

# 創薬探索段階でのフラビン含有酸素添加酵素の薬物酸化反応への寄与評価と 基質認識予測に関する研究

谷口（瀧澤）友美

医薬品開発時、代謝反応に関与する酵素分子種の同定は重要である。米国食品医薬品局により承認された新医薬品を経年調査した結果によると、cytochrome P450 (P450) により代謝消失される医薬品の割合が依然最も多く、グルクロン酸抱合酵素やフラビン含有酸素添加酵素 (FMO) の寄与も一部報告されている。日米欧 3 極の薬物相互作用検討ガイドランスには、体内消失の 25% 以上を担う酵素を同定し、臨床薬物相互作用試験で受ける影響を確認する旨が明記されている。さらに同ガイドランスはいずれも実験系の適切な陽性対照の設定を推奨しているが、現時点にて明確な記載はない。したがって、化合物の代謝消失に関わる酵素分子の寄与を早期にかつ適切に明らかにすることは、医薬品開発の臨床試験計画を考える上でも重要である。創薬大規模代謝スクリーニングでは、最も医薬品代謝への関与報告が多い P450 に適した試験条件を選択せざるを得ない状況であることも考慮すべき課題である。

以上の背景から、本研究では酸化的薬物代謝への FMO 寄与を推定する適切な *in vitro* 代謝実験条件および構造由来物性値に基づく *in silico* FMO 基質該当予測法の提案を目的とした。さらに、3 極相互作用ガイドランスに未記載の FMO および P450 両酵素の代謝評価時に適した陽性対照化合物候補の検索を行った。提唱する *in silico* FMO 基質該当予測法を簡便かつ推奨 *in vitro* 評価系にて実証した成果と統合し、以下に詳述する。

## 1. 探索段階での FMO の寄与を考慮した薬物酸化的代謝反応条件

非ステロイド系抗炎症薬 benzydamine には、複数の酸化経路があり (図 1)、FMO および P450 双方の陽性対照プローブとなる可能性が考えられた。酵素源熱処理や選択的阻害剤の影響等複数の手法を用い、benzydamine *N*-酸化が FMO 酵素活性、および *N*-脱メチル化が P450 酵素活性のそれぞれ良好な指標となることを明らかにした。

製薬企業等のロボット分注機を用いる大量医薬候補化合物スクリーニングでは、微量分注精度等の問題から、薬物酸素添加反応に必須な補酵素 NADPH 添加にて酵素反応開始を行うことが通例である。しかし、補酵素 NADPH 非存在下では、37°Cでの 5-10 分間プレインキュベーション中に FMO 酵素活性が低下することを明らかにし、FMO 酵素源と NADPH を共存させた実験手順の策定が必要であることを示した。加えて創薬段階では、溶解度および不揮発性の観点から、膨大な被験物質溶液をジメチルスルフォキシド (DMSO) で調製し、長期保管して使用する。しかし、酵素反応系の含有 DMSO により FMO 酵素活性は著しく影響を受けた (図 2)。医薬品候補化合物の一般的スクリーニング条件では、薬物酸化反応への FMO の寄与を過小評価する可能性が示唆され、特に FMO 酵素の酸化的代謝関与を検討

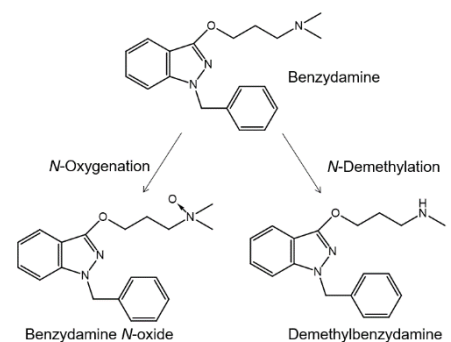


図 1 Benzydamine の代謝経路

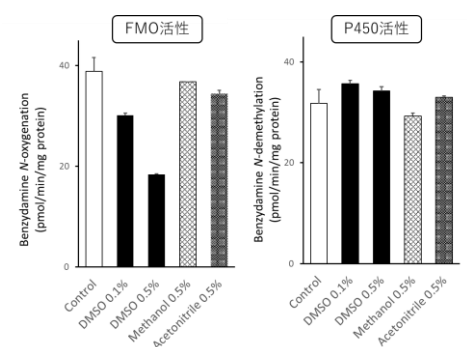


図 2 FMO および P450 が触媒する薬物酸化酵素活性におよぼす有機溶媒の影響

する場合、熱安定性、補酵素 NADPH および被験物質用溶媒を含めた一連の操作手順を考慮し、適切な *in vitro* 代謝実験の適応が推奨された。

## 2. 構造由来物性値に基づく FMO 基質該当予測と検証

FMO 酵素が代謝に関与あるいは一部寄与する化合物を文献調査し、基質構造情報より ACD/Labs (Advanced Chemistry Development, Toronto, ON, Canada)を用い、*N* 基の塩基性度 pKa (base) を計算した。FMO 酵素が代謝消失に寄与する化合物の代謝 *N* 基と非代謝 *N* 基の pKa (base) および非 FMO 基質の *N* 基 pKa (base) を比較したところ、主に FMO 酵素により代謝される化合物は pKa (base) 8.4 以上を示す *N* 基を構造に有していた (図 3)。この知見から、基質の化学構造から *in silico* 手法により算出する推定塩基性度 pKa (base) 8.4 を指標にすることで、酸化的代謝反応への FMO 寄与を推定する簡便な予測法を提案した。

上記 *in silico* FMO 寄与予測結果を実証し、pKa (base) 推定値の妥当性を検証した。検証 30 化合物のうち、入手可能かつヒト肝ミクロゾームを酵素源とした代謝消失反応時の未変化体減少率が実測可能であった 11 化合物および対照として P450 典型的基質 midazolam の pH 8.4 (FMO 至適条件) と一般的な pH 7.4 での代謝クリアランスを同一条件で算出した。*In silico* pKa (base) が 8.4 を超える化合物は、pH 8.4 条件下の代謝クリアランス値が pH 7.4 条件下に比較して高値を示し、クリアランス比 (pH8.4/pH7.4) と基質の pKa (base) 値は相関した (図 4)。

以上、FMO および P450 の酸化的代謝への寄与率を正確に推定できる実験条件を設定し、3 極相互作用検討ガイドランスが設置を推奨する標準的陽性対照薬として双方の代謝経路を持つ benzydamine が活用できることを示した。さらに、被験物質構造情報から市販ソフトウェアを用いた窒素含有基の *in silico* pKa (base) 値に基づく FMO 基質該当予測法を確立し、FMO 用至適緩衝液 (pH 8.4) を用いた代謝消失実験にて本予測の有用性を明らかにした。

### 本研究の誌上発表

1. [Taniguchi-Takizawa T, Shimizu M, Kume T, Yamazaki H.](#) Benzydamine *N*-oxygenation as an index for flavin-containing monooxygenase activity and benzydamine *N*-demethylation by cytochrome P450 enzymes in liver microsomes from rats, dogs, monkeys, and humans. *Drug Metab Pharmacokinet* 2015;30(1):64-9.
2. [Taniguchi-Takizawa T, Kato H, Shimizu M, Yamazaki H.](#) Predicted Contributions of Flavin-containing Monooxygenases to the *N*-oxygenation of Drug Candidates Based on their Estimated Base Dissociation Constants. *Curr Drug Metab* 2021;22(3):208-14.
3. [Taniguchi-Takizawa T, Kato N, Shimizu M, Kume T, Yamazaki H.](#) Different substrate elimination rates of model drugs pH-dependently mediated by flavin-containing monooxygenases and cytochromes P450 in human liver microsomes. *Drug Metab Pharmacokinet* 2021;40:100412.

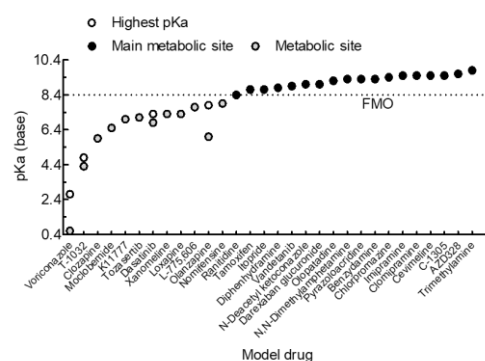


図 3 モデル化合物の *N* 基 pKa (base)

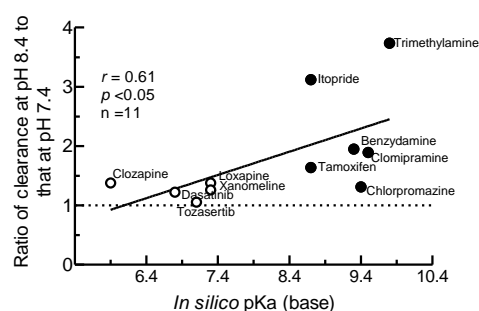


図 4 クリアランス比と pKa (base) の相関