

氏 名	かくたに のぶゆき 角谷 信至
学 位 の 種 類	博士(薬学)
学 位 記 番 号	乙博薬第3号
学位授与の日付	令和6年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 題 目	反応性代謝物の曝露量に基づいた肝障害リスク予測に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 永 井 純 也 (副査) 教 授 岩 永 一 範 (副査) 教 授 中 村 任

論 文 内 容 の 要 旨

一般に薬物が代謝を受けると薬理活性や毒性ポテンシャルは減弱する傾向にあるが、薬物によっては代謝反応により反応性の高い化学種が生じることがある。このような代謝物は反応性代謝物と呼ばれ、代謝時において近傍に存在する代謝酵素等のタンパクに非特異的に共有結合し、結合により生じた異常なタンパクへの免疫応答により毒性が発現すると考えられている。反応性代謝物に起因する毒性リスクは医薬品の販売中止や開発中断にもつながる非常に深刻な問題であるにも関わらず、代謝の種差や遺伝的要因等のために動物を用いた毒性学的安全性評価や少人数での臨床試験によりそのリスクを予見することは難しい。そのため、ヒト生体由来試料を用いた *in vitro* 代謝試験におけるタンパクへの結合量を指標に反応性代謝物を生成しない、あるいはその生成量が少ない医薬候補品を見出す取り組みが製薬企業では行われている。反応性代謝物の評価は、従来の手法では $[^3\text{H}]$ あるいは $[^{14}\text{C}]$ により標識された被験物質を使用し、肝ミクロソーム等のタンパクへ共有結合した放射エネルギーを定量することで評価される。しかし、放射性同位元素標識された被験物質の調達にはコストと時間が必要となるため、医薬品探索の段階では数多くの化合物に対して反応性代謝物生成量を定量的に評価することは難しい。更に、*in vitro* 代謝試験における薬物の共有結合量と臨床における肝障害には明確な相関が認められず、そのリスクを精度よく予測することも難

しい。そこで、本研究では、放射性同位元素標識された被験化合物を入手できない探索段階においても反応性代謝物生成を定量的に評価できる評価系の確立、および、*in vitro*における反応性代謝物生成ポテンシャルから精度よく臨床における肝障害リスクを評価できる予測法の確立を目指して検討を行った。

第一章ではヒト肝ミクロソームを用い、第一相代謝反応により生成する反応性代謝物の定量的評価法を検討した。医薬品構造にしばしば使用されるフッ素原子をトレーサーとして F-NMR により定量することで放射性同位元素標識体を使用せず共有結合量を評価した。含フッ素医薬品フルタミドを用いて検討を行い、代謝を受けて化学構造が変換したタンパクに共有結合した結合体由来のフッ素シグナルが定量可能であることを新規に示した。一方、構造中にフッ素原子を有さない化合物の酸化的代謝物を評価するために $[^{35}\text{S}]$ システインおよび $[^{14}\text{C}]\text{KCN}$ を用いたトラッピングアッセイ法を新たに構築し、得られたアダクト生成量が共有結合量に相関することを示した。

第二章では、カルボン酸の第二相代謝反応により生成するアシル CoA 抱合体の反応性を定量的に評価する方法を検討した。構造中にカルボン酸を有する薬物から生じるアシル CoA 抱合体は非常に反応性が高く、ミクロソーム等のタンパクへの共有結合することが知られているものの、その反応性を評価する方法は報告されていない。そこで、適切なトラップ剤を探索したところ、システインがアシル CoA 抱合体と安定なアダクトを形成することを新規に見出した。更にシステインアダクトは、元の薬物と比較して UV 吸収部位に構造変化を持たないことに注目し、極大吸収波長における UV 吸収により定量することで、放射性同位元素標識したシステインを用いた定量的なトラッピングアッセイと同等の結果が得られることを示した。システインをトラップ剤として用いることで、これまで検出することが難しかったアシル CoA 抱合体について、放射性同位元素標識体を用いない定量的な評価法を構築した。

第三章では、反応性代謝物による毒性リスクの予測について検討した。複数の薬物について、*in vitro* 実験値として放射性同位元素標識体を用いた共有結合量、あるいはトラッピングアッセイにおけるアダクト生成量に関するデータを収集し、加えて臨床 PK データを考慮することで毒性リスク予測性の向上を目指した。先行報告より収集した 48 個の薬物のヒト肝ミクロソームへの共有結合量と、薬物の投与量および親化合物の AUC から反応性代謝物の体内負荷量 (RM burden) を見積もることで、毒性リスクの予測性が大幅に向上することを示した。更に、第一相代謝反応による反応性代謝物については、本研究で構築した定量的トラッピングアッセイにより RM burden を同様に算出できること、第二相代謝反応によるアシル CoA 抱合体およびアシルグルクロ

ニドについてもトラッピングアッセイにおけるアダクト生成量と親化合物の曝露を乗じることで、毒性リスクと良好な相関があることを示した。

本研究では、反応性代謝物生成の定量的評価法および、ヒト生体内での反応性代謝物曝露量を見積もることによる肝障害リスク予測法を確立した。これらの手法は、医薬品候補化合物の放射性同位元素標識体を必要とせず、またヒト **PK** パラメーター予測と組み合わせることで、医薬品探索段階から高い精度で特異体質性薬物毒性リスクを予測することができるため、より安全で効率的な医薬品開発について貢献することができるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

生体内で薬物が代謝を受けると薬理活性や毒性は減弱する傾向にあるが、薬物によっては代謝により反応性の高い化学種が生じることがある。このような代謝物は反応性代謝物と呼ばれ、代謝時において近傍に存在する代謝酵素等のタンパク質に非特異的に共有結合し、その結合により生じた異常タンパク質への免疫応答により毒性が発現することが考えられている。反応性代謝物に起因する毒性リスクは医薬品の販売中止や開発中断にもつながる非常に深刻な問題であるにも関わらず、代謝の種差や遺伝的要因などのために動物を用いた毒性学的安全性評価や少人数での臨床試験ではそのリスクを予見し難い。そのため、ヒト生体由来試料を用いた *in vitro* 代謝試験におけるタンパク質への結合量を指標に反応性代謝物を生成しない、あるいはその生成量が少ない医薬品候補化合物を見出す取り組みが製薬企業などで行われている。反応性代謝物の評価は、従来の手法では $[^3\text{H}]$ あるいは $[^{14}\text{C}]$ 標識された被験物質を使用し、肝ミクロソームなどのタンパク質へ共有結合した放射エネルギーを定量することで評価される。しかし、放射性同位元素標識された被験物質の調達にはコストと時間を要するため、医薬品探索の段階において数多くの化合物に対して反応性代謝物の生成量を定量的に評価することは難しい。更に、*in vitro* 代謝試験における薬物の共有結合量と臨床における肝障害には明確な相関が認められないことも多く、そのリスクを精度よく予測することも困難とされる。そこで、本研究では、放射性同位元素標識された被験化合物を入手できない探索段階においても反応性代謝物生成を定量的に評価できる評価系の確立を行うとともに、*in vitro* における反応性代謝物生成量から精度よく臨床における肝障害リスクを評価できる予測法の確立を目指した検討を行った。

第一章では、ヒト肝ミクロソームを用い、第一相代謝反応により生成する反応性代謝物の定量的評価法を検討した。医薬品化合物の構造にしばしば含まれるフッ素原子をトレーサーとして F-NMR により定量することで放射性同位元素標識体を使用せず共有結合量を評価した。含フッ素医薬品であるフルタミドを用いた検討を行い、代謝によってタンパク質に共有結合した結合体由来のフッ素シグナルが定量可能であることを新規に示した。一方、構造中にフッ素原子を有さない化合物の酸化的代謝物を評価するために $[^{35}\text{S}]$ システインあるいは $[^{14}\text{C}]\text{KCN}$ を用いたトラッピングアッセイ法を新規に構築し、得られたアダクト生成量が共有結合量に相関することを示した。

第二章では、カルボン酸の第二相代謝反応により生成するアシル CoA 抱合体の反応性を定量的に評価する方法を検討した。構造中にカルボン酸を有する薬物から生じる

アシル CoA 抱合体は非常に反応性が高く、ミクロソームなどのタンパク質に共有結合することが知られているが、その反応性を評価する方法は報告されていない。そこで、適切なトラップ剤を探索したところ、システインがアシル CoA 抱合体と安定なアダクトを形成することを新規に見出した。さらに、システインアダクトは親薬物と比較して UV 吸収部位に構造変化を持たないことに注目し、極大吸収波長における UV 吸収を測定することで、放射性同位元素標識したシステインを用いた定量的なトラッピングアッセイと同等の結果が得られることを示した。システインをトラップ剤として用いることで、これまで検出することが困難であったアシル CoA 抱合体を放射性同位元素標識体を用いることなく定量的に評価できる方法を構築した。

第三章では、反応性代謝物による毒性リスク予測について検討した。複数の薬物について、*in vitro* 実験値として放射性同位元素標識体を用いた共有結合量、あるいはトラッピングアッセイにおけるアダクト生成量の測定に加えて、臨床 PK データを考慮することで毒性リスク予測性の向上を目指した。先行報告により収集した 48 個の薬物のヒト肝ミクロソーム共有結合量と、薬物の投与量および親化合物の AUC から反応性代謝物の体内負荷量(RM burden)を見積もることで、毒性リスクの予測性が大幅に向上することを示した。さらに、第一相代謝によって生成する反応性代謝物については、本研究で構築した定量的トラッピングアッセイにより RMburden を同様に算出できること、第二相代謝によって生成するアシル CoA 抱合体およびアシルグルクロニドについてもトラッピングアッセイにおけるアダクト生成量と親化合物の曝露量の積を求めることによって、毒性リスクとの良好な相関が得られることを示した。

以上、本研究によって、反応性代謝物の定量的評価法を構築するとともに、反応性代謝物生成量を見積もることによる肝障害リスク予測法を確立した。これらの手法は、医薬品候補化合物の放射性同位元素標識体を必要としない方法論を提示することに加えて、医薬品探索段階から高精度で特異体質性薬物毒性リスクを予測することを可能とするものと考えられることから、本研究で得られた成果はより安全で効率的な医薬品開発に貢献することができるものと期待される。

以上より、上記の論文は、博士（薬学）論文として適当と判断する。