

論文内容の要旨

氏名 多 鹿 哲 也

学位の種類 博士(農学)

学位記番号 農第160号

学位授与の日付 平成23年9月15日

学位授与の要件 学位規程第5条第2項該当

学位論文題目 17位アシルオキシ-21位水酸基グルココルチコイドの眼組織における脱17位アシルオキシ-21位カルボン酸体代謝物に関する研究

論文審査委員 (主査) 教授 飯 田 彰

(副主査) 教授 河 村 幸 雄

(副主査) 教授 上 島 繁

グルココルチコイド(GC)は点眼投与で結膜炎、角膜炎、ぶどう膜炎等の前眼部疾患、硝子体内投与あるいはテノン嚢下投与で糖尿病黄斑浮腫、加齢性黄斑変性、ぶどう膜炎など後眼部疾患の治療に幅広く使用されている。しかしながら、GCは多様な薬理作用を有するために副作用も高頻度で生じることが知られている。そのため、強い抗炎症効果を有し、副作用が少ないGCの開発が望まれている。その一つのアプローチとして、眼組織の薬物代謝反応を利用して、GCを速やかに不活性化させ、眼組織での副作用を減少させることが考えられる。

本研究ではこれまで眼科領域で開発されていなかった17位アシルオキシGCに着目し、プレドニゾン(PN)の17位水酸基を酪酸、21位水酸基を酢酸でエステル化したPN誘導体であるジフルプレドナート(DFBA)の眼組織における代謝物を精査した。その結果、新規代謝物で、不活性体である脱17位ブチルオキシ-21位カルボン酸代謝物が眼組織で生成することを発見し、眼組織で活性体から不活性体となる代謝反応の存在を証明した。また、この代謝反応は17位の側鎖がブチルオキシ基だけでなく、バレリルオキシ基でも確認され、17位アシルオキシGCで共通の代謝反応であると推測された。これらのことから、17位アシルオキシGCは眼局所で強い抗炎症作用を有し、副作用が少ない特徴を有する可能性が示唆され、眼局所投与に適したGCであると考えられた。

第1章 ジフルプレドナート点眼液における眼組織代謝

DFBA乳濁点眼液と懸濁点眼液をウサギに点眼投与したときの房水中薬物移行量を比較したところ、薬物濃度-時間曲線下面積(AUC)及び最高濃度(Cmax)いずれも乳濁点眼液が懸濁点眼液よりも優れていた。次に、トリチウム標識(³H)したDFBAを合成し、乳濁点眼液に製剤化した後、ウサギに単回投与後の眼組織内分布を検討した。組織中放射能濃度は、角膜、前房水、虹彩/毛様体を含む外眼部及び前眼部で高濃度であったが、代謝物分析を行うためには、単回投与では組織中放射能量が不十分であった。そのため、ウサギに³H-DFBA 0.05%乳濁点眼液を5分間隔で5回点眼投与したときの、各組織中放射能を高速液体クロマトグラフィー-放射能検出器(HPLC-RAD)で分析し、既報のDFBA代謝物とHPLCの保持時間における比較を行った。角膜、前房水、虹彩/毛様体中の放射能のHPLCクロマトグラムのピークパターンは同様であり、DFBAの21位加水分解代謝物(DFB)、17位及び21位加水分解代謝物(DF)に加えて、未知代謝物の3種類の代謝物が認められた。それぞれの組織のコロマトグラムの保持時間から、各組織の未知代謝物は同一の化合物(M1)であると考えられた。各組織中の放射能濃度は投与後0.5時間ではDFBが最も高濃度であったが、投与後2時間ではM1の割合が増加した。したがって、DFBからM1へ二次代謝が進んでいるものと推定され、M1は放射能濃度推移からDFよりも速やかに代謝されると考えられた。

第2章 ジフルブレドナートにおける眼組織代謝経路

³H-DFBAを点眼投与後にウサギ角膜中に認められたM1のLC/MS (full scan) 測定を行なったところ、MH⁺イオンと考えられるm/z 395が検出され、M1の質量数は394と推察された。また、MH⁺イオンをprecursor ionとするLC/MS/MS (daughter scan) 測定から、M1はカルボン酸誘導体であると推定され、脱17位ブチリルオキシ-21位カルボン酸体代謝物標品 (DF21C) を合成した。In vivoウサギ角膜中M1とDF21C標品をLC/MS/(MS)で比較したところ、保持時間及びメジャーフラグメントイオンが一致したため、M1はDF21Cであると同定した。DF21Cはこれまでに報告の無い新規代謝物である。In vitro角膜ホモジネート代謝実験において、DF21CはDFBから生成されたが、DFから生成されなかった。DFBからDF21Cへの代謝反応は角膜ホモジネートの熱処理によって進行しないことから酵素の関与が示唆され、その代謝活性は眼組織では角膜上皮、虹彩及び結膜において高く、肝臓の組織分画ではサイトゾールで高いことが明らかとなった。

第3章 17位アシルオキシグルココルチコイドにおける17位脱離反応

GCの17位側鎖が脱離反応に影響するのかを検討するためにin vitro角膜ホモジネート代謝実験の基質として、17位が水素(-H)、水酸基(-OH)及びブチリルオキシ基(-OCOC₃H₇)及びバレリルオキシ基(-OCOC₄H₉)であるDesoxmethasone (DOM)、Prednisolone (PN)並びにPrednisolone 21-acetate (PN21A)、DFBA及びPrednisolone 17-valerate 21-acetate (PNVA)並びにBetamethasone 17-valerate (BM17V)を用いて、脱17位アシルオキシ-21位カルボン酸体を中心に、推定代謝経路で生成する代謝物の有無を確認した。その結果、17位が水素あるいは水酸基である場合は、脱17位アシルオキシ-21位カルボン酸体に相当する代謝物は確認されず、17位がブチリルオキシ基及びバレリルオキシ基である場合は、脱17位アシルオキシ-21位カルボン酸体に相当する代謝産物が確認された。次に、PNVAを用いて代謝経路を確認した。PNVAは21位の加水分解を受けてPN17Vとなり、20, 21-enediol中間体を経て、17位のバレリルオキシ基が脱離してPN21CHOとなり、これが酸化されてPN21Cになると考えられた。これらのことから、眼組織において脱17位アシルオキシ-21位カルボン酸体を与える代謝反応は17位アシルオキシ-21位水酸基GCに共通のものであると考えられた。

第4章 DF21CのGR受容体結合活性

GC受容体 (GR) 結合活性を阻害定数 (K_i値) で示したところ、DF21Cは5.6 × 10⁻⁷ mol/Lであり、DFBAの7.2 × 10⁻¹⁰ mol/Lと比較して、約1/1000倍に低下していた。これは、PN、Dexamethasone (DM)、Fluorometholone (FM)と比較しても約1/100倍の活性であり、DF21Cは眼組織内でGR結合に起因する薬理作用及び副作用には影響を及ぼさないと考えられた。

DFBA乳濁点眼液とBetamethasone phosphate (BMP) 点眼液の眼組織中薬物濃度をGR結合活性でバイオアッセイしたところ、DFBA乳濁点眼液では0.1% BMP点眼液と比較して速やかな薬物濃度の消失が確認され、その一因としてDFBから速やかにDF21Cへ代謝されたことが関与しているものと推測された。

結論

1) ジフルブレドナートを用いた新規脱17位ブチリルオキシ-21位カルボン酸体 (DF21C) の同定とGR結合活性の測定
17位水酸基が酪酸で、21位水酸基が酢酸でエステル化されたブレドニゾン誘導体であるDFBA乳濁点眼液をウサギに点眼投与後の眼組織内代謝物を精査したところ、眼組織では加水分解代謝物であるDFB及びDFに加えて、新規代謝物である脱17位ブチリルオキシ-21位カルボン酸体 (DF21C) へ代謝されることを見出した。In vivo試験及びIn vitro試験の結果から、DF21CはDFBから生成されるものの、DFからは生成されず、その代謝反応速度はDFBからDFへ代謝される17位の加水分解反応よりも早い可能性が示唆された。また、DF21CはGR結合活性がDFBA、DFBと比較して約1/1000以上に非常に弱くなることから、DFBAは眼局所で活性体から不活性体へ速やかに代謝されることが明らかとなった。

2) 17位アシルオキシGCにおける脱17位アシルオキシ-21位カルボン酸体の代謝反応と側鎖の影響

GCの17位側鎖が脱離反応に影響するのかを検討するためにin vitro代謝実験の基質として、17位が水素(-H)、水酸基(-OH)及びブチリルオキシ基(-OCOC₃H₇)及びバレリルオキシ基(-OCOC₄H₉)であるGCを用いたところ、17位がブチリルオキシ基及びバレリルオキシ基である場合のみ、脱17位アシルオキシ-21位カルボン酸体に相当する代謝物が確認された。このことから、眼組織において脱17位アシルオキシ-21位カルボン酸体を与える代謝反応は17位アシルオキシ-21位水酸基GCに共通の代謝反応であると考えられた。次に、PNVAを用いて代謝反応を確認したところ、まずPNVAは21位の加水分解を受けてPN17Vとなり、20, 21-enediol中間体を経て、17位のバレリルオキシ基が脱離してPN21CHOとなり、これが酸化されてPN21Cになると考えられた。

論文審査結果の要旨

グルココルチコイド(GC)は点眼投与で結膜炎、角膜炎、ぶどう膜炎等の前眼部疾患、硝子体内投与あるいはテノン嚢下投与で糖尿病黄斑浮腫、加齢性黄斑変性、ぶどう膜炎など後眼部疾患の治療に幅広く使用されている。しかしながら、GCは多様な薬理作用を有するため副作用も高頻度で生じることが知られている。そのため、強い抗炎症効果を有し、副作用が少ないGCの開発が望まれている。その一つのアプローチとして、眼組織の薬物代謝反応を利用して、GCを速やかに不活性化させ、眼組織での副作用を減少させることが考えられる。

申請者はこれまで眼科領域で開発されていなかった17位アシルオキシGCに着目し、プレドニゾン(PN)の17位水酸基を酪酸、21位水酸基を酢酸でエステル化したPN誘導体であるジフルプレドナート(DFBA)の眼組織における代謝物を精査した。その結果、新規代謝物で、不活性体である脱17位ブチリルオキシ-21位カルボン酸代謝物が眼組織で生成することを発見し、眼組織で活性体から不活性体となる代謝反応の存在を証明した。また、この代謝反応は17位の側鎖がブチリルオキシ基だけでなく、バレリルオキシ基でも確認され、17位アシルオキシGCで共通の代謝反応であることを推測した。これらのことから、申請者は、17位アシルオキシGCは眼局所で強い抗炎症作用を有し、副作用が少ない特徴を有する眼局所投与に適したGCであると考えた。

申請者は、まず、ジフルプレドナート点眼液における眼組織代謝について検討した。DFBA乳濁点眼液と懸濁点眼液をウサギに点眼投与したときの房水中薬物移行量を比較したところ、薬物濃度-時間曲線下面積(AUC)及び最高濃度(C_{max})いずれも乳濁点眼液が懸濁点眼液よりも優れていた。そこで、トリチウム標識(³H)したDFBAを合成し、乳濁点眼液に製剤化した後、ウサギに単回投与後の眼組織内分布を検討した。組織中放射能濃度は、角膜、前房水、虹彩/毛様体を含む外眼部及び前眼部で高濃度であったが、代謝物分析を行うためには、単回投与では組織中放射能濃度が不十分であった。そのため、ウサギに³H-DFBA 0.05%乳濁点眼液を5分間隔で5回点眼投与したときの、各組織中放射能を高速度液体クロマトグラフィー放射能検出器(HPLC-RAD)で分析し、既報のDFBA代謝物とHPLCの保持時間における比較を行った。角膜、前房水、虹彩/毛様体中の放射能のHPLCクロマトグラムのピークパターンは同様であり、DFBAの21位加水分解代謝物(DFB)、17位及び21位加水分解代謝物(DF)に加えて、未知代謝物の3種類の代謝物を認めた。それぞれの組織のコロマトグラムの保持時間から、各組織の未知代謝物は同一の化合物(M1)であると考えた。各組織中の放射能濃度は投与後0.5時間ではDFBが最も高濃度であったが、投与後2時間ではM1の割合が増加した。したがって、DFBからM1へ二次代謝が進んでいるものと推定し、M1は放射能濃度推移からDFよりも速やかに代謝されると考えた。

次に、申請者は、ジフルプレドナートにおける眼組織代謝経路について検討した。³H-DFBAを点眼投与後にウサギ角膜中に認められたM1のLC/MS(full scan)測定を行なったところ、MH⁺イオンと考えられるm/z 395が検出したことから、M1の質量数は394と推察した。また、MH⁺イオンをprecursor ionとするLC/MS/MS(daughter scan)測定から、M1はカルボン酸誘導体であると推定されたことから、脱17位ブチリルオキシ-21位カルボン酸代謝物標品(DF21C)を合成した。In vivoウサギ角膜中M1とDF21C標品をLC/MS/MSで比較したところ、保持時間及びメジャーフラグメントイオンが一致したため、M1はDF21Cであると同一とした。DF21Cはこれまでに報告の無い新規代謝物であることを明らかにした。In vitro角膜ホジネート代謝実験において、DF21CはDFBから生成されたが、DFからは生成されなかった。DFBからDF21Cへの代謝反応は角膜ホジネートの熱処理によって進行しないことから酵素の関与が示唆され、その代謝活性は眼組織では角膜上皮、虹彩及び結膜において高く、肝臓の組織分画ではサイトゾールで高いことを明らかにした。

次に申請者は17位アシルオキシグルココルチコイドにおける17位脱離反応を検討した。GCの17位側鎖が脱離反応に影響するのかが検討するためにin vitro角膜ホジネート代謝実験の基質として、17位が水素(-H)、水酸基(-OH)及びブチリルオキシ基(-OCOC₂H₅)及びバレリルオキシ基(-OCOC₄H₉)であるDesoxmethasone(DOM)、Prednisolone(PN)並びにPrednisolone 21-acetate(PN21A)、DFBA及びPrednisolone 17-valerate 21-acetate(PNVA)並びにBetamethasone 17-valerate(BM17V)を用いて、脱17位アシルオキシ-21位カルボン酸体を中心に、推定代謝経路で生成する代謝物の有無を確認した。その結果、17位が水素あるいは水酸基である場合は、脱17位アシルオキシ-21位カルボン酸体に相当する代謝物は確認されず、17位がブチリルオキシ基及びバレリルオキシ基である場合は、脱17位アシルオキシ-21位カルボン酸体に相当する代謝物を確認した。次に、PNVAを用いて代謝経路を確認した。PNVAは21位の加水分解を受けてPN17Vとなり、20, 21-enediol中間体を経て、17位のバレリルオキシ基が脱離してPN21CHOとなり、これが酸化されてPN21Cになると考えた。これらのことから、眼組織において脱17位アシルオキシ-21位カルボン酸体を与える代謝反応は17位アシルオキシ-21位水酸基GCに共通のものであると結論付けた。

最後に、申請者はDF21CのGR受容体結合活性について検討を加えた。GC受容体(GR)結合活性を阻害定数(K_i値)で示したところ、DF21Cは 5.6×10^{-7} mol/Lであり、DFBAの 7.2×10^{-10} mol/Lと比較して、約1/1000倍に低下していた。これは、PN、Dexamethasone(DM)、Fluorometholone(FM)と比較しても約1/100倍の活性であり、DF21Cは眼組織内でGR結合に起因する薬理作用及び副作用には影響を及ぼさないと考えた。DFBA乳濁点眼液とBetamethasone phosphate(BMP)点眼液の眼組織中薬物濃度をGR結合活性でバイオアッセイし、DFBA乳濁点眼液では0.1% BMP点眼液と比較して速やかな薬物濃度の消失を確認した。これは、DFBが速やかにDF21Cへ代謝されたことに起因していると推測した。

本研究の結論を、申請者は以下の2点に要約した。

1) ジフルプレドナートを用いた新規脱17位ブチリルオキシ-21位カルボン酸体(DF21C)の同定とGR結合活性の測定

17位水酸基が酪酸で、21位水酸基が酢酸でエステル化されたプレドニゾン誘導体であるDFBA乳濁点眼液をウサギに点眼投与後の眼組織内代謝物を精査したところ、眼組織では加水分解代謝物であるDFB及びDFIに加えて、新規代謝物である脱17位ブチリルオキシ-21位カルボン酸体(DF21C)へ代謝されることを見出した。In vivo試験及びIn vitro試験の結果から、DF21CはDFBから生成されるもの、DFからは生成されず、その代謝反応速度はDFBからDFへ代謝される17位の加水分解反応よりも早い可能性を示唆した。また、DF21CはGR結合活性がDFBA、DFBと比較して約1/1000以上に非常に弱くなることから、DFBAは眼局所で活性体から不活性体へ速やかに代謝されることを明らかにした。

2) 17位アシルオキシGCにおける脱17位アシルオキシ-21位カルボン酸体の代謝反応と側鎖の影響

GCの17位側鎖が脱離反応に影響するのかが検討するためにin vitro代謝実験の基質として、17位が水素(-H)、水酸基(-OH)及びブチリルオキシ基(-OCOC₃H₇)及びバレリルオキシ基(-OCOC₄H₉)であるGCを用いたところ、17位がブチリルオキシ基及びバレリルオキシ基である場合のみ、脱17位アシルオキシ-21位カルボン酸体に相当する代謝物を確認した。このことから、眼組織において脱17位アシルオキシ-21位カルボン酸体を与える代謝反応は17位アシルオキシ-21位水酸基GCに共通の代謝反応であると考えた。次に、PNVAを用いて代謝反応を確認したところ、まずPNVAは21位の加水分解を受けてPN17Vとなり、20, 21-enediol中間体を経て、17位のバレリルオキシ基が脱離してPN21CHOとなり、これが酸化されてPN21Cになると結論づけた。

よって、本論文は、博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会などの所定の手続きを経たうえ、平成23年7月12日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。