

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 博士後期課程（創薬物理化学教室）3年 加藤 晴敏

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 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、産物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、 $0.02 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ 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 蛋白構造のサンプルリングを実施した。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 5β -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 2\AA 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)。

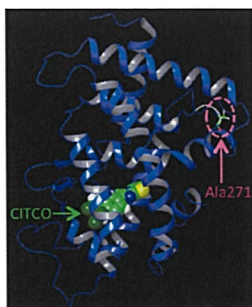


Fig. 1 hCAR+A structures (1XVP)

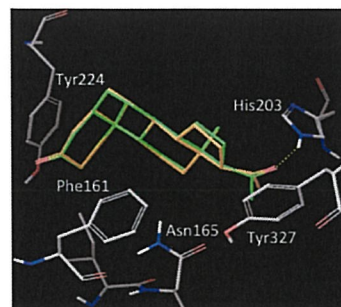


Fig. 2 The pose position of 5β -pregnane-dione determined by docking protocol (orange) and in X-ray crystallography (green)

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)。

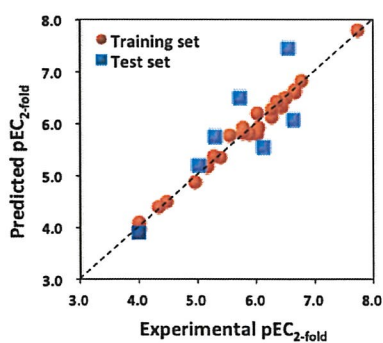


Fig. 3 Plots of experimental versus predicted pEC_{2-fold} values in the modified CoMFA model

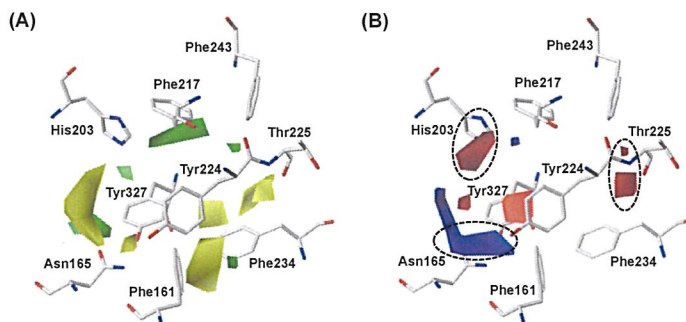


Fig. 4 Contour maps of the steric field (A) and electrostatic field (B) in the modified CoMFA model

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、臨床で使用される類似の 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.