The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	CYP3A4における代謝活性化作用機構の解明 ーエファビレンツのCYP3A4エフェクター作用の解析ー
Author(s)	市川, 友彦
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69513
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（市川　友彦）	
論文題名	CYP3A4における代謝活性化作用機構の解明 ―エファビレンツのCYP3A4エフェクター作用の解析―

論文内容の要旨

薬物間相互作用（drug-drug interaction: DDI）は、複数の薬物を併用した際に各々の薬物が相互に影響を及ぼすことを指し、臨床上では薬効が変化することで予想しない副作用が現れることが大きな問題となっている。DDI の中でも薬物代謝に関する相互作用が発生する事例が多く、特に、ヒトの体内において水酸基の導入や脱アルキル等の酸化的代謝を担う cytochrome P450（CYP）を介したものがその多くを占めている。CYP には様々な分子種が報告されているが、このうち CYP3A4 はヒト肝臓における発現量が全 CYP の中で約 30%と最も多い分子種である。さらに、基質特異性が非常に低く、市販されている薬物のうち 30%以上もの代謝に関与していることが知られている。したがって、CYP3A4 は他の CYP 分子種に比べ、数多くの薬物の代謝に関与している点で、先に述べた DDI が生じる可能性が最も高いと言える。

実際に、CYP3A4 において DDI が発生した場合、影響を受ける側の薬物（被相互作用薬）の代謝が『阻害』あるいは『活性化』されることが報告されている。『阻害』については代謝サイクル中、親和性の異なる 2 種の基質が共通の基質結合部位を取り合うことにより、『活性化』については影響を及ぼす側の薬物（相互作用薬）が CYP3A4 にアロステリック効果をもたらし代謝を促すことにより、それぞれの現象が発生すると考えられている。ソリブジン薬害以来、代謝阻害が関わる DDI についてはその発生リスクの低減を目指した研究や医薬品開発が行われてきた。一方で、代謝活性化に関する報告例は豊富ではなく、その発生メカニズムの詳細についても不明である。

本研究では、CYP3A4 における代謝活性化に注目した。CYP3A4 では、薬物の結合及び代謝が行われる活性中心のヘム周辺（触媒部位）のみならず、その中心部位から離れた CYP3A4 の周辺領域（エフェクター部位）に対しても薬物が結合するモデルが提唱されている。本研究では、すでに代謝活性化によって他薬の血中濃度変化をもたらすことが臨床的に報告されている非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 efavirenz について、efavirenz 自身の CYP3A4 に対する結合性と、代表的な基質 midazolam の CYP3A4 に対する結合性に与える影響を解析し、DDI による薬物の結合及び代謝過程に変化を及ぼすメカニズムについて検討した。

UV-VIS 分光計を用いた吸収滴定により efavirenz の CYP3A4 に対する触媒部位への親和性を評価した結果、evfavirenz は代表的な CYP3A4 阻害剤 ketoconazole と同様の結合様式を示した（解離定数 K_d = 517 μM）。次に efavirenz が midazolam の結合に与える影響を評価した結果、efavirenz は濃度依存的に midazolam の結合親和性を上昇させた。この作用は比較的低濃度の efavirenz でも現れており（最大影響の 50%を与える iK_d 値は 5.6 μM）、efavirenz は CYP3A4 の触媒部位よりもエフェクター部位に対する親和性が高いことを示した。さらに efavirenz が midazolam の代謝物 1’-hydroxymidazolam 生成に対して及ぼす影響についても評価し、その生成速度が上昇していることと、ミカエリス定数 K_m は影響を受けていないことを示した。Efavirenz と midazolam の同時投与による臨床薬物相互作用試験における efavirenz の最高血漿中濃度（約 3 μM）と iK_d 値（5.6 μM）の比較から、この DDI の直接的な原因は efavirenz の CYP3A4 のエフェクター部位に対する優先的な結合と結論付けられた。また、efavirenz 類縁体を用いた検討により、efavirenz impurity が midazolam の結合親和性や代謝に対して efavirenz と同様の作用を示すことが判明し、エフェクター作用を示す共通構造として benzoxazin-2-one を提示した。さらに、分子動力学シミュレーションを用いた検証で、efavirenz が CYP3A4 の触媒部位よりもエフェクター部位でより安定に存在できることが推定され、一連の efavirenz のエフェクター作用に関する実験データを支持する予測結果が得られた。

上記の結果より、efavirenz の代謝活性化作用を結合面から解析し、分子動力学シミュレーションを行うことにより、*in vitro* 試験及び臨床 DDI 試験で観察された結果の直接的な要因が efavirenz のエフェクター部位への結合に基づくものであることを説明することに成功した。同時に、UV-VIS 分光計を用いて CYP3A4 に対する薬物の結合に注目した評

価を行うことにより、より直接的にDDIの発生要因を捉えることを可能にした。

医薬品開発ではDDIの発生リスクを低減するため、日米欧医薬品規制当局によって指針の作成や施行が行われている。この中で医薬品開発におけるDDIの検出は間接的に代謝物の生成量の変化で評価することと述べられている。即ち、相互作用を及ぼす側の薬物（例えばefavirenz）に注目するのではなく、被相互作用薬（例えばmidazolam）の代謝物生成量の変化で評価する。このため、相互作用薬のDDIメカニズムの詳細について、特に触媒部位とは異なる部位への結合がきっかけで生じる代謝活性化の機序を説明することは困難であった。本研究で用いた吸収滴定により代表的基質のCYP3A4に対する結合親和性の変化を観察することで、結合親和性の観点からも薬物相互作用の発生リスクを提示することが可能であり、また、このアプローチがこれまでのDDIのメカニズムを解明する手段としても有効であることを示した。今後、化学構造と代謝活性化作用の関係を詳細に研究することにより、医薬品開発において、本現象をもたらす化合物の排除及びDDIの発生リスクの低減にも寄与しうると考えられる。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　市川友彦　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	堤　康央
	副 査　教授	大久保忠恭
	副 査　教授	高木達也

論文審査の結果の要旨

本学位論文では、efavirenz及びその類縁体を用いてmidazolamのCYP3A4結合及び代謝に与える影響を観察すると共に、in vitro試験や臨床薬物相互作用試験で得られている結果を薬物結合の観点から解明することを目指し、以下の貴重な知見等を得たものである。

① CYP3A4に対する阻害剤及び活性化剤を用いて、midazolamの結合を指標としてDDIの検出が行えるか確認した。阻害剤又は活性化剤を添加した場合に、midazolamの解離定数Kdがそれぞれ上昇又は低下し、即ち、CYP3A4に対する結合の親和性が低下又は上昇することを定量的に示すことが可能であることが判明した。

② efavirenz存在下でmidazolamのK_dを得た結果、efavirez非存在下に比べて低下し、その変化はefavirez濃度依存的であることが判明した。さらに、efavirez共存濃度依存的にmidazolamの代謝が促進されることも明らかとし、それら作用はefavirenzが低濃度でも起こり、この濃度は臨床DDI試験における血漿中濃度と同等であった。したがって、そのDDI試験の中で報告されているefavirenzとmidazolamの併用時における血漿中midazolam濃度の低下やその代謝物の濃度上昇は、efavirenzのmidazolamのCYP3A4への結合性を高める特性に起因したものと考えられた。

③ efavirenz類縁体を用いた検討により、efavirenzと同様にしてmidazolamの結合親和性を上昇させる構造と影響を及ぼさない構造があることが判明し、efavirenzのCYP3A4に対する特性はその化学構造にも依存している可能性を認めた。

本学位論文では、CYP3A4に対する結合特性の観点から相互作用を検出することで、より直接的にDDIの発生要因を捉えることを可能にし、さらに、efavirenzの代謝活性化のメカニズムがCYP3A4に対するエフェクター作用に基づくものであることを説明することに成功した。今後、化学構造と代謝活性化作用の関係を詳細に研究することにより、医薬品開発において、本現象をもたらす化合物の排除及びDDIの発生リスクの低減にも寄与するものと考えられる。

以上、今後の画期的新薬の創成など、創薬領域で、新たな知見・概念を提示・発見したことにより、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認めるものである。