

細木 淳(D1117003)氏 博士学位論文審査報告

平成 30 年 2 月 14 日

主査 今村 亨

副査 杉山 友康

副査 佐藤 淳

副査 正木 仁

副査 藤澤 章雄

I. 論文審査の要旨

学位論文題目

「ピペラジン環骨格を有する新規キナーゼ阻害剤のモノアミノキシダーゼ B 及びアルデヒドキシダーゼによる代謝」

論文の内容

医薬品の多くは体内にて代謝を受け、体外に排出されることから、医薬品候補化合物の代謝について解析することは、臨床での医薬品の薬物動態を予測し、適切な用法用量を設定する上で重要である。本研究は、白血病治療薬候補物質として開発されていたFLT3キナーゼ阻害を主な薬理作用とする新規キナーゼ阻害剤（以後、KW-2449と記述）が、生体外試験において高い有効性を示したにもかかわらず、臨床試験において十分な有効性を示せなかったこと背景にあるメカニズムを解明し、それにより、類似薬物の開発における問題の解決に資することを目的とした。

まず、KW-2449が臨床試験において短半減期を示した点について、そのメカニズムを検討した。はじめにKW-2449のピペラジン環部分がオキシピペラジン体 (M1) に変換され、速やかにKW-2449の血中濃度が低下することが判明した。肝細胞を用いたKW-2449の代謝物プロファイル解析では、ヒトにもっとも近いKW-2449の代謝を示す動物種はカニクイザルであり、ヒト、サルではM1が主代謝物であったのに対し、ラット、イヌではほとんどM1は産生されなかった。次いで、サル及びラットにKW-2449を投与したところ、サルではヒトと同様に短半減期を示し、*in vivo*でもM1が主代謝物として検出されたが、ラットではM1の産生は認められず、

長半減期を示した。サルにおけるKW-2449からM1への変換率は30%前後と高く、M1への代謝がKW-2449の短半減期、低曝露の原因と考えられた。KW-2449からM1への代謝には代表的な薬物代謝酵素であるシトクロームP450 (CYP) の関与は認められなかった。シアン化ナトリウムを用いた代謝中間体のトラップ法を用いて、M1への代謝中間体としてイミニウムイオンが存在していることを見だし、阻害剤、酵素発現系を用いた検討により、KW-2449がモノアミンオキシダーゼB (MAO-B) によってイミニウム中間体へと代謝され、さらに、このイミニウムイオン中間体がアルデヒドオキシダーゼ (AO) によりM1に代謝されることを本研究で初めて明らかにした。MAO-B、AO共に全身に発現している代謝酵素であることから、MAO-B及びAOが代謝に関与した場合にヒトの全身クリアランスを予測する方法について、比較検討を行い、肝細胞の代謝データをサルの *in vivo* データで補正することにより、従来法では大幅に過少評価していたクリアランスを2-4倍の実用的精度で予測可能であることを実証した。

次に、薬理活性を有するM1の血中濃度も反復投与により著しく低下し、M1によるキナーゼ阻害も不十分となることを見出し、その原因の解明を目指した。ヒトと類似した代謝物プロファイルを持つカニクイザルにKW-2449を反復投与したところ、サルでもヒトと同様にM1濃度が顕著に低下した。サルにおけるM1濃度は投与翌日には低下していたことから、M1濃度低下の原因として、M1産生酵素 (MAO-B及びAO) の阻害が推測された。KW-2449及びM1の代謝酵素阻害検討から、KW-2449及びM1がMAO-Bを競合阻害することを見出したが、その阻害定数 (K_i) は臨床におけるKW-2449及びM1濃度よりも十分低く、臨床においてMAO-B阻害が生じる可能性は低いと考えられる結果を得た。次いで、KW-2449のイミニウムイオン中間体の代謝酵素阻害能を検討し、イミニウムイオン中間体がAOを不可逆的に阻害することを見いだした。その阻害パラメータは臨床でCYPを不可逆的に阻害することが知られている他の阻害剤に匹敵する値であった。これらを総合し、反復投与によりM1濃度が低下した原因はイミニウムイオン中間体によるAOの不可逆阻害であると考えられた。ここでその原因を探る一貫として、サルに ^{14}C -KW-2449を経口投与したところ、放射能の血漿上清への回収率は時間依存的に低下し、 ^{14}C -KW-2449由来の放射能が血漿中タンパクに共有結合していることが強く示唆された。MAO-B阻害剤及びイミニウムイオン捕捉剤 (シアン化ナトリウム) を用いたタンパク結合実験から、イミニウムイオン中間体がタンパクとの共有結合を起こしていることを明らかとした。

以上2つの研究結果から、KW-2449が臨床試験において十分な薬効を示せなかった原因は、MAO-B及びA0による協奏的代謝にあると推定した。これはピペラジン環の代謝経路としては本研究で初めて明らかにした機構である。すなわち、KW-2449が速やかにM1に代謝されることでKW-2449濃度が低下し、KW-2449本体によるキナーゼ阻害が不十分となった。次いで、代謝中間体であるイミニウムイオンのA0不可逆阻害により、薬理作用を有するM1の濃度も反復投与で低下し、結果としてM1のキナーゼ阻害も低下したと考えられた。また、イミニウムイオン中間体によるA0の阻害はイミニウムイオン中間体のM1への変換率を低下させ、タンパクへの共有結合量を増加させた可能性もある。

本研究で対象としたピペラジン環のようなN-ヘテロ環構造は、開発中の他の多くの医薬品においても、化合物の溶解性の向上とCYPに対する代謝安定性向上を目的に導入されている構造である。従って、本研究で明らかにしたMAO-B及びA0によるピペラジン環の協奏的代謝は、今後N-ヘテロ環化合物の代謝経路を検討する上で有用な知見であると考えられる。このように、本研究において得られた知見は、医薬品の安全性確保と有効性確保の両方の観点から、今後の医薬品開発において活用しうるものと期待される。

予備審査会と結果（副査のうち1名は、佐藤 淳 教授に代わり山本 順寛 教授）

・予備審査会（口頭発表）は平成29年11月2日（木）に実施され、主査と副査全員により合格と判定された。

・学位論文（予備審査用）は期日通りに提出され、微修正の後、主査、副査全員により合格と判定された。

研究発表（ピアレビュー・国際誌）

1. Jun Hosogi, Rui Ohashi, Hiroshi Maeda, Satoshi, Tashiro, Eiichi Fuse, Yorihiro Yamamoto, Takashi Kuwabara. Monoamine oxidase B oxidizes a novel multikinase inhibitor KW-2449 to its iminium ion and aldehyde oxidase further converts it to the oxo-piperazine form in human. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 32(5), 255-264, 2017.
2. Jun Hosogi, Rui Ohashi, Hiroshi Maeda, Kazuhiro Fujita, Junko Ushiki, T Kuwabara, Yorihiro Yamamoto, Toru Imamura. An iminium ion metabolite hampers the production of the pharmacologically active metabolite of

a multikinase inhibitor KW-2449 in primates: Irreversible inhibition of aldehyde oxidase and covalent binding with endogenous proteins. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* (accepted for publication on February 6, 2018).

II. 学力試験と結果

学力試験は生物、化学、英語の計3科目について出題され、手書きによる解答を得た。その解答を主査及び副査が採点した結果、合格と判定された。(別添)

III. 最終試験（公開発表会）と成績

最終試験（公開発表会）は平成30年2月13日（火）に実施され、研究内容、発表の質ともに良好であり、主査、副査全員一致により、博士の学位授与に値する「合格」と判定された。

IV. 結論（学位授与の可否について）

博士号の学位を授与することを可とする。