

分子動力学法及び密度汎関数法を用いた
CYP2D6 におけるチオリダジンの代謝機構
に関する研究

2016

笹原 克則

Short summary

第1章 諸言

1.1 チトクローム P450 (Cytochrome P450; CYP)

1.1.1 CYP の概要

1.1.2 CYP の生理的意義

1.1.3 CYP の分子的性質

1.1.3.1 立体構造

1.1.3.2 CYP の基質認識部位

1.1.3.3 鉄ポルフィリンの電子状態

1.1.4 CYP の触媒反応とそのメカニズム

1.1.5 CYP による薬物の代謝

1.2 分子科学計算を用いた CYP 代謝予測の意義

1.2.1 薬物の開発における代謝プロファイルの評価の位置づけ

1.2.2 分子科学計算を用いた CYP 代謝予測の重要性

1.3 精神病と抗精神病薬

1.3.1 精神病

1.3.2 抗精神病薬

1.3.3 フェノチアジン化合物の構造, 薬効及び副作用

1.3.4 チオリダジン (THD) の構造, 薬効及び副作用

1.3.5 フェノチアジン化合物の薬物動態

1.3.6 THD の薬物動態

1.3.6.1 薬物動態全般

1.3.6.2 CYP による代謝

1.3.7 THD の代謝上の問題点

1.4 本研究の目的

引用文献

第2章 *in vitro* での THD の代謝

2.1 序論

2.2 方法

2.2.1 基質

2.2.2 酵素

2.2.3 試験系

2.2.4 分析

2.2.4.1 標準溶液

2.2.4.2 分析方法

2.2.5 解析

2.3 結果

2.3.1 THD 及びクロルプロマジン (CPZ)の代謝物検索及び同定

2.3.1.1 THD の代謝物検索及び同定

2.3.1.2 CPZ の代謝物検索及び同定

2.3.2 各種ミクロソームにおける THD 及び CPZ の代謝物の生成

2.3.2.1 ヒト肝ミクロソームにおける THD の代謝物の生成量

2.3.2.2 CYP1A2 発現系ミクロソームにおける THD の代謝物の生成量

2.3.2.3 CYP3A4 発現系ミクロソームにおける THD の代謝物の生成量

2.3.2.4 CYP2D6 発現系ミクロソームにおける CPZ の代謝物の生成量

2.3.2.5 CYP2D6 発現系ミクロソームにおける THD の代謝物の生成量

2.3.3 CYP2D6 発現系ミクロソームにおける THD 及び CPZ の生成速度定数の算出

2.3.3.1 CPZ の生成速度定数の算出

2.3.3.2 THD の生成速度定数の算出

2.4 考察

2.5 小括

引用文献

第 3 章 CYP2D6-THD 複合体の結合ポーズの分子動力学 (MD)計算

3.1 序論

3.2 方法

3.2.1 結晶構造における結合ポーズの比較

3.2.2 分子動力学法

3.3 結果と考察

3.3.1 MD trajectory 解析による結合ポーズの特性評価

3.3.2 THD と CYP2D6 の相互作用解析による特性比較

3.4 小括

引用文献

第 4 章 量子化学計算による酸化反応における遷移状態解析

4.1 序論

4.2 方法

4.3 結果と考察

4.4 小括

引用文献

第 5 章 分子動力学と量子化学計算による THD の代謝反応機構の考察

5.1 序論

5.2 分子動力学と量子化学計算による THD の代謝反応機構の考察

5.3 THD と相互作用する CYP2D6 の重要な残基の考察

5.4 *In vitro* 代謝試験で *N*-desmethyl 体がほとんど検出されないことの考察

5.5 小括

引用文献

第 6 章 総合討論

引用文献

謝辞

本稿で用いた省略形

1) 創薬関連

CPZ	ChlorPromaZine
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
MSD	MeSoriDazine
SFD	SulForiDazine
THD	THioriDazine

2) 薬物動態関連

AUC	Area Under the blood Concentration-time curve
BA	BioAvailability
CYP	CYtochrome P450
Cpd I	ComPound I (iron-oxo porphyrin cation radical oxidant)
DDI	Drug-Drug Interaction
EM	Efficient (rapid) Metabolizer
FMO	Flavin-containing MonoOxygenase
PM	Poor Metabolizer
SOM	Sites Of Metabolism

3) 代謝実験関連

GSH	Glutathione-SH
LC	Liquid Chromatography
MS	Mass Spectrometry
NADH	β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide, reduced form
NADPH	β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, reduced form

4) 理論計算関係

○分子力場法関連

AMBER	Assisted Model Building with Energy Refinement (MM)
MD	Molecular Dynamics
MM	Molecular Mechanics
MM/MD	Molecular Mechanics/Molecular Dynamics

○水和自由エネルギー計算関連

GB/SA	Generalized Born/Surface Area
-------	-------------------------------

IEFPCM Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Model
TIP3P Three-point transferable Inter-molecular Potential

○非経験的分子軌道法・密度汎関数法関連

MO Molecular Orbital
QM/MM Quantum Mechanics/Molecular Mechanics
RESP Restrained ElectroStatic Potential
DFT Density Functional Theory
 E^{act} ACTivation Energy

5) その他

O_{CpdI} Oxygen atom attached to the iron atom in Compound I
SRS Substrate Recognition Site
TS Transition State
TSR Two-State Reactivity
vdW van der Waals

Short summary

Molecular dynamics and density functional studies on the metabolic selectivity of antipsychotic thioridazine by CYP2D6

Cytochrome P450s (CYPs) is now known to exist in multiple forms and to play important roles in the oxidation of endogenous substrates such as androgens and estrogens for biofunctional control (Sasahara K et al., *J. Neurosci.* (2007)) as well as tremendous range of drugs (Sasahara K et al., *Drug. Metab. Dispos.* (2015)). In fact, CYPs are involved in the catalysis of approximately 75% of drug metabolism reactions, suggesting CYPs are most important drug-metabolizing enzymes. Therefore it is important to clarify the metabolic profiles and mechanism of drugs. CYP2D6 is second most responsible for the CYP-mediated metabolism. Thioridazine (THD) is one of the phenothiazine-type antipsychotics, which exhibit dopamine D₂ antagonistic activity. THD shows characteristic metabolic profiles compared to

other phenothiazine-type antipsychotics such as chlorpromazine. The sulfur atom attached to the phenothiazine ring is preferentially oxidized mainly by CYP2D6, i.e. the 2-sulfoxide is a major metabolite, and interestingly this metabolite shows more potent activity against dopamine D₂ receptors than THD. On the other hand, the formation of this metabolite causes many serious problems for its clinical use. Recently, Wang et al.

revealed the crystallographic structure of THD with CYP2D6. In the current study, *in vitro* metabolic profiles of THD with CYP2D6 as well as other CYP isozymes were experimentally examined using LC-UV-MS/MS under experimental concentrations closer to the effective blood ones. At the same time, the binding and reaction mechanisms at the atomic and electronic levels were computationally examined based on the assumption as to whether or not the different

crystallographic binding poses correspond to the different metabolites. The binding and oxidative reaction steps in the whole metabolic process were investigated using molecular dynamics (MD) and density functional theory (DFT) calculations, respectively. The observed metabolites and crystallographic binding poses can be related to each other by means of MD and DFT calculations. The results presented here will act as links between crystallographic, dynamic, and kinetic pictures, and the observed metabolism of THD with CYP2D6. The current study demonstrated the essential importance of the orientation of the substrate in the reaction center of CYP2D6 for the metabolic reaction (from Sasahara K et al., *Bioorg. Med. Chem.* (2015)).

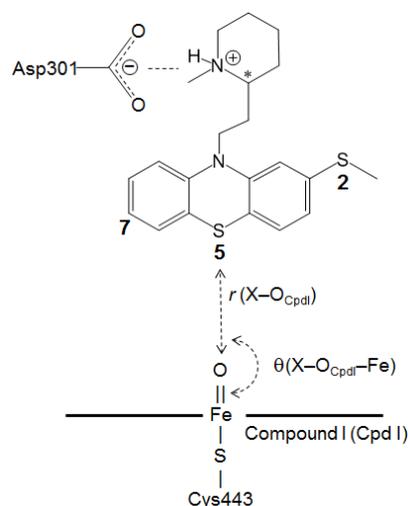


Figure 1. THD, Compound I, and Asp301.

*: asymmetric carbon

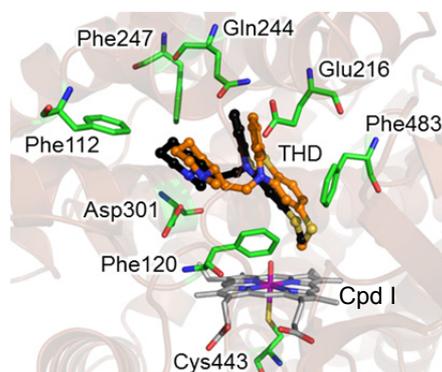


Figure 2. Calculated equilibrium binding poses (orange) together with crystallographic ones (dark).

第1章 諸言

昨今、創薬初期から化合物の薬物動態特性を評価し、その構造展開に活かすことが必須となっている。これは 1990 年頃の臨床試験において、薬物動態が問題で開発中止になるケースが最も多く、各社が薬物動態改善に取り組むようになったためである。薬物動態の過程は主に Absorption (吸収), Distribution (分布), Metabolism (代謝), Excretion (排泄) の 4 つに分けることができ、その頭文字をとり ADME と呼ぶ。この各過程において例えば結晶型、溶解度、膜透過性、分布容積、組織内濃度、代謝安定性、CYP 基質性・阻害能、トランスポーター基質性・阻害能、抱合酵素基質性・阻害能、代謝物検索、GSH (Glutathione-SH) トラッピングの有無などを明らかにする必要がある、多くの試験を実施しなければならない。さらに、新薬の誕生確率は約 3 万分の一といわれており、日々多くの候補化合物が合成されており、そのすべての化合物に対して ADME 試験を実施することは不可能に近い。ゆえに、マンパワーやコストとプロジェクトのステージや優先度を加味して、ADME 試験を実施していくこととなる。勿論、評価する化合物数が多いにこしたことはないが、多くなりすぎることによって試験作業に時間を取られ、数値を出すことが目的化し、化合物の ADME 評価やヒト予測が疎かになれば元も子もないため、評価する化合物数を一定数に絞らざるをえない。そこで、評価する化合物数を増やす手段の一つとして、“*in silico*”における研究があげられる。構造ゲノミクス研究の進展により、タンパク質の立体構造情報が集積されていることに加え、近年の飛躍的なコンピューターの演算能力の向上により、計算化学分野は急速に発展している。これらの発展により、タンパク質のような大規模分子系に対する高精度かつ迅速な分子科学計算及びシミュレーションが可能となり、迅速な ADME 評価につながることを期待されている。

チトクローム P450 (Cytochrome P450; CYP) は医薬品の約 75% の代謝を担う最も重要な薬物代謝酵素である。CYP 阻害による血中濃度の変化は薬効の欠如や副作用をもたらすため、ヒトや動物の代謝プロファイルを明らかにすることは非常に重要である。特に探索初期段階に代謝プロファイルを明らかにすることは開発候補品の構造展開をするために必要である。その為、CYP を対象として、分子科学計算や情報科学的手法によるハイスループットな新しい代謝反応の予測法の開発が期待されている。

フェノチアジン化合物の多くはドーパミン D₂ 受容体アンタゴニストであり、抗精神病作用を有している。薬効にはフェノチアジン骨格の 2 位 (図 1.1) の置換基が重要といわれている。実際、2 位が無置換のプロマジンは活性が弱く、(引用文献: 1-1) 置換基にそれぞれ Cl 及び S-Met を持つクロルプロマジン

(Chlorpromazine; CPZ) とチオリダジン (Thioridazine; THD; CAS Name: 10-[2-(1-Methyl-2-piperidiny)ethyl]-2-(methylthio)-10H-phenothiazine)は同程度の薬効を持つことが報告されている (引用文献: 1-2). THD の主要代謝物であり, 2位の S-sulfoxide であるメソリダジン (Mesoridazine; MSD, [2-SO])は THD に比べ薬効が 10 倍高いことが報告されている (引用文献: 1-3). フェノチアジン化合物は塩基性窒素 (3 級アミン)を持ち, 代謝には CYP2D6 等の CYP ファミリーが関与している (引用文献: 1-4 ~ 1-37). THD の代謝物はフェノチアジンの 2 位および 5 位の S-sulfoxide, 2 位の S-sulfone, フェノチアジン骨格のベンゼン環の hydroxide, 側鎖 N-desmethyl 体が認められることが報告されている (引用文献: 1-4 ~ 1-6, 1-11, 1-18 ~ 1-22). THD, MSD([2-SO])に特徴的なそれぞれ 2 位置換基の酸化反応は, 主に CYP2D6 によることが報告されている (引用文献: 1-4).

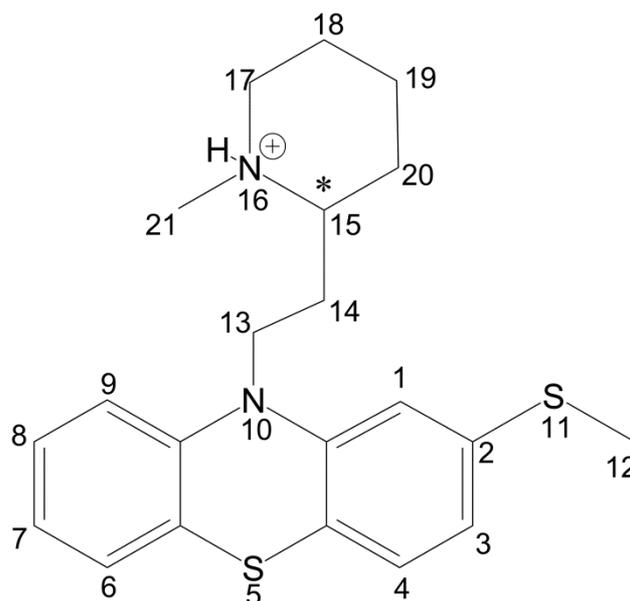


図 1.1 THD の化学構造 (*は不斉炭素)

CYP2D6 による THD の代謝能低下は, THD の血中濃度の上昇を引き起こし, THD の血中濃度が高いと重篤な毒性である QT 延長が起こりやすいと報告されている (引用文献: 1-37). 実際, QT 延長の問題で THD は多くの国で撤退している (引用文献: 1-38). CYP2D6 による THD の代謝能低下の要因として, THD と CYP2D6 阻害薬との併用による薬物間相互作用 (drug-drug interaction, DDI) (引用文献: 1-4 ~ 1-6, 1-37, 1-39)や CYP2D6 の遺伝子多型 (genetic polymorphism) (引用文献: 1-37, 1-40 ~ 1-43)が報告されている. THD の代謝能低下はさらに, MSD ([2-SO])の生成を抑制し, 薬効低減を引き起こす可能性がある. 同時に未変化体の血中濃度の増加による QT 延長作用が起こると推測される.

THD は主に CYP2D6 で代謝を受けるが，その結果，薬効の低下，CYP2D6 の薬物間相互作用，遺伝子多型，QT 延長に関する問題が起こる．これらは THD に特徴的なフェノチアジン骨格 2 位の S-メチル基の代謝特性に起因すると推測される．そこで本研究では，まず THD の *in vitro* での代謝特性を LC-UV-MS/MS で体系的に明らかにし，分子動力学法 (MD) 及び密度汎関数法 (DFT) を用いて結晶結合ポーズと代謝物との対応を調べ，代謝機構を原子・電子レベルで明らかにすることを目的とした．本研究で用いたアプローチや方法は CYP による薬物代謝の一般的な非経験的予測法の構築にもつながるであろう．

1.1 チトクローム P450 (Cytochrome P450; CYP)

1.1.1 CYP の概要

CYP は薬物の代謝反応において Phase I 反応を担う酵素の中で最も重要な酵素として知られているが、それだけではなく、生体内で様々な一原子酸素添加反応を触媒し、生命を維持するために必要な酵素である。

CYP は一酸化炭素と結合し、450 nm に吸収極大をもつものの総称であり、一次構造の異なる多数の分子種が存在しており、スーパーファミリーを形成している。分子量は約 50000 で約 450 残基のアミノ酸からなる。そのアミノ酸残基の類似性から群 (ファミリー) 及び亜群 (サブファミリー) などに分類される。最初の CYP は動物組織のミクロソーム (小胞体) 中で発見されたが、その後ミトコンドリアにもあることが明らかとなり、さらに酵母、細菌、植物にも広く分布することが確かめられた。

1.1.2 CYP の生理的意義

CYP の基質は、生体内基質と生体外基質の大きく二つに分けることができる。生体内基質は主にプロゲステロンやエストラジオールに代表されるステロイドホルモン、プロスタグランジンやトロンボキサンに代表される脂肪酸があげられる (引用文献: 1-44)。さらにレチノイン酸の様な脂溶性生理活性物質も基質とする。これらは生体の恒常性の維持に必須の生理活性を有する物質であり、CYP はこのような生理機能が大きな役割の一つであると考えられている。これらの生体内基質の酸化反応に関わる CYP は基本的にミトコンドリアに存在し、高い基質特異性を示す。一方で、生体外基質は薬物を含む外来異物であり、この場合 CYP は酸化反応による解毒が主な役割と考えられている (引用文献: 1-45)。これらの酸化反応に関わる CYP はミクロソームに存在し、基質特異性が低いものが多い。様々な異物に対応するために、基質特異性を下げ、生体防御を行っているものと考えられる。

1.1.3 CYP の分子的性質

1.1.3.1 立体構造

CYP の立体構造は 1985 年に Poulos らの CYP101 (P450cam) の X 線結晶構造解析により初めて明らかにされた (引用文献: 1-46)。それに続き、水溶型

CYPである細菌 (原核生物)由来の3種類 (CYP108, CYP102 及び CYP107A1) 及びカビ (真核生物)由来の1種類 (CYP55A1) の合計 5 種類の構造が明らかにされた。一方, 哺乳類等の高等生物由来の膜結合型 CYP は, 可溶化プロセス時における変性の問題から結晶化は困難を極めたが, 1999 年に CYP2C5 の X 線結晶構造が解析されたのを皮切りに, 膜結合型 CYP の X 線結晶構造が報告されるようになった (引用文献: 1-47)。最近では, アポタンパクだけではなく, 基質や阻害剤との共結晶構造も報告され (表 1.1), 基質結合時の基質認識部位の変化についても明らかになってきた。

CYP 結晶構造は, 一般に一辺約 60 Å 及び厚さが約 30 Å のプリズム型である。立体構造の基本的なフォールディングパターンは CYP 間で酷似している。図 1.2 及び 1.3 のヒト CYP2D6 の X 線結晶構造の様に, 多くの部分を α ヘリックスが占め, 13 本の各ヘリックス (A, B, B', C, ..., K, L)は見合った長さで一次構造上の対応する位置にあり, 大まかな立体的相互配置も似ている (引用文献: 1-48)。酵素反応の活性中心である heme は分子全体のほぼ中央に位置しており, 周囲をアミノ酸残基に取り囲まれているため, 溶媒に直接露出をしていない。heme の遠位側に長大な I ヘリックスがあり, それにかぶさるように V 字型をした F, G ヘリックスが存在し, 活性ポケットを形成している。

Poulos らは細菌由来の CYP の X 線結晶構造を重ね合わせると, 基質の有無にかかわらず, 大部分の二次構造はほぼ一致するが, B', F および G-helix の二次構造に大きな変化が見られることを報告している (引用文献: 1-49, 1-50)。また CYP 間で B'ヘリックスの向き, F 及び G 両ヘリックスと I ヘリックスとの相対配置の違いを反映して heme ポケットから分子外部への通路部分に個性が生じている。さらに B'ヘリックスならびに F, G ヘリックスをつなぐループ構造 (FG ループ)は, 温度因子が高く, 分子構造上の“揺らぎ”が大きな部位であることが知られている。I ヘリックスと heme との距離にも CYP 間で相違が認められる。これらより, B', F および G ヘリックスが CYP の基質認識の多様性を生んでいると考えられる。一方, CYP を構成している大部分の二次構造は生物種を問わず一定であり, 基質結合の前後においてもほとんど変化しないと考えられる。

表 1.1 結晶構造解析された生体外基質を代謝する主なヒト CYP
(2016 年 1 月現在)

CYP	基質または阻害剤	PDB code	解像度 (Å)	報告年
CYP1A2	7,8-Benzoflavone	2HI4	1.95	2007
CYP1B1	7,8-Benzoflavone	3PM0	2.70	2011
CYP2A6	Coumarin	1Z10	1.90	2005
	Coumarin	1Z11	2.05	2005
	N,N-dimethyl(5-(pyridin-3-yl)furan-2-yl)methanamine	2FDU	1.85	2006
	N-methyl-1-(5-pyridin-3-ylfuran-2-yl)methanamine	2FDV	1.65	2006
	1-(5-pyridin-3-ylfuran-2-yl)methanamine	2FDW	2.05	2006
	4,4'-disulfanediyldipyridine	2FDY	1.95	2006
	None	2PG5	1.95	2007
	None	2PG6	2.53	2007
	None	2PG7	2.80	2007
	Pilocarpine	3T3Q	2.10	2012
	Pilocarpine	3T3R	2.40	2013
	Nicotine	4EJJ	2.30	2012
	Phenacetin	3EBS	2.15	2008
CYP2B6	Cyclohexyl-pentyl-maltoside	3IBD	2.00	2010
	Cyclohexyl-pentyl-maltoside	3QOA	2.10	2011
	Cyclohexyl-pentyl-maltoside	3QU8	2.80	2011
	Amlodipine	3UA5	2.80	2012
CYP2C8	Palmitic Acid	1PQ2	2.70	2004
	Isotretinoin	2NNH	2.60	2008
	Montelukast	2NNI	2.80	2008
	Felodipine	2NNJ	2.28	2008
	Troglitazone	2VN0	2.70	2008
CYP2C9	None	1OG2	2.60	2003
	Warfarin	1OG5	2.55	2003
	Flurbiprofen	1R90	2.00	2004
	Inhibitor	4NZ2	2.45	2014
CYP2C19	(4-hydroxy-3,5-dimethylphenyl)	4GQS	2.87	2012
CYP2D6	None	2F9Q	3.00	2006
	Prinomastat	3QM4	2.85	2012
	Thioridazine	3TBG	2.10	2012
	Ajmalicine	4WNT	2.60	2015
	Quinidine	4WNU	2.26	2015
	Quinine	4WNV	2.35	2015
	Thioridazine	4WNW	3.30	2015
	BACE1 Inhibitor	4XRY	2.50	2015
	BACE1 Inhibitor	4XRZ	2.40	2015
	Thioridazine	3TBG	2.10	2012
CYP2E1	Fomepizole	3E4E	2.60	2008
	1H-indazole	3E6I	2.20	2008
	10-imidazol-1-yldecanoic acid	3GPH	2.70	2010
	8-imidazol-1-yldecanoic acid	3KOH	2.90	2010
	12-imidazol-1-yldecanoic acid	3LC4	3.10	2010
	Pilocarpine	3T3Z	2.35	2012

CYP3A4	None	1TQN	2.05	2004
	Progesterone	1W0E	2.80	2004
	Progesterone	1W0F	2.65	2004
	Metyrapone	1W0G	2.73	2004
	Erythromycin	2J0D	2.75	2006
	Ketoconazole	2V0M	2.80	2006
	Ritonavir	3NXU	2.00	2010
	Desthiazolylmethyloxycarbonyl ritonavir	3TJS	2.25	2012
	Bromocriptine	3UA1	2.15	2012
	None	4I3Q	2.60	2013
	Progesterone	5A1P	2.50	2015
	Progesterone	5A1R	2.45	2015
	Imidazole	4D6Z	1.93	2015
	Inhibitor	4D78	2.80	2015
	Inhibitor	4D7D	2.76	2015
	Inhibitor	4D75	2.25	2015
	Desoxyritonavir analog	4K9T	2.50	2013
	Desoxyritonavir analog	4K9U	2.85	2013
	Desoxyritonavir analog	4K9V	2.60	2013
	Desoxyritonavir analog	4K9W	2.40	2013
	Desoxyritonavir analog	4K9X	2.76	2013
	Inhibitor	4NY4	2.95	2014
	Desoxyritonavir	4I4G	2.72	2013
	Desoxyritonavir	4I4H	2.90	2013

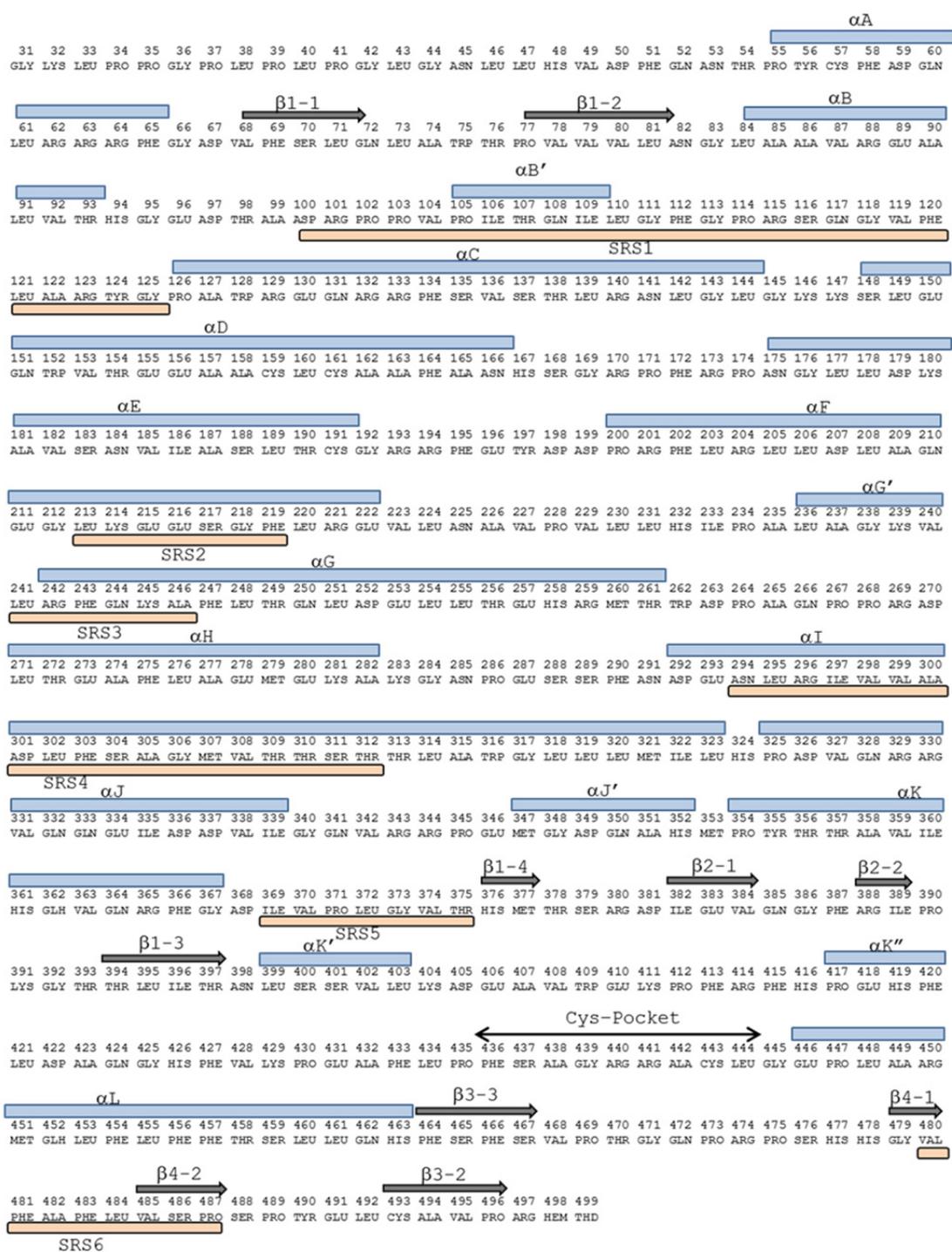
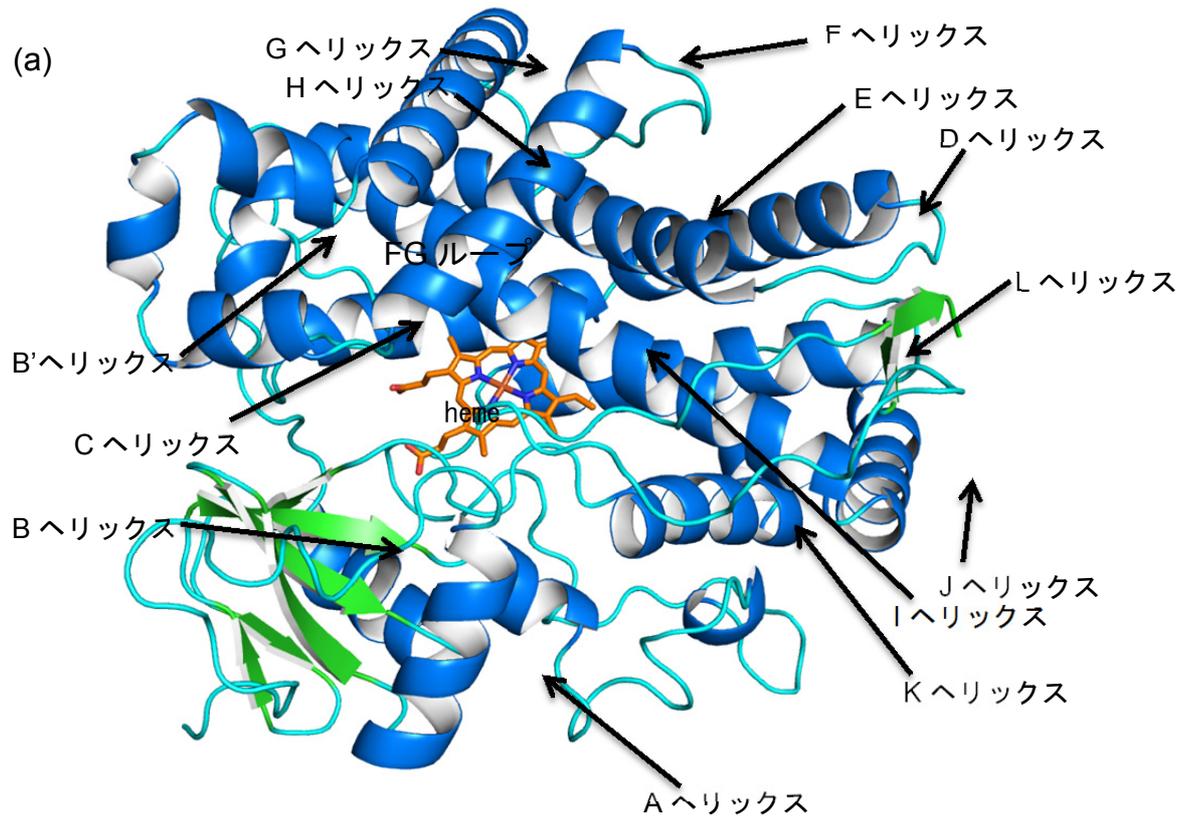


図 1.2 CYP2D6 (PDB code : 3TBG) のアミノ酸配列 (引用文献: 1-51)



(b)

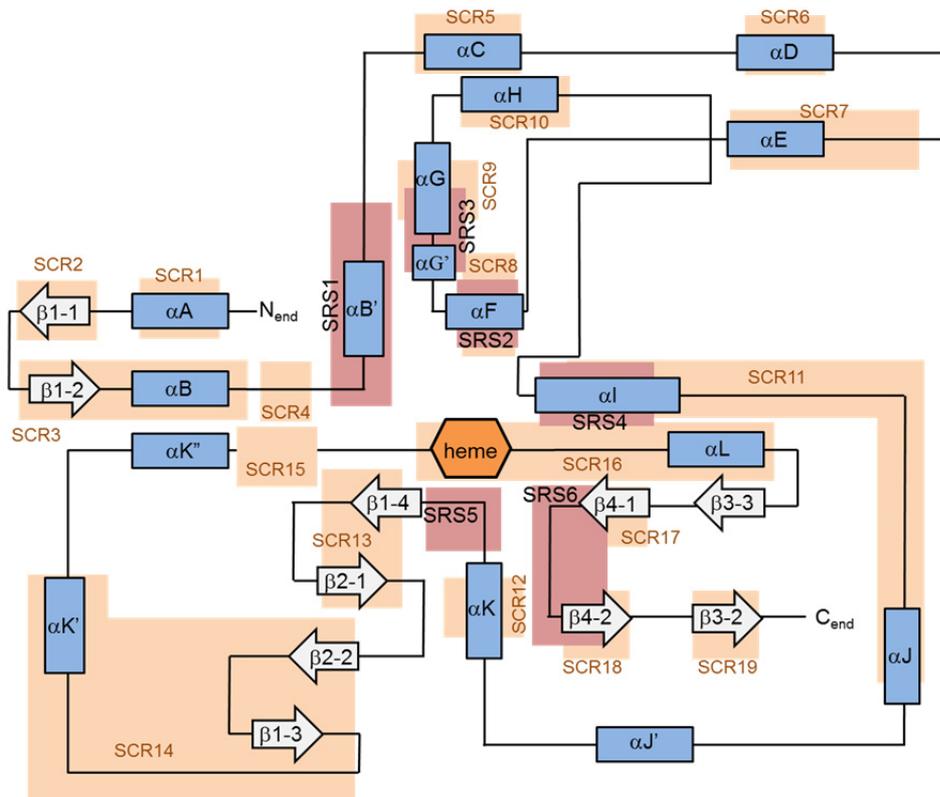


図 1.3 CYP2D6 (PDB code : 2F9Q) の (a) X線結晶構造及び (b) 模式図 (引用文献: 1-52, 1-53)

1.1.3.2 CYP の基質認識部位

Gotoh らは CYP2 ファミリーの配列を比較し、構造中に基質認識に重要な部位があることを推定し、基質認識部位 (Substrate Recognition Site; SRS) と名付けた (引用文献: 1-54). SRS は 6 つ存在し、全アミノ酸領域の約 16% にあたる. SRS1 は B ヘリックス及び B' ヘリックス内, SRS2 は F ヘリックス内, SRS3 は G ヘリックス内, SRS4 は β シート及び I ヘリックス内, SRS5 は K ヘリックス, β 3 シート及び β 4 シート内, SRS6 は β 5 シート内にある (引用文献: 1-55). その後、変異を用いた実験や立体構造において SRS が活性部位に集中していることが確認されたことから、SRS が基質認識部位として正しいことが証明された (引用文献: 1-52, 1-53, 1-56 ~ 1-58). 基質は SRS2 と SRS6 の間を通るが、CYP2D6 の場合ここに酸性アミノ酸残基である Glu216 があり、基質認識に重要な役割を果たしている. また、SRS6 は残基の温度因子が高く、その構造の柔軟性を発揮している (引用文献: 1-52). この様に SRS 内の残基の特徴や柔軟性によって、基質認識の多様性が生まれると考えられる.

1.1.3.3 鉄ポルフィリンの電子状態

Heme が CYP の触媒反応サイクルの中心的な役割を担っている (引用文献: 1-47, 1-59 ~ 1-61). 図 1.4 (a) に示すように heme はポルフィリン環骨格の中心に Fe 原子 (heme 鉄) を含み、heme 鉄はポルフィリン環内の 4 つの窒素原子と配位結合を形成している. また、CYP における heme 鉄の第 5 配座はシステインに由来するチオレートアニオン ($-S^-$) を軸配位子とし、第 5 配座の逆側に位置する第 6 配座が触媒反応の場となる. heme 鉄の第 6 配座は条件によって様々に変化し、heme の電子状態に大きな影響を与える (引用文献: 1-62).

heme 鉄には酸化型 (Fe^{3+}) と還元型 (Fe^{2+}) が存在し、酸化型では 5 個、還元型では 6 個の d 電子を有しているため、基底状態についてはそれぞれの型で 3 つの異なるスピン状態を取りえる (図 1.4 (b), (c)).

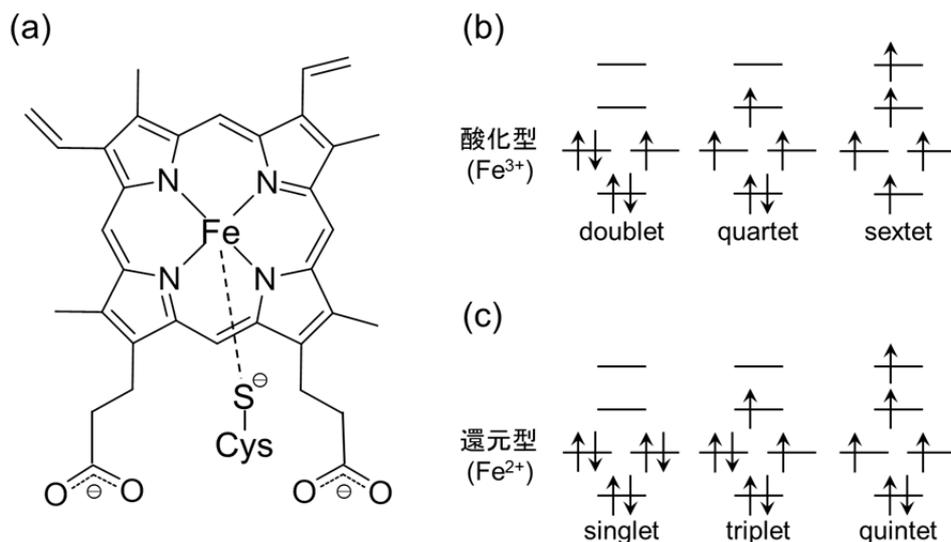


図 1.4 Heme の分子構造とスピン状態

1.1.4 CYP の触媒反応とそのメカニズム

表 1.2 に示すように CYP が触媒する反応は多岐に渡っているが、基本的にはすべて下記の反応式で示した一原子酸素添加反応で表すことができる (引用文献: 1-63, 1-64).



または



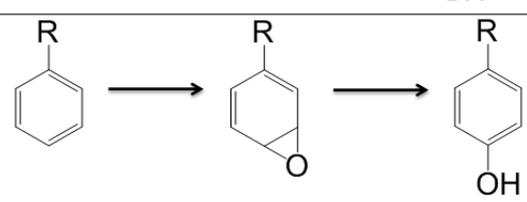
S: 基質

CYP が触媒する反応には、分子状酸素と還元力 (電子)が必要となる。この電子はhemeを還元してCYPに結合した酸素分子を活性化するために必要となる。基質一分子に対して酸素原子を一つ付加するのに二個の電子が必要となる。酸素原子一つは基質に取り込まれ、一方は水分子に還元される。

酸化反応は図 1.5 に示すように、① 酸化型 CYP へ基質が結合し、複合体を形成する。② 複合体が一つ目の電子を受け取り heme 鉄が還元される。③ 還元型の heme 鉄へ酸素が結合して酸素型 CYP となる。④ 二個目の電子を受け取り、酸素が活性化される。この様に形成された活性種である“iron-oxo porphyrin π -cation radical”を Compound I (Cpd I)と呼ぶ。⑤ Cpd I は基質の酸化を行い、一原子酸素が基質へ取り込まれる。他方は水分子となる。⑥ 酸素の付加された基質を遊離して、CYP は酸化型 CYP へ戻る (引用文献: 1-65 ~ 1-69). 高い酸化力を有する Cpd I は、CYP が高い代謝能を持つ一因である。

Cpd Iは低スピン状態の doublet と高スピン状態の quartet がある。CYP が酸化反応を行う際に、doublet と quartet の状態交換が起こると考えられており、これを two-state reactivity (TSR)機構という (引用文献: 1-70 ~ 1-72)。

表 1.2 CYP による代表的酸化反応

様式	反応
① 脂肪族酸化	$R-CH_2-CH_3 \begin{array}{l} \xrightarrow{\hspace{1.5cm}} \\ \xrightarrow{\hspace{1.5cm}} \end{array} \begin{array}{l} \begin{array}{c} OH \\ \\ R-CH_2-CH_2 \end{array} \\ \begin{array}{c} R-CH-CH_3 \\ \\ OH \end{array} \end{array}$
② 芳香族水酸化	
③ O-脱アルキル化	$R-O-CH_3 \rightarrow R-O-CH_2OH \rightarrow R-OH$
④ N-脱アルキル化	$R-N \begin{array}{l} CH_3 \\ \\ CH_3 \end{array} \rightarrow R-N \begin{array}{l} CH_2OH \\ \\ CH_3 \end{array} \rightarrow R-N \begin{array}{l} H \\ \\ CH_3 \end{array}$
⑤ 窒素原子の酸化	$R-N \begin{array}{l} H \\ \\ CH_3 \end{array} \rightarrow R-N \begin{array}{l} OH \\ \\ CH_3 \end{array} \quad \begin{array}{c} R \\ \\ R-N \\ \\ R \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} R \\ \\ R-N-O \\ \\ R \end{array}$
⑥ 硫黄原子の酸化	$R \begin{array}{l} \diagup \\ S \\ \diagdown \\ R \end{array} \rightarrow R \begin{array}{l} \diagup \\ S-O \\ \diagdown \\ R \end{array} \rightarrow R \begin{array}{l} \diagup \\ S \begin{array}{l} O \\ // \\ O \end{array} \\ \diagdown \\ R \end{array}$
⑦ アルコールと アルデヒドの酸化	$H_3C-CH_2OH \rightarrow H_3C-\overset{O}{\parallel}C-H \rightarrow H_3C-\overset{O}{\parallel}COH$

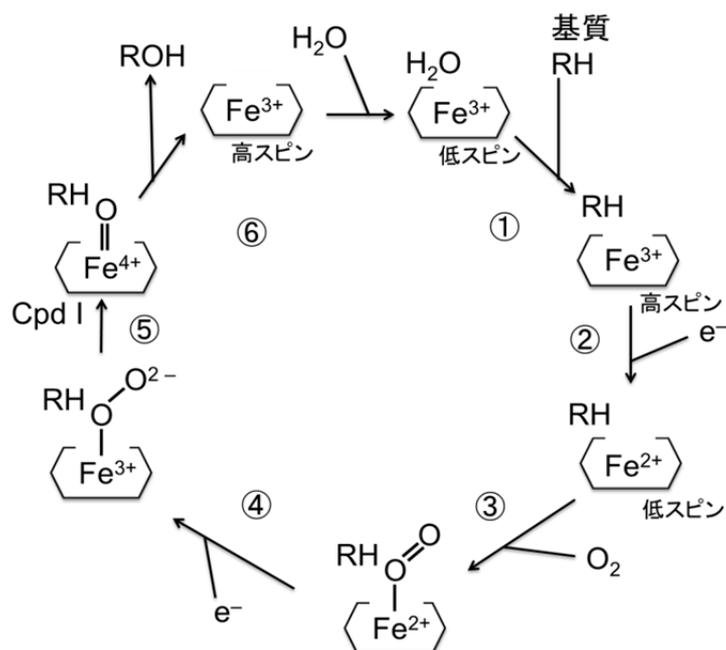


図 1.5 CYP の酸化還元サイクル

1.1.5 CYP による薬物の代謝

CYP は 75%の治療薬の代謝を担う最も重要な薬物代謝酵素である (引用文献: 1-64). 動物のミクロソーム型 CYP の大部分は薬物代謝活性を持っている. 薬物代謝活性を持つ CYP は主に CYP1, CYP2, CYP3 及び CYP4 に属している (引用文献: 1-73 ~ 1-74). CYP1 は A と B の二つのサブファミリーを持ち, CYP1A2 がよりヒトで薬物代謝に関わる分子種である. 気管支拡張剤であるテオフィリンや非ピリン系解熱鎮痛薬フェナセチンなどの代謝が知られている. CYP1A2 は平面構造を持つ弱塩基性化合物を基質とする. CYP2 は哺乳類では 13 種類のサブファミリーが存在する. ヒトでは, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 及び CYP2D6 が主要な酵素である. CYP2B6 は, 平面構造を持たず, 中性または弱塩基性でさらに脂溶性で水素結合受容体を一つか二つもつ基質を代謝する. 麻酔薬のケタミンや抗がん剤のシクロフォスファミドなどを代謝する. CYP2C サブファミリーでは CYP2C9 の発現量が一番高い. CYP2C9 は水素結合受容体を持ち弱酸性化合物で, 血漿タンパク結合率が高い薬物を基質とする場合が多い. 抗てんかん薬フェニトインや抗凝固薬ワルファリンなどを代謝する. CYP2D6 は塩基性で芳香環を持つ薬物を代謝する. イミプラミンやミアンセリンの抗うつ薬及びハルペリドールなどの抗精神病薬などの主に中枢薬の代謝に関わる. CYP3 ファミリーでは CYP3A サブファミリーのみが報告されている. その中で CYP3A4 により代謝される薬物は最も多く, 基質選択性が非常に広いことが特徴である. 図 1.6 に示す

ように，CYP で代謝される臨床薬の 30.2%が CYP3A4 で代謝され，ついで CYP2D6 (20.0%)，CYP2C9 (12.8%)，CYP1A2 (8.9%)，CYP2B6 (7.2%)，CYP2C19 (6.8%)の順であり，この 6 分子種で 9 割近い薬物の代謝が説明できる (引用文献: 1-75 ~ 1-77).

表 1.3 薬物代謝に関わる主なヒト CYP の特徴

CYP	基質の特徴	基質例
CYP1A2	平面構造を持つ 弱塩基性	テオフィリン フェナセチン
CYP2B6	平面構造を持たない 中性または弱塩基性 脂溶性 水素結合受容体を持つ	ケタミン シクロフォスファミド
CYP2C9	弱酸性 血漿タンパク結合率が高い 水素結合受容体を持つ	フェニトイン ワルファリン
CYP2C19	中性または弱塩基性 脂溶性 水素結合受容体または供与体を持つ	オメプラゾール ジアゼパム
CYP2D6	塩基性 芳香環を持つ 疎水性	THD イミプラミン ハルペリドール
CYP3A4	基質選択性が非常に広い 分子量が大きい 脂溶性	トリアゾラム ニフェジピン ミダゾラム

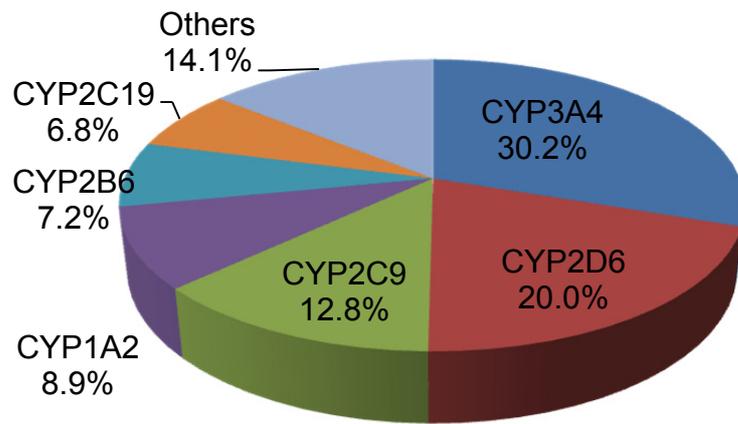


図 1.6 CYP で代謝される薬物の割合 (引用文献: 1-75 ~ 1-77)

複数の薬物を併用した場合、代謝の競合が起こることがある。これを薬物間相互作用と呼ぶが、この際、薬物が有効血中濃度より高くなった場合は副作用が、下回った場合は薬効が欠如する危険性がある。主に一つの CYP 分子種の代謝寄与率が高い薬物 (主に単代謝酵素薬物) は、その酵素が阻害されると薬物の血中濃度が著しく増加する。一方で、複数の CYP 分子種でバランスよく代謝される薬物 (多代謝酵素薬物) は、一つの CYP 分子種が阻害されても、他 CYP 分子種による代謝により、薬物の血中濃度は上昇しにくい。

1988 年に CYP2D6 の代謝異常を持つヒトが確認され、初めて CYP の遺伝子多型が報告された (引用文献: 1-78)。一方、CYP2D6 において遺伝子増幅により著しい代謝亢進も報告され (引用文献: 1-79)、遺伝子多型の問題は薬物動態分野で大きな関心事となった。遺伝子多型が原因で個人により薬物の代謝速度が大きく変わり、それが薬物の血中濃度の個体差を招く。これまで酵素活性にまで影響を及ぼす変異は CYP2 ファミリーについてのみ報告がされており CYP2D6 がその数が多い (表 1.4) (引用文献: 1-64)。遺伝子多型はフェノタイプとゲノタイプに区別される。フェノタイプは実際の酵素活性として現れる型で、実際の生体を反映していることから、実用的であるが、タイプの決定は容易にできない欠点もある。逆に、ゲノタイプは遺伝子解析から分類される型で、タイプの決定は遺伝子診断で容易にできるものの、生体機能との関わりは明らかではない。

表 1.4 CYP2D6 の遺伝子多型と酵素活性

アリル	遺伝子変異	アミノ酸変異	酵素活性
CYP2D6*1	野生型	野生型	野生型
CYP2D6*2	2850 C → T, 4180 G → C	R296C, S486T	減少型
CYP2D6*3	2549 A → del	フレームシフト	不活性型
CYP2D6*4	1846 G → A	スプライシング欠損	不活性型
CYP2D6*5	全欠損	全欠損	不活性型
CYP2D6*6	1707 T → del	フレームシフト	不活性型
CYP2D6*7	2935 A → C	H324P	不活性型
CYP2D6*8	1758 G < T	終止コドン	不活性型
CYP2D6*9	2613-2615 del AGA	K218 del	減少型
CYP2D6*10	100 C → T	P34S	減少型
CYP2D6*11	883 G → C	スプライシング欠損	不活性型
CYP2D6*12	124 G → A	G42R	不活性型
CYP2D6*13	CYP2D7P/2D6 hybrid	フレームシフト	不活性型
CYP2D6*14	1758 G → A	G169R	不活性型
CYP2D6*15	138 ins T	フレームシフト	不活性型
CYP2D6*16	CYP2D7P/2D6 hybrid	フレームシフト	不活性型
CYP2D6*17	1023 C → T, 2850 C → T	T107I, R296C	減少型
CYP2D6*18	9 bp ins. In exon 9		減少型
CYP2D6*19	2539-2542 del AACT	フレームシフト	不活性型
CYP2D6*20	1973 ins G	フレームシフト	不活性型
CYP2D6*36	100 C → T, gene conversion to CYP2D7 in exon 9	P34S	減少型
CYP2D6*38	2587-2590 del GACT	フレームシフト	不活性型
CYP2D6*40	1023 C → T, 1661 G → C, 1863 ins 2, 2850 C → T, 4180 G → C	T107I, 172-174 (FRP) 3, R296C, S486T	不活性型
CYP2D6*41	-1548C, -1235 A → G, -740 C → T, -678 G → A, CYP2D7 gene conversion in intron 1, 1661 G → C, 2850 C → T, 4180 G → C	R296C, S486T	減少型
CYP2D6*42	-1548C, 1661 G → C, 2850 C → T, 3259 ins GT, 4180 G → C	R296C, S486T, フレームシフト	不活性型

del: delete, ins: insert

1.2 分子科学計算を用いた CYP 代謝予測の意義

1.2.1 薬物の開発における代謝プロファイルの評価の位置づけ

探索段階ではマウスやラットなどの動物を用いて薬効や副作用の評価を実施し、薬としてのポテンシャルを見極める。その後、前臨床試験を経て、ヒトでの薬効や副作用を確かめる臨床試験に移行する。1990年代に、例えば薬物のヒト血中濃度が動物から推定される有効血中濃度よりも著しく低く薬効が発現しないなど、薬物動態が問題となり、臨床試験が中止となるケースが続発した。図 1.7 に 1991 年における開発中止の原因を示す (引用文献: 1-80)。

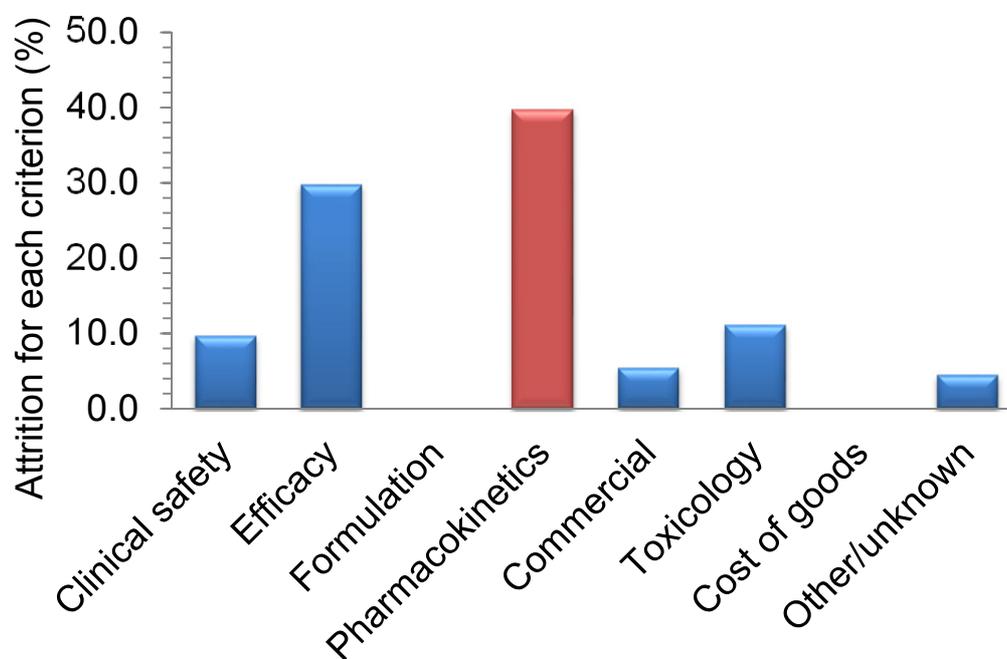


図 1.7 開発中止の原因 (引用文献: 1-80)

薬物動態を明らかにするための試験は多くあり、例えば、結晶型、溶解度、膜透過性、分布容積、組織内濃度、代謝安定性、CYP 基質性・阻害能、トランスポーター基質性・阻害能、抱合酵素基質性・阻害能、GSH トラッピングの有無及び代謝物検索試験などがある。

薬効や副作用を評価した動物とヒトにおいて、薬物動態の種差が認められた場合、動物の評価結果をヒトに外挿することは難しい。これは臨床試験において予想外に薬効が認められなかったり、副作用が発現したりすることを意味する。その為、数多くある薬物動態試験の中で、各動物種及びヒトにお

いて代謝プロファイル及びタンパク結合の程度を明らかにするような“種差を明らかにする試験”は特に重要である。これは日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; ICH) M3 ガイドラインにも明確に記載がなされている。

これらより、早い段階から動物とヒトの代謝安定性や代謝物検索を中心とした代謝プロファイルを明らかにする試験を実施し、薬物動態的観点から構造展開することは、昨今必須となっており、探索初期から評価を行うことも多い。しかしながら、新薬の誕生確率は約 3 万分の一と極めて低く、開発期間は 9 年～17 年といわれており (引用文献: 1-81)、日々多くの候補化合物が合成されているものの、そのすべての化合物に対してこの様な試験を実施することは不可能に近い。

ゆえに、マンパワーやコストとプロジェクトのステージや優先度を加味して、試験を実施していくこととなる。また代謝プロファイルを評価する際には、薬物の約 75%の代謝を担う CYP に関するデータを優先的に取得する。この様に化合物数や試験数を絞り込んでも、“評価する化合物数が多いにこしたことはない”との思いから作業量は多くなりがちである。作業量の多さから、数値を出すことが目的化し、化合物のポテンシャル評価が疎かになれば元も子もない。

1.2.2 分子科学計算を用いた CYP 代謝予測の重要性

評価する化合物数を増やす手段の一つとして、“*in silico*”における研究があげられる。構造ゲノミクス研究の進展により、タンパク質の立体構造情報が集積されていることに加え、近年の飛躍的なコンピューターの演算能力の向上により、計算化学分野は急速に発展している。これらの発展により、タンパク質のような大規模分子系に対する高精度かつ迅速な分子科学計算及びシミュレーションが可能となり、迅速な ADME 評価につながることで期待されている。

特に、CYP を対象として、分子科学計算や情報科学的手法によるハイスループットな新しい代謝反応の予測法の開発が期待されている。これまでに代謝過程を結合過程 (アクセシビリティ)と酸化反応過程を分割し、これらを用いて代謝反応の予測やメカニズムの理解が行われてきた。CYP に対する化合物のアクセシビリティ評価としては、ホモロジーモデリング法や Chemo-Informatics 手法 (引用文献: 1-82, 1-83)を用いた化合物の代謝部位 (Site of Metabolism, SOM)予測, docking (引用文献: 1-84, 1-85)や分子動力学法

(molecular dynamics; MD) (引用文献: 1-86, 1-87)を用いたものが報告されている。また、酸化反応過程では理論化学計算法, 非経験的分子軌道法 (molecular orbital; MO)及び密度汎関数法 (density functional theory; DFT) (引用文献: 1-88 ~ 1-91)を用いた化合物の酸化反応の活性化エネルギー評価などが報告されている。

1.3 精神病と抗精神病薬

1.3.1 精神病

精神病とはヒトの知的能力・現実を認識する能力・他の人と情報を伝え合ったり関係を持ったりする能力が障害された状態をいう。診断の際に、このような精神病症状が必要な疾患は統合失調症と薬物誘発性精神病性障害が主に知られており、統合失調症については最も多い精神病の原因の一つである。広義には躁病やうつ病、アルツハイマー型痴呆なども含むが、これらの疾患には精神病症状がある場合とない場合がある (引用文献: 1-81)。

統合失調症は思春期後期あるいは成人期早期に症状の発現をみる生物学的脳障害である。この疾患は重い人格障害と思考過程の分裂によって特徴づけられる。統合失調症に伴う症状は大まかに陽性症状 (妄想, 幻覚, 概念の解体, 誇大的, 敵意, 被害念慮, 疑い深さ, 興奮) と陰性症状 (平板な感情, 自閉, 乏しい親密感, 社会的引きこもり, 抽象的思考能力の障害, コミュニケーション障害) に分けられる (引用文献: 1-92)。

統合失調症の生物学的基礎はいまだにわかっていない。しかし、陽性症状の生物学的な基礎はドーパミン神経, 特に中脳辺縁系経路の過剰な活動に関係していると信じられている。これをドーパミン仮説と呼ぶが、以下のことから支持されている。① ドーパミン作動性薬物は精神病症状を引き起こす, ② 臨床的に効果のある抗精神病薬は D2 受容体の約 70~80% を占有する, ③ 統合失調症患者の剖検はドーパミン受容体レベルの上昇を明らかにしていること。ドーパミン受容体は D1 類 (D1, D5 受容体) 及び D2 類 (D2, D3, D4 受容体) に分類される。ほとんどの抗精神病薬は D2 受容体を遮断することから、力価評価は D2 受容体の拮抗作用に基づいている (引用文献: 1-81, 1-92)。

1.3.2 抗精神病薬

フェノチアジン化合物である CPZ (chlorpromazine) の抗精神病効果の発見はペニシリンにも匹敵する医学的, 科学的な一大事件であった。統合失調症を始めとした精神病症状に対して 1950 年代の CPZ 発見以前には有効な治療は事実上存在しなかった。その様な状況下において CPZ は顕著な効果をもたらしたのである。発見以来の 15 年間で精神病院の長期入院患者数は 3 分の 2 に減少した (引用文献: 1-93)。CPZ の発見後, フェノチアジン化合物を主として上市された化合物は D2 受容体拮抗作用による治療効果だけでなく, ヒスタミン受容体遮断作用による体重増加や眠気, α アドレナリン受容

体遮断によるふらつきや血圧の低下，ムスカリン性受容体遮断作用による眠気，口渇，かすみ目や便秘等の副作用を起こす (図 1.8)．これらの副作用は on-target (特異的)であり，化合物が変わっても“定型的に”同様の薬効及び副作用を持っていたため定型抗精神病薬と呼ばれた．その後，この定型的な副作用を軽減した薬物が開発され，非定型抗精神病薬と呼ばれるようになった (引用文献: 1-81)．

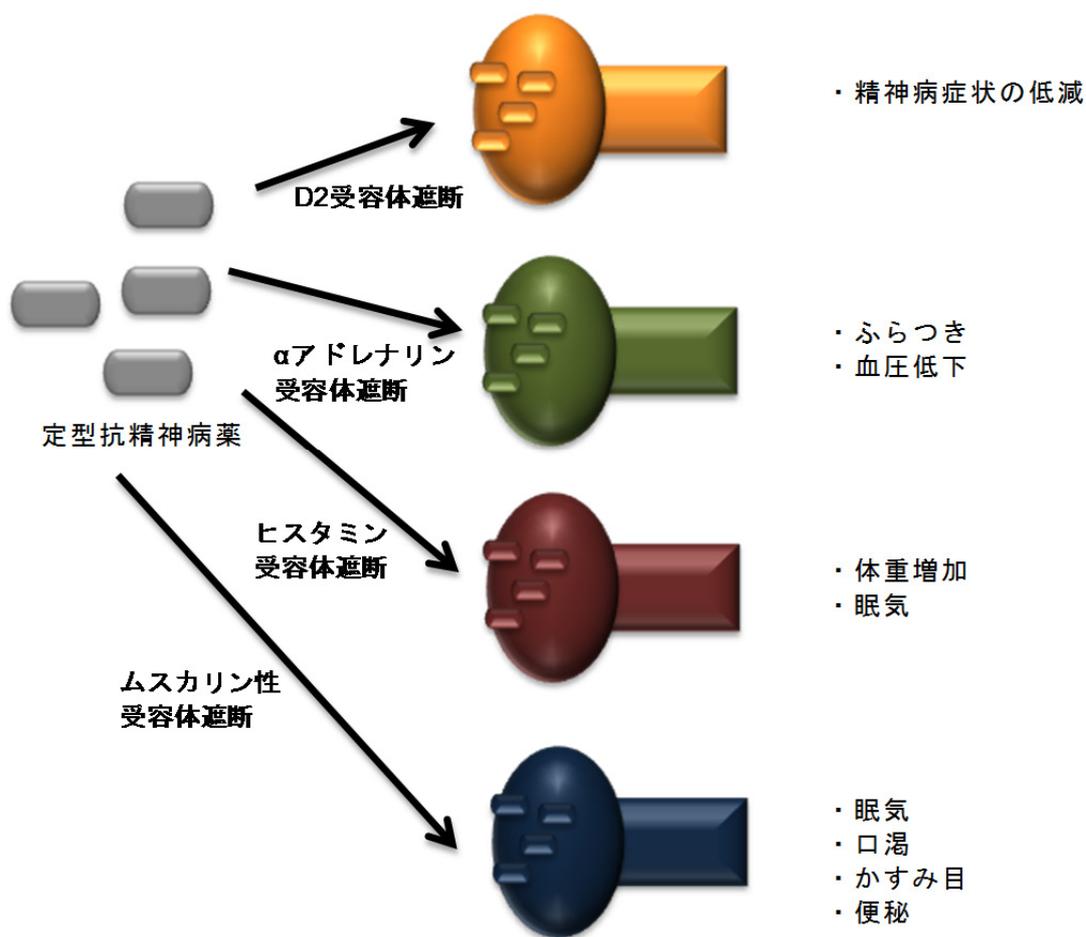


図 1.8 定型抗精神病薬の薬効と副作用

1.3.3 フェノチアジン化合物の構造，薬効及び副作用

フェノチアジン化合物は CPZ が上市されて以来，多くの亜種が創られ，定型抗精神病薬の中心的な化合物群となった．フェノチアジン化合物は共通

して、フェノチアジン骨格を持ち、その 10 位の窒素からプロピル鎖及びその末端にアミンを持つ (図 1.9 及び図 1.10). 10 位の側鎖は脂肪族、ピペラジン及びピペリジンタイプの主に 3 つに分けられる. さらに 2 位に置換基を持つものが多いが、これが薬効発現に重要であるといわれており、2 位置換基の構造は多種多様である. 実際、2 位が無置換のプロマジンは活性が 2 位の置換基にそれぞれ S-Met を持つ THD に比べて弱い (図 1-11 (a)) (引用文献: 1-1, 1-2). THD の主要代謝物であり、2 位の S-sulfoxide である MSD ([2-SO]) は THD に比べ薬効が 10 倍高く、さらに MSD ([2-SO]) の S-sulfone であるスルフォリダジン (sulforidazine; SFD, [2-SO₂]) は MSD ([2-SO]) より薬効が強いと報告されている (図 1-11 (b)) (引用文献: 1-3). 2 位置換基の構造を薬効順に並べると次のようになると報告がある (引用文献: 1-94).

$\text{OH} < \text{H} \approx \text{CONHNH}_2 \approx \text{OCH}_3 < \text{C}(\text{CH}_3)_3 < \text{CH}_3 \approx \text{CH}(\text{CH}_3)_2 < \text{COCH}_3 \approx \text{CO}_2\text{CH}_3$
 $\approx \text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2 \approx \text{SCH}_3 \approx \text{Br} \approx \text{Cl} \approx \text{SCF}_3 < \text{SCH}_3 < \text{SO}_2\text{CH}_3$

副作用は、ヒスタミン受容体、 α アドレナリン受容体及びムスカリン性受容体遮断作用による定型抗精神病薬に特有の副作用が発現する.

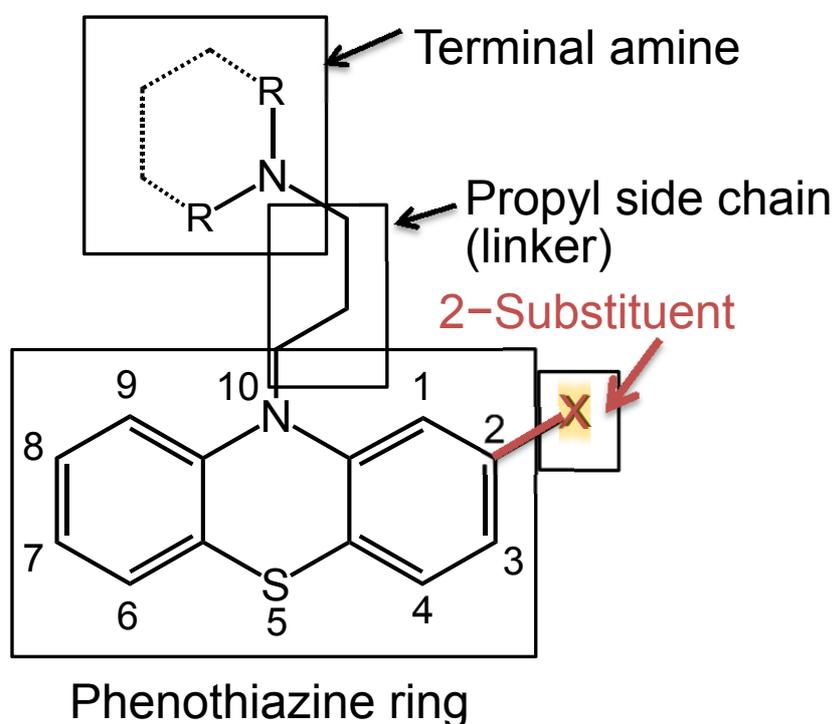


図 1.9 フェノチアジン化合物の一般的な化学構造

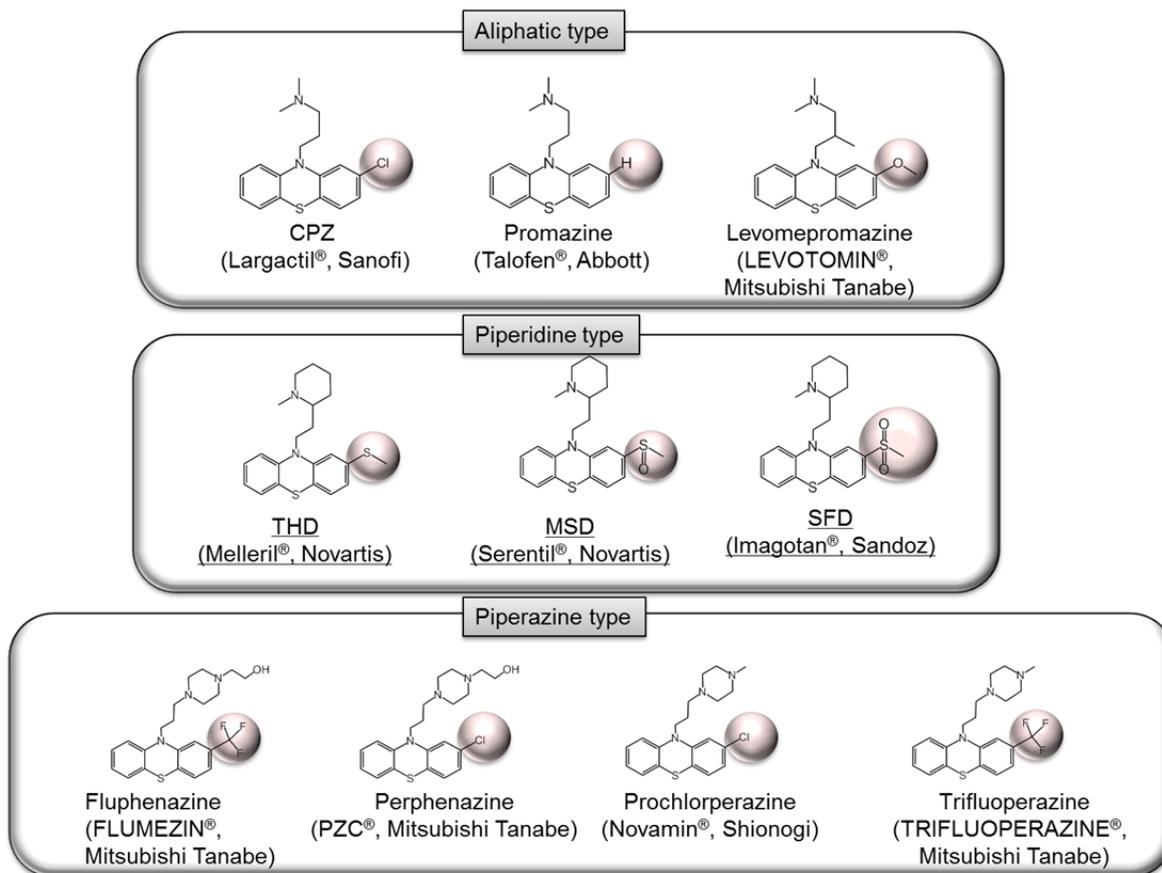


図 1.10 フェノチアジン化合物

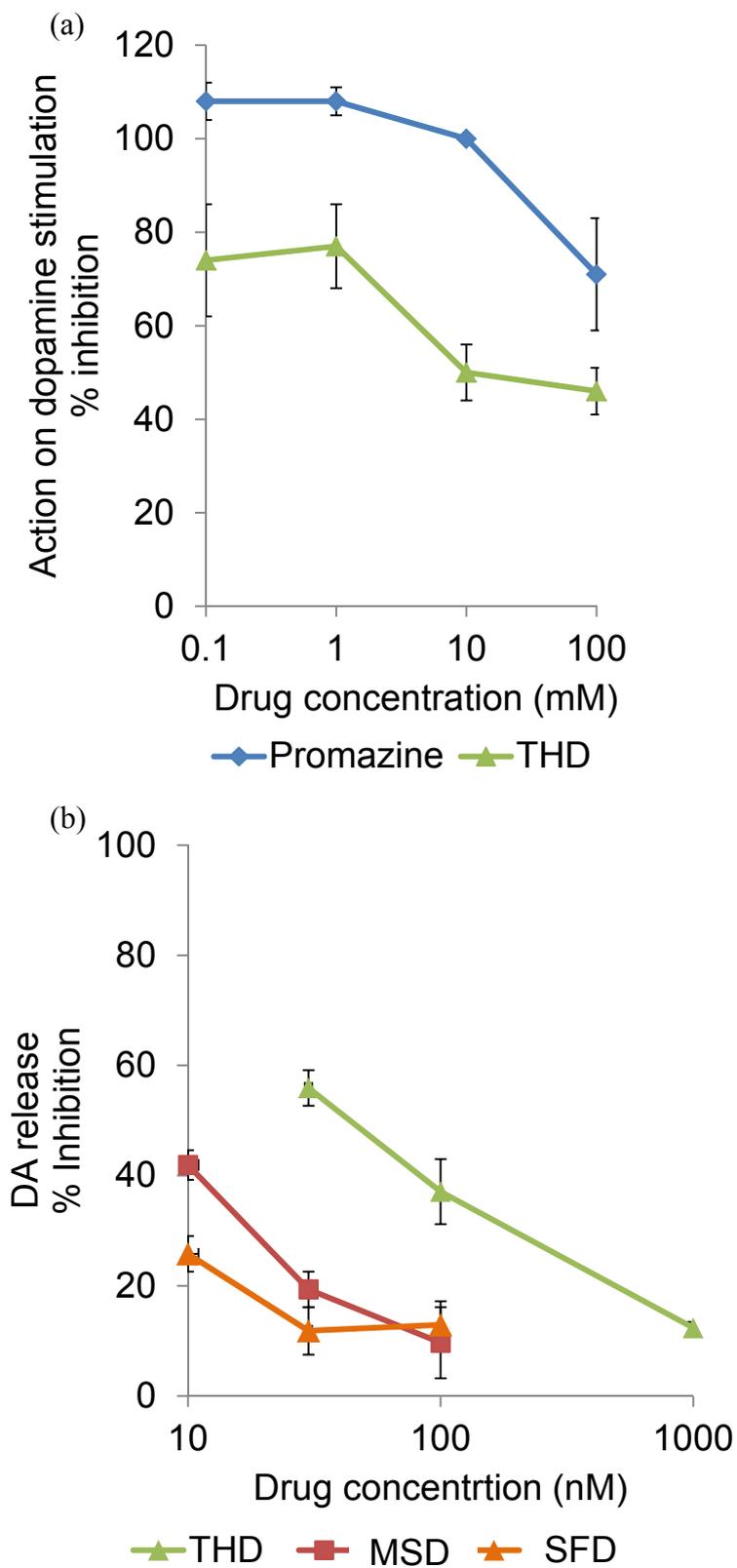


図 1.11 フェノチアジン化合物の薬効比較 (引用文献: 1-1 ~ 1-3)
 (a) THD とプロマジン, (b) THD と代謝物である MSD ([2-SO])及び SFD ([2-SO₂])

1.3.4 チオリダジン (THD) の構造, 薬効及び副作用

THDは10位の側鎖がピペリジンタイプで, 2位にSMe基を持つ(図1.10). THDは分子量370.6(フリー体), 窒素原子を持つ塩基性化合物で, 脂溶性である(表1.5).

表 1.5 THD の物性 (引用文献: 1-95)

IUPAC Name:	10-[2-(1-methylpiperidin-2-yl)ethyl]-2-(methylsulfanyl)-10H-phenothiazine
Chemical Formula:	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ S ₂ · HCl
Molecular Weight (free base):	407.0 (370.6)
pK _a :	9.5
Log P:	5.66

Log P: *n*-Octanol/water partition coefficient

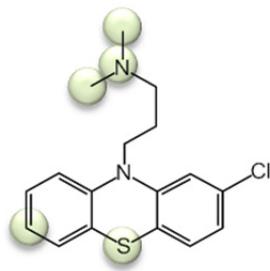
THDはシナプス後ろに存在するD2受容体への拮抗作用を持ち, 主にこの作用で他の抗精神病薬同様に効果を発揮していると考えられる. その作用はR体(C15不斉炭素)の方がS体よりも強いと報告されている(引用文献: 1-96, 1-97).

また他にも薬理作用があり, (第4脳室に接する脳幹領域に存在し, 薬物や毒物に反応して嘔吐中枢に刺激を送り, 嘔吐を誘発する) 化学受容器引き金帯においてドーパミンを阻害することで薬の嘔吐作用を弱めている(引用文献: 1-95, 1-98). また, プロラクチンの分泌促進やD1受容体の拮抗作用を持つが, これらの重要性は不明である.

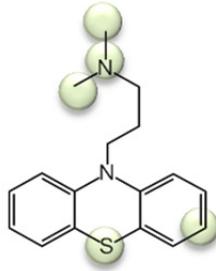
THDは突然心停止という生活を脅かすレベルの重篤な副作用を持つ. これは不整脈や心不全に起因し, 突然死に至るというものである(引用文献: 1-99). QT延長に関連した心室性不整脈はTHDで多くの報告がなされ, 他の抗精神病薬よりも関連性が高いと考えられている(引用文献: 1-100). 臨床研究で抗精神病薬を服用中に突然死した49人の内28人がTHDを服用していた(引用文献: 1-101). またTHDを過剰摂取した際, 他の抗精神病薬に比べて, 心室性不整脈をより引き起こすことが報告されている. これはQT延長として心電図に現れる(引用文献: 1-102). さらにラットやイヌにおいてもTHDの心毒性は報告されている(引用文献: 1-95). THDは他の定型抗精神病薬同様のヒスタミン受容体, αアドレナリン受容体及びムスカリン性受容体遮断作用による副作用を発現するが, それ以上に上述した心毒性に注意が必要な化合物である.

1.3.5 フェノチアジン化合物の薬物動態

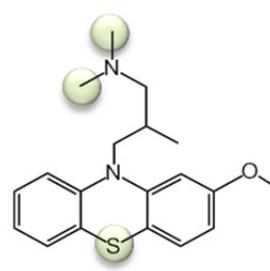
フェノチアジン化合物は分布容積及び血漿中タンパク結合率が高く、分布しやすい化合物群であるといえる。これはフェノチアジン化合物の高い脂溶性に起因すると推測している。代謝に関してはフェノチアジン骨格のS原子の酸化、芳香環の水酸化や10位側鎖末端のアミン周辺が主なターゲットである。また、フェノチアジン化合物は塩基性窒素(3級アミン)を持ち、代謝にはCYP2D6等のCYPファミリーが関与している(図1.12)(引用文献: 1-4~1-37, 1-103)。



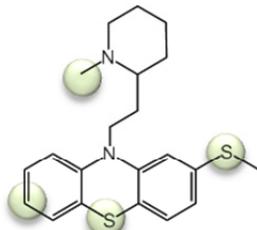
CPZ
(Largactil[®], Sanofi)



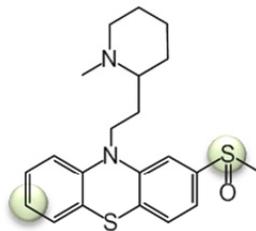
Promazine
(Talofen[®], Abbott)



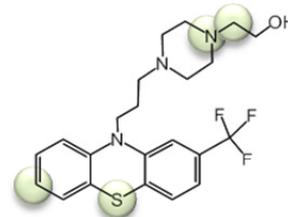
Levomepromazine
(LEVOTOMIN[®],
Mitsubishi Tanabe)



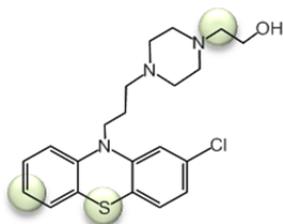
THD
(Melleril[®], Novartis)



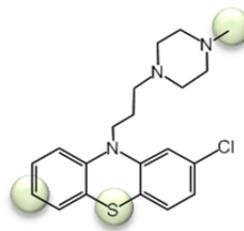
MSD
(Serentil[®], Novartis)



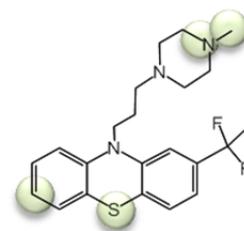
Fluphenazine
(FLUMEZIN[®],
Mitsubishi Tanabe)



Perphenazine
(PZC[®], Mitsubishi Tanabe)



Prochlorperazine
(Novamin[®], Shionogi)



Trifluoperazine
(TRIFLUOPERAZINE[®],
Mitsubishi Tanabe)

図 1.12 フェノチアジン化合物の代謝部位 (Site of metabolism, SOM)

1.3.6 THD の薬物動態

1.3.6.1 薬物動態全般

THD を 50 mg/body で経口投与すると、THD は消化管より速やかに吸収され、投与後 3 時間に最高血漿中濃度 (C_{max}) を迎え、その後、6.5 時間の消失半減期 ($t_{1/2}$) で比較的速やかに消失する (表 1.6 及び図 1.13) (引用文献: 1-104). THD の分布容積は 10 L/kg と非常に大きく、広くに体内に分布する (引用文献: 1-95).

放射能ラベル体を用いたラット組織内分布試験より、放射能は肺に最も多く分布し、次いで肝、脳の順であった (引用文献: 1-103). 血漿中タンパク結合率も 96.5% から 99.3% と高かった. 非結合型 THD の脳脊髄液中濃度は血漿中濃度の 2 倍である (引用文献: 1-106).

代謝は受けやすく、定量対象である MSD ([2-SO]), SFD ([2-SO₂]) 及び 5-SO 体 ([5-SO]) の C_{max} は THD の C_{max} に対してそれぞれ 2.33, 0.41 及び 0.97 倍とすべてにおいて高いが、特に MSD ([2-SO]) で高い (引用文献: 1-104).

未変化体の尿中排泄は 4% 以下と非常に少なく、ほとんどが代謝物として排泄される. 代謝物の胆汁排泄は 50% で、尿排泄は 34% である.

THD は統合失調症治療に用いられる場合、推奨投与量が 150 mg~600 mg である. 投与量と C_{max} や血中濃度-時間曲線下面積 (area under the blood concentration-time curve; AUC) に線形性があると仮定すると推奨投与量で治療した際の C_{max} 及び AUC はそれぞれ 0.8~3.3 $\mu\text{mol/L}$ 及び 6.8~27.2 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{hr}$ となる. *In vitro* 代謝試験では 10 $\mu\text{mol/L}$ を基質濃度に設定した. 生物学的利用能 (bioavailability; BA) は 60% といわれているが、バラツキが大きいことが報告されている (引用文献: 1-95). C_{max} 及び AUC についてもバラツキは大きい (表 1.6) (引用文献: 1-104). 主要代謝物である MSD ([2-SO]) や SFD ([2-SO₂]) は主に CYP2D6 で生成すると報告されており、BA, C_{max} 及び AUC のバラツキは CYP2D6 の遺伝子多型を反映しているものと推察される.

表 1.6 THD の薬物動態パラメータ (引用文献: 1-104)

Parameter	THD	MSD		SFD	
		([2-SO])	([2-SO ₂])	[5-SO]	
C_{max} (nmol/L)	278 ± 132	649 ± 103	115 ± 29	270 ± 107	
t_{max} (hr)	3.0 ± 1.6	3.6 ± 1.3	5.6 ± 1.3	5.3 ± 2.0	
$t_{1/2}$ (hr)	6.5 ± 1.3	8.7 ± 1.5	9.6 ± 1.9	18.4 ± 3.8	
AUC (nmol/L·hr)	2270 ± 1148	9709 ± 1940	2149 ± 540	8896 ± 4759	

THD dose: 50 mg t_{max} : 最高血漿中濃度到達時間

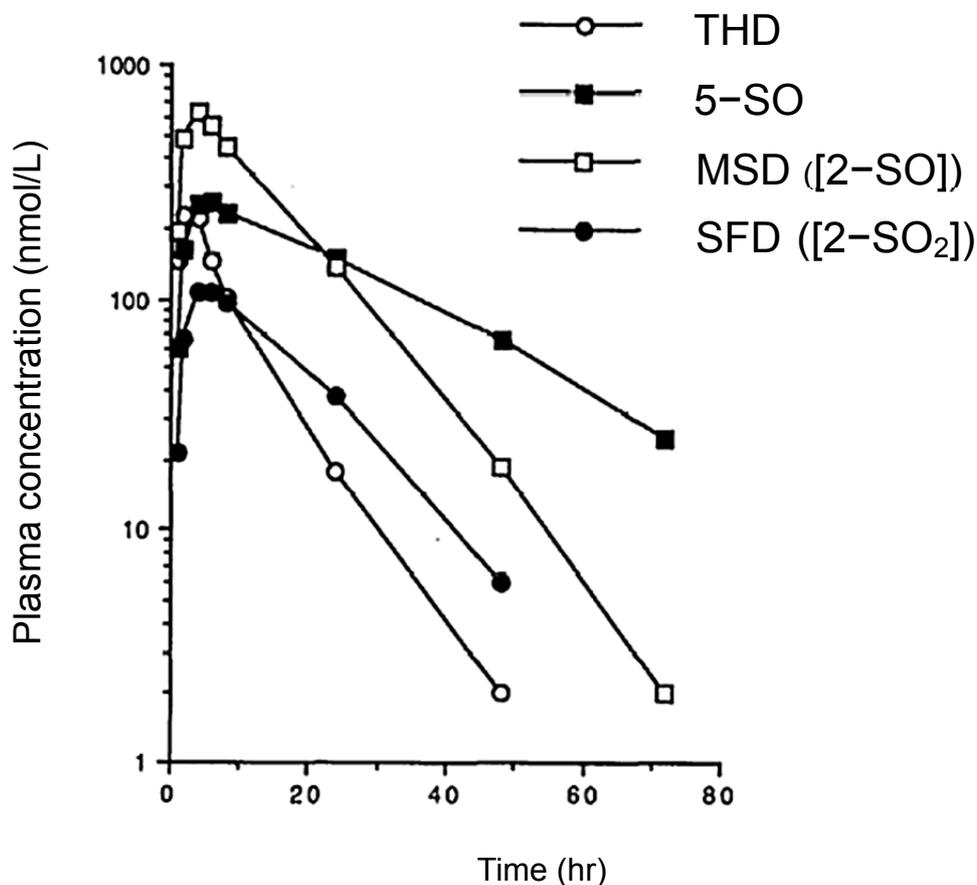


図 1.13 50 mg の THD を経口投与した後の THD 及び代謝物の血漿中濃度推移
(引用文献: 1-104)

1.3.6.2 CYP による代謝

THD の代謝物は MSD ([2-SO]), SFD ([2-SO₂]), [5-SO], フェノチアジン骨格のベンゼン環の hydroxide, *N*-desmethyl 体 ([*N*-desMe]) が認められることが報告されている (図 1.14) (引用文献: 1-4 ~ 1-6, 1-11, 1-18 ~ 1-22, 1-103). 上述したが, *in vivo* において, C_{max} が最も高いのは MSD ([2-SO]) で (未変化体の 2.33 倍), 次いで SFD ([2-SO₂]) 及び [5-SO] の順であった (hydroxide 及び [*N*-desMe] は定量対象外, 表 1.6 及び図 1.14) (引用文献: 1-104). ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験でも, MSD ([2-SO]) が最も生成し, 次いで, [5-SO], [*N*-desMe] 及び SFD ([2-SO₂]) の順であった (hydroxide は定量対象外) (引用文献: 1-4). これらの文献調査の結果から THD の主要代謝物は MSD ([2-SO]) であると考えられる. フェノチアジン化合物の薬効発現には 2

位の置換基が重要であるが、THD はこの 2 位が主に代謝され、より薬効が強い MSD ([2-SO])が生成する。

In vivo において、CYP2D6 の代謝能が THD の血漿中濃度に影響を与えるとの報告がある (引用文献: 1-43, 1-107)。さらに *in vitro* での実験より、THD, MSD ([2-SO])に特徴的なそれぞれ 2-SMe, 2-SOMe の代謝は、主に CYP2D6 によることが報告されている (図 1.14 及び表 1.7) (引用文献: 1-4)。[5-SO]の生成は主に CYP1A2 と CYP3A4 が関わっており、CYP2D6 も生成に寄与している (図 1.14 及び表 1.7) (引用文献: 1-4)。[N-desMe]の生成は主に flavin-containing monooxygenase (FMO), CYP1A2 及び CYP3A4 が関わっており、CYP2D6 も生成に寄与している (図 1.14 及び表 1.7) (引用文献: 1-4, 1-108)。Hydroxide の生成に関わる CYP 分子種の報告はないが、CPZ の主要代謝物である 7-hydroxide は主に CYP2D6 で生成することから(引用文献: 1-10), THD の hydroxide 生成には CYP2D6 が関わっているものと推測される。

これらより THD の主要代謝物は MSD ([2-SO])であり、THD の代謝には CYP2D6 の寄与が大きいことが推察される。しかしながら、hydroxide の生成に関して *in vivo* 及び *in vitro* のどちらにおいても定量的な報告なく、THD の代謝における hydroxide の寄与率は不明である。さらに網羅的に血漿や肝臓中の THD の代謝物を検索した報告も見つけられなかった。従って、他に重要な代謝物が存在する可能性、すなわち、MSD ([2-SO])に匹敵する主要代謝物が存在する懸念も捨てきれない。

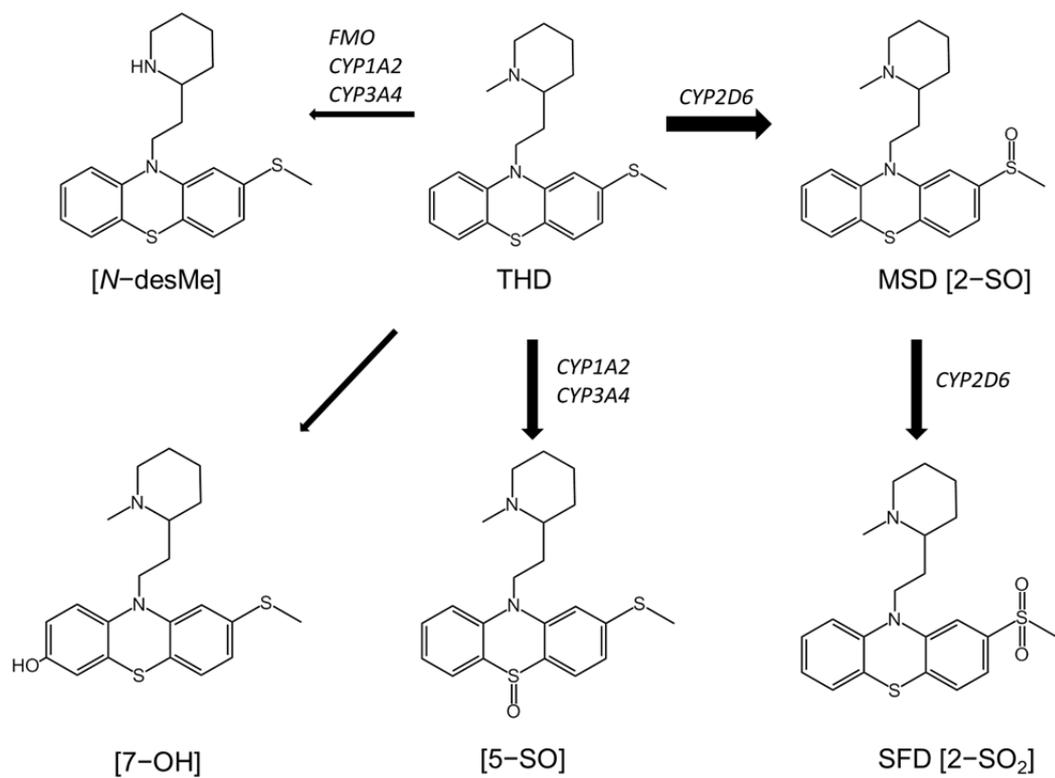


図 1.14 THD の推定代謝経路
太字は主要代謝経路

表 1.7 各 CYP 発現系マイクロソーム中における各代謝物の kinetic parameter (引用文献: 1-4)

	MSD ([2-SO])			SFD ([2-SO ₂])			[5-SO]			[N-desMe]		
	K _m ^a	V _{max} ^b	V _{max} /K _m	K _m ^a	V _{max} ^b	V _{max} /K _m	K _m ^a	V _{max} ^b	V _{max} /K _m	K _m ^a	V _{max} ^b	V _{max} /K _m
CYP1A2	160	1.786	0.0112	16	0.02	0.0012	80	7.519	0.094	36	0.403	0.0112
CYP2A6	323	0.485	0.0015	48	0.004	0.0001	34	0.879	0.0258	200	0.2	0.001
CYP2B6	67	0.605	0.009	55	0.006	0.0001	71	1.412	0.0199	55	0.124	0.0022
CYP2C9	45	0.221	0.0049	91	0.009	0.0001	114	1.25	0.011	20	0.057	0.0028
CYP2C19	47	6.289	0.1338	26	0.141	0.0054	800	6.993	0.0087	400	2.128	0.0053
CYP2D6	62	16.667	0.2688	10	0.468	0.0468	385	5.263	0.0137	67	0.233	0.0035
CYP2E1	333	0.527	0.0016	38	0.004	0.0001	50	1.16	0.0232	83	0.109	0.0013
CYP3A4	42	0.302	0.0072	20	0.009	0.0004	28	1.193	0.0426	21	0.148	0.007

a. In μmol/L

b. In pmol/pmol CYP/min

1.3.7 THD の代謝上の問題点

CYP2D6 による THD の代謝能低下は、THD の血中濃度の上昇を引き起こす。THD の血中濃度が高いと重篤な毒性である QT 延長が起これやすいと報告されている (引用文献: 1-37)。実際、THD は QT 延長が多く発現し、多くの国で撤退している (引用文献: 1-38)。

CYP2D6 による THD の代謝能低下の要因として、まず THD と CYP2D6 阻害薬との併用による DDI が挙げられる。主に一つの CYP 分子種の代謝寄与率が高い薬物は、その酵素が阻害されると薬物の血中濃度が著しく増加するが、上述した通り、THD の代謝には CYP2D6 が大きく関与しており、DDI による血漿中濃度の上昇が起これると考えられる (引用文献: 1-4 ~ 1-6, 1-37, 1-39)。従って、THD と多剤の併用には十分に注意が必要である。

また THD の代謝能低下のもう一つの要因として遺伝子多型があげられる (引用文献: 1-37, 1-40 ~ 1-43)。例えば、遺伝子多型によって CYP2D6 の poor metabolizer (PM) と efficient (rapid) metabolizer (EM) が存在し、THD を同じ投与量で投与しても、 C_{max} で約 3 倍の違いがでる (図 1.15) (引用文献: 1-109)。この様に PM と EM では大きく血漿中濃度が違い、個体のバラツキにつながっている。THD の投与時には遺伝子多型の影響を十分に考慮して投与すべきで、慎重な投与が必要とされる。

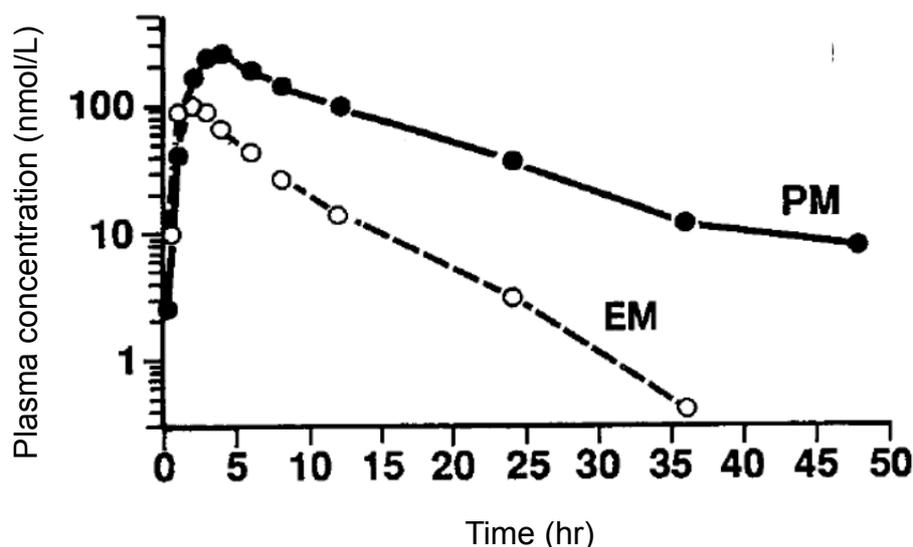


図 1.15 THD (25 mg) を単回経口投与した後の THD の血漿中濃度 (引用文献: 1-109)

CYP2D6 による THD の代謝能低下が起こると、MSD ([2-SO])の生成が阻害されると考えられる。THD より MSD ([2-SO])の方が薬効が高いことから、MSD ([2-SO])の阻害は、薬効低減を引き起こす可能性がある。同時に未変化体の血中濃度の増加による QT 延長作用が起こると推測される。

1.4 本研究の目的

ドーパミン D₂受容体アンタゴニスト作用を持つフェノチアジン系抗精神病薬であるチオリダジン (THD)は、類薬と異なり、主に CYP2D6 でフェノチアジン環 2 位の S-メチル基が主に代謝される。この代謝反応が薬効や副作用に影響を及ぼす。近年、THD と CYP2D6 の共結晶構造が複数報告された。本研究では、まず第 2 章で THD の *in vitro* での代謝特性を LC-UV-MS/MS で体系的に明らかにし、第 3 章以降で分子動力学法 (MD)及び密度汎関数法 (DFT)を用いて結晶結合ポーズと代謝物との対応を調べ、代謝機構を原子・電子レベルで明らかにすることを目的とした。

引用文献

- [1-1] Palmer, G. C., Manian, A. A. (1976). Actions of phenothiazine analogues on dopamine-sensitive adenylate cyclase in neuronal and glial-enriched fractions from rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, 25(1), 63-71.
- [1-2] Bylund, D. B. (1981). Interactions of neuroleptic metabolites with dopaminergic, alpha adrenergic and muscarinic cholinergic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 217(1), 81-86.
- [1-3] Niedzwiecki, D. M., Mailman, R. B., Cubeddu, L. X. (1984). Greater potency of mesoridazine and sulforidazine compared with the parent compound, thioridazine, on striatal dopamine autoreceptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 228(3), 636-639.
- [1-4] Wójcikowski, J., Maurel, P., Daniel, W. A. (2006). Characterization of human cytochrome p450 enzymes involved in the metabolism of the piperidine-type phenothiazine neuroleptic thioridazine. *Drug. Metab. Dispos.*, 34(3), 471-476.
- [1-5] Wen, B., Zhou, M. (2009). Metabolic activation of the phenothiazine antipsychotics chlorpromazine and thioridazine to electrophilic iminoquinone species in human liver microsomes and recombinant P450s. *Chem. Biol. Interact.*, 181(2), 220-226.
- [1-6] Daniel, W. A., Syrek, M., Haduch, A., Wójcikowski, J. (2000). Pharmacokinetics and metabolism of thioridazine during co - administration of tricyclic antidepressants. *Br. J. Pharmacol.*, 131(2), 287-295.
- [1-7] Wójcikowski, J., Boksa, J., Daniel, W. A. (2010). Main contribution of the cytochrome P450 isoenzyme 1A2 (CYP1A2) to N-demethylation and 5-sulfoxidation of the phenothiazine neuroleptic chlorpromazine in human liver—A comparison with other phenothiazines. *Biochem. Pharmacol.*, 80(8), 1252-1259.
- [1-8] West, N. R., Rosenblum, M. P., Sprince, H., Gold, S., Boehme, D. H., Vogel, W. H. (1974). Assay procedures for thioridazine, trifluoperazine, and their sulfoxides and determination of urinary excretion of these compounds in mental patients. *J. Pharm. Sci.*, 63(3), 417-420.
- [1-9] Hartmann, F. R. A. N. Z., Gruenke, L. D., Craig, J. C., Bissell, D. M. (1983). Chlorpromazine metabolism in extracts of liver and small intestine from guinea pig and from man. *Drug. Metab. Dispos.*, 11(3), 244-248.
- [1-10] Yoshii, K., Kobayashi, K., Tsumuji, M., Tani, M., Shimada, N., Chiba, K. (2000). Identification of human cytochrome P450 isoforms involved in the 7-hydroxylation of chlorpromazine by human liver microsomes. *Life Sci.*, 67(2), 175-184.

- [1-11] Svendsen, C. N., Bird, E. D. (1986). HPLC with electrochemical detection to measure chlorpromazine, thioridazine and metabolites in human brain. *Psychopharmacology*, 90(3), 316-321.
- [1-12] Yamaori, S., Yamazaki, H., Suzuki, A., Yamada, A., Tani, H., Kamidate, T., ... Kamataki, T. (2003). Effects of cytochrome b 5 on drug oxidation activities of human cytochrome P450 (CYP) 3As: similarity of CYP3A5 with CYP3A4 but not CYP3A7. *Biochem. Pharmacol.*, 66(12), 2333-2340.
- [1-13] Wójcikowski, J., Pichard - Garcia, L., Maurel, P., Daniel, W. A. (2003). Contribution of human cytochrome P - 450 isoforms to the metabolism of the simplest phenothiazine neuroleptic promazine. *Br. J. Pharmacol.*, 138(8), 1465-1474.
- [1-14] Daniel, W., Syrek, M., Janczar, L., Boksa, J. (1994). The pharmacokinetics of promazine and its metabolites after acute and chronic administration to rats--a comparison with the pharmacokinetics of imipramine. *Pol. J. Pharmacol.*, 47(2), 127-136.
- [1-15] Fishman, V., Goldenberg, H. (1965). SIDE-CHAIN DEGRADATION AND RING HYDROXYLATION OF PHENOTHIAZINE TRANQUILIZERS. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 150(1), 122-128.
- [1-16] Syrek, M., Wójcikowski, J., Daniel, W. A. (1996). Promazine pharmacokinetics during concurrent treatment with tricyclic antidepressants. *Pol. J. Pharmacol.*, 49(6), 453-462.
- [1-17] Wójcikowski, J., Basińska, A., Daniel, W. A. (2014). The cytochrome P450-catalyzed metabolism of levomepromazine: a phenothiazine neuroleptic with a wide spectrum of clinical application. *Biochem. Pharmacol.*, 90(2), 188-195.
- [1-18] Lin, G., Hawes, E. M., McKay, G., Korchinski, E. D., Midha, K. K. (1993). Metabolism of piperidine-type phenothiazine antipsychotic agents. IV. Thioridazine in dog, man and rat. *Xenobiotica* 23(10), 1059-1074.
- [1-19] Svendsen, C. N., Hrbek, C. C., Casendino, M., Nichols, R. D., Bird, E. D. (1988). Concentration and distribution of thioridazine and metabolites in schizophrenic post-mortem brain tissue. *Psychiatry. Res.*, 23(1), 1-10.
- [1-20] Hartigan-Go, K., Bateman, N., Nyberg, G., Mårtensson, E., Thomas, S. H. (1996). Concentration-related pharmacodynamic effects of thioridazine and its metabolites in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 60(5), 543-553.
- [1-21] Papadopoulos, A. S., Cramer, J. L. (1986). Sulphoxide metabolites of thioridazine in man. *Xenobiotica*, 16(12), 1097-1107.

- [1-22] Salih, I. S. M., Thanacoody, R. H. K., McKay, G. A., Thomas, S. H. L. (2007). Comparison of the effects of thioridazine and mesoridazine on the QT interval in healthy adults after single oral doses. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 82(5), 548-554.
- [1-23] Gaertner, H. J., Breyer, U., Liomin, G. (1974). Metabolism of trifluoperazine, fluphenazine, prochlorperazine and perphenazine in rats: in vitro and urinary metabolites. *Biochem. Pharmacol.*, 23(2), 303-311.
- [1-24] Curry, S. H., Whelpton, R., De Schepper, P. J., Vranckx, S., Schiff, A. A. (1979). Kinetics of fluphenazine after fluphenazine dihydrochloride, enanthate and decanoate administration to man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 7(4), 325.
- [1-25] Aravagiri, M., Marder, S. R., Yuwiler, A., Midha, K. K., Kula, N. S., Baldessarini, R. J. (1995). Distribution of fluphenazine and its metabolites in brain regions and other tissues of the rat. *Neuropsychopharmacology*, 13(3), 235-247.
- [1-26] Heyes, W. F., Robinson, M. L. (1985). HPLC procedure for the determination of some potential fluphenazine metabolites in urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 3(5), 477-481.
- [1-27] Hansen, L. B., Elley, J., Christensen, T. R., Larsen, N. E., Naestoft, J., Hvidberg, E. F. (1979). Plasma levels of perphenazine and its major metabolites during simultaneous treatment with anticholinergic drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 7(1), 75-80.
- [1-28] Van Kempen, G. M. J. (1971). Urinary excretion of perphenazine and its sulfoxide during administration in oral and long-acting injectable form. *Psychopharmacologia*, 21(3), 283-286.
- [1-29] HUANG, C. L., KURLAND, A. A. (1964). Perphenazine (Trilafon) metabolism in psychotic patients. *Arch. Gen. Psychiatry.*, 10(6), 639-646.
- [1-30] Olesen, O. V., Linnet, K. (2000). Identification of the human cytochrome P450 isoforms mediating in vitro N - dealkylation of perphenazine. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 50(6), 563-571.
- [1-31] Larsson, M., Forsman, A. (1983). A high-performance liquid chromatographic method for the assay of perphenazine and its dealkylated metabolite in serum after therapeutic doses. *Ther. Drug Monit.*, 5(2), 225-228.
- [1-32] Isah, A. O., Rawlins, M. D., Bateman, D. N. (1991). Clinical pharmacology of prochlorperazine in healthy young males. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 32(6), 677-684.
- [1-33] Aravagiri, M., Hawes, E. M., Midha, K. K. (1984). Radioimmunoassay for the sulfoxide metabolite of trifluoperazine and its application to a kinetic study in humans. *J. Pharm. Sci.*, 73(10), 1383-1387.

- [1-34] Aravagiri, M., Hawes, E. M., Midha, K. K. (1985). Radioimmunoassay for the 7 - hydroxy metabolite of trifluoperazine and its application to a kinetic study in human volunteers. *J. Pharm. Sci.*, 74(11), 1196-1202.
- [1-35] Breyer, U., Gaertner, H. J., Prox, A. (1974). Formation of identical metabolites from piperazine-and dimethylamino-substituted phenothiazine drugs in man, rat and dog. *Biochem. Pharmacol.*, 23(2), 313-322.
- [1-36] Aravagiri, M., Hawes, E. M., Midha, K. K. (1986). Development and application of a specific radioimmunoassay for trifluoperazine N4'-oxide to a kinetic study in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 237(2), 615-622.
- [1-37] Buckley, N. A., Whyte, I. M., Dawson, A. H. (1995). Cardiotoxicity more common in thioridazine overdose than with other neuroleptics. *Clin. Toxicol.*, 33(3), 199-204.
- [1-38] Purhonen, M., Koponen, H., Tiihonen, J., Tanskanen, A. (2012). Outcome of patients after market withdrawal of thioridazine: a retrospective analysis in a nationwide cohort. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.*, 21(11), 1227-1231.
- [1-39] Murray, M. (2006). Role of CYP pharmacogenetics and drug - drug interactions in the efficacy and safety of atypical and other antipsychotic agents. *J. Pharm. Pharmacol.*, 58(7), 871-885.
- [1-40] Zhou, S. F. (2009). Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance. *Clin. Pharmacokinet.*, 48(12), 761-804.
- [1-41] Shu-Feng-Zhou, P. (2009). Polymorphism of Human Cytochrome P450 2D6 and Its Clinical Significance Part II. *Clin. Pharmacokinet.*, 48, 761-804.
- [1-42] Bahr, C., Movin, G., Nordin, C., Lidén, A., Hammarlund - Udenaes, M., Hedberg, A., Sjöqvist, F. (1991). Plasma levels of thioridazine and metabolites are influenced by the debrisoquin hydroxylation phenotype. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 49(3), 234-240.
- [1-43] Berecz, R., de la Rubia, A., Dorado, P., Fernández-Salguero, P., Dahl, M. L., LLerena, A. (2003). Thioridazine steady-state plasma concentrations are influenced by tobacco smoking and CYP2D6, but not by the CYP2C9 genotype. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 59(1), 45-50.
- [1-44] Sasahara, K., Shikimi, H., Haraguchi, S., Sakamoto, H., Honda, S. I., Harada, N., Tsutsui, K. (2007). Mode of action and functional significance of estrogen-inducing dendritic growth, spinogenesis, and synaptogenesis in the developing Purkinje cell. *J. Neurosci.*, 27(28), 7408-7417.
- [1-45] Groves, J. T., Han, Y. Z., de Montellano, P. O. (1995). *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. Springer.

- [1-46] Poulos, T. L., Finzel, B. C., Howard, A. J. (1987). High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J. Mol. Biol.*, 195(3), 687-700.
- [1-47] Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E. F., McRee, D. E. (2000). Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol. cell.*, 5(1), 121-131.
- [1-48] Imai, Y., Kamataki, T. (1998). P450: new functions and application to practical sciences. *Tanpakushitsu kakusan koso*, 43(3), 203.
- [1-49] Ekroos, M., Sjögren, T. (2006). Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103(37), 13682-13687.
- [1-50] Sevrioukova, I. F., Poulos, T. L. (2010). Structure and mechanism of the complex between cytochrome P4503A4 and ritonavir. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107(43), 18422-18427.
- [1-51] Wang, A., Savas, U., Hsu, M. H., Stout, C. D., Johnson, E. F. (2012). Crystal structure of human cytochrome P450 2D6 with prinomastat bound. *J. Biol. Chem.*, 287(14), 10834-10843.
- [1-52] Rowland, P., Blaney, F. E., Smyth, M. G., Jones, J. J., Leydon, V. R., Oxbrow, A. K., Bridges, A. M. (2006). Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *J. Biol. Chem.*, 281(11), 7614-7622.
- [1-53] Sirim, D., Widmann, M., Wagner, F., Pleiss, J. (2010). Prediction and analysis of the modular structure of cytochrome P450 monooxygenases. *BMC Struct. Biol.*, 10(1), 34.
- [1-54] Gotoh, O. (1992). Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J. Biol. Chem.*, 267(1), 83-90.
- [1-55] de Groot, M. J., Vermeulen, N. P., Kramer, J. D., van Acker, F. A., Donné-Op den Kelder, G. M. (1996). A three-dimensional protein model for human cytochrome P450 2D6 based on the crystal structures of P450 101, P450 102, and P450 108. *Chem. Res. Toxicol.*, 9(7), 1079-1091.
- [1-56] Wester, M. R., Yano, J. K., Schoch, G. A., Yang, C., Griffin, K. J., Stout, C. D., Johnson, E. F. (2004). The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 279(34), 35630-35637.
- [1-57] Yano, J. K., Wester, M. R., Schoch, G. A., Griffin, K. J., Stout, C. D., Johnson, E. F. (2004). The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 279(37), 38091-38094.

- [1-58] Ingelman-Sundberg, M. (2004). Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 369(1), 89-104.
- [1-59] Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S. S., Kim, J. J. P. (1997). Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN-and FAD-containing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94(16), 8411-8416.
- [1-60] Hasemann, C. A., Kurumbail, R. G., Boddupalli, S. S., Peterson, J. A., Deisenhofer, J. (1995). Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure*, 3(1), 41-62.
- [1-61] Omura, T. (2005). Heme-thiolate proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338(1), 404-409.
- [1-62] Lee, D. S., Park, S. Y., Yamane, K., Obayashi, E., Hori, H., Shiro, Y. (2001). Structural characterization of n-butyl-isocyanide complexes of cytochromes P450nor and P450cam. *Biochemistry*, 40(9), 2669-2677.
- [1-63] Horie, T., Yokoi, T., (2003) 臨床薬物代謝化学. Hirokawa publishing
- [1-64] Sato, R., Ohmura, T., (1988) 薬物代謝の酵素系, Kodansha
- [1-65] Kamataki, T., Takahashi, K., Yamasaki, H., (2010) 医療薬物代謝学, Mimizukusya
- [1-66] Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D., Dawson, J. H. (1996). Heme-containing oxygenases. *Chem. Rev.*, 96(7), 2841-2888.
- [1-67] Dawson, J. H. (1988). Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science*, 240(4851), 433-439.
- [1-68] Shoji, O., Watanabe, Y. (2014). Peroxygenase reactions catalyzed by cytochromes P450. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, 19(4-5), 529-539.
- [1-69] Meunier, B., De Visser, S. P., Shaik, S. (2004). Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.*, 104(9), 3947-3980.
- [1-70] Shaik, S., Filatov, M., Schröder, D., Schwarz, H. (1998). Electronic structure makes a difference: cytochrome P-450 mediated hydroxylations of hydrocarbons as a two-state reactivity paradigm. *Chemistry-weinheim-european journal*, 4, 193-199.
- [1-71] Harris, N., Cohen, S., Filatov, M., Ogliaro, F., Shaik, S. (2000). Two - State Reactivity in the Rebound Step of Alkane Hydroxylation by Cytochrome P - 450: Origins of Free Radicals with Finite Lifetimes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 39(11), 2003-2007.

- [1-72] Filatov, M., Harris, N., Shaik, S. (1999). A theoretical study of electronic factors affecting hydroxylation by model ferryl complexes of cytochrome P-450 and horseradish peroxidase. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, (3), 399-410.
- [1-73] Guengerich, F. P., Rendic, S. (2010). Update information on drug metabolism systems—2009, part I. *Curr. Drug Metab.*, 11(1), 1-3.
- [1-74] Wienkers, L. C., & Heath, T. G. (2005). Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4(10), 825-833.
- [1-75] Zanger, U. M., Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.*, 138(1), 103-141.
- [1-76] Lewis, D. F. (2000). On the recognition of mammalian microsomal cytochrome P450 substrates and their characteristics: towards the prediction of human p450 substrate specificity and metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 60(3), 293-306.
- [1-77] Smith, D. A., Jones, B. C. (1992). Speculations on the substrate structure-activity relationship (SSAR) of cytochrome P450 enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 44(11), 2089-2098.
- [1-78] Johansson, I., Lundqvist, E., Bertilsson, L., Dahl, M. L., Sjöqvist, F., Ingelman-Sundberg, M. (1993). Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90(24), 11825-11829.
- [1-79] Zanger, U. M., Vilbois, F., Hardwick, J. P., Meyer, U. A. (1988). Absence of hepatic cytochrome P450buf1 causes genetically deficient debrisoquine oxidation in man. *Biochemistry*, 27(15), 5447-5454.
- [1-80] Kola, I., Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3(8), 711-716.
- [1-81] Stahl, S. M., Meltzer, H. Y. (1997). Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications. *Trends Neurosci.*, 20(1), 50-50.
- [1-82] Rostkowski, M., Spjuth, O., Rydberg, P. (2013). WhichCyp: prediction of cytochromes P450 inhibition. *Bioinformatics*, 29(16), 2051-2052.
- [1-83] Zaretski, J., Bergeron, C., Huang, T. W., Rydberg, P., Swamidass, S. J., Breneman, C. M. (2013). RS-WebPredictor: a server for predicting CYP-mediated sites of metabolism on drug-like molecules. *Bioinformatics*, 29(4), 497-498.
- [1-84] McLaughlin, L. A., Paine, M. J., Kemp, C. A., Maréchal, J. D., Flanagan, J. U., Ward, C. J., Wolf, C. R. (2005). Why is quinidine an inhibitor of cytochrome P450 2D6? The role of key active-site residues in quinidine binding. *J. Biol. Chem.*, 280(46), 38617-38624.

- [1-85] Unwalla, R. J., Cross, J. B., Salaniwal, S., Shilling, A. D., Leung, L., Kao, J., Humblet, C. (2010). Using a homology model of cytochrome P450 2D6 to predict substrate site of metabolism. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 24(3), 237-256.
- [1-86] Yuki, H., Honma, T., Hata, M., Hoshino, T. (2012). Prediction of sites of metabolism in a substrate molecule, instanced by carbamazepine oxidation by CYP3A4. *Bioorg. Med. Chem.*, 20(2), 775-783.
- [1-87] Perić-Hassler, L., Stjernschantz, E., Oostenbrink, C., Geerke, D. P. (2013). CYP 2D6 binding affinity predictions using multiple ligand and protein conformations. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(12), 24514-24530.
- [1-88] Oláh, J., Mulholland, A. J., Harvey, J. N. (2011). Understanding the determinants of selectivity in drug metabolism through modeling of dextromethorphan oxidation by cytochrome P450. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108(15), 6050-6055.
- [1-89] Singh, S. B., Shen, L. Q., Walker, M. J., Sheridan, R. P. (2003). A model for predicting likely sites of CYP3A4-mediated metabolism on drug-like molecules. *J. Med. Chem.*, 46(8), 1330-1336.
- [1-90] Jones, J. P., Mysinger, M., Korzekwa, K. R. (2002). Computational models for cytochrome P450: a predictive electronic model for aromatic oxidation and hydrogen atom abstraction. *Drug. Metab. Dispos.*, 30(1), 7-12.
- [1-91] Hata, M., Tanaka, Y., Kyoda, N., Osakabe, T., Yuki, H., Ishii, I., Hoshino, T. (2008). An epoxidation mechanism of carbamazepine by CYP3A4. *Bioorg. Med. Chem.*, 16(9), 5134-5148.
- [1-92] Keltner, N. L., Folks, D. G., Palmer, C. A., Powers, R. E. (1998). *Psychobiological foundations of psychiatric care*. CV Mosby.
- [1-93] Harvey, P. D., Sharma, T. (2002). *Understanding and treating cognition in schizophrenia*. CRC Press.
- [1-94] Burger, A. (1970). *Medicinal chemistry* (Vol. 1). John Wiley Sons.
- [1-95] Dollery C (1998) *Therapeutic Drugs*, 2nd ed. Churchill Livingstone.
- [1-96] Faedda, G., Kula, N. S., Baldessarini, R. J. (1989). Pharmacology of binding of 3 H-SCH-23390 to D-1 dopaminergic receptor sites in rat striatal tissue. *Biochem. Pharmacol.*, 38(3), 473-480.
- [1-97] Svendsen, C. N., Froimowitz, M., Hrbek, C., Campbell, A., Kula, N., Baldessarini, R. J., Bird, E. D. (1988). Receptor affinity, neurochemistry and behavioral characteristics of the enantiomers of thioridazine: evidence for different stereoselectivities at D 1 and D 2 receptors in rat brain. *Neuropharmacology*, 27(11), 1117-1124.

- [1-98] Borison, R. L., Fields, J. Z., Diamond, B. I. (1981). Site-specific blockade of dopamine receptors by neuroleptic agents in human brain. *Neuropharmacology*, 20(12B), 1321-1322.
- [1-99] Sydney, M. A. (1973). Ventricular arrhythmias associated with use of thioridazine hydrochloride in alcohol withdrawal. *BMJ*, 4(5890), 467-467.
- [1-100] Thomas, S. H. (1993). Drugs, QT interval abnormalities and ventricular arrhythmias. *Adverse drug reactions and toxicological reviews*, 13(2), 77-102.
- [1-101] Mehtonen, O. P., Aranko, K., Mälkonen, L., Vapaatalo, H. (1991). A survey of sudden death associated with the use of antipsychotic or antidepressant drugs: 49 cases in Finland. *Acta. Psychiatr. Scand.* , 84(1), 58-64.
- [1-102] Buckley, N. A., Whyte, I. M., Dawson, A. H. (1995). Cardiotoxicity more common in thioridazine overdose than with other neuroleptics. *Clin. Toxicol.* , 33(3), 199-204.
- [1-103] Lin, G., Hawes, E. M., McKay, G., Korchinski, E. D., Midha, K. K. (1993). Metabolism of piperidine-type phenothiazine antipsychotic agents. IV. Thioridazine in dog, man and rat. *Xenobiotica*, 23(10), 1059-1074.
- [1-104] Hartigan-Go, K., Bateman, N., Nyberg, G., Mårtensson, E., Thomas, S. H. (1996). Concentration-related pharmacodynamic effects of thioridazine and its metabolites in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 60(5), 543-553.
- [1-105] Miller, R. J., HILEY, C. R. (1974). Anti-muscarinic properties of neuroleptics and drug-induced Parkinsonism. *Nature*, 248(449), 596-597.
- [1-106] Axelsson, R., Mårtensson, E., Alling, C. (1982). Serum concentration and protein binding of thioridazine and its metabolites in patients with chronic alcoholism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 23(4), 359-363.
- [1-107] Thanacoody, R. H. K., Daly, A. K., Reilly, J. G., Ferrier, I. N., Thomas, S. H. L. (2007). Factors affecting drug concentrations and QT interval during thioridazine therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 82(5), 555-565.
- [1-108] Blake, B. L., Rose, R. L., Mailman, R. B., Levi, P. E., Hodgson, E. (1995). Metabolism of thioridazine by microsomal monooxygenases: relative roles of P450 and flavin-containing monooxygenase. *Xenobiotica*, 25(4), 377-393.
- [1-109] Bahr, C., Movin, G., Nordin, C., Lidén, A., Hammarlund - Udenaes, M., Hedberg, A., Sjöqvist, F. (1991). Plasma levels of thioridazine and metabolites are influenced by the debrisoquin hydroxylation phenotype. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 49(3), 234-240.

第2章 *in vitro* での THD の代謝

2.1 序論

文献調査から THD (thioridazine)の主要代謝物は mesoridazine (MSD, [2-SO])であり, THD の代謝には CYP2D6 の寄与が大きいことが推察される. (引用文献: 2-1) しかしながら, 7位 hydroxide ([7-OH])の生成に関して *in vivo* 及び *in vitro* のどちらにおいても定量的な報告はなく, THD の代謝における[7-OH]の寄与率は不明である. さらに網羅的に血漿や肝臓中の THD の代謝物を検索した報告も見つけられなかった. 従って, 他に重要な代謝物が存在する可能性, すなわち, [2-SO]に匹敵する主要代謝物が存在する懸念も捨てきれない.

そこで本章では, ヒト肝ミクロソーム及び CYP2D6 発現系ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝を実施し, THD, その既知代謝物及び未知代謝物を liquid chromatography-ultra violet-tandem mass spectrometry (LC-UV-MS/MS) を用いて網羅的に分析し, その生成量から反応速度定数を求め, THD の代謝特性を明らかにすることとした. また, THD の代謝特性との比較目的で, THD と同じフェノチアジン骨格を有する chlorpromazine (CPZ)についても代謝試験を実施した.

2.2 方法

2.2.1 基質

表 2.1 から表 2.5 に示す各基質をそれぞれ dimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解した. さらに DMSO で適宜混合・希釈し, 基質調製液とした. 10°C 以下, 遮光下で保存した.

表 2.1 基質 1

名称	THD (hydrochloride, racemic mixture)
供給源	Sigma-Aldrich Co.
保管条件	室温, 遮光

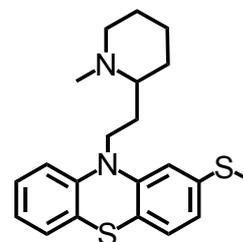


表 2.2 基質 2

名称	CPZ (hydrochloride)
供給源	Sigma-Aldrich Co.
保管条件	室温, 遮光

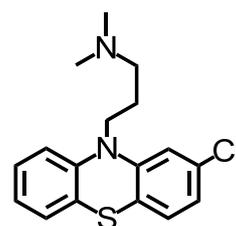


表 2.3 基質 3

名称	MSD (besylate) ([2-SO])
供給源	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
保管条件	室温, 遮光

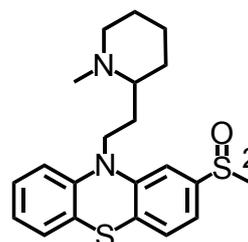


表 2.4 基質 4

名称	Sulforidazine (SFD) [2-SO ₂]
供給源	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
保管条件	冷蔵, 遮光

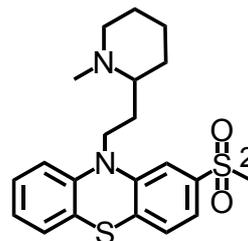
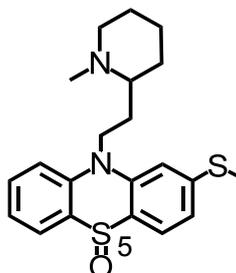


表 2.5 基質 5

名称	5S-sulfoxide of THD [5-SO]
供給源	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
保管条件	冷凍, 遮光



2.2.2 酵素

THD, β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form (NADPH), 及び β -Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form (NADH) は Sigma-Aldrich Co.から購入した. MSD besylate ([2-SO]), SFD 及び 5-SO は Santa Cruz Biotechnology, Inc から購入した. バキュロウイルス細胞株を用いたヒト CYP1A2, CYP2D6 及び CYP3A4 発現系マイクロソーム及びヒト肝マイクロソームは Corning Japan K.K.から得た. リン酸緩衝液 (pH 7.4)は Nakarai tesque, Inc.から購入した. 他の試薬や溶媒は特級または HPLC グレードのものをを用いた.

2.2.3 試験系

基本反応系を表 2.6 及び表 2.7 に示す。反応は基質調製液以外を混合し、37°C 温浴中で pre-incubation を 5 分行った後、基質調製液を添加することで開始した。各規定時間に一部を分取し、アセトニトリルと混合することで、反応を停止した。ヒト肝ミクロソームを使用したときは 0, 10, 30 及び 120 分に反応停止した。ヒト CYP 発現系ミクロソーム使用の際は、0, 5, 10, 20, 40, 60, 120 及び 180 分に反応停止した。THD の中心基質濃度を 10 $\mu\text{mol/L}$ に設定した。理由は次の 3 つである；① [2-SO] 生成の K_m は 62 $\mu\text{mol/L}$ であり、(引用文献: 2-1) 反応速度と基質濃度が比例する一次反応の条件下となる 62 $\mu\text{mol/L}$ 以下に設定すること、② 推奨投与量で治療した際の C_{max} は 0.8~3.3 $\mu\text{mol/L}$ であること、(引用文献: 2-2) ③ 代謝物が検出可能な濃度であること。

表 2.6 基本反応系 1 (ヒト肝ミクロソーム)

名称	最終濃度
Potassium phosphate buffer	0.1 mol/L
Human liver microsomes	1 mg protein/mL
NADPH	2.5 mmol/L
NADH	2.5 mmol/L
Substrate	10 $\mu\text{mol/L}$

表 2.7 基本反応系 2 (ヒト CYP 発現系ミクロソーム)

名称	最終濃度
Potassium phosphate buffer	0.1 mol/L
Recombinant microsomes	100 nmol/L (P450 量)
NADPH	2.5 mmol/L
NADH	2.5 mmol/L
Substrate	1~300 $\mu\text{mol/L}$ の間で設定

反応 (37°C) 停止後、遠心分離した上清を測定サンプルとした。上清を保存は -15°C 以下で行った。

2.2.4 分析

測定サンプルは LC-UV-MS/MS で分析した。

2.2.4.1 標準溶液

標準物質は, THD hydrochloride 及び CPZ hydrochloride を Sigma-Aldrich Co. から, MSD besylate ([2-SO]), SFD 及び 5-SO 体を Santa Cruz Biotechnology, Inc. から入手した. 標準溶液は各標準物質を適宜 DMSO 及びメタノールに溶解して調製した. 必要に応じて混合した. 標準溶液は 10°C 以下, 遮光下で保存した. その他の試薬は特級以上のものを使用した.

2.2.4.2 分析方法

Shimadzu Prominence HPLC, Orbitrap Fusion LC-UV-MS/MS 及び 4000QTRAP LC-UV-MS/MS を使用した. 表 2.8 及び表 2.9 の条件で分析した.

表 2.8 HPLC 条件

Column	Cadenza CD-C18 (3 μ m, 2.0 mmID \times 100 mm, Imtakt Corp.)																																		
Column temperature	40°C																																		
Autosampler temperature	10°C																																		
Injection volume	10 μ L																																		
Detection	UV 260 nm																																		
Mobile phase	Pump A	10 ^a または 20 mmol/L Ammonium acetate aq. Solution																																	
	Pump B	Acetonitrile																																	
Time program	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>Pump A (%)</th> <th>Pump B (%)</th> <th>Flow rate (mL/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Initial</td> <td>90</td> <td>10</td> <td>0.25</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>10</td> <td>90</td> <td>0.25</td> </tr> <tr> <td>24.0</td> <td>10</td> <td>90</td> <td>0.25</td> </tr> <tr> <td>24.1</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>0.35</td> </tr> <tr> <td>28.0</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>0.35</td> </tr> <tr> <td>28.1</td> <td>90</td> <td>10</td> <td>0.25</td> </tr> <tr> <td>36.0</td> <td>90</td> <td>10</td> <td>0.25</td> </tr> </tbody> </table> <p>Gradient curve: Linear</p>			Time (min)	Pump A (%)	Pump B (%)	Flow rate (mL/min)	Initial	90	10	0.25	20.0	10	90	0.25	24.0	10	90	0.25	24.1	0	100	0.35	28.0	0	100	0.35	28.1	90	10	0.25	36.0	90	10	0.25
Time (min)	Pump A (%)	Pump B (%)	Flow rate (mL/min)																																
Initial	90	10	0.25																																
20.0	10	90	0.25																																
24.0	10	90	0.25																																
24.1	0	100	0.35																																
28.0	0	100	0.35																																
28.1	90	10	0.25																																
36.0	90	10	0.25																																

a. CYP2D6 発現系ミクロソームにおける THD 及び CPZ の代謝物検索に使用

表 2.9 MS/MS 条件

Ionization method	Electrospray ionization (ESI)
Ionization mode	Positive or Negative
Detection mode	Full scan and Product ion scan

2.2.5 解析

UV クロマトグラム及び質量分析スペクトルはそれぞれ Empower (Waters Co.)及び Xcalibur (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いて解析した。THD とその代謝物の分析の際は、反応サンプルの UV クロマトグラム及び

質量分析スペクトルにおける代謝物ピークと THD, [2-SO], [2-SO₂]の [5-SO]混合標準溶液の各ピークの溶出時間, 親及びフラグメントイオンを比較し, 同定した. CPZ の際は CPZ 標準溶液を使用した. 他の代謝物は親及びフラグメントイオンから構造を推定した. 未変化体とその代謝物の生成量は各時点 (0, 5, 10, 20, 40, 60, 120 及び 180 分) の UV クロマトグラムにおけるピーク面積から評価した. CYP2D6 発現系ミクロソームにおける各代謝経路の生成速度定数は WinNonlin version 6.3 (Pharsight Corp.)を用いたモデル解析により算出した. モデルは CYP2D6 発現系ミクロソームで反応 ($n = 3$)した際の未変化体とその代謝物の生成量-時間データを用いて生成量時間推移を N コンパートメント (N: 未変化体と代謝物の合計数)にフィッティングさせることで算出した.

2.3 結果

2.3.1 THD 及びクロルプロマジン (CPZ)の代謝物検索及び同定

2.3.1.1 THD の代謝物検索及び同定

2.3.1.1.1 ヒト肝ミクロソーム中における検索及び同定

ヒト肝ミクロソーム中において、THD (基質濃度 10 μ M)を 0, 20 及び 60 分反応させた後の、UV クロマトグラムを図 2.1 に示した。反応 60 分のクロマトグラムにおいて、反応 0 分には認められないピークが 5 つ (溶出時間 9.1, 9.2, 10.1, 10.8 及び 13.1 分) 検出された。溶出時間 9.1, 9.2 及び 10.1 分のピークは標準品の溶出時間との比較により、それぞれ[5-SO], [2-SO]及び[2-SO₂]と同定された。

溶出時間 10.8 分のピークの m/z は未変化体 (m/z 370) に比べ、+16 であった。このピークのフラグメント解析を行い、THD のフラグメントと比較した結果 (図 2.2 (a), (b)), フェノチアジン骨格の m/z が+16 増えていた。フェノチアジン骨格の+16 は芳香環の水酸化体または[5-SO]の可能性はあるが、[5-SO]の標品と溶出時間が異なるため、溶出時間 10.8 分のピークは芳香環の水酸化体であると考えられた。CPZ の主要代謝物は[7-OH] であることから (引用文献: 2-3), この THD の水酸化体は[7-OH]であると推定した。

溶出時間 13.1 分のピークの m/z は未変化体 (m/z 370) に比べ、-14 であった。このピークのフラグメント解析を行い、THD のフラグメントと比較した結果 (図 2.2 (a), (c)), *N*-methyl piperidine 部位の m/z が-14 となっていた。従って、溶出時間 13.1 分のピークは *N*-desmethyl 体 ([*N*-desMe])であると推定した。

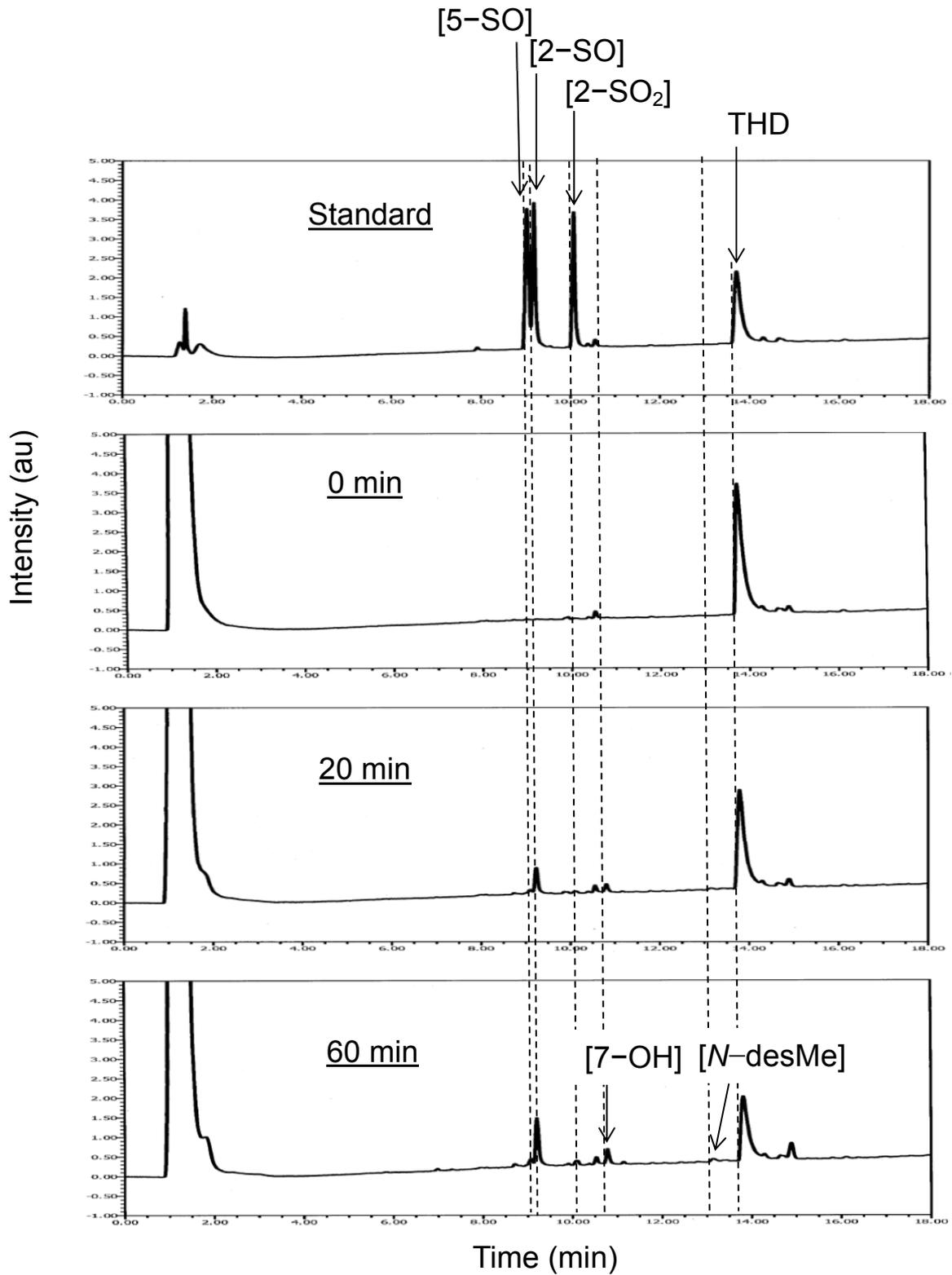


図 2.1 ヒト肝ミクロソーム中において、THD を反応させた後の UV クロマトグラム (UV260 nm) au は arbitrary unit (相対値)

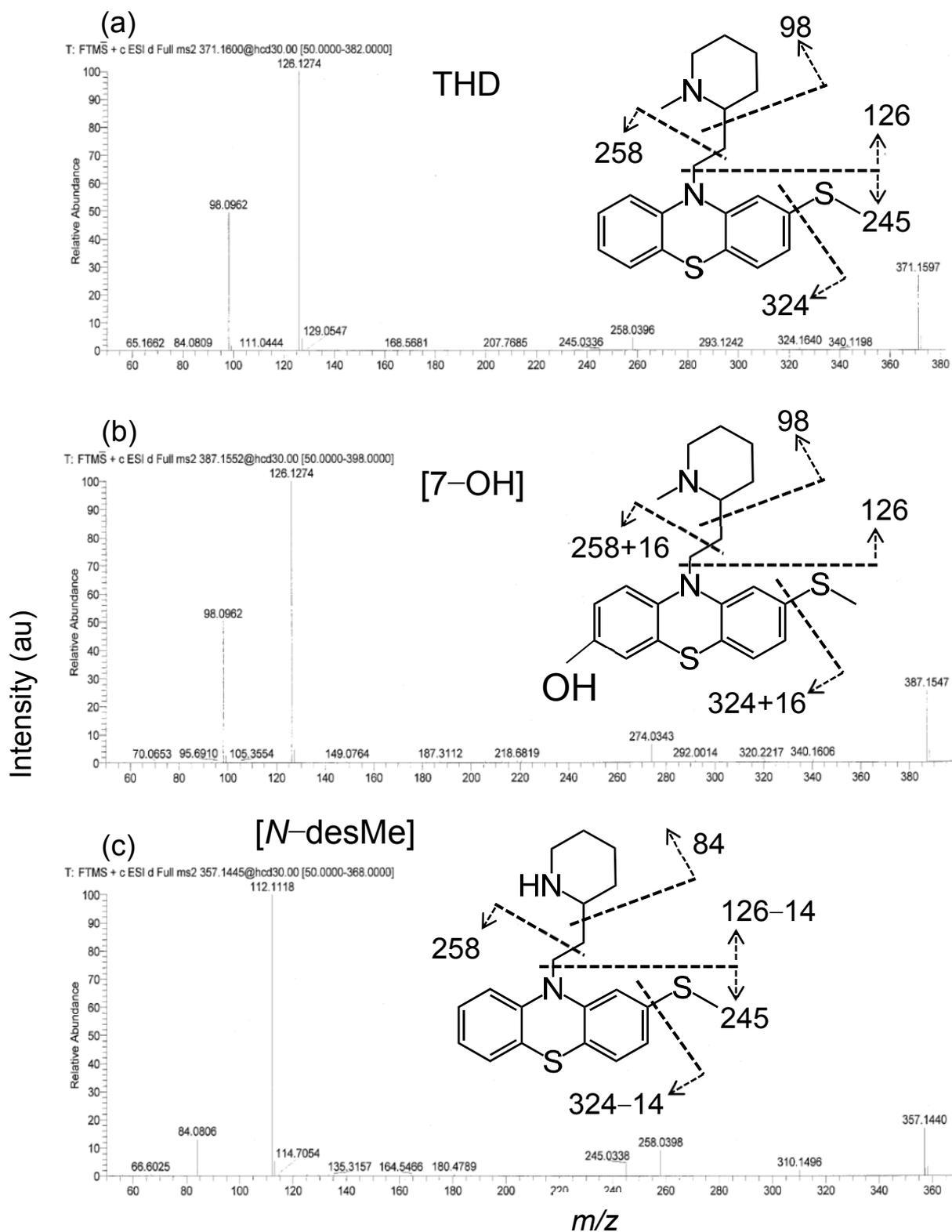


図 2.2 ヒト肝マイクロソーム中における, THD, [7-OH]及び[N-desMe]のピークのフラグメント解析 点線はMS/MSの開裂様式を示す.
(ヒト肝マイクロソーム)

2.3.1.1.2 CYP2D6 発現系ミクロソーム中における検索及び

同定

CYP2D6 発現系ミクロソーム中において、THD (基質濃度 10 μM)を 0, 20 及び 60 分反応させた後の、UV クロマトグラムを図 2.3 に示した。UV クロマトグラムを解析したところ、[*N*-desMe]は認められなかったが、[5-SO], [2-SO], [2-SO₂]及び[7-OH]が認められた。また未知のピークが、溶出時間 7.4 分及び 8.3 分に検出された。

[*N*-desMe]が CYP2D6 で生成するか判断するために、上記の条件で、基質濃度を 300 μM にして THD を反応させた後の、*m/z* 356~357 (THD の *m/z* 370 から-14 したもの)の MS クロマトグラムを作成した (図 2.4)。THD の溶出時間の少し前 (0.6 分前の 14.5 分)にピークが認められ、それは経時的に増加したことから、CYP2D6 発現系ミクロソーム中においても、[*N*-desMe]が微量生成することがわかった。

溶出時間 7.4 分の *m/z* は THD の *m/z* の+32 (*m/z* 402)であることがわかった。この代謝物は二酸素付加体であると考えられ、一酸素付加体である [2-SO], [5-SO]及び[7-OH]から生成したことが予想される。そこで、CYP2D6 発現系ミクロソーム中において、[2-SO] (基質濃度 10 μM)及び [5-SO] (基質濃度 10 μM)を反応させ、溶出時間 7.4 分の未知ピークが生成するか調べた。[2-SO]を代謝させたところ、溶出時間 7.4 分にピークが認められ、それは経時的に増加した (図 2.5)。ゆえにこの代謝物は[2-SO]同様、2 位の硫黄原子が sulfoxide 化したものであることがわかった。次に、[5-SO]を代謝させたところ、溶出時間 7.4 分に非常に小さいピークが認められたが、このピークは反応時間 0 分のクロマトグラムから認められ、経時的な増加はなかった (図 2.6)。従って、この代謝物は 5 位の硫黄原子が酸化されていないと推定した。

溶出時間 8.3 分の *m/z* は THD の *m/z* の+48 (*m/z* 418)であることがわかった。この代謝物は三酸素付加体であると考えられ、一酸素付加体である [2-SO], [5-SO]及び[7-OH]から、あるいは、二酸素付加体である[2-SO₂]から生成したことが予想される。そこで、CYP2D6 発現系ミクロソーム中において、SFD (基質濃度 10 μM)を代謝させたところ、溶出時間 8.3 分にピークが認められ、この代謝物は経時的に増加した (図 2.7)。ゆえにこの代謝物は[2-SO₂]同様、2 位の S-sulfone を持つことがわかった。一方で、[5-SO]の代謝物として、この代謝物は認められなかったことから (図 2.6)、この代謝物は 5 位の硫黄原子が酸化されていないと考えられた。

さらに溶出時間 7.4 分と 8.3 分のピークのフラグメント解析を行い、[2-SO]のフラグメントと比較した。その結果、フェノチアジン骨格及び 2 位側鎖の m/z が溶出時間 7.4 分のピークでは+32 及び溶出時間 8.3 分のピークでは+48 増えていた (図 2.9)。以上より、溶出時間 7.4 分のピークは 2 位側鎖の硫黄原子が sulfoxide 化されており、かつ 5 位の硫黄原子は酸化されておらず、かつフェノチアジン骨格及び 2 位側鎖の m/z が+32 増えている構造であることから、[7-OH, 2-SO]であると推定された。同様に、溶出時間 8.3 分のピークは 2 位側鎖の硫黄原子が sulfone 化されており、かつ 5 位の硫黄原子は酸化されておらず、かつフェノチアジン骨格及び 2 位側鎖の m/z が+48 増えている構造であることから、[7-OH 及び 2-SO₂]であると推定された。

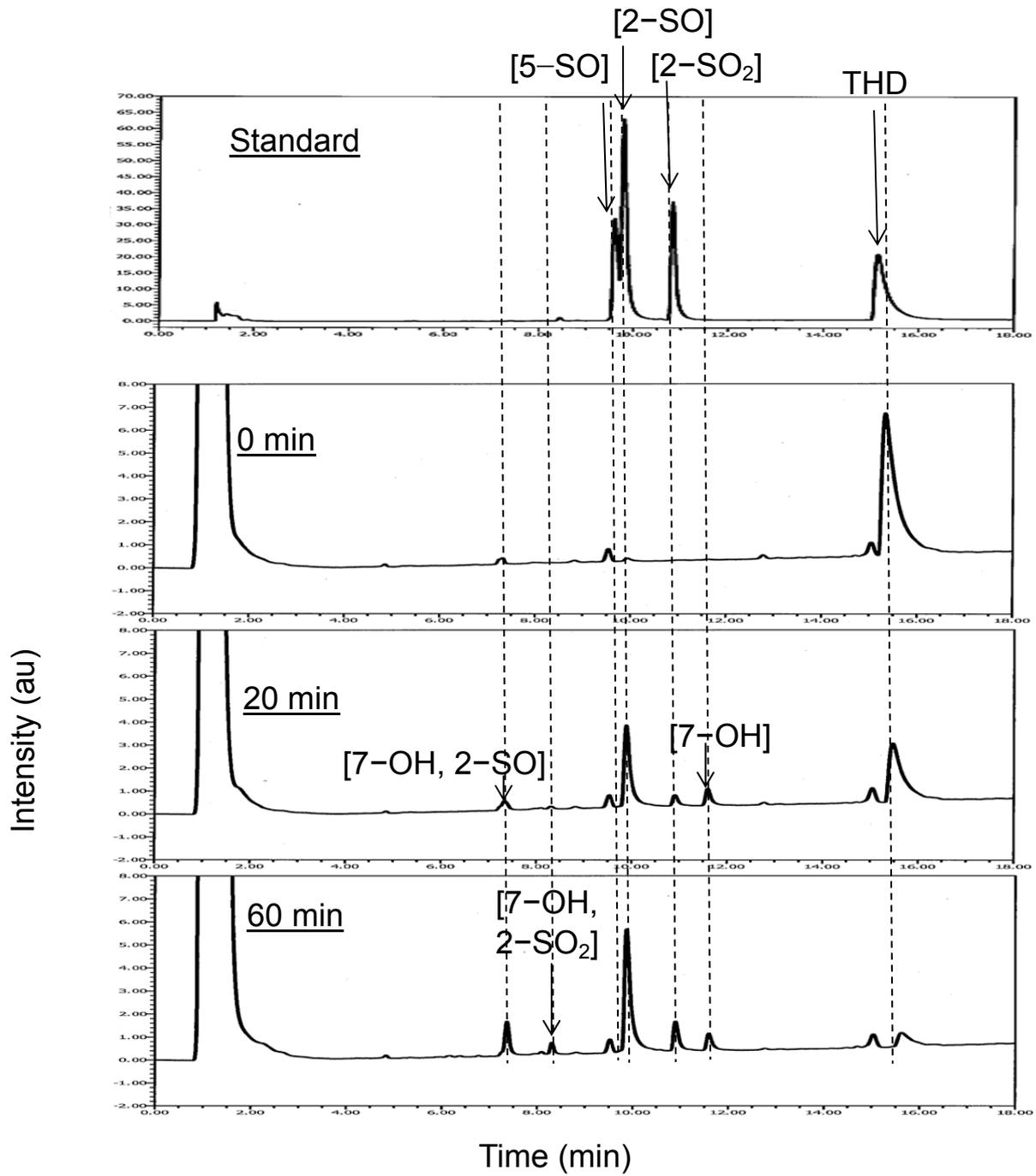


図 2.3 CYP2D6 発現系ミクロソーム中において、THD (10 μ M)を反応させた後のUVクロマトグラム (UV260 nm)

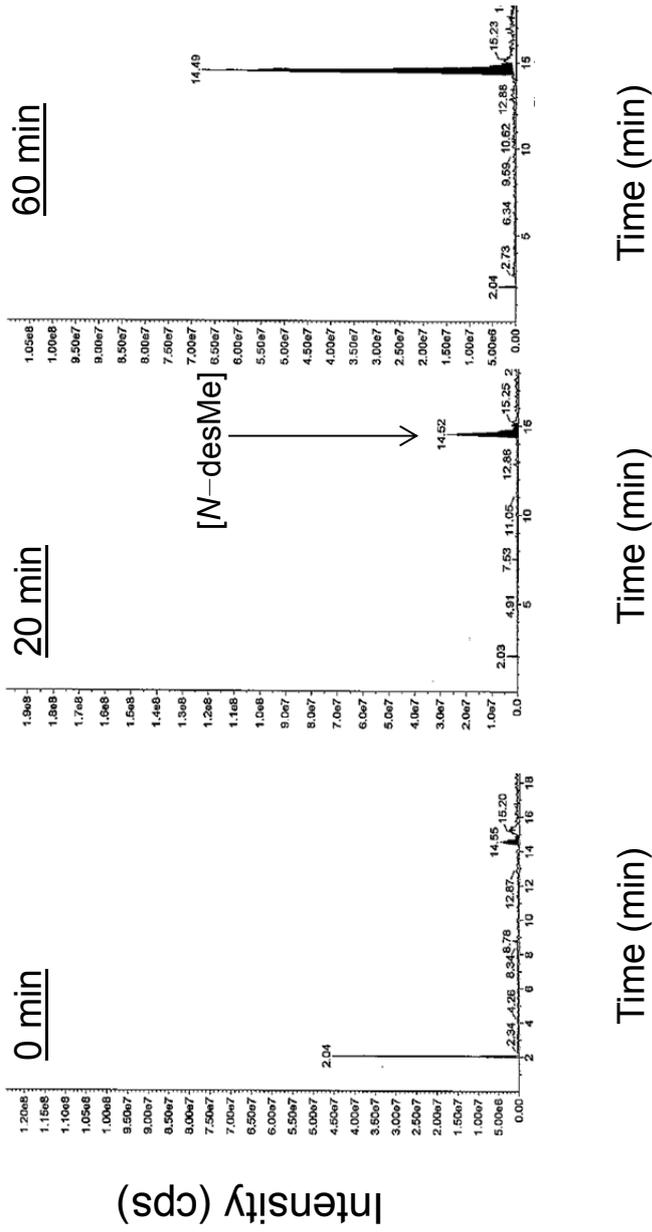


図 2.4 CYP2D6 発現系ミクロソーム中において, THD (300 μM)を反応させた後の MS クロマトグラム (m/z 356~357)

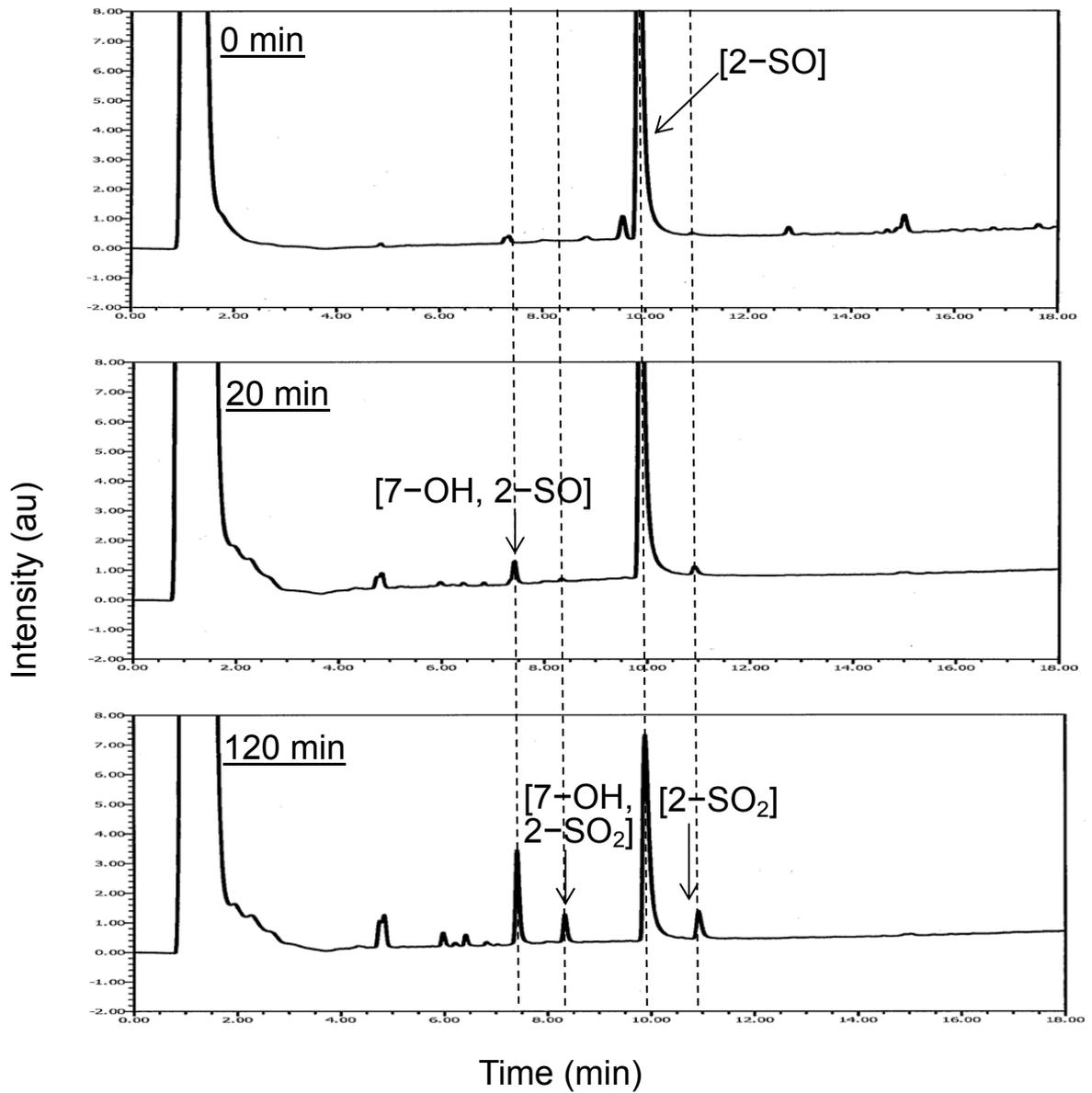


図 2.5 CYP2D6 発現系ミクロソーム中において, MSD ([2-SO], 10 μ M)を反応させた後の UV クロマトグラム (UV260 nm)

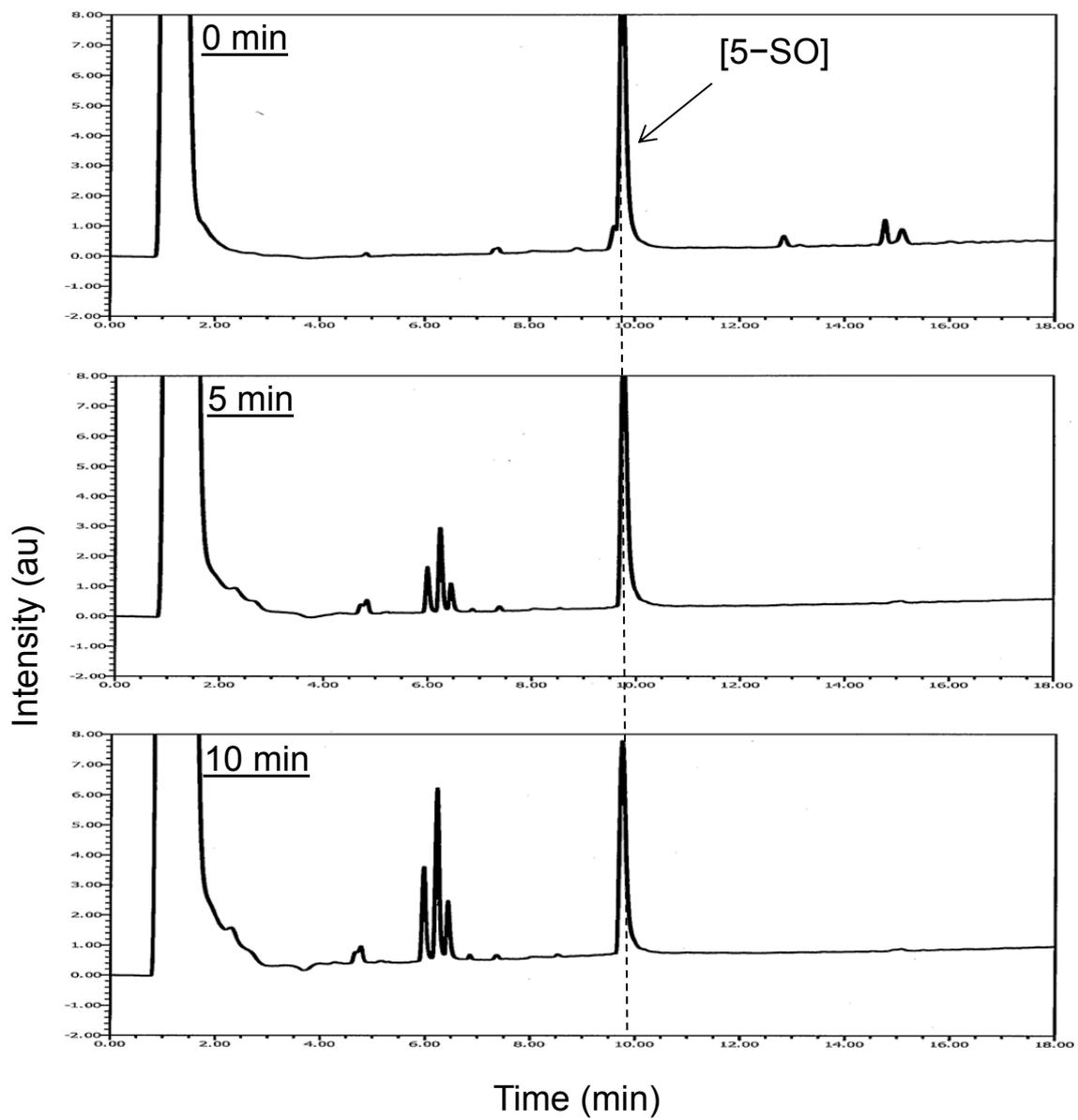


図 2.6 CYP2D6 発現系マイクロソーム中において、5-SO 体 (10 μ M) を反応させた後の UV クロマトグラム (UV260 nm)

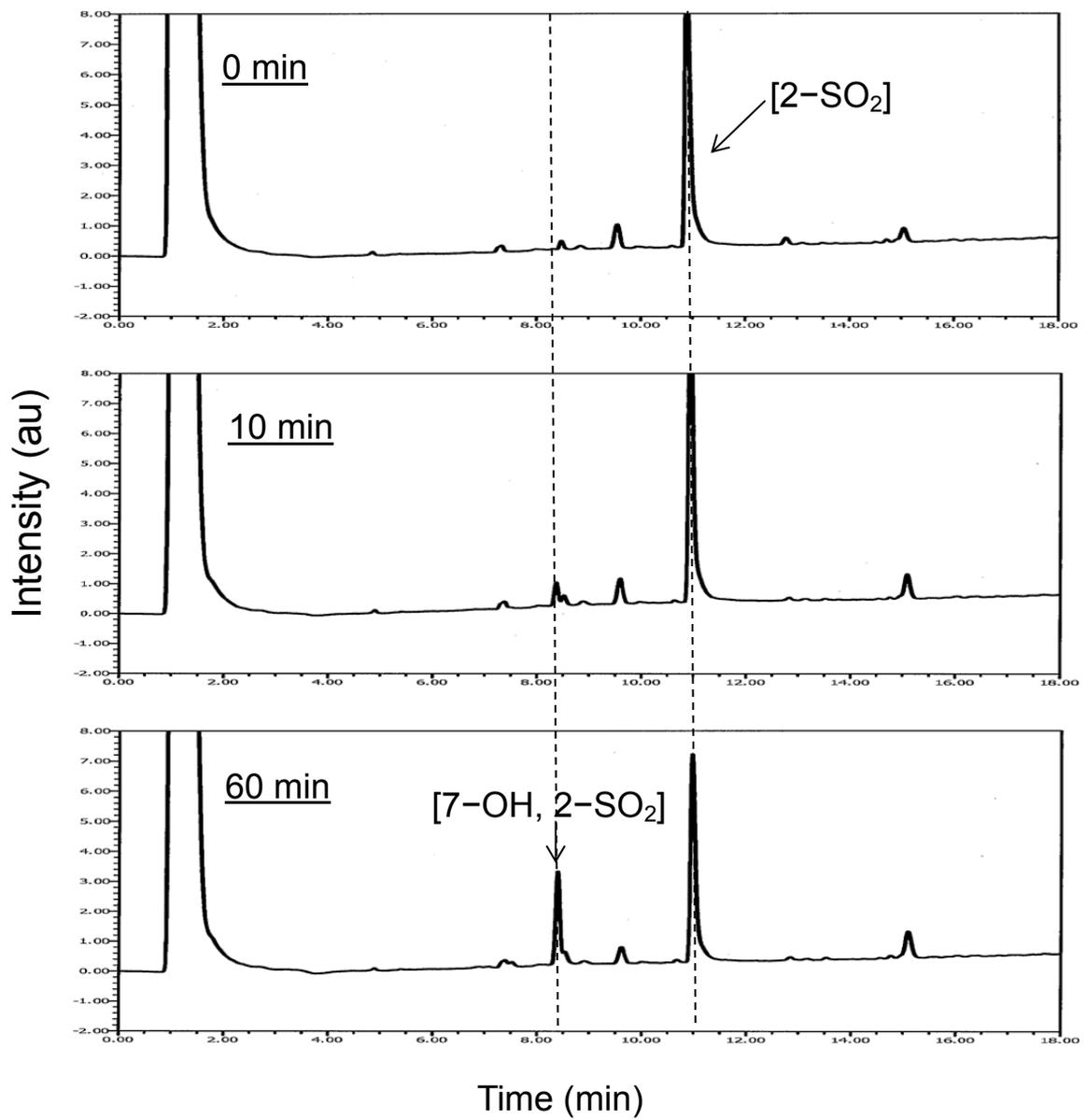


図 2.7 CYP2D6 発現系ミクロソーム中において、SFD (2-SO₂, 10 μM)を反応させた後の UV クロマトグラム (UV260 nm)

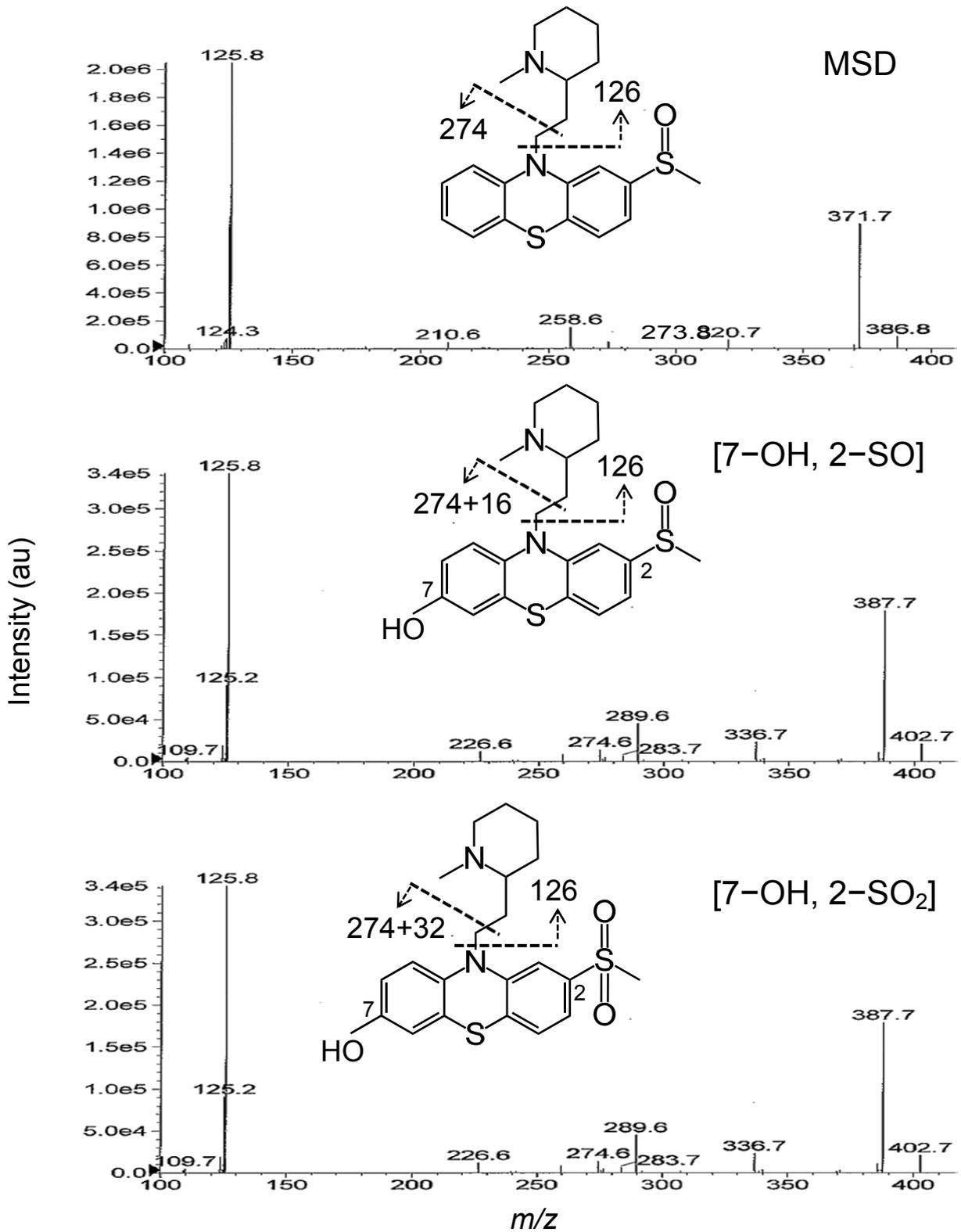


図 2.8 [2-SO], [7-OH, 2-SO], 及び[7-OH, 2-SO₂]のピークのフラグメント解析
点線は MS/MS の開裂様式を示す (CYP2D6 発現系マイクロソーム).

2.3.1.2 CPZ の代謝物検索及び同定

CYP2D6 発現系ミクロソーム中において, chlorpromazine (CPZ; 基質濃度 10 μM)を 0, 5 及び 60 分反応させた後の, UV クロマトグラムを図 2.9 に示した. UV クロマトグラムを解析したところ, 溶出時間 10.6 分及び 12.7 分に経時的に増加するピークが認められた.

溶出時間 10.6 分のピークは m/z 334 であり, CPZ (m/z 318)の+16 であることから, このピークは CPZ の一酸素付加体であると予想した. さらにフラグメント解析の結果からこの代謝物はフェノチアジン骨格に酸素が付加したものであると考えられた (図 2.10). CYP2D6 発現系ミクロソームにおいて, [7-OH]が主要代謝物であるとの報告があり (引用文献: 2-4 ~ 2-6), 溶出時間 10.6 分のピークは[7-OH]であると考えられた.

溶出時間 12.7 分ピークは m/z 304 であり, CPZ (m/z 318)の m/z が-14 であることから, このピークは CPZ の[*N*-desMe]であると考えられた. フラグメント解析からアミン部分の m/z が-14 であることから, 側鎖の[*N*-desMe]であると推定した (図 2.10).

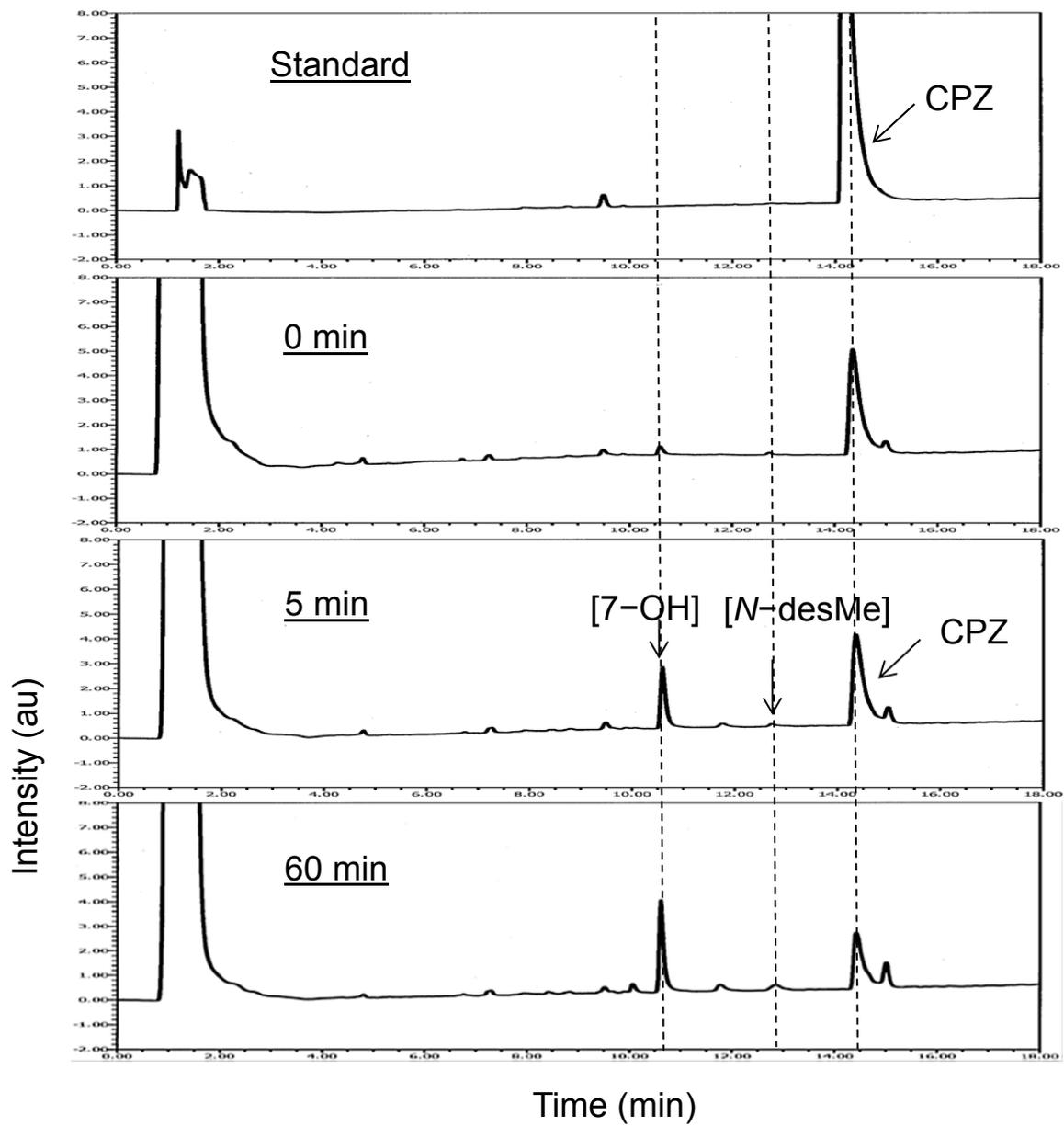


図 2.9 CYP2D6 発現系ミクロソーム中において、CPZ (10 μ M)を反応させた後の UV クロマトグラム (UV260 nm)

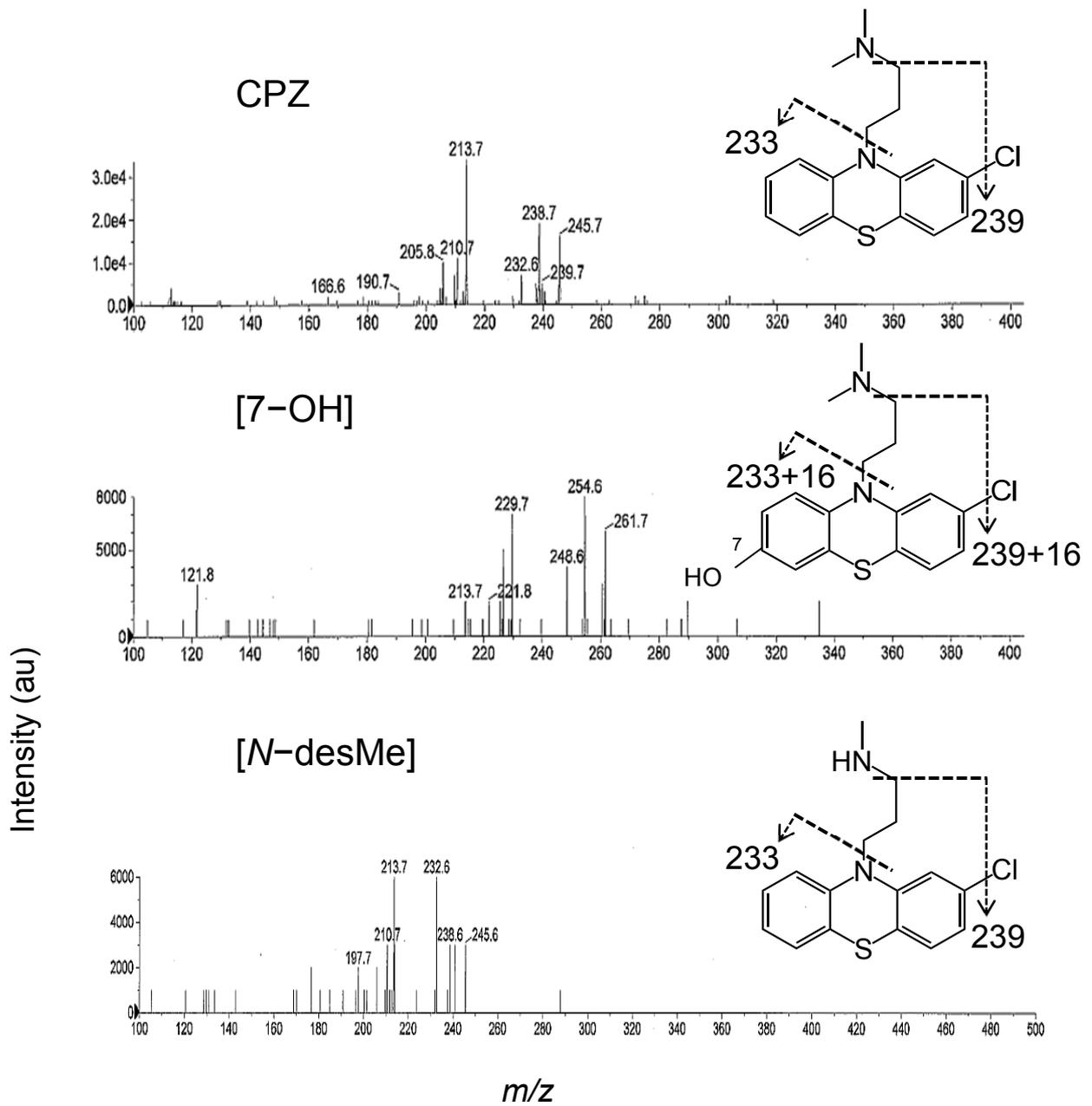


図 2.10 CPZ, [7-OH]及び[N-desMe]のピークのフラグメント解析
点線は MS/MS の開裂様式を示す (CYP2D6 発現系マイクロソーム).

2.3.2 各種ミクロソームにおける THD 及び CPZ の代謝物の生成

2.3.2.1 ヒト肝ミクロソームにおける THD の代謝物の生成量

ヒト肝ミクロソーム中において、THD (基質濃度 10 μM)を 0~180 分の間で経時的に反応させた後に、THD 及び各代謝物 ([5-SO], [2-SO], [7-OH], [N-desMe], [2-SO₂], [7-OH, 2-SO])の生成量を UV クロマトグラムから算出した (図 2.11 及び表 2.10). THD, [5-SO], [2-SO]及び[2-SO₂]の標品の UV 吸光度が同程度であったため、代謝物によらず吸光係数は同じと考えた。それ故、THD と代謝物の生成量は UV の吸光度で評価した。

THD は消失速度定数 -0.0150 (1/min, 算出時間 0~10 分)で消失した。代謝物は[2-SO]が最も多く生成し、次いで[7-OH]が生成した。

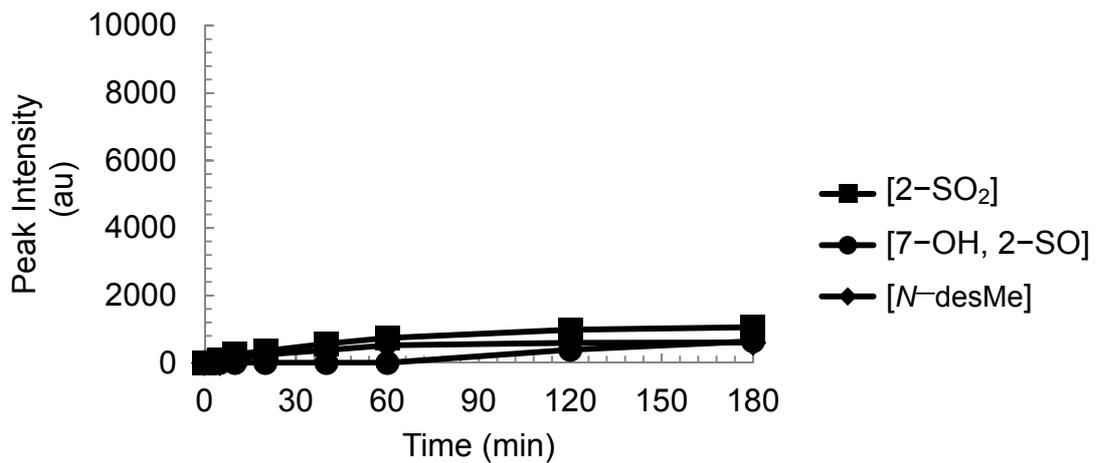
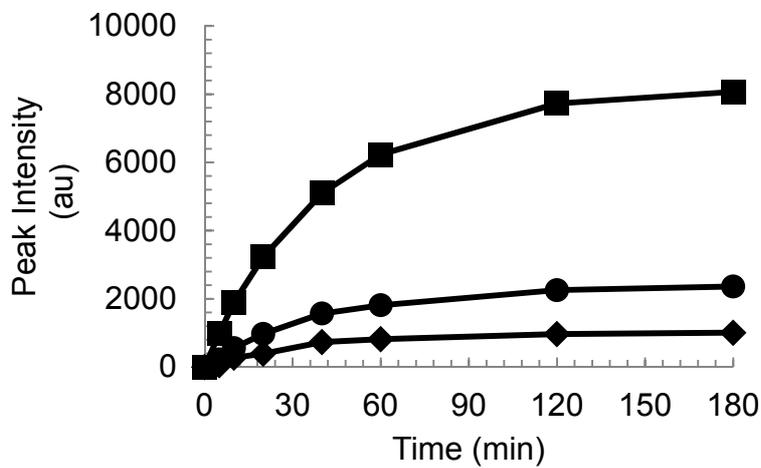
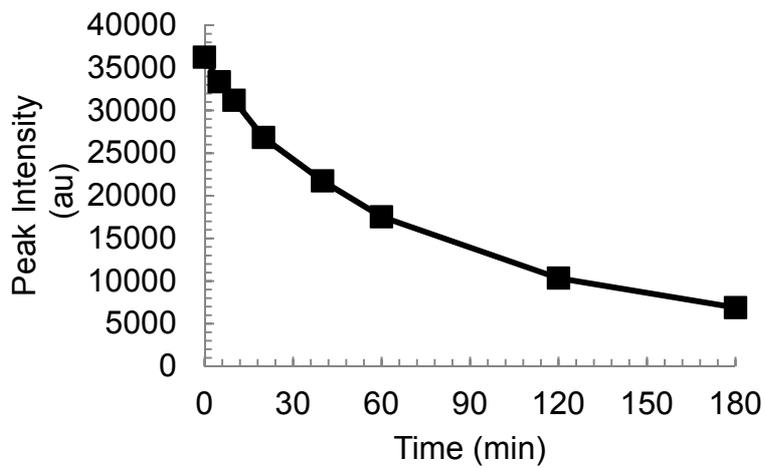


図 2.11 ヒト肝ミクロソーム中において THD を経時的に反応させた後の、THD 及び各代謝物の生成量

表 2.10 ヒト肝ミクロソーム中において THD を経時的に反応させた後の THD 及び各代謝物の生成量

Time (min)	THD	Peak Intensity (au)					
		[2-SO]	[7-OH]	[5-SO]	[2-SO ₂]	[7-OH, 2-SO]	[N-desMe]
0	36200	0	0	0	0	0	0
5	33400	975	224	57.7	99.3	0	0
10	31200	1890	557	273	254	0	76.0
20	26800	3230	973	393	357	0	245
40	21700	5100	1570	732	569	0	378
60	17500	6230	1810	817	739	0	522
120	10300	7730	2260	966	981	388	595
180	6890	8070	2360	1010	1060	641	600

2.3.2.2 CYP1A2 発現系ミクロソームにおける THD の代謝物の

生成量

CYP1A2 発現系ミクロソーム中において, THD (基質濃度 10 μM)を 0~180 分の間で経時的に反応させた後に, THD 及び各代謝物 ([5-SO], [2-SO], [7-OH], [2-SO₂])の生成量を UV クロマトグラムから算出した (図 2.12 及び表 2.11).

THD は消失速度定数 -0.0466 (1/min, 算出時間 0~10 分)で消失した. 代謝物は[5-SO]が最も多く生成し, [N-desMe]は認められなかった.

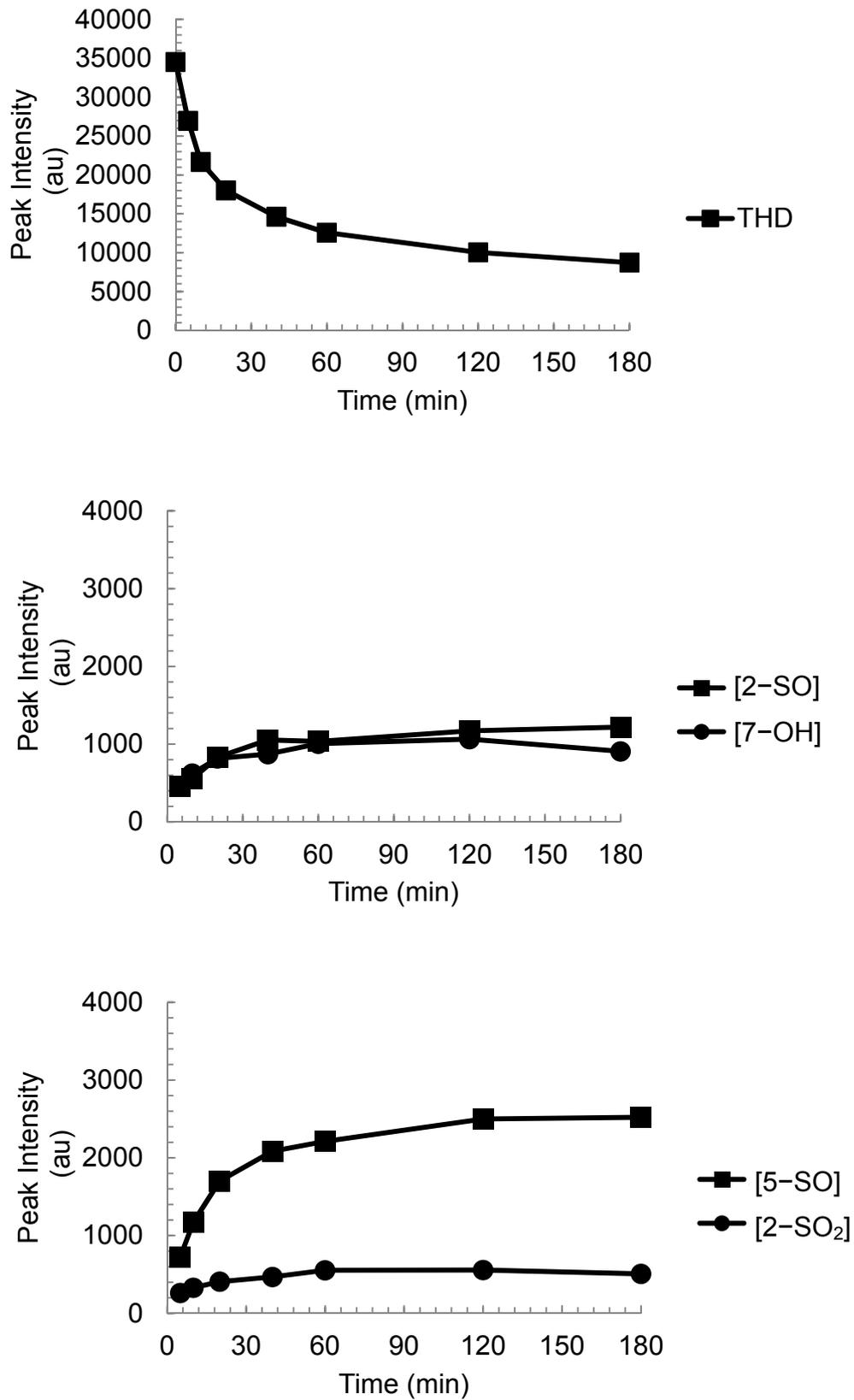


図 2.12 CYP1A2 ミクロソーム中において THD を経時的に反応させた後の THD 及び各代謝物の生成量

表 2.11 CYP1A2 ミクロソーム中において THD を経時的に反応させた後の THD 及び各代謝物の生成量

Time (min)	THD	Peak Intensity (au)			
		[2-SO]	[7-OH]	[5-SO]	[2-SO ₂]
0	34500	0	0	0	0
5	26900	453	0	727	263
10	21700	556	622	1170	330
20	18000	831	817	1700	408
40	14600	1050	872	2090	468
60	12600	1030	1010	2210	554
120	10000	1170	1060	2500	557
180	8720	1220	907	2520	508

2.3.2.3 CYP3A4 発現系ミクロソームにおける THD の代謝物の

生成量

CYP3A4 発現系ミクロソーム中において, THD (基質濃度 10 μM)を 0~180 分の間で経時的に反応させた後に, THD 及び各代謝物 ([5-SO], [2-SO], [7-OH], [*N*-desMe], [2-SO₂])の生成量を UV クロマトグラムから算出した (図 2.13 及び表 2.12).

THD は消失速度定数-0.0670 (1/min, 算出時間 0~10 分)で消失した. [2-SO]が最も多く生成し, 次いで[*N*-desMe], [5-SO], [2-SO₂]が生成した.

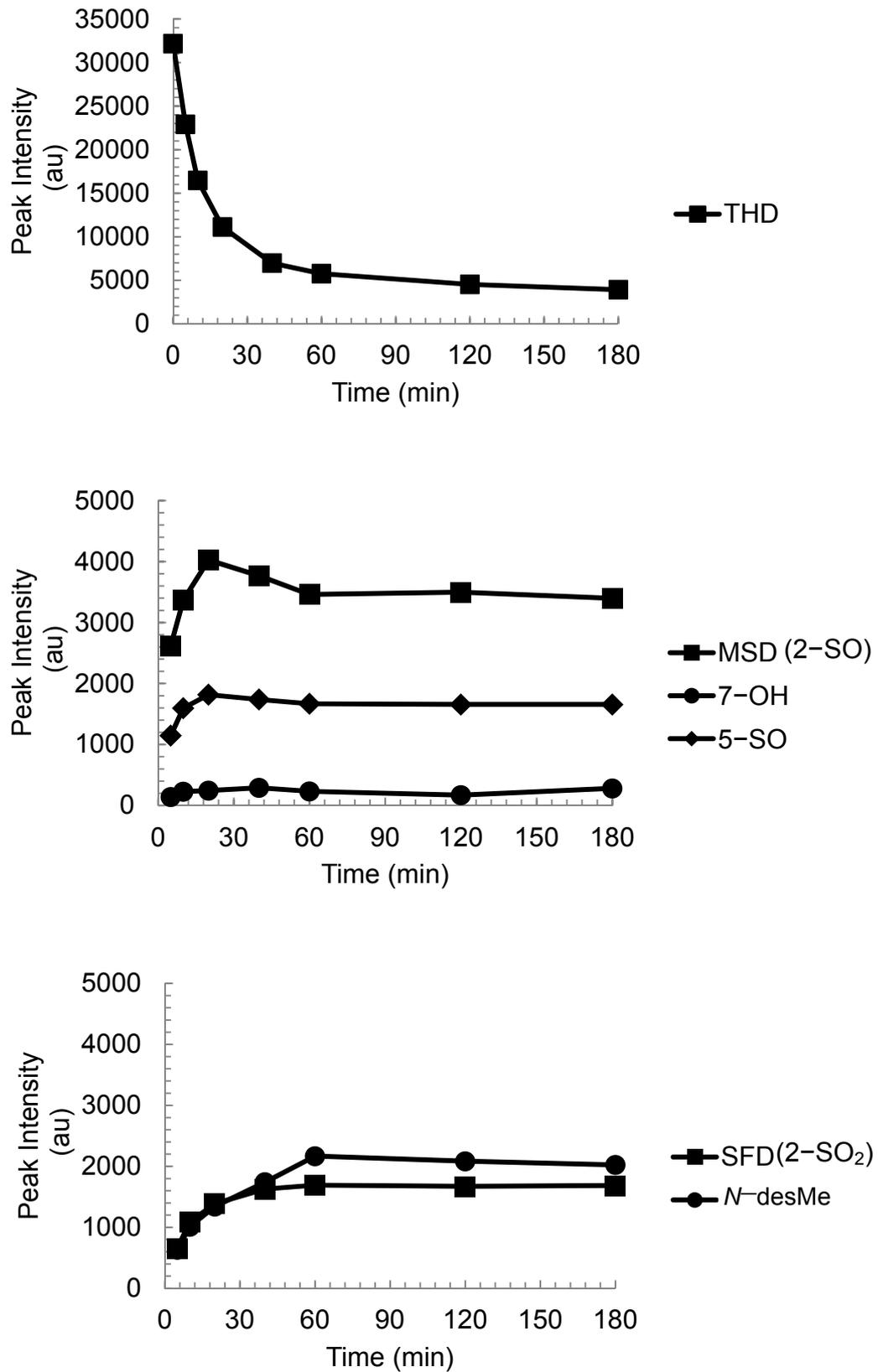


図 2.13 CYP3A4 ミクロソーム中において THD を経時的に反応させた後の THD 及び各代謝物の生成量

表 2.12 CYP3A4 ミクロソーム中において THD を経時的に反応させた後の THD 及び各代謝物の生成量

Time (min)	THD	Peak Intensity (au)				
		[2-SO]	[7-OH]	[5-SO]	[2-SO ₂]	[N-desMe]
0	32200	0	0	0	0	0
5	22900	2620	140	1150	654	632
10	16500	3370	228	1600	1090	1010
20	11100	4030	244	1820	1390	1340
40	6980	3770	290	1740	1630	1740
60	5760	3460	232	1670	1690	2170
120	4530	3500	170	1660	1670	2080
180	3920	3400	280	1660	1680	2020

2.3.2.4 CYP2D6 発現系ミクロソームにおける CPZ の代謝物の

生成量

CYP2D6 発現系ミクロソーム中において、CPZ (基質濃度 10 μ M) を 0～180 分の間で経時的に反応させた後に、CPZ 及び各代謝物 ([7-OH]及び[N-desMe]) の生成量を UV クロマトグラムから算出した (図 2.14 及び表 2.13).

CPZ は消失速度定数 0.0205 (1/min, 算出時間 0～20 分)で、THD より緩やかに消失した. [7-OH]の生成量が最も多く、120 分で最高値に達した.

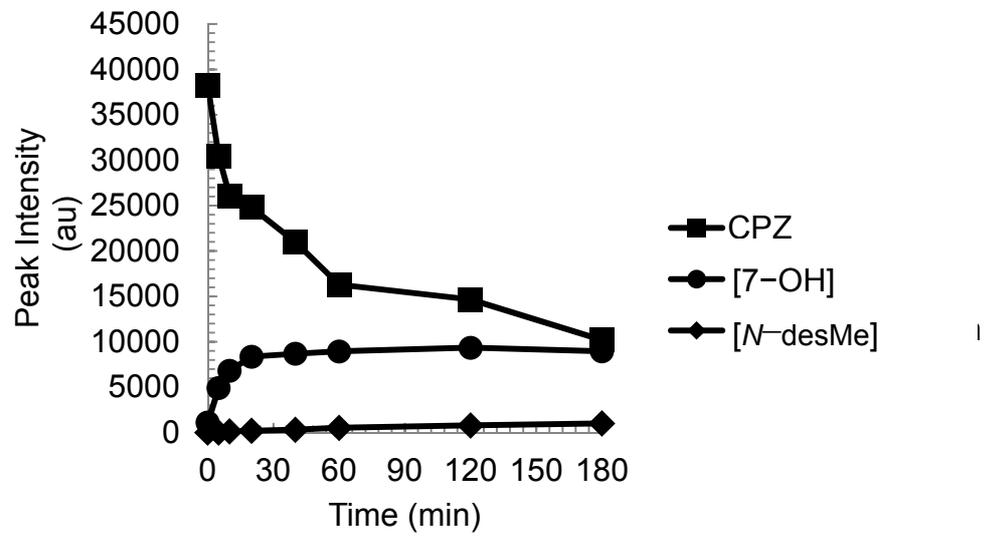


図 2.14 CYP2D6 発現系マイクロソームにおいて、CPZ を経時的に反応させた後の CPZ 及び各代謝物の生成量

表 2.13 CYP2D6 発現系マイクロソームにおいて, CPZ を経時的に反応させた後の CPZ 及び各代謝物の生成量

Time (min)	Peak Intensity (au)	
	CPZ	[7-OH] [N-desMe]
0	38200	1110 0
5	30500	4900 0
10	26100	6810 122
20	24800	8360 197
40	21000	8680 310
60	16300	8950 520
120	14700	9350 785
180	10200	8950 1000

2.3.2.5 CYP2D6 発現系ミクロソームにおける THD の代謝物の生成量

CYP2D6 発現系ミクロソーム中において、THD (基質濃度 10 μ M)を 0~180 分の間で経時的に反応させた後に、THD 及び各代謝物 ([5-SO], [2-SO], [7-OH], [N-desMe], [2-SO₂], [7-OH, 2-SO], 及び[7-OH, 2-SO₂])の生成量を UV クロマトグラムから算出した (図 2.15 及び表 2.14).

THD は消失速度定数 -0.0434 (1/min, 算出時間 0~40 分)で速やかに消失した. [2-SO]の生成量が圧倒的に多く、60 分で最高値を迎え、その後減り始めた. [7-OH]は速やかに生成し、40 分で最高値を迎え、その後減り始めた. [2-SO₂]と[7-OH, 2-SO]の生成パターンは似ており、THD の[7-OH]より緩やかに生成し、180 分で最高値に達する. 最大値は THD の[7-OH]の約 2 倍である. SFD の[7-OH]は反応最終時間である 180 分まで緩やかに増え続けた. [5-SO]の生成はわずかであった.

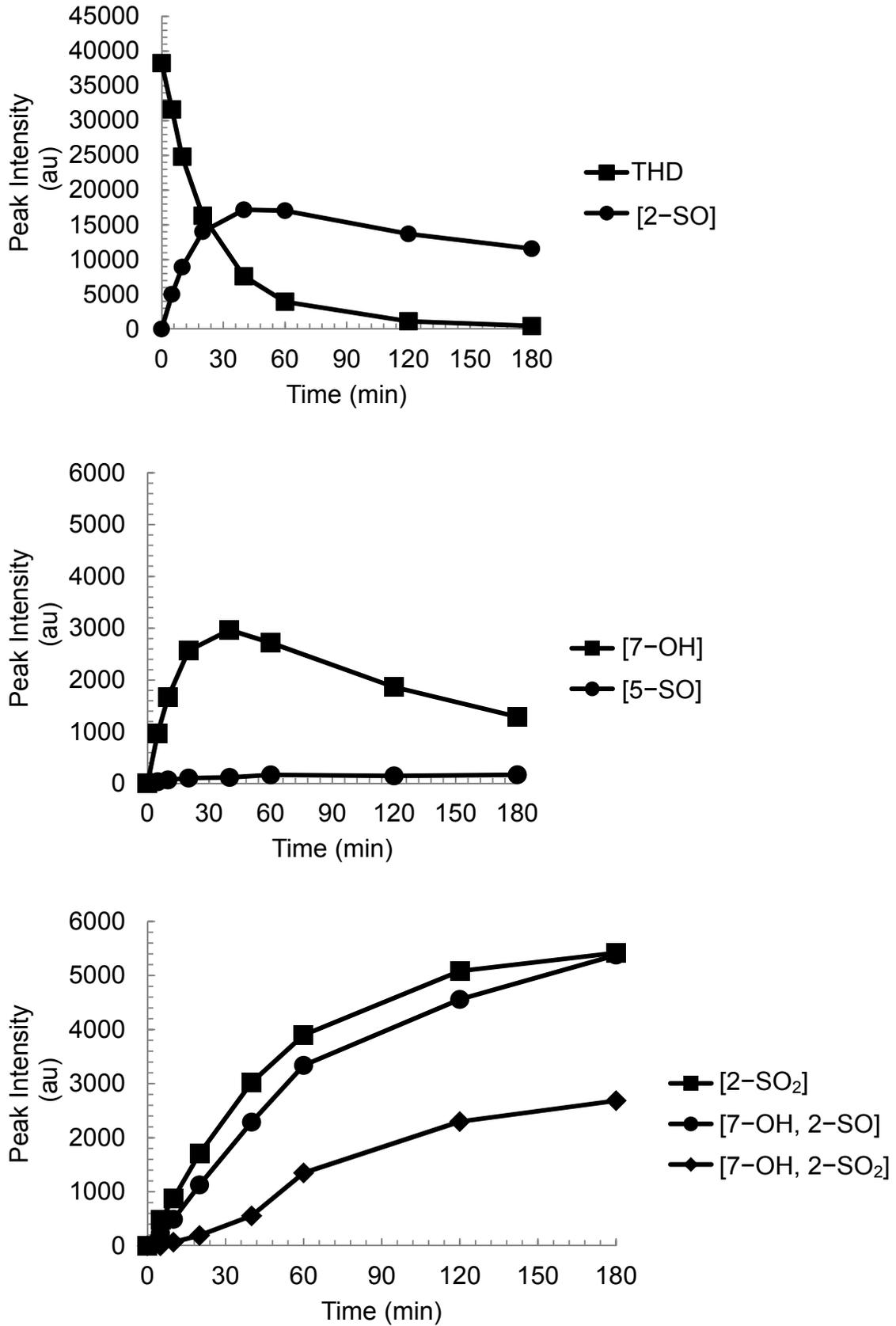


図 2.15 CYP2D6 発現系ミクロソーム中において, THD を経時的に反応させた後の THD 及び各代謝物の生成量

表 2.14 CYP2D6 発現系マイクロソーム中において, THD を経時的に反応させた後の THD 及び各代謝物の生成量

Time (min)	THD	Peak Intensity (au)					
		[2-SO]	[7-OH]	[5-SO]	[2-SO ₂]	[7-OH, 2-SO]	[7-OH, 2-SO ₂]
0	38300	0	0	0	0	0	0
5	31600	5000	975	37.3	474	236	0
10	24800	8910	1670	72.3	877	490	66.3
20	16300	14000	2560	108	1710	1130	192
40	7620	17200	2970	120	3020	2290	554
60	3930	17000	2720	169	3900	3340	1350
120	1130	13700	1870	149	5080	4560	2300
180	444	11600	1290	171	5420	5380	2690

2.3.3 CYP2D6 発現系ミクロソームにおける THD 及び CPZ の生

成速度定数の算出

2.3.3.1 CPZ の生成速度定数の算出

CPZ を経時的に反応させた後の CPZ 及び各代謝物の生成量を基に図 2.16 に示す速度論モデルを構築した。WinNonlin ver 6.3 を用いてモデル解析を実施した。解析の結果，予測値は実測値を良好に再現し (図 2.17)，coefficient of variation (変動係数, 式 2.1) も最大で 8.67% であった (表 2.15)。

$$\text{変動係数} = \frac{\sqrt{\sigma^2}}{\bar{x}} \quad (2.1)$$

標準偏差: $\sqrt{\sigma^2}$ ，算術平均: \bar{x}

各代謝経路における反応速度定数が最大であったのは k_{7OH} ($7.81 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) であり，圧倒的であった。

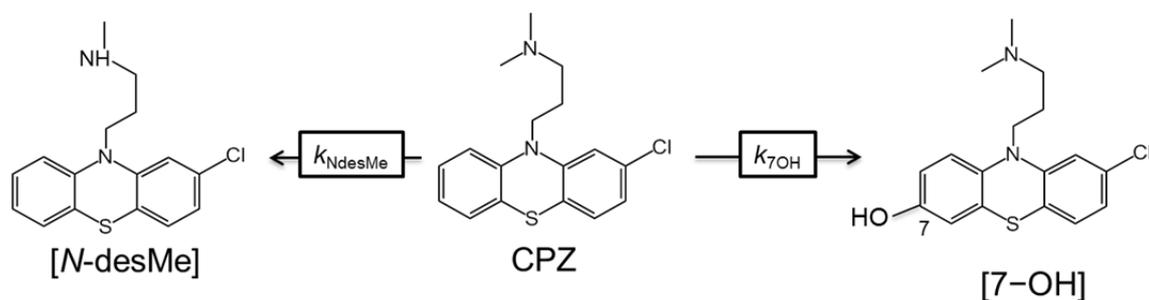


図 2.16 CPZ の代謝経路の速度論モデル (CYP2D6 発現系ミクロソーム)

— 予測値
○ 実測値

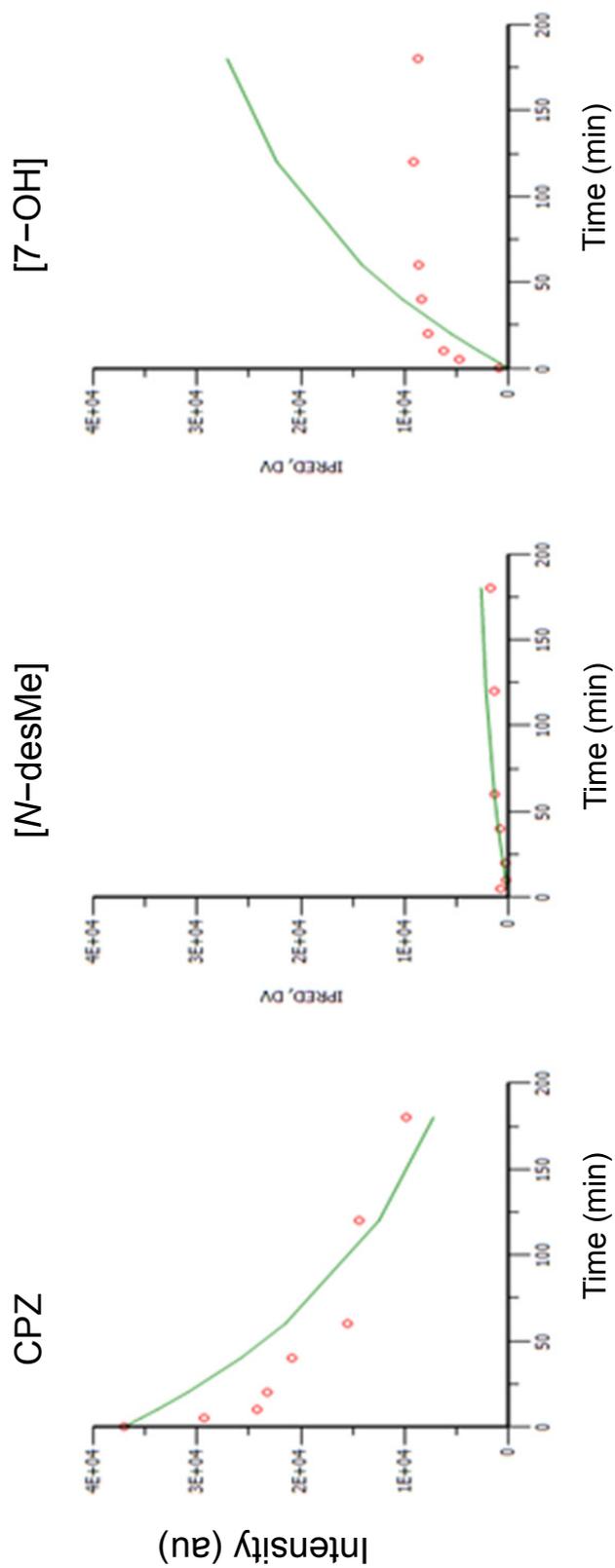


図 2.17 CPZ と代謝物濃度の実測値と予測値 (CYP2D6 発現系ミクロソーム)

表 2.15 CPZ の各代謝経路における反応速度定数 (CYP2D6 発現系マイクロソーム)

Rate constant	Reaction	Rate constant (1/min)	Relative rate constant ($k_{7OH} = 1$)	Coefficient of variation (%)
k_{7OH}	Hydroxydation	$7.81 \times 10^{-3} \pm 0.53 \times 10^{-3}$	1.000	5.32 ± 0.23
k_{NdesMe}	Desmethylation	$2.78 \times 10^{-4} \pm 0.10 \times 10^{-4}$	0.036	6.49 ± 0.26

$n = 3$

2.3.3.2 THD の生成速度定数の算出

THD を経時的に反応させた後の、THD 及び各代謝物の生成量を基に図 2.18 に示す速度論モデルを構築した。[N-desMe]は検出限界以下であったため、モデルに含めなかった。WinNonlin ver 6.3 を用いてモデル解析を実施した。解析の結果、予測値は実測値を良好に再現し (図 2.19), coefficient of variation (変動係数)も $k_{2SO \text{ to } 7OH2SO}$ (140.5%)を除いて最大で 9.82%であった (表 2.16)。各代謝経路における反応速度定数が最大だったのは k_{2SO} , 次いで $k_{7OH \text{ to } 7OH2SO}$ であり, どちらも 2-S の酸化反応であった。最も値が低かったのは k_{5SO} であり, 5-S の酸化反応であった。

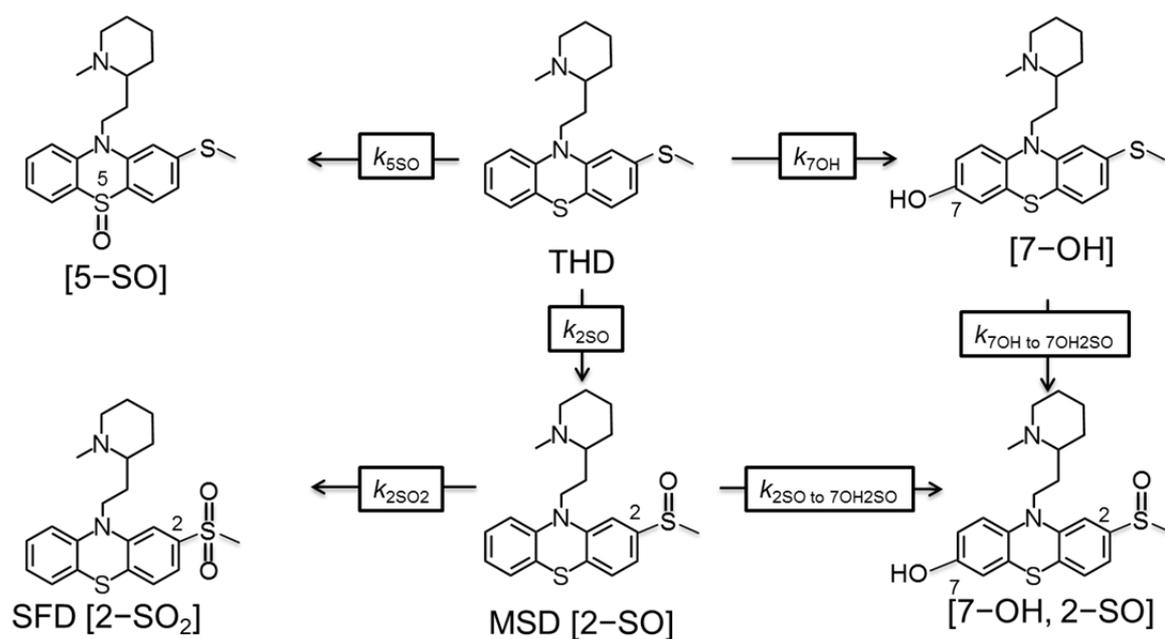


図 2.18 THD の代謝経路の速度論モデル (CYP2D6 発現系ミクロソーム)

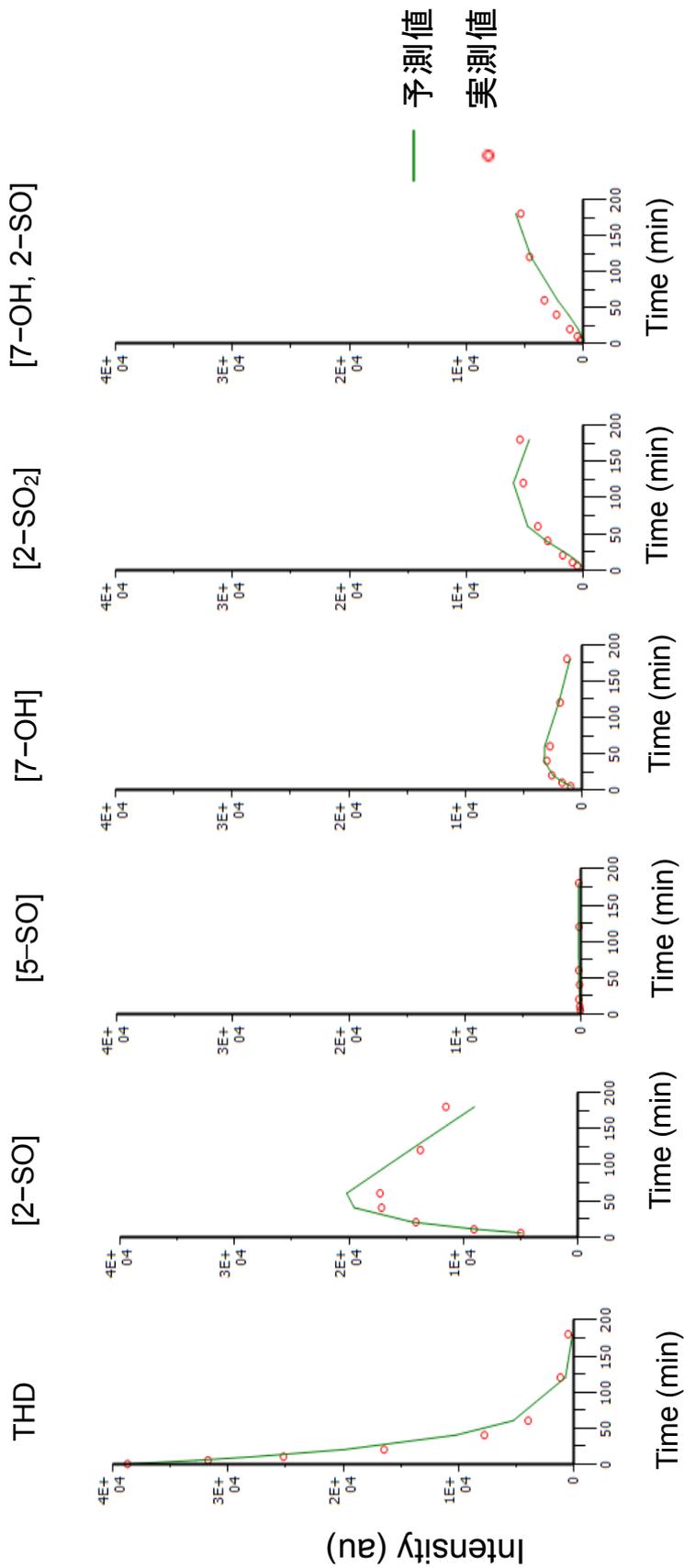


図 2.19 THD と代謝物濃度の実測値と予測値 (CYP2D6 発現系ミクロソーム)

表 2.16 THD の各代謝経路における反応速度定数 (CYP2D6 発現系マイクロソーム)

Rate constant	Reaction	rate constant (min^{-1})	Relative rate constant vs. $k_{2\text{SO}}$	Coefficient of variation (%)
$k_{2\text{SO}}$	2S-oxidation	$2.84 \times 10^{-2} \pm 0.04 \times 10^{-2}$	1.000	3.56 ± 0.02
$k_{5\text{SO}}$	5S-oxidation	$1.61 \times 10^{-5} \pm 0.14 \times 10^{-5}$	0.006	8.38 ± 3.31
$k_{7\text{OH}}$	Hydroxydation	$5.01 \times 10^{-3} \pm 0.03 \times 10^{-3}$	0.177	6.15 ± 0.07
$k_{2\text{SO}2}$	2S-dioxydation	$8.30 \times 10^{-3} \pm 0.13 \times 10^{-3}$	0.293	7.82 ± 0.21
$k_{2\text{SO to } 7\text{OH}2\text{SO}}$	Hydroxydation	$3.84 \times 10^{-5} \pm 0.55 \times 10^{-5}$	0.014	140.5 ± 21.4
$k_{7\text{OH to } 7\text{OH}2\text{SO}}$	2S-oxidation	$1.18 \times 10^{-2} \pm 0.02 \times 10^{-2}$	0.416	9.82 ± 0.17

$n = 3$

2.4 考察

フェノチアジン系化合物は共通して、フェノチアジンの[7-OH] や [5-SO]及び *N*-alkyl 側鎖の[*N*-desMe]が生成することがわかっている (引用文献: 2-1, 2-2, 2-4, 2-7~2-32). フェノチアジン系化合物の一つである THD は *in vivo*, *in vitro* において他と同様に hydroxide, [5-SO]及び[*N*-desMe]の生成が認められている. さらに THD 特異的な代謝物として 2 位置換基の代謝物 [2-SO]及び[2-SO₂]が認められている (引用文献: 2-2, 2-10). この THD に特徴的な生成物である[2-SO]は *in vivo*, *in vitro* において主要代謝物であると考えられている (引用文献: 2-1, 2-2).

実際に、ヒト肝臓ミクロソーム中において THD を代謝させた後の UV ピークを解析したところ[2-SO]が最も生成した (図 2.11). この結果は, *in vivo* における主要代謝物が[2-SO]であることと一致 (引用文献: 2-2)し, (表 1.10) [2-SO]は *in vivo* 及び *in vitro* 共に非常に重要であることがわかった.

[2-SO]や[2-SO₂]の生成には主に CYP2D6, [5-SO]は主に CYP1A2 が関わっているとの報告がある (引用文献: 2-1, 2-33, 2-34). [*N*-desMe]は flavin-containing monooxygenases で主に生成され, CYP3A4 でもわずかに生成することが明らかになっている (引用文献: 2-1, 2-35). THD ではフェノチアジンの hydroxide が生成するとの報告があるが (引用文献: 2-36), 水酸化部位及び生成量は不明である. 類薬である CPZ では[7-OH]が主要代謝物であり, それは CYP2D6 で生成するとの報告があるため, THD でも[7-OH]が生成すると考えられる (引用文献: 2-3). 網羅的な代謝物検索も不十分で, この5つの代謝物の他に重要な代謝物がある可能性もある. 以上より, THD の代謝プロファイルの詳細は十分に明らかになっていない. 従って, 本研究において rhCYP1A2, rhCYP3A4 及び rhCYP2D6 を用いて *in vitro* で THD の全代謝プロファイルを明らかにすることを目的とした.

図 2.2 及び図 2.20 に rhCYP1A2, rhCYP3A4 及び rhCYP2D6 における *in vitro* 代謝後の, MS/MS のフラグメント情報と UV クロマトグラムの結果を示した. [2-SO], [2-SO₂]及び[5-SO]についてはスタンダードの溶出時間と *m/z* から同定された. *m/z* が THD の+16 の代謝物はフラグメント解析からフェノチアジン部位の水酸化体であることがわかった (図 2.2). CPZ でフェノチアジン骨格の[7-OH]が主要代謝物 (引用文献: 2-3)であることを考慮し, 水酸化体は THD の[7-OH]であると推定した. [7-OH]の生成に関して *in vivo* 及び *in vitro* のどちらにおいても定性的な報告のみがあり (引用文献: 2-7, 2-9), THD の代謝における[7-OH]の寄与率は不明であったが, [7-OH]は生成することが初めて明らかにした.

さらに m/z が THD の-14 の代謝物は (図 2.2) フラグメント解析からペリジン環の[N-desMe]であると推定した。

rhCYP2D6 で認められた THD の m/z の+32 (m/z 402)及び+48 (m/z 418) はそれぞれ[7-OH, 2-SO]及び [7-OH 及び 2-SO₂]であると推定した。

各ピークの構造推定及び同定の結果を用いたクロマトグラムの解析より (図 2.20), rhCYP1A2, rhCYP3A4 及び rhCYP2D6 は THD の SOM の明確な特徴の違いを示した ; CYP1A2 では主に[5-SO]が生成し, CYP3A4 では, 唯一, [N-desMe]が生成した. CYP2D6 において THD から, 圧倒的に [2-SO]が生成し, 次いで[2-SO₂]と[7-OH]が同程度生成し, [5-SO]は生成量が少ないという特徴が明らかにした. さらに[N-desMe]は非常に少なかった. 各 CYP 分子種における代謝物の多様性は, SOM の決定には heme との反応性だけではなく, 結合プロファイルも非常に重要であることを示している. 各 CYP 分子種における, [2-SO], [2-SO₂], [5-SO]及び[N-desMe]の生成に関する THD の代謝プロファイルは, これまでの報告と一致する. また, [7-OH]の生成量に関する報告は見つけられなかったが, 本試験から生成量は比較的多く, 重要な代謝物であることが明らかにした. 検出された 5 つの代謝物の他に特筆すべき代謝物はなかった.

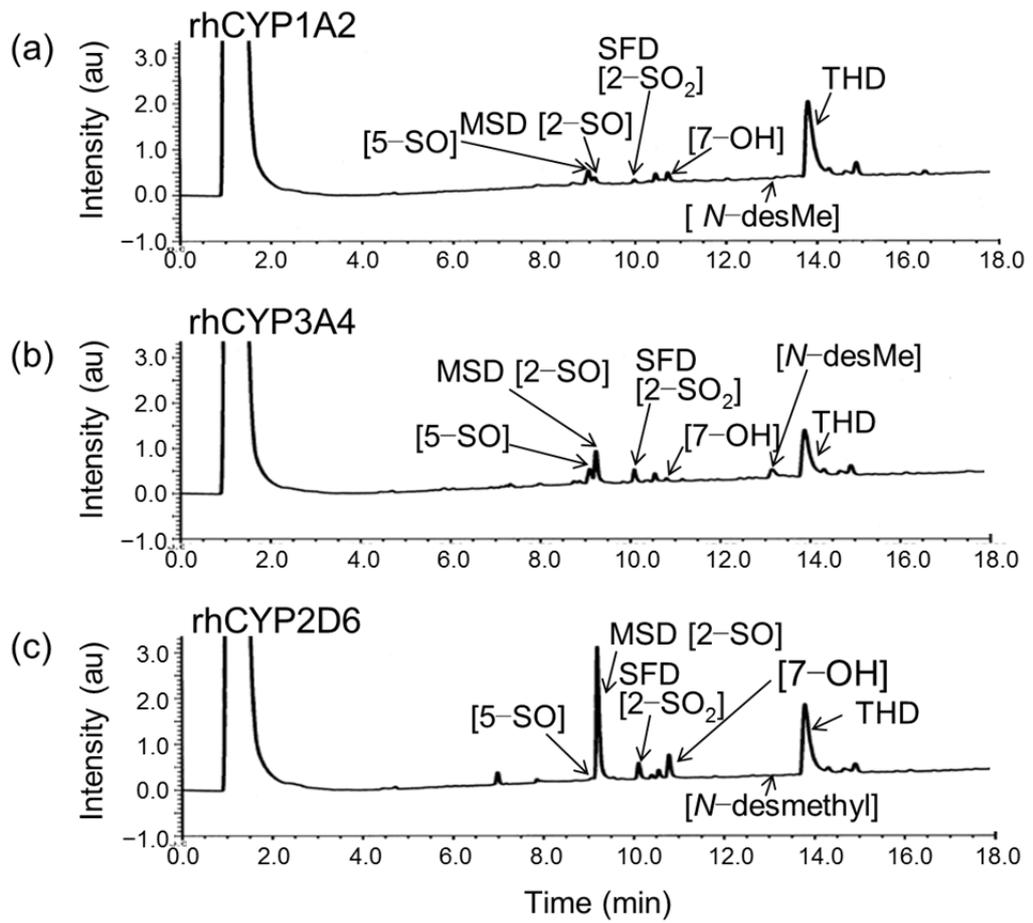


図 2.20 代謝プロファイルの比較 (a) CYP1A2, (b) CYP3A4, (c) CYP2D6

[2-SO]の生成は CYP2D6 が極めて重要であることがわかったため、CYP2D6 における THD の代謝プロファイルをより詳細に調べた。各代謝物の構造から代謝経路を推定し、モデルを組むことにより、反応速度定数 (k)を求めた。

各代謝反応の速度定数 (k , 図 2.21)から CYP2D6 では、[2-SO]の k_{2SO} が $2.84 \times 10^{-2} \pm 0.04 \times 10^{-2}$ と圧倒的に高く、次いで[2-SO₂] ($k_{2SO_2} = 8.30 \times 10^{-3} \pm 0.13 \times 10^{-3}$)及び[7-OH] ($k_{7OH} = 5.01 \times 10^{-3} \pm 0.03 \times 10^{-3}$)であり、[5-SO] ($k_{5SO} = 1.61 \times 10^{-5} \pm 0.14 \times 10^{-5}$)は非常に低かった。解析の結果、予測値は実測値を良好に再現し (図 2.17, 図 2.19), さらに **coefficient of variation** も、THD の $k_{2SO \text{ to } 7OH_2SO}$ を除いて、9.82%以下であったため、モデルは適切であると考えられる。

[N-desMe]は MS で定性的に検出できたが、UV の検出限界以下であったことから、 k は算出できなかった。同様の方法で CPZ についても評価したところ、THD の消失半減期は 23.0 分であり、CPZ (48.7 分)より速やかに消失した。さらに最も生成速度定数が高かったのは、文献の報告通り、[7-OH]の生成であり、数値は THD の k_{7OH} と同程度であった (図 2.21)。THD が CPZ に比べて代謝を受けやすい原因として、2 位置換基の代謝が考えられた。CYP2D6 において[7-OH]が比較的良好に生成されることが初めて明らかにした。 k 値の上位 3 つは S11 の酸化反応に関わるものであり、THD の S11 は反応性が高いことが示された。従って、選択的な THD の 2 位側鎖の代謝という特徴は、2 位側鎖が heme に安定的に近接しやすいことや heme との反応性の高さが要因ではないかと考えられる。

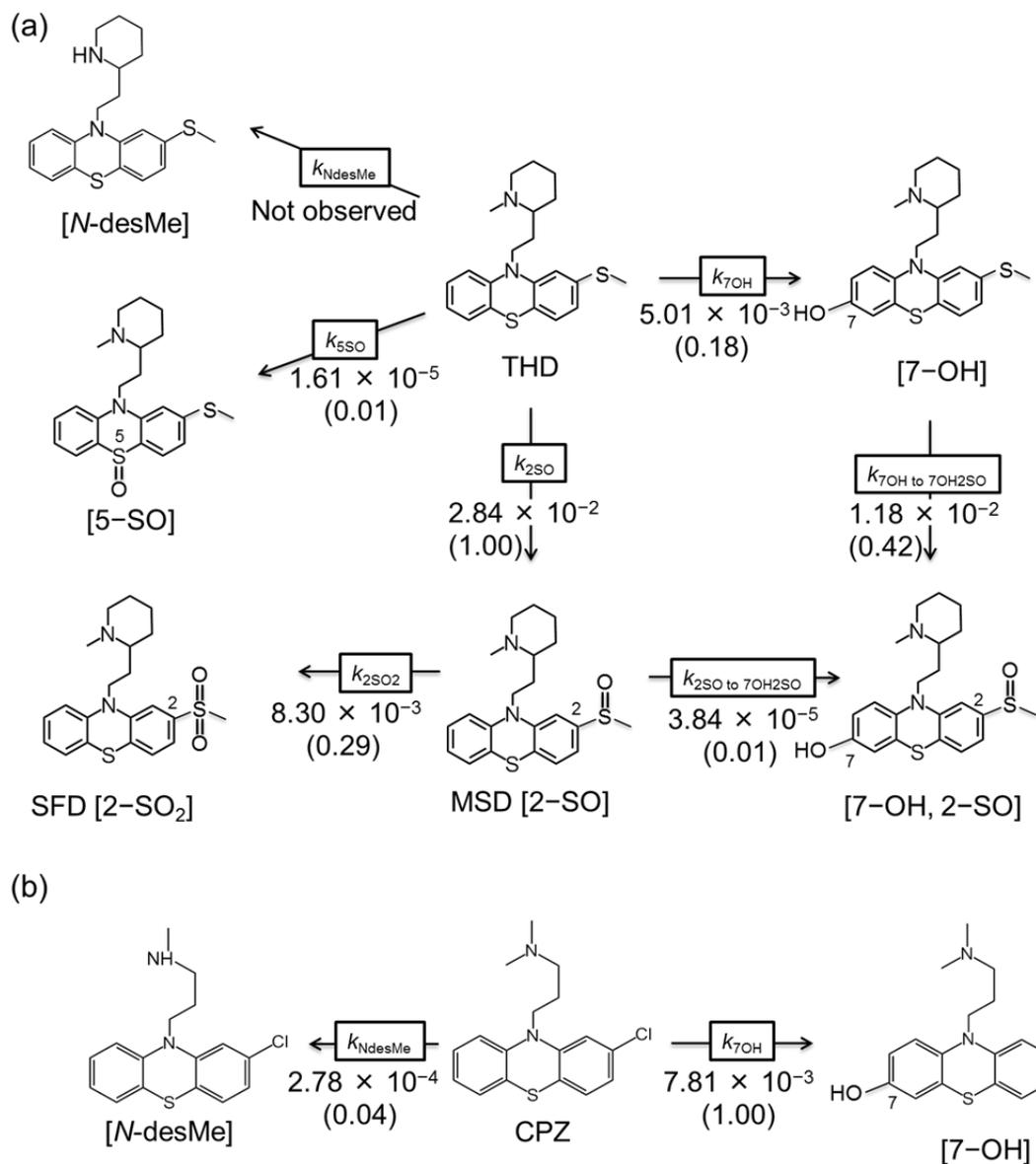


図 2.21 代謝経路と反応速度定数 (min^{-1})

(a) THD, (b) CPZ, 括弧内は $k_{2\text{so}}$ または $k_{7\text{OH}}$ に対する相対速度定数の比

2.5 小括

CYP2D6 の代謝能の大小が THD 由来の QT 延長の発現に関わっており、さらに主要代謝物である MSD (2-SO) は CYP2D6 が主に触媒するとの報告があるが (引用文献: 2-1, 2-37), THD の代謝特性には不明な点が多数存在する。そこで本章では CYP2D6 による THD の代謝特性を実験的に明らかにした。その結果, CYP2D6 において THD から, 圧倒的に[2-SO]が生成し, 次いで[7-OH]が生成し, [5-SO]は生成しにくいことが明らかとなった。また, [N-desMe]は検出限界以下であった。またこれらの代謝物を元に [2-SO₂]や[7-OH, 2-SO]が生成した。代謝物の絶対立体配置は調べていないため, 不明である。各代謝反応の生成速度定数の上位 3 つはすべて, 2 位側鎖の代謝に関わるものであり, 選択的な THD の 2 位側鎖の代謝という特徴は, 2 位側鎖が heme に安定的に近接しやすいことや heme との反応性の高さが要因ではないかと推測した。一方, THD と CYP2D6 の共結晶構造から予測される[5-SO]は実際にはほとんど代謝されず, 結晶構造から代謝メカニズムは理解できない。

次章から分子動力学法 (MD)及び密度汎関数法 (DFT)を用いて結晶結合ポーズと代謝物との対応を調べ, 代謝機構を考察する。

引用文献

- [2-1] Wójcikowski, J., Maurel, P., Daniel, W. A. (2006). Characterization of human cytochrome p450 enzymes involved in the metabolism of the piperidine-type phenothiazine neuroleptic thioridazine. *Drug. Metab. Dispos.*, 34(3), 471-476.
- [2-2] Hartigan-Go, K., Bateman, N., Nyberg, G., Mårtensson, E., Thomas, S. H. (1996). Concentration-related pharmacodynamic effects of thioridazine and its metabolites in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 60(5), 543-553.
- [2-3] Hartmann, F., Gruenke, L. D., Craig, J. C., Bissell, D. M. (1983). Chlorpromazine metabolism in extracts of liver and small intestine from guinea pig and from man. *Drug. Metab. Dispos.*, 11(3), 244-248.
- [2-4] Wójcikowski, J., Boksa, J., Daniel, W. A. (2010). Main contribution of the cytochrome P450 isoenzyme 1A2 (CYP1A2) to N-demethylation and 5-sulfoxidation of the phenothiazine neuroleptic chlorpromazine in human liver—A comparison with other phenothiazines. *Biochem. Pharmacol.*, 80(8), 1252-1259.
- [2-5] Yoshii, K., Kobayashi, K., Tsumuji, M., Tani, M., Shimada, N., Chiba, K. (2000). Identification of human cytochrome P450 isoforms involved in the 7-hydroxylation of chlorpromazine by human liver microsomes. *Life Sci.*, 67(2), 175-184.
- [2-6] Wójcikowski, J., Daniel, W. A. (2010). Influence of antidepressant drugs on chlorpromazine metabolism in human liver—an in vitro study. *Pharmacol. Rep.*, 62(6), 1062-1069.
- [2-7] Lin, G., Hawes, E. M., McKay, G., Korchinski, E. D., Midha, K. K. (1993). Metabolism of piperidine-type phenothiazine antipsychotic agents. IV. Thioridazine in dog, man and rat. *Xenobiotica*, 23(10), 1059-1074.
- [2-8] Svendsen, C. N., Hrbek, C. C., Casendino, M., Nichols, R. D., Bird, E. D. (1988). Concentration and distribution of thioridazine and metabolites in schizophrenic post-mortem brain tissue. *Psychiatry. Res.*, 23(1), 1-10.
- [2-9] Wen, B., Zhou, M. (2009). Metabolic activation of the phenothiazine antipsychotics chlorpromazine and thioridazine to electrophilic iminoquinone species in human liver microsomes and recombinant P450s. *Chem. Biol. Interact.*, 181(2), 220-226.
- [2-10] Daniel, W. A., Syrek, M., Haduch, A., Wójcikowski, J. (2000). Pharmacokinetics and metabolism of thioridazine during co - administration of tricyclic antidepressants. *Br. J. Pharmacol.*, 131(2), 287-295.

- [2-11] West, N. R., Rosenblum, M. P., Sprince, H., Gold, S., Boehme, D. H., Vogel, W. H. (1974). Assay procedures for thioridazine, trifluoperazine, and their sulfoxides and determination of urinary excretion of these compounds in mental patients. *J. Pharm. Sci.*, 63(3), 417-420.
- [2-12] Svendsen, C. N., Bird, E. D. (1986). HPLC with electrochemical detection to measure chlorpromazine, thioridazine and metabolites in human brain. *Psychopharmacology*, 90(3), 316-321.
- [2-13] Yamaori, S., Yamazaki, H., Suzuki, A., Yamada, A., Tani, H., Kamidate, T., Kamataki, T. (2003). Effects of cytochrome b 5 on drug oxidation activities of human cytochrome P450 (CYP) 3As: similarity of CYP3A5 with CYP3A4 but not CYP3A7. *Biochem. Pharmacol.*, 66(12), 2333-2340.
- [2-14] Wójcikowski, J., Pichard - Garcia, L., Maurel, P., Daniel, W. A. (2003). Contribution of human cytochrome P - 450 isoforms to the metabolism of the simplest phenothiazine neuroleptic promazine. *Br. J. Pharmacol.*, 138(8), 1465-1474.
- [2-15] Daniel, W., Syrek, M., Janczar, L., Boksa, J. (1994). The pharmacokinetics of promazine and its metabolites after acute and chronic administration to rats--a comparison with the pharmacokinetics of imipramine. *Pol. J. Pharmacol.*, 47(2), 127-136.
- [2-16] Fishman, V., Goldenberg, H. (1965). Side chain degradation and ring hydroxylation of phenothiazine tranquilizers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 150(1), 122-128.
- [2-17] Syrek, M., Wójcikowski, J., Daniel, W. A. (1996). Promazine pharmacokinetics during concurrent treatment with tricyclic antidepressants. *Pol. J. Pharmacol.*, 49(6), 453-462.
- [2-18] Wójcikowski, J., Basińska, A., Daniel, W. A. (2014). The cytochrome P450-catalyzed metabolism of levomepromazine: a phenothiazine neuroleptic with a wide spectrum of clinical application. *Biochem. Pharmacol.*, 90(2), 188-195.
- [2-19] Papadopoulos, A. S., Crammer, J. L. (1986). Sulphoxide metabolites of thioridazine in man. *Xenobiotica*, 16(12), 1097-1107.
- [2-20] Gaertner, H. J., Breyer, U., Liomin, G. (1974). Metabolism of trifluoperazine, fluphenazine, prochlorperazine and perphenazine in rats: in vitro and urinary metabolites. *Biochem. Pharmacol.*, 23(2), 303-311.
- [2-21] Curry, S. H., Whelpton, R., De Schepper, P. J., Vranckx, S., Schiff, A. A. (1979). Kinetics of fluphenazine after fluphenazine dihydrochloride, enanthate and decanoate administration to man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 7(4), 325-331.

- [2-22] Aravagiri, M., Marder, S. R., Yuwiler, A., Midha, K. K., Kula, N. S., Baldessarini, R. J. (1995). Distribution of fluphenazine and its metabolites in brain regions and other tissues of the rat. *Neuropsychopharmacology*, 13(3), 235-247.
- [2-23] Hansen, L. B., Elley, J., Christensen, T. R., Larsen, N. E., Naestoft, J., Hvidberg, E. F. (1979). Plasma levels of perphenazine and its major metabolites during simultaneous treatment with anticholinergic drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 7(1), 75-80.
- [2-24] Van Kempen, G. M. J. (1971). Urinary excretion of perphenazine and its sulfoxide during administration in oral and long-acting injectable form. *Psychopharmacologia*, 21(3), 283-286.
- [2-25] Huang, C. L., Kurland, A. A. (1964). Perphenazine (Trilafon) metabolism in psychotic patients. *Arch. Gen. Psychiatry.*, 10(6), 639-646.
- [2-26] Andersson, T., Miners, J. O., Veronese, M. E., Tassaneeyakul, W., Tassaneeyakul, W., Meyer, U. A., Birkett, D. J. (1993). Identification of human liver cytochrome P450 isoforms mediating omeprazole metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 36(6), 521-530.
- [2-27] Larsson, M., Forsman, A. (1983). A high-performance liquid chromatographic method for the assay of perphenazine and its dealkylated metabolite in serum after therapeutic doses. *Ther. Drug Monit.*, 5(2), 225-228.
- [2-28] Aravagiri, M., Hawes, E. M., Midha, K. K. (1984). Radioimmunoassay for the sulfoxide metabolite of trifluoperazine and its application to a kinetic study in humans. *J. Pharm. Sci.*, 73(10), 1383-1387.
- [2-29] Aravagiri, M., Hawes, E. M., Midha, K. K. (1985). Radioimmunoassay for the 7 - hydroxy metabolite of trifluoperazine and its application to a kinetic study in human volunteers. *J. Pharm. Sci.*, 74(11), 1196-1202.
- [2-30] Breyer, U., Gaertner, H. J., Prox, A. (1974). Formation of identical metabolites from piperazine-and dimethylamino-substituted phenothiazine drugs in man, rat and dog. *Biochem. Pharmacol.*, 23(2), 313-322.
- [2-31] Aravagiri, M., Hawes, E. M., Midha, K. K. (1986). Development and application of a specific radioimmunoassay for trifluoperazine N4'-oxide to a kinetic study in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 237(2), 615-622.
- [2-32] Tashiro, M., Naito, T., Kagawa, Y., Kawakami, J. (2012). Simultaneous determination of prochlorperazine and its metabolites in human plasma using isocratic liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, 26(6), 754-760.

- [2-33] Lewis, D. F. (2000). On the recognition of mammalian microsomal cytochrome P450 substrates and their characteristics: towards the prediction of human p450 substrate specificity and metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 60(3), 293-306.
- [2-34] Smith, D. A., Jones, B. C. (1992). Speculations on the substrate structure-activity relationship (SSAR) of cytochrome P450 enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 44(11), 2089-2098.
- [2-35] Tokuriki, N., Tawfik, D. S. (2009). Protein dynamism and evolvability. *Science*, 324(5924), 203-207.
- [2-36] Papadopoulos, A. S., Crammer, J. L., Cowan, D. A. (1985). Phenolic metabolites of thioridazine in man. *Xenobiotica*, 15(4), 309-316.
- [2-37] LLerena, A., Berecz, R., de la Rubia, A., Dorado, P. (2002). QTc interval lengthening is related to CYP2D6 hydroxylation capacity and plasma concentration of thioridazine in patients. *J. Psychopharmacol.*, 16(4), 361-364.

第 3 章 CYP2D6-THD 複合体の結合ポーズの分子動力学 (MD)計算

3.1 序論

第 2 章における *in vitro* 代謝試験より, CYP2D6 による thioridazine (THD) の代謝プロファイルは CYP1A2 や CYP3A4 におけるそれとは異なり, 主要代謝物が mesoridazine (2-SO, MSD, 図 3.1)であるという CYP2D6 特有の代謝特性があることを明らかにした. 次いで CYP2D6 では[C7-OH]及び[5-SO]が生成することが明らかとなり, その生成速度定数は[2-SO] ($2.89 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) > [C7-OH] ($4.86 \cdot 10^{-3}$) >> [5-SO] ($1.62 \cdot 10^{-5}$)の順であった.

THD と CYP2D6 の共結晶構造は 12 複合体 (PDB code: 4WNW (非対称ユニット 4 個), 3TBG (非対称ユニット 8 個))報告されているが, THD の結合部位が CYP2D6 の活性中心である Cpd I に近接しているものに限ると 8 複合体 (4WNW: 4 個, 3TBG: 4 個)となる. この 8 複合体では O_{CpdI} (Cpd I の鉄原子に結合した酸素原子)に最近接する THD 中の原子 (X)は C7, S5 または S11 であり, 興味深いことに実験で認められた代謝部位と一致した.

本章では, 上記の共結晶構造に基づき, 分子力学 (Molecular Mechanics; MM)・分子動力学 (Molecular Dynamics; MD)計算を用い, CYP2D6-THD 複合体の結合ポーズの解析を行った.

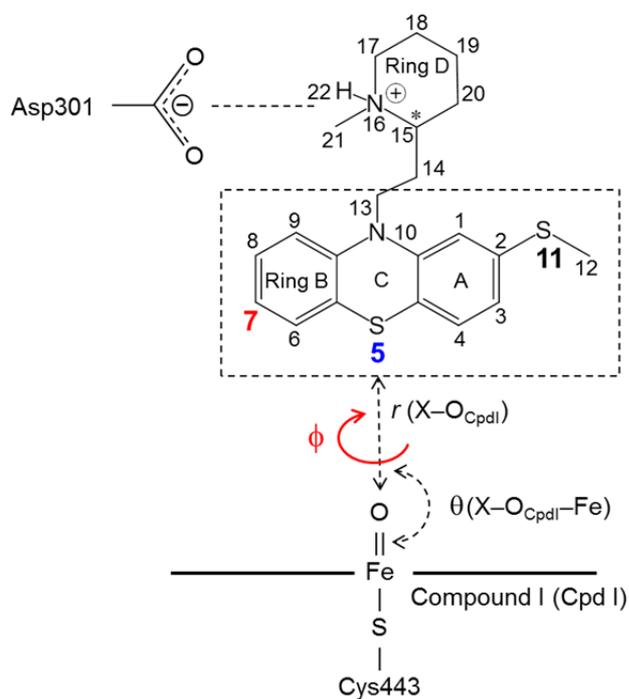


図 3.1 THD, Compound I と Asp301

* は不斉炭素を表す.

3.2 方法

3.2.1 結晶構造における結合ポーズの比較

2016年1月現在, THD と CYP2D6 の共結晶構造は 4WNW (Resolution = 3.30 Å)及び 3TBG (Resolution = 2.10 Å)でのみ報告されている. 4WNW 及び 3TBG はそれぞれ 2 量体 (Units A 及び B)及び 4 量体 (Units A', B', C' 及び D')で構成され, すべての単量体につき 2 つの異なる結合ポーズの THD (I 及び II)が認められる. ラセミ体を供試したものの, これらの共結晶構造中の 12 個の THD すべてにおいて C15 (図 3.1)の立体絶対配置は *R* 体であった. 3TBG で認められた THD の 8 つの結合ポーズは CYP2D6 中の Cpd I から proximal (I)及び distal (II)に位置する 2 つに分類することができる. Cpd I に近接した 8 つの pose (A-I, A-II, B-I, B-II, A'-I, B'-I, C'-I 及び D'-I)すべてにおいて, THD 中の Ring D の(N16)-H22 は Asp301 の側鎖と水素結合を形成していた. これらの 8 個の pose 間の root mean square deviation (RMSD)を表 3.1 に示した. 3TBG で認められた A'-I, B'-I, C'-I 及び D'-I 間の RMSD は十分小さくほとんど同一構造であるため, A'-I のみを解析対象とし, 最終的に 6 個の pose (A-I (4WNW), A-II (4WNW),

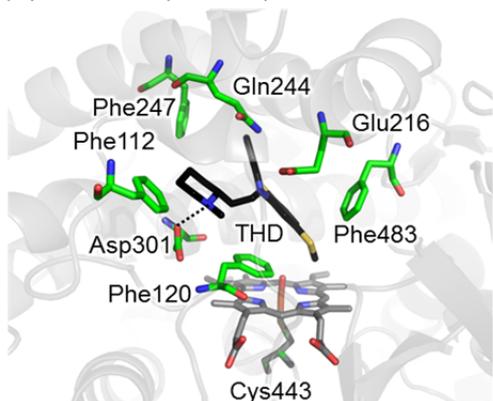
B-I (4WNW), B-II (4WNW)及び I (3TBG), II (3TBG))を MD 計算の初期構造として選択した. MD 計算は 4WNW 及び 3TBG の様な多量体からなる結晶構造を精密化するためにも必要となる.

表 3.1 RMSD 値 (Å)

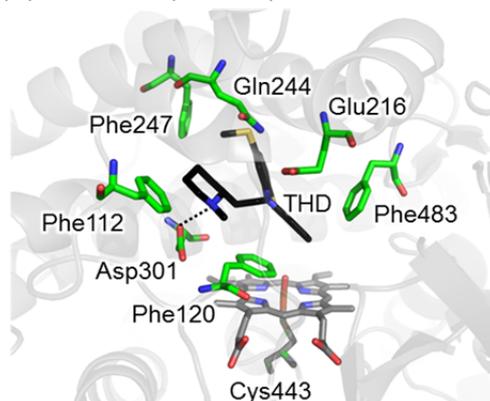
	4WNW				3TBG			
	Pose A-I	Pose A-II	Pose B-I	Pose B-II	Pose A'-I	Pose B'-I	Pose C'-I	Pose D'-I
Pose A-I	4.74	1.16	4.77	5.00	5.00	5.04	4.98	5.02
Pose A-II	4.74	4.81	0.59	5.04	1.81	1.84	1.74	1.75
Pose B-I	1.16	4.81	4.81	4.98	4.83	4.83	4.81	4.84
Pose B-II	4.77	0.59	4.81	4.98	1.85	1.87	1.79	1.78
Pose A'-I	5.00	1.81	4.83	5.00	0.28	0.28	0.12	0.15
Pose B'-I	5.04	1.84	4.83	5.04	0.28	0.28	0.28	0.33
Pose C'-I	4.98	1.74	4.81	4.98	0.12	0.28	0.15	0.15
Pose D'-I	5.02	1.75	4.84	5.02	0.15	0.33	0.15	0.15

CYP2D6 中の C_α原子及び Compound I の Fe 原子の座標を重ね合わせ済みのものを使用し、8つの THD 間の重原子について RMSD を算出した。

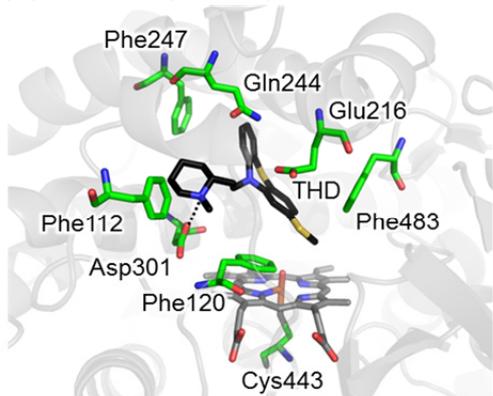
(A) Pose A-I (4WNW)



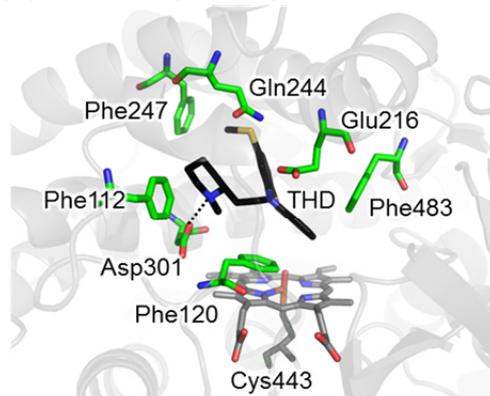
(B) Pose A-II (4WNW)



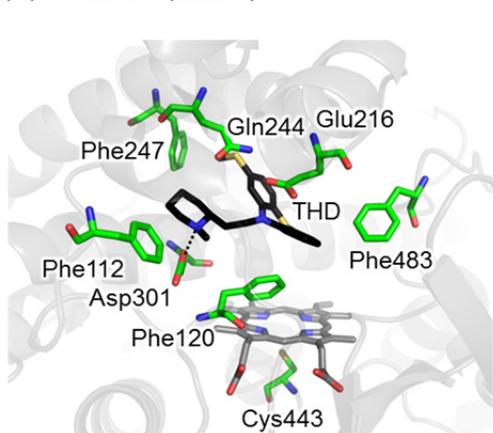
(C) Pose B-I (4WNW)



(D) Pose B-II (4WNW)



(E) Pose A'-I (3TBG)



(F) Pose A'-II (3TBG)

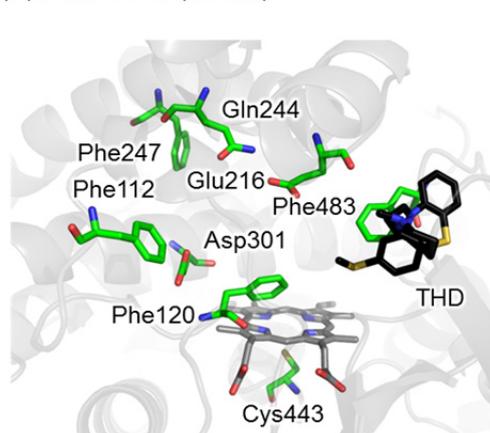


図 3.2 (R)-THD と CYP2D6 の共結晶構造
破線は水素結合 (Asp301 の側鎖と THD の N16)を表す。
()内は pdb コードを表す。

3.2.2 分子動力学法

MD 計算には, AMBER11 (引用文献: 3-1) を使用し, 力場パラメータとして parm99 (引用文献: 3-2) および GAFF (general AMBER force field) (引用文献: 3-3) を CYP2D6 および THD にそれぞれ割り当てた.

解離性のアミノ酸残基 (Asp, Glu, Arg, Lys) 及び His のプロトン化状態は, PDB2PQR web server (引用文献: 3-4) により第二章で実施した実験条件に基づいて pH 7.4 における予測 pK_a に基づき決定した. なお, N, C 両末端はそれぞれ CH_3CO 基, $NHCH_3$ 基でキャップ処理した. 以上のすべての操作には SYBYL-X1.2 (引用文献: 3-5) を使用した. THD の実測の pK_a は 9.5 であるとの報告から (引用文献: 3-6), THD の 16 位の N 原子の axial 位をプロトン化した. なお, 原子電荷以外の Cpd I の力場パラメータには Giammona (引用文献: 3-7) 及び Seifert ら (引用文献: 3-8) の報告値を使用した (パラメータ set 1).

Cpd I およびその第 5 配座に位置する Cys443 の原子電荷は, 図 3.3 に示すモデル構造を用いて Gaussian 09 により, B3LYP 法より得られる RESP 電荷 (引用文献: 3-9) を用いた. B3LYP 法では, Fe 原子に対しては有効内殻ポテンシャルの LanL2DZ (引用文献: 3-10 ~ 3-12) を, その他の原子 (H, C, N, O, S 原子) に対しては 6-31G(d) をそれぞれ基底関数として適用した. なお, Cpd I の電子スピン状態には二重項及び四重項を採用した. 同様に THD の RESP 電荷は, THD 単独状態で B3LYP/6-31G(d) により算出した.

なお, パラメータ set 1 の妥当性を検証するために, Shahrokh ら (引用文献: 3-13) の報告値をパラメータ set 2 として, それぞれのパラメータを使用し (表 3.2), 複合体構造の MM 計算による構造最適化を実施し, 図 3.1 に示す距離 r ($X-O_{CpdI}$) 及び角度 θ ($X-O_{CpdI}-Fe$) ($X = S11, C7$ and $S5$) を比較した (表 3.3). Cpd I に使用するパラメータ set 1 及び set 2 のどちらにおいても r ($X-O_{CpdI}$) 及び θ ($X-O_{CpdI}-Fe$) に有意な違いはなかったため, パラメータ set 1 は妥当と判断した.

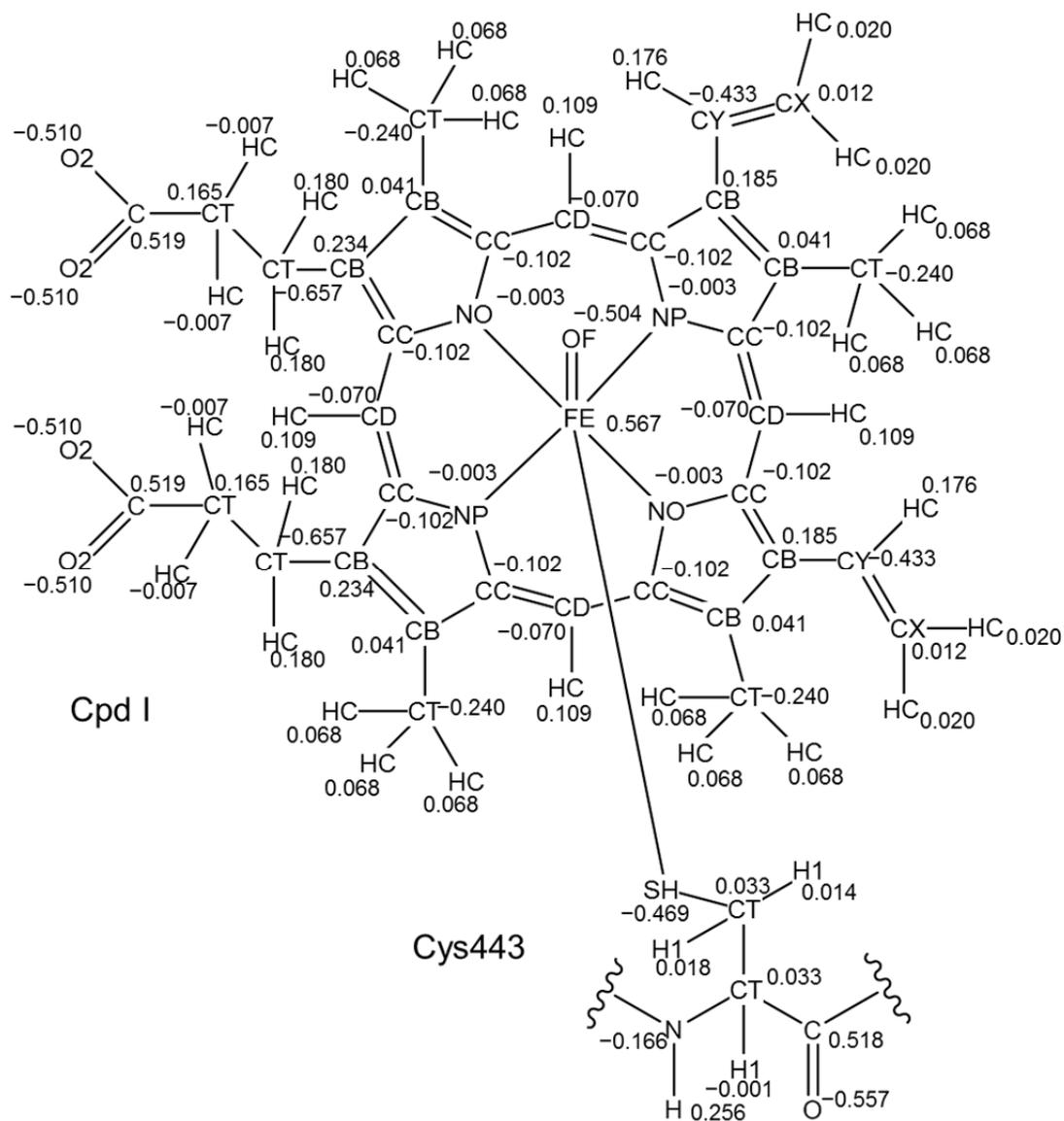


図 3.3 Cpd I と Cys443 の RESP 電荷 (esu) と原子タイプ

表 3.2 CpdI の力場パラメータ^a

Parameter set 1			Parameter set 2					
Bond	Force constant ^b	Equilibrium bond length ^c	Force constant ^b	Equilibrium bond length ^c				
FE-NO	50.0	2.010	114.0	2.029				
FE-NP	50.0	2.010	114.0	2.029				
NO-CC	316.0	1.384	494.6	1.335				
NP-CC	316.0	1.384	431.6	1.376				
CC-CB	273.0	1.444	418.3	1.429				
CC-CD	391.0	1.391	418.3	1.429				
CB-CB	418.0	1.357	418.3	1.429				
CB-CT	297.0	1.501	337.3	1.499				
CB-CY	297.0	1.501	418.3	1.429				
CD-HC	338.0	1.090	341.5	1.089				
CY-HC	340.0	1.080	347.2	1.085				
CX-HC	340.0	1.080	347.2	1.085				
CY-CX	570.0	1.340	418.3	1.429				
FE-OF	220.0	1.640	572.0	1.639				
Angle	Force constant ^d	Equilibrium bond angle ^e	Force constant ^d	Equilibrium bond angle ^e				
NO-FE-NO	0.0	90.000	0.0	174.731				
NP-FE-NP	0.0	90.000	0.0	175.636				
NP-FE-NO	50.0	90.000	239.0	89.900				
FE-NO-CC	30.0	127.400	146.0	126.651				
FE-NP-CC	30.0	127.400	146.0	126.651				
NP-CC-CB	70.0	110.300	70.0	113.420				
NO-CC-CB	70.0	110.300	71.2	112.560				
NP-CC-CD	70.0	125.500	68.5	125.044				
NO-CC-CD	70.0	125.500	68.5	125.044				
CC-NO-CC	70.0	105.400	68.9	116.040				
CC-NP-CC	70.0	105.400	68.6	110.190				
CC-CB-CB	70.0	107.000	67.9	110.700				
CC-CD-CC	70.0	124.100	63.8	126.057				
CB-CC-CD	70.0	125.400	65.6	124.539				
CC-CB-CT	70.0	124.900	64.7	115.970				
CB-CB-CT	70.0	128.200	64.7	115.970				
CC-CD-HC	30.0	118.000	46.6	116.969				
CB-CT-HC	35.0	109.500	45.1	121.520				
CB-CB-CY	70.0	128.200	67.9	110.700				
CB-CY-HC	35.0	120.000	47.5	119.260				
CB-CY-CX	70.0	120.000	67.9	110.700				
CY-CX-HC	35.0	120.000	47.5	119.260				
CC-CB-CY	70.0	124.900	67.9	110.700				
CX-CY-HC	35.0	120.000	47.5	119.260				
CB-CT-CT	63.0	114.000	63.6	111.920				
HC-CX-HC	35.0	120.000	38.0	117.650				
OF-FE-NP	50.0	90.000	65.0	92.406				
OF-FE-NO	50.0	90.000	65.0	92.406				
Dihedral ^f	IDIVF ^g	PK ^h	Phase ⁱ	Periodicity ^j	IDIVF ^g	PK ^h	Phase ⁱ	Periodicity ^j
X-NP-FE-X	1	0.00	180	2	1	0.00	180	2
X-NO-FE-X	1	0.00	180	2	1	0.00	180	2
X-NP-CC-X	4	5.70	180	2	1	0.00	180	2
X-NO-CC-X	4	5.70	180	2	1	0.00	180	2
X-CC-CB-X	4	3.15	180	2	4	16.00	180	2
X-CB-CB-X	4	21.50	180	2	4	16.00	180	2
X-CD-CC-X	4	7.90	180	2	4	16.00	180	2
X-CB-CT-X	1	0.00	180	2	3	0.00	180	2
X-CB-CY-X	4	0.00	180	2	4	16.00	180	2
X-CY-CX-X	4	30.00	180	2	4	16.00	180	2
Nonbon	vdW radii ^k	potential well depth ^l	vdW radii ^k	potential well depth ^l				
FE	1.200	0.050	1.300	0.010				
NO	1.824	0.170	1.824	0.170				
NP	1.824	0.170	1.824	0.170				
CX	1.908	0.086	1.908	0.086				
OF	1.660	0.210	1.661	0.210				

^a Atom typeは図3.2で示した

^b kcal/mol/Å²

^c Å

^d kcal/mol/radian²

^e degree

^f Torsion energy = (PK / IDIVF) (1 + cos (Periodicity · φ - PHASE))

^g IDIVFは単結合におけるtorsionの総数

^h PKはbarrier magnitudeの半分に等しい

ⁱ degree

^j Periodicityはdihedral angle φのためのスケールリングファクター

^k Å

^l "potential well" はLennard-Jones parameter

表 3.3 Cpd I に使用するパラメータが構造最適化に及ぼす影響

	Pose A-I		Pose A-II		Pose B-I		Pose B-II		Pose I (3TBG)		Pose II (3TBG)	
	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2	Set 1	Set 2
Distance (Å)												
$r(\text{S11-O}_{\text{CpdI}})$	5.26	5.20	11.58	11.52	10.37	10.35	12.17	12.53	12.83	12.63	9.47	9.38
$r(\text{C7-O}_{\text{CpdI}})$	11.31	11.34	7.73	7.85	10.44	10.44	8.04	7.93	8.46	8.57	17.16	16.85
$r(\text{S5-O}_{\text{CpdI}})$	7.74	7.74	5.82	5.82	7.15	7.17	6.37	6.62	7.06	6.89	15.68	15.58
$r(\text{O}_{\text{CpdI}}-\text{Fe})$	1.66	1.64	1.66	1.64	1.66	1.64	1.65	1.64	1.66	1.64	1.66	1.64
$r(\text{Fe}-\text{N}_{\text{CpdI}})$	2.04	2.07	2.04	2.07	2.04	2.08	2.04	2.07	2.04	2.08	2.04	2.07
$r(\text{Fe}-\text{N}_{\text{CpdI}})$	2.04	2.08	2.04	2.08	2.04	2.08	2.03	2.07	2.04	2.07	2.03	2.07
$r(\text{Fe}-\text{N}_{\text{CpdI}})$	2.04	2.08	2.04	2.08	2.04	2.08	2.04	2.08	2.04	2.08	2.03	2.08
$r(\text{Fe}-\text{N}_{\text{CpdI}})$	2.05	2.07	2.05	2.06	2.05	2.07	2.04	2.07	2.05	2.07	2.05	2.07
$r(\text{Fe}-\text{S}_\gamma(\text{Cys443}))$	2.54	2.59	2.54	2.62	2.54	2.61	2.54	2.61	2.54	2.61	2.54	2.60
Angle (degree)												
$\theta(\text{S11-O}_{\text{CpdI}}-\text{Fe})$	126.6	127.5	165.1	164.1	127.9	130.2	159.7	160.6	157.6	158.7	119.8	120.2
$\theta(\text{C7-O}_{\text{CpdI}}-\text{Fe})$	164.0	162.2	129.3	128.3	172.9	175.1	136.4	139.9	141.7	142.7	133.6	135.4
$\theta(\text{S5-O}_{\text{CpdI}}-\text{Fe})$	174.8	171.8	155.6	154.1	164.3	165.9	161.5	165.5	162.4	163.0	121.7	122.9
$\theta(\text{O}_{\text{CpdI}}-\text{Fe}-\text{N}_{\text{CpdI}})$	90.0	92.2	89.3	92.4	90.3	92.9	90.9	92.8	89.2	92.8	89.5	92.6
$\theta(\text{O}_{\text{CpdI}}-\text{Fe}-\text{N}_{\text{CpdI}})$	89.7	93.2	89.5	93.3	90.0	93.2	89.0	93.0	90.0	93.3	88.4	92.0
$\theta(\text{O}_{\text{CpdI}}-\text{Fe}-\text{N}_{\text{CpdI}})$	91.0	93.0	89.1	92.0	89.9	92.3	90.9	92.8	88.7	92.2	88.2	91.6
$\theta(\text{O}_{\text{CpdI}}-\text{Fe}-\text{N}_{\text{CpdI}})$	89.5	92.7	88.9	92.7	89.2	92.5	88.2	92.2	88.5	92.2	91.2	94.4
$\theta(\text{O}_{\text{CpdI}}-\text{Fe}-\text{S}_\gamma(\text{Cys443}))$	176.0	177.0	177.3	177.5	176.3	175.7	177.7	177.8	178.3	176.4	179.0	176.7

Explicit water: TIP3P (1 ns, 310 K)

Set 1: Giammona, D. A. (1984). An examination of conformational flexibility in porphyrins and bulky-ligand binding in myoglobin (*Doctoral dissertation*). Seifert, A., Tatzel, S., Schmid, R. D., Pleiss, J. (2006). Multiple molecular dynamics simulations of human p450 monooxygenase CYP2C9: the molecular basis of substrate binding and regioselectivity toward warfarin. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 64(1), 147-155.

Set 2: Shahrokh, K., Orendt, A., Yost, G. S., Cheatham, T. E. (2012). Quantum mechanically derived AMBER - compatible heme parameters for various states of the cytochrome P450 catalytic cycle. *J. Comput. Chem.*, 33(2), 119-133.

MD 計算は 2 つの条件の異なる条件で実施した。MD-1 では、実溶媒として複合体構造の周囲 12 Å に TIP3P (transferable intermolecular potential 3 point) モデルの水分子を配置し、系全体の電荷を中性化するために、カウンターイオンとして Na⁺ を 4WNW の pose A-I, A-II, B-I, B-II にはそれぞれ 2 個、3TBG の pose I, II にはそれぞれ 1 個加えた。一方で、MD-2 では、溶媒は配置せず、溶媒効果を距離依存誘電率 ($\epsilon = 4r$) により考慮することで、MD-1 よりも長時間の MD 計算を試みた。

MD 計算を行う前処理として、結晶構造の歪みを緩和するために(1) 水素原子、(2) アミノ酸残基の側鎖原子、(3) 系全体の順にそれぞれ MM によるエネルギー極小化計算を行った。各段階における極小化計算には 1,000 ステップの最急降下 (steepest descent) 法と 10,000 ステップの共役勾配 (conjugate gradient) 法を組み合わせ使用し、エネルギー勾配の収束閾値は 10^{-4} kcal/mol/Å に設定した。昇温過程 (200 ps, 310 K まで) 及び平衡過程 (400 ps, 310 K) を経たのち、MD-1 の productive run として周期境界条件下で NPT アンサンブル (1 bar, 310 K) を用いて 5 ns の MD を実施した。

MD-2 の productive run は 30 ns (310 K) で実施した。MD-1, 2 ともに積分時間の刻みを 2.0 fs (1.0×10^{-15} s) とし、水素原子が関わる共有結合長の固定には SHAKE アルゴリズム (引用文献: 3-14) を、温度・圧力制御には Berendsen アルゴリズム (引用文献: 3-15) を使用した。非結合原子間の相互作用のカットオフ距離を 12 Å とした。

各複合体構造の trajectory (MD-1: 合計 1000 フレーム, MD-2: 合計 30000 フレーム) から各原子の座標平均を算出し、MM による構造最適化を実施したものを平均構造とした。平均構造を用いて、結合エネルギー ($\Delta E_{\text{bind}} = E_{\text{complex}} - [E_{\text{protein}} + E_{\text{ligand}}]$), r (X-O_{CpdI}) 及び θ (X-O_{CpdI}-Fe) (X = C7, S5, S11) を算出した。

共結晶構造において確認された THD の (N16)-H22 と Asp301 の側鎖との水素結合の MD 計算中の占有率を確認するために、原子間距離 (N16-CYP2D6 の水素結合受容体原子) が $0.8 [R_{\text{vdW}}(\text{N16}) + R_{\text{vdW}}(\text{CYP2D6 の水素結合受容体原子})]$ 以下の時、水素結合が形成されていると判断した。なお、各原子の van der Waals (vdW) 半径 (R_{vdW}) は Bondi ら (引用文献: 3-16) の報告値を使用した。

3.3 結果と考察

3.3.1 MD trajectory 解析による各結合ポーズの特性評価

図 3.4 の(A)及び(B)は pose A-I (4WNW), A-II (4WNW), B-I (4WNW), B-II (4WNW), I (3TBG)及び II (3TBG)の MD-1 (1 ns)における距離 r ($X-O_{C_{pdf}}$)及び角度 θ ($X-O_{C_{pdf}}-Fe$)の変化を示している. Pose II (3TBG)では, 共結晶構造において $O_{C_{pdf}}$ から遠位 (10.9 Å ($S11-O_{C_{pdf}}$))にあり, MD 計算中にも $O_{C_{pdf}}$ に S11, S5, C7 のいずれの原子も近接することがないことがわかる. 従って, 代謝反応に関わる pose として, Pose A-I (4WNW), A-II (4WNW), B-I (4WNW), B-II (4WNW)及び I (3TBG)を解析対象とした. 図 3.4 のいずれの pose においても, MD 計算中の熱揺動は小さく, 距離 r ($X-O_{C_{pdf}}$)及び角度 θ ($X-O_{C_{pdf}}-Fe$)はほとんど一定であった. 水素結合形成率は 100%であり (表 3.4), THD の(N16)-H22 と CYP2D6 の Asp301 の側鎖との水素結合は連続的に認められた.

計算条件の違いが結果に及ぼす影響を調べるため, 実溶媒の代わりに距離依存誘電率 ($\epsilon = 4r$)を用いた. MD-2 (30 ns)を別途実施し, 結果を図 3.5 に示した. 図 3.5 の trajectory は図 3.4 と類似しており, 計算条件の違いはほとんどないと考えられる. 但し, MD-2 trajectory においては水素結合率は MD-1 よりも低く (表 3.5), Asp301 との水素結合が断続的であった. この点が 2 つの計算方法で異なった.

表 3.4 に結晶結合ポーズ及び平均構造における r ($X-O_{C_{pdf}}$)及び θ ($X-O_{C_{pdf}}-Fe$)の平均値と標準偏差, 同時に RMSD を示した. r ($X-O_{C_{pdf}}$)及び θ ($X-O_{C_{pdf}}-Fe$)の RMSD2 及びその標準偏差は非常に小さかった. 表 3.5 に MD-2 の結果を示したが, 同様に RMSD2 及びその標準偏差は非常に小さかった. これらの結果は, すべての結合ポーズの THD が CYP2D6 に安定に結合していることを示していると考えられる.

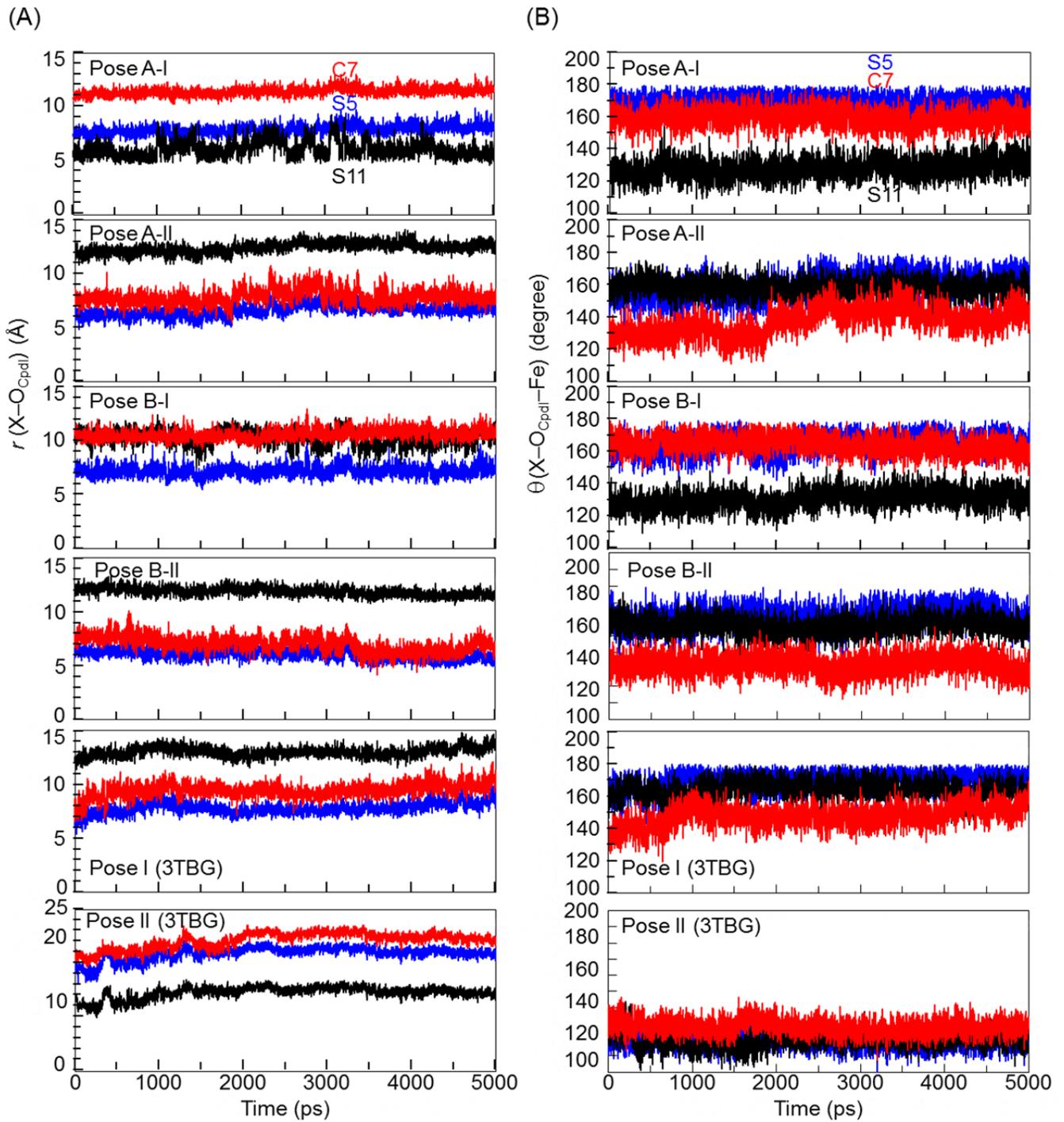


図 3.4 MD-1 (explicit water: TIP3P, 5 ns, 310 K)における
 (A) $r(X-O_{\text{Cpdt}})$ と(B) $\theta(X-O_{\text{Cpdt}}-Fe)$ の推移 (X = C7, S5, S11)
 青線: S5, 赤線: C7, 黒線: S11

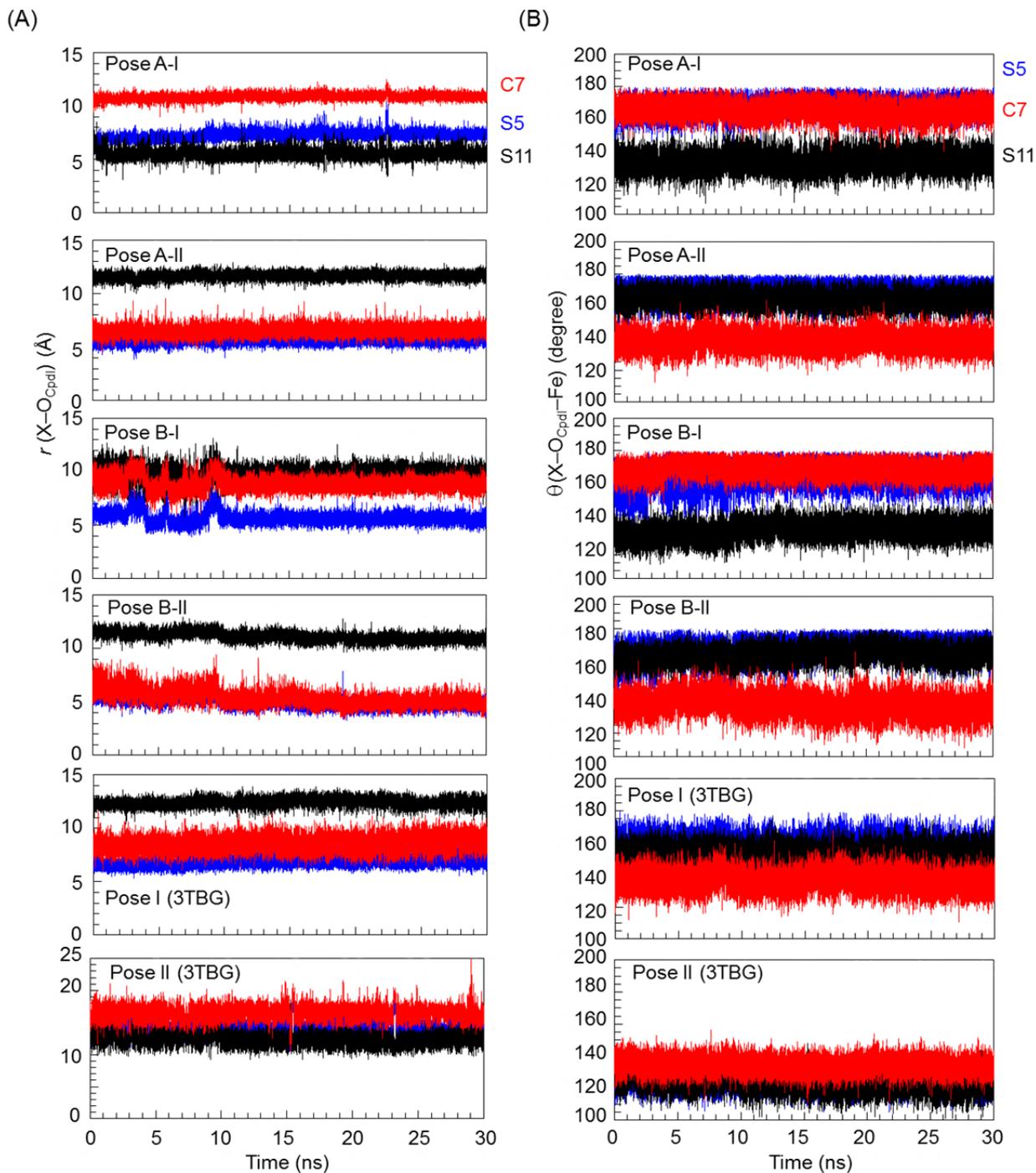


図 3.5 MD-2 (implicit water: $\epsilon = 4r$, 30 ns, 310 K)における
 (A) $r(X-O_{CpdI})$ と(B) $\theta(X-O_{CpdI}-Fe)$ の推移 (X=C7, S5, S11)
 青線: S5, 赤線: C7, 黒線: S11

表 3.4 MD-1 の trajectory から得た r ($X-O_{\text{CpdI}}$) と θ ($X-O_{\text{CpdI}}-Fe$) の平均値と RMSD

	4 WNW Pose A-I		4 WNW Pose A-II		4 WNW Pose B-I		4 WNW Pose B-II		Poses A-II and B-II		3TBG Pose I		3TBG Pose II				
	mean	std.	X-ray	mean	std.	X-ray	mean	std.	X-ray	mean	std.	mean	std.	X-ray	mean	std.	X-ray
r (S5- O_{CpdI})	7.92	0.46	7.21	6.58	0.54	5.47	7.18	0.52	7.73	5.98	0.47	5.24	6.28	0.59	7.78	0.54	6.68
r (S11- O_{CpdI})	6.11	0.77	4.74	12.43	0.49	11.56	10.27	0.70	6.30	11.88	0.40	11.45	12.16	0.52	13.01	0.46	12.28
r (C7- O_{CpdI})	11.46	0.38	10.99	7.88	0.71	4.24	10.61	0.50	11.65	7.00	0.74	4.95	7.44	0.84	9.46	0.64	8.38
θ (S5- $O_{\text{CpdI}}-Fe$)	168.9	5.4	147.3	159.8	7.8	150.6	164.4	6.3	151.6	161.3	6.9	159.4	160.5	7.4	169.3	5.6	163.7
θ (S11- $O_{\text{CpdI}}-Fe$)	128.1	6.1	152.7	158.4	5.2	156.4	130.6	6.0	155.8	156.4	5.4	158.5	157.4	5.4	163.6	5.6	158.2
θ (C7- $O_{\text{CpdI}}-Fe$)	159.4	5.8	153.9	137.1	8.7	159.4	164.3	5.7	154.9	133.0	6.0	153.5	135.1	7.8	147.7	6.8	137.3
HB (%)	100			100			100			100			100		100		
RMSD 1	1.79	0.08		1.88	0.12		1.87	0.10		1.94	0.15		1.91	0.14	1.69	0.10	
RMSD 2	1.48	0.30		1.27	0.54		1.18	0.34		0.78	0.23		1.03	0.48	1.11	0.33	

Explicit water: TIP3P (5 ns, 310 K).

RMSD 1: 結晶構造に対する THD-CYP2D6 複合体の重原子について算出.

RMSD 2: THD の平均構造に対する THD の重原子について算出.

HB: THD の(N116)-H22 と Asp301 の側鎖が水素結合している割合.

表 3.5 MD-2 の trajectory から得た $r(X-O_{C_{\text{pdI}}})$ と $\theta(X-O_{C_{\text{pdI}}}-Fe)$ の平均値

	4 WNW Pose A-I		4 WNW Pose A-II		4 WNW Pose B-I		4 WNW Pose B-II		Poses A-II and B-II		3TBG Pose I		3TBG Pose II				
	mean	std.	X-ray	mean	std.	X-ray	mean	std.	X-ray	mean	std.	mean	std.	X-ray	mean	std.	X-ray
$r(S5-OC_{\text{pdI}})$	7.27	0.40	7.21	5.59	0.31	5.47	5.72	0.58	7.73	4.98	0.46	5.24	5.29	0.50	6.86	0.43	6.68
$r(S11-OC_{\text{pdI}})$	5.54	0.51	4.74	11.67	0.33	11.56	9.91	0.70	6.30	11.16	0.44	11.45	11.42	0.46	12.42	0.41	12.28
$r(C7-OC_{\text{pdI}})$	10.88	0.29	10.99	6.58	0.46	4.24	8.96	0.68	11.65	5.40	0.75	4.95	5.99	0.86	8.57	0.72	8.38
$\theta(S5-OC_{\text{pdI}}-Fe)$	166.5	5.4	147.3	168.9	5.7	150.6	163.9	7.6	151.6	167.3	6.6	159.4	168.1	6.2	157.5	7.1	163.7
$\theta(S11-OC_{\text{pdI}}-Fe)$	133.2	6.1	152.7	164.3	5.0	156.4	130.2	5.6	155.8	163.7	5.3	158.5	164.0	5.2	154.1	5.4	158.2
$\theta(C7-OC_{\text{pdI}}-Fe)$	165.4	5.2	153.9	138.3	5.7	159.4	168.5	5.0	154.9	132.6	6.7	153.5	135.5	6.8	136.2	6.2	137.3
HB (%)	74			64			36			78			71		82		
RMSD 1	1.52	0.06		1.23	0.05		1.22	0.06		1.19	0.06		1.21	0.06	1.52	0.07	
RMSD 2	0.92	0.32		0.80	0.23		1.00	0.40		1.02	0.47		0.91	0.38	0.85	0.23	

Implicit water: $\varepsilon = 4r$ (30 ns, 310 K).

RMSD 1: 結晶構造に対する THD-CYP2D6 複合体の重原子について算出.

RMSD 2: THD の平均構造に対する THD の重原子について算出.

HB: THD の(N16)-H22 と Asp301 の側鎖が水素結合している割合.

図 3.6 に A-I (4WNW), A-II (4WNW), B-I (4WNW), I (3TBG) 及び II (3TBG) の平均構造と結晶結合ポーズを示す.

Pose A-I 及び A-II における THD の配置はフェノチアジン環の中心からおおよそ反転した配置であり, Pose A-I 及び B-I の THD の配置は, Pose A-I の距離 r (S11-O_{C_{pdf}}) が B-I に比べて約 5 Å 短かったものの, ほぼ同一の結合ポーズとみなすことができる.

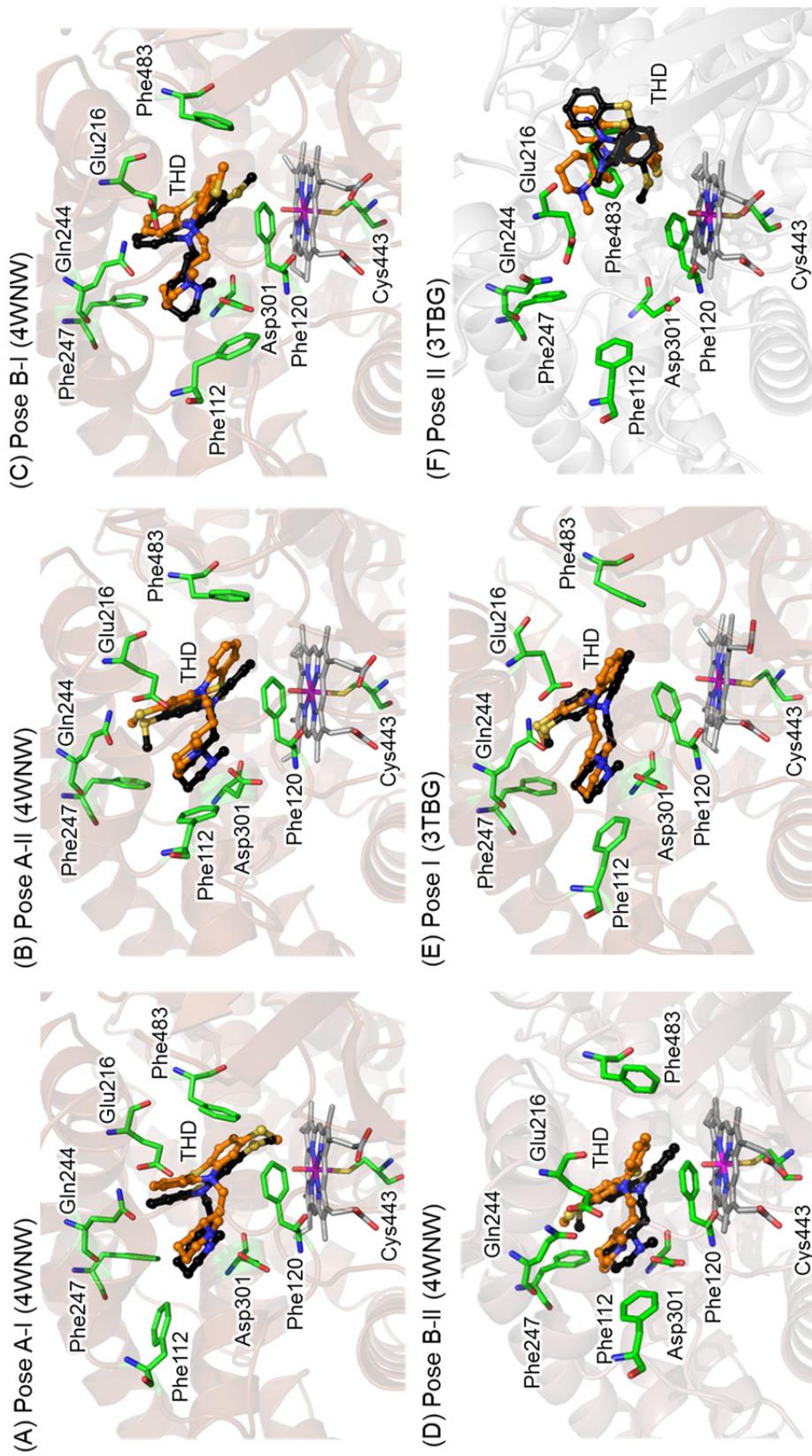


図 3.6 平均構造 (橙)と共結晶構造 (黒) における(*R*)-THD の結合ポーズの比較
CYP2D6 の C_{α} と THD の重原子を重ね合わせた。

3.3.2 THD と CYP2D6 の相互作用解析による特性比較

THD が O_{cpdl} の遠位にある Pose II (3TBG)を除いた, 図 3.7 に示す 4 つの結合ポーズは CYP2D6 のアミノ酸残基と THD の結合エネルギーは非常に近い値であった. 結合エネルギー ($\Delta E_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{electrostatic}} + \Delta E_{\text{van der Waals}}$)への個々の残基の寄与を図 3.7 に示す. 4 つの結合ポーズ間で特筆すべきエネルギー差が Glu216 及び Gln244 との相互作用で認められた. これらの 2 つの残基は水素結合を形成している.

N16 と Asp301 の距離は 4 つの結合ポーズ間でほとんど同じ (2.79 ± 0.02 Å (N-O δ))で, 安定な水素結合が認められたが, THD の N16 と Glu216 の距離 ($3.70\sim 6.28$ Å (N-O ϵ))には大きな違いがあり, このエネルギー差を生じる原因となっている. これらの結果は 4WNW 及び 3TBG における Glu216 の温度因子 B-factor が Asp301 に比べて有意に高いことと一致する.

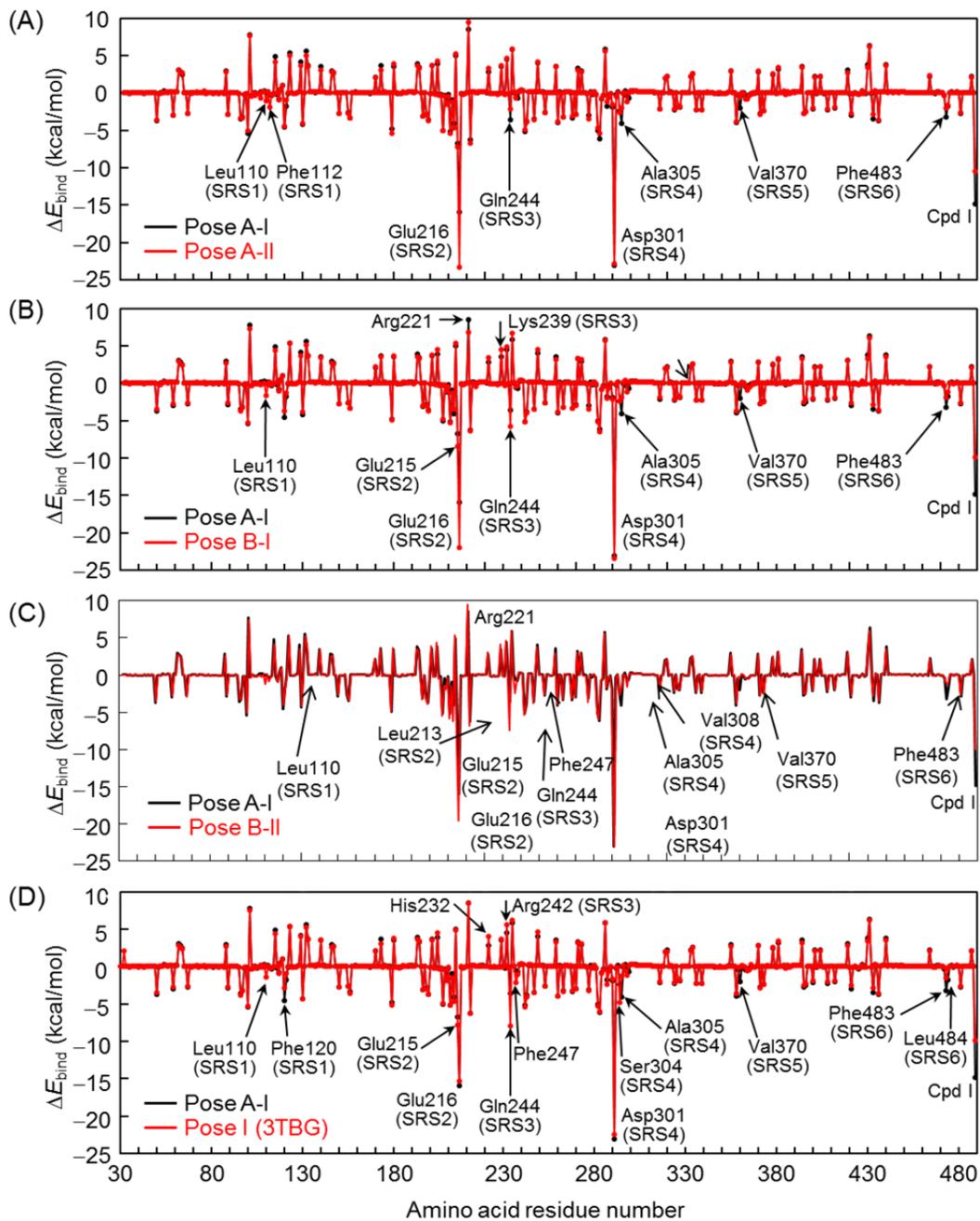


図 3.7 総結合エネルギーに対する各アミノ酸残基の寄与結合パターンは Pose A-I と Pose A-II (A), Pose B-I (B), Pose B-II (C)及び Pose I (D)について示した.

SRS: Substrate Recognition Site.

3.4 小括

本章では共結晶構造を初期構造として、分子力学・分子動力学計算を用いて CYP2D6-THD 複合体の結合ポーズの解析を行った。

代謝に関わる Pose として解析した Pose A-I (4WNW), A-II (4WNW), B-I (4WNW) 及び I (3TBG) は, MD 計算中の熱揺動は小さく, $r(\text{X-O}_{\text{CpdI}})$, $\theta(\text{X-O}_{\text{CpdI}}-\text{Fe})$ 及び構造の変化は小さかったため, 各 THD が CYP2D6 に強く結合していることを示していると考えられる. THD と CYP2D6 の Asp301 は安定した水素結合を形成する. $\theta(\text{X-O}_{\text{CpdI}}-\text{Fe})$ は 2 つのグループに分けることができた; グループ 1 は $\langle\theta\rangle$ が 127 から 138° であり, グループ 2 では $\langle\theta\rangle$ は 153 以上であった.

CYP2D6 の各残基と THD の結合エネルギーは, 各 Pose で似ていたが, Glu216 と Glu244 との相互作用エネルギーでのみ違いが認められた. Glu216 と Glu244 は水素結合を形成している. このエネルギー差は各 Pose で Glu216 と THD との距離が異なることに起因すると考えられた.

引用文献

- [3-1] Case, D. A., Cheatham, T. E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Woods, R. J. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.*, 26(16), 1668-1688.
- [3-2] Wang, J., Cieplak, P., Kollman, P. A. (2000). How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules?. *J. Comput. Chem.*, 21(12), 1049-1074.
- [3-3] Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.*, 25(9), 1157-1174.
- [3-4] Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., Baker, N. A. (2004). PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic acids res.*, 32, W665-W667.
- [3-5] SYBYL-X1.2 Tripos Inc., 1699 South Hanley Road, St. Louis, MI 63144, U.S.A
- [3-6] Dollery, C. (1998) *Therapeutic Drugs*, 2nd ed., T95–T99
- [3-7] Giammona, D. A. (1984). An examination of conformational flexibility in porphyrins and bulky-ligand binding in myoglobin, *University of California, Davis*, Ph. D. Dissertation.
- [3-8] Seifert, A., Tatzel, S., Schmid, R. D., Pleiss, J. (2006). Multiple molecular dynamics simulations of human p450 monooxygenase CYP2C9: the molecular basis of substrate binding and regioselectivity toward warfarin. *Proteins*, 64(1), 147-155.
- [3-9] Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W., Kollman, P. A. (1993). A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.*, 97(40), 10269-10280.
- [3-10] Hay, P. J., Wadt, W. R. (1985). Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg. *J. Chem. Phys.*, 82(1), 270-283.
- [3-11] Wadt, W. R., Hay, P. J. (1985). Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi. *J. Chem. Phys.*, 82(1), 284-298.

- [3-12] Hay, P. J., Wadt, W. R. (1985). Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. *J. Chem. Phys.*, 82(1), 299-310.
- [3-13] Shahrokh, K., Orendt, A., Yost, G. S., Cheatham, T. E. (2012). Quantum mechanically derived AMBER - compatible heme parameters for various states of the cytochrome P450 catalytic cycle. *J. Comput. Chem.*, 33(2), 119-133.
- [3-14] Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., Berendsen, H. J. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.*, 23(3), 327-341.
- [3-15] Berendsen, H. J., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. R. H. J., Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, 81(8), 3684-3690.
- [3-16] Bondi, A. (1964). van der Waals volumes and radii. *J. Phys. Chem.*, 68(3), 441-451.

第4章 量子化学計算による酸化反応における遷移状態解析

4.1 序論

第2章における *in vitro* 代謝試験より, CYP2D6 では[2-SO], [C7-OH]及び[5-SO]が生成することが明らかとなり, その生成速度定数は[2-SO] ($2.89 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) > [C7-OH] ($4.86 \cdot 10^{-3}$) >> [5-SO] ($1.62 \cdot 10^{-5}$)の順であった. また [N-desMe]はほとんど認められなかった.

本章では各反応部位を含んだ THD の部分構造と酸化反応において中心的役割を果たす Compound I (Cpd I)との酸化反応モデルを反応の遷移状態構造を含めて構築し, density functional theory (DFT)計算により, 活性化エネルギー (E^{act})を算出した.

4.2 方法

THD の部分構造と Cpd I のモデル (reaction center models)を図 4.1 に示す. Cpd I 中のプロトポルフィリン XI はポルフィンとして, Cpd I の Fe 原子に配位する第 5 配座の Cys443 の側鎖を SH⁻としてそれぞれモデル化した(引用文献: 4-1, 4-2). THD については, [2-SO]の代謝反応に関わる S11 を含むモデルとして 10-methyl-2-(methylthio)-10*H*-phenothiazine, C7 ([C7-OH])及び S5 ([5-SO])を含むモデルとして, *N*-methylphenothiazine を使用した.

図 4.2 に THD と各部分構造における部分電荷を示した. SOM における部分電荷は, THD と各部分構造において違いは認められなかった. 図 4.3 に THD と各部分構造における Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO)及び Lowest Unoccupied Molecular Orbital (LUMO) を示した. 各部分構造の HOMO または LUMO は THD のそれらと一致した. これらの結果より, THD の部分構造は電子的に THD を類似しており, その使用は妥当であると判断した.

Reaction center model を用いた DFT 計算により, 活性化エネルギー (E^{act})を算出した.

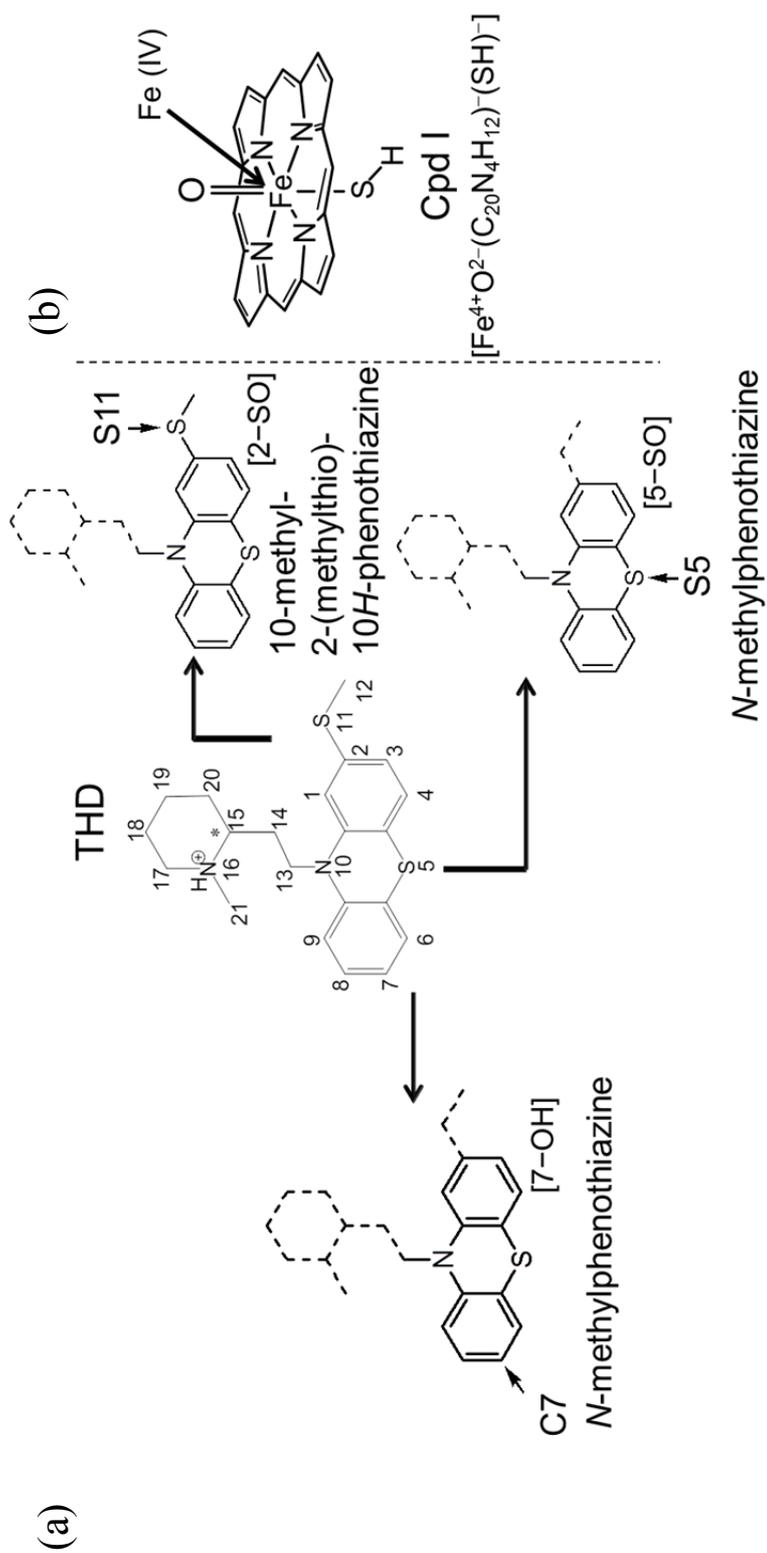
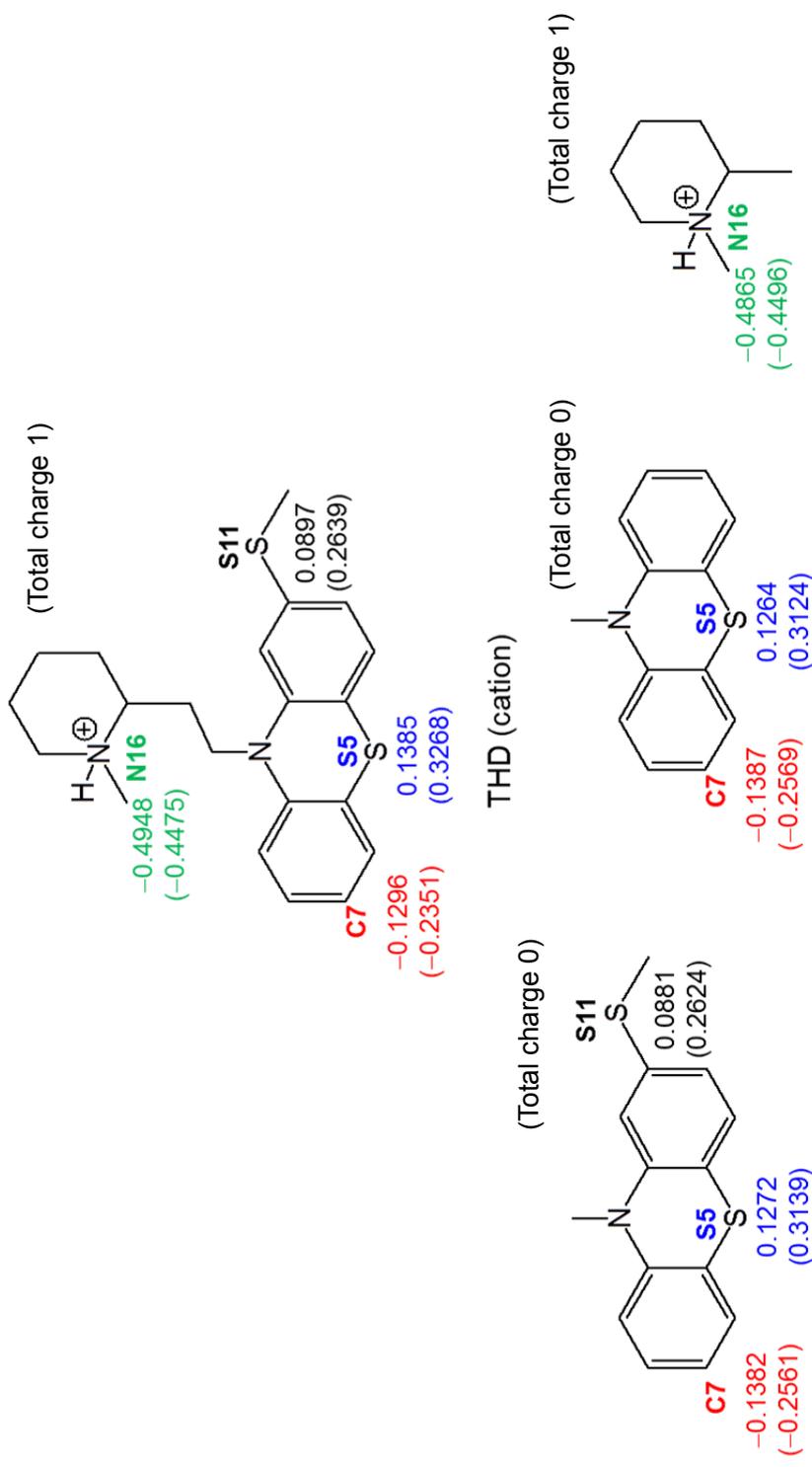


図 4.1 モデル計算 (reaction center model)に用いた(a) THD の部分構造と(b) Cpd I の構造
矢印は酸化部位を表す.



10-methyl-2-(methylthio)-10H-phenothiazine N-methylphenothiazine N-methyl-2-methylpiperidine (cation)

図 4.2 THD と各部分構造における部分電荷

値は Mulliken charge を表し、括弧内は Natural charge を表す。単位は esu. Energy levels of transition state (reaction center model).

計算は IEF-PCM/B3LYP/BS1 を用いた。

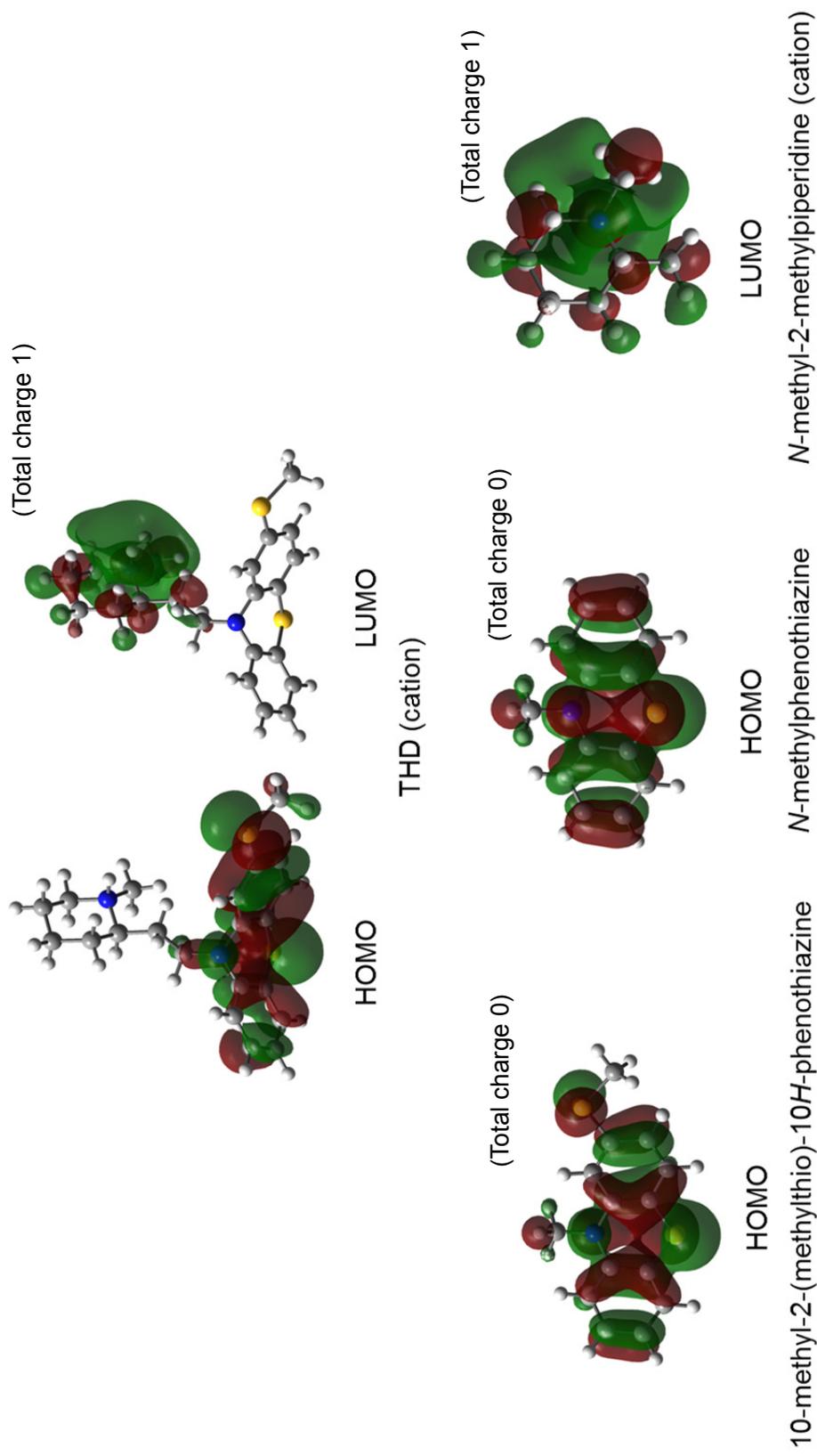


図 4.3 (R)-THD と各部分構造における HOMO 及び LUMO 計算は B3LYP/BS1 // IEF-PCM/B3LYP/BS1 を用いた.

タンパク質内部における環境中での実効誘電率を考慮するために IEF-PCM 法 ($\epsilon = 5.70$, chlorobenzene 溶媒, 4-3)を用いて, B3LYP 法により以下の全ての計算を行った. 酸化反応の反応物ならびに遷移状態 (Transition State; TS)構造の構築と零点エネルギー (Zero-Point Energy; ZPE)補正のための基準振動解析では, スピン多重度は doublet 及び quartet の二つの状態を考慮し, 基底関数として Fe 原子に有効内殻ポテンシャルの LanL2DZ を, それ以外の H, C, N, O, S 原子には 6-31G(d)を適用した (以下, 基底関数 BS1 とする).

また, IEF-PCM/B3LYP/BS1 で構築した構造に基づき, BS1 よりも大きな基底関数 BS2 (Fe 原子に LanL2DZ, それ以外の H, C, N, O, S 原子には 6-31+G(d,p)を適用)を用いて single point 計算を行った (IEF-PCM/B3LYP/BS2 // IEF-PCM/B3LYP/BS1). 活性化エネルギー E^{act} を以下の式 (4.1)に基づき算出した.

$$E^{\text{act}} = E(\text{TS}) - [E(\text{THD model}) + E(\text{Cpd I})]_{\infty} + \text{ZPE correction} + \text{BSSE} \quad (4.1)$$

ここで, $E(\text{TS})$ は TS 複合体構造のエネルギー, $E(\text{THD model})$, $E(\text{Cpd I})$ は反応物である THD の部分構造および Cpd I モデルのエネルギーをそれぞれ表す. $[E(\text{model}) + E(\text{Cpd I})]_{\infty}$ は 2つの部分を無限大に引き離れた時の複合体エネルギーを表す. ZPE correction は基準振動解析により温度 310 K における零点振動エネルギー補正を表す.

さらに, TS において距離 r (X-O_{CpdI})を固定し, 角度 θ (X-O_{CpdI}-Fe)に関する potential energy scan を実施した. すべての DFT 計算は Gaussian09 (引用文献: 4-4)を使用した.

基底関数重なり誤差 (basis set super position error; BSSE)の影響でエネルギーが過大に評価されてしまう場合がある. 従って, 量子化学計算を用いる場合は, counterpoise 法等により BSSE を補正することでより高精度な結果を得ることができる.

4.3 結果と考察

E^{act} 及び TS 構造を[2-SO]の代謝反応に関わる S11 を含むモデルとして 10-methyl-2-(methylthio)-10H-phenothiazine, C7 ([C7-OH])及び S5 ([5-SO])を含むモデルとして, N-methylphenothiazine を使用した reaction center model で計算した.

図 4.4 に B3LYP/BS1 及び B3LYP/BS2 で計算した 3 つの reaction center model の E^{act} を示す. 原子 X と O_{CpdI} の van der Waals (vdW) 半径の合計を $[E(\text{THD model}) + (E(\text{Cpd I}))]_{\text{vdwS}}$ と定義した場合 (3.22 及び 3.32 Å, X はそれぞれ C 及び S), $[E(\text{THD model}) + E(\text{Cpd I})]_{\infty}$ (THD model と Cpd I を ∞ に離した場合) と $[E(\text{THD model}) + (E(\text{Cpd I}))]_{\text{vdwS}}$ の差は 1 kcal/mol (BS1 basis set) 未満とほとんど同じであった. すなわち, E^{act} は位置 vdW でのエネルギーに対する TS 構造のエネルギーの差として考えることができる.

図 4.5 に各 reaction center model の配座と虚の振動数を示す. S11 と S5 の E^{act} (sulfoxidation) は Li らが報告した dimethyl sulfide ($(\text{CH}_3)_2\text{S}$) の値とほとんど同じであった (引用文献: 4-5, 4-6). C7 の E^{act} (aromatic carbon oxidation) は他の報告と一致した (引用文献: 4-7, 4-8). 図 4.5 において, 他の報告と比較するために, basis set superposition error (BSSE) 補正を実施していないが, B3LYP/BS1 での BSSE (doublet (quartet) spin state) は [2-SO], [7-OH] 及び [5-SO] で 3.03 (3.19), 3.69 (3.79) 及び 3.63 (3.74) kcal/mol であった. Basis set (BS1 及び BS2) による違いはなく, E^{act} は同じ順番を示した, $\text{S5} < \text{S11} < \text{C7}$. 3 つの reaction center model すべてにおいて, スピン多重度が doublet における E^{act} は quartet よりも低かった. Quartet における S5 モデルの角度 θ ($\text{S5-O}_{\text{CpdI}}\text{-Fe}$) は最も鈍角であった (158 degrees). C21 位の脱メチル化反応については次章に述べる.

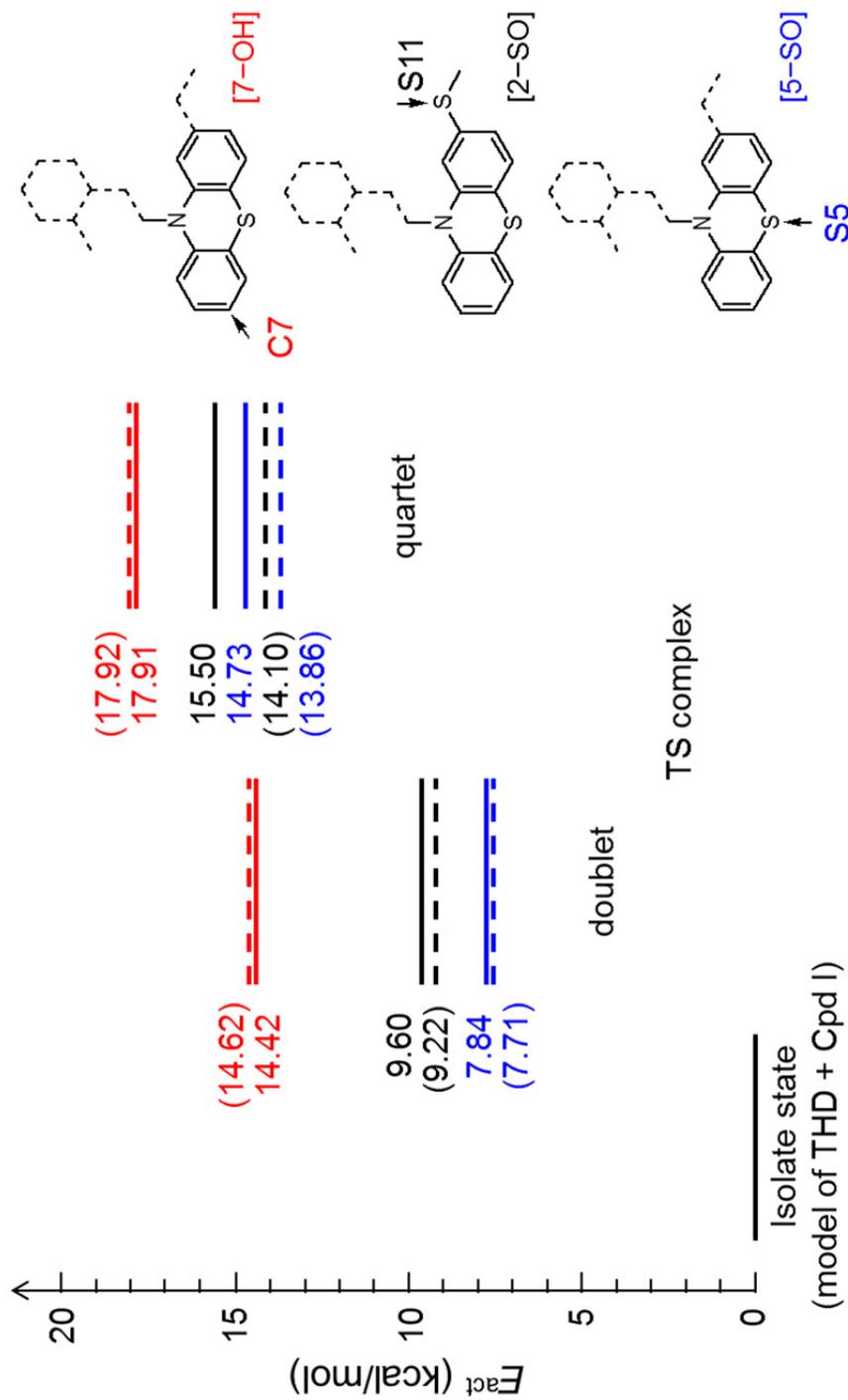


図 4.4 Reaction center model での TS 構造のエネルギーレベル
括弧外及び括弧内の値はそれぞれ BS1 及び BS2 basis set E^{act} を表す.

ZPE 補正済み. BSSE 補正はしていない.

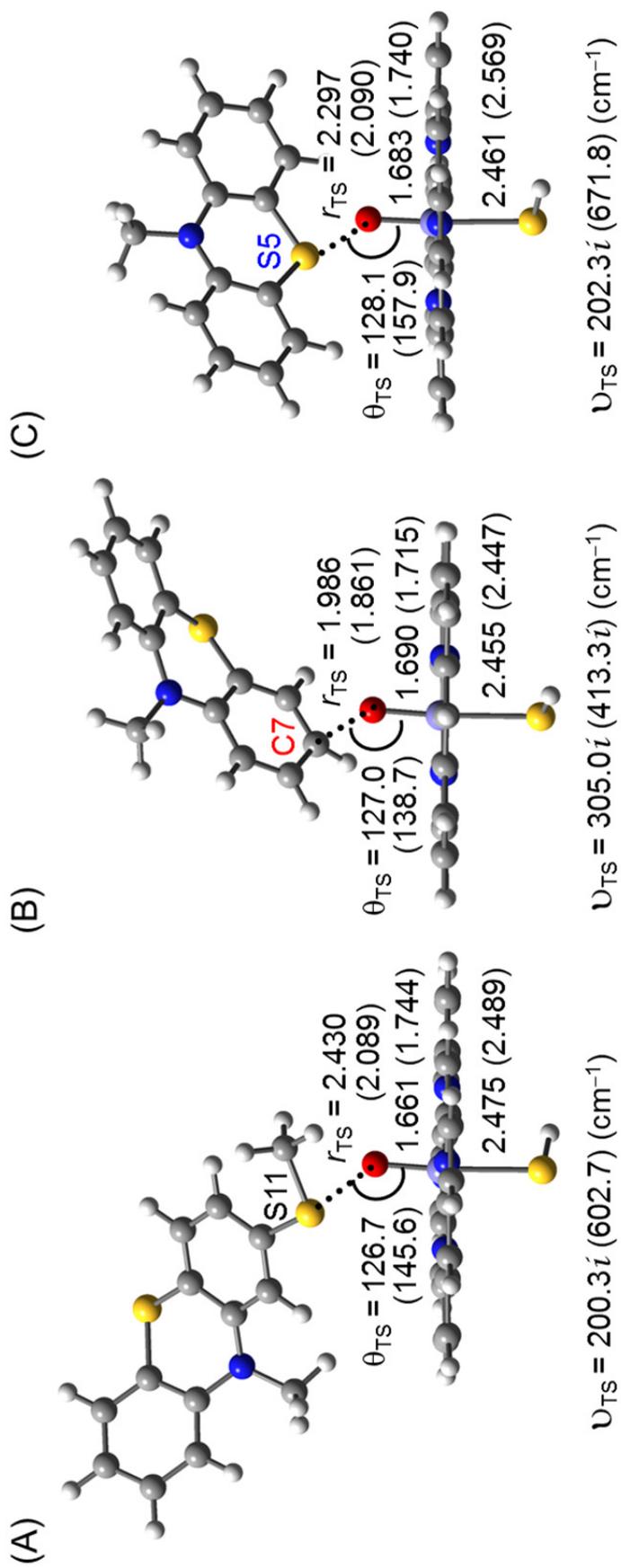


図 4.5 Reaction center model での TS 構造の配座と虚の振動数
Geometry and imaginary frequency of transition state (reaction center model).
括弧外及び括弧内は doublet 及び quartet spin state を表す.

Basis set は BS1 を使用した.

単位は angstrom または degree を表す.

4.4 小括

本章では各反応部位を含んだ THD の部分構造と酸化反応において中心的役割を果たす Compound I (Cpd I) との酸化反応モデルを反応の遷移状態構造を含めて構築し、density functional theory (DFT) 計算により、活性化エネルギーを算出した。計算の結果、活性化エネルギーは $S5 > S11 >> C7$ であった。これは実験で認められた生成速度の順序とは異なっており、活性化エネルギーだけでは説明できないことが明らかとなった。

引用文献

- [4-1] Shaik, S., Kumar, D., de Visser, S. P., Altun, A., Thiel, W. (2005). Theoretical perspective on the structure and mechanism of cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.*, 105(6), 2279-2328.
- [4-2] Rydberg, P., Olsen, L., Ryde, U. (2012). Quantum-mechanical studies of reactions performed by cytochrome P450 enzymes. *Curr. Inorg. Chem.*, 2(3), 292-315.
- [4-3] Li, C., Wu, W., Cho, K. B., Shaik, S. (2009). Oxidation of Tertiary Amines by Cytochrome P450—Kinetic Isotope Effect as a Spin - State Reactivity Probe. *Chemistry*, 15(34), 8492-8503.
- [4-4] Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian HP, Izmaylov AF, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg JL, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery JA Jr, Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd JJ, Brothers E, Kudin KN, Staroverov VN, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam MJ, Klene M, Knox JE, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Zakrzewski VG, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Dapprich S, Daniels AD, Farkas Ö, Foresman JB, Ortiz JV, Cioslowski J, and Fox DJ. Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009
- [4-5] Li, C., Zhang, L., Zhang, C., Hirao, H., Wu, W., Shaik, S. (2007). Which oxidant is really responsible for sulfur oxidation by cytochrome P450?. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 46(43), 8168-8170.
- [4-6] Rydberg, P., Ryde, U., Olsen, L. (2008). Sulfoxide, sulfur, and nitrogen oxidation and dealkylation by cytochrome P450. *J. Chem. Theory Comput.*, 4(8), 1369-1377.
- [4-7] de Visser, S. P., Shaik, S. (2003). A proton-shuttle mechanism mediated by the porphyrin in benzene hydroxylation by cytochrome P450 enzymes. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(24), 7413-7424.
- [4-8] Oláh, J., Mulholland, A. J., Harvey, J. N. (2011). Understanding the determinants of selectivity in drug metabolism through modeling of dextromethorphan oxidation by cytochrome P450. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108(15), 6050-6055.

第 5 章 分子動力学と量子化学計算による THD の代謝反応

機構の考察

5.1 序論

第 2 章における *in vitro* 代謝試験より, CYP2D6 における [2-SO], [C7-OH] 及び [5-SO] の生成速度定数は [2-SO] ($2.89 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) > [C7-OH] ($4.86 \cdot 10^{-3}$) >> [5-SO] ($1.62 \cdot 10^{-5}$) の順であった. [N-desMe] はほとんど認められなかった. [2-SO] と [5-SO] は同じフェノチアジン部の sulfoxidation であるにも関わらず, それらの生成は大きく異なった.

分子中の原子は 10-100 fs で 1 回振動し, 化学反応も同じ時間で起こると考えられる. 反応に十分な時間であると考えられる実溶媒を用いた 5 ns の MD-1 を 6 つの THD と CYP2D6 の共結晶構造 (4WNW 及び 3TBG) を用いて実施した. 各 MD の trajectory から, 反応に重要な原子 X (S11, C7 及び S5) と Cpd I の距離 $r(\text{X}-\text{O}_{\text{CpdI}})$ 及び angle $\theta(\text{X}-\text{O}_{\text{CpdI}}-\text{Fe})$ は一定であり, 揺動も小さいことを示した. (図 5.1) 3TBG の Pose II を除くすべての pose で MD 中の平均距離 $\langle r(\text{S5}-\text{O}_{\text{CpdI}}) \rangle$ は 10 Å 以下であった. 平均角度 $\langle \theta(\text{X}-\text{O}_{\text{CpdI}}-\text{Fe}) \rangle$ は $\langle \theta \rangle$ (Group 1) = 127~146 及び $\langle \theta \rangle$ (Group 2) = 158 (degrees) の 2 つのグループに分類することができる. 3TBG の Pose II を除くすべてで $\langle \theta(\text{S5}-\text{O}_{\text{CpdI}}-\text{Fe}) \rangle$ は Group 2 であった. 実溶媒の代わりに距離依存誘電率 ($\epsilon = 4r$) を用い, 30 ns の MD-2 を別途実施したが, 同様の結果を得た.

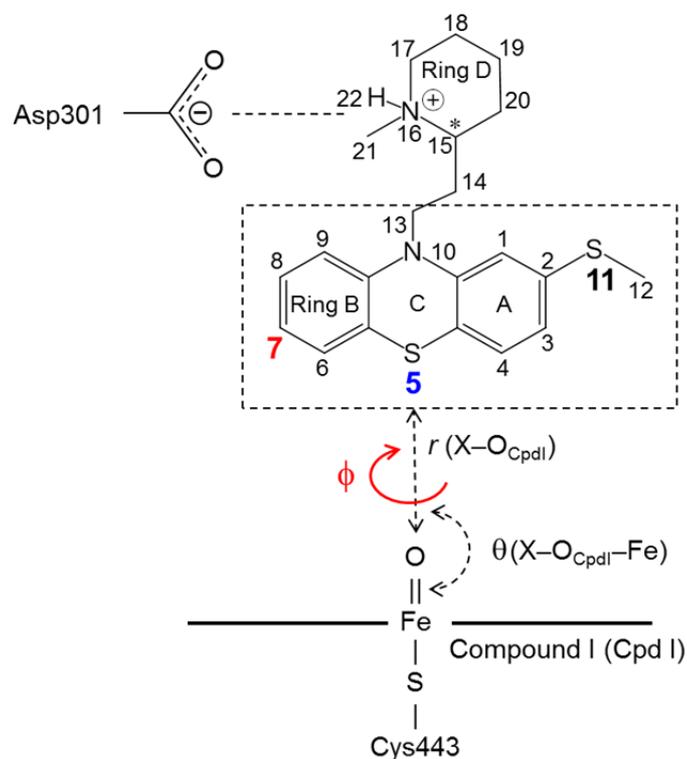


図 5.1 THD 及び Compound I

* は不斉炭素を表す.

Reaction center model を用いた S11, C7 及び S5 の酸化に対応する DFT 計算は次の 2 つを示した; (1) $E^{\text{act}}(\text{S5}) < E^{\text{act}}(\text{S11}) < E^{\text{act}}(\text{C7})$ 及び (2) E^{act} (スピン二重項状態 (doublet spin state)) $< E^{\text{act}}$ (スピン四重項状態 (quartet spin state)). B3LYP/BS1 での BSSE (doublet (quartet) spin state) は [2-SO], [7-OH] 及び [5-SO] で 3.03 (3.19), 3.69 (3.79) 及び 3.63 (3.74) kcal/mol であり, 予測順位に影響を及ぼさないことがわかった.

予想通り, sulfoxidation (S11 及び S5) の E^{act} は aromatic oxidation (C7) のそれよりも 2~7 kcal/mol 低かった. これらは dimethyl sulfide や benzene といった構造的に単純なリガンドで報告されている E^{act} と同様の結果であった.

S5 の酸化は最も低い E^{act} (doublet spin state) を示したにも関わらず, 実験的に S5 の酸化に対応する [5-SO] の生成は極めて少ないことは注目すべきことである.

5.2 分子動力学と量子化学計算による THD の代謝反応機構の考

察

DFT 計算により構築した遷移状態構造 (doublet spin state)における $\theta(\text{X-O}_{\text{CpdI}}\text{-Fe})$ は, 異なる反応タイプにも関わらず, 非常に狭い範囲 (127~128 degrees) であった. この発見は酸化反応における THD の Cpd I へのアプローチには至適な角度があることを示唆している. それゆえに, 実際の CYP 環境下において THD が Cpd I に近接していく際の, アプローチ角 $\theta(\text{X-O}_{\text{CpdI}}\text{-Fe})$ は代謝反応に非常に重要であると考えられる.

THD が代謝を受けるには図 5.2A の様に平均構造の各 Pose から, 図 5.2B の様に遷移状態まで近接することが必要になる. CYP2D6 において THD の S11, C7 及び S5 が代謝されるまでの経路は図 5.3 に示すように 3 つに分けることができると考えられる. 平衡状態から遷移状態へのエネルギー変化は古典力場と DFT 計算をそれぞれ用いて別々に扱った. Path 1 は r_{eq} (MD の平均構造を用いた Amber の極小化計算から得られた X-O_{CpdI} の平衡距離) から r_{vdwS} (X と O_{CpdI} の van der Waals radii の合計) 間まで近づく経路を表し, 各距離で Amber を用いて最適化計算を行った. Path 2 は Path 1 で求めた r_{vdwS} における $\theta(\text{X-O}_{\text{CpdI}}\text{-Fe})$ が至適な反応角度に移行する経路を表しており, 各角度で Amber を用いて最適化計算を行った. Path 3 は r_{vdwS} と r_{TS} (遷移状態の距離) まで近づく経路を表し, 各距離で DFT 計算を用いて計算を行った. THD と CYP2D6 の複合体及び reaction center model において $r = r_{\text{vdwS}}$ の時の $\theta(\text{X-O}_{\text{CpdI}}\text{-Fe})$ をそれぞれ $\theta_{\text{vdwS}}(\text{complex})$ 及び $\theta_{\text{vdwS}}(\text{model})$ とした.

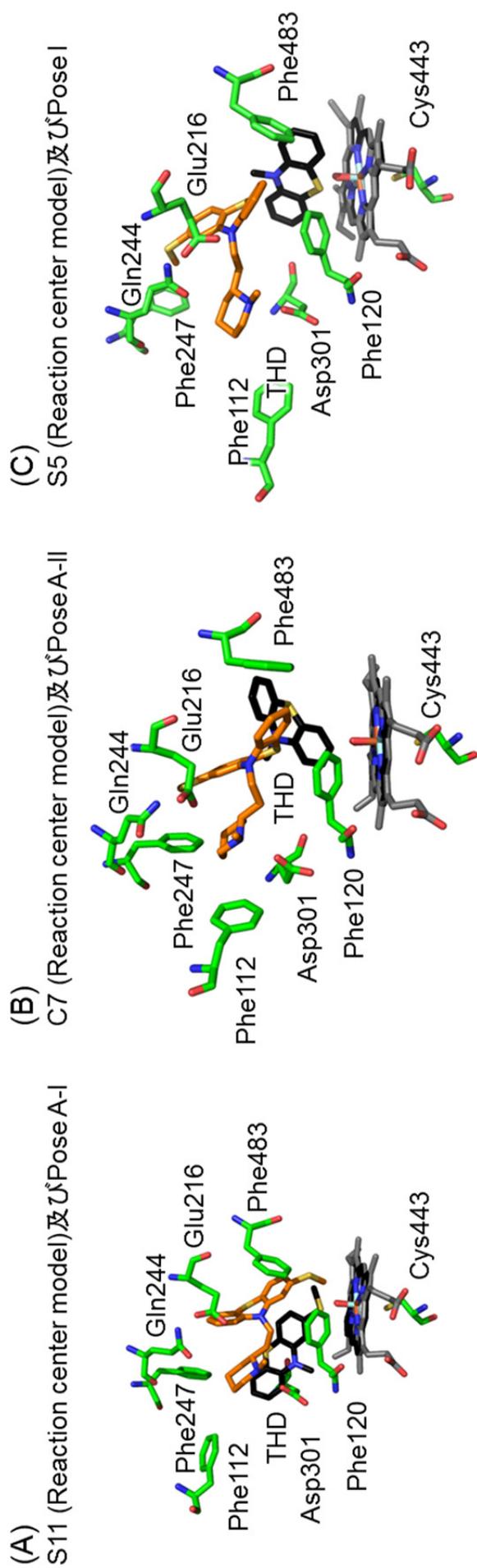


図 5.2 遷移状態構造 (黒, model) と平均構造 (橙, complex)における THD の結合ポーズの比較
 (A) S11 に対応, (B) C7 に対応, (C) S5 に対応

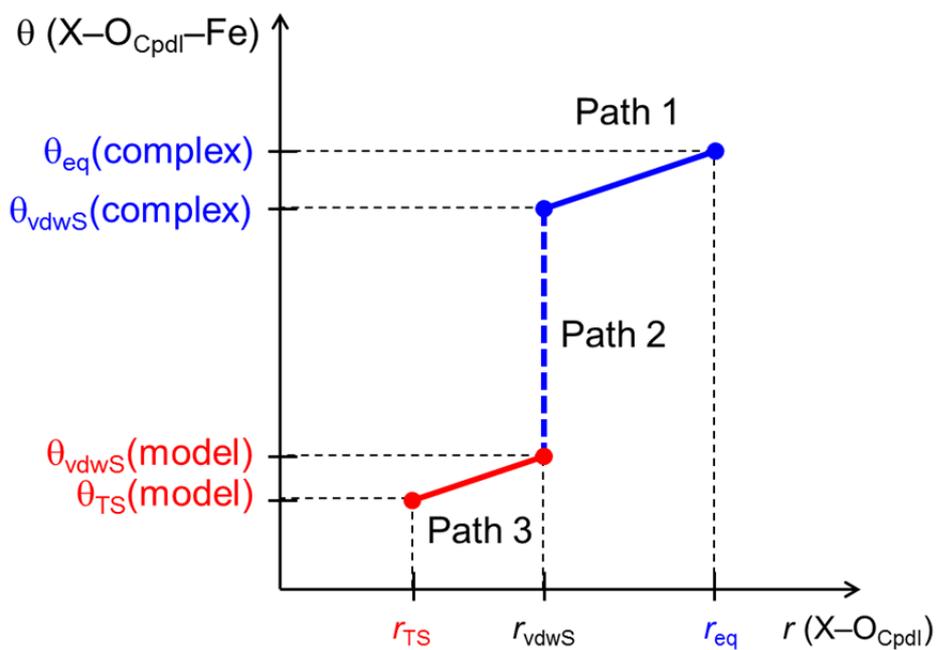


図 5.3 CYP2D6 中で THD が平衡状態から遷移状態に至るまでの 3 つの経路を表した概念図

Path 1 は r_{eq} から r_{vdws} まで近づく経路, Path 2 は $\theta_{vdws}(\text{complex})$ が $\theta_{vdws}(\text{model})$ の角度まで変化する経路, Path 3 は r_{vdws} から r_{TS} まで近づく経路を表す. 青色の実線及び破線は Amber, 赤色の実線は DFT を用いて計算した.

各 Pose における THD が Cpd I に近接していく際のエネルギー変化を図 5.4 に示した。図 5.4A 及び B は Amber を用いて、図 5.4C は DFT 計算を用いてエネルギーの変化を計算した。

Path 1 及び 2 において、S11 (Pose A-I) は他の Pose に比べて最もエネルギー変化が小さかった。さらに Path 3 においても、S11 のエネルギー変化は小さかった。このことは CYP2D6 において平衡状態から代謝物[2-SO]への酸化反応は最も容易に進むことを示している。

Path 3 の $\Delta E(\text{model})$ は E^{act} にほぼ対応するが、C7 が S5 に比べて 7 kcal/mol 以上高く、*in vitro* 代謝実験の結果と矛盾する。Path 2 のエネルギー障壁は実際には θ のみではなく、図 5.1 に示した ϕ の回転制限という steric restriction によっても影響を受けるため、Path 2 の $\Delta E(\text{complex})$ は図 5.4B に示したものよりも、高くなるものと推察される。Path 2 において C7 (Pose A-II) は $\theta_{\text{vdws}}(\text{complex})$ が $\theta_{\text{vdws}}(\text{model})$ まで (Path 2) 容易に変化でき、THD が Cpd I に対して至適なアプローチをすることができると考えられる。一方、S5 は全 pose で至適なアプローチ角から 40 degree 近く異なり、至適角度からは程遠く、エネルギー的に不利である (図 5.4B)。従って、S11 (Pose A-I) と C7 (Pose A-II) は productive な pose であり、他の Pose は non-productive な Pose であると判断した。

図 5.2 に示すように、いずれの Pose も Phe120 及び Phe483 に囲まれていた。CYP2C9、CYP2D6 や CYP3A4 では active site 内に phenylalanine cluster と呼ばれるケージが存在することが報告されており (引用文献: 5-1 ~ 5-3), THD においてもケージ内に捕らわれていることがわかる。Phe120 は Cpd I 近傍にあり、その位置から最も SOM に影響を与えそうな残基であり、実際、Phe120 の変異体では、キニジンの SOM に変化が生じることがわかっている (引用文献: 5-4 ~ 5-6)。また Phe483 は active site の入口に位置し、その変異体は基質の SOM を変化させることが明らかとなっており (引用文献: 5-7 ~ 5-9), THD の ϕ の立体障害による回転制限にもこれらの残基が関わっているものと考えられる。

微量な代謝物である[5-SO]は適切な結合ポーズを取ることが難しいと思われるが、頻度は低いながらも[5-SO]生成を可能性がある; (1) 今回の短い MD 計算では認められていないような大きな揺動により偶然にも適切な配置をとることができる場合、(2) 結晶構造とは違う新たな結合ポーズがある場合があると考えられるためである。Quartet spin state における遷移状態の $\theta(\text{S5-O}_{\text{CpdI}}\text{-Fe})_{\text{TS (quartet)}}$ は 158 degrees であり、他の model の θ と著しく異なった。 $E^{\text{act}}(\text{quartet})$ は $E^{\text{act}}(\text{doublet})$ よりも ~6~7 kcal/mol 高くなるが、quartet spin state の至適角度が大きいため、quartet spin state 介して S5 の反応が進むこと

が考えられる。

Oláh ら (引用文献: 5-10)は, CYP2D6 における dextromethorphan の aromatic oxidation の研究において, quantum and molecular mechanics (QM/MM)を用いた E^{act} が今回使用した reaction center model と同様の simplified model での E^{act} に比べて~18 kcal/mol 高いことを報告した。Oláh ら (引用文献: 5-10)は, この原因を CYP の中で, リガンドが O_{CpdI} に近づくための, 理想的なアプローチを妨害するという steric restriction で説明した。Oláh ら (引用文献: 5-10)の結果は THD と CYP2D6 複合体においても, 至適なアプローチができない場合は CYP 酸化反応への影響は非常に大きく, さらに reaction center model の E^{act} だけでは説明ができないことを示している。

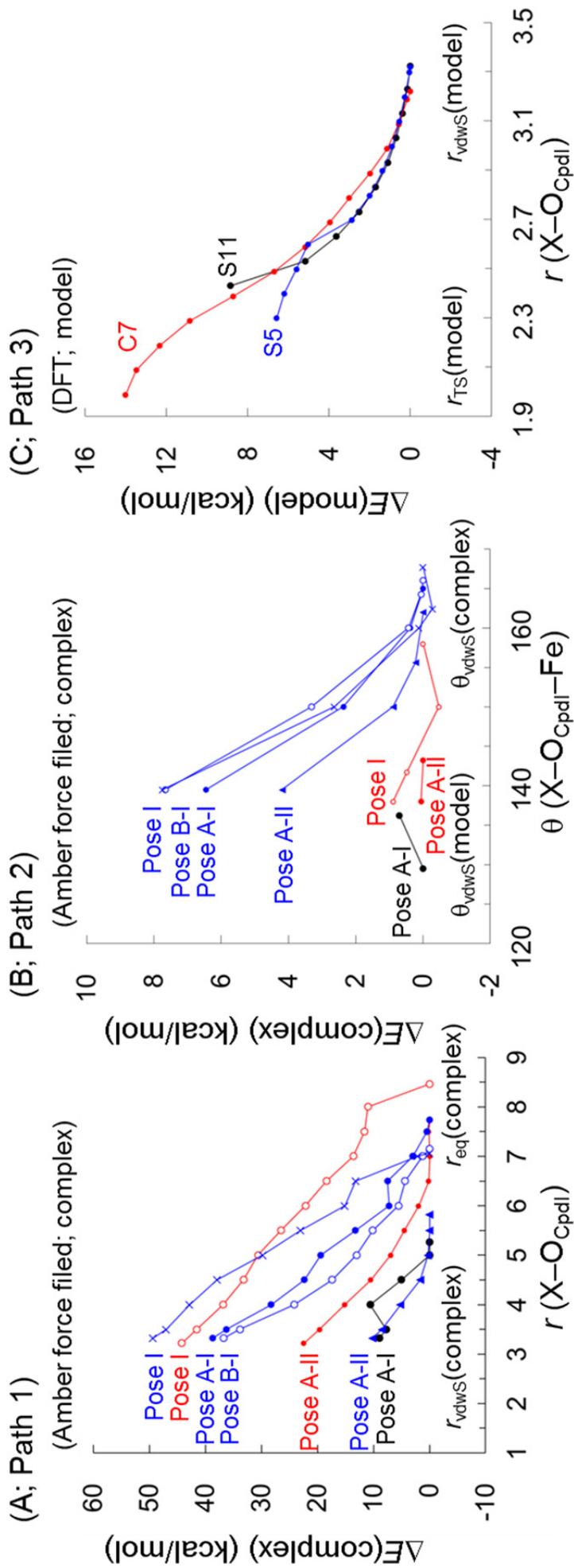


図 5.4 (A) THD と CYP2D6 複合体における $r(\text{X}-\text{O}_{\text{Cpdl}})$ が r_{eq} から r_{vdws} へ近づいた時の $\Delta E(\text{complex})$ (Amber 計算), (B) THD と CYP2D6 複合体における $\theta_{\text{vdws}}(\text{complex})$ が $\theta_{\text{vdws}}(\text{model})$ へ変化した時の $\Delta E(\text{complex})$ (Amber 計算), (C) reaction center model における $r(\text{X}-\text{O}_{\text{Cpdl}})$ が r_{vdws} から r_{TS} へ近づいた時の $\Delta E(\text{model})$ の変化 (DFT 計算, IEF-PCM/B3LYP/BS1, doublet spin state). ZPE 補正はしていない.

$\Delta E(\text{complex})$ (kcal/mol) は Amber を用い、 $r_{\text{vdws}}(\text{complex})$ または $\theta_{\text{vdws}}(\text{complex})$ の Energy を 0 として計算した. $\Delta E(\text{model})$ (kcal/mol) は DFT を用い、 $r_{\text{vdws}}(\text{model})$ を 0 として計算した.

5.3 THD と相互作用する CYP2D6 の重要な残基の考察

酸性アミノ酸残基である Glu216 及び Asp301 は active site 内にあり、基質認識に重要といわれている (引用文献: 5-9, 5-11 ~ 5-15). Glu216 または Asp301 に変異をいれると、代謝活性が変化することが知られており、Glu216 変異体では、CYP2D6 の基質ではないテストステロンや抗不整脈薬のキニジンの SOM に変化が生じる (引用文献: 5-12, 5-13). さらに Glu216 及び Asp301 の両変異体では、酸性化合物である非ステロイド性抗炎症薬のジクロフェナクができるようになる (引用文献: 5-13). 従って、Glu216 及び Asp301 は塩基性化合物のアミン等と水素結合を形成し、その代謝に関わっていると考えられている. 本研究においても MD 計算 (MD-1)において得られたすべてで Asp301 との水素結合が認められた. さらに Asp301 と Glu216 の結合エネルギー ($\Delta E_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{electrostatic}} + \Delta E_{\text{van der Waals}}$)への寄与は、他の残基に比べ非常に高かった. 従って、THD との結合において酸性アミノ酸残基 Asp301 及び Glu216 が重要であることがわかった.

Phe120 及び Phe483 は active site 内にあり、基質認識に重要といわれている. THD においても Phenylalanine cluster 内に存在している. Phe120 は Cpd I 近傍にあり、その位置から最も SOM に影響を与えそうな残基であり、実際、Phe120 の変異体では、キニジンの SOM に変化が生じることがわかっている (引用文献: 5-4 ~ 5-6). また Phe483 は active site の入口に位置し、その変異体は基質の SOM を変化させることが明らかとなっている (引用文献: 5-7 ~ 5-9).

5.4 *In vitro* 代謝試験で *N*-desmethyl 体がほとんど検出されない

ことの考察

In vitro 代謝試験では、生成量を計算できない程の微量ではあるが、C21 位の [*N*-desMe]が認められた. [*N*-desMe]は Wójcikowski らもわずかに存在することを報告している (引用文献: 5-16). 一般的に、CYP2D6 の基質は塩基性窒素から 5-7Å の範囲に SOM 存在することが報告されている (引用文献: 5-17). 本研究において、THD の N16 位が Asp301 と水素結合する. おそらくこの水素結合の為に、ピペリジン環を Cpd I に近づけるような適切な結合 pose を取れないためではないかと思われる. 脱メチル化反応を図 5.5 のモデル系 (IEF-PCM/B3LYP/BS2)で検証したところ (図 5.5), 水素移動 (Step 1) の活性化エネルギー (E_a)はほとんどなく、CYP2D6 による酸化 (Step 2)の

E_a は 6.4 kcal/mol であり，両 step 共に S5, S11 及び C7 位の水酸化の E_a に比較して低い．図 5.6 に脱メチル化モデルにおける TS 構造を示した．非酵素的脱メチル化 (Step 3) (引用文献: 5-18) は $E_a = 31.4$ kcal/mol と反応律速段階であり，図 5.7 に示した S5, S11 及び C7 位の水酸化反応に比べ高く，脱メチル体の生成はしにくいと考えられる．

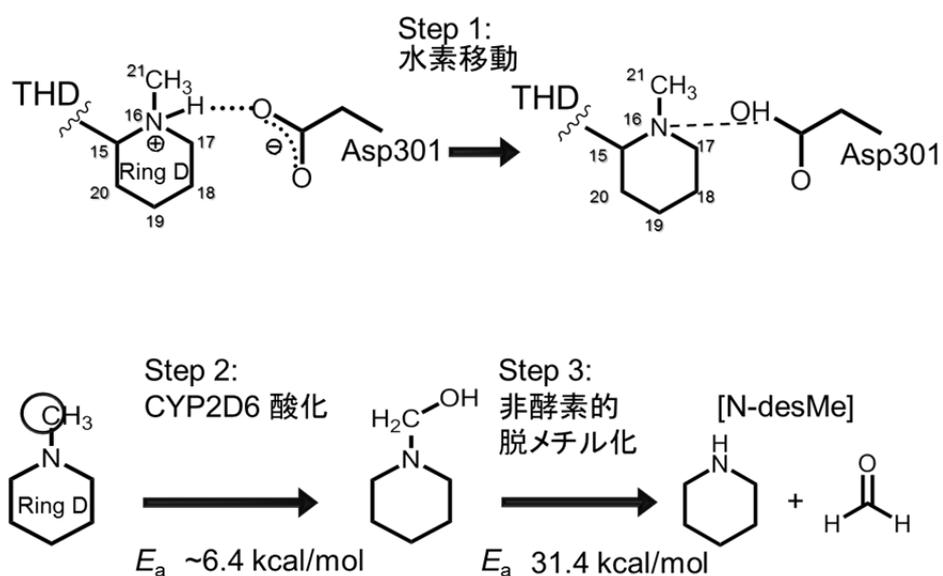


図 5.5 THD の脱 *N*-methyl 化反応 (IEF-PCM (CHCl₃)/B3LYP/BS2)

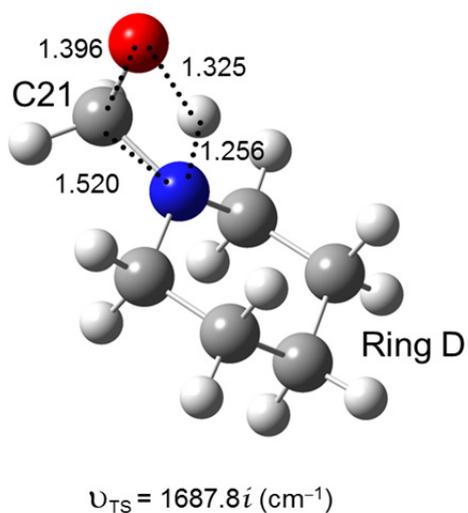


図 5.6 脱 *N*-methyl 化反応の TS 構造の配座と虚の振動数 (IEF-PCM (CHCl₃)/B3LYP/BS2, doublet)
結合長は angstrom で表す.

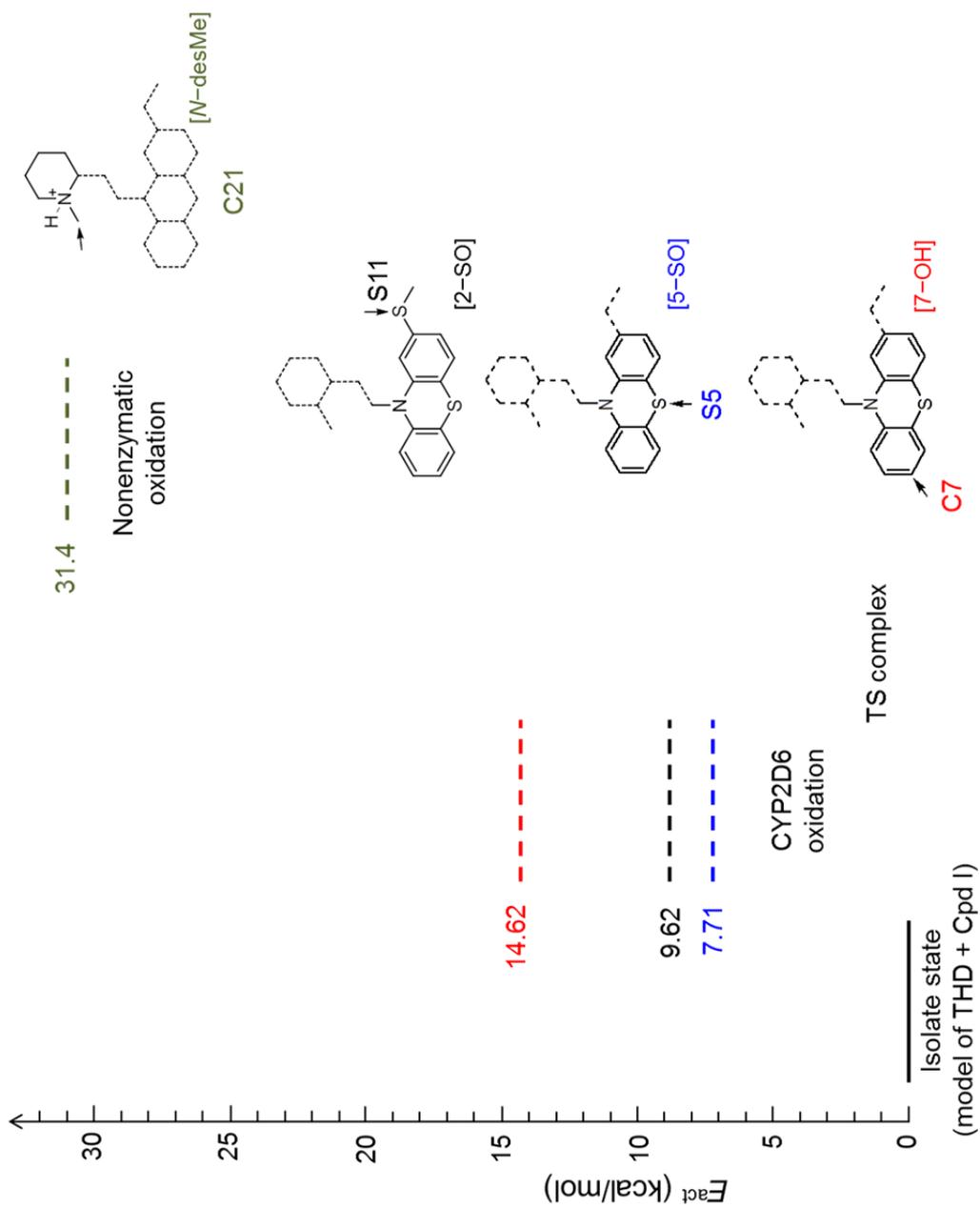


図 5.7 Reaction center model での TS 構造のエネルギーレベル (IEF-PCM (CHCl₃)/B3LYP/BS2, doublet)

5.5 小括

今回の結果は酸化される原子が O_{CpdI} へアプローチする際の至適な角度があることだけでなく、CYP 酸化反応を容易にするために近接する必要があることを示唆した。Cpd I に対して THD の適切な配置 (相対的に短い $\langle r(\text{X}-O_{\text{CpdI}}) \rangle$ と $\theta(\text{X}-O_{\text{CpdI}}-\text{Fe})_{\text{TS}}$ に近い $\langle \theta(\text{X}-O_{\text{CpdI}}-\text{Fe}) \rangle$) を取れば、優先的にそれぞれの E_a に対して代謝物が生成すると思われる。

引用文献

- [5-1] Williams, P. A., Cosme, J., Vinković, D. M., Ward, A., Angove, H. C., Day, P. J., Jhoti, H. (2004). Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science*, 305(5684), 683-686.
- [5-2] Mosher, C. M., Hummel, M. A., Tracy, T. S., Rettie, A. E. (2008). Functional Analysis of Phenylalanine Residues in the Active Site of Cytochrome P450 2C9†. *Biochemistry*, 47(45), 11725-11734.
- [5-3] Bonn, B., Masimirembwa, C. M., Castagnoli, N. (2010). Exploration of catalytic properties of CYP2D6 and CYP3A4 through metabolic studies of levorphanol and levallorphan. *Drug. Metab. Dispos.*, 38(1), 187-199.
- [5-4] Flanagan, J., MARECHAL, J., Ward, R., Kemp, C., McLAUGHLIN, L., Sutcliffe, M., Wolf, C. (2004). Phe120 contributes to the regiospecificity of cytochrome P450 2D6: mutation leads to the formation of a novel dextromethorphan metabolite. *Biochem. J*, 380, 353-360.
- [5-5] Masuda, K., Tamagake, K., Okuda, Y., Torigoe, F., Tsuzuki, D., Isobe, T., Narimatsu, S. (2005). Change in enantioselectivity in bufuralol 1'' - hydroxylation by the substitution of phenylalanine - 120 by alanine in cytochrome P450 2D6. *Chirality*, 17(1), 37-43.
- [5-6] Bonifacio, A., Keizers, P. H., Commandeur, J. N., Vermeulen, N. P., Robert, B., Gooijer, C., van der Zwan, G. (2006). Binding of bufuralol, dextromethorphan, and 3, 4-methylenedioxymethylamphetamine to wild-type and F120A mutant cytochrome P450 2D6 studied by resonance Raman spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 343(3), 772-779.
- [5-7] Chowdry, J., Pucci, M. R., Harlow, J., Tucker, G. T., Ellis, S. W. (2002, April). Evidence that both phenylalanine 481 and phenylalanine 483 are substrate-contact residues in the active site of cytochrome P450 2D6. In *BR. J. Clin. Pharmacol.*, 53, 443-444.
- [5-8] SMITH, G., MODI, S., PILLAI, I., Lian, L., Sutcliffe, M., Pritchard, M., ... Wolf, C. (1998). Determinants of the substrate specificity of human cytochrome P-450 CYP2D6: design and construction of a mutant with testosterone hydroxylase activity. *Biochem. J*, 331, 783-792.
- [5-9] Lussenburg, B. M., Keizers, P. H., de Graaf, C., Hidestrand, M., Ingelman-Sundberg, M., Vermeulen, N. P., Commandeur, J. N. (2005). The role of phenylalanine 483 in cytochrome P450 2D6 is strongly substrate dependent. *Biochem. Pharmacol.*, 70(8), 1253-1261.

- [5-10] Oláh, J., Mulholland, A. J., Harvey, J. N. (2011). Understanding the determinants of selectivity in drug metabolism through modeling of dextromethorphan oxidation by cytochrome P450. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108(15), 6050-6055.
- [5-11] Wang, A., Savas, U., Hsu, M. H., Stout, C. D., Johnson, E. F. (2012). Crystal structure of human cytochrome P450 2D6 with prinomastat bound. *J. Biol. Chem.*, 287(14), 10834-10843.
- [5-12] McLaughlin, L. A., Paine, M. J., Kemp, C. A., Maréchal, J. D., Flanagan, J. U., Ward, C. J., Wolf, C. R. (2005). Why is quinidine an inhibitor of cytochrome P450 2D6? The role of key active-site residues in quinidine binding. *J. Biol. Chem.*, 280(46), 38617-38624.
- [5-13] Paine, M. J., McLaughlin, L. A., Flanagan, J. U., Kemp, C. A., Sutcliffe, M. J., Roberts, G. C., Wolf, C. R. (2003). Residues glutamate 216 and aspartate 301 are key determinants of substrate specificity and product regioselectivity in cytochrome P450 2D6. *J. Biol. Chem.*, 278(6), 4021-4027.
- [5-14] Kotsuma, M., Hanzawa, H., Iwata, Y., Takahashi, K., Tokui, T. (2008). Novel binding mode of the acidic CYP2D6 substrates pactimibe and its metabolite R-125528. *Drug. Metab. Dispos.*, 36(9), 1938-1943.
- [5-15] Livezey, M., Nagy, L. D., Diffenderfer, L. E., Arthur, E. J., Hsi, D. J., Holton, J. M., Furge, L. L. (2012). Molecular analysis and modeling of inactivation of human CYP2D6 by four mechanism based inactivators. *Drug metabolism letters*, 6(1), 7.
- [5-16] Wójcikowski, J., Maurel, P., & Daniel, W. A. (2006). Characterization of human cytochrome p450 enzymes involved in the metabolism of the piperidine-type phenothiazine neuroleptic thioridazine. *Drug. Metab. Dispos.*, 34(3), 471-476.
- [5-17] Lewis, D. F. (2000). On the recognition of mammalian microsomal cytochrome P450 substrates and their characteristics: towards the prediction of human p450 substrate specificity and metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 60(3), 293-306.
- [5-18] Li, C., Wu, W., Cho, K. B., Shaik, S. (2009). Oxidation of Tertiary Amines by Cytochrome P450—Kinetic Isotope Effect as a Spin - State Reactivity Probe. *Chemistry*, 15(34), 8492-8503.

第6章 総合討論

薬物はほとんどの場合、未変化体の薬効により有効性を発揮する。その為、化合物の構造展開にあたっては、薬効や毒性を考慮することは当然であるが、代謝を受けにくいものを創成する。具体的には、cytochrome P450 (CYP)が薬物代謝酵素で最も重要であることから、CYPの基質とならないような構造展開を実施する。

我々は cytochrome P450 aromatase によって生成したステロイドホルモンの一種であるエストロゲンが脳内で新生期の神経回路網形成に重要な役割を果たしていることを明らかにしている (引用文献: 6-1)。また、我々は新規抗結核薬であるデラマニドの代謝には様々な CYP が関わり、特に CYP3A4 が重要であることも明らかにしている (引用文献: 6-2)。この様な例に代表されるように、CYP は生体内基質の酸化及び薬物の代謝という 2 つの重要な役割から、生体の成長、恒常性維持及び防御を担っている。

薬物代謝に関わる CYP 分子種は総じて、基質特異性が緩く、化合物の構造だけでは代謝を受けるか否か判断することはできないため、結局のところ、一つ一つ実験で明らかにするしかないのが実情である。その実験の手間及びコストは膨大であり、簡便な判断法の開発が望まれている。その 1 つの手段として、“*in silico*”が挙げられる。昔から、*in silico* 用いた CYP の研究は盛んに行われているが、基質特異性の低さなどが原因で、基質になるか否かの予測はもとより、その代謝メカニズムもはっきりとわかっていないことが多い。

本研究では、抗精神病薬のチオリダジン (THD)の薬効や毒性発現が CYP2D6に積極的に代謝されることにあること着目し、CYP2D6による THD の代謝メカニズムを明らかにすることを目的とした。

THD と CYP2D6 の共結晶構造は複数得られており、これらの結合ポーズで O_{CpdI} (Cpd I の鉄原子に結合した酸素原子)に最近接する THD の原子は S11, C7 及び S5 であり、これらは *in vitro* で認められる代謝物 (それぞれ [2-SO], [C7-OH]及び[5-SO])に対応するものであった。(図 6.1) まず本研究では *in vitro* 代謝試験より、CYP2D6 で代謝物の生成は[2-SO] > [C7-OH] >> [5-SO]の順となることを明らかにした。

次に共結晶構造から MD 計算を用い、その構造から CYP2D6 と THD の結合において、 $\theta(X-O_{CpdI}-Fe)$ ($X = S11, C7$ 及び $S5$)が 2 つのグループに分けられることを明らかにした。続いて THD の部分構造と Cpd I を用いた DFT 計算から、sulfoxidation (S11 及び S5)及び aromatic oxidation (C7)の遷移状態構造を構築したが、その $\theta(X-O_{CpdI}-Fe)$ は異なる反応系に関わらず同じであ

った. このことから至適なアプローチ角があることがわかった.

THD が代謝を受けるには平均構造の各 Pose から, 遷移状態まで近接することが必要になる. この経路を r_{eq} から r_{vdws} まで近づく経路, $\theta_{vdws}(\text{complex})$ が $\theta_{vdws}(\text{model})$ の角度まで変化する経路, r_{vdws} から r_{TS} まで近づく経路の 3 つに分割し, 評価した. S11 に対応する Pose では, すべての経路でエネルギー的に有利であり, [2-SO] への酸化反応が容易に行くことを示した. 活性化エネルギーは C7 > S5 となり実験結果と矛盾している. C7 に対応する Pose は平均構造と遷移状態との $\theta(X-O_{CpdI}-Fe)$ が近いが, C5 では大きく異なることから, おそらくエネルギー障壁は $\theta(X-O_{CpdI}-Fe)$ や ϕ の回転制限という steric restriction によって影響を受けることが原因で代謝物の生成は [C7-OH] \gg [5-SO] となると考えられた.

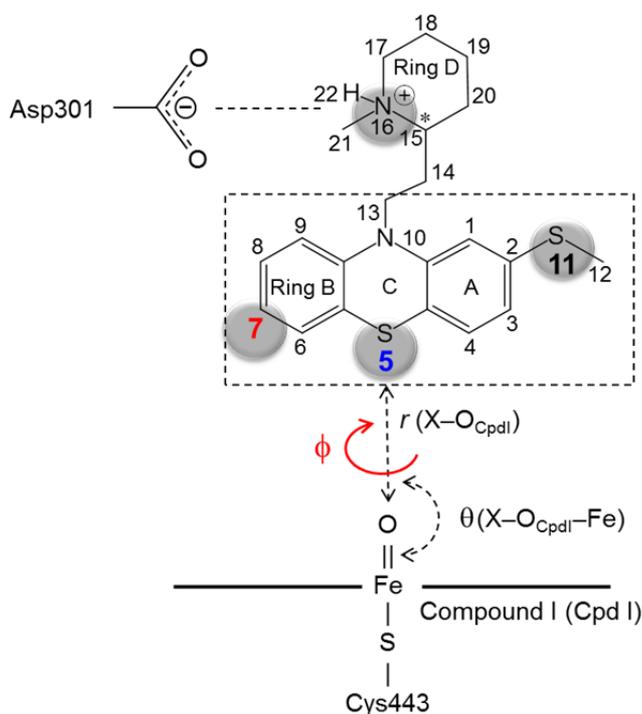


図 6.1 THD 及び Compound I

* は不斉炭素を表す.

本研究で得られた結果は酸化される原子が O_{CpdI} へアプローチする際の至適な角度があること, さらに CYP 酸化反応を容易にするために近接する必要があることを示唆した. Cpd I に対して THD の適切な配置 (相対的に短い $\langle r(X-O_{CpdI}) \rangle$ と $\theta(X-O_{CpdI}-Fe)_{TS}$ に近い $\langle \theta(X-O_{CpdI}-Fe) \rangle$) がなされれば, 優先的にそれに対応する代謝物が行われると思われる.

共結晶構造を基に, MD と DFT 計算を用いることによって, CYP2D6 に

における THD の代謝メカニズムを明らかにし、共結晶構造と代謝反応を互いに結び付けた。

THD の主要代謝物は methylthio 側鎖の酸化代謝物である [2-SO] であり、この [2-SO] は THD よりも dopamine D₂ アンタゴニスト作用が強く、[2-SO] の生成は drug-drug interaction や QT 延長のような副作用を引き起こすことがわかっている。この様に、THD は代謝的及び薬理的に methylthio 側鎖が重要であることが明らかとなっている。本研究はこれらの methylthio 側鎖の特性をより理解しやすいものにした。

これまでのケモインフォマティクス等で距離を用いた従来の予測方法から、大まかな SOM を推測できることが報告されている (引用文献: 6-3)。しかしながら、精密な予測、例えば隣接する原子のどちらが代謝のターゲットとなるのかを定量的に予測することは難しい。今回の研究では、共結晶構造、*in vitro* 代謝試験や変異体を用いた適切な実験結果がある場合、代謝メカニズムを明らかにすることを可能にした。これらの方法を用いれば近接する SOM の識別が可能になるであろう。

患者のためになる薬を上市するには、薬効があることはもちろんであるが、副作用や薬物動態など様々なパラメータの最適化も重要である。CYP 代謝においても、最適化が必要となる。図 6.2 に探索研究段階における代謝改善の流れを示す。*In vitro* 代謝試験は十分に研究がなされ、*in vivo* を反映した実験系ができてはいるが、その実験の手間及びコストは膨大である (図 6.2)。さらに、*in vitro* から得たデータを用いて、問題となる部分構造を明らかにできること (図 6.2) は稀で、多くは原因がはっきりしない。現状 *in vitro* 代謝試験の結果は新しい合成展開に使われるというよりは、薬効や副作用面で有望な化合物について、代謝が悪くないか確認する為に使われる程度で、大量のデータを活かしていない (図 6.2)。

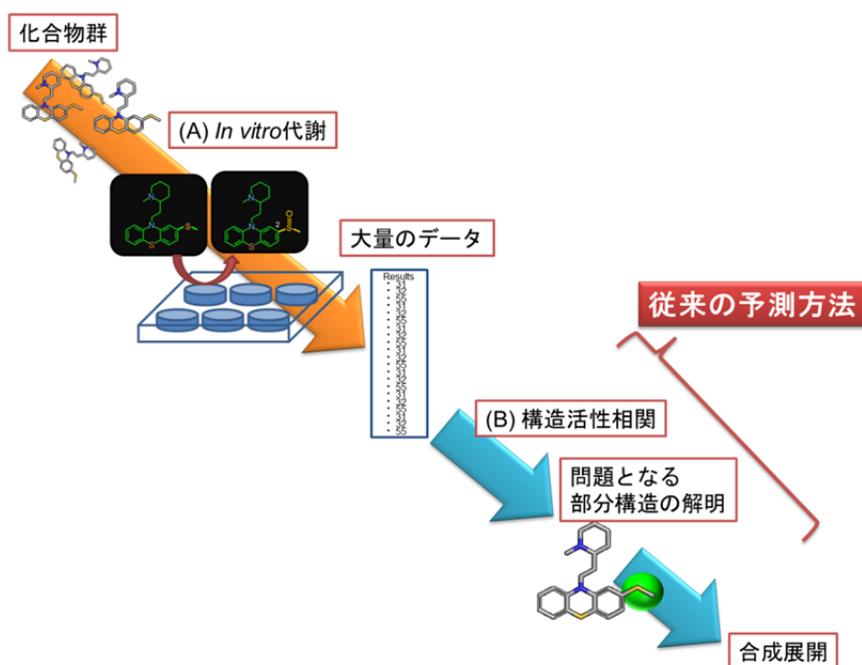


図 6.2 探索研究段階における代謝改善の流れ

この様に、労力の割にその結果を合成展開に活かせていない現状がある。

図 6.3 に本研究を受けた新しい代謝改善方法を示す。様々な実験データを用い、 O_{CpdI} で代謝を受けるまでの過程を(1) 結合過程と(2) 反応過程に分け、それぞれ分子動力学法及び密度汎関数法を用いて詳細に明らかにすることで、問題となる部分構造を明らかにでき、効率的な合成展開が期待できる。

さらに、代謝メカニズムの解明は、薬物間相互作用、遺伝子多型、薬効及び毒性発現の最適化につなげることができる可能性がある。今回の研究では複数の共結晶構造を用い、信頼できる初期構造として使用した。しかしながら、複数の共結晶構造が報告されている例は少ないため、当研究室では単一の共結晶構造からドッキングソフトである GOLD を用いて初期構造を構築し、代謝メカニズムの研究を行っている。信頼できる初期構造が構築できることが期待される。

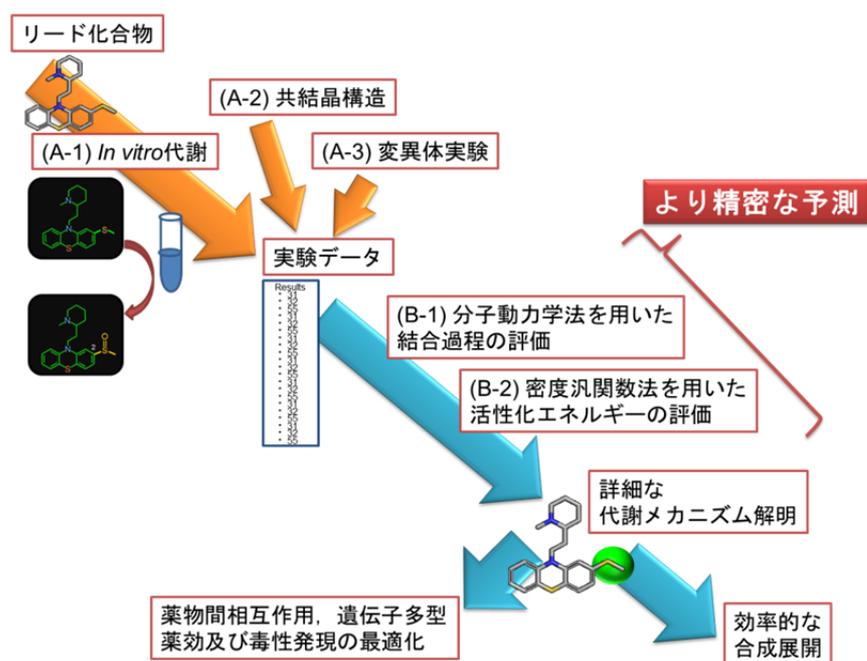


図 6.3 新しい代謝改善方法

薬物代謝に関わる CYP は膜タンパクであり，結晶構造を得ることは難しかったが，2000 年頃から結晶構造が報告されるようになってきた．さらに，急速なコンピューターの発達により，大きな分子でも量子化学計算が適用できるようになりつつあり，酵素反応を高精度に予測することができるようになってきている．現状では低コストな計算手法である Hartree-Fock 法を用いても化学反応のエネルギーを 99%以上の精度という高い精度で求めることができる (引用文献: 6-4 ~ 6-6)．しかしながら，化学反応を定量的に記述するには 99%でも十分とは言えない．

技術の進歩，特にコンピューターの進歩は著しく，今後も進んでいくものと考えられる．それにより，最高精度の計算手法である完全電子相関法 (Full CI 法)に近く，酵素反応を定量的に議論するのに十分な化学的精度を持った，量子化学計算が気軽にできるようになるものと思われる．

コンピューターで気軽に高精度の酵素反応を再現することができるようになれば，問題となる化合物の部分構造がはっきりと理解することができることとなる．そうすれば，合成展開の速度が飛躍的にアップし，より早く，より良い薬を患者さんに届けることができるようになると思われる．

引用文献

- [6-1] Sasahara, K., Shikimi, H., Haraguchi, S., Sakamoto, H., Honda, S. I., Harada, N., Tsutsui, K. (2007). Mode of action and functional significance of estrogen-inducing dendritic growth, spinogenesis, and synaptogenesis in the developing Purkinje cell. *J. Neurosci.*, 27(28), 7408-7417.
- [6-2] Sasahara, K., Shimokawa, Y., Hirao, Y., Koyama, N., Kitano, K., Shibata, M., Umehara, K. (2015). Pharmacokinetics and metabolism of delamanid, a novel anti-tuberculosis drug, in animals and humans: importance of albumin metabolism in vivo. *Drug. Metab. Dispos.*, 43(8), 1267-1276.
- [6-3] Lewis, D. F. (2000). On the recognition of mammalian microsomal cytochrome P450 substrates and their characteristics: towards the prediction of human p450 substrate specificity and metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 60(3), 293-306.
- [6-4] Yoshida, T., Mashima, A., Sasahara, K., Chuman, H. (2014). A simple and efficient dispersion correction to the Hartree-Fock theory. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24(4), 1037-1042.
- [6-5] Yoshida T, Hayashi T, Mashima A, Chuman H. (2015). A simple and efficient dispersion correction to the Hartree-Fock theory (2): Incorporation of a geometrical correction for the basis set superposition error. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 25(19):4179-4184.
- [6-6] Yoshida T, Hayashi T, Mashima A, Sasahara, K., Chuman H. (2016). A simple and efficient dispersion correction to the Hartree-Fock theory (3): A comprehensive performance comparison of HF-Dtq with MP2 and DFT-Ds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 26(2):589-593.

謝 辞

終わりに臨み、本研究の機会を賜り、終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました、徳島大学大学院 医歯薬学研究部 創薬理論化学分野 恩師 中馬 寛 教授に心より感謝の意を表するとともに、厚く御礼申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、良き理解者として長きにわたる御指導と御協力ならびに有益な御助言を頂きました、徳島大学大学院 医歯薬学研究部 創薬理論化学分野 吉田 達貞 助教に深く感謝致します。

本研究の機会を賜りました大塚製薬株式会社 徳島研究所 薬物動態研究部 梅原 健 部長、また、本研究を遂行するにあたり、御指導と御助言を賜りました、同研究部 笹辺 裕行 主任研究員、金光 佳代子 リーダー、柴田 昌和 研究員、診断事業部 開発部 下川 義彦 課長、藤井記念研究所 大谷 直明 研究員に深く感謝致します。

長きに渡りお世話になりました徳島大学薬学部 創薬理論化学分野 研究室の在学生及び卒業生の皆様、ならびに大塚製薬株式会社 徳島研究所及び藤井記念研究所の皆様に感謝致します。

学士・修士課程在学時に、研究というものの面白さと厳しさ、研究に向かう姿勢や基礎を教えて下さいました広島大学大学院 筒井 和義 教授 (現・早稲田大学 教授)ならびに浮穴 和義 助手 (現・広島大学大学院 准教授)にも、心から感謝致します。

最後に私事ではありますが、どのような状況においても応援し、陰ながら支えてくれた妻と頑張る元気を与えてくれた子供たちに感謝します。家族の支えなくしてはここまでくることはできませんでした。ここまで育ててくれた両親にも深く感謝致します。本当にありがとう。

2016年1月
笹原 克則