.92	5	5.50	Phe161, His203, Phe217, Thr225, Phe234

^a Structures of A, B, C, D, E, F, G and H, I, J are obtained from 1XVP chain B and D, respectively. ^b Not calculated

この中で、ヒト CAR 活性化能の平均値の最も高い鍵穴構造 I, および最も低い鍵穴構造 D について、リガンド結合部位のアミノ酸の重ね合わせを実施した。その結果、35 化合物との間で相互作用が観察された、9 つのアミノ酸 (Phe161, Asn165, His203, Phe217, Tyr224, Thr225, Phe234, Phe243, および Tyr327) の複数で構造のずれが確認された (Fig. 17)。

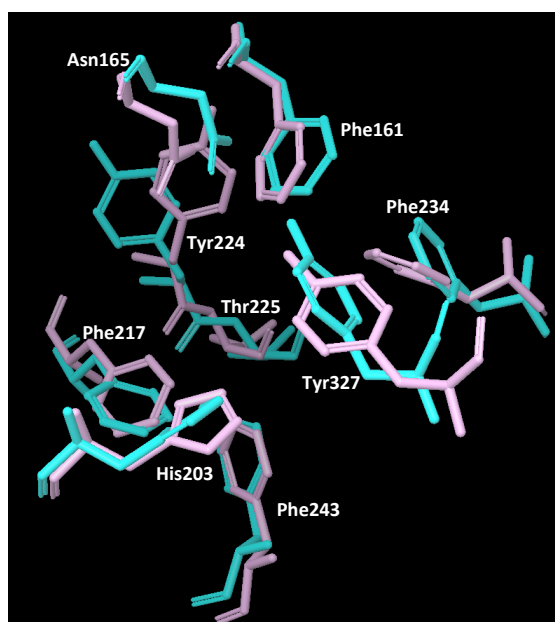


Fig. 17 Glide トップスコア化合物と相互作用する鍵穴構造の 9 個のアミノ酸
アミノ酸の色：鍵穴構造 D (桃), 鍵穴構造 I (水色)

これまでの報告によると, Phe161, Asn165, Phe234 および Tyr326 (本研究では Tyr327) は、ヒト CAR 蛋白のコアクティベーター結合に大事な役割を担っているヘリックス 12 を安定化されるための、重要なアミノ酸残基と言われている[7]。また、Tyr326 は、CAR にアゴニストが結合した際、ヘリックス 12 と相互作用して、その動きを制限すること

でコアクティベーターをリクルートしているという考察もある[53]. さらに, His203 は X 線結晶構造にて, リガンド (5 β -pregnane-3,20-dione) との水素結合が観察されたアミノ酸残基である[46]. 従って, 本研究においても, 鍵穴構造 D と I 間で構造のずれの見られた Asn165, His203 および Tyr327 は, ヒト CAR 活性化の差異を説明する上で重要であると考えられた. 一方, 特に構造のずれの大きかった Tyr224 は, 多くの CAR 活性化化合物との間で相互作用が観察されたアミノ酸残基である. 現状, CAR 活性化と Tyr224 の関連について, ヒト CAR 蛋白リガンド結合部位の疎水性ポケットの一部を Tyr224 が構成するという報告がある程度で[46], その寄与は明確でない. しかしながら, ヒト CAR の核内移行シグナルである, NLS2 (nuclear localization signal 2) には Tyr224 が含まれているため[54], リガンドとの直接的な相互作用以外に, Tyr224 が CAR 活性化ならびに核内移行へ関与している可能性もあり, 更なる検証が必要と考えられる.

次に, 「(3) 脂溶性パラメータの追加効果」について述べる. 標準 CoMFA モデルと比較し, 脂溶性パラメータである $S+\log D_{7.4}$ を追加することで, 改良 CoMFA モデルにおける q^2 の明らかな改善が見られた. 本研究において, $S+\log D_{7.4}$ を標準 CoMFA に追加した理由は二つ挙げられる. 第一に, 類縁の核内受容体 PXR と同様, ヒト CAR のリガンド結合部位周辺は, 極性および電荷を持つアミノ酸残基よりも疎水性アミノ酸残基が多いため, 疎水性環境であると報告されている[40]. 実際, CITCO の X 線結晶構造情報から, CITCO の *para*-cholrophenyl 部位および dichlorophenyl のオキシムリンカー領域が, ヒト CAR リガンド結合部位の二つの離れた疎水性ポケット内に位置していることがわかっている[40]. 従って, 脂溶性パラメータである $S+\log D_{7.4}$ を, 立体場および静電場を使用する標準 CoMFA モデルに追加することは, 疎水性相互作用情報を補う面から

非常に重要であると考えられる。第二に、本研究における化合物のヒト CAR 活性化能の *in vitro* 評価は, HepG2 細胞を用いて実施されており, 細胞質画分に存在するヒト CAR 蛋白へ化合物が結合するためには, 化合物は細胞膜を透過して細胞質に入る必要がある。複数の報告から [55-56], Caco-2 細胞膜の透過性は $\log D_{7.4}$ と正の相関があるとされているため, ヒト CAR 活性化能評価において脂溶性は重要なパラメータと考えられる。以上, 二つの理由を考慮すると, 標準 CoMFA モデルに $S+\log D_{7.4}$ を追加することは, ヒト CAR リガンド結合部位におけるリガンドとの疎水性相互作用の影響面, および細胞膜透過性の影響面において, ヒト CAR 活性化能の予測性向上に寄与したと考えられた。

一方, これまでヒト CAR 活性化能を評価する 3D-QSAR モデルとして, GRID/GOLPE 手法を用いた報告 (Jyrkkärinne モデル) がある[25]。しかしながら, Jyrkkärinne モデルは単一のヒト CAR X 線結晶構造を用いて構築されているため, ヒト CAR 蛋白の柔軟性の情報を十分に利用できていない。加えて, モデルに使用しているトレーニングセット化合物は, *N*-置換のスルホンアミドおよびウレア誘導体でほぼ構成されているため, 構造的多様性に乏しいと考えられる。実際, 本研究で使用した 35 化合物, および Jyrkkärinne モデルにて使用された 27 化合物の構造多様性を比較するために, 両モデルの合計 62 化合物について, フィンガープリントの構造情報に基づく階層型クラスタリングを実施した。その結果, 本研究で使用した 35 化合物は, 得られた 10 クラスター全てに分布した。

一方, Jyrkkärinne モデルの 27 化合物はクラスター2 および 3 のわずか 2 クラスへの分布にとどまり, 本研究のモデル構築に使用した 35 化合物と比較して, その構造多様性は小さかった (Fig. 18)。

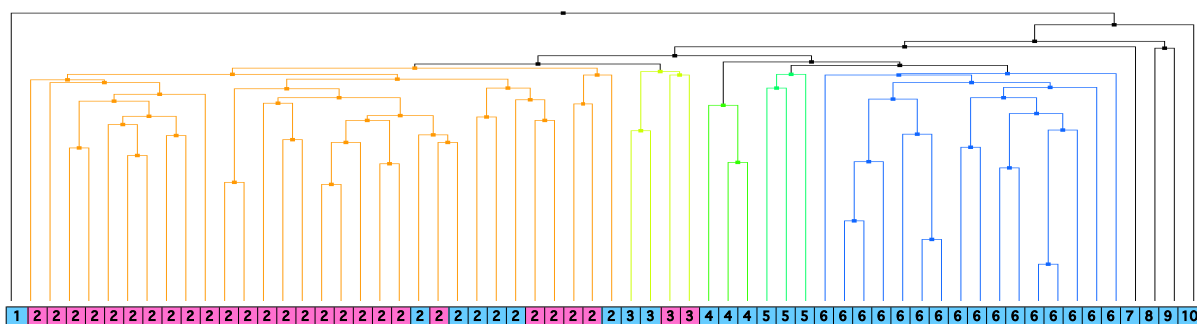


Fig. 18 階層型クラスタリングの樹形図

クラスター番号の色：本研究の使用化合物（青），Jyrkkärinne モデルの使用化合物（桃）

加えて，Jyrkkärinne モデルでは，テストセット化合物を用いたモデルの検証が実施されていなかった．従って，本研究は，多数の鍵穴蛋白構造を用いたアンサンブルドッキングにより，ヒト CAR 活性化に対し多様な構造を持つテストセット化合物の検証を実施した最初の 3D-QSAR モデルの報告と考えられた．実際，本研究における改良 CoMFA モデルの統計値 ($r^2 = 0.99$, $q^2 = 0.74$) は，Jyrkkärinne モデルの統計値 ($r^2 = 0.95$, $q^2 = 0.73$) よりも優れていた．さらに，本モデルでは，Jyrkkärinne モデルでは未実施である，テストセットを用いた良好な検証結果 ($r^2_{\text{pred}} = 0.71$) も確認している．

第二節 3D-QSAR モデルを用いたヒダントイン誘導体のヒト CAR 活性化能の比較

改良 CoMFA モデルを創薬段階で使用する際、例えばヒト CAR 活性化能を有する化合物と、その化合物の活性化能を減弱させるために一部分を変換したデザイン化合物、つまり二次元構造は類似な化合物間の CAR 活性化能を、改良 CoMFA モデルは区別できる必要がある。そこで、本節ではヒダントイン誘導体のヒト CAR 活性化能について検証した。使用するヒダントイン誘導体として、モデル構築時に使用したフェニトインに加え、新規検証化合物としてエトトインを用いた。両化合物とも、癲癇の予防および治療のために広く使用されている抗けいれん薬である[57-58]。フェニトインは、ヒト CAR 活性化能の $pEC_{2\text{-fold}}$ 予測値および実測値がそれぞれ 4.86 および 4.95 と相関する、中程度のヒト CAR 活性化化合物である。加えて、ヒト肝細胞を用いた CYP2B6 誘導能に関する報告[57]、ならびに抗腫瘍薬であるシクロフォスファミドおよびイフォスファミド等との臨床薬物相互作用の報告が存在する[17-18, 59]、CYP2B6 誘導の陽性化合物である。一方、(R)-エトトインおよび(S)-エトトインのヒト CAR 活性化能の $pEC_{2\text{-fold}}$ 予測値は、それぞれ 4.30 および 4.28 と低いものであり、続いてエトトイン（ラセミ体）の実測値を測定した結果、予測値をよく反映する非常に弱いヒト CAR 活性化能 ($EC_{2\text{-fold}} > 100 \mu\text{M}$) を示した。また、これまでにエトトインのヒト肝細胞を用いた CYP2B6 誘導能、および臨床薬物相互作用に関する情報は存在せず、エトトインは CYP2B6 誘導の陰性化合物と考えられた。従って、フェニトインおよびエトトインは類縁の誘導体であるにも関わらず、異なるヒト CAR 活性能および CYP2B6 誘導能を示すことが明らかとなった。そこで、両化合物の CoMFA モデルの等高線、およびヒト CAR 蛋白との結合ポ

ーズについて観察した (Fig. 19).

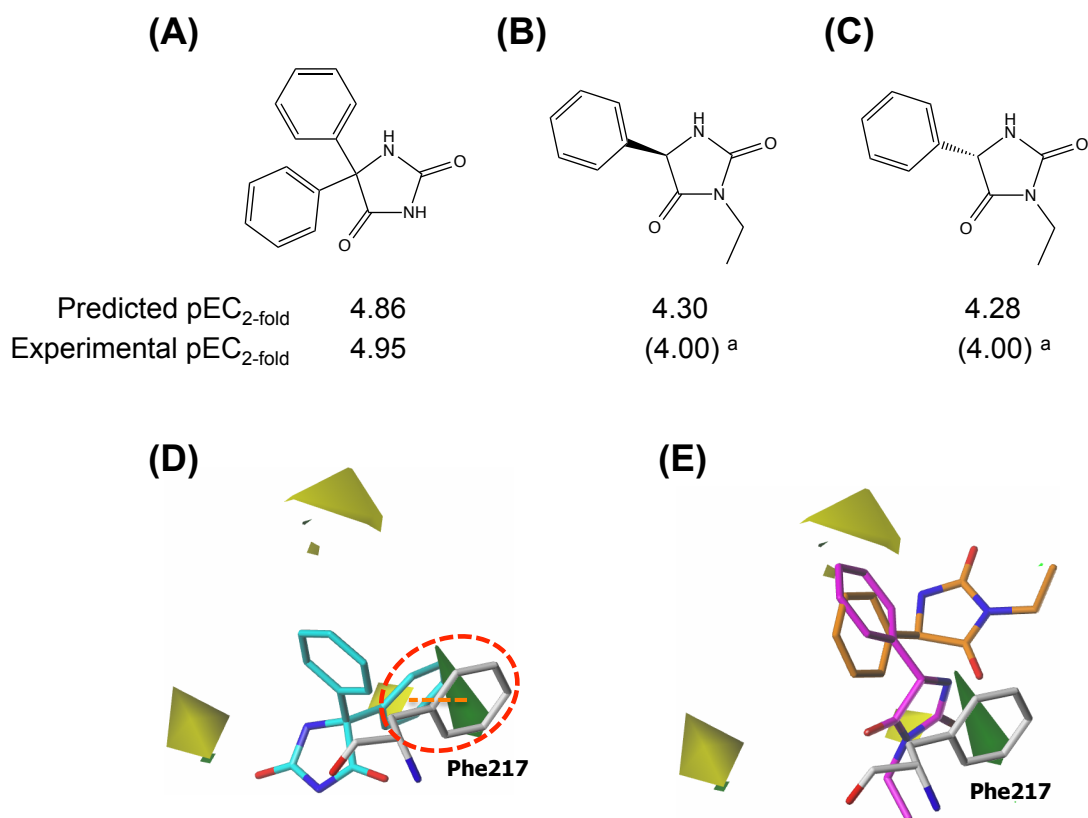


Fig. 19 ヒダントイン誘導のドッキングポーズと CoMFA 等高線図

- (A) フェニトイン
- (B) (R)-エトトイン
- (C) (S)-エトトイン
- (D) CoMFA 等高線の立体場におけるフェニトインのドッキングポーズ
- (E) CoMFA 等高線の立体場における(R)および(S)-エトトインのドッキングポーズ

^a 括弧内の値はラセミ体エトトインの pEC_{2-fold} を表示

その結果、フェニトインはリガンド配置が好ましい立体場の領域（緑）に芳香環が位置しており、同時にその芳香環と Phe217 の π - π 相互作用が観察された (Fig. 19D)。一

方, (R)および(S)-エトトインでは, 同じ領域に芳香環は位置しないため, 同様の相互作用は観察されなかった (Fig. 19E). また, 物性面において, フェニトインおよびエトトインの $S+\log D_{7.4}$ はそれぞれ 1.99 および 1.09 であることから, ヒト CAR リガンド結合部位の疎水性環境を考慮すると, フェニトインの持つエトトインより高い脂溶性が, CAR との相互作用に有利であると考えられた.

以上, 本研究の改良 CoMFA モデルは, CoMFA 等高線, ヒト CAR との結合ポーズ, および脂溶性面の考察から, ヒダントイン誘導体をはじめとする類縁化合物のヒト CAR 活性化能の違いを説明可能であると考えられた.

第三節 本研究における 3D-QSAR モデルの課題

本研究にて構築した 3D-QSAR モデルは、ヒト CAR 活性化能を精度高く予測可能なモデルである。しかしながら、本モデルでは、典型的なヒト CAR 活性化能を持つ CYP2B6 誘導剤の一つであるフェノバルビタールについて、活性化能無しと予測しており、既知の情報と乖離する結果となっている。フェノバルビタールはヒト CAR に直接結合せず CAR を活性化する、いわゆる“indirect CAR activator（間接的活性化剤）”であることが知られている[60-61]。また、そのメカニズムとして、フェノバルビタールによる epidermal growth factor receptor (EGFR) シグナル経路を介した CAR の Thr38 脱リン酸化が、CAR の核内移行に重要であると報告されている[61]。そのため、乖離の直接的原因として、本研究で使用した活性データである hCAR1+A レポータージーンアッセイ評価条件において、間接的活性化剤であるフェノバルビタールのヒト CAR 活性化能が観察されない点が挙げられる。この点に関し、レポータージーンアッセイに用いたヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞は、薬物代謝活性およびトランスポーター輸送活性が極めて低いことが報告されており[62]、ヒト初代肝細胞と比べ細胞の機能低下が示唆されている。従って、フェノバルビタールが本 *in vitro* 評価条件で活性を示さない理由の一つに、HepG2 細胞の間接的 CAR 活性化に関わる機能低下の可能性が考えられる。ただし、フェノバルビタールの CAR に直接結合しない性質、ならびに本研究の *in vitro* 評価条件では、フェノバルビタールの間接的な CAR 活性化能を検出しない点を考え合わせると、改良 CoMFA モデルにおいて、フェノバルビタールのヒト CAR 蛋白への結合能が弱く、活性化能無しと予測した結果は、非常にリーズナブルであると言える。この点

から、本研究の改良 CoMFA モデルは、ヒト CAR 蛋白との結合を基に、主に直接的な CAR 活性化能を引き起こす化合物を予測するモデルと考えることができる。

一方、CYP2B6 誘導予測という観点では、間接的活性化剤を除外している本予測モデルは、その全体を必ずしもカバーしていない。現在、ヒト CAR の間接的活性化のみを正確に評価する創薬上の試験系は存在しないため、解決策の一つとして、ヒト肝細胞を用いた CYP2B6 発現誘導能を直接予測する試みが考えられる。一例として、Nagai らがアゾール誘導体 22 個のヒト肝細胞における CYP2B6 誘導データを用いた回帰モデルを構築し、23 個の薬剤で検証を行った報告がある[63]。しかしながら、その予測精度は十分ではなく、CYP2B6 誘導予測の過大評価傾向が見られた。従って、種々のメカニズムが含まれる CYP2B6 誘導を直接予測するのは、現状非常に困難であり、更なる検討が必要と考えられている。

以上、本研究にて構築した改良 CoMFA モデルは、採用した *in vitro* 評価系の性質上、間接的なヒト CAR 活性化剤の予測に課題を残している。しかしながら、創薬での活用を考えた場合、間接的活性化剤のような、存在割合が低くかつメカニズムが完全に解明されていない化合物よりも、直接的な CAR 活性化化合物を第一に見出すことが、化合物の SAR および原因構造を迅速に把握し、回避に向けた構造展開を行う上で重要となってくる。それ故、本研究の予測モデルは、創薬段階での CYP2B6 誘導を回避するファーストステップの役割を果たす性能を持っており、その利用価値は高いと考える。

第五章 総括

本研究では、創薬プロセスで利用可能な CYP2B6 誘導予測のための有効的な *in silico* 手法の確立を目的とした。手法として、CYP2B6 誘導に重要な役割を果たすヒト CAR 蛋白に対する **structure-based** アプローチを採用し、ヒト CAR 活性化能を指標とした 3D-QSAR モデルの開発を行った。以下に、本研究で得られた知見をまとめる。

- ① ヒト CAR 活性化能評価の同一試験プロトコルとしては、多様な化学構造を持つ化合物、ならびに広いダイナミックレンジを持つ活性からなる最大級のデータセットを整備した。
- ② ヒト CAR 蛋白構造の柔軟性を考慮し、複数の鍵穴蛋白構造を用いたアンサンブルドッキングを取り入れることで、X 線結晶構造のリガンド結合ポーズを再現可能なドッキングプロトコルを確立した。
- ③ 3D-QSAR モデルとして、標準の CoMFA フィールドである立体場および静電場に脂溶性パラメータを追加した改良 CoMFA モデルを構築し、優れた予測精度を確認した ($r^2 = 0.99$, $q^2 = 0.74$, $r^2_{\text{pred}} = 0.71$)。

本研究の改良 CoMFA モデルは、創薬研究へ適した、ヒト CAR 活性化能を持つ幅広い化合物群の予測が可能である。また、**structure-based** CoMFA モデルの利点を活かすことで、CoMFA 等高線および CAR 蛋白への結合ポーズを基に、CAR 活性化化合物と予測した化学構造に関する変換部位の提案をはじめとした、CYP2B6 誘導回避に向けた合

成展開への具体的な考察を可能とする。従って、本研究成果は、創薬早期ステージから CYP2B6 誘導に関連する薬物相互作用リスクを低減した医薬品候補の選択に有益な知見を提供でき、その結果、より安全で使い易い医薬品を患者さんへ届けるために貢献できるものと考えられる。

論文目録

<主論文>

Kato H, Yamaotsu N, Iwazaki N, Okamura S, Kume T, Hirono S. Precise prediction of activators for the human constitutive androstane receptor using structure-based three-dimensional quantitative structure–activity relationship methods. Drug Metab Pharmacokinet 2017; in press.

謝辞

本研究に際し、終始、御指導、御鞭撻を賜りました北里大学薬学部創薬物理化学教室
広野修一 教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究の活動において、日頃から御指導、御鞭撻頂きました北里大学薬学部創薬物理
化学教室 山乙教之 講師に謹んで御礼申し上げます。

本研究の貴重な機会を与えて下さり、適切な御助言を頂きました、田辺三菱製薬株式
会社 久米俊行 博士、ならびに、多大な御支援を頂きました、北嶋浩 博士、山中武志
博士に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行に当たり、重要かつ多くの技術的サポートおよび御助言を頂きました、
田辺三菱製薬株式会社 岩崎紀彦 氏、岡村茂昭 博士に謹んで御礼申し上げます。

本研究の活動において、御指導、御協力を頂きました北里大学薬学部創薬物理化学教
室 中込泉 助教、小澤新一郎 助教、吉田智喜 助教、早川大地 助教に深く感謝致しま
す。

最後に、本研究の遂行を陰ながら支えて頂いた家族に心より感謝致します。

引用文献

- [1] 八木崇, 大久保昌美, 小野俊介, 医薬産業政策研究所 政策研ニュース 2010;29:1-9
- [2] Khanna I. Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. *Drug Discov Today* 2012;17:1088–102.
- [3] Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:711–5.
- [4] 千葉寛, ファルマシア 1995;31:992–6
- [5] Villikka K, Kivistö KT, Backman JT, Olkkola KT, Neuvonen PJ. Triazolam is ineffective in patients taking rifampin. *Clin Pharmacol Ther* 1997;61:8–14.
- [6] Waxman DJ. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys* 1999;369:11–23.
- [7] Molnár F, Küblbeck J, Jyrkkärinne J, Prantner V, Honkakoski P. An update on the constitutive androstane receptor (CAR). *Drug Metab Drug Interact* 2013;28:79–93.
- [8] Cherian M, Chai SC, Chen T. Small-molecule modulators of the constitutive androstane receptor. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2015;11:1099–114.
- [9] Honkakoski P, Zelko I, Sueyoshi T, Negishi M. The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol* 1998;18:5652–8.
- [10] Sueyoshi T, Kawamoto T, Zelko I, Honkakoski P, Negishi M. The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J Biol Chem*

1999;274:6043–6.

[11] Sugatani J, Kojima H, Ueda A, Kakizaki S, Yoshinari K, Gong QH, et al. The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. *Hepatology* 2001;33:1232–8.

[12] Ferguson SS, LeCluyse EL, Negishi M, Goldstein JA. Regulation of human CYP2C9 by the constitutive androstane receptor: discovery of a new distal binding site. *Mol Pharmacol* 2002;62:737–46.

[13] Goodwin B, Hodgson E, D’Costa DJ, Robertson GR, Liddle C. Transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene by the constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol* 2002;62:359–65.

[14] Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stolts CM, et al. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 2002;277:2908–15.

[15] Wang H, Tompkins LM. CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme. *Curr Drug Metab* 2008;9:598–610.

[16] Hedrich WD, Hassan HE, Wang H. Insights into CYP2B6-mediated drug-drug interactions. *Acta Pharm Sin B* 2016;6:413–25.

[17] Ducharme MP, Bernstein ML, Granvil CP, Gehrcke B, Wainer IW. Phenytoin-induced alteration in the N-dechloroethylation of ifosfamide stereoisomers. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997;40:531–3.

[18] Williams ML, Wainer IW, Embree L, Barnett M, Granvil CL, Ducharme MP.

Enantioselective induction of cyclophosphamide metabolism by phenytoin. *Chirality* 1999;11:569–74.

[19] Simonsson US, Jansson B, Hai TN, Huong DX, Tybring G, Ashton M. Enantioselective induction of cyclophosphamide metabolism by phenytoin. *Clin Pharmacol Ther* 2003;74:32–43.

[20] Wang Y, Xing J, Xu Y, Zhou N, Peng J, Xiong Z, et al. In silico ADME/T modelling for rational drug design. *Q Rev Biophys* 2015;48:488–515.

[21] Moroy G, Martiny VY, Vayer P, Villoutreix BO, Miteva MA. Toward in silico structure-based ADMET prediction in drug discovery. *Drug Discov Today* 2012;17:44–55.

[22] Küblbeck J, Jyrkkärinne J, Poso A, Turpeinen M, Sippl W, Honkakoski P, et al. Discovery of substituted sulfonamides and thiazolidin-4-one derivatives as agonists of human constitutive androstane receptor. *Biochem Pharmacol* 2008;76:1288–97.

[23] Lynch C, Pan Y, Li L, Ferguson SS, Xia M, Swaan PW, et al. Identification of novel activation of constitutive androstane receptor from FDA-approved drugs by integrated computational and biological approaches. *Pharm Res* 2013;30:489–501.

[24] Lynch C, Pan Y, Li L, Heyward S, Moeller T, Swaan PW, Wang H. Activation of the constitutive androstane receptor inhibits gluconeogenesis without affecting lipogenesis or fatty acid synthesis in human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014;279:33–42.

[25] Jyrkkärinne J, Windshügel B, Rönkkö T, Tervo AJ, Küblbeck J, Lahtela-Kakkonen M, et al. Insights into ligand-elicited activation of human constitutive androstane receptor based on novel agonists and three-dimensional quantitative structure-activity relationship. *J Med Chem* 2008;51:7181–92.

- [26] Khakar PS. Two-dimensional (2D) in silico models for absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME/T) in drug discovery. *Curr Top Med Chem* 2010;10:116–26.
- [27] 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;49:1762–76.
- [28] Stoll F, Göller AH, Hillisch A. Utility of protein structures in overcoming ADMET-related issues of drug-like compounds. *Drug Discov Today* 2011;16:530–8.
- [29] Chen T, Tompkins LM, Li L, Li H, Kim G, Zheng Y, et al. A single amino acid controls the functional switch of human constitutive androstane receptor (CAR) 1 to the xenobiotic-sensitive splicing variant CAR3. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;332:106–15.
- [30] Küblbeck J, Laitinen T, Jyrkkärinne J, Rousu T, Tolonen A, Abel T, et al. Use of comprehensive screening methods to detect selective human CAR activators. *Biochem Pharmacol* 2011;82:1994–2007.
- [31] Zhang H, Zhang Z, Nakanishi T, Wan Y, Hiromori Y, Nagase H, et al. Structure-dependent activity of phthalate esters and phthalate monoesters binding to human constitutive androstane receptor. *Chem Res Toxcol* 2015;28:1196–204.
- [32] Kawamoto T, Kakizaki S, Yoshinari K, Negishi M. Estrogen activation of the nuclear orphan receptor CAR (constitutive active receptor) in induction of the mouse Cyp2b10 gene. *Mol Endocrinol* 2000;14:1897–905.
- [33] Yao R, Yasuoka A, Kamei A, Kitagawa Y, Tateishi N, Tsuruoka N, et al. Dietary flavonoids activate the constitutive androstane receptor (CAR). *J Agric Food Chem*

2010;58:2168–73.

[34] Abass K, Lämsä V, Reponen P, Küblbeck J, Honkakoski P, Mattila S, et al. Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. *Toxicology* 2012;294:17–26.

[35] Imai J, Yamazoe Y, Yoshinari K. Novel cell-based reporter assay system using epitope-tagged protein for the identification of agonistic ligands of constitutive androstane receptor (CAR) *Drug Metab Pharmacokinet* 2013;28:290–8.

[36] Base M, Gulick T, Choi HS, Martinoli MG, Simha D, Moore DD. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Mol Cell Biol* 1994;14:1544–52.

[37] Honkakoski P, Zelko I, Sueyoshi T, Negishi M. The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol* 1998;18:5652–8.

[38] Wang H, Faucette S, Sueyoshi T, Moore R, Ferguson S, Negishi M, et al. A novel distal enhancer module regulated by pregnane X receptor/constitutive androstane receptor is essential for the maximal induction of CYP2B6 gene expression. *J Biol Chem* 2003;278:14146–52.

[39] Kanno Y, Suzuki M, Miyazaki Y, Matsuzaki M, Nakahama T, Kurose K, et al. Difference in nucleocytoplasmic shuttling sequences of rat and human constitutive active/androstane receptor. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:934–44.

[40] Sinz MW. Avoiding PXR and CAR activation and CYP3A4 enzyme induction. *Top Med Chem* 2015;9:159–90.

- [41] Lynch C, Zhao J, Huang R, Xiao J, Li L, Heyward S, et al. Quantitative high-throughput identification of drugs as modulators of human constitutive androstane receptor. *Sci Reports* 2015;5:10405.
- [42] Perkins R, Fang H, Tong W, Welsh WJ. Quantitative structure-activity relationship methods: perspectives on drug discovery and toxicology. *Environ Toxicol Chem* 2003;22:1666–79.
- [43] Costanzi S, Tikhonova IG, Harden TK, Jacobson KA. Ligand and structure-based methodologies for the prediction of the activity of G protein-coupled receptor ligands. *J Comput Aided Mol Des* 2009;23:747–54.
- [44] Datar PA, Coutinho EC. A CoMFA study of COX-2 inhibitors with receptor based alignment. *J Mol Graph Model* 2004;23:239–51.
- [45] 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;42:365–72.
- [46] Xu RX, Lambert MH, Wisely BB, Warren EN, Weinert EE, Waitt GM, et al. A structural basis for constitutive activity in the human CAR/RXR α heterodimer. *Mol Cell* 2004;16:919–28.
- [47] Golbraikh A, Shen M, Xiao YD, Lee KH, Tropsha A. Rational selection of training and test sets for the development of validated QSAR models. *J Comput Aided Mol Des* 2003;17:241–53.
- [48] Tropsha A. Best Practices for QSAR model development, validation, and exploitation. *Mol Inf* 2010;29:476–88.
- [49] Dring AM, Anderson LE, Qamar S, Stoner MA. Rational quantitative structure-activity

relationship (RQSAR) screen for PXR and CAR isoform-specific nuclear receptor ligands.

Chemico Biol Interact 2010;180:512–25.

[50] Poso A, Honkakoski A. Ligand recognition by drug-activated nuclear receptors PXR and CAR: structural, site-directed mutagenesis and molecular modeling studies Mini-Rev Med Chem 2006;6:937–43.

[51] 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;49:853–64.

[52] Handa K, Nakagome I, Yamaotsu N, Gouda H, Hirono S. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis for human pregnane X receptor for the prediction of CYP3A4 induction in human hepatocytes: structure-based comparative molecular field analysis. J Pharm Sci 2015;104:223–32.

[53] Windshügel B, Poso A. Constitutive activity and ligand-dependent activation of the nuclear receptor CAR-insights from molecular dynamics simulations. J Mol Recognit 2011;24:875–82.

[54] Kanno Y, Inoue Y. Mechanism for subcellular localization of nuclear receptor CAR. Yakugaku Zasshi 2011;131:359–65

[55] Camenisch G, Alsenz J, van de Waterbeemd H, Folkers G. Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight. Eur J Pharm Sci 1998;6:313–19.

[56] Pham-The H, González-Álvarez I, Bermejo M, Garrigues T, Le-Thi-Thu H, Cabrera-Pérez

MÁ. The use of rule-based and QSPR approaches in ADME profiling: A case study on Caco-2 permeability. *Mol Inf* 2013;32:459–79.

[57] Wang H, Faucette S, Moore R, Sueyoshi T, Negishi M. Human constitutive androstane receptor mediates induction of CYP2B6 gene expression by phenytoin. *J Biol Chem* 2004;279:29295–301.

[58] Hooper WD, O'Shea NJ, Qing MS. Enantioselective pharmacokinetics of ethotoin in human following single oral doses of the racemate. *Chirality* 1992;4:142–7.

[59] Yap KY, Chui WK, Chan A. Drug interactions between chemotherapeutic regimens and antiepileptics. *Clin Ther* 2008;30:1385–407.

[60] Mutoh S, Osabe M, Inoue K, Moore R, Pedersen L, Perera L, et al. Dephosphorylation of threonine 38 is required for nuclear translocation and activation of human xenobiotic receptor CAR (NR113). *J Biol Chem* 2009;284:34785–92.

[61] Mutoh S, Sobhany M, Moore R, Perera L, Pedersen L, Sueyoshi T, Negishi M. Phenobarbital indirectly activates the constitutive active androstane receptor (CAR) by inhibition of epidermal growth factor receptor signaling. *Sci Signal* 2013;6:ra31.

[62] Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;189:233–46.

[63] Nagai M, Konno Y, Satsukawa M, Yamashita S, Yoshinari K. Establishment of In Silico Prediction Models for CYP3A4 and CYP2B6 Induction in Human Hepatocytes by Multiple Regression Analysis Using Azole Compounds. *Drug Metab Dispos* 2016;44:1390–8.