

審査結果の要旨

氏 名 渡辺 悦郎

医薬品の主要な代謝・排泄器官である肝臓・腎臓には多数のトランスポーターが発現している。肝臓に発現する organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1/*SLCO1B1* および OATP1B3/*SLCO1B3*、腎臓に発現する organic anion transporter (OAT) 3/*SLC22A8* は血液中から組織内への取り込みに特に重要な役割を果たしている。OATP1B1、OATP1B3、OAT3 は基質選択性が重複しており、これらトランスポーターにより、肝腎両組織へ分布する薬物の特性を説明することができる。また、肝胆系輸送はアニオン性薬物の肝排泄メカニズムとして重要な経路であり、OATP1B1 や OATP1B3 により肝細胞内へ取り込まれたアニオン性薬物は、胆管側膜に発現するトランスポーターMRP2 により胆汁排泄を受ける。このように、生体内では異なるファミリーに属するにも関わらず基質選択性が類似したトランスポーターが連携することで、効率的な異物排泄システムを形成している。トランスポーターの基質選択性・輸送活性は医薬品の体内動態に深く関わっていることから、その輸送活性を制御することで、医薬品の標的組織選択的な送達、あるいは排泄経路の制御など医薬品体内動態の最適化につながる。しかし、膜タンパクであるトランスポーターの立体構造は明らかにされていないため、現状では構造に基づいたドラッグデザインは困難である。一方で、多様な構造的特徴を有する化合物を多数基質とするトランスポーターに関する基質の情報は複数得られている。

以上の背景において、申請者は、ligand-based drug design の手法であるファーマコフォア解析、三次元定量的構造活性相関 Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) 解析を用いて、薬物トランスポーターの基質認識を合理的に説明できるモデルの構築と、医薬品の体内動態最適化法として薬物トランスポーターの *in silico* スクリーニング法の開発を目的として本研究を遂行した。以下に詳細を示す。

【本論】

1. 活性値として K_m 値を用いた解析

申請者は、トランスポーターの基質認識部位周辺の環境の手掛かりを得るため、基質のトランスポーターに対する親和性に関連したパラメータであるミカエリス定数 (K_m 値) を活性値として用いた。 K_m 値は HEK293 細胞発現系を用いた輸送実験もしくは文献値により求め、OATP1B1、OATP1B3、OAT3 それぞれで 13、16、15 個の化合物をモデル構築のための学習セット化合物とした。分子配座解析プログラム CAMDAS により生成した各基質のエネルギー極小配座集団を、6 種類の物理化学的特性球(水素結合受容、水素結合供与、水素結合受容/供与、疎水性、芳香環、ハロゲン) の三次元的な配置として表し、分子重ね合わせプログラム SUPERPOSE により各基質の配座集団同士を重ね合わせた。高活性の

3 化合物の配座集団の総当たりの重ね合わせにより、重なりのある良好な配座集団を選び出した。選ばれた最高活性の化合物の配座集団をさらに他の化合物の配座集団と次々と重ね合わせ、配座の選び出しを繰り返し、配座の組み合わせを 20~40 パターン程度に絞った。それら全てのパターンについて、三次元定量的構造活性相関の一手法である CoMFA を行った。活性予測式の良否は cross-validated r^2 (q^2) 値により判断した。OATP1B1、OATP1B3、OAT3 基質の CoMFA の結果、3 つのトランスポーターのいずれについても高い q^2 値を示す結合配座ならびに活性予測式を得た。全基質の結合配座に共通して重なっていた物理化学的特性球の三次元配置を、そのトランスポーターの基質群のファーマコフォアとすると、OATP1B1、OATP1B3 基質のファーマコフォアは水素結合受容球 1 つ、疎水性球 3 つから構成され、互いに類似していた。一方、CoMFA 等高線図では、OATP1B1 基質と OATP1B3 基質のモデルは異なり、特異性を見出すことができた。一方、OAT3 のファーマコフォアモデルは水素結合受容球 1 つ、疎水性球 2 つから構成され、OATP と比較して疎水性球が 1 つ少ないという結果が得られた。OAT3 は OATP と比較して分子量が小さく極性の高い化合物を基質とする傾向があることを反映していると考えられている。申請者はさらに、 K_i 値を用いて CoMFA 活性予測式の検証を行ったところ、OATP1B1、OATP1B3 に関しては、実測値と予測値は比較的近い値が得られ、精度の高い活性予測式であることを示している。一方 OAT3 に関しては、2 個中 1 個の化合物で実測値と予測値が一致していた。OATP1B3、OAT3 については検証セット化合物数が少ないため、今後さらに化合物数を増やして検証することが必要である。

2. 活性値として V_{max}/K_m 値を用いた解析

申請者は、*in silico* スクリーニングへの応用のため、輸送活性 (V_{max}/K_m 値) を活性値とした解析を行った。 V_{max}/K_m 値はトランスポーター発現細胞を用いて実測し、OATP1B1、OATP1B3、OAT3 それぞれで 13、16、14 個の化合物を学習セット化合物とした。CoMFA の結果、 q^2 値は、いずれのトランスポーターにおいても有意だとされる 0.3 を超える値が得られた。ファーマコフォア解析の結果、OATP1B1、OATP1B3 基質のファーマコフォアはいずれも水素結合受容球 1 つ、疎水性球 3 つから構成され、また互いに類似していた。一方、OAT3 基質のファーマコフォアは水素結合受容球 1 つ、疎水性球 2 つから構成され、OATP のモデルと比較して疎水性球が 1 つ少なかった。ファーマコフォアモデルの結果は、活性値として K_m 値を用いた解析結果と同様である。一方、CoMFA 等高線図においては、OATP1B1 と OATP1B3 間で特異性は見られず、類似した結果が得られた。得られた CoMFA 活性予測式の検証を行ったところ、OATP1B1、OAT3 については実測値と予測値は比較的近い値が得られた。OATP1B3 についても 1 化合物を除いて妥当な結果が得られた。

CoMFA の結果をまとめると、肝排泄型、もしくは肝排泄が優位な化合物については OATP1B1、OATP1B3、OAT3 による予測値は妥当であった。腎排泄型の化合物で、OAT3 が取り込みに関与するものについては、OAT3 の輸送活性予測値は概ね妥当だが、OATP の

予測値は検証できていないため、肝腎振り分けの *in silico* 予測精度については今後の検討課題だと申請者は考えている。腎排泄型の化合物で、主に OAT1 が取り込みに関与する化合物の特性球の配置は、OATP1B1、OATP1B3、OAT3 基質のファーマコフォアとは重ならない。したがって、OAT1 が取り込みに関与する腎排泄型薬物は判別可能である。

MRP2 により胆汁排泄を受ける化合物は、OATP の学習セット化合物に 4 化合物含まれていた。また、MRP2 により胆汁排泄を受ける 7 化合物の特性球配置は OATP1B1、OATP1B3 のファーマコフォアと重なり、かつ OATP1B1、OATP1B3 による輸送活性予測値を得た。

以上本研究により、申請者は CAMDAS、SUPERPOSE、CoMFA を組み合わせた、トランスポーター基質の三次元定量的構造活性相関モデル、ファーマコフォアモデルを構築する手法を確立した。さらに、多様な構造を有する有機アニオン系化合物を基質として認識する 3 つのトランスポーターについて、一義的に収束する有意な CoMFA モデルを得ることに成功した。同定したファーマコフォアモデルにより、基質とはならない化合物を容易に識別することが可能になった。CoMFA モデルを用いることで、肝排泄型ならびに肝排泄優位型医薬品の判定が可能なこと、ファーマコフォアモデルにより、OAT1 が関与した腎排泄型医薬品を判定することができることを示した。MRP2 基質が OATP1B1/OATP1B3 基質のファーマコフォアを満たすことから、OATP と MRP2 が連携した *in vivo* 胆汁排泄を *in silico* で定量的に予測できることを示した。

本研究により、申請者はアニオン性薬物の組織分布の肝腎振り分け、胆汁排泄を定量的に予測可能な CoMFA モデルを構築することに成功した。以上の成果は、医薬品開発において候補化合物の体内動態最適化に貢献するものと考えており、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。