

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

平成 29 年度 博士論文

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—

大阪大学大学院 薬学研究科 創成薬学専攻 分子反応解析学分野

市川 友彦

目次

緒言			1
本論			6
第一章 吸収液	商定法を用いた	薬物間相互作用の判定	
第一節	序論		6
第二節	結果		6
第二章 Efavi	renz による薬物	間相互作用の解析	
第一節	序論		9
第二節	結果		9
第三章 Efavi	renz の類縁体	こよる薬物間相互作用の解析	
第一節	序論		13
第二節	結果		13
考察			17
総括			21
実験方法			23
引用文献			27
謝辞			31

本論文中には以下の略語を使用した。

CPR : cytochrome P450 reductase CYP : cytochrome P450 DMSO : dimethylsulfoxide DDI : drug-drug interaction DTT : dithiothreitol UV-VIS : ultraviolet-visible

緒言

薬物相互作用と Cytochrome P450

薬物間相互作用(drug-drug interaction: DDI)とは、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は多く、その中でもCytochrome P450(CYP)を介したものが主要である[1]。

CYP は、生物界に広く存在しており、補欠分子として鉄ポルフィリン錯体であるへム(図 1)を活性 中心に持ったヘムタンパク質である。還元型で一酸化炭素と結合して 450 nm に極大を持つ特徴的な 吸収スペクトルを示す。この特徴は、プロトヘムの第 5 配位座に CYP のシステイン残基のチオール基がイ オン化したチオレートアニオンが配位していることに起因する。このシステイン残基の前後のアミノ酸配列は ほぼすべての CYP で保存されており [2]、ヘム結合領域と呼ばれている。CYP には数多くの種類が存在 し、ヒト CYP は約 50 の分子種が確認されている。このうちヒトの体内で薬物代謝を担う主要な分子種と して CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4 が挙げられる。



図 1. ヘム b の構造.

CYP3A4 はと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 [3]。したがって、CYP3A4は他のCYP分子種に比べ多くの薬物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分子種である。

CYP3A4 が関与する薬物相互作用と医薬品開発におけるリスクマネジメント

臨床での DDI は主に血中薬物濃度の変化として観察され、その現れ方は、各薬物の CYP に対する 親和性や組織内(酵素近傍)の濃度、被相互作用薬が単一の酵素で代謝されるのか、あるいは複 数の酵素で代謝されるのかによっても異なる。他薬が CYP の基質結合部位に結合して競合阻害薬とし て働くケースのみならず、一部はアロステリック作用を示し、被相互作用薬の血中濃度を変化させる場合 もある。医療現場では、複数の医薬品の併用による薬物治療がしばしば行われる。多剤併用による薬 物治療は、薬理作用の相加または相乗効果あるいは副作用軽減を目的として行われるが、これらベネフ ィットを大きく上回るリスクが発現する場合がある。CYP3A4 が関わる例としては、テルフェナジンと抗真菌薬の併用により重篤な心毒性が発生した例があり、これは抗真菌薬の CYP3A4 の代謝阻害が起因したものである。一方で、CYP3A4 による活性化が DDI として顕在化した例はほとんどなく、efavirenz における DDI 試験及び動物試験でのみ報告されている [15,16]が、代謝の活性化は、効果の減弱や活性代謝物による毒性の増悪をもたらす可能性があるため、医薬品を開発する上では避けることが望ましい。

このような経験や懸念に基づき、リスクの高い薬物相互作用が発現する可能性の有無を医薬品開発時に検討しておくことの意義が認識され、薬物相互作用の検討のための指針作成が日米欧医薬品規制当局において進められ、欧州医薬品庁(EMA)では確定された指針[4]で承認審査が行われている。本邦でも「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)が平成26年にまとめられており、米国では平成29年に新たな最終案[5]が発表されている。これら指針では、現時点で標準的な in vitro 実験方法や臨床試験デザイン、意思決定時の判断基準等について、可能な限り具体的に示されており、CYP3A4を中心としたDDIのリスク低減やそれに関係する適切な情報の提供に役立っている。

しかしながら、CYP3A4 は他の CYP 分子種と比較しても、より多くの DDI に関与しうるため、 CYP3A4 における DDI の発生リスクは依然として高い。これは、臨床使用されている薬物の代謝への関 与の大きさのみならず、触媒部位周辺の構造的理由にも要因がある。

CYP3A4の構造的特徴

CYP3A4 は他の分子種の CYP と類似の三次元構造を有するにも関わらず、活性部位の広さが 1385 Å³であり、CYPA1A2 の活性部位の広さである 375 Å³と比較しても極めて活性部位が広いこと が特徴である [6]。さらに、リガンド結合による構造変化の柔軟性が高いことも特徴の一つであり [7]、 ketoconazole 結合型の CYP3A4 の結晶構造では、2つの ketoconazole が結合していることが示さ れ、また、このとき活性部位が基質非結合型と比べて約 1.8 倍広くなっており、リガンドの種類によって CYP3A4 の構造が非常に大きく変化しうることが示された [8]。以上から、CYP3A4 には様々な薬物が 複数個同時に結合する可能性があり、複雑かつ多様な DDI に関与していると考えられている。

薬物代謝の阻害及び活性化作用

CYP3A4 において DDI が発生した場合、一方の薬物の代謝が『阻害』又は『活性化』されることが報告されている。『阻害』については親和性の異なる 2 種の基質が共通の基質結合部位を取り合う、『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、ことによって起こる。

一般的な CYP による一原子酸素添加反応として、図 2 に示すような代謝サイクルが提唱されている [9]。一般的な CYP では、休止状態においてへム鉄が 3 価の酸化型で存在し、主に水分子が第 6 配 位子として配位した 6 配位構造をとっている。代謝反応はまず、この休止状態の 6 配位型 CYP に基質 が結合し、水分子が追い出され 5 配位型 CYP となることからはじまる。その結果、へム鉄の酸化還元電 位が上昇し、CPR から一電子還元を受けて 2 価のへム鉄となり [10]、その状態で直ちに酸素が結合し、 再び酸素結合型になる。ここに CPR 又は cytochrome b5による電子供給と分子内プロトンネットワー クを介したプロトン供給によりへムはペルオキシ型となる。さらに一当量のプロトンを得て、0-0 結合は不 均等開裂を起こし、Compound I と呼ばれるポルフィリン・カチオンラジカルが生成する [11]。この Compound I が基質に対して一電子酸化を行い、次いで、基質に酸素一原子を添加した ROH を放 出し、水分子が再びへムに配位することで CYP は始めの休止状態に戻る。



図 2. CYP の反応サイクル.

この反応サイクルに加え、CYP3A4では、薬物は活性中心のへム周辺のみならず、この触媒部位から 離れた周辺領域にも結合するモデルが提唱されている [8]。Progesterone 結合型の CYP3A4 の結 晶構造 [12]では、ヘムから 17Å 離れた CYP3A4 の表面領域にプロゲステロンが結合しているモデルが 示された(図 3)。Progesterone は CYP3A4 基質である carbamazepine の代謝を促し、 10,11-エポキシ化代謝物の生成量を増加させると報告されている [13]。この他にも、代謝型グルタミ ンレセプター5 (mGlu5) のアロステリックモジュレーター VU0448187 [14]、ステロイド [13]、 qunidine [15]、α-naphthoflavone (7,8-benzoflavone) [16] 等が報告されている。



図 3. 表面領域にプロゲステロンが結合した CYP3A4 構造 (PDB: 1W0E).

CYP3A4 におけるエフェクター作用とその判定方法

DDIの発生の可能性を予め見積もることは、医薬品の適正使用や医薬品候補化合物の選択におい て非常に大切である。このリスクは通常、典型的な基質の代謝又はその代謝物の生成速度の変化で判 定していることが多い。この変化は、親和性の異なる薬物が複数存在することにより、活性部位に対する 結合性が変化することによってもたらされている。したがって、CYP3A4 に対する薬物結合の変化を観察 することで、薬物相互作用の判定やその機構を解析することも可能と考えられる。

2 つ以上の薬物が共存する状況下で基質の代謝やその代謝物の生成が減少している場合、触媒部 位において異なる親和性を示す薬物が競合し、結合が妨げられていることが原因と考えられる。これは競 合阻害と呼ばれ、他剤の血中濃度を上昇させるリスクとなり、安全性上の情報提供を目的とした臨床試 験の例が多数存在する [17,18]。一方、基質の代謝やその代謝物の生成が増大する例については、 主に 2 つの分子機構によって引き起こされる。1 つは、薬物が遺伝子発現を促すことによる CYP 発現量 の上昇であり、もう1つは、薬物が CYP3A4 に直接作用することよる酵素触媒能力の上昇である。前者 は酵素誘導作用と呼ばれ、酵素タンパクの発現制御機構が明らかになっており、DDI 発生のリスクを管 理した医薬品開発が進められるようガイドラインの整備が進んでいる [4,5]。後者は薬物が触媒部位と は異なる活性化部位に結合することで起こる現象 [19]と考えられており、ある薬物が触媒部位に結合 した後に基質の結合位置が変化することで代謝が促されるメカニズムや、この触媒部位とは異なる部位

(エフェクター部位)にある薬物が結合し、基質の結合性を高めて代謝が促されるメカニズム[20]が提唱されている。

エフェクター部位の存在位置については、2004 年 Williams らの CYP3A4 結晶構造解析によって一 つの可能性が提示された [12]。さらに近年、CYP3A4 による代謝を活性化する物質として知られてい るα-naphthoflavone が触媒部位とは離れた領域に結合し、エフェクターとして機能するモデルも示され た [21]。エフェクター作用を持つ薬物は CYP3A4 の代謝活性化をもたらし、基質化合物の代謝物生 成速度を増大させる。ただし、観察されている現象としては、基質側(被相互作用薬)の代謝物生成 の変化のみであり、影響を及ぼす側の薬物に着目した解析は進んでいないのが現状である。

医薬品開発で行われる CYP3A4 における DDI 発生リスクの判定では、代表的な基質である midazolam (図 4A)が用いられることが多い。Midazolam は *in vitro* 試験及び臨床 DDI 試験に おいて、CYP3A4 を介して生じる DDI の程度を判定するために用いられる標準的な物質であり、先に述 べた日米欧の医薬品製造販売の規制当局が発出する DDI 検討のガイダンス又はガイドラインにも記載 されている。例えば、*in vitro*の CYP3A4 代謝試験において、代表的な CYP3A4 阻害剤 ketoconazole と midazolam を共存させた場合、CYP3A4 の触媒部位で競合阻害が起こることによ り midazolam の代謝が阻害され、反応液中の代謝物 1'-hydroxymidazolam (図 4B)の生成 量が減少する。このような結果を得ることで新規医薬品における DDI の潜在性を判定している。また、臨 床用量における DDI 強度を見積もるために実施される臨床 DDI 試験では、血液中の midazolam 代 謝物を追跡することで、併用薬物が midazolam の代謝に与える影響を判定することになっている。



図 4. Midazolam (A) 及び代謝物 1'-hydroxymidazolam (B) の構造.

このような背景から、本研究では、CYP3A4の代謝活性化に注目し、薬物の結合という観点から、こ の DDI に関わる詳細な機構を解明することと、また、DDI リスクの低減に向けた知見を得ることを目的と して解析を進めた。解析対象薬物として、*in vitro* 試験のみならず臨床 DDI 試験でも代謝活性化が報 告されており HIV 治療の第一選択薬として広く使用されている efavirenz(図 5A)を選択し、 midazolam の結合性や代謝に及ぼす影響を評価することで、そのメカニズムの解明を目指した。さらに、 efavirenz の類縁体として、各々が構造的特徴を一部だけ efavirenz と共有する efavirenz impurity(図 5B)及び efavirenz intermediate(図 5C)を選択し、それぞれが及ぼす影響につ いても検証することで、最終的に efavirenz のエフェクター作用について、CYP3A4 における構造学的な 考察を行い、DDI に関わる機構の一端を解明することとした。



図 5. Efavirenz (A)、efavirenz impurity (B)及び efavirenz intermediate (C) の構造.

第一章 吸収滴定法を用いた薬物間相互作用の判定

第一節 序論

本章では、薬物の結合特性に基づいた DDI の潜在性を検出することを目的として、UV-VIS 分光 計を用いた吸収滴定により、midazolam を含む種々の基質の CYP3A4 に対する薬物結合能を測定 した。さらに、同じ手法により CYP3A4 阻害剤 ketoconazole または活性化作用を示す化合物 α -naphthoflavone が共存した場合の典型的基質 midazolam の結合に与える影響を観察し、 DDI の判定が行えるかについて検討した。

第二節 結果

紫外可視分光法を利用した吸収滴定法によって結合親和性を測定した。まずはCYP3A4の典型的 基質である midazolam について以下に説明する。Midazolam が CYP に結合するとき、ヘム周辺に 結合した際にはヘムの配位状態及びスピン状態の変化として吸収スペクトルで観測される。この吸収スペ クトルの変化は微小であるため、解析するために薬物添加後から薬物添加前の吸収スペクトルを引いた 差スペクトルを求めた。吸収スペクトルを観測すると、第 6 配位子として水分子が配位した 6 配位型 low-spin 状態のヘム鉄では 420 nm 付近に吸収極大を有し、水分子が存在しない 5 配位型 high-spin 状態のヘム鉄は 390 nm 付近に吸収極大を有する。 Midazolam を添加する前では、多く のCYPは第6配位座に水分子が配位した6配位構造をとるが、薬物添加後は水分子が押し出され5 配位構造になるため、midazolam を添加した場合に得られる差スペクトルは、390 nm 付近の山と 420 nm 付近の谷として観測される (図 6A)。この変化は Type I スペクトル変化と呼ばれており、 CYP により代謝を受ける基質が結合する際に見られる一般的な変化である。一方で、ketoconazole を添加した場合に得られる差スペクトルは 400 nm 前後に谷となり、425 nm 付近が山となる Type II スペクトル変化と呼ばれるスペクトル変化が観測された (図 6B)。この変化は窒素性配位子や酸素原 子が第 6 配位座を占める変化、すなわち薬物が直接へム鉄に配位することを意味している。この変化が 見られる際には、ヘム鉄上での酸素活性化がうまくできないため、薬物が阻害剤として働く。実際に ketoconazole は CYP3A4 に対して阻害剤として働くことが知られているため、得られた結果は矛盾な いものであった。

これら midazolam、ketoconazole 及びα-naphthoflavone の濃度ごとに吸収スペクトルを測定 し、その吸収スペクトルの変化から算出した変化率を基質濃度に対してプロットし、式 1 [22]に基づいて 理論曲線を最小二乗法によりフィッティングすることで、Kd を算出した。各物質を添加したときの吸収スペ クトル変化及び差スペクトルを図 6 に示す。



 $E + S \Leftrightarrow ES$ K_d

図 6. Midazolam (A)、ketoconazole (B)又はα-naphthoflavone (C)を漸増添加した場合 の CYP3A4 の吸収スペクトル変化(350–500nm)(下段は差スペクトル)並びに midazolam (D)、ketoconazole (E) 及びα-naphthoflavone (F)の差スペクトル変化. 矢印はスペクトル変化の方向を示す.

Midazolam の差スペクトルは 388 nm に山、417 nm に谷となり、 α -naphthoflavone の差スペクトルは 389 nm に山、417 nm に谷となり、いずれも Type I スペクトル変化を示した。一方、 ketoconazoleの差スペクトルは 393 nm に谷、428 nm に山となる Type IIスペクトル変化を示した。 それぞれの基質に対して Kdを算出することで、休止状態の CYP3A4 に対する結合親和性を評価することができ、それぞれ midazolam は 64 ± 23 μ M、ketoconazole は 6.4 ± 2.0 μ M 及び α -naphthoflavone は 21 ± 0.57 μ M となった。

次に、ketoconazole 又は α -naphthoflavone 共存下における midazolam の結合親和性について調べた。Midazolam 添加後からそれぞれの薬物添加時の吸収スペクトルを引いた差スペクトルを求めた。Ketoconazole 又は α -naphthoflavone の添加濃度は K_d 付近の濃度を用い、それぞれ 5 μ M 又は 20 μ M とした。Ketoconazole 又は α -naphthoflavone 共存下において、midazolam は単独の滴定時と同様に Type I スペクトル変化を示した (data not shown)。各物質共存下におけるmidazolam の差スペクトルの変化率を図 7 に示す。Midazolam の K_d を算出した結果、単独滴定では 64 ± 23 μ M であったが ketoconazole 共存時には 90 ± 20 μ M に上昇し、 α -naphthoflavone 共存下にた。



図 7. ミダゾラムの CYP3A4 結合に及ぼす各種薬物の影響(標準化した差スペクトルとミダゾラム濃度の関係).

O共存薬物なし、並びに●5 μM ketoconazole 及び■ 20 μM of α-naphthoflavone 存在時. 各値は平均値±標準偏差(n=3-5).

第2章 Efavirenzの薬物間相互作用の解析

第一節 序論

Efavirenz (図 4A) は非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤であり、HIV 感染症治療ガイドラインに おいて標準的な第一選択薬として推奨されている。Efavirenz は CYP2B6の選択的基質である [23] が、CYP3A4 の代謝を活性化する作用を有することが、*in vitro* 試験のみならず臨床 DDI 試験でも示 されている希少な化合物である。とト肝由来のミクロソーム画分や CYP3A4 発現系を用いた *in vitro* 実 験で、efavirenz が midazolam の代謝を促し、代謝物 1'-hydroxymidazolam の生成量を増加さ せることが示された [14,24]。また、臨床試験では midazolam と efavirenz を同時に服用した場合 に、血中の代謝物 1'-hydroxymidazolam 濃度の上昇が認められた [25]。この結果は酵素上での 直接的なアロステリック作用が反映されており、薬物の反復服用によって生じる酵素発現量の上昇に基 づく作用 (酵素誘導) とは異なる。しかしながら、efavirenz の CYP3A4 を介した midazolam の代 謝活性化機構について詳細な検討は行われていない。また、efavirenz の CYP3A4 における結合部位 について検討された報告例はない。

本章では、efavirenz の CYP3A4 との親和性並びに midazolam の結合性及び代謝物生成に与 える影響について調べるとともに、分子動力学シミュレーションを用いて efavirenz の CYP3A4 における 結合部位について検討した。

第二節 結果

(1) Midazolam の結合に与える影響

Efavirenz を添加したときの CYP3A4 の吸収スペクトル変化及び差スペクトルを図 8 に示す。 Efavirenz の差スペクトルは 411 nm に谷、432 nm に山となる Type II のスペクトル変化を示し、 CYP3A4 のへム周辺領域に対して結合親和性を示すことが判明した。解離定数 K_d は 517 ± 72 μ M であり、midazolam が示す K_d (64 μ M) と比較すると高い値であった。



図 8. Efavirenz を漸増添加した場合の CYP3A4 の吸収スペクトル変化(上段;スペクトル変化、 下段;差スペクトル)(A)及び差スペクトル変化(B). 矢印はスペクトル変化の方向を示す.

次に、efavirenz 共存時の midazolam 代謝の活性化に及ぼす要因について検討するため、 efavirenz 共存下における midazolam の結合親和性に与える影響を調べた。ここでは Midazolam 添加後から efavirenz 薬物添加時の吸収スペクトルを引いた差スペクトルを求めた。Efavirenz の添加 濃度は 1 μ M から 100 μ M とした。Efavirenz 共存下における midazolam の差スペクトル変化及び 各 K_d をそれぞれ図 9 及び表 1 に示す。Efavirenz は濃度依存的に midazolam の CYP3A4 に対す る K_d を低下させ、検討した最高濃度(efavirenz = 100 μ M)では、 K_d は 15 μ M まで低下した。



図 9. ミダゾラムを漸増添加した場合の CYP3A4 吸収スペクトルから得られた差スペクトルの変化率. ミダゾラムの CYP3A4 結合に及ぼす efavirenz の影響(標準化した差スペクトルとミダゾラム濃度の関 係).

O共存薬物なし、及び▲ 5 µM efavirenz 存在時.

各値は平均値±標準偏差(n=3-5).

表1	Efavirenz が存在する場合の midazolam の CYP3A4 に対する解離定数 Ka	h
<u></u>		v

Efavirenz (µM)	K_{d} of midazolam for CYP3A4 (μ M)
1	68 ± 12
5	45 ± 14
10	36 ± 13
20	31 ± 2
50	19 ± 4
75	18 ± 1
100	15 ± 4

各値は平均値±標準偏差(n=3)

Midazolam の K_d を efavirenz の濃度に対してプロットした。(図 10)。Efavirenz のエフェクター 部位に対する親和性の指標として、midazolam の K_d の低下に 50%の影響を及ぼす efavirenz 濃 度を i K_d と定義し、式 2 より算出した結果、i K_d = 5.6 μ M であった。



図 10. Midazolam の CYP3A4 解離定数に対する efavirenz の影響. 各値は平均値±標準偏差(n=3).

 $Y = Y_0 - K_{d,max} \times [efavirenz] / (iK_d + [efavirenz])$ 式 2 ミダゾラムの解離定数 K_d に対して最大の影響($K_{d,max}$)の半分を与える efavirenz 濃度 (iK_d)の算出.

(2) 1'-hydroxymidazolam 代謝物生成に与える影響

Efavirenz 共存時の 1'-hydroxymidazolam の生成速度を図 11 に示す。 1'-hydroxymidazolamの生成速度とmidazolam濃度の関係はいずれもミカエリス-メンテン式にフィットした。得られたパラメータを表 2 に示した。Efavirenz 非存在時における 1'-hydroxymidazolam 生成の最大速度 V_{max} は 0.47 nmol/min/nmol of CYP3A4 であり、ミカエリス定数 K_m は 14 μ M であった。Efavirenz 共存時において、1'-hydroxymidazolam 生成の V_{max} は efavirenz の濃度依 存的に上昇し、efavirenz 濃度が 30 μ M の場合では 1'-hydroxymidazolam 生成の V_{max} に頭打 ち傾向が認められた。Efavirenz 非存在及び共存時において、midazolamの CYP3A4 への親和性を 表す K_m はほとんど変化しなかった。



図 11. Efavirenz 存在及び非存在下における CYP3A4 の 1'-hydroxymidazolam 生成活性. ● 30 µM、△10 µM 及び▲3 µM efavirenz 共存時並びに○efavirenz 非存在時. 各値は平均値±標準偏差(n=3-7).

			, ,
Efavirenz (μM)	<i>K</i> _m (μΜ)	V _{max} (nmol/min/nmol of CYP3A4)
(-)	0	14 ± 4	0.44 ± 0.12
(+) Efavirenz	3	14 ± 4	0.63 ± 0.16
	10	13 ± 3	0.82 ± 0.26
	30	14 ± 4	0.85 ± 0.31

表 2 Efavirenz の存在及び非存在下における 1'-hydroxymidazolam 生成活性

各値は平均値±標準偏差(n=3-7).

(3) 分子動力学シミュレーションによる efavirenz のエフェクター部位結合

まず、midazolam 結合型の CYP3A4 構造を利用し、ヘム結合部位近傍に配置している midazolam を efavirenz に置換した。配置した efavirenz を 2 ピコ秒ごとに観察した結果、 efavirenz は速やかに CYP3A4 のヘム結合部位から離れ、470 ナノ秒後に CYP3A4 のタンパク質表 面に向かって移動し、最終的にヘムから少し離れた位置においてその構造は安定した(図 12)。この位置は progesterone や α -naphthoflavone などのエフェクター分子が結合すると報告されているエフェク ター部位 [12,21] と類似の位置であった。



図 12. Efavirenz を配置し、動力学シミュレーションを行った際の efavirenz の結合部位の変化. ヘム及び efavirenz を球及び棒モデルで表した.

第三章 Efavirenz 類縁体の薬物間相互作用の解析

第一節 序論

本章では efavirenz が有する化学構造に代謝活性化作用を示す要因があるのかを考察するため、 efavirenz 類縁体(impurity 及び intermediate)を用いて同様の検討を行った。即ち、 efavirenz 類縁体の CYP3A4 との親和性並びに midazolam の結合性及び代謝物生成に与える影響について調べた。

第二節 結果

(1) Efavirenz 誘導体の結合能

Efavirenz impurity 及び efavirenz intermediate の吸収スペクトル変化及び差スペクトルを 図 13 に示す。Efavirenz impurity の差スペクトルは 411 nm に谷、432 nm に山となる Type II のスペクトル変化を示し、efavirenz と同様 CYP3A4 のへム周辺領域に対して結合親和性を示すこ とが判明した。解離定数 K_d は 1200 ± 1000 μ M であり、高い値であった。一方、efavirenz intermediate も 410 nm に谷、433 nm に山となる Type II のスペクトル変化を示し、CYP3A4 のへム周辺領域に対して結合親和性を示すことが判明した。検討可能な濃度範囲(1–400 μ M) において、 K_d は算出できなかった。



図 13. Efavirenz impurity (A)及び efavirenz intermediate (B)を漸増添加した場合の CYP3A4の吸収スペクトル変化(350-500 nm)(上段;スペクトル変化、下段;差スペクトル)並 びに(C)差スペクトル変化率(■efavirenz impurity、▲efavirenz intermediate). 各値は平均値±標準偏差(n=3). 矢印はスペクトル変化の方向を示す.

(2) Midazolam の結合に与える影響

次に、efavirenz impurity 及び intermediate 共存時の midazolam 代謝の活性化に及ぼす 要因について検討するため、efavirenz 類縁体共存下における midazolam の結合親和性に与える影 響を調べた。ここでは Midazolam 添加後から efavirenz 類縁体添加時の吸収スペクトルを引いた差ス ペクトルを求めた。Efavirenz 類縁体の添加濃度は 1 μ M から 100 μ M とした。Efavirenz 類縁体共 存下における midazolam の差スペクトル変化及び得られた K_d をそれぞれ図 14 及び表 3 に示す。 Efavirenz impurity は濃度依存的に midazolam の CYP3A4 に対する K_d を低下させ、検討した 最高濃度 (efavirenz impurity= 100 μ M) では K_d = 26 ± 2 μ M まで低下した。一方、 efavirenz intermediate は添加濃度 100 μ M においても、midazolam の K_d に影響を及ぼさなか った。



図 14. ミダゾラムの CYP3A4 結合に及ぼす各薬物の影響(標準化した差スペクトルとミダゾラム濃度の関係).

各値は平均値±標準偏差(n=3).

(A) ◇共存薬物なし、並びに●50 µM 及び■ 5 µM efavirenz impurity 存在時.

(B) ◇共存薬物なし、並びに●100 µM 及び■ 20 µM efavirenz intermediate 存在時.

Co-existing	K_d of midazolam for CYP3A4 (μ M)		
substrates (µM)	efavirenz impurity	efavirenz intermediate	
1	59 ± 5	-	
5	42 ± 1	-	
20	24 ± 2	62 ± 15	
50	20 ± 1	-	
100	26 ± 2	62 ± 15	

表 3	Efavirenz が存在する場合の midazolam の CYP3A4 に対する解離	定数 Kd

各値は平均値±標準偏差(n=3)

Midazolam の K_d を efavirenz impurity の濃度に対してプロットし (図 15)、最大影響 (K_{d,max})の半分を与える efavirenz impurity 濃度 iK_dを式 2 より算出した結果、iK_d = 3.2 μM であった。



図 15. Midazolam の CYP3A4 解離定数に対する efavirenz impurity の影響. 各値は平均値±標準偏差(n=3).

(3) 1'-hydroxymidazolam 代謝物生成に与える影響

Midazolam の結合親和性に影響を及ぼした efavirenz impurity について、efavirenz impurity 共存時の 1'-hydroxymidazolam の生成速度に対する影響について検討した結果を図 16 および表 4 に示す。Efavirenz impurity 非存在時における 1'-hydroxymidazolam 生成パラメ – タはそれぞれ、V_{max} が 0.44 nmol/min/nmol of CYP3A4 であり、K_m は 14 μM であった。 Efavirenz impurity 共存時において V_{max} は上昇し、Efavirenz impurity 濃度が 30 μM の場合 で非存在時の 1.1 倍であった。また、Efavirenz impurity 非存在及び共存時において、midazolam の CYP3A4 への親和性を表す K_m はほとんど変化しなかった。





●30 µM 及び△10 µM efavirenz impurity 共存時並びに▲efavirenz impurity 非存在時. 各値は平均値±標準偏差(n=3-7).

Efavirenz compounds (µM)		V _{max} (nmol/min/nmol of CYP3A4)
0	14 ± 4	0.44 ± 0.12
3	8 ± 1	0.44 ± 0.058
10	11 ± 4	0.50 ± 0.045
30	11 ± 3	0.49 ± 0.017
	0 3 10 30	$ \begin{array}{c c} $

表 4 Efavirenz impurity の存在及び非存在下における 1'-hydroxymidazolam 生成活性

各値は平均値±標準偏差(n=3-7).

吸収滴定法を用いた薬物間相互作用の判定

CYP3A4 の典型的基質である midazolam の結合親和性を指標として、共存薬物の競合阻害作 用又は活性化作用を判定できることを示した。

競合阻害作用を示すには、まず共存薬物そのものが触媒部位に対して結合親和性を有することが必要である。Ketoconazole は DDI を考える上で、CYP3A4 に対する強力かつ可逆的な阻害作用を有する化合物である。吸収滴定結果から Ketoconazole の K_d は 6 μ M であり、midazolam の K_d

(64 μM) に比べて低く、CYP3A4 に対する結合親和性は非常に強いことが示された。 Ketoconazole 共存下において、midazolam の Kd は上昇し、結合親和性が低下した。これは ketoconazole のイミダゾール基の窒素原子がヘムに配位することで、midazolam のヘム周辺への結 合を阻害したためである。

一方、 α -naphthoflavone は CYP3A4 に対する活性化作用を示す化合物として知られている。吸 収滴定結果から α -naphthoflavone はとル式にフィットし、 K_d は 21 μ M であった。midazolam の K_d は、 α -naphthoflavone 共存下において値が低下した。これは α -naphthoflavone が CYP3A4 に対 して Type I スペクトル変化を示し、ヘム周辺に親和性を有する一方で、同じ Type I スペクトル変化を 示す midazolam の結合親和性を上昇させたことを示している。 α -naphthoflavone は midazolam と同様 CYP3A4 のヘム周辺に結合することから、共存時にはこれらの薬物の競合により midazolam の 結合親和性は低下するものと推察されるが、midazolam の結合親和性は上昇した。したがって、 α -naphthoflavone は midazolam のへム周辺への結合を促す潜在性も有していることが考えられ る。

α-naphthoflavone は CYP3A4 の代謝を活性化する性質を有することが報告されてきた [3,26] が、そのメカニズムは明らかになっていない。近年α-naphthoflavone は CYP3A4 のへム部分から離れ た周辺領域に結合するモデルが報告されており [27]、この部位への結合が代謝活性化に関与している ことが予想される。通常 Type I の結合スペクトルを示す薬物は、midazolamの結合に対しては競合阻 害薬として働くため、midazolamの K_d は上昇すると推測されるが、α-naphthoflavoneのように midazolamの K_d を低下させる薬物も存在する。したがって、吸収滴定を用いて midazolamの K_d を 観測することで共存薬物の CYP3A4 に対する代謝活性化能を予測することが可能と考えられる。

Efavirenz の薬物間相互作用の解析

Efavirenz が CYP3A4 の触媒部位に対して親和性を有するとともに、エフェクター部位に対してはより 優先的に結合し、CYP3A4 基質 midazolam の結合親和性を高めていることを示した。

Efavirenz は CYP2B6 により選択的に代謝される [23]ため、CYP3A4 で代謝されるとの報告例はない。一方で、CYP3A4 に対する活性化作用のみが報告されている [14,25]。このため CYP3A4 のへム領域への親和性を確認した結果、典型的基質である midazolam と比べると efavirenz の Kd は非常に高いものの、触媒部位に対し結合親和性を有することが明らかになった。

Efavirenz は Type II スペクトル変化を示した。 Type II の結合様式は ketoconazole を含め各種 CYP 阻害剤で観察される変化 [28,29]であるため、efavirenz と midazolam が共存すると midazolam の結合はある程度妨げられると予想される。 この予想は efavirenz が CYP3A4 基質代 謝を阻害するという過去の報告 [30]と矛盾がない。しかしながら、efavirenz の濃度依存的に midazolam の K_d は低下し、midazolam の CYP3A4 に対する結合能が上昇した。 Efavirenz の触 媒部位に対する K_d は 500 μ M 程度の高い値を示す一方で、midazolam の K_d の低下に 50%の影 響を及ぼす efavirenz 濃度 i K_d 値は 5.6 μ M であった。したがって、efavirenz のエフェクター部位への 結合親和性は触媒部位に比べて約 100 倍高いと考えられた。また、この濃度 (i K_d = 5.6 μ M) は臨 床で 400 mgを単回経口投与した場合に観察されている血中濃度 (C_{max} = 3 μ M) とほぼ同程度 である [25]。したがって、efavirenz がヒト肝ミクロソームや CYP3A4 発現系を用いた *in vitro* 実験及 び臨床薬物相互作用試験 [31]で midazolam 代謝物である 1'-hydroxymidazolam の生成量 を上昇させた背景には、efavirenz のエフェクター部位への結合に起因した midazolam の CYP3A4 に 対する結合親和性の向上が大きく関係していると考えられた。

分子動力学シミュレーションの結果、efavirenz は progesterone 結合型の CYP3A4 (PDB: 1W0E) で見られるエフェクター部位と類似の位置でより安定に存在できる可能性が提示された。このと きの基質結合部位について、progesterone 結合型 CYP3A4 と比較すると、efavirenz 及び progesterone のどちらの結合型でも近傍に存在する残基として Phe213 及び Phe220 が挙げられ、 どちらも 4–5 Å の距離にこれらの Phe 残基が存在していた。さらに、Phe213 及び Phe220 周辺の残 基は efavirenz 結合型シミュレーション、progesterone 結合型結晶構造 (PDB: 1W0E)、 midazolam 結合型結晶構造 (PDB: 5TE8) の全てで大きくその位置が変化しており (図 17)、 Phe213 及び Phe220 との相互作用によって、周辺残基の位置が変化することで、エフェクター効果を 発揮することが示唆された。

Efavirenz と progesterone は化学構造上、際立った類似性を上げることは難しいが、共に主骨格として環構造を有している。Efavirenz 及び progesterone の環構造と上記に挙げた環構造を有する疎水性アミノ酸(Phe)が相互作用することが、CYP3A4 にアロステリックな変化を誘発し、エフェクター作用を発現している可能性が考えられる。



図 17. エフェクター部位への結合と Phe213, Phe220 周辺残基の動き.

(A) efavirenz 結合型シミュレーション、(B) progesterone 結合型結晶構造(PDB: 1W0E)、

(C) midazolam 結合型結晶構造(PDB: 5TE8).

へムを紫、薬物を黄緑、Phe213 及び Ph220 をシアン、動きが大きい周辺残基をオレンジで示す.

さらにここでは、efavirenzがCYP3A4代謝のマーカー反応である1'-hydroxymidazolamの生成 速度を高めることを示した。同様な結果は過去に肝臓ミクロソーム画分又は他の CYP3A4 発現系ミクロ ソームを用いた系ですでに報告例「31〕があるが、本実験系でも再現された。Efavirenz 非存在では 1'-hydroxymidazolam 生成の V_{max} は 0.44 nmol/min/nmol of CYP3A4 であったが、 efavirenz 30 µM 存在時には約 1.8 倍 (0.85 nmol/min/nmol of CYP3A4) に増加した。 Efavirenz 及び midazolam はいずれも CYP3A4 の触媒部位に親和性を有するため、efavirenz 共 存時には midazolam 代謝における親和性を表すミカエリス定数 Km は上昇することが予想される。しか し、Km値に変化は認められなかった。したがって、efavirenzはmidazolamのCYP3A4への結合性に 対し、少なくとも負の影響(競合阻害)を及ぼさないと考えられた。また、一方で、最大反応速度は efavirenz の濃度依存的に上昇したため、efavirenz のエフェクター部位への結合とそれに伴うエフェクタ ー効果(代謝活性化)が現れていると考えられた。Km は薬物の結合速度定数と代謝物の解離速度 定数の複合パラメータとして記述できる(式 3)ことから、efavirenzの存在下ではエフェクター作用によ り midazolam の結合親和性を表す K_d (= k₋₁/k₁) が低下した一方で、1'-hydroxymidazolam 生成速度定数 k2 が上昇したために、見かけ上 Km に変化が現れなかったとも考えられる。したがって、 efavirenz がこの濃度範囲(3–30 μ M)においてエフェクター部位へ結合することにより midazolam の結合親和性を高めたことに加え、CYP3A4 において E+P へのターンオーバー (k2に相当)を増大させ るような変化も生じた可能性があると考えられた。

Efavirenz 類縁体の薬物間相互作用の解析

Efavirenz impurity が CYP3A4 のへム周辺領域に親和性を有するとともに、CYP3A4 の基質である midazolam の結合親和性を高める性質を有することを示した。一方で、efavirenz intermediate は CYP3A4 のへム周辺領域に親和性を有するものの、検討した濃度(~100 μM)では midazolam の結合親和性に全く影響を及ぼさなかった。

Efavirenz impurity は Type II のスペクトル変化を示し、midazolam の CYP3A4 結合に対して 競合阻害作用を示すと考えられる。しかし、efavirenz impurity 共存時において midazolam の K_d は efavirenz impurity 濃度依存的に低下し、midazolam の CYP3A4 に対する結合親和性は上 昇した。Efavirenz impurity の触媒部位に対する K_d は 1200 μ M 程度の高い値を示す一方で、 midazolam の K_d を 50%低下させる efavirenz impurity 濃度は 3.2 μ M と低濃度であった。

Efavirenz intermediate においても Type II のスペクトル変化が観察されたが、midazolam の結合能には影響を及ぼさなかった。

Efavirenz impurity は構造中に cyclopropylethynyl 基を有さないが、benzoxazin-2-one を 有する点は efavirenz と共通している。一方、efavirenz intermediate は cyclopropylethynyl 基を有しているが、benzoxazin-2-one 構造を有さない。この点から、efavirenzの midazolam の結 合性を高める作用をもたらす特徴として、efavirenzの構造中の benzoxazin-2-one 部分が関係して いる可能性がある。

EfavirenzはCYP2B6の基質 [23]であり、主として8位水酸化体が生じるが、CYP3A4による代謝は報告されていない。詳細な代謝経路が報告されている efavirenz 類似化合物は DPC-963 [(S)-5,6-difluoro-4-cyclopropylethynyl-4-trifluoromethyl-3,4-dihydro-2(1H)-quinaz olinone](図18)のみである。DPC-963はCYP3A4によって代謝を受けると報告されており [32]、 oxirene 中間体を生じて cyclobutenyl ketone 中間体が導かれる経路と *p*-benzoquinone imine 中間体を生じて 6 位水酸化体(M7)が導かれる経路に関わっている(図18)。DPC-963 は efavirenz とは異なる qunazolinone 構造を有するため、同様な結合実験を行った場合、化学構造とCYP3A4に対する活性化作用の関係について新たな情報が得られる可能性がある。



図 18. DPC-963 の推定代謝経路の一部.

CYP3A4 基質の代謝を活性化する作用は、CYP3A4 の触媒部位とは別の領域に存在するエフェク ター部位に対する薬物の結合が一つの引き金になると考えられているが、この部位に対する結合親和性 について化学構造の特徴から考察した例はない。今回 efavirenz の類似化合物の中に、エフェクター部 位に対して親和性を有する化合物が見出されたことは、今後 CYP3A4 の活性化作用における構造活 性相関を把握するための有意義な知見となりうる。 これまでに efavirenz による midazolam の代謝活性化は *in vitro* 試験結果や臨床薬物相互作 用試験結果で示されてきたが、この構造的なメカニズムは明らかになっていない。本研究ではこれを明らか にするために、UV-VIS 分光計を用いて CYP3A4 の代謝活性に関するメカニズムを解明することを目指 した。

Efavirenz は主に CYP2B6 によって代謝され、CYP3A4 の代謝への関与はほとんどない [23]。本 研究において efavirenz は CYP3A4 に対し type II の結合様式を示し、得られた解離定数 K_d は 517 μ M であった。したがって、efavirenz が CYP3A4 代表的基質 midazolam が共存した場合、CYP3A4 への結合を巡って競合的に阻害し合う可能性が考えられた。しかしながら、midazolam の CYP3A4 に 対する K_d は efavirenz 濃度依存的に低下し、midazolam の CYP3A4 に対する結合親和性が上昇 した。この作用は低濃度 (iK_d = 5.6 μ M) から観察され、efavirenz が触媒部位 (K_d = 517 μ M) に比べてエフェクター部位に対する親和性が高いことが明らかになった。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 μ M) 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考えられた。この時生じる代謝活性化を 1'-hydroxymidazolam 生成速度で観 察すると、ミカエリス定数 K_m は影響を受けなかったことから、efavirenz が midazolam の結合性を上昇 させ、かつ、触媒部位における midazolam の代謝に efavirenz が競合せず代謝を促進したことが示さ れた。また、分子動力学シミュレーションを用いた検証でも、efavirenz が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示され、efavirenz のエフェクター作用が支持された。さらに、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 と同様の効果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。

Efavirez は反復投与により CYP3A4 発現量の増加をもたらし、他薬の代謝活性を増大させる性質、 即ち酵素誘導作用を有することも報告されている [33]。臨床現場において医薬品は通常、複数回又 は長期にわたり投与されるため、これによって他薬の血中濃度の低下がもたらされると、薬効の減弱又は 代謝物生成量の増加が懸念される。酵素誘導作用が CYP3A4 の発現を調節する因子(遺伝子発 現)を活性化することによって起きるのに対し、本研究で示したアロステリックな CYP3A4 の活性化は、 直接酵素に対して efavirenz が作用することによって引き起こされている。酵素誘導作用と同様にして、 臨床現場でこの直接的な作用が発現した場合にも、efavirenz は他薬の血漿中濃度を低下させ、治 療効果の減弱をもたらす可能性がある。ただ、複数回又は長期にわたり投与される治療では、代謝活 性化による急性のリスクは酵素誘導作用によって覆われる可能性があり、顕在化しにくい。実際に efavirenz (ストックリン錠)の添付文書には酵素誘導作用に対するリスクのみが掲載されている。しか しながら、代謝の活性化も同様に、効果の減弱や活性代謝物による毒性の増悪をもたらす可能性があ る。したがって、医薬品を開発する上ではいずれの作用も避けることが望ましい。

本研究では 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。分子動力学シミュレーションにより efavirenzのエフェクター部位に対する結合親和性を推定し、類縁体を用いてエフェクター作用を示す化 学構造を提示したことは、医薬品開発を進める上で、エフェクター作用に基づくDDIの発生リスクを低減 した化合物の探索に大変有意義な情報になると考えられた。

実験方法

(1) CYP3A4 の大量培養及び精製

(1)-1 大量培養

CYP3A4 の遺伝子を組み込んだ発現用プラスミドベクター pBEX を、大腸菌株 BL21-Gold (DE3) に形質導入した。それを 100 µg/mL ampicillin sodium を含む LB 培地中で 600 nm における吸 光度 OD₆₀₀ が 0.1 になるまで 37℃で前培養を行った。培養液 50 mL を 0.5 mM 5-アミノレブリン酸

(ALA)、100 µg/mL ampicillin sodium、1 mM cimetidine を含む2LのTB 培地中で30℃、 振盪速度 130 rpm の条件下で37-40 時間培養した。

(1)-2 粉砕·可溶化

以下の操作はすべて4℃で行った。4700 gで培養液を遠心し、回収した菌体の重量を測定した後、 -80℃で冷凍した。流水により解凍した菌体に2 mL/菌体 1 g の量の Lysis buffer で懸濁し、約 12 時間撹拌した。懸濁液を 8000 g で 40 分遠心して上清を取り除いた後、菌体を Lysis buffer と同 量の TMK buffer で 4 時間懸濁した。懸濁敵を 100–150 mL ずつ 300 mL のガラス製のビーカーに 分注し、超音波発生装置により超音波破砕(Output: 7、Duty cycle: 20、1分、1回)を行った。 得られた懸濁液を超遠心(33000 rpm、1 時間)した。遠心後すぐにオートピペッターを用いて分離し、 沈殿に Lysis buffer と同量の Solubilization buffer のうちの約 2/3 の量を加えて懸濁した。また、 Solubilization buffer 全量で 0.6%になる分量の CHAPS を Solubilization buffer の残りの約 1/3 で懸濁した。両者が十分に懸濁された後、deoxyribonuclease I と CHAPS 溶液を CYP3A4 の 懸濁液に加え、撹拌することで可溶化した。CHAPS 溶液添加から 2 時間後に超遠心(40000 rpm、 1 時間)を行った。遠心後すぐにオートピペッターを用いて上清を回収し、透析(100 mM buffer、5 mM cimetidine、1 mM DTT、50 mM KCl)を行うことで、CHAPS を取り除いた。

(1)-3 精製

以下の操作はすべて 4℃で行った。精製は 3 種類のカラム (DEAE-Sepharose Fast Flow、 Octyl-Sepharose、Hydroxy Apatite Bio Gel) を用いて行った。透析後の CYP3A4 を DEAE-Sepharose Fast Flow カラムに通し、不要なタンパク質を除去した。さらに CYP3A4 溶液中の KCl 濃度が 150 mMとなるように KCIを加え、静かに撹拌した。 次に KCI 濃度を調整した CYP3A4 溶液を Octyl-Sepharose カラムに通し、CYP3A4 を吸着させた。 1 L の 100 mM KPi buffer (pH 7.4)

(150 mM KCl、5 mM cimetidine、1 mM DTT 含む) で洗浄した後、0.1-1% Triton X-100 の濃度勾配を有する 100 mM KPi buffer (pH 7.4) (150 mM KCl、5 mM cimetidine、 1 mM DTT 含む) で溶出を行った。フラクションの Soret 帯の吸光度を測定し、最も吸光度が高いフラ クションの A_{soret}を 1 としたとき、A_{soret}が 0.5 以上のフラクションを集めた。この溶液を 5 倍希釈し、塩濃 度を 20 mM KPi buffer (30 mM KCl、5 mM cimetidine、1 mM DTT 含む) とした後、 Hydroxy Apatite Bio Gel カラムにアプライし、CYP3A4 を吸着させた。ここで各種測定の妨げとなる Triton X-100 を除去するため、500 mL 以上の 20 mM KPi buffer (pH 7.4) (5 mM cimetidine、1 mM DTT、0.1% CHAPS 含む)で洗浄した。その後、500 mM KPi buffer (pH 7.4) (5 mM cimetidine、1 mM DTT 含む)で CYP3A4 を溶出し、透析(100 mM KPi buffer(pH 7.4))により cimetidine と DTT を除去した。最終的に、Amicon Ultra-15 30,000 MWCO を用いて濃縮と 100 mM KPi buffer(pH 7.4)への buffer 交換を行った。 CYP3A4 の濃 度測定を行った後、液体窒素で瞬間凍結し、-80℃で冷凍保存した。

(2) CYP3A4 の濃度測定

濃度の決定は、ヘムタンパク質固有の方法であるピリジンヘモクロム法を用いて算出した。ヘムのアルカ リ性溶液(pH 11–12)にピリジン(最終濃度 10%)を加えて sodium dithionite で還元すると、 プロトヘムに特有な吸収スペクトルを示す。プロトヘムのミリモル吸光係数 ε_{556 nm} = 34.4 mM⁻¹cm⁻¹を 用いて、タンパク質の濃度を算出した。

(3) 吸収滴定法

全ての操作を 25℃で行った。100 mM KPi buffer (pH 7.4) に対し、CYP3A4 が 8 µM となる ように調製した。Midazolam(和光純薬工業)、ketoconazole(和光純薬工業)、 α-naphthoflavone(和光純薬工業)、efavirenz(図 5A, 和光純薬工業)、Efavirenz impurity (図 5B, Rac 6-chloro-1,4-dihydro-4-(1-pentynyl)-4-(trifluoromethyl)-2 H-3,1-benzoxazin-2-one, Toronto Research Chemicals) 及び efavirenz intermediate (S)-1-(2-amino-5-chlorophenyl)-1-(trifluoromethyl)-3-cyclopropyl-(図 5C, 2-propyn-1-ol, Toronto Research Chemicals)はdimethylsulfoxide(DMSO、和光純薬 工業)に添加濃度の 1000 倍濃度液となるよう溶解した。CYP3A4 溶液に薬物溶液を添加し、 420nmでの吸光度が安定化するのを待った後に200-750 nmの吸収スペクトルを測定した。薬物終 濃度が Midazolam、Efavirenz 及び efavirenz intermediate は 1–400 µM、 ketoconazole は 1–45 μM, α -naphthoflavone は 1–120 μM, 及び efavirenz impurity は 1–100 μM となるよ う、薬物溶液添加ごとに測定操作を繰り返した。観察されたスペクトル変化を解析し、解離定数 Kaを算 出した。Ketoconazole、 α -naphthoflavone、efavirenz、efavirenz impurity 又は efavirenz intermediate 共存時の midazolam のスペクトル変化は、ketoconazole(終濃度 5 µM)、 α-naphthoflavone(終濃度 20 µM)、又はいつかの efavirenz、efavirenz impurity 及び efavirenz intermediate 添加時に観察されたスペクトルを差し引いて解析し、解離定数 Kdを算出し た。Kdは CYP3A4 と各薬物の結合親和性を示すパラメータとなる。

(4) Cytochrome P450 reductase (CPR) の大量培養と精製

(4)-1 大量培養

CPR の遺伝子を発現用プラスミドベクター pET-b15 に組み込み、大腸菌株 BL21-Gold (DE3) (Stratagene)に形質導入した。それを 100 µg/mL ampicillin sodium を含む LB 培地中 37℃、 振盪速度 100 rpm で 12 時間前培養を行った。培養液を 100 µg/mL ampicillin sodium を含 む 50 倍量の本培養用 LB 培地中で 37℃、振盪速度 125 rpm の条件下で培養した。その後、紫外 可視吸収分光計(BECKMAN DU800)を用いて LB 培地の 600 nm の吸光度を測定し、約 0.7 になったところで LB 培地を氷浴上で速やかに冷却した。LB 培地の温度が 15℃になったところで、再び 培養器で 15℃、80 rpm の条件下で 6 時間培養を行った。

(4)-2 破砕·可溶化

以下の操作はすべて 4℃で行った。4000 g で回収した菌体を-80℃で冷凍した後、2 時間後に菌 体を解凍した。そして約 100 mL の遠心用 20 mM リン酸カリウム緩衝液で懸濁し、緩衝液 1 mL に 対して 1 mg の Lysozyme と微量の deoxyribonuclease I を加えた。これを終夜撹拌した後、高圧 連続式ホモジナイザー(AVESTIN)を用いてフレンチプレスによって菌体を破砕した。得られた懸濁液 に 200 mL の遠心用 20 mM リン酸カリウム緩衝液を加え、Triton X-100 を終濃度 1%になるように 添加して 2 時間 4℃で撹拌し、CPR を膜画分からはがして可溶化した。その後、超遠心(30000 rpm、60 min)により上清を回収した。

(4)-3 精製

精製はすべて 4℃で行った。超遠心後の上清を 2′5′ADP Sepharose 4B カラムを通して吸着させ、 以下に示すカラム用 20 mM リン酸カリウム緩衝液で洗浄した後、さらに 0.5 mM 2-AMP を加えたカラ ム用 20 mM リン酸カリウム緩衝液で再度カラムの洗浄を行った。 溶出は 10 mM NADP⁺を加えたカラ ム用 20 mM リン酸カリウム緩衝液で行い、得られたフラクションは Amicon Ultra-15 30000 MWCO を用いて 3000 g で濃縮し、緩衝液を 100 mM リン酸カリウム緩衝液に置換した。

(4)-4 CPR の濃度測定

酸化型 CPR のミリモル吸光係数 ε 454 nm = 21.4 mM⁻¹ cm⁻¹を用いて濃度を測定した。CPR の酵素活性(Units/mL)はシトクロム c を用いて決定した。反応液(全 300 μL)は 100 mM リン 酸カリウム緩衝液、50 μM シトクロム c (Sigma)、NADPH 再生システム(1 mM NADP⁺、 2.5 mM グルコース-6-リン酸(G6P)、2 Units/mL グルコース-6-リン酸脱水酵素(G6PDH) (BD Gentest)を含むように調製した。

反応は 37℃で 5 分間プレインキュベートした NADPH 再生システムを加えて開始し、紫外可視吸収 分光計(BECKMAN DU 800)を用いて 550 nm の吸光度の変化を 37℃の条件下で 15 秒おき に測定した。得られた吸光度の変化と、550 nm におけるシトクロム c のミリモル吸光係数 $\Delta \epsilon$ 550 nm =21.0 mM⁻¹ cm⁻¹を用いて比活性を計算した。1 Unit の CPR は pH 7.4、37℃で 1 分間に 1 μ mol のシトクロム c を還元すると定義した。

(5) 薬物間相互作用によるミダゾラム代謝速度(代謝物生成速度)の変化

Midazolam の代謝物 1'-hydroxymidazolam は CYP3A4 の代謝活性のマーカー反応として用 いられており、efavirenz 又は efavirenz impurity の共存下での 1'-hydroxymidazolam 生成速 度を観察した。代謝反応液(190 µL)は 100 mM KPi buffer、30 µg/mL phosphatidylcholine、0.3 µM CYP3A4、0.6 µM cytochrome b₅、2.4 µM cytochrome P450 reductase に適当な濃度 midazolam を含むように調製した。Midazolam は DMSO/methanol(25/75, v/v) 混液で調製したものを反応液に対して終濃度 0.5% (v/v) と なるよう添加した。Efavirenz及び efavirenz impurity は DMSO/methanol(1/1, v/v)混液で 調製したものを反応液に対して終濃度 0.5%(v/v)となるよう添加した。また、反応開始液(10 µL) は NADPH generating system として代謝反応液に混ぜた後に 1 mM NADP⁺、2.5 mM glucose-6-phosphate, 2 U/mL glucose-6-phophate dehydrogenase, 2.5 mM MgCl₂ の組成となるよう調製した。反応液と反応開始液は予め37℃で5分間プレインキュベートした後、この二 つの溶液を混合し、代謝反応を開始させた。反応開始 0、5、10 及び 15 分後に 20 µM diazepam を含む methanol を 200 µL 添加し、激しく撹拌して反応を停止させた。その後、サンプルを遠心 (14000 rpm、10 min) して得られた上清を HPLC へ注入した。 HPLC 分析は ODS-3 カラム (5 µm, 150 × 4.6 mm ID; ジーエルサイエンス) を用いて 10 mmol/L 酢酸ナトリウム (pH 4.7)及 びアセトニトリルのグラジエント溶離で実施した。HPLC のクロマトグラム上で efavirenz 及びその関連物 質が 1'-hydroxymidazolam 及び diazepam の測定に影響を及ぼさないことを確認した。HPLC の 1'-hydroxymidazolam 及び diazepam のクロマトグラムから、1'-hydroxymidazolam 生成量を 決定した。この時間変化から代謝物の生成速度を得た後、代謝活性パラメータ Km 及び Vmaxを算出し た。

(6) 分子動力学シミュレーションによる efavirenz の結合部位推定

Protein Data Bank (PDB) に登録されている CYP3A4 の構造 PDB ID: 5TE8 を採用し、 efavirenzのCYP3A4に対する結合部位を予測するための鋳型構造とした。5TE8はX線結晶解析 により得られた構造であり、構造分解能は 2.7 Å である。ヘム及び efavirenz の力場は Acpype program [34]で作成した。欠失残基は Modellar program [35]を用いて補い、水素原子は pH7 の条件下として付加した。構造は長方形型区画の中心に配置し、水分子で満たした。適切な数のナト リウム及び塩化物イオンを付加し、イオン濃度 150 mM の電気的中性状態を構築した。タンパク質と区 画の間に最低 18 Å 確保したため、水分子が約 3 万個配置された。カ場パラメータとして、アミノ酸残基 及びイオンには amber03 力場 [36]、水分子には TIP3P 力場 [37]を用いた。重元素に restrained potential 法を適用し、TIP3P モデルの水素原子は剛体条件で SETTLE アルゴリズム [38]を用いて拘束した。静電気的相互作用は particle-mesh-Ewald method [39]を用いて計算 し、van der Waals 相互作用の半径のカットオフ値を8Åとした。系の電位は最急降下法で最小化し た。系を Berendsen アルゴリズム [40]を用いて、ある一定の温度条件(310K)で一定の原子数を 用いてシミュレーションした。Linear constraint solver (LINCS)アルゴリズム [41]を用いてタンパク質 中の化学結合を厳格に分類した。時間間隔は 2 フェムト秒に設定し、Parrinello-Rahman barostat [42]及び Nose-Hoover thermostat [43,44] アルゴリズムを用いて、一定の原子数、 気圧(1 atm)及び温度(310 K)でシミュレーションを実行した。拘束ポテンシャルを解除し、本計 算を開始した。全体系の座標を2ピコ秒ごとに記録した。ただし、始めの50ナノ秒の軌跡は平衡化とし、 削除した。分子動力学シミュレーションは InfiniBand ネットワークに接続した Xeon E5 2600v3 搭載 の Gromacs-4.5.5 program package [45]を用いて行った。

引用文献

1. Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cellular and Molecular Life Sciences Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. Cell. Mol. Life Sci. 2001;58:737–47.

Omura T. Heme-thiolate proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005;338:404–
 Omura T. Heme-thiolate proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005;338:404–

3. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Pharmacol. Ther. 2013;138:103–41.

4. European Medicines Agency. Guideline on the Investigation of Drug Interactions (Final). EMA/CPMP/EWP/565/95/Rev. 1. 2012;June.

 Food and Drug Administration. In Vitro Metabolism- and Transporter- Mediated Drug-Drug Interaction Studies (Guidance for Industry). Cent. Drug Eval. Res. (CDER), Food Drug Adm. Rockville, MD. 2017;October.

6. Wang B., Yang LP, Zhanf XZ, Huang SQ, Bartlam M ZS. New insights into the structural characteristics and functional relevance of the human cytochrome P450 2D6 enzyme. Drug Metab. Rev. 2009;41:573–643.

7. Isin EM, Guengerich FP. Multiple Sequential Steps Involved in the Binding of Inhibitors to Cytochrome P450 3A4. J. Biol. Chem. 2007;282:6863–74.

8. Ekroos M, Sjogren T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. Proc. Natl. Acad. Sci. 2006;103:13682–7.

9. Sevrioukova IF, Poulos TL. Dalton Transactions. Dalt. Trans. 2013;42:3116–26.

Sevrioukova IF, Li H, Zhang H, Peterson JA, Poulos TL. Structure of a cytochrome
 P450 – redox partner electron-transfer complex. Proc. Natl. Acad. Sci. 1999;96:1863–
 8.

11. Rittle J, Green MT. Cytochrome P450 Compound I: Capture, Characterization, and C-H Bond Activation Kinetics. Science (80-.). 2010;330:933–8.

12. Williams PA, Cosme J, Vinkovic DM, Ward A, Angove HC, Day PJ, et al. Crystal Structures of Human Cytochrome P450 3A4 Bound to Metyrapone and Progesterone. Science (80-.). 2004;305:683–7.

13. Henshall J, Galetin A, Harrison A, Houston JB. Comparative analysis of CYP3A heteroactivation by steroid hormones and flavonoids in different in vitro systems and potential in vivo implications. Drug Metab. Dispos. 2008;36:1332–40.

14. Blobaum AL, Bridges TM, Byers FW, Turlington ML, Mattmann ME, Morrison RD, et al. Heterotropic Activation of the Midazolam Hydroxylase Activity of CYP3A by a Positive Allosteric Modulator of mGlu 5: In Vitro to In Vivo Translation and Potential Impact on Clinically Relevant Drug-Drug Interactions. Drug Metab. Dispos. 2013;41:2066–75. 15. Ngui JS, Chen Q, Shou M, Wang RW, Stearns RA, Baillie TA, et al. In vitro stimulation

of warfarin metabolism by quinidine: Increases in the formation of 4'- and 10-hydroxywarfarin. Drug Metab. Dispos. 2001;29:877–86.

16. Ueng Y, Kuwabara T, Chun Y, Guengerich FP. Cooperativity in Oxidations Catalyzed by Cytochrome P450 3A4. Biochemistry. 1997;36:370–81.

17. Teo YL, Ho HK, Chan A. Metabolism-related pharmacokinetic drug – drug interactions with tyrosine kinase inhibitors : current understanding , challenges and recommendations. Br. J. Clin. Pharmacol. 2014;79:241–53.

Yu H, Balani SK, Chen W, Cui D, He L, Humphreys WG, et al. Perspective
 Contribution of Metabolites to P450 Inhibition – Based Drug – Drug Interactions :
 Scholarship from the Drug Metabolism Leadership Group of the Innovation and Quality
 Consortium Metabolite Group. Drug Metab. Dispos. 2015;43:620–30.

19. Hutzler JM, Tracy TS. Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions. Drug Metab. Dispos. 2002;30:355–62.

Davydov DR, Halpert JR. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology Allosteric
 P450 mechanisms: multiple binding sites , multiple conformers or both? Expert Opin.
 Drug Metab. Toxicol. 2008;4:1523–35.

21. Sevrioukova IF, Poulos TL. Structural basis for regiospecific midazolam oxidation by human cytochrome P450 3A4. Proc. Natl. Acad. Sci. 2017;114:486–91.

22. Basran J, Rafice SA, Chauhan N, Efimov I, Cheesman MR, Ghamsari L, et al. A Kinetic , Spectroscopic , and Redox Study of Human Tryptophan. Biochemistry. 2008;47:4752–60.

23. Ward BA. The Cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) Is the Main Catalyst of Efavirenz Primary and Secondary Metabolism: Implication for HIV/AIDS Therapy and Utility of Efavirenz as a Substrate Marker of CYP2B6 Catalytic Activity. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003;306:287–300.

24. Keubler A, Weiss J, Haefeli WE, Mikus G, Burhenne J. Drug interaction of efavirenz and midazolam: Efavirenz activates the CYP3A-mediated midazolam 1'-hydroxylation in vitro. Drug Metab. Dispos. 2012;40:1178–82.

25. Mikus G, Heinrich T, Bödigheimer J, Röder C, Matthee A-K, Weiss J, et al.
Semisimultaneous Midazolam Administration to Evaluate the Time Course of CYP3A
Activation by a Single Oral Dose of Efavirenz. J. Clin. Pharmacol. 2017;57:899–905.
26. Wang RW, Newton DJ, Liu N, Atkins WM, Lu AYH. Human Cytochrome P-450 3a4 : in
Vitro Drug-Drug Interaction Patterns. Drug Metab. Dispos. 2000;28:360–6.

27. Roberts AG, Atkins WM. Energetics of heterotropic cooperativity between a-naphthoflavone and testosterone binding to CYP3A4. Arch. Biochem. Biophys. 2007;463:89–101.

28. Sutter R, Guengerich FP. Inhibition of Human Cytochrome P450-catalyzed Oxidations of Xenobiotics and Compounds. Cancer Res. 1997;57:4757–64.

29. Taavitsainen P, Juvonen R, Pelkonen O. In vitro inhibition of cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes by a potent CYP2A6 inhibitor,

trans-2-phenylcyclopropylamine (tranylcypromine), and its nonamine analog, cyclopropylbenzene. Drug Metab. Dispos. 2001;29:217–22.

30. von Moltke LL, Greenblatt DJ, Granda BW, Giancarlo GM, Duan SX, Daily JP, et al. Inhibition of Human Cytochrome P450 Isoforms by Nonnucleoside Reverse

Transcriptase Inhibitors. J. Clin. Pharmacol. 2001;41:85–91.

31. Kosugi Y, Takahashi J. Species differences and substrate specificity of CYP3A heteroactivation by efavirenz. Xenobiotica. 2015;45:345–52.

32. Chen H, Chen W, Gan L-S, Mutlib AE. Metabolism of

(S)-5,6-difluoro-4-cyclopropylethynyl-4-trifluoromethyl-3,

4-dihydro-2(1H)-quinazolinone, a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, in human liver microsomes. Metabolic activation and enzyme kinetics. Drug Metab. Dispos. 2003;31:122–32.

33. Hariparsad N, Nallani SC, Sane RS, Buckley DJ, Buckley AR, Desai PB. Induction of CYP3A4 by Efavirenz in Primary Human Hepatocytes: Comparison With Rifampin and Phenobarbital. J. Clin. Pharmacol. 2004;44:1273–81.

34. Monteiro LM, Lione VF, Carmo FA, Amaral LH, Silva JH, Nasciutti LE, et al.
Development and characterization of a new oral dapsone nanoemulsion system :
permeability and in silico bioavailability studies. Int. J. Nanomedicine. 2012;7:5175–82.
35. Sali A, Blundell TL. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial
Restraints. J. Mol. Biol. 1993;234:779–815.

36. Duan Y, Wu C, Chowdhury S, Lee MC, Xiong G, Zhang W, et al. A Point-Charge Force Field for Molecular Mechanics Simulations of Proteins Based on Condensed-Phase Quantum Mechanical Calculations. J. Comput. Chem. 2003;24:1999–2011.

37. Jorgensen WL, Jayaraman C, Madura JD. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. J. Chem. Phys. 1983;79:926.

38. Miyamoto S, Kollman PA. SETTLE : An Analytical Version of the SHAKE and RATTLE Algorithm for Rigid Water Models. J. Comput. Chem. 1992;13:952–62.

39. Essmann U, Perera L, Berkowitz ML. A smooth particle Mesh Ewald method. J. Chem. Phys. 1995;103:8577–93.

40. Berendsen H, Postma J, van Gunsteren W, Dinola A, Haak J. Molecular dynamics with coupling to an external bath. J. Chem. Phys. 1984;81:3684.

41. Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM. LINCS : A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. J. Comput. Chem. 1997;18:1463–72.

42. Parrinello M, Rahman A. Crystal structure and pair potentials: a molecular-dynamics study. Phys. Rev. Lett. 1980;45:1196–9.

43. Hoover WG. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. Phys. Rev. A. 1985;31:1695–7.

44. Nose S. A unified formulation of the constant temparature molecular-dynamics methods. J. Chem. Phys. 1984;81:511–9.

45. Pronk S, Pall S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. Bioinformatics. 2013;29:845–54.

謝辞

本稿を終えるにあたり、ご親切なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授 宇野 公之 先生、同教授 堤 康央 先生に心より深くお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、直接のご指導を賜り、日常の様々な議論を通じて多くの知識や示唆を いただきました武庫川女子大学大学院薬学研究科准教授山下沢先生、大阪大学大学院薬学 研究科助教 辻野 博文 先生に深謝致します。

また、分子動力学シミュレーションにあたり、御協力、御討論を賜りました近畿大学先端技術総合研 究所教授 米澤 康滋 先生、大阪大学蛋白研究所特任助教 竹下 浩平 先生に深謝致します。

さらに、本研究を遂行するにあたり、多大な御協力を頂きました大阪大学大学院薬学研究科分子 反応解析学分野 三木 飛宙 修士、小林 将也 氏、松原 千明 氏、宮田 紗良 氏、及び研究 室の皆様に心からお礼申し上げます。

最後に、博士号取得への理解を示し、日々サポートしてくれた家族に心から感謝致します。