CYP を阻害するフラノクマリン、ベンゾフラン及び クマリン誘導体の合成と CYP 阻害メカニズムの解明

山口 由基

Synthesis of Furanocoumarin, Benzofuran and Coumarin Derivatives Possessing an Inhibitory Effect on Human CYP, and Elucidation of the Inhibitory Mechanism

Yuki Yamaguchi

*School of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido;
1757 Kanazawa, Tobetsu-cho, Ishikari-gun, Hokkaido 061-0293, Japan.*

(Received June 5, 2017)

Grapefruit juice (GFJ) consumption has been shown to increase the bioavailability of certain orally administered drugs. The furanocoumarin derivatives Paradisin A and bergamottin, which are present in GFJ, are potent mechanism-based inhibitors of CYP3A4. The primary aim of this work was to synthesize a series of furanocoumarin derivatives with a view to determining the relationship between the structure of the inhibitors and their inhibitory CYP3A4 activity. Furanocoumarin derivatives that were more stable and accessible than the furanocoumarin derivatives in GFJ were prepared, and their ability to inhibit CYP3A4 was examined. Synthesized furanocoumarin monomers showed strong mechanism-based inhibition of CYP3A4. The furanocoumarin dimers are also mechanism-based inhibitors of CYP3A4. These monomers and dimers are more potent inhibitors of CYP3A4 than bergamottin and Paradisin A, respectively.

Key words—furanocoumarin; bergapten; CYP3A4; grapefruit juice

はじめに

シトクロム P450 (CYP) は、1950–1960 年代に薬物代謝酵素として認識されて以降、分子種の同定やそれにより代謝される化合物の探索、及びその活性を誘導又は阻害する化合物等に関する多くの研究がなされている。¹⁾ 代謝研究では、医薬品に代表される外因性物質だけではなく生体内因性物質等様々な物質を代謝することが明らかとされてきた。これらの研究を総合すると、“CYP を阻害する”ことは単に薬物相互作用の原因となるだけではなく、CYP 分子種によっては医薬品開発につながる事ができる。筆者はこれまでに、化学合成したフラノクマリン、ベンゾフラン、クマリン等の誘導体と CYP2A6, 3A4, 19 (アロマトラーゼ) 阻害に関する構造活性相関研究を行っている。本稿では、フラノクマリン誘導体と CYP3A4 阻害について述べる。

CYP3A4 は薬物代謝の中心的な役割を果たしている。現在では、Fig. 1 に示した **1** 及び **2** 等グレープフルーツジュース (GFJ) 中のフラノクマリン類が CYP3A4 活性を阻害するため、併用薬の体内動態に影響を与えることは、医療関係者にとって周知の事実であり、CYP3A4 により代謝される多くの薬物と GFJ との相互作用が解明されてきた。^{2,3)} しかし、GFJ の生産メーカーやロット毎にフラノクマリン類の含有量が大きく異なるため、市販の GFJ を用いて相互作用を定量的に解析することは困難である。^{4,5)} したがって、相互作用を定量的に解析するにはフラノクマリン誘導体を用いた研究が不可欠となる。しかし、GFJ に含まれるフラノクマリン類のうち、標品として市販されているのは **2** のみであり、他のフラノクマリン誘導体は GFJ からの単離が必要となるが、これら誘導体は GFJ 中にごくわずかしき含まれていない。^{4,6)} そこで、薬物相互作用の定量的な解析を目的とし、化学合成したフラノクマリン誘導体と CYP3A4 阻害能との構造活性相関研究を行った。

北海道医療大学薬学部 (〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢 1757)

e-mail: y.yamagu@hoku-iryo-u.ac.jp

本総説は、平成 28 年度日本薬学会北海道支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Paradishin A (1) and Bergamottin (2)

フラノクマリン誘導体の合成

天然に存在するフラノクマリン誘導体に関する研究から、フラノクマリン骨格が CYP3A4 の阻害に不可欠な構造であると考えられている。^{7,8)} そこで、フラノクマリン誘導体単量体では側鎖、二量体では2つのフラノクマリン環をつないでいるリンカーを変換した誘導体 (Fig. 2) をターゲットとした。

ターゲットとした誘導体は、4-又は9-ヒドロキシフラノクマリン (3, 8) のアルキル化によって合成可能と考えた。ヒドロキシフラノクマリンはアルコキシフラノクマリンの脱アルキル化により調製可能である。アルコキシフラノクマリンのうち9-メトキシフラノクマリン (9) は市販されていたため、購入し反応に用いた。4-メトキシフラノクマリン (4) は、市販されているものの高価であり、既報の合成法では収率が低かったため、⁹⁾ 新規合成経路の開発を行った。

Reisch らに従い合成した 18¹⁰⁾ のヒドロキシ基を2-ブロモアセトアルデヒドジメチルアセタールを用いてアルキル化し 19 とした (Scheme 1)。それに、三フッ化ホウ素・ジエチルエーテル錯体¹¹⁾を作用させてアルデヒドの脱保護と同時にフラン環を構築したところ、2種類の生成物を得た。結果、ベルガプテン (4) の収率は9%であり、8位で閉環したイソベルガプテン (21) が43%生成した。そこで、21の副生を避けるために18の8位をヨウ素で封鎖し、¹²⁾ 位置選択的なフラン環の構築を試みた (Scheme 2)。化合物22のヒドロキシ基と2-ブロモアセトアルデヒドジメチルアセタールとの反応を試みたが、ヨウ素の立体障害のため反応は進行しなかった。そこで、より反応性の高い臭化アリルによ

furanocoumarin monomers

furanocoumarin dimers

Fig. 2. Target Compounds

り7位のヒドロキシ基をアリル化後、23の側鎖不飽和結合の酸化的開裂によりアルデヒド24へと変換した。¹³⁾ 次に、19と同様の閉環反応を行い、フラノクマリン環を構築して25とした後、封鎖基をはずしてベルガプテン (4) を得ることができた。続いて、三臭化ホウ素により脱メチル化した3をハロアルコールによってアルキル化して26へ導いてから、カプロイルクロリドを作用させることで4位置換フラノクマリン誘導体7を合成した。

4,9'位置換フラノクマリン二量体は、市販のメトキサレン (9) から調製した9-ヒドロキシフラノクマリン (8)¹⁴⁾ に対して過剰量の1,5-ジブロモペンタンを作用させてモノアルキル体27に変換後、3と

Scheme 1. Synthesis of Bergapten (4)

Scheme 2. Synthesis of 4-Alkoxy Furanocoumarin Monomer 7

Scheme 3. Synthesis of 4,9'-Substituted Furanocoumarin Dimer 14

Table 1. Synthesis of Furanocoumarin Monomers

Substrate	R	X	Base	Solvent	Temperature	Products	Yield (%)
3	geranyl	Cl	Cs ₂ CO ₃	CH ₃ CN	reflux	2	27
3	propyl	I	Cs ₂ CO ₃	DMF	120°C	5	37
3	allyl	Br	Cs ₂ CO ₃	DMF	120°C	6	55
8	propyl	Br	Cs ₂ CO ₃	CH ₃ CN	reflux	10	quant.
8	allyl	Br	K ₂ CO ₃	acetone	reflux	11	73
8	geranyl	Cl	Cs ₂ CO ₃	CH ₃ CN	reflux	12	66

Table 2. Synthesis of Furanocoumarin Dimers

Substrate	<i>n</i>	Base	Solvent	Temperature	Products	Yield (%)
3	5	Cs ₂ CO ₃	CH ₃ CN	reflux	13	72
8	5	K ₂ CO ₃	DMF	120°C	15	69
8	8	K ₂ CO ₃	DMF	120°C	16	87
8	10	K ₂ CO ₃	DMF	120°C	17	89

縮合させた (Scheme 3). フラノクマリン単量体 **2**, **5**, **6**, **10–12** 及び二量体 **13**, **15–17** も同様に, **3** 又は **8** と相当するハロゲン化アルキル又はジブロモアルカンとの縮合により合成した (Tables 1 and 2). 4-ヒドロキシ体 **3** に比べて, 9-ヒドロキシ体 **8** は反応性が高く, より穏やかな条件かつ比較的高収率で目的化合物を得ることができた.

CYP3A4 阻害能の測定

BD Corning 社より購入したバキュロウイルス発現系ヒト CYP3A4 を用いて, テストステロンの 6β-ヒドロキシ化反応⁷⁾ に対する誘導体 **2–17** の IC₅₀ 値を測定後 (Table 3), mechanism-based inhibition (MBI) の有無を測定した (Fig. 3).

CYP3A4 活性は, 基質や酵素の種類によって変化するとされているため,^{15–17)} 合成した **2** を測定したところ IC₅₀ 値は 0.35 μM を示した (Table 3). これまでにヒトプールドミクロソームを用いて測定された値 (22 μM)⁷⁾ とは異なるものであったことから, 本稿ではこの値を用いて比較を行った. なお, IC₅₀ 値が 10 μM 以上のものについては >10 μM と記す. フラノクマリン単量体 **2–12** の IC₅₀ 値は, 0.18–>10 μM であり, 4 位置換体 **2–7** と 9 位置換体

Table 3. IC₅₀ Values of Furanocoumarin Derivatives on Testosterone 6β-Hydroxylation

Compounds	IC ₅₀ (μM)
2	0.35
3	>10
4	1.51
5	0.54
6	0.43
7	0.08
8	>10
9	5.46
10	0.48
11	0.76
12	0.18
13	0.15
14	0.03
15	0.03
16	0.04
17	0.05

8–12 の比較から, 置換位置による違いはみられなかった. したがって, GFJ 含有フラノクマリン類のように 4 位置換体であることは必須ではない可能性が示唆された. 活性は側鎖構造に応じて変化する. ヒドロキシ体 **3**, **8** 及びメトキシ体 **4**, **9** ではほとん

Fig. 3. Effects of Preincubation with Inhibitors on Testosterone 6 β -Hydroxylation

Each column represents mean $\pm$ S.D. ($n=3$). Furanocoumarin derivatives were studied at 0.005–0.2 μ M. * $p<0.01$, ** $p<0.001$: Significantly different from peak area ratio of preincubation (–).

ど阻害しないのに対して、嵩高い側鎖の誘導体 **2**, **5–7**, **10–12** では強力になる傾向を示した。炭素数が 3 以上の側鎖を有する誘導体の阻害能が **2** と同程度であったことから、ゲラニル基のような複雑な側鎖は必須ではないと推察された。二量体 **13–17** では 0.03–0.15 μ M を示し、リンカーの炭素鎖長を伸長させても活性に大きな変化はなく、ほとんどの誘導体がパラジシン A (**1**, 0.09 μ M)⁷⁾ と同程度若しくは強力な阻害剤であることが示唆された。4,4'位置換体に比べて 4,9'又は 9,9'位置換体で強力になる傾向を示した。したがって、**1** のように嵩高いリンカー構造は阻害能の発現に必須ではないと考えられた。また、カプロン酸エステル体 **7** は単量体でありながらも二量体に匹敵する強力な阻害剤であることが明らかとなった。

MBI とは阻害剤の代謝物による不可逆阻害であり、ベルガモチン (**2**) 等 GFJ 含有のフラノクマリン誘導体は MBI を示すと報告されている。^{7,18)} そこで、MBI の発現メカニズムを解明するために、CYP3A4 を阻害した誘導体 **2**, **5–7**, **10–15** に関して MBI の有無を測定することとした。阻害剤を NADPH 存在下で CYP3A4 とともに 10 分プレインキュベートして阻害剤の代謝物を生成させた場合 [プレインキュベーション (+)] と、プレインキュベートしない場合 [プレインキュベーション (–)] の酵素活性を比較した。プレインキュベーション (–) 時とプレインキュベーション (+) 時の活性値の差が大きいと、阻害様式に MBI を有する。¹⁹⁾ なお、阻害剤濃度はプレインキュベーション (–) 時の残存活性が 60–80% となるようにした。

はじめに、**2** (0.05 μ M) による CYP3A4 に対する MBI の有無を測定したところ、プレインキュベーション (–) 時の残存活性はコントロール: 100%, **2**: 87%, プレインキュベーション (+) 時の残存活性はコントロール: 85%, **2**: 47% であった (Fig. 3)。したがって、残存活性の差はコントロール: 15%, **2**: 40% となる。コントロールと比較して、**2** の残存活性がプレインキュベーションにより有意に減少したことから MBI を有すると判断した。測定を行った誘導体中、**14** 以外の誘導体ではプレインキュベーションにより阻害能が 17–28% 増大し、阻害様式に MBI を有することが明らかとなった。4,4'置換体 **13** 及び 9,9'置換体 **15** で MBI を示し、4,9'置換体 **14** でのみ MBI を示さなかったことから、フラノクマリン二量体では 2 つのフラノクマリン環とリンカーとの置換位置が MBI の発現に影響を与えると推察される。

IC₅₀ 値及び MBI の測定より、4 位又は 9 位に炭素数 3 以上の側鎖を有するフラノクマリン単量体 **5**, **6**, **10–12** は **2** の等価体であると考えられる。さらに、フラノクマリン二量体 **13**, **15–17** は、**1** の等価体としての可能性を示唆した。加えて、カプロン酸エステル誘導体 **7** は、単量体でありながらも MBI を有する非常に強力な阻害剤であり、**1** 並びに **2** の等価体としての働きが期待される。

おわりに

化学合成したフラノクマリン誘導体と CYP3A4 阻害能との構造活性相関研究の結果、フラノクマリン類の強力な阻害作用には MBI の有無が影響を与えることを明らかとした。CYP 阻害剤の構造活性相関研究により薬物相互作用や医薬品開発が発展することを期待している。

謝辞 本稿で紹介させて頂いた研究は、北海道医療大学で行われたものである。ご懇意なるご指導ご鞭撻を賜りました北海道医療大学薬学部 小田和明特任教授、和田啓爾教授、吉村照毅教授並びに西園直純准教授に深謝致します。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Rendic S., Di Carlo F. J., *Drug Metab. Rev.*,

- 29, 413–580 (1997).
- 2) Sawada Y., “Kusuri to Shoku no Sougosayou,” Vol. 1, Medicine and Drug Journal Co., Ltd., Osaka, 2005.
 - 3) Dahan A., Altman H., *Eur. J. Clin. Nutr.*, **58**, 1–9 (2004).
 - 4) Guo L. Q., Fukuda K., Ohta T., Yamazoe Y., *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 766–771 (2000).
 - 5) De Castro W. V., Mertens-Talcott S., Rubner A., Butterweck V., Derendorf H., *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 249–255 (2006).
 - 6) Ohta T., Nagahashi M., Hosoi S., Tsukamoto S., *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 969–973 (2002).
 - 7) Guo L. Q., Taniguchi M., Xiao Y. Q., Baba K., Ohta T., Yamazoe Y., *Jpn. J. Pharmacol.*, **82**, 122–129 (2000).
 - 8) Wangensteen H., Molden E., Christensen H., Malterud K. E., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **58**, 663–668 (2003).
 - 9) Howell W. N., Robertson A., *J. Chem. Soc.*, 293–294 (1937).
 - 10) Reisch J., Wickramasinghe A., Kumar V., *Monatsh. Chem.*, **119**, 1333–1339 (1988).
 - 11) Ahluwalia V. K., Bhat K., Prakash C., Singh R. P., *Indian J. Chem., Sect. B*, **20B**, 23–24 (1981).
 - 12) Reisch J., Wickramasinghe A., Wickremaratne D. B. M., *Liebigs Ann. Chem.*, 209–210 (1990).
 - 13) Taylor R. E., Chen Y., Beatty A., Myles D. C., Zhou Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 26–27 (2003).
 - 14) McOmie J. F. W., Watts M. L., West D. E., *Tetrahedron*, **24**, 2289–2292 (1968).
 - 15) Kenworthy K. E., Bloomer J. C., Clarke S. E., Houston J. B., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **48**, 716–727 (1999).
 - 16) Stresser D. M., Blanchard A. P., Turner S. D., Erve J. C. L., Dandeneau A. A., Miller V. P., Crespi C. L., *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 1440–1448 (2000).
 - 17) Lu P., Lin Y., Rodrigues A. D., Rushmore T. H., Baillie T. A., Shou M., *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 1473–1479 (2001).
 - 18) Paine M. F., Criss A. B., Watkins P. B., *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 1146–1153 (2004).
 - 19) Yamada Y., *Drug. Metab. Pharmacokinet.*, **22**, 13–28 (2007).