

革新的な蛍光トラッピング剤CysGlu-Danによる 反応性代謝物評価の進化

大阪ラボラトリー 塩田 優子

1 はじめに

新規蛍光トラッピング剤 CysGlu-Dan¹⁾ は、ソフトおよびハードな反応性代謝物 (RM : Reactive Metabolite) を幅広く検出可能にする革新的な試薬です。当社はこれまでの実績と経験を生かして CysGlu-Dan を用いた RM スクリーニング評価系を構築・最適化しました。本稿では従来のトラッピング剤ダンシルグルタチオン (dGSH) との違いを解説するとともに、最新の評価事例を紹介します。

2 反応性代謝物と dGSH トラッピングアッセイ

1997 年に発売された糖尿病治療薬トログリタゾンは、市販後に重篤な薬物性肝障害 (DILI : Drug-Induced Liver Injury) を引き起こすことが明らかとなり、わずか 3 年で販売中止に至りました。後の研究から、トログリタゾンは投与後の体内の代謝過程で RM を生成し、RM と肝細胞タンパク質との共有結合や酸化ストレスの惹起などを通じて肝障害が発現したのではないかと考えられています。この事例は新薬の創薬段階での安全性評価、特に開発候補化合物が体内で代謝されて RM を生成するかどうかの確認が化合物のスクリーニングで極めて重要であることを示しています。しかし RM は反応性が高く不安定であることから、生成した RM そのものを直接検出することが困難なため、タンパク質との結合量を放射能で測定する「共有結合試験」や、

dGSH などのトラッピング剤で捕捉・検出する「トラッピングアッセイ」といった、間接的な評価法が用いられてきました。なかでも dGSH を用いたトラッピングアッセイは、グルタチオンが有するチオール基で RM を捕捉するシンプルで汎用性の高い方法として、創薬初期スクリーニングの標準的なツールとなっています。

3 新規トラッピング剤 CysGlu-Dan の可能性

dGSH は汎用的なトラッピング剤ですが、すべての RM を捕捉することはできません。グルタチオン分子内にあるチオール基は HSAB 則によるソフトな求核部位であるため、キノン構造などを有するソフトな RM は捕捉しやすい一方で、アルデヒドのようなハードな RM は捕捉しにくいという限界があります。そのため dGSH を用いたアッセイだけではハードな RM の生成を見逃し、DILI リスクを過小評価してしまう可能性があります。この課題に対し、2023 年に市販された CysGlu-Dan は、分子内にチオール基とアミノ基を併せ持つ蛍光標識トラッピング剤として設計されました。ソフトな RM はチオール基で、アルデヒドなどのハードな RM は安定な環状構造としてアミノ基とチオール基で捕捉できるため、ソフトとハード両方の RM を一挙に検出できる点が大きな特長です (図 1)。そのため CysGlu-Dan は、従来の dGSH では捕捉できないハードな RM を含め、RM 生成プロファイルをより網羅的に把握することが可能な蛍光トラッピング剤と言えます。

4 CysGlu-Dan を用いたアッセイ : 事例紹介

当社では dGSH を用いたトラッピングアッセイに 15 年以上の実績があります。その経験を活かして CysGlu-Dan を用いた反応条件の最適化、CysGlu-Dan による酵素阻害の検討等を行い、RM スクリーニングに適用可能な分析評価系を構築しました。評価例としてトログリタゾン、クロザピンおよびシプロフロキサシンを用い、CysGlu-Dan 存在下でヒト肝ミクロソームによる代謝反応を行い、反応試料を UPLC®- 蛍光検出器にて分析しました (図 2)。矢印で示したピークが CysGlu-Dan とこれら化合物の RM の付加体を示しており、蛍光強度から付加体量を算出することで、各化合物の RM 生成量を評価しています。

次に、CysGlu-Dan トラッピングアッセイで DILI リスクレベルの異なる 43 化合物の評価を行い、共有結合試験^{3)~5)} および dGSH アッセイと比較しました (図 3)。DILI リスクは FDA DILI ランク²⁾ 等に

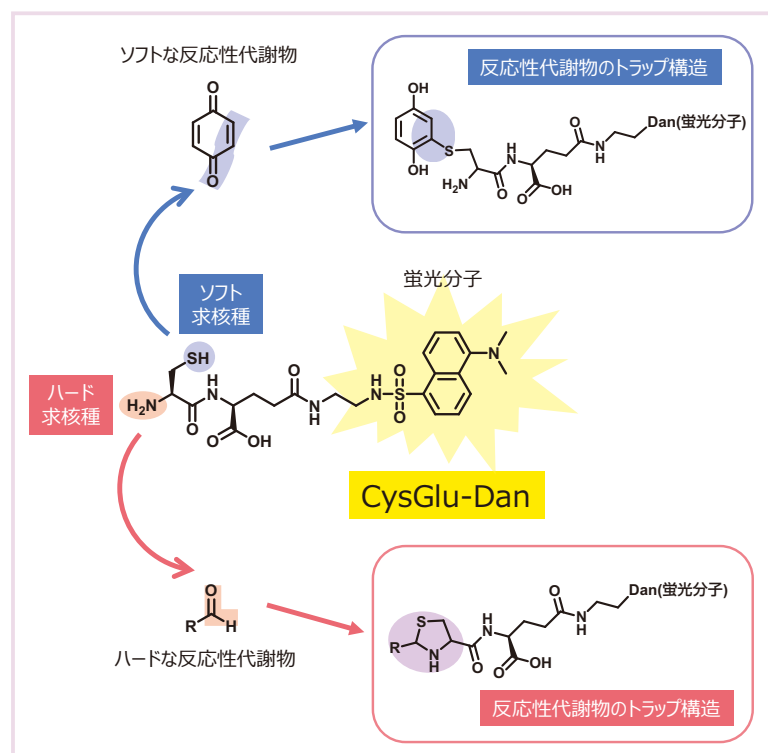


図 1 CysGlu-Dan の構造と反応性代謝物のトラップメカニズム

に基づき、化合物とDILIに因果関係があるもののうち重症度の異なる3グループ(Most, Less, No)と、因果関係が曖昧な1グループ(Ambiguous)に分類しました。共有結合試験ではDILIリスクの閾値を50 pmol/mg protein以上⁶⁾とし、このうちDILIリスクのない化合物を除く26化合物を「DILIリスクあり」と定義しました。またトラッピングアッセイではRMの定量値が0.1 μmol/L以上の化合物を「DILIリスクあり: Positive」と定義しました。その結果、dGSHアッセイでは26化合物中18化合物がPositive (69%)であったのに対し、CysGlu-Danアッセイでは22化合物がPositive (85%)となりました。CysGlu-DanはdGSHと比較して、ハードな

RMも含めてより網羅的にRMを捕捉・検出できることが示され、RM評価における見逃しを減らし、DILIリスク予測の信頼性を高める評価法として有用です。

5 総括と展望

CysGlu-Danを用いたトラッピングアッセイは、ソフトおよびハードなRMを網羅的に検出することでDILIリスク評価の精度を高めることが期待されます。当社では、CysGlu-Danを用いた分析をUPLC[®]を用いて1サンプルあたり約15分、一回の測定で最大45化合物を評価し、結果は約2週間で報告します。これにより、製薬会社等における初期スクリーニングから候補化合物の絞り込みまでの迅速化に寄与できると考えます。また、高分解能質量分析計を用いた構造解析と組み合わせることで、精密質量測定によるRMの組成情報の取得、フラグメンテーションパターン解析によるRM構造の推定やRM生成経路の解析など、製薬会社等における開発候補化合物の構造最適化を支援することも可能です。

このように、当社はdGSHアッセイで蓄積した知見とCysGlu-Danの特長を統合した反応性代謝物評価に構造解析を組み合わせ、お客様のターゲット化合物の特性に合わせて最適な反応性代謝物評価法を提案し、より安全で革新的な医薬品の研究開発に貢献してまいります。

文 献

- 1) Chikako Shibasaki, Tomoyuki Ohe, Kyoko Takahashi, Shigeo Nakamura, Tadahiro Mashino: *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **39**, 100386 (2021).
- 2) アメリカ食品医薬品局 (FDA): "Liver Toxicity Knowledge Base (LTKB)", <<https://www.fda.gov/science-research/bioinformatics-tools/liver-toxicity-knowledge-base-ltkb>>, (accessed 2026-05-21).
- 3) Nobuyuki Kakutani, Toyomichi Nanayama, Yukihiro Nomura: *The Journal of Toxicological Sciences*, **44** (3), 201 (2019).
- 4) Toru Usui, Masashi Mise, Takanori Hashizume, Masashi Yabuki, Setsuko Komuro: *Drug Metabolism and Disposition*, **37** (12), 2383 (2009).
- 5) Shintaro Nakayama, Ryo Atsumi, Hideo Takakusa, Yoshimasa Kobayashi, Atsushi Kurihara, Yoko Nagai, Daisuke Nakai, Osamu Okazaki: *Drug Metabolism and Disposition*, **37** (9), 1970 (2009).
- 6) David C Evans, Alan P Watt, Deborah A Nicoll-Griffith, Thomas A Baillie: *Chem Res Toxicol.*, **17** (1), 3 (2004).

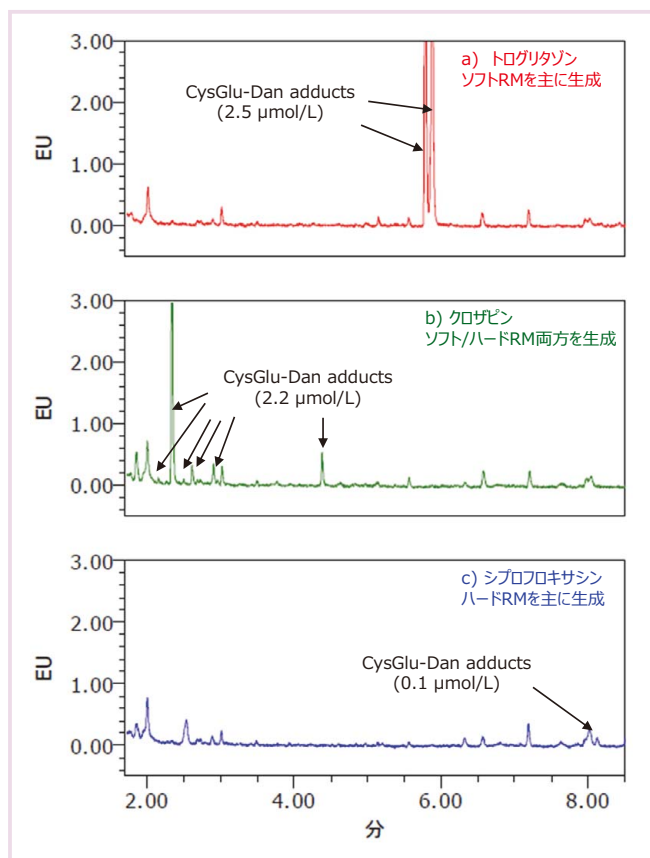


図2 代謝反応試料の蛍光クロマトグラム

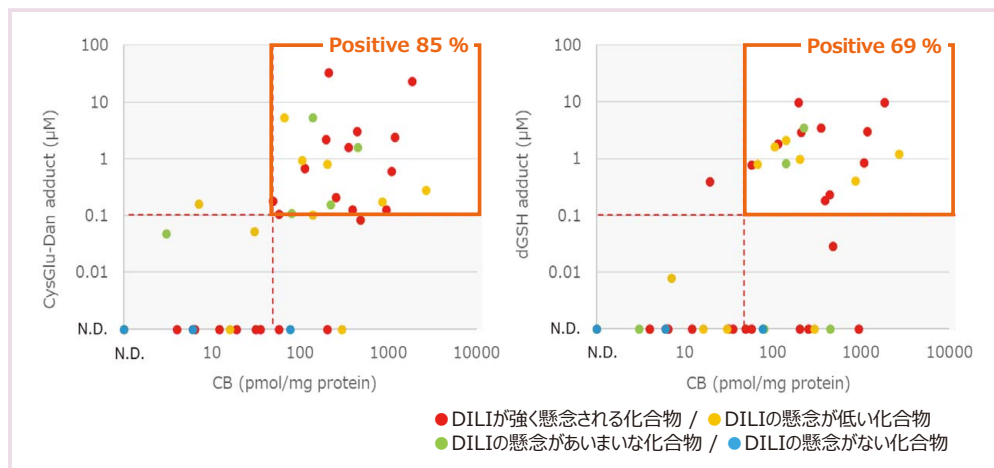


図3 共有結合試験 (CB), dGSHトラッピング, CysGlu-Danトラッピングの結果比較



塩田 優子
(しおた ゆうこ)
大阪ラボラトリー