

チエノピリジン系抗血小板薬の代謝活性化に関する研究

2016 年

數井 美穂

# 目次

略語表 .....	6
序論 .....	8
第 1 章 クロピドグレル代謝物生成に関与する CYP 同定とその寄与率に関する評価 .. .....	12
1.1 小序 .....	12
1.2 実験材料および方法 .....	14
1.2.1 被験物質および試薬 .....	14
1.2.2 生物学的試料 .....	15
1.2.3 クロピドグレルチオラクトン体生成に関与する CYP 同定 .....	15
1.2.4 クロピドグレル活性代謝物生成に関与する CYP 同定 .....	16
1.2.5 クロピドグレルチオラクトン体生成における酵素キネティクスパラメー タ算出 .....	16
1.2.6 クロピドグレル活性代謝物生成における酵素キネティクスパラメータ算 出 .....	17
1.2.7 ヒト肝ミクロソーム中でのクロピドグレルチオラクトン体生成阻害 .....	17
1.2.8 ヒト肝ミクロソーム中でのクロピドグレル活性代謝物生成阻害 .....	19
1.2.9 分析方法 .....	21
1.2.9.1 HPLC 法 .....	21
1.2.9.2 LC-MS/MS 法 .....	22
1.2.10 データ解析方法 .....	23
1.3 結果 .....	25

1.3.1	クロピドグレルチオラクトン体生成に関与する CYP 同定 .....	25
1.3.2	クロピドグレル活性代謝物生成に関与する CYP 同定 .....	26
1.3.3	クロピドグレルチオラクトン体およびクロピドグレル活性代謝物生成に 関与する CYP 分子種の寄与率 .....	27
1.3.4	ヒト肝ミクロソーム中でのクロピドグレルチオラクトン体およびクロピ ドグレル活性代謝物生成阻害 .....	29
1.4	考察 .....	33
1.5	小括 .....	35
第 2 章	プラスグレルの加水分解反応に関与する新規ヒト小腸中 RKIP (Raf kinase inhibitor protein) の同定 .....	36
2.1	小序 .....	36
2.2	実験材料および方法 .....	37
2.2.1	被験物質および試薬 .....	37
2.2.2	生物学的試料 .....	37
2.2.3	サル小腸細胞画分の調製 .....	38
2.2.4	加水分解酵素の局在化 .....	38
2.2.5	酵素精製 .....	38
2.2.5.1	ヒト小腸 S9 とサル小腸サイトソル中の加水分解酵素精製 .....	38
2.2.5.2	サル小腸サイトソル中の加水分解酵素精製 .....	39
2.2.6	LC-MS/MS 法によるタンパク質同定 .....	40
2.2.7	hCE2 および hRKIP 発現系調製 .....	41
2.2.8	チオラクトン体生成における酵素キネティクスパラメータ算出 .....	41

2.2.9	ヒト小腸 S9 中の hRKIP および hCE2 発現量	42
2.2.10	ヒト小腸 S9 中でのチオラクトン体生成阻害	43
2.2.11	分析法	44
2.2.11.1	LC-MS/MS 条件	44
2.2.11.2	ウェスタンブロッティング法 1	45
2.2.11.3	ウェスタンブロッティング法 2	46
2.2.11.4	定量ウェスタンブロット解析法	46
2.2.12	データ解析方法	47
2.3	結果	49
2.3.1	ヒトおよびサル小腸中の加水分解酵素同定	49
2.3.2	プラスグレル加水分解酵素の精製	51
2.3.3	プラスグレル新規加水分解酵素タンパク質の LC-MS/MS 法による同定	53
2.3.4	hRKIP および hCE2 発現系を用いたプラスグレル加水分解反応における酵素キネティクスパラメータ算出	54
2.3.5	ヒト小腸 S9 中でのプラスグレル加水分解酵素寄与率	56
2.3.6	ヒト小腸 S9 中でのチオラクトン体生成阻害	58
2.4	考察	60
2.5	小括	62
第 3 章	プラスグレルの S-メチル化酵素の同定とその立体選択的代謝反応の評価	63
3.1	小序	63
3.2	実験材料および方法	65
3.2.1	被験物質および試薬	65

3.2.2	生物学的試料 .....	65
3.2.3	実験動物 .....	65
3.2.4	ヒト肝ミクロソームおよびサイトソル中でのプラスグレル活性代謝物の S-メチル化反応.....	66
3.2.5	ヒト肝ミクロソームおよびサイトソル中でのプラスグレル活性代謝物の S-メチル化反応阻害 .....	67
3.2.6	プラスグレル活性代謝物の 4 種光学異性体の S-メチル化反応評価 .....	67
3.2.7	プラスグレル活性代謝物光学異性体の S-メチル化反応における酵素キネ ティクスパラメータの算出 .....	68
3.2.8	プラスグレル活性代謝物投与後のラット・イヌ血漿中 S-メチル代謝物濃 度推移 .....	68
3.2.8.1	投与液ならびに投与方法 .....	68
3.2.8.2	血漿サンプル前処理 .....	68
3.2.9	分析法.....	69
3.2.9.1	UPLC-UV 法による分析 .....	69
3.2.9.2	LC-MS/MS 法による分析 .....	70
3.2.10	データ解析方法 .....	73
3.3	結果.....	75
3.3.1	プラスグレル活性代謝物の S-メチル化反応に関与する酵素 .....	75
3.3.1.1	ヒト肝ミクロソームおよびサイトソル中でのプラスグレル活性代謝物の S-メチル化反応.....	75
3.3.1.2	ヒト肝ミクロソームおよびサイトソル中でのプラスグレル活性代謝物の S-メチル化反応阻害 .....	76

3.3.2	TMT (チオール S-メチルトランスフェラーゼ)の立体選択的代謝活性と酵素活性種差.....	78
3.3.3	プラスグレル活性代謝物投与後のラット・イヌ血漿中 S-メチル代謝物の動態プロファイル .....	80
3.4	考察.....	82
3.5	小括.....	84
	総括 .....	85
	参考文献.....	90
	主論文目録.....	96
	謝辞 .....	97

## 略語表

本論文では以下の略号を用いた。

ACS	急性冠症候群 (acute coronary syndromes)
AUC <sub>0-1 h</sub>	投与後 1 時間までの濃度－時間曲線下面積
AUC <sub>0-inf</sub>	濃度－時間曲線下面積
BNPP	Bis p-nitrophenyl phosphate
hCE2	ヒトカルボキシルエステラーゼ 2
CL <sub>int</sub>	肝固有クリアランス
C <sub>max</sub>	最高血漿中濃度
CYP	Cytochrome P450
DCMB	(±) - 2,3-dichloro-alpha-methylbenzylamine hydrochloride
DMA	N, N-ジメチルアセトアミド
DMSO	ジメチルスルホキシド
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
IS	内部標準物質
K <sub>m</sub>	ミカエリス・メンテン定数
LC-MS/MS	液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計
LLOQ	定量下限濃度
MPBr	3'-methoxyphenacyl bromide
β-NADP	β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt
PCI	経皮的冠動脈形成術 (percutaneous coronary intervention)
RKIP	Raf kinase inhibitor protein
SAM	S-(5'-adenosyl)-L-methionine chloride
t <sub>1/2</sub>	消失半減期
TFA	トリフルオロ酢酸
TMT	チオール-S-メチルトランスフェラーゼ
TPMT	チオプリンメチルトランスフェラーゼ
ULOQ	定量上限濃度

UPLC	超高速液体クロマトグラフィー
$V_{\max}$	最大反応速度



## 序論

心疾患は日本人の死因の中で戦後大幅に増加した疾病の1つである[1]。厚生労働省「平成26年人口動態統計の年間推計」では、心疾患は悪性新生物に次いで第2位の死因と記載されており[2]、「心疾患の死亡率（人口10万人対）」は増加傾向にある（Figure 1S）[1]。

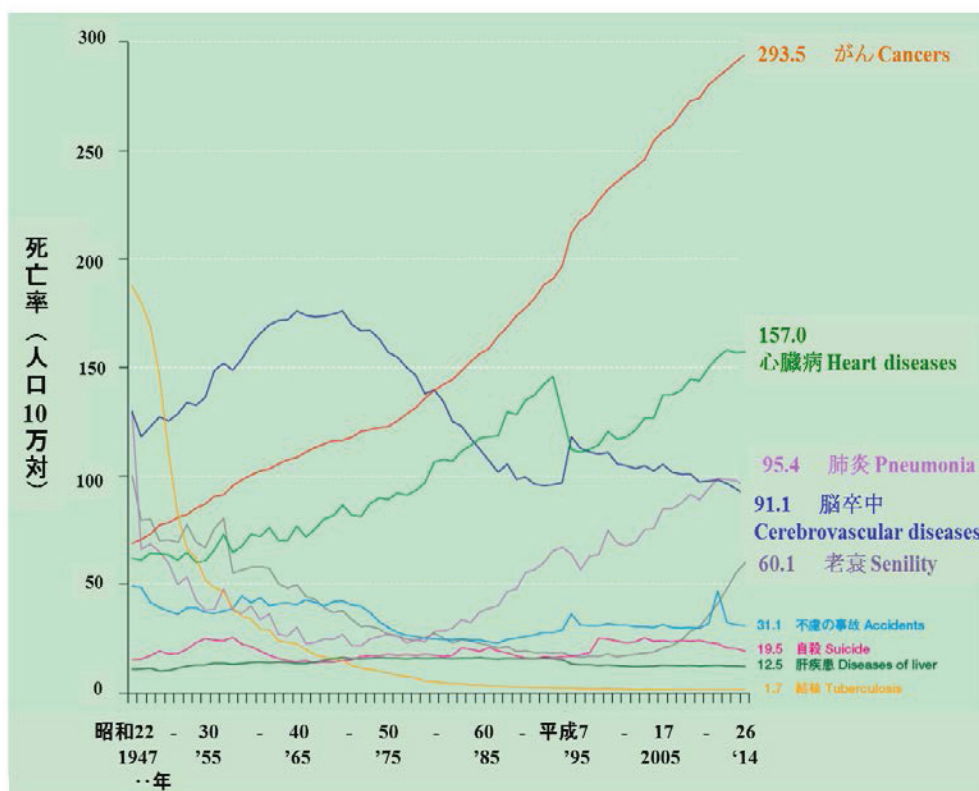


Figure 1S 主な死因別にみた死亡率の年次推移—昭和22年～平成26年—  
（「平成26年 我が国の人口動態—厚生労働省」より一部改変）

注1) 本書の場合の「がん」、「心臓病」、「脳卒中」は、国際疾病障害死因分類における「悪性新生物」、「心疾患（高血圧性を除く）」、「脳血管疾患」にあたる。

注2) 平成6、7年の心臓病の低下は、新しい死亡診断書（死体検案書）（平成7年施行）における「死亡の死因欄には、疾患の終末期の状態としての心不全、呼吸不全等は書かないください。」という注意書きの、事前周知の影響によるものと考えられる。

注3) 平成7年の脳卒中の上昇の主な要因は、ICD-10（平成7年1月適用）による原死因選択ルールの明確化によるものと考えられる。

心疾患の大部分を占める虚血性心疾患は心筋に酸素と栄養素を含む血液を供給する冠動脈が狭窄や冠攣縮することにより、血液が十分に心筋に行き渡らなくなる事で発症する疾患である。なかでも虚血性心疾患に属する急性心筋梗塞・不安定狭心症は死亡率が高く、緊急の治療を要する疾患とされている[3, 4]。急性心筋梗塞と不安定狭心症は共に急性冠症候群（ACS）と呼ばれる臨床症候群に属する。ACSは、冠動脈中の動脈硬化性プラークが破壊されることで形成される血栓が原因となり発症する急性心筋虚血を呈する疾患と定義されており、急性心筋梗塞、不安定狭心症から心臓性突然死までを包括する広範囲な疾患概念である[5]。Figure 2S に虚血性心疾患の分類について簡単にまとめた[6]。

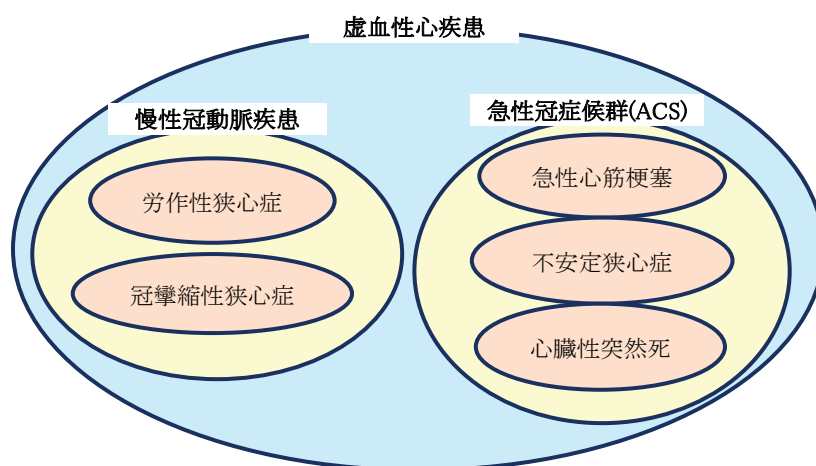


Figure 2S 虚血性心疾患の分類

ACS 疾患の一般的治療法には、外科的治療法として冠動脈バイパス術と心臓カテーテル治療（経皮的冠動脈形成術（PCI））があり、内科的治療法として薬物療法がある。

冠動脈バイパス術の主な利点は、PCI が適応できない患者の血流回復に適用できる点である。しかし、血塊による心臓発作、不整脈、腎不全、脳卒中等の合併症リスクや、体への負担が大きいという欠点がある[7]。一方、PCI の主な利点は速やかな血流改善が可能で、合併症リスクが低く、また、心臓への損傷が最小限であるため、体への負担が小さい点である。しかし、欠点としてステント周辺に血栓が形成され、血管が再開塞されるというリスクがある[7]。このステント内血栓による致死率は約 20% である[8]。従って、PCI のステント留置

後の一定期間はステント血栓症発生率を抑制する目的で、抗血小板薬 2 剤併用療法（アスピリン／チエノピリジン系抗血小板薬）が推奨されている[9]。

現在、心筋梗塞の治療薬として市販されているチエノピリジン系抗血小板薬にはチクロピジン（第一世代）、クロピドグレル（第二世代）、プラスグレル（第三世代）がある。1981 年に日本で承認されたチクロピジンの臨床用量は 200-600 mg/day であり、重篤な副作用（肝障害、血栓性血小板減少性紫斑病など）が問題となっていた。1997 年に米国で上市され、2006 年に日本で承認された第二世代のクロピドグレルはこのような副作用発症頻度が軽減されており、臨床用量もチクロピジンと比較して初回用量 300 mg/day、維持用量 75 mg/day と低い用量で有効な血小板凝集抑制作用を発揮する[10]。現在、クロピドグレルの売上は国内トップクラスであり[11]、非常に多くの ACS 疾患を有する患者に服用されている。しかし、クロピドグレルに対する”non-responders”あるいは”variable response”の症例も多数認められている[12]。2009 年に欧州・米国で承認され、2014 年に日本で承認された第三世代のプラスグレルはこれら先行品の欠点を克服するべく開発された薬物であり、臨床において安全性と有用性が確認されている。プラスグレルの臨床用量はクロピドグレルよりさらに低く、初回用量 20 mg/day、維持用量 3.75 mg/day で有効な血小板凝集抑制作用を示す[13, 14]。

一連のチエノピリジン系抗血小板薬はそれ自身では血小板凝集抑制作用を持たないプロドラックであり、生体内で活性代謝物に変換された後、血小板膜上の P2Y<sub>12</sub> 受容体と共有結合し、強力な血小板凝集抑制作用を示す[15]。In vitro における血小板凝集抑制作用はチクロピジン活性代謝物が最も低く、プラスグレルとクロピドグレルの各活性代謝物は同程度の血小板凝集抑制作用を示す[16, 17]。しかし、臨床（in vivo）における薬効発現用量はプラスグレルが最も低く、次いでクロピドグレル、チクロピジンの順である[13, 14, 15]。また、プラスグレルでは臨床用量における non-responder は存在しない[12]。プラスグレルの血小板凝集抑制作用は、投与後 30 分で有意な薬理効果を示すのに対し、クロピドグレルは投与後 2 時間以降で薬理効果を示す[18]。つまり、プラスグレルはクロピドグレルと比較して個体間変動が小さく、薬効発現が「迅速」であるといえる。このような薬効における in vitro と in vivo の乖離は薬物動態的な

相違が起因していると考えられる。

Table 1S に *in vitro* の薬理活性と各薬剤の国内用量についてまとめた[16, 17]。

**Table 1S Pharmacological activity (*in vitro*) of each anti-platelet drugs and clinical dose in Japan.** \*適応疾患により用量は異なる。

抗血小板薬名	プラスグレル	クロピドグレル	チクロピジン
ラット洗浄血小板凝集阻害活性 (IC <sub>50</sub> )	1.8 μM	2.4 μM	約 30 μM
臨床用量 (初回用量/維持用量)	20 mg/3.75 mg	300 mg/75 mg	200-600 mg*

著者は前述したプラスグレルの臨床上的薬理的優位性、すなわち、プラスグレルがクロピドグレルと比較して、「低用量で薬効発現し、その効果は迅速かつ確実に個体間変動が少ない薬物である」という要因を明らかにすることを目的として、薬物動態的視点からプラスグレルとクロピドグレルの代謝活性化に注目して研究した。

第1章ではクロピドグレルの薬効個体間変動が大きい要因、すなわち、non-responder が存在する要因を明らかにすることを目的として、クロピドグレル活性代謝物生成に関与する CYP 分子種同定とその寄与率について評価した。

第2章ではプラスグレルが低用量で薬効発現し、その効果が迅速、且つ、確実な薬効を示す要因を明らかにすることを目的として、プラスグレルの初発代謝である加水分解反応に注目し、ヒト小腸中でのプラスグレル加水分解酵素を同定し、代謝寄与について評価した。

第3章ではプラスグレルが低用量で薬効発現し、その効果が確実である要因を明らかにする目的で血漿中の活性代謝物光学異性体 (4 種) のうち活性の強い異性体 2 種が優位に血漿中に存在する原因を活性代謝物消失反応である S-メチル化反応に注目し、*in vitro* と *in vivo* の両面から評価した。*In vitro* においては S-メチル化反応に関与する酵素の同定とその立体選択性をラット・イヌ・ヒト肝ミクロソームを用いて評価し、*in vivo* においてはラットおよびイヌに活性代謝物投与後の S-メチル代謝物 2 種異性体の薬物動態を評価した。

## 第 1 章 クロピドグレル代謝物生成に関与するCYP同定とその寄与率に関する評価

### 1.1 小序

クロピドグレルは薬効の個体間変動が大きく、また、non-responder(一般的に血小板凝集抑制率が 20%以下の被験者を non-responder と呼称している)の症例も多数認められている[12]。Brandt JT らはクロピドグレル 300 mg を健常人 74 名に、prasugrel 60 mg を健常人 71 名に経口投与後、4 時間の血小板凝集抑制率を両薬剤で比較し、クロピドグレルの個体間変動が大きく、また、non-responder が存在することを報告している (Figure 3S) [12]。医療現場における薬の適正使用、個別化医療を考える上で、個体間変動が大きい要因を明らかにすることは重要である。

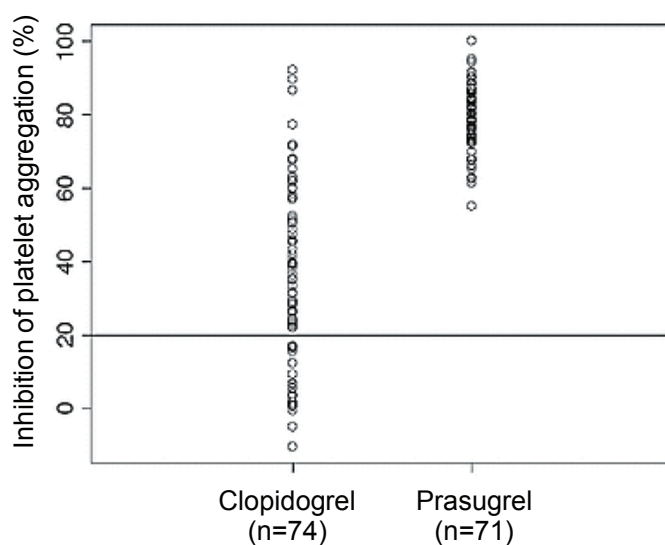


Figure 3S The pharmacodynamic response to clopidogrel 300 mg and prasugrel 60 mg, as measured by inhibition of platelet aggregation (IPA) 4 h postdose.

(Brandt JT et al. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2429-2436 から引用し、一部改変)

本章では個体間変動が大きい要因を明らかにする目的で Figure 4S に示したクロピドグレル代謝活性化反応過程（2 段階の酸化代謝過程）に注目し、クロピドグレル活性代謝物生成に関与する CYP 分子種の同定とその寄与率について評価した。

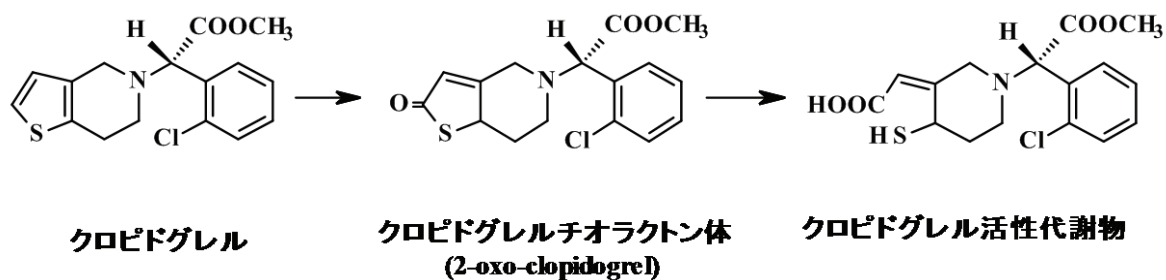


Figure 4S Biotransformation pathway of clopidogrel leading to its pharmacologically active metabolite via clopidogrel thiolactone form.

## 1.2 実験材料および方法

### 1.2.1 被験物質および試薬

クロピドグレル、クロピドグレルチオラクトン体 (2-oxo clopidogrel)、クロピドグレル活性代謝物および R-135766 (Figure 4S および Figure 5S) [19] は宇部興産株式会社 (Ube, Japan) で合成された。R-135766 はクロピドグレルチオラクトン体およびクロピドグレル活性代謝物の LC-MS/MS 測定用内部標準物質として使用した。Butyl *p*-hydroxybenzoate は和光純薬工業株式会社 (Tokyo, Japan) から購入し、クロピドグレル活性代謝物の HPLC 測定用内部標準物質として使用した。Furafylline、omeprazole、(S)-*N*-3-benzylrivanol、sulfaphenazole、ketoconazole、glutathione、 $\beta$ -NADP、および D-glucose 6-phosphate は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から、Glucose-6-phosphate dehydrogenase はオリエンタル酵母工業株式会社 (Tokyo, Japan) から、チオール誘導体化試薬である 3'-methoxyphenacyl bromide (MPBr) は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) からそれぞれ購入した。その他の試薬は、市販の特級、一級、HPLC 用のものを用いた。

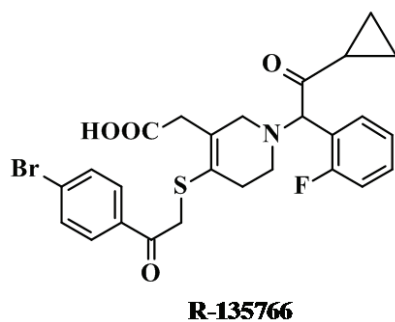


Figure 5S Structure of R-135766



### 1.2.2 生物学的試料

CYP1A2、CYP3A4、CYP2B6およびCYP2C19の各モノクローナル抗体はBDバイオサイエンス社 (Woburn, MA) から、CYP2C9ポリクローナル抗体およびウサギコントロール血清は日本農産工業株式会社 (Yokohama, Japan) からそれぞれ購入した。

プールドヒト肝ミクロソーム (10名) は特定非営利活動法人HAB研究機構 (Tokyo, Japan) から、CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4およびCYP4A11のヒトリンフォブラスト発現系酵素およびスーパーゾーム (組換えヒトCYP分子種) はBDバイオサイエンス社 (Woburn, MA) からそれぞれ購入した。

### 1.2.3 クロピドグレルチオラクトン体生成に關与するCYP同定

NADPH-generating system ( $\beta$ -NADP (2.5 mM), G-6-P (25 mM), G-6-PDH (2 units/mL),  $MgCl_2$  (10 mM)) およびCYP1A1、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4スーパーゾーム発現系 (3 mg protein/mL) を含むリン酸カリウム緩衝液 (50 mM, pH7.4, total volume: 196  $\mu$ L) またはCYP2A6、CYP2C9、CYP4A11スーパーゾーム発現系 (3 mg protein/mL) を含むトリス塩酸緩衝液 (50 mM, pH7.4, total volume: 196  $\mu$ L) を37°C下で5分間インキュベートし、4  $\mu$ LのクロピドグレルDMA溶液 (終濃度500  $\mu$ M) を反応液に加え、37°C下で30分間インキュベートした。本反応液に3倍量のエタノールを添加し、遠心分離 (20,800 $\times$ g, 3 min, 4°C) 後、上清25  $\mu$ LをHPLC分析装置に注入し、クロピドグレルチオラクトン体濃度を測定した。



#### 1.2.4 クロピドグレル活性代謝物生成に関与するCYP同定

NADPH-generating system、グルタチオン (1 mM) および CYP1A1、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4 ヒトリンフォブラスト発現系 (2 mg protein/mL) を含むリン酸カリウム緩衝液 (50 mM, pH7.4, total volume: 195 $\mu$ L) または CYP2A6、CYP2C9、CYP4A11 ヒトリンフォブラスト発現系 (2 mg protein/mL) を含むトリス塩酸緩衝液 (50 mM, pH7.4, total volume: 195  $\mu$ L) を 37 $^{\circ}$ C 下で 5 分間インキュベートし、5  $\mu$ L のクロピドグレルチオラクトン体 DMA 溶液 (終濃度 200  $\mu$ M) を反応液に加え、37 $^{\circ}$ C 下で 90 分間インキュベートした。本反応液に 3 倍量のアセトニトリルと 20  $\mu$ L の Butyl *p*-hydroxybenzoate アセトニトリル溶液 (20  $\mu$ g/mL, 内部標準物質) を加え、遠心分離 (20,800 $\times$ g, 3 min, 4 $^{\circ}$ C) 後、上清 20  $\mu$ L を HPLC 分析装置に注入し、クロピドグレル活性代謝物濃度を測定した。

#### 1.2.5 クロピドグレルチオラクトン体生成における酵素キネティクスパラメータ算出

NADPH-generating system および CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19 スーパーズーム発現系 (20 pmol CYP/0.2 mg protein/mL) を含むリン酸カリウム緩衝液 (100 mM, pH7.4, total volume: 294  $\mu$ L) を 37 $^{\circ}$ C 下で 5 分間インキュベートし、6  $\mu$ L のクロピドグレルメタノール溶液 (終濃度 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40  $\mu$ M) を反応液に加え、37 $^{\circ}$ C 下で 1 分間インキュベートした。本反応液 50  $\mu$ L に 200  $\mu$ L アセトニトリルと 2  $\mu$ M R-135766 アセトニトリル溶液 50  $\mu$ L を加え、遠心分離 (20,800 $\times$ g, 3 min, 4 $^{\circ}$ C) 後、上清 5  $\mu$ L を LC-MS/MS 分析装置に注入し、クロピドグレルチオラクトン体濃度を測定した。得られた値から 1.2.10 で示す方法に従って、酵素キネティクスパラメータを算出した。

### 1.2.6 クロピドグレル活性代謝物生成における酵素キネティクスパラメータ算出

NADPH-generating system、グルタチオン（終濃度5 mM）およびCYP2B6、CYP2C19、CYP3A4スーパーゾーム発現系（20 pmol CYP/0.3 mg protein/mL）を含むリン酸カリウム緩衝液（100 mM, pH7.4, total volume: 294  $\mu$ L）またはCYP2C9スーパーゾーム発現系（20 pmol CYP/0.3 mg protein/mL）を含むトリス塩酸緩衝液（100 mM, pH7.5, total volume: 300  $\mu$ L）を37°C下で5分間インキュベートし、6  $\mu$ Lのクロピドグレルチオラクトン体メタノール溶液（終濃度0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40  $\mu$ M）を反応液に加え、37°C下で15分間および30分間インキュベートした。本反応液50  $\mu$ Lに198  $\mu$ Lアセトニトリル、500 mM 3'-methoxyphenacyl bromide (MPBr) アセトニトリル溶液2  $\mu$ L、2  $\mu$ M R-135766アセトニトリル溶液50  $\mu$ Lを加え、反応を停止させた。クロピドグレル活性代謝物のチオール基をMPBrで誘導体化するため、室温下で10分放置し、遠心分離（20,800 $\times$ g, 3 min, 4°C）後、上清5  $\mu$ LをLC-MS/MS分析装置に注入し、クロピドグレル活性代謝物濃度を測定した[20]。得られた値から1.2.10で示す方法に従って、酵素キネティクスパラメータを算出した。

### 1.2.7 ヒト肝ミクロソーム中でのクロピドグレルチオラクトン体生成阻害

クロピドグレルからクロピドグレルチオラクトン体生成における $K_m$ 値（ミカエリス・メンテン定数）を算出するため、NADPH-generating systemおよびプーールドヒト肝ミクロソーム（0.5 mg protein/mL）を含むリン酸カリウム緩衝液（100 mM, pH7.4, total volume: 198  $\mu$ L）を37°C下で5分間インキュベートし、2  $\mu$ Lのクロピドグレルメタノール溶液（終濃度1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160  $\mu$ M）を反応液に加え、37°C下で5分間インキュベートした。以降の処理は1.2.5項と同様の操作をした。得られたクロピドグレルチオラクトン体濃度とクロピドグレル添加濃度の値を使用して $K_m$ 値をWinNonlin nonlinear estimation program（version 4.0.1; Pharsight, Mountain View, CA）で算出した（1.2.10を参照）。

CYP抗体を用いてクロピドグレルチオラクトン体生成阻害試験を行った。

5  $\mu$ Lのプールドヒト肝ミクロソーム (20 mg protein/mL) と10  $\mu$ LのCYP1A2、CYP2B6、CYP2C19モノクロナール抗体を混合して20分間氷冷下でインキュベートした。対照群にはモノクロナール抗体の代わりに25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) を10  $\mu$ Lプールドヒト肝ミクロソーム中に添加した。その後、各反応液に133  $\mu$ Lの100 mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)と50  $\mu$ LのNADPH-generating systemを添加し、37°C下で5分間プレインキュベーション後、2  $\mu$ Lのクロピドグレルメタノール溶液 (終濃度4  $\mu$ M) を添加し、37°C下で5分間インキュベートした。以降の処理は上記 $K_m$ 値算出時と同様の操作をした。得られた試料5  $\mu$ LをLC-MS/MS分析装置に注入し、クロピドグレルチオラクトン体濃度を測定した。

CYP1A2の選択的阻害剤としてfurfurylline、CYP2C19の選択的阻害剤として(S)-N-3-benzylnirvanolとomeprazoleを使用してクロピドグレルチオラクトン体の生成阻害試験を行った。プールドヒト肝ミクロソーム(終濃度0.5 mg protein/ mL)、(S)-N-3-benzylnirvanol、omeprazole (各阻害剤終濃度10  $\mu$ M) またはメタノール溶液 (対照群)、クロピドグレル (終濃度4  $\mu$ M) を含むリン酸カリウム緩衝液 (100 mM, pH7.4, total volume: 225  $\mu$ L) を37°C下で5分間プレインキュベーション後、75  $\mu$ LのNADPH-generating systemを添加し、37°C下で5分間インキュベートした。

阻害剤にfurfuryllineを用いた場合はプールドヒト肝ミクロソーム (終濃度0.5 mg protein/ mL) とfurfurylline (終濃度10  $\mu$ M) を含むリン酸カリウム緩衝液 (100 mM, pH7.4, total volume: 223.5  $\mu$ L) を37°C下で25分間プレインキュベートした。その後、1.5  $\mu$ Lのクロピドグレルメタノール溶液 (終濃度4  $\mu$ M) を添加し、37°C下で5分間インキュベーション後、75  $\mu$ LのNADPH-generating systemを添加し、37°C下で5分間インキュベートした。以降の処理は上記 $K_m$ 値算出時と同様の操作をした。得られた試料5  $\mu$ LをLC-MS/MS分析装置に注入し、クロピドグレルチオラクトン体濃度を測定した。

### 1.2.8 ヒト肝ミクロソーム中でのクロピドグレル活性代謝物生成阻害

クロピドグレルチオラクトン体からクロピドグレル活性代謝物生成における  $K_m$  値を算出するため、NADPH-generating system、グルタチオン（終濃度 5 mM）およびプールドヒト肝ミクロソーム（0.5 mg protein/mL）を含むリン酸カリウム緩衝液（100 mM, pH7.4, total volume: 198  $\mu$ L）を 37°C 下で 5 分間インキュベートし、2  $\mu$ L のクロピドグレルチオラクトン体メタノール溶液（終濃度 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160  $\mu$ M）を反応液に加え、37°C 下で 15 分間インキュベートした。本反応液 50  $\mu$ L に 198  $\mu$ L アセトニトリル、500 mM MPBr アセトニトリル溶液 2  $\mu$ L、2  $\mu$ M R-135766 アセトニトリル溶液 50  $\mu$ L を加え、反応を停止させた。以降の処理は 1.2.6 項と同様の操作をした。得られたクロピドグレル活性代謝物濃度とクロピドグレルチオラクトン体添加濃度の値を使用して  $K_m$  値を算出した（1.2.10 を参照）。

CYP抗体を用いてクロピドグレル活性代謝物生成阻害試験をした。

5  $\mu$ L のプールドヒト肝ミクロソーム（20 mg protein/mL）と 10  $\mu$ L の CYP2B6、CYP2C19、CYP3A4 モノクロナール抗体を混合して 20 分間氷冷下でインキュベートした。対照群にはモノクロナール抗体の代わりに 25 mM トリス塩酸緩衝液（pH7.5）10  $\mu$ L をプールドヒト肝ミクロソームに添加した。また、5  $\mu$ L のプールドヒト肝ミクロソーム（20 mg protein/mL）と 10  $\mu$ L の CYP2C9 ポリクロナール抗体またはコントロールウサギ血清を混合して 10 分間室温下でインキュベートした。これら反応液のインキュベーション終了後、各反応液に 113  $\mu$ L の 100 mM リン酸カリウム緩衝液（pH7.4）、20  $\mu$ L のグルタチオン（終濃度 5 mM）と 50  $\mu$ L の NADPH-generating system を添加し、37°C 下で 5 分間プレインキュベーション後、2  $\mu$ L のクロピドグレルメタノール溶液（終濃度 3  $\mu$ M）を添加し、37°C 下で 15 分間インキュベートした。その後の処理は  $K_m$  値算出時と同様の操作をした。得られた試料 5  $\mu$ L を LC-MS/MS 分析装置に注入し、クロピドグレル活性代謝物濃度を測定した。

CYP2C9の選択的阻害剤としてsulfaphenazole、CYP2C19の選択的阻害剤として(S)-N-3-benzylnirvanolとomeprazole、CYP3A4の選択的阻害剤としてketoconazoleを使用してクロピドグレル活性代謝物の生成阻害試験をした。プールドヒト肝ミクロソーム（終濃度0.5 mg protein/ mL）、グルタチオン（終濃度5 mM）、sulfaphenazole、(S)-N-3-benzylnirvanol、omeprazole（各阻害剤終濃度10  $\mu$ M）、ketoconazole（終濃度0.2  $\mu$ M）またはメタノール溶液（対照群）、クロピドグレルチオラクトン体（終濃度3  $\mu$ M）を含むリン酸カリウム緩衝液（100 mM, pH7.4, total volume: 225  $\mu$ L）を37 $^{\circ}$ C下で5分間プレインキュベーション後、75  $\mu$ LのNADPH-generating systemを添加し、37 $^{\circ}$ C下で15分間インキュベートした。その後の処理は $K_m$ 値算出時と同様の操作をした。得られた試料5  $\mu$ LをLC-MS/MS分析装置に注入し、クロピドグレル活性代謝物濃度を測定した。

## 1.2.9 分析方法

### 1.2.9.1 HPLC 法

本分析方法は CYP 同定試験でクロピドグレルチオラクトン体およびクロピドグレル活性代謝物濃度を定量するために構築した。

HPLC 装置：LC-VP system (株式会社 島津製作所)

分析用カラム：YMC Pack ODS-A302 column

(4.6 × 150 mm, 粒子径 5 μm, 株式会社ワイエムシィ)

カラム温度：40℃

移動相①：アセトニトリル/蒸留水/トリフルオロ酢酸 (TFA) = 35/65/0.02  
(v/v/v)

移動相②：アセトニトリル/蒸留水/TFA = 38/62/0.02 (v/v/v)

流速：1 mL/min

検出波長：220 nm

移動相①はクロピドグレルチオラクトン体測定に、移動相②はクロピドグレル活性代謝物測定に使用した。クロピドグレルチオラクトン体の定量下限濃度 (LLOQ) および定量上限濃度 (ULOQ) はそれぞれ 2 μM、500 μM であった。また、クロピドグレル活性代謝物の LLOQ および ULOQ はそれぞれ 0.5 μM、20 μM であった。LLOQ 未満の濃度はゼロとして扱った。誘導体化処置なしのクロピドグレル活性代謝物は、4℃下で 24 時間、アセトニトリル中で安定であった。

### 1.2.9.2 LC-MS/MS 法

酵素キネティックパラメータ算出試験および阻害試験におけるクロピドグレルチオラクトン体およびクロピドグレル活性代謝物の定量は Takahashi らの方法 (2008) に準拠して、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) で実施した[20]。以下に分析条件を記す。

HPLC 装置 : Alliance 2695 Separations Module (Waters Corp)

質量分析装置 : Quattro-LC-MS/MS system (Micromass UK., Ltd.)

分析用カラム : Inertsil ODS-3 column

(2.1 × 150 mm, 粒子径 5 μm, ジーエルサイエンス株式会社)

カラム温度 : 40°C

移動相 : メタノール/蒸留水/TFA = 710/290/0.5 (v/v/v)

流速 : 0.2 mL/min

イオン化法 : Electro-spray ionization (ESI) – positive ion detection mode

デゾルベーション温度 : 350°C

ソース温度 : 120°C

Capillary voltage : 3.5kV

Cone voltage : 20 V

Collision energy : 25 eV

定量時のモニタリングイオン :

クロピドグレルチオラクトン体,  $m/z$  338→183

クロピドグレル活性代謝物誘導体,  $m/z$  504→354

R-135766 (内部標準物質),  $m/z$  548→206

各測定対象物のLLOQは0.025 μMであった。データ解析にはMassLynx version 3.4 software (Waters Corp.) またはMasslynx version 4.0 SP4 software (Waters Corp.) を用いた。

### 1.2.10 データ解析方法

酵素キネティックパラメータ以外の全ての計算値は3回の実験の mean±SD で記した。

クロピドグレルおよびクロピドグレルチオラクトン体を基質に使用して、CYP 発現系の酵素キネティックパラメータを算出した。その際の生成代謝物反応速度定数 (V) は式①に従って算出した。

$$V \text{ (pmol/pmol CYP/min)} = \frac{\text{生成代謝物濃度(nmol/mL)} \times 1000}{20 \text{ (pmol CYP/mL)} \times \text{インキュベーション時間(min)}} \quad \text{式①}$$

ミカエリス-メンテン定数 ( $K_m$ ,  $\mu\text{M}$ ) と最大反応速度 ( $V_{\max}$ , pmol/pmol CYP/min) はEadie-Hofsteeプロットにおいて線形であることを確認した後、WinNonlin Professionalのpharmacodynamic compiled model (model no.101、version4.0.1; Pharsight) で算出した。算出された $K_m$ および $V_{\max}$ はparameter estimateのmean±S.E.として記した。肝固有クリアランス ( $CL_{\text{int}}$ ) は $V_{\max}$ 値を $K_m$ 値で除することにより算出した。ヒト肝ミクロソーム中における各CYP分子種の固有クリアランス ( $CL_{\text{int, expressed CYP}}$ ) は式②に従って算出した。なお、ヒト肝ミクロソーム中の各種CYP含量 (pmol CYP/mg protein) はRowland Yeoらの報告 (2004) [21]に記載してあるデータを使用した。

$$CL_{\text{int, expressed CYP}} \text{ (}\mu\text{l/mg protein/min)} = \frac{V_{\max} \times \text{各種CYP含量 (pmol CYP/mg protein)}}{K_m} \quad \text{式②}$$

クロピドグレルチオラクトン体およびクロピドグレル活性代謝物生成に関与する各CYPの代謝寄与率 ( $f_{\text{mCYP}}$ , %) は式③に従って算出した。

$$f_{\text{mCYP}} \text{ (%) } = \frac{\text{各CYP分子種の} CL_{\text{int, expressed CYP}} \times 100}{\Sigma CL_{\text{int, expressed CYP}}} \quad \text{式③}$$



クロピドグレルおよびクロピドグレルチオラクトン体を基質に使用して、ヒト肝ミクロソームの酵素キネティックパラメータを算出した。その際の生成代謝物反応速度定数 (V) は式④に従って算出した。

$$V \text{ (pmol/mg protein/min)} = \frac{\text{生成代謝物濃度(nmol/mL)} \times 1000}{0.5 \text{ (mg protein/mL)} \times \text{インキュベーション時間(min)}} \quad \text{式④}$$

ヒト肝ミクロソームにおけるクロピドグレルチオラクトン体およびクロピドグレル活性代謝物生成の $K_m$ および $V_{max}$ はEadie-Hofsteeプロットにおいて線形が認められなかったため、式⑤を使用してWinNonlin nonlinear estimation programで算出した。

$$V = \frac{V_{max1} \times S \text{ (}\mu\text{M)}}{K_{m1} + S \text{ (}\mu\text{M)}} + \frac{V_{max2} \times S \text{ (}\mu\text{M)}}{K_{m2} + S \text{ (}\mu\text{M)}} \quad \text{式⑤}$$

Sは基質濃度、 $K_{m1}$ と $V_{max1}$ は高親和性の見かけの $K_m$ 、 $V_{max}$ 、 $K_{m2}$ と $V_{max2}$ は低親和性の見かけの $K_m$ 、 $V_{max}$ を示す。算出された $K_m$ 、 $V_{max}$ は3回の試験のmean±SDとして記す。

CYP抗体および選択的CYP阻害剤存在下の酵素残存活性 (%) は式⑥により算出した。

酵素残存活性 (%)

$$= \frac{\text{CYP抗体またはCYP阻害剤存在下における生成代謝物濃度 (}\mu\text{M)} \times 100}{\text{CYP抗体またはCYP阻害剤非存在下における生成代謝物濃度 (}\mu\text{M)}} \quad \text{式⑥}$$

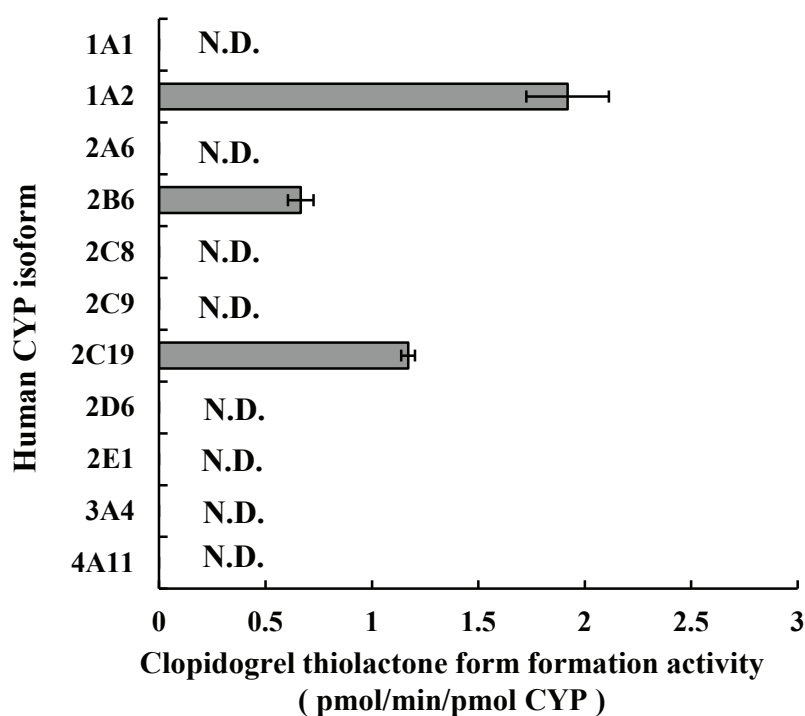
酵素阻害率は式⑦に従って算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = 100 - \text{酵素残存活性 (\%)} \quad \text{式⑦}$$

### 1.3 結果

#### 1.3.1 クロピドグレルチオラクトン体生成に関与するCYP同定

各CYP分子種によるクロピドグレルチオラクトン体生成活性をFigure 1に示した。クロピドグレルはCYP1A2, CYP2B6およびCYP2C19によってクロピドグレルチオラクトン体へと代謝された。CYP1A2, CYP2B6およびCYP2C19によるクロピドグレルチオラクトン体の生成活性はそれぞれ $1.92 \pm 0.19$ 、 $0.666 \pm 0.060$ 、 $1.17 \pm 0.03$  pmole/min/pmol CYPであった。上記CYP分子種以外(CYP1A1, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP4A11)の分子種ではクロピドグレルチオラクトン体の生成は認められなかった。

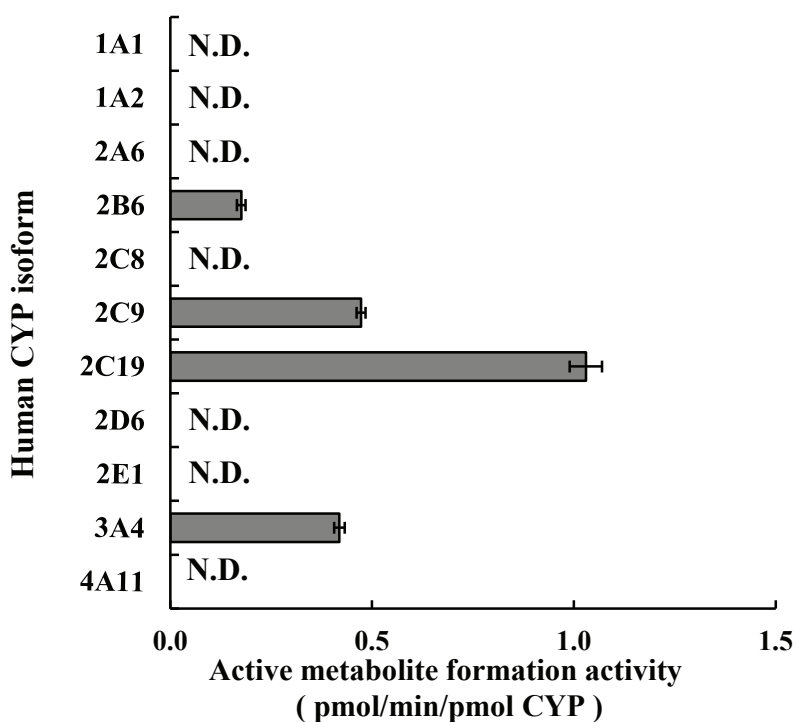


**Figure 1 Formation of clopidogrel thiolactone form from clopidogrel in human CYP-expression system in the presence of NADPH.**

The assays were performed by using the microsomes from baculovirus/insect cells expressing human CYP (Supersomes). Data were expressed as mean  $\pm$  S.D. of three experiments. N.D., not determined.

### 1.3.2 クロピドグレル活性代謝物生成に関与する CYP 同定

各 CYP 分子種によるクロピドグレル活性代謝物の生成活性を Figure 2 に示した。クロピドグレルチオラクトン体は CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19 および CYP3A4 によってクロピドグレル活性代謝物へと代謝された。CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19 および CYP3A4 によるクロピドグレル活性代謝物生成活性はそれぞれ  $0.176 \pm 0.011$ 、 $0.472 \pm 0.011$ 、 $1.03 \pm 0.04$ 、 $0.419 \pm 0.013$  pmole/min/pmol CYP であった。上記 CYP 分子種以外 (CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2C8、CYP2D6、CYP2E1、CYP4A11) の分子種ではクロピドグレル活性代謝物の生成は認められなかった。



**Figure 2 Formation of the pharmacologically active metabolite of clopidogrel from clopidogrel thiolactone form in human CYP-expression system in the presence of NADPH and glutathione.**

The assays were performed by using the microsomes from  $\beta$ -lymphoblastoid cells expressing human CYP. Data were expressed as mean  $\pm$  S.D. of three experiments. N.D., not determined.

### 1.3.3 クロピドグレルチオラクトン体およびクロピドグレル活性代謝物生成 に關与する CYP 分子種の寄与率

CYP 発現系 (CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4) におけるクロピドグレルチオラクトン体生成の  $K_m$  および  $V_{max}$  を算出した (Table 1)。得られた酵素キネティックパラメータとヒト肝ミクロソーム中の各 CYP 含量 (pmol CYP/mg protein) からヒト肝ミクロソーム中における各 CYP 分子種の固有クリアランス ( $CL_{int, \text{expressed CYP}}$ ) を算出した。また、式③に従って各 CYP の代謝寄与率 ( $f_{mpCYP}$ , %) を算出した (Table 1)。Table 1 に示す通りクロピドグレルチオラクトン体生成に關与する CYP 分子種である CYP1A2、CYP2B6 および CYP2C19 の寄与率はそれぞれ 35.8%, 19.4% および 44.9% であり、CYP2C19 の寄与率が最も高かった。

**Table 1 Enzyme kinetic parameters of clopidogrel thiolactone form formation from clopidogrel**

The assays were performed by using the microsomes baculovirus/insect cells expressing human CYP (Supersomes).  $K_m$  and  $V_{max}$  values were expressed as mean  $\pm$  S.E. of parameter estimate.  $CL_{int, \text{expressed CYP}}$  and  $f_{mCYP}$  (contribution ratio of each CYP) values were scaled to eqs. 2 and 3 under *Materials and Methods* to determine contribution.

	Incubation time (min)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ (pmol/pmol CYP/min)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu\text{L}/\text{pmol CYP}/\text{min}$ )	Enzyme Abundances* (pmol CYP/mg protein)	$CL_{int, \text{expressed P450}}$ ( $\mu\text{L}/\text{mg protein}/\text{min}$ )	$f_{mCYP}$ (%)
CYP1A2	1	1.58 $\pm$ 1.35	2.27 $\pm$ 0.46	1.44	52	74.9	35.8
CYP2B6	1	2.08 $\pm$ 0.73	7.66 $\pm$ 0.69	3.68	11	40.5	19.4
CYP2C19	1	1.12 $\pm$ 0.25	7.52 $\pm$ 0.36	6.71	14	93.9	44.9

\* The abundances of CYP1A2, CYP2B6, and CYP2C19 were obtained from the reported data in Rowland Yeo et al. (2004).

CYP 発現系 (CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4) におけるクロピドグレル活性代謝物生成の  $K_m$  および  $V_{max}$  を算出した (Table 2)。上記同様の手法によりヒト肝ミクロソーム中における各 CYP 分子種の固有クリアランス ( $CL_{int, \text{expressed CYP}}$ ) ならびに各 CYP の代謝寄与率 ( $f_{mCYP}$ , %) を算出した (Table 2)。Table 2 に示す通りクロピドグレル活性代謝物生成に関与する CYP 分子種である CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19 および CYP3A4 の寄与率はそれぞれ 32.9%、6.76%、20.6 および 39.8% であり、本酸化過程において寄与率が最も高い分子種は CYP3A4 であった。

**Table 2 Enzyme kinetic parameters of the formation of the pharmacologically active metabolite of clopidogrel from clopidogrel thiolactone form**

The assays were performed using the microsomes baculovirus/insect cells expressing human CYP (SUPERSOMES).  $K_m$  and  $V_{max}$  values were expressed as mean  $\pm$  standard error (SE) of parameter estimate.  $CL_{int}$  and  $f_{mCYP}$  (CYP contribution ratio) values were scaled to equation 2 and 3 under Materials and Method section to determine contribution.

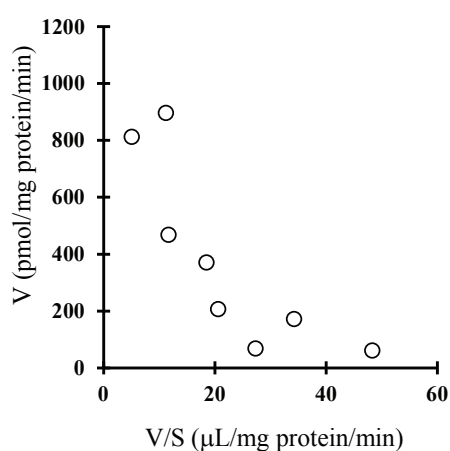
	Incubation time (min)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ (pmol/pmol CYP/min)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu\text{L}/\text{pmol CYP}/\text{min}$ )	Enzyme Abundances* (pmol CYP/mg protein)	$CL_{int, \text{expressed P450}}$ ( $\mu\text{L}/\text{mg protein}/\text{min}$ )	$f_{mCYP}$ (%)
CYP2B6	15	$1.62 \pm 0.08$	$2.48 \pm 0.03$	1.53	11	16.8	32.9
CYP2C9	30	$18.1 \pm 3.8$	$0.855 \pm 0.084$	0.0472	73	3.45	6.76
CYP2C19	15	$12.1 \pm 2.2$	$9.06 \pm 0.68$	0.749	14	10.5	20.6
CYP3A4	15	$27.8 \pm 4.2$	$3.63 \pm 0.29$	0.131	155	20.3	39.8

\* The abundances of CYP3A4, CYP2B6, CYP2C19 and CYP2C9 obtained from the reported data in Rowland-Yeo K et al., (2004).

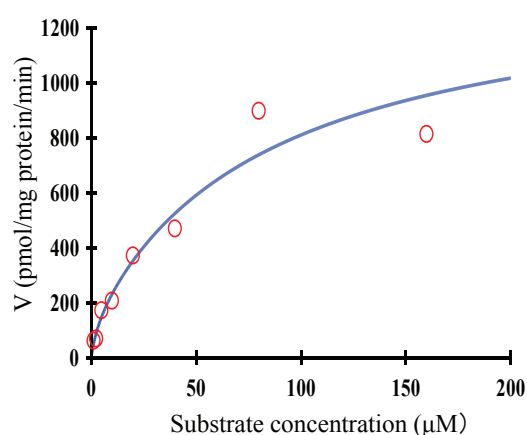
### 1.3.4 ヒト肝ミクロソーム中でのクロピドグレルチオラクトン体およびクロピドグレル活性代謝物生成阻害

ヒト肝ミクロソームにおけるクロピドグレルチオラクトン体生成の $K_m$ 値をEadie-Hofstee plots及びDirect plots (Figure 3) の結果から算出した。ヒト肝ミクロソーム中でのクロピドグレルチオラクトン体生成はEadie-Hofstee plotsにおいて2相性を示したため、式⑤を使用したWinNonlin nonlinear estimation programにより $K_m$ 、 $V_{max}$ を算出した (Direct plots)。 $K_{m1}$ と $V_{max1}$ はそれぞれ $4.70 \pm 2.62 \mu\text{M}$ 、 $144 \pm 61.0 \text{ pmol/mg protein/min}$ であり、 $K_{m2}$ と $V_{max2}$ はそれぞれ $71.9 \pm 30.8 \mu\text{M}$ 、 $1230 \pm 220 \text{ pmol/mg protein/min}$ であった。ヒト肝ミクロソーム中でのクロピドグレルチオラクトン体生成阻害試験の基質添加濃度は親和性の高い $K_{m1}$ 付近の濃度 ( $4 \mu\text{M}$ ) に設定した。

(A)



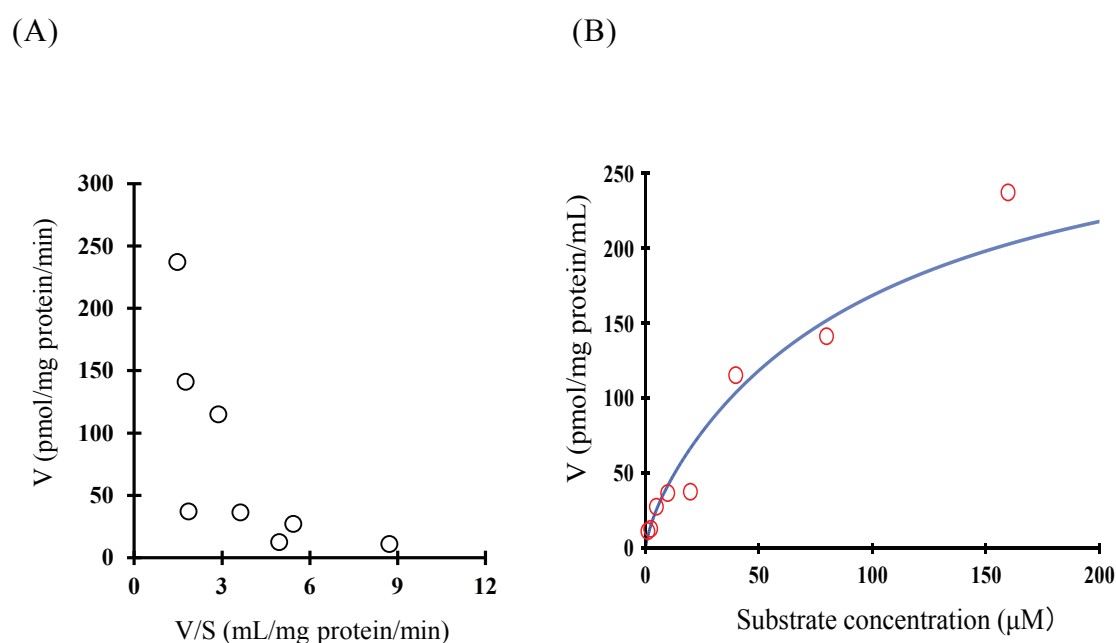
(B)



**Figure 3 Kinetic analysis of clopidogrel thiolactone form formation from clopidogrel in human liver microsomes by an Eadie-Hofstee plot and WinNonlin nonlinear estimation program.**

The human liver microsomes were incubated with 1.25 to 160  $\mu\text{M}$  clopidogrel at 37°C for 5 min. Data are plotted using an Eadie-Hofstee plots (A) and direct plots (B). Line in B represents the curve fit to eq. 5 using WinNonlin nonlinear estimation program. Typical results from one of three experiments are shown.

同様にヒト肝ミクロソームにおけるクロピドグレル活性代謝物生成の $K_m$ 値を算出した。Figure 4にEadie-Hofstee plotsとDirect plotsの結果を示した。ヒト肝ミクロソーム中でのクロピドグレル活性代謝物生成もEadie-Hofstee plotsにおいて2相性を示したため、式⑤を使用したWinNonlin nonlinear estimation programにより $K_m$ 、 $V_{max}$ を算出した (Direct plots)。 $K_{m1}$ と $V_{max1}$ はそれぞれ $2.69 \pm 0.828 \mu\text{M}$ 、 $32.4 \pm 11.6 \text{ pmol/mg protein/min}$ であり、 $K_{m2}$ と $V_{max2}$ はそれぞれ $94.9 \pm 6.05 \mu\text{M}$ 、 $249 \pm 41.0 \text{ pmol/mg protein/min}$ であった。ヒト肝ミクロソーム中でのクロピドグレル活性代謝物生成阻害試験の基質添加濃度は親和性の高い $K_{m1}$ 付近の濃度 ( $3 \mu\text{M}$ ) に設定した。



**Figure 4 Kinetic analysis of the active metabolite formation from clopidogrel thiolactone form in human liver microsome by Eadie-Hofstee plots and WinNonlin nonlinear estimation program.**

The human liver microsomes were incubated with 1.25 to 160  $\mu\text{M}$  clopidogrel thiolactone form at  $37^\circ\text{C}$  for 15 min. Data are plotted using Eadie-Hofstee plots (A) and direct plots (B). Line in B represents the curve fit to eq. 5 using WinNonlin nonlinear estimation program. Typical results from one of three experiments are shown.

モノクロナールおよびポリクロナールCYP抗体によるクロピドグレルチオラクトン体およびクロピドグレル活性代謝物の生成阻害率をTable 3にまとめた。CYP1A2、CYP2B6およびCYP2C19モノクロナール抗体によるクロピドグレルチオラクトン体の生成阻害率はそれぞれ $30.9 \pm 9.0\%$ 、 $26.0 \pm 2.5\%$ 、および $42.0 \pm 8.1\%$ であり、CYP2C19モノクロナール抗体による阻害率が最も高かった。

CYP2B6、CYP2C19、CYP3A4モノクロナール抗体およびCYP2C9ポリクロナール抗体によるクロピドグレル活性代謝物生成阻害率はそれぞれ $54.3 \pm 3.4\%$ 、 $32.9 \pm 4.2\%$ 、 $31.3 \pm 5.3\%$ 、および $13.5 \pm 4.4\%$ であり、CYP2B6モノクロナール抗体による阻害率が最も高かった。

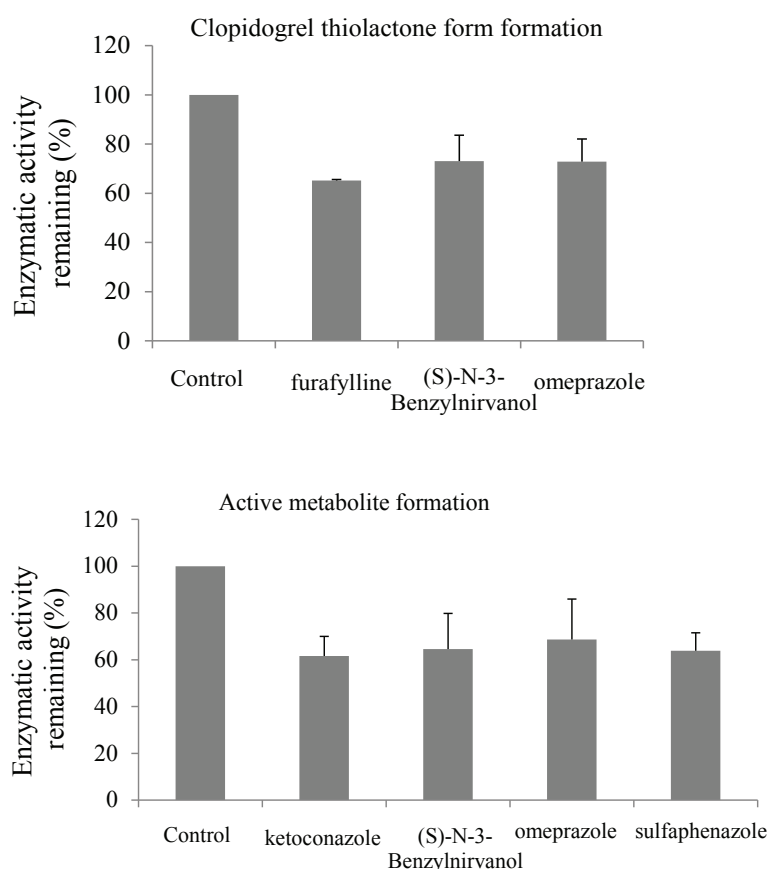
**Table 3 Effect of anti-CYP antibodies on the clopidogrel thiolactone form formation from clopidogrel and active metabolite formation from clopidogrel thiolactone form.**

The assays were performed by using human liver microsomes. Anti-CYP1A2, anti-CYP2B6, anti-CYP2C19, and anti-CYP3A4 were monoclonal antibodies, and anti-CYP2C9 was polyclonal antibody. The inhibition ratio values were calculated using eqs. 4 and 5 under Materials and Methods. Data were expressed as mean  $\pm$  S.D. of three experiments.

	Inhibition ratio (%)	
	Clopidogrel thiolactone form formation	Active metabolite formation
Anti-CYP1A2	$30.9 \pm 9.0$	
Anti-CYP2B6	$26.0 \pm 2.5$	$54.3 \pm 3.4$
Anti-CYP2C9		$13.5 \pm 4.4$
Anti-CYP2C19	$42.0 \pm 8.1$	$32.9 \pm 4.2$
Anti-CYP3A4		$31.3 \pm 5.3$



CYP1A2 の阻害剤として furafylline、CYP2C9 の阻害剤として sulfaphenazole、CYP2C19 の阻害剤として (S)-N-3-benzyl nirvanol と omeprazole、CYP3A4 の阻害剤として ketoconazole を使用して、クロピドグレルチオラクトン体およびクロピドグレル活性代謝物生成における残存酵素活性を Figure 5 に示した。クロピドグレルチオラクトン体の生成は 10  $\mu$ M furafylline 添加により  $34.9 \pm 0.5\%$ 、10  $\mu$ M (S)-N-3-Benzyl nirvanol および 10  $\mu$ M omeprazole 添加によりそれぞれ  $26.9 \pm 10.5\%$  および  $27.1 \pm 9.2\%$  阻害された。クロピドグレル活性代謝物の生成は 10  $\mu$ M sulfaphenazole 添加により  $36.2 \pm 7.7\%$ 、10  $\mu$ M (S)-N-3-Benzyl nirvanol および 10  $\mu$ M omeprazole 添加によりそれぞれ  $35.4 \pm 15.2\%$  および  $31.3 \pm 17.3\%$  阻害され、2  $\mu$ M ketoconazole 添加により  $38.4 \pm 8.4\%$  阻害された。



**Figure 5** Effects of the selective chemical inhibitors for CYP1A2 (furafylline), CYP3A4 (ketoconazole), CYP2C19 [(S)-N-3-benzyl nirvanol, omeprazole], and CYP2C9 (sulfaphenazole) on the clopidogrel thiolactone form formation and the active metabolite formation by pooled human liver microsome.

Data were expressed as mean  $\pm$  S.D. of three experiments.

## 1.4 考察

本章ではクロピドグレルからクロピドグレル活性代謝物生成過程における 2 段階酸化過程 (Figure 4S、p14) に関与する CYP 分子種の同定ならびに各 CYP 分子種の代謝寄与率を明らかにした。

クロピドグレルからクロピドグレルチオラクトン体生成に関与する CYP 分子種は CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19 であった。また、クロピドグレルチオラクトン体からクロピドグレル活性代謝物生成に関与する CYP 分子種は CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 であった。Savi らは (1994 年) クロピドグレル活性代謝物生成に CYP1A が関与すると報告したが [22]、本研究において CYP1A2 が関与するのはクロピドグレルチオラクトン体生成であることが明らかとなった。

Dansette らはクロピドグレル活性代謝物は CYP によりクロピドグレルチオラクトン体のチオフェン環部位が酸化され、その後、生成したクロピドグレルスルフェン酸中間代謝物が生体内のグルタチオンと反応して生成すると報告している [23]。さらに、他の論文においてもチエノピリジン系抗血小板薬の活性代謝物生成には還元剤としてグルタチオンの存在が必要であることが報告されていたことから [24, 25]、本研究のクロピドグレル活性代謝物生成反応はグルタチオン存在下で評価した。Savi らの *in vitro* 反応条件 [22] にはグルタチオンを添加していないことからこのような相違が観察されたと考察する。

酵素キネティックパラメータから算出したクロピドグレルチオラクトン体生成に関与する CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19 の代謝寄与率はそれぞれ 35.8%、19.4% で 44.9% であった。ヒト肝ミクロソーム中において、クロピドグレルチオラクトン体生成は CYP1A2、CYP2B6 および CYP2C19 モノクロナール抗体により、それぞれ  $30.9 \pm 9.0\%$ 、 $26.0 \pm 2.5\%$ 、および  $42.0 \pm 8.1\%$  阻害された。さらに、ヒト肝ミクロソーム中でクロピドグレルチオラクトン体生成は  $10 \mu\text{M}$  furafylline (CYP1A2 阻害剤) 添加により  $34.9 \pm 0.5\%$ 、 $10 \mu\text{M}$  (*S*)-*N*-3-Benzyl nirvanol (CYP2C19 阻害剤) および  $10 \mu\text{M}$  omeprazole (CYP2C19 阻害剤) 添加により、それぞれ  $26.9 \pm 10.5\%$  および  $27.1 \pm 9.2\%$  阻害された。抗体ならびに CYP 阻害剤を使用した試験結果と酵素キネティックパラメータから算出した代謝寄与率の結果から、クロピドグレルチオラクトン体生成に関与する CYP 分子種の代謝寄与率は CYP2C19 > CYP1A2 > CYP2B6 の順に高いと考

察する。

酵素キネティックパラメータから算出したクロピドグレル活性代謝物生成に  
関与する CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 の代謝寄与率はそれぞれ 32.9%、  
6.76%、20.6%および 39.8%であった。ヒト肝ミクロソーム中において、クロピ  
ドグレル活性代謝物生成は CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4 モノクロナール抗体お  
よび CYP2C9 ポリクロナール抗体によりそれぞれ  $54.3 \pm 3.4\%$ 、 $32.9 \pm 4.2\%$ 、 $31.3 \pm$   
 $5.3\%$  および  $13.5 \pm 4.4\%$  阻害された。さらに、ヒト肝ミクロソーム中でクロピ  
ドグレル活性代謝物が  $10 \mu\text{M}$  sulfaphenazole (CYP2C9 阻害剤) 添加により  $36.2$   
 $\pm 7.7\%$ 、 $10 \mu\text{M}$  (*S*)-*N*-3-Benzyl nirvanol および  $10 \mu\text{M}$  omeprazole 添加によりそれ  
ぞれ  $35.4 \pm 15.2\%$  および  $31.3 \pm 17.3\%$  阻害され、 $2 \mu\text{M}$  ketoconazole (CYP3A4 阻  
害剤) 添加により  $38.4 \pm 8.4\%$  阻害された。抗体ならびに CYP 阻害剤を使用し  
た試験結果と酵素キネティックパラメータから算出した代謝寄与率の結果から、  
クロピドグレル活性代謝物生成には CYP2B6、CYP2C19、CYP3A4 が同レベル  
で寄与していると考えする。

本章において CYP2C19 がクロピドグレルからクロピドグレル活性代謝物生  
成過程における 2 段階酸化過程の両過程に大きく寄与していることを明らかに  
した。実際、CYP2C19 の代謝活性がほとんどない個体群 (poor metabolizer; PM)、  
活性が低下している個体群 (intermediate metabolizer; IM)、活性が高い個体群  
(extensive metabolizer; EM) にクロピドグレルを経口投与し、血漿中活性代謝  
物濃度と血小板凝集抑制作用の関連性を評価した臨床試験では、CYP2C19 PM  
群で活性代謝物生成ならびに血小板凝集抑制作用が低いという報告がされてい  
る [12, 26, 27, 28, 29]。このような臨床結果と本研究結果から、CYP2C19 がクロ  
ピドグレル活性代謝物生成に大きな影響を与え、薬理効果の個体間変動に大き  
く寄与していると考えする。

## 1.5 小括

第一章の検討結果から、以下のことが明らかとなった。

- ・クロピドグレルからクロピドグレルチオラクトン体生成に関与する CYP 分子種は CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19 であり、その寄与率はそれぞれ 35.8%、19.4%、44.9%であった。

- ・クロピドグレルチオラクトン体からクロピドグレル活性代謝物生成に関与する CYP 分子種は CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 であり、その寄与率はそれぞれ 32.9%、6.76%、20.6%、39.8%であった。

- ・クロピドグレル活性代謝物生成には 2 段階の酸化代謝を要するが、この両酸化代謝に CYP2C19 が大きく寄与していることがクロピドグレルの薬効発現における個体間変動の要因の 1 つであることが示された。

## 第2章 プラスグレルの加水分解反応に関与する新規ヒト小腸中 RKIP (Raf kinase inhibitor protein)の同定

### 2.1 小序

本章ではプラスグレルが低用量で薬効発現し、その効果が迅速、且つ、確実である要因を明らかにするため、プラスグレルの初発代謝である加水分解反応に注目した。プラスグレルの活性代謝物生成経路は Figure 6S に示す通り[25]、生体内で加水分解を受けチオラクトン体に代謝され、さらに CYP による酸化代謝を受けて、活性代謝物へと変換される。

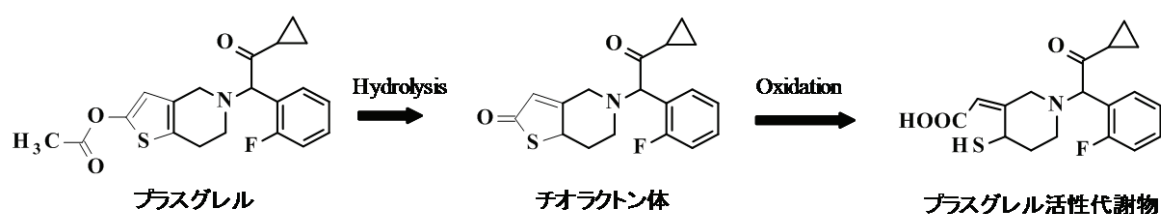


Figure 6S Metabolic pathway of prasugrel

(Rehmel JL et al. *Drug Metab Dispos* 2006; 34: 600-607 から引用し、一部改変)

この加水分解反応が小腸中で速やかに進行し、プラスグレルのほとんどがチオラクトン体へと代謝されることが、薬効発現が迅速、且つ、低用量でも確実な薬効を示す要因の1つと考えられる。プラスグレルは小腸ミクロソーム中のヒトカルボキシルエステラーゼ2 (hCE2) によって加水分解を受けるが、一方で、hCE2の加水分解活性はプラスグレル濃度109  $\mu\text{M}$ 以上になると低下する[30]。この濃度(109  $\mu\text{M}$ )は250 mLの水でプラスグレル10 mgを服薬した際の濃度にほぼ匹敵する[31]。臨床試験 (*in vivo*) では、プラスグレルを2.5 mg, 10 mg, 75 mgの用量で服薬した際のチオラクトン体の血漿中濃度は線形であった[32]。つまり、*in vitro*の結果を考慮すると、75 mgの用量でチオラクトン体の血漿中濃度を線形に保つためには、hCE2以外の加水分解酵素の存在が考えられる。

そこで、本章ではヒト小腸中に存在するhCE2以外の加水分解酵素を同定し、加水分解酵素の代謝寄与について評価した。

## 2.2 実験材料および方法

### 2.2.1 被験物質および試薬

プラスグレル、チオラクトン体およびR-135766 (Figure 6SおよびFigure 5S) [33] は宇部興産株式会社 (Ube, Japan) で合成された。R-135766はチオラクトン体の LC-MS/MS測定用内部標準物質として使用した。プロテアーゼ阻害剤カクテル (cOmplete mini: mixture of serine, cysteine and metalloprotease inhibitors) はロシユ・ライフサイエンス社 (Mannheim, Germany) から、Bis p-nitrophenyl phosphate (BNPP) はSigma-Aldrich (St. Louis, MO) から、Laemmli sample buffer、Flamingo fluorescent gel stain、5%–20% SDS-PAGE、12.5%および7.5% SDS-PAGE (Ready Gel J)、ポリビニリデンジフロライド (PVDF) メンブレンはバイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社 (Richmond, CA) から、Trypsin溶液はプロメガ株式会社 (Madison, WI) からそれぞれ購入した。その他の試薬は、市販の特級、一級、HPLC用のものを用いた。

### 2.2.2 生物学的試料

プールドヒト小腸 S9 (雌雄 mixture) は Sekisui Xeno-Tech 社 (Kansas, KS) より購入し、個体別小腸 S9 (HIS-063-S3: 16.6 mg protein/mL、HIS-067-S3: 12.6 mg protein/mL、HIS-084-S3: 19.9 mg protein/mL、HIS-111-S3: 5.7 mg protein/mL) は特定非営利活動法人 HAB 研究機構 (Tokyo, Japan) より購入した。

FreeStyle 293F 細胞、細胞培養液、遺伝子導入試薬 293 フェクチンおよびマウス抗ヒト Raf Kinase Inhibitor Protein (hRKIP) 抗体はインビトロジェン株式会社 (Carlsbad, CA) から、FLAG M2 agarose は Sigma-Aldrich から、免疫沈降実験に使用したウサギ抗 hRKIP 抗体とコントロールウサギ IgG は株式会社免疫生物研究所 (Gunma, Japan) から、牛血清アルブミンはサーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社 (Rockford, IL) からそれぞれ購入した。

hRKIPポリクロナール抗体 (RKIP FL-187: sc-28837) はSanta Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) から、ウサギ抗hCE2モノクロナール抗体は株式会社免疫生物研究所から、Amersham ECL-anti-rabbit IgG Horseradish peroxidase (HRP) linked species-specific whole antibody、Amersham ECL PlusまたはAdvanceウェスタンブロットティング検出キットはGEヘルスケアジャパン株式会社 (Tokyo, Japan)

から、Peptide N-glycosidase F (PNGase F, Lot 0360910) はニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株式会社 (Tokyo, Japan) からそれぞれ購入した。

### 2.2.3 サル小腸細胞画分の調製

サル小腸細胞画分の調製は第一三共株式会社動物倫理規定に従って、4°C下で実施した。ハムリー株式会社 (Ibaragi, Japan) から入手したカニクイサル小腸に9倍量のホモジネート緩衝液 (0.25 Mショ糖とプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む10 mM HEPES-NaOH緩衝液 (pH 7.0)) を加え、ポリトロンでホモジネートした試料を遠心 (9,000×g, 4°C, 30 min) し、S9画分を調製した。さらに、S9の一部を超遠心 (105,000×g, 4°C, 60 min) し、上清をサイトソル画分、沈殿をマイクロソーム画分とした。これら調製された各細胞画分 (ホモジネート・S9・マイクロソーム・サイトソル) は加水分解酵素の局在化の検討に用いた。

### 2.2.4 加水分解酵素の局在化

100 mM HEPES緩衝液とサル小腸ホモジネート・S9・マイクロソームおよびサイトソル (各細胞画分終濃度: 1 mg protein/mL) の各反応液にプラスグレルDMSO溶液を終濃度6 mMになるように添加し、37°C下で15分間インキュベートした。本反応液50 µLにメタノール100 µLを添加し、反応停止後、試料をUltrafree-MC 0.45 mm PVDFメンブランフィルターでフィルターろ過することにより、得られた試料2 µLをLC-MS/MS分析装置に注入し、チオラクトン体濃度を測定した

### 2.2.5 酵素精製

#### 2.2.5.1 ヒト小腸 S9 とサル小腸サイトソル中の加水分解酵素精製

200 µL のヒト小腸 S9 (10 mg protein/mL) をゲルろ過カラム (Superdex 75, GEヘルスケア社) に負荷し、流速 0.5 mL/mL で 20 mL の 100 mM HEPES 緩衝液 (pH7.0) を流し、溶出液を 0.5 mL ずつ回収した。プラスグレルの加水分解活性を確認するため、各溶出液 30 µL にプラスグレル DMSO 溶液を終濃度 6 mM になるように添加し、BNPP (終濃度: 1 mM) 存在下、非存在下で 60 分間、37°C 下でインキュベートした。本反応液 50 µL にメタノール 100 µL を添加し、反応を停止させた。以降、2.2.4 項に記載した処理と同様の操作を行い、チオラクト



ン体濃度を測定した。サル小腸サイトソルも同様の操作を行い、各溶出液中のチオラクトン体濃度を測定した。

#### 2.2.5.2 サル小腸サイトソル中の加水分解酵素精製

サル小腸（5 g）から調製された小腸サイトソルを 20 mM 酢酸ナトリウム溶液（pH6.0）で透析し、透析液を HiPrep Heparin カラム（GE ヘルスケア社）に負荷した。透析液負荷後、試料を 20 mL の塩化ナトリウム溶液（濃度勾配 0-0.5 M）でグラジエント溶出し、溶出液を 0.5 mL ずつ回収した。プラスグレルの加水分解活性を BNPP 存在下、非存在下で確認するため、2.2.5.1 と同様の操作をした。また、溶出液中への hCE2 混入を確認するため、ウサギ抗 hCE2 モノクロナール抗体（1 次抗体）を用いたウェスタンブロッティングをした。ウェスタンブロッティング条件は別途、2.2.11.2 に記載した。

HiPrep Heparin カラム溶出液のフラクション No.5-10 をプールし、1 mL サイズの mono S 5/50 GL カラム（GE ヘルスケア社）に負荷し、試料を 30 mL の塩化ナトリウム溶液（濃度勾配 0-0.5 M）でグラジエント溶出し、溶出液を 0.5 mL ずつ回収した。2.2.5.1 と同様の操作をし、プラスグレルの加水分解活性を BNPP 非存在下で確認後、プラスグレル加水分解活性が認められたフラクションをプールし、20 mM Tris-HCl 溶液（pH9.0）で透析した。その後、透析液を 1 mL サイズの mono Q 5/50 GL カラム（GE ヘルスケア社）に負荷し、試料を 30 mL の塩化ナトリウム溶液（濃度勾配 0-0.5 M）でグラジエント溶出し、溶出液を 0.5 mL ずつ回収した。プラスグレルの加水分解活性を確認するため、2.2.5.1 と同様の操作をした。また、溶出液の一部を 5% - 20% SDS-PAGE ゲルを用いて電気泳動し、Flamingo 蛍光ゲルステインでゲル染色後、検出されたタンパク質を molecular imager FX（バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社）でスキャンした。最後にプラスグレル加水分解活性が高かった mono Q 5/50 GL カラム溶出液をプールし、20 mM 酢酸ナトリウム溶液（pH6.0）で透析後、透析液を 0.24 mL サイズの mini S PC 3.2/3 カラム（GE ヘルスケア社）に負荷した。負荷試料は 7.2 mL の塩化ナトリウム溶液（濃度勾配 0-0.35 M）でグラジエント溶出し、各溶出液（0.5 mL）中のプラスグレル加水分解活性と SDS-PAGE によるタンパク質検出を上記同様の方法で実施した。



## 2.2.6 LC-MS/MS 法によるタンパク質同定

Mini S カラムで分画後、活性画分を SDS-PAGE により分離し、フラミンゴ染色を行った。染色後、活性と相関するバンドを切り出し還元アルキル化、トリプシン消化を行った。16 時間後、終濃度 5%の蟻酸を添加し、消化ペプチドをゲル片から抽出した。LC-MS/MS 装置は DiNa ナノフロー液体クロマトグラフィーを装備した LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) を使用した。測定条件として、ロックマス使用、解像度 15,000、MS スペクトル中最も強度の強い 2 価以上の 6 個のプレカーサーイオンに対して、データ依存的に MS/MS スペクトルを取得した。データベース検索には Mascot を使用し、データベースには Swiss-Prot (human) を使用した。検索条件として、ペプチドの未切断 2 まで許容、fixed modification にはシステイン残基のカルバミドメチル化、variable modification にはタンパク質 N 末端アセチル化、メチオニン残基の酸化、アスパラギン、グルタミン残基の脱アミノ化をそれぞれ選択した。ペプチドの計算質量との許容範囲を 5 ppm、プロダクトイオンの計算値との許容範囲を 0.8 Da に設定し、質量値はモノアイソトピックを、装置タイプは ESI-TRAP を選択した。ペプチドの同定は自家製のソフトを用いて、FDR (False Discovery Rate) が 1%以下になるフィルターを使用した。

### 2.2.7 hCE2 および hRKIP 発現系調製

hCE2 発現ベクターの調製は石塚らの方法に従って実施した[34]。RKIP はヒト 293F 細胞の cDNA library からクローンし、久保田らの手法[35]に従ってサイトメガウィルス由来のプロモーター下で N 末端に FLAG タグを付けた RKIP 発現ベクターを調製した。緑色蛍光タンパク質 (GFP)、hRKIP および hCE2 の発現ベクター (30  $\mu\text{g}$ ) を 293 フェクチンを用いて 293F 細胞 ( $3 \times 10^7$  cells) に導入した。遺伝子導入された細胞を 72 時間培養後、培養細胞を遠心して回収し、lysis バッファー (20mM Tris-HCl (pH7.5), 500mM NaCl, 0.1% NP-40) 中で懸濁させた (氷冷下、5 分)。細胞懸濁液を遠心後、細胞可溶化画分 300 $\mu\text{L}$  に抗 FLAG M2 アガロース (FLAG 抗体固定化ビーズ) 5 $\mu\text{L}$  を添加し、4 $^{\circ}\text{C}$  下で 2 時間インキュベートした。その後、FLAG 抗体固定化ビーズを遠心し、lysis バッファー 500 $\mu\text{L}$  で 3 回洗浄した。FLAG 抗体固定化ビーズに結合したタンパク質を 0.1 mg/mL FLAG ペプチド含有 lysis バッファー 100 $\mu\text{L}$  で溶出し、recombinant hRKIP とした。Recombinant hCE2 は hCE2 の培養上清を用いて、上記同様の操作を行い、調製した。さらに、ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株式会社のプロトコルに従って、PNGase F で処理をしたものをウェスタンブロッティングの定量用標品として使用した。

### 2.2.8 チオラクトン体生成における酵素キネティクスパラメータ算出

基質にプラスグレルを使用して、チオラクトン体生成時の hRKIP および hCE2 recombinant の酵素キネティクスパラメータを算出する目的で以下の試験をした。Recombinant hRKIP (終濃度: 1  $\mu\text{g protein/mL}$ ) または recombinant hCE2 (終濃度: 0.25  $\mu\text{g protein/mL}$ ) を添加した 0.1N HEPES 緩衝液 (pH7.0) 198  $\mu\text{L}$  を 37 $^{\circ}\text{C}$  下で 5 分間インキュベート後、各反応液に 2 $\mu\text{L}$  のプラスグレル DMSO 溶液 (終濃度 0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、80、160、320 および 640  $\mu\text{M}$ ) をそれぞれ添加し、37 $^{\circ}\text{C}$  下で 2 分間インキュベートした。本反応液 50  $\mu\text{L}$  にアセトニトリル 100  $\mu\text{L}$  と 2  $\mu\text{M}$  R-135766 アセトニトリル溶液 50  $\mu\text{L}$  を添加し、遠心分離 (20,800 $\times g$ , 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ ) 後、上清 5  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS 分析装置に注入し、チオラクトン体濃度を測定した。

### 2.2.9 ヒト小腸 S9 中の hRKIP および hCE2 発現量

hRKIP および hCE2 の代謝寄与率を算出するため、個体別ヒト小腸 S9 (n=4) 中の hRKIP および hCE2 含量をウェスタンブロッティング分析で確認した。

Recombinant hRKIP (100 µg protein/mL) を 0.1N HEPES 緩衝液 (pH7.0) で希釈することにより 2.5、5、10、15 および 20 µg protein/mL の recombinant hRKIP を調製し、ヒト小腸 S9 中 hRKIP 含量測定時の検量線用試料とした。個体別ヒト小腸 S9 は 0.1N HEPES 緩衝液 (pH7.0) で希釈し、0.8 mg protein/mL の濃度に調製した。検量線用試料、各個体別ヒト小腸 S9 (0.8 mg protein/mL) および GFP (Recombinant のコントロールとして使用) に 5%メルカプトエタノールを含む Laemmli サンプルバッファーを 2 倍量添加し、100°C 下で 5 分間加熱処理した。本試料 10 µL を 12.5% SDS-PAGE に負荷し、電気泳動 (140V, 80 min) 後、ウェスタンブロッティングを行った (2.2.11.2 参照)。

PNGase F 処理をした recombinant hCE2 (50 µg protein/mL) を 5%メルカプトエタノールを含む Laemmli サンプルバッファーで希釈し、1、2.5、5、7.5 および 10 µg protein/mL の濃度で調製し、100°C 下で 5 分間加熱処理した。本試料をヒト小腸 S9 中 hCE2 含量測定時の検量線用試料とした。個体別ヒト小腸 S9 は 0.1N HEPES 緩衝液 (pH7.0) で希釈し、1.6 mg protein/mL の濃度に調製後、PNGase F で処理した。その後、各個体別ヒト小腸 S9 に 5%メルカプトエタノールを含む Laemmli サンプルバッファーを 2 倍量添加し、100°C 下で 5 分間加熱処理した。本試料 10 µL を 7.5% SDS-PAGE に負荷し、電気泳動 (140V, 80 min) 後、ウェスタンブロッティングを行った (2.2.11.2 参照)。

ウェスタンブロッティング後、ヒト小腸 S9 中 hRKIP および hCE2 発現量は定量ウェスタンブロット解析法で測定した。定量ウェスタンブロット解析法については 2.2.11.3 に記載した。

#### 2.2.10 ヒト小腸 S9 中でのチオラクトン体生成阻害

抗 hRKIP 抗体を用いて hRKIP タンパク質を枯渇させ、その後、BNPP を使用して、チオラクトン体の生成阻害を検討した。個体別ヒト小腸 S9 (n=2, HIS-063-S3, HIS-111-S3) 20 µg protein/tube に抗 hRKIP 抗体またはコントロールウサギ IgG 抗体 (20 µg protein/tube) を加えて TNN 緩衝液 (20 mM Tris (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1% NP-40) 中で 4°C 下、一晩インキュベートした。その後、試料に 10 µL の protein G-Sepharose を加え、ローテーターで 4°C 下、3 時間攪拌し、免疫複合体を取り除いた。hRKIP タンパク質の枯渇程度はウサギ抗 hRKIP 抗体を用いたウェスタンブロッティング法 2 で確認した (2.2.11.3 参照)。

抗hRKIP抗体またはコントロールウサギIgG抗体で免疫枯渇させたヒト小腸 S9サンプル (終濃度: 0.2 mg protein/mL) と BNPP (終濃度: 0.1 mM) 存在下、非存在下の 50 mM HEPES 緩衝液 (pH7.0) 100µL を 37°C 下で 2 分間インキュベートした。プレインキュベーション後、プラスグレル DMSO 溶液 (終濃度 40 µM) を添加し、37°C 下で 20 分間インキュベートした溶液 10 µL に 90 µL の 50% メタノール溶液を添加して反応停止した。その後、本試料 25 µL に 75 µL の 50% メタノール溶液を添加した試料を LC-MS/MS 分析装置に注入し、チオラクトン体濃度を測定した。

## 2.2.11 分析法

### 2.2.11.1 LC-MS/MS 条件

チオラクトン体測定のための LC-MS/MS 条件を以下に記載した。

HPLC 装置 : Alliance 2695 Separations Module (Waters Corp)

質量分析装置 : Quattro-LC-MS/MS system (Micromass UK., Ltd.)

分析用カラム : Inertsil ODS-3 column

(2.1 × 150 mm, 粒子径 5 μm, ジーエルサイエンス株式会社)

カラム温度 : 40°C

移動相 : メタノール/蒸留水/TFA = 570/430/0.5 (v/v/v) または  
520/480/0.5 (v/v/v)

流速 : 0.2 mL/min

イオン化法 : Electro-spray ionization (ESI) – positive ion detection mode

デゾルベーション温度 : 350°C

ソース温度 : 120°C

Capillary voltage : 3.5kV

Cone voltage : 20 V

Collision energy : 25 eV

定量時のモニタリングイオン :

チオラクトン体,  $m/z$  332→149

R-135766 (内部標準物質),  $m/z$  548→206

測定対象物と内部標準物質の面積比を用いた最小二乗法で検量線を作成した。チオラクトン体のLLOQは0.025 μMであり、0.025-500 μMの範囲で線形を示した。データ解析にはMassLynx version 3.4 software (Waters Corp.) またはMasslynx version 4.0 SP4 software (Waters Corp.) を用いた。

## 2.2.11.2 ウェスタンブロッティング法 1

### ①メンブレン転写

使用メンブレン：PVDF

ブロッティング装置：Transblot (Bio-Rad Laboratories, Inc.)

ブロッティング電圧および時間：15 V、40 分

### ②ブロッキング操作：

ブロッキングバッファーで室温、1 時間インキュベート

ブロッキングバッファー：

0.05% Tween 20 と 2% スキムミルク含有トリス緩衝液

### ③メンブレン洗浄：

0.05% Tween 20 含有トリス緩衝液 (TTBS) で行った。

### ④一次抗体反応：

メンブレンと一次抗体を室温で 1 時間インキュベート

一次抗体：hRKIP ポリクロナール抗体を TTBS で 400 倍希釈して使用

ウサギ抗 hCE2 モノクロナール抗体を TTBS で 5000 倍希釈して使用

### ⑤二次抗体反応：

一次抗体反応終了後、メンブレンを TTBS で洗浄（室温下、30 分インキュベート）し、メンブレンと二次抗体を室温で 1 時間インキュベート

二次抗体：

ECL anti-rabbit IgG-HRP-linked antibody を TTBS で 5000 倍希釈して使用  
(hRKIP 用)

ECL anti-rabbit IgG-HRP-linked antibody を TTBS で 20000 倍希釈して使用  
(hCE2 用)

### ⑥化学発光による検出：

二次抗体反応終了後、メンブレンを TTBS で洗浄（室温下、30 分インキュベート）し、メンブレンと化学発光試薬 (Lumigen TMA-6, Western blotting kits) を室温下で 5 分間インキュベーションした。

ルミノイメージアナライザー (LAS-4000UVmini; Fujifilm Co., Ltd) で化学発光物質を検出した。

### 2.2.11.3 ウェスタンブロッティング法 2

hRKIP タンパク質枯濁後のヒト小腸 S9 サンプル (10  $\mu$ L) に 5%メルカプトエタノールを含む Laemmli サンプルバッファーを 2 倍量添加し、100°C 下で 5 分間加熱処理した。加熱処理後の試料 10  $\mu$ L を 5%–20% SDS-PAGE に負荷し、電気泳動 (140V, 80 min) 後、PVDF メンブレンにタンパク質を転写した。その後、PVDF メンブレンを 10% Aqua block 含有 TBS-T 溶液 (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20) 中で室温下、1 時間インキュベートした。抗 hRKIP 抗体 (5000 倍希釈) または抗  $\beta$ -アクチン抗体 (5000 倍希釈) を用いて、一次抗体反応を行った。二次抗体反応には ECL anti-mouse IgG-HRP-linked antibody (50,000 倍希釈) を用いた。二次抗体反応終了後、メンブレンを TBS-T 溶液で洗浄 (室温下、30 分インキュベーション) し、ECL Plus または ECL Advance ウェスタンブロッティング検出キットを用いて目的タンパク質を化学発光させ、NightOWL イメージングシステムで (Berthold Technologies GmbH, BadWildbad, Germany) で検出した。

### 2.2.11.4 定量ウェスタンブロット解析法

ウェスタンブロッティング後、検量線用試料およびヒト小腸 S9 サンプル中の各酵素 (hRKIP、hCE2) の化学発光物質質量 (AU) をルミノイメーリアナライザー (LAS-4000UVmini; Fujifilm Co., Ltd) で検出し、Multi Gauge version 3.0 software (Fujifilm Corp.) を使用して AU 値を計算した。得られた AU 値を各 recombinant 濃度に対してプロットし、最小二乗法で検量線を作成した。hRKIP および hCE2 発現量測定用の検量線範囲はそれぞれ 12.5 ng/10  $\mu$ L から 100 ng/10  $\mu$ L および 10 ng/10  $\mu$ L から 100 ng/10  $\mu$ L とした。

## 2.2.12 データ解析方法

代謝物生成速度 (V, pmol/min/μg protein) は下記式①に従って算出した。

V (pmol/min/μg protein)

$$= \frac{\text{生成代謝物濃度(nmol/mL)} \times 1000}{1 \text{ or } 0.25 (\mu\text{g protein/mL}) \times \text{インキュベーション時間(min)}} \quad \text{式①}$$

Recombinant hRKIPによるチオラクトン体生成はEadie-Hofsteeプロット (X軸: V/基質濃度、Y軸: V) で線形であることが示されたため、WinNonlin Professionalのpharmacodynamic compiled model (model no.101、version4.0.1; Pharsight) を使用してミカエリス-メンテン定数 ( $K_m$ , μM) と最大反応速度 ( $V_{max}$ , pmol/min/μg protein) を算出した。チオラクトン体生成に対するrecombinant hCE2の $K_m$ および $V_{max}$ はEadie-Hofsteeプロットにおいて線形が認められず、基質阻害キネティクス特性を示したため、式②を使用したWinNonlin nonlinear estimation programにより算出した。Sは基質濃度 (μM)、 $K_i$ は基質阻害定数を示す。

$$V = \frac{V_{max}}{(1 + (K_m/S) + (S/K_i))} \quad \text{式②}$$

ヒト小腸S9中におけるチオラクトン体生成に関与するhRKIPとhCE2の寄与率は式③、④に従って算出した。

$CL_{int}$  for each enzyme (μl/min/ng enzyme concentration)

$$= \frac{V_{max} \times \text{各enzyme concentration (ng/}\mu\text{g ヒト小腸S9)}}{K_m} \quad \text{式③}$$

$$\text{寄与率 (\%)} = \frac{CL_{int} \text{ for each enzyme} \times 100}{\Sigma CL_{int} \text{ for each enzyme}} \quad \text{式④}$$



阻害試験における残存加水分解活性 (%) は式⑤、⑥に従って算出した。

抗hRKIP抗体免疫枯渇処理ヒト小腸S9の残存加水分解活性 (%)

$$= \frac{\text{BNPP存在下、または非存在下の抗hRKIP抗体免疫枯渇処理ヒト小腸S9 試料中でのチオラクトン体生成活性 (nmol/mg/min)}}{\text{BNPP非存在下コントロールウサギIgG抗体処理ヒト小腸S9 試料中でのチオラクトン体生成活性 (nmol/mg/min)}} \times 100 \quad \text{式⑤}$$

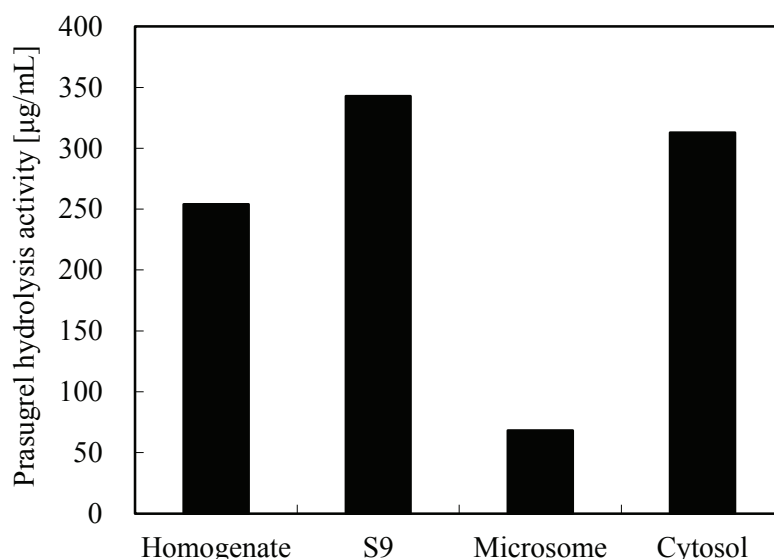
コントロールウサギIgG抗体処理ヒト小腸S9の残存加水分解活性 (%)

$$= \frac{\text{BNPP存在下コントロールウサギIgG抗体処理ヒト小腸S9 試料中でのチオラクトン体生成活性 (nmol/mg/min)}}{\text{BNPP非存在下コントロールウサギIgG抗体処理ヒト小腸S9 試料中でのチオラクトン体生成活性 (nmol/mg/min)}} \times 100 \quad \text{式⑥}$$

## 2.3 結果

### 2.3.1 ヒトおよびサル小腸中の加水分解酵素同定

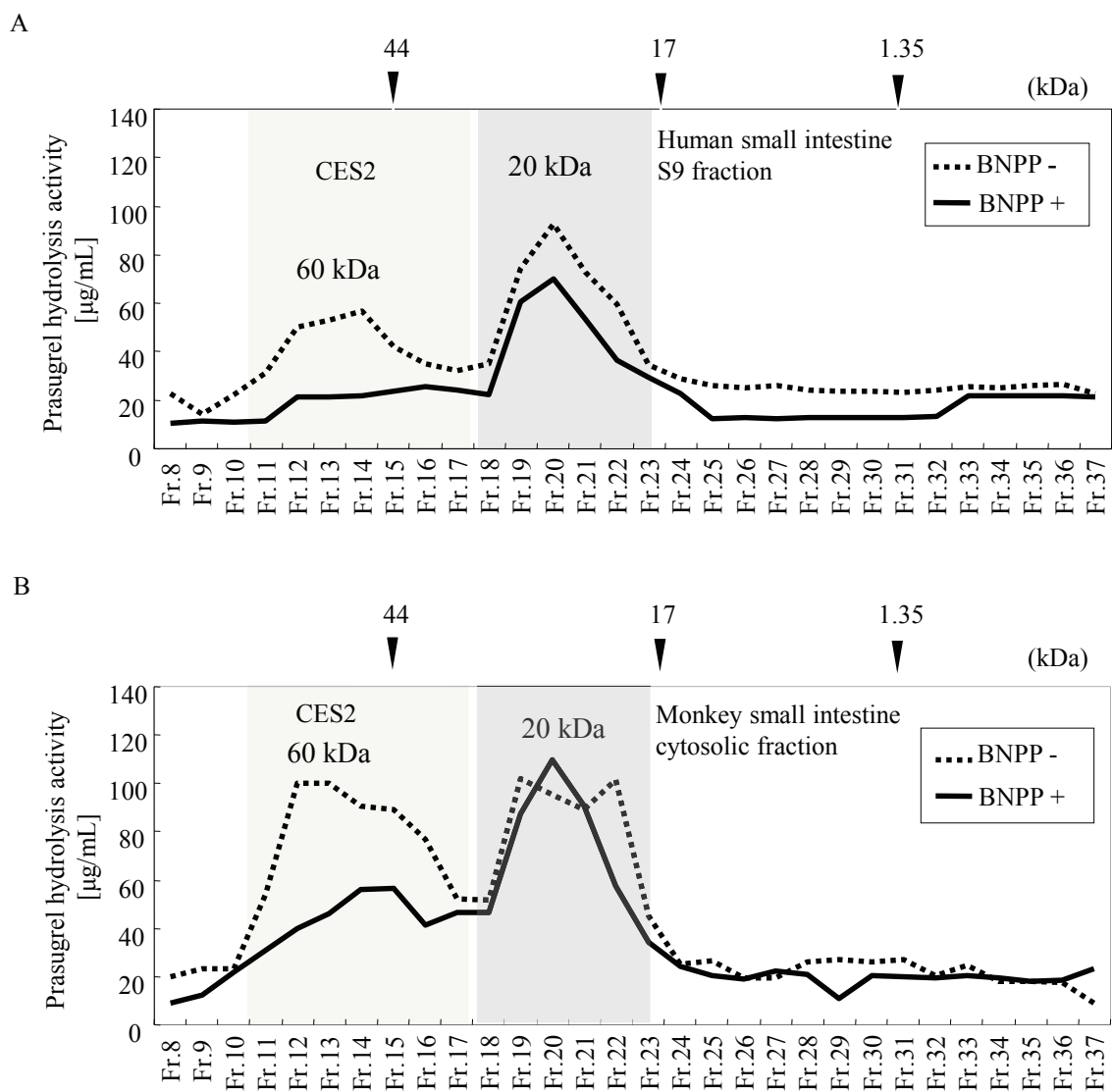
サル小腸ホモジネート・S9・ミクロソームおよびサイトソルを使用してプラスグレル加水分解酵素の局在を検討した結果、プラスグレルの加水分解活性はサル小腸サイトソル画分で最も高かった (Figure 6)。



**Figure 6 Localization of prasugrel hydrolase in monkey small intestine.**

Comparison of hydrolysis activity of respective fraction. The small intestine subcellular fractions were incubated with 6 mM prasugrel for 15 minutes at 37°C.

次に、ヒト小腸 S9 とサル小腸サイトソルをゲルろ過し、プラスグレルの加水分解活性をカルボキシルエステラーゼ阻害剤である BNPP 存在下、非存在下で確認した (Figure 7)。ヒト小腸 S9 のゲルろ過では、2 つのプラスグレル加水分解活性ピークが確認された。最初のピークはおおよそ 60 kDa 付近に認められ、BNPP 存在下で加水分解活性は低下した。一方、後のピークはおおよそ 20 kDa 付近に認められ、BNPP 存在下で加水分解活性はほとんど低下しなかった。本結果から最初のピークは CES2 (カルボキシルエステラーゼ 2) 活性を有し、後のピークは CES2 活性を有さない加水分解酵素と判断した。また、サル小腸サイトソルはヒト小腸 S9 とほぼ同様の結果を示したことから、プラスグレル加水分解酵素の精製はサル小腸サイトソルを用いた。



**Figure 7 Chromatography of human small intestinal S9 and monkey small intestinal cytosolic fraction on Superdex 75 gel filtration column.**

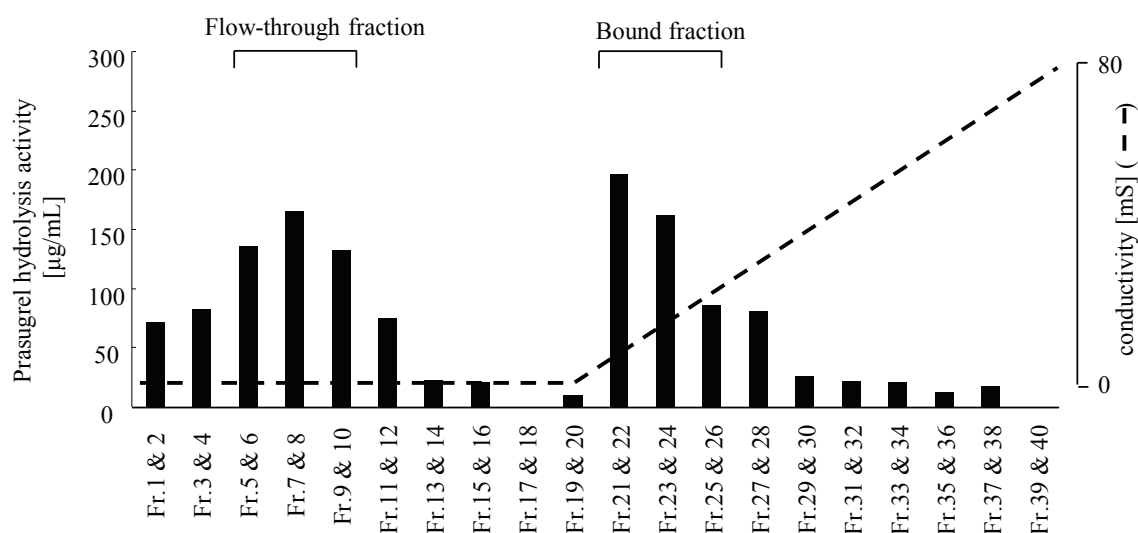
We applied 200  $\mu\text{L}$  of human small intestine S9 fraction (A) or monkey small intestine cytosolic fraction (B) to a Superdex 75 gel filtration column. Each fraction was incubated with 6 mM prasugrel for 60 minutes at 37°C in the presence or absence of BNPP. The positions of the native molecular weight markers are indicated at the top.

### 2.3.2 プラスグレル加水分解酵素の精製

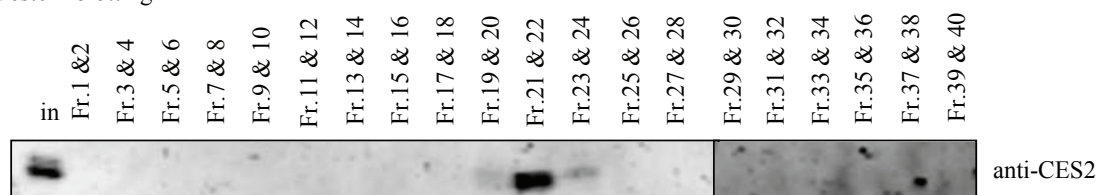
サル小腸サイトソルを HiPrep Heparin カラムに負荷し、プラスグレル加水分解酵素の精製をした (Figure 8)。Figure 8A に示した通り、プラスグレルの加水分解酵素は Heparin カラム非結合型と結合型の 2 タイプが存在した。

また、抗 CES2 抗体を使用したウェスタンブロッティングの結果から Heparin カラム結合型が CES2 酵素活性を有しており、Heparin カラム非結合型は CES2 酵素活性を有さない未知加水分解酵素であった。本検討結果からプラスグレル加水分解活性が高かった HiPrep Heparin カラム溶出液フラクション No.5-10 をプールし、未知加水分解酵素の更なる精製をした。

A: HiPrep Heparin chromatography



B: Western blotting



**Figure 8 Chromatography of monkey small intestinal cytosol fraction on HiPrep Heparin column and Western blotting of each elution.**

Heparin fractions were assayed for prasugrel hydrolysis activity.

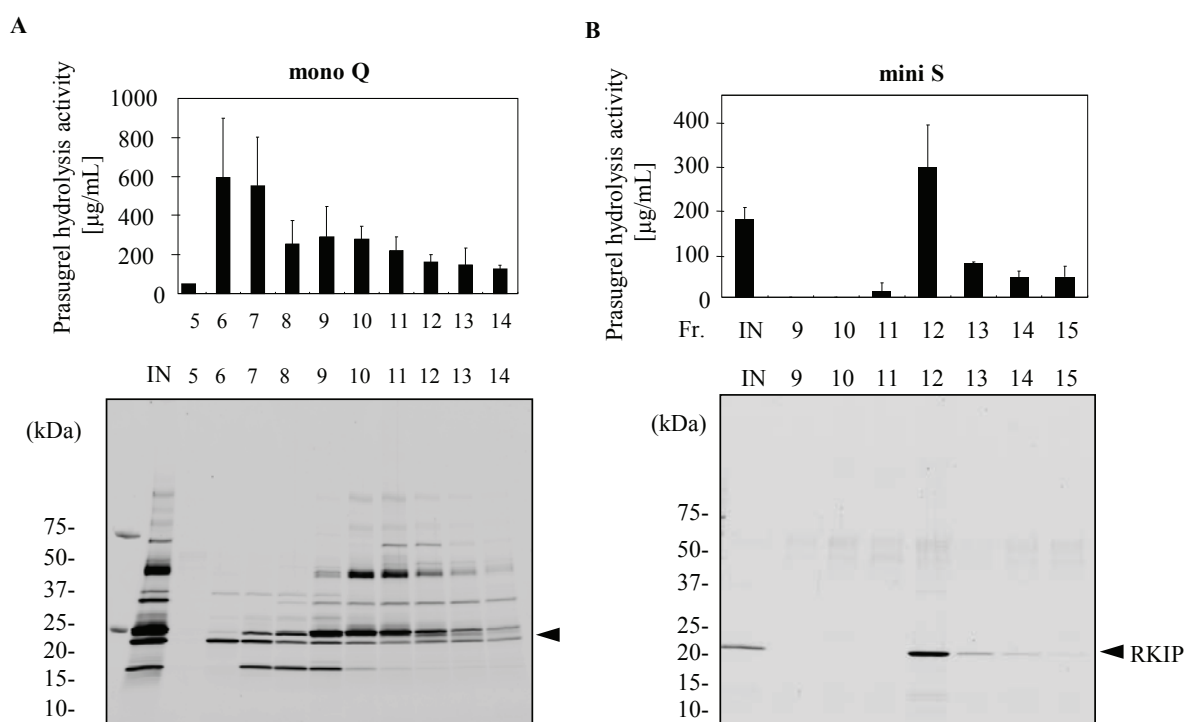
Each fraction was incubated with 6 mM prasugrel at 37°C for 60 minutes. (A) Hydrolysis

activity was found in fractions flow through (1–12) and bound (19–28). (B) Each fraction was

analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. IN, input.

HiPrep Heparin カラム溶出液フラクション No.5-10 中のプラスグレル未知加水分解酵素精製には Mono Q 5/50 GL カラムと mini S PC 3.2/3 カラムを用いた (Figure 9)。Mono Q 5/50 GL カラムによる加水分解酵素精製の結果、プラスグレルの加水分解活性は溶出フラクション N.6-7 に高い活性を認めた。また、各溶出フラクション (No.5-14) に含まれるタンパク質分子量を Flamingo 蛍光ゲルステイン染色法にて検討した結果、21 kDa 付近のタンパク質がプラスグレルの加水分解活性を有するすべてのフラクションで検出された (Figure 9A)。

さらに、プラスグレルの加水分解活性が高かった Mono Q 5/50 G カラム溶出液フラクション No.6-7 を mini S PC 3.2/3 カラムで精製した結果を Figure 9B に示した。プラスグレルの加水分解活性は溶出フラクション No.12 が最も高く、Flamingo 蛍光ゲルステイン染色法により検出されたバンドは 21 kDa 付近に 1 つであった。



**Figure 9 Purification of prasugrel hydrolase.**

(A) Prasugrel activity on the mono Q column. Mono Q fractions were incubated with 6 mM prasugrel for 60 minutes at 37°C. Data were expressed as mean +SD of three experiments. Hydrolase activity was found in fractions 6–14. The mono Q fractions were also resolved by 5%–20% SDS-PAGE, and the gel was stained with Flamingo and scanned by molecular imager FX. The band of 21 kDa (indicated by arrows) was associated with the activity.

(B) The mini S active fractions were resolved by SDS-PAGE, and the gel was stained with Flamingo. Mini S fractions were incubated with 6 mM prasugrel for 60 minutes at 37°C. Data were expressed as mean +SD of three experiments

2.3.3 プラスグレル新規加水分解酵素タンパク質の LC-MS/MS 法による同定  
LC-MS/MS と Mascot Server を使用して、Mini S PC 3.2/3 カラム溶出フラクション (No.12) で検出された 21 kDa のタンパク質を同定した。Figure 10 に 21 kDa タンパク質のアミノ酸配列を記載した。GenBank accession のデータベース検索から本アミノ酸配列はサルの RKIP と同定され、その相同性は 96%であった。つまり、CES2 活性を有さないプラスグレルの加水分解酵素は RKIP であった。

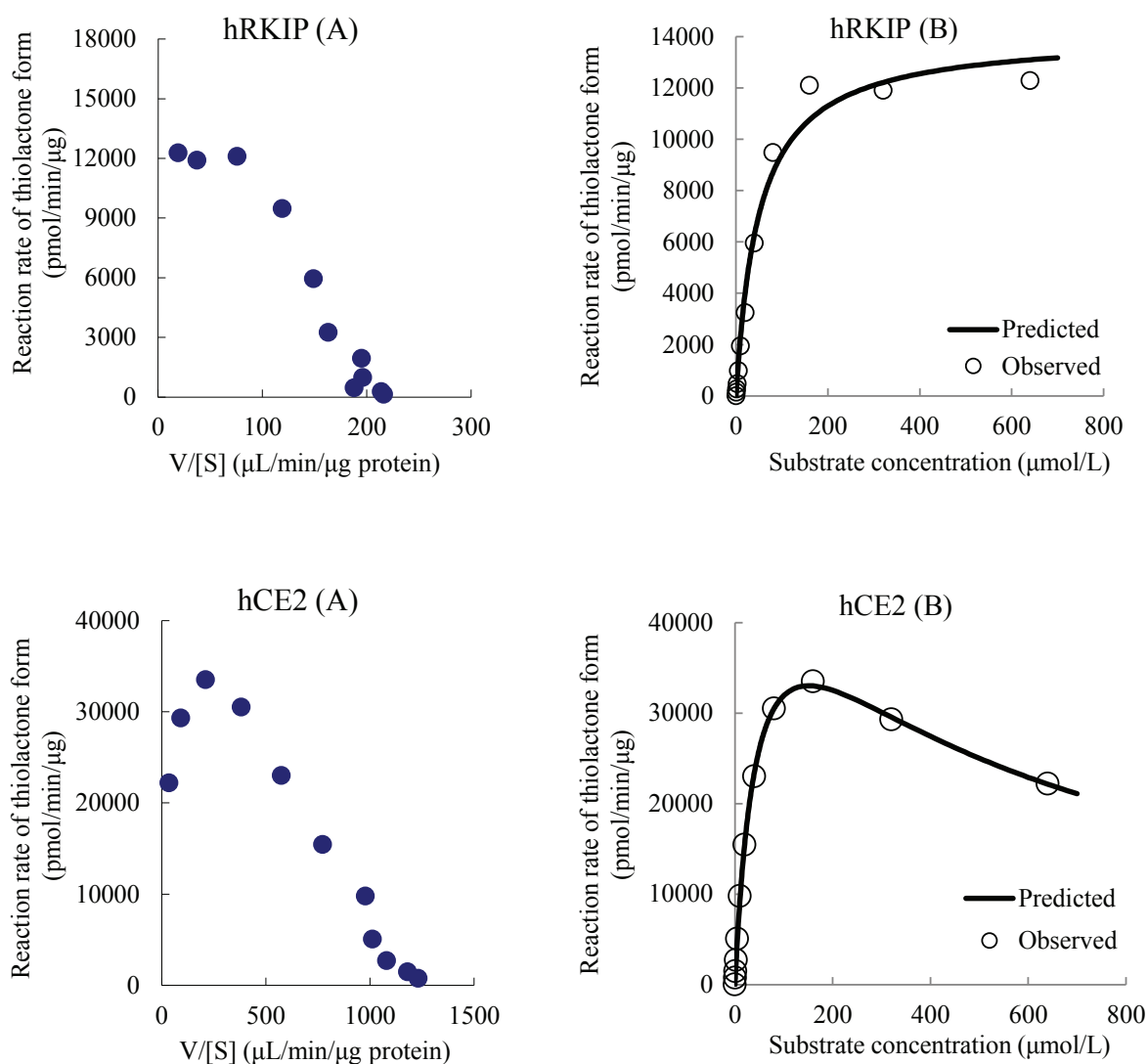
```
1  MPVDLSKWSG  PLSLQEVDEQ  PQHPLHVTYA  GAALDELGKV  LTPTQVKNRP
51  TSISWDGLDS  GKLYTLVLTD  PDAPSRKDPK  YREWHHFLVV  NMKGNDISSG
101 TVLSDYVGSG  PPKGTGLHRY  VWLVYEQARP  LKCDEPILSN  RSGDHRGKFK
151 VASFRKKYEL  GAPVAGACYQ  AEWDDYVPKL  YEQLSGK
```

**Figure 10 Identified amino acid sequence as prasugrel hydrolase using monkey small intestinal cytosolic fraction.**

The active fractions from mini S were subjected to SDS-PAGE, and the band of 21 kDa was subjected to LC-MS/MS analysis. The peptides found to be identical to monkey RKIP are shown in bold (GenBank accession no. P48737). The identical peptides covered 96% of RKIP amino acid sequence.

### 2.3.4 hRKIP および hCE2 発現系を用いたプラスグレール加水分解反応における酵素キネティクスパラメータ算出

チオラクトン体生成に対するrecombinant hRKIPおよびhCE2の酵素キネティックパラメータ ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) を算出した。Figure 11にEadie-Hofstee plotsとDirect plotsの結果を示した。Recombinant hRKIPによるチオラクトン体生成はEadie-Hofstee plotsにおいて、線形が認められたため、ミカエリス - メンテンモデルで $K_m$ 、 $V_{max}$ を算出した。一方、recombinant hCE2によるチオラクトン体生成はEadie-Hofstee plotsにおいて、線形が認められず、基質阻害キネティクス特性を示したため、式②を使用して $K_m$ 、 $V_{max}$ を算出した。



**Figure 11 Kinetic analysis of the thiolactone produced from prasugrel using recombinant hRKIP and hCE2 by Eadie-Hofstee plots (A) and direct plots (B).**

チオラクトン体生成に対するrecombinant hRKIPの $K_m$ 、 $V_{max}$ 値はそれぞれ $49.9 \pm 7.96 \mu\text{M}$ 、 $14,100 \pm 647 \text{ pmol/min}/\mu\text{g protein}$ であり、recombinant hCE2の $K_m$ 、 $V_{max}$ 値はそれぞれ $49.8 \pm 2.54 \mu\text{M}$ 、 $54,800 \pm 1510 \text{ pmol/min}/\mu\text{g protein}$ であった (Table 4)。

**Table 4 Enzymatic kinetic parameters of the thiolactone metabolite produced from prasugrel using recombinant hRKIP and hCE2**

Enzymatic kinetic parameters were expressed as mean $\pm$ SE of parameter estimate.

N.D. is expressed as no data. The formation of thiolactone metabolite from prasugrel in the recombinant hCE2 indicated a non-straight line in the Eadie-Hofstee plot, suggesting the involvement of the substrate inhibition kinetic properties. Therefore, the data were fitted to Equation 2 to calculate the  $K_m$  and  $V_{max}$  values.  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ ) is the Michaelis-Menten constant,  $V_{max}$  ( $\text{pmol/min}/\mu\text{g protein}$ ) is the maximal reaction rate and  $K_i$  is the inhibition constant for the substrate.  $K_m$  and  $V_{max}$  for the recombinant hRKIP were calculated by using WinNonlin professional based on a pharmacodynamic compiled model (model No.101).

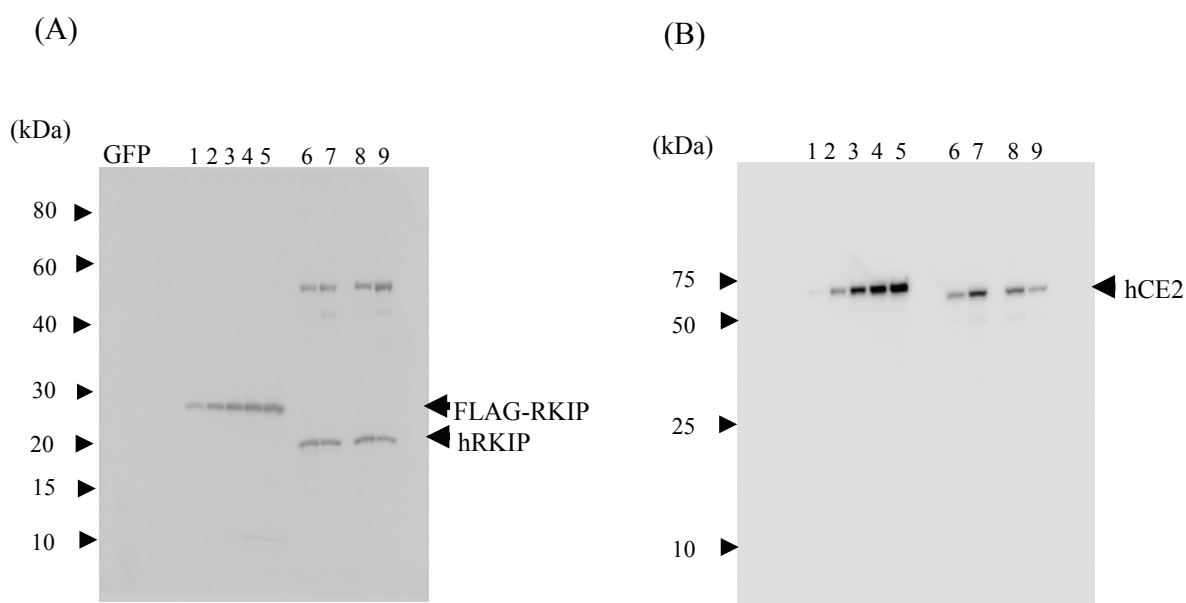
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\text{pmol/min}/\mu\text{g protein}$ )	$V_{max}/K_m$ ( $\mu\text{L/min}/\mu\text{g protein}$ )	$K_i$
hRKIP	$49.9 \pm 7.96$	$14,100 \pm 647$	283	N.D.
hCE2	$49.8 \pm 2.54$	$54,800 \pm 1510$	1101	$1380 \pm 498$



### 2.3.5 ヒト小腸 S9 中でのプラスグレル加水分解酵素寄与率

ヒト小腸 S9 中でのプラスグレル加水分解酵素 (hRKIP、hCE2) の代謝寄与率を算出するため、ヒト小腸 S9 中の hRKIP および hCE2 発現量を定量ウェスタンブロット法で解析した。Figure 12 に個体別小腸 S9 を用いたウェスタンブロットの結果を示した。Lane 1-5 に検量線用 recombinant、Lane 6-9 に個体別小腸 S9 (n=4) の電気泳動パターンを示した。Figure 12 (A) の recombinant hRKIP は FLAG タグが付いているため、21 kDa より分子量が大きい位置にバンドが認められ、ヒト小腸 S9 の電気泳動レーンでは 21 kDa 付近に hRKIP バンドが検出された。

また、Figure 12 (B) では recombinant hCE2 とヒト小腸 S9 泳動レーンで検出されたバンドは、ほぼ同じ位置 (60 kDa 付近) であった。



**Figure 12 Expression of hRKIP and hCE2 in human small intestinal S9 by Western blot analysis.**

(A) Expression of hRKIP in human small intestinal S9. Lanes 1, 2, 3, 4, and 5 are recombinant hRKIP at the concentrations of 12.5, 25, 50, 75, and 100 ng/10 ml, respectively. Lane 6, 7, 8, and 9 are individual human small intestinal S9.

(B) Expression of hCE2 in human small intestinal S9. Lanes 1, 2, 3, 4, and 5 are recombinant hCE2 at the concentrations of 10, 25, 50, 75, and 100 ng/10 ml, respectively. Lanes 6, 7, 8, and 9 are individual human small intestinal S9.

定量ウェスタンブロット法で解析したヒト小腸S9中のhRKIPおよびhCE2発現量は、それぞれ7.48 ng/μg S9 ~ 15.6 ng/μg S9および2.24 ng/μg S9 ~ 7.91 ng/μg S9であった (Table 5)。これら発現量と酵素キネイクスパラメータを使用して、プラスグレル加水分解に参与するhRKIPおよびhCE2の代謝寄与率を算出した。hRKIPおよびhCE2の代謝寄与率はそれぞれ42.9% ± 9.82%および57.1% ± 9.82%であった。

**Table 5 Estimation of the contribution ratio of hRKIP and hCE2 involved in the formation of the thiolactone metabolite from prasugrel in human small intestinal S9 by the enzymatic kinetic parameters**

The contents of hRKIP and hCE2 in individual human small intestinal S9 (n = 4) were determined using recombinant hRKIP and PNGase F-treated hCE2 by Western blotting method. The contribution ratio of hRKIP and hCE2 involved in the hydrolysis reaction of prasugrel in human small intestinal S9 was estimated by using the obtained contents data and enzyme kinetic parameters.

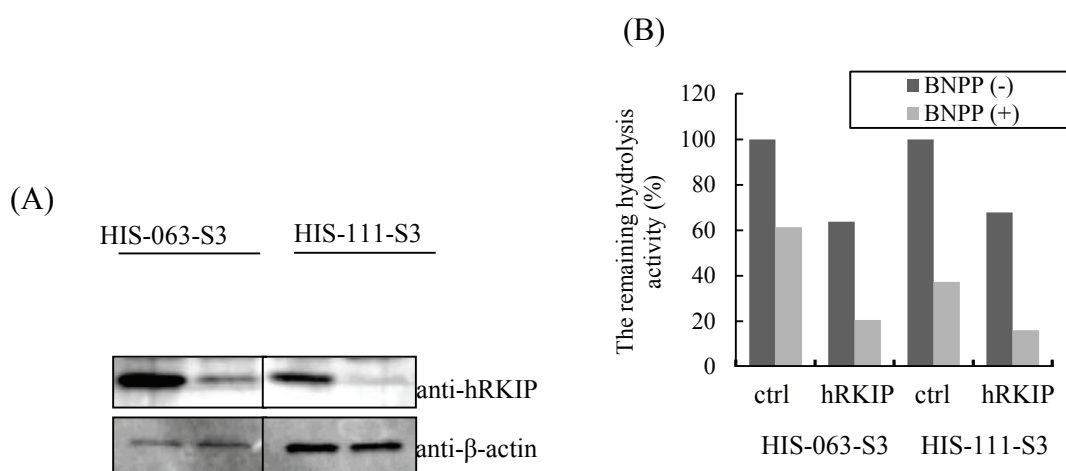
$V_{max}/K_m$ : μL/min/μg protein, Enzyme contents: ng/human small intestinal S9 μg

CLint: μL/min/μg enzyme contents

	$V_{max}/K_m$	Individual human small intestinal S9	Enzyme contents	CLint	Contribution ratio (%)		
					Individual	mean	SD
hRKIP	283	HIS-063-S3	14.9	4217	52.7	42.9	9.82
		HIS-067-S3	12.8	3622	29.4		
		HIS-084-S3	15.6	4415	43.4		
		HIS-111-S3	7.48	2117	46.2		
hCE2	1101	HIS-063-S3	3.44	3787	47.3	57.1	9.82
		HIS-067-S3	7.91	8709	70.6		
		HIS-084-S3	5.24	5769	56.6		
		HIS-111-S3	2.24	2466	53.8		

### 2.3.6 ヒト小腸 S9 中でのチオラクトン体生成阻害

抗 hRKIP 抗体を用いて hRKIP タンパク質を枯渇させ、その後、BNPP を使用したチオラクトン体生成阻害試験を行った結果を Figure 13 に示した。抗 hRKIP 抗体によりヒト小腸 S9 中の hRKIP 含量が低下した (Figure 13A)。抗 hRKIP 抗体で hRKIP を免疫枯渇させることにより、ヒト小腸 S9 中のプラスグレル加水分解活性は約 34% 低下した (Figure 13B, Table 6)。また、hRKIP タンパク質を枯渇させたヒト小腸 S9 中のプラスグレル加水分解活性は BNPP 存在下で、さらに約 48% 低下した (Figure 13B, Table 6)。



**Figure 13 Immunodepletion of hRKIP from human small intestine S9 fraction.**

(A) Immunoblot analysis of the human small intestine S9 fractions depleted of hRKIP. The anti-hRKIP antibodies or nonspecific rabbit IgGs were used to immunodeplete the hRKIP. The hRKIP-depleted S9 fraction was subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting analysis with the indicated antibodies.  $\beta$ -actin was used as an internal control.

(B) The relative prasugrel hydrolysis activity of the hRKIP-depleted S9 fraction. The depleted S9 fractions were incubated with 40 mM prasugrel for 20 minutes at 37°C in the presence or absence of 0.1 mM BNPP. The data are mean (n = 2).

**Table 6 Immunodepletion of hRKIP and effect of BNPP**

The relative prasugrel hydrolase activity of hRKIP depleted human small intestine S9. The depleted S9 fractions were incubated with 40  $\mu$ M prasugrel for 20 min at 37°C in the presence of or absence of 0.1 mM BNPP.

Individual human small intestinal S9	Production of thiolactone form (nmol/mg protein/min)				Remaining hydrolysis activity (%)			
	Control		Anti-hRKIP treatment		Control		Anti-hRKIP treatment	
	BNPP (-)	BNPP (+)	BNPP (-)	BNPP (+)	BNPP (-)	BNPP (+)	BNPP (-)	BNPP (+)
HIS-063-S3	54.5	33.4	34.8	11.2	100	61.4	63.8	20.6
HIS-111-S3	50.5	18.8	34.2	8.09	100	37.3.	67.9	16.0

## 2.4 考察

本章ではサル小腸サイトソルからプラスグレルの初発代謝物であるチオラクトン体の生成活性（プラスグレル加水分解活性）を指標として、新規加水分解酵素を単離精製することに成功し、本酵素が RKIP であることを明らかにした。また、ヒト小腸 S9 中でのプラスグレル加水分解反応に關与する hCE2 と hRKIP の寄与率がそれぞれ約 60% および 30-40% であることを明らかにした。

プラスグレル新規加水分解酵素の精製は「プラスグレル加水分解活性がサル小腸サイトソル画分で最も高かったこと」、「ヒト小腸 S9 とサル小腸サイトソルのゲルろ過時のプラスグレル加水分解活性パターンが両試料でほとんど同じであったこと」からサル小腸サイトソルを使用した。プラスグレル新規加水分解酵素は HiPrep Heparin カラム、mono Q 5/50 GL カラム、mini S PC 3.2/3 カラムを使用して、プラスグレルの加水分解代謝活性を指標に 3 段階の工程で精製した。最終カラム精製において、最もプラスグレル加水分解代謝活性が高く、且つ、単一バンドの電気泳動パターンを示した溶出フラクションを用いてアミノ酸配列を LC-MS/MS で同定した結果、本タンパク質が 21 kDa の RKIP であることを明らかにした。RKIP はホスファチジルエタノールアミン結合タンパクファミリーに属するタンパク質であり、サイトソル画分に存在する Raf キナーゼ抑制タンパク質として良く知られている[36, 37, 38, 39, 40]。RKIP は細胞増殖調節過程において様々な役割を持つタンパク質であるが[41]、加水分解代謝活性を有することは知られていない。従って、本研究は RKIP が加水分解代謝活性を持つことを初めて明らかにした研究であり、今後の医薬品開発への貢献につながる研究である。

次に、プラスグレル加水分解酵素の代謝寄与率を見積もるため、recombinant hRKIP および hCE2 を用いて、各 recombinant の酵素キネティクスパラメータ ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) を算出した。チオラクトン体生成に対する recombinant hRKIP および hCE2 の  $K_m$  値はそれぞれ 49.9  $\mu\text{M}$ 、49.8  $\mu\text{M}$ 、 $V_{max}$  はそれぞれ 14,100 pmol/min/ $\mu\text{g}$  protein、54,800 pmol/min/ $\mu\text{g}$  protein であった。また、hCE2 による加水分解反応は Eadie-Hofstee plots (Figure 11) において、基質阻害キネイクス特性が示された。一方、hRKIP による加水分解反応は Eadie-Hofstee plots (Figure 11) において線形を示したことから、hCE2 のような基質阻害キネイクス特性を持たないことが示

唆された。従って、hRKIPは“想定される小腸中プラスグレル濃度範囲（26.8  $\mu\text{M}$  - 803  $\mu\text{M}$ ）”で基質阻害を受けないと考えられる。上記酵素キネティクスパラメータとヒト小腸S9中のこれら酵素の含量からヒト小腸S9中でのhRKIPおよびhCE2の代謝寄与率を算出した結果、それぞれ42.9%および57.1%であった。両加水分解酵素の代謝寄与率がほとんど同レベルであることはプラスグレルの速やかな薬効発現に重要である。仮に、109  $\mu\text{M}$ 以上のプラスグレル濃度でhCE2の加水分解活性が阻害されたとしても、小腸中に存在するhRKIPがプラスグレルの加水分解反応を触媒するので、*in vivo*におけるチオラクトン体の生成は阻害されないと考察する。

抗hRKIP抗体でhRKIPを免疫枯渇させることにより、ヒト小腸S9中のプラスグレル加水分解活性は約34%低下し、BNPP存在下ではプラスグレル加水分解活性が、更に約48%低下した。hRKIPの免疫枯渇により低下したプラスグレル加水分解活性がhRKIPの代謝寄与、BNPP存在下で低下したプラスグレル加水分解活性がhCE2の代謝寄与を示していると考え、本試験で得られたhRKIPおよびhCE2の代謝寄与は酵素キネティクスパラメータから算出した寄与率とほぼ一致したので、算出された値の妥当性が示された。

プラスグレルの加水分解反応に関与する酵素がhCE1（ヒトカルボキシエステラーゼ1）、hCE2であることはすでに報告されているが、同時に、hCE2によるチオラクトン体生成活性はプラスグレル濃度109  $\mu\text{M}$ 以上になると低下することも報告されている[30]。一方、臨床試験においてプラスグレルを2.5 mg、10 mg、75 mgの用量で服薬した際のチオラクトン体の血漿中濃度は線形である[32]。仮に、これらの用量を250 mLの水で服用した際の濃度はそれぞれ26.8, 107, 803  $\mu\text{M}$ となる。*In vitro*の結果を考慮するとプラスグレル加水分解反応に関与する酵素がhCE2だけでは、チオラクトン体血漿中濃度が用量75 mgまで線形であることを説明できない。しかし、この*in vitro*と*in vivo*の乖離はhRKIPという加水分解酵素が小腸に存在することにより説明可能となった。

つまり、プラスグレルは小腸中でそのほとんどがhCE2及びhRKIPにより加水分解されチオラクトン体へと変換される。本研究において、hRKIPという新規加水分解酵素の存在を見出したことは、プラスグレルの薬効発現が速く、且つ確実であるという臨床上の薬理学的優位性を説明する上で重要な成果である。

## 2.5 小括

第2章の検討結果から、以下のことが明らかとなった。

- ・ プラスグレルの加水分解反応に関与する新規代謝酵素が RKIP であることを明らかにした。
- ・ hRKIP は想定される小腸中のプラスグレル濃度範囲で基質阻害を受けなかった。
- ・ プラスグレルからチオラクトン体生成に関与する加水分解酵素は主として hCE2 と hRKIP であり、ヒト小腸 S9 中でこれら酵素の代謝寄与率はそれぞれ約 60% および 30-40% であった。
- ・ ヒト小腸 S9 中に hCE2 以外の加水分解酵素 hRKIP が存在することが、プラスグレルの薬効発現が速く、且つ確実であるという臨床上の薬理学的優位性を説明する要因の1つとして示された。

## 第3章 プラスグレルのS-メチル化酵素の同定とその立体選択的代謝反応の評価

### 3.1 小序

本章ではプラスグレルが低用量で薬効発現し、その効果が確実である要因を明らかにする目的で、血漿中の活性代謝物光学異性体（4種）のうち活性の強い異性体2種が優位に血漿中に存在する原因を活性代謝物から先の代謝反応、すなわち、S-メチル化反応に注目し、*in vitro* と *in vivo* の両面から評価した。

Figure 7S に示す通りプラスグレル活性代謝物は、さらに代謝されて S-メチル代謝物とシステイン抱合体へと変換される。S-メチル代謝物はヒト血漿中のメイン代謝物であることからシステイン抱合体ではなく、S-メチル代謝物の生成反応に注目した。

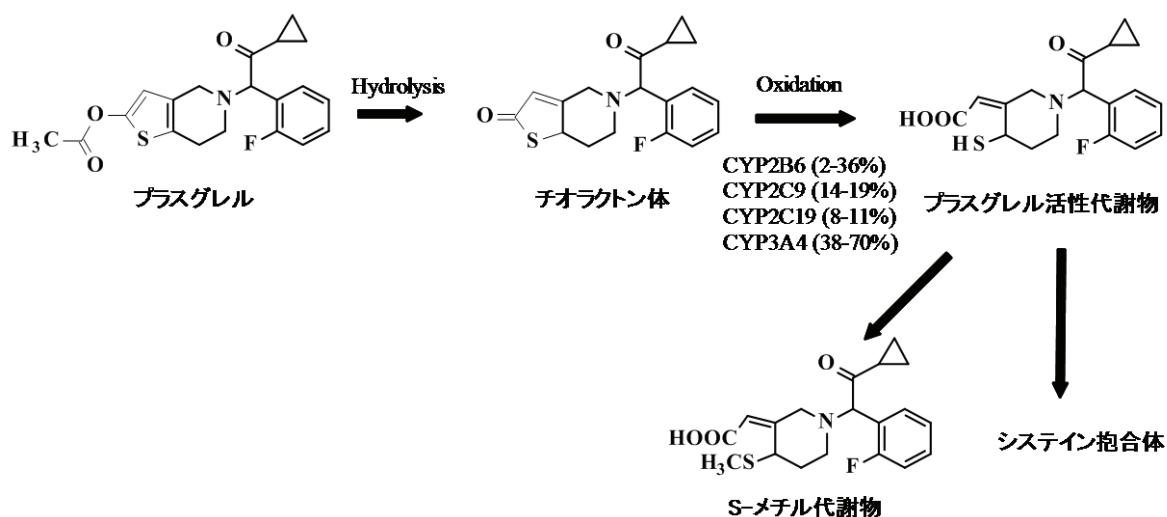
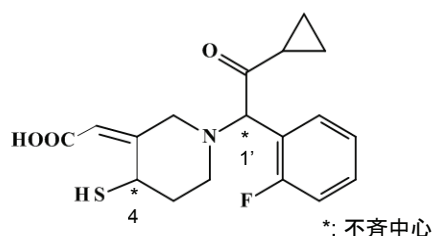


Figure 7S Metabolic pathway of prasugrel

前述したように、プラスグレル活性代謝物は構造中2箇所不斉中心を持つ、4種光学異性体混合物である (Figure 8S)。各光学異性体の薬理活性 (*in vitro*) は Figure 9S に示す通り、RS 体が最も強く、次いで RR 体、SS 体、SR 体の順に薬理活性は低い [42]。ヒト血漿中の4種光学異性体存在比は薬効の強い RS、RR 体が優位に存在しているため [43]、本原因を明らかにすることがプラスグレルの薬効発現が低用量でも確実である要因を説明する上で重要である。そこで、著者は活性代謝物の消失反応である S-メチル化反応に注目して検討を行った。



*In vitro* では S-メチル化反応に関与する酵素を同定した。また、S-メチル化酵素の立体選択性については、ラット・イヌ・ヒト肝ミクロソームを用いて検討した。*In vivo* ではラットおよびイヌに活性代謝物投与後の S-メチル代謝物 2 種異性体の動態を評価した。

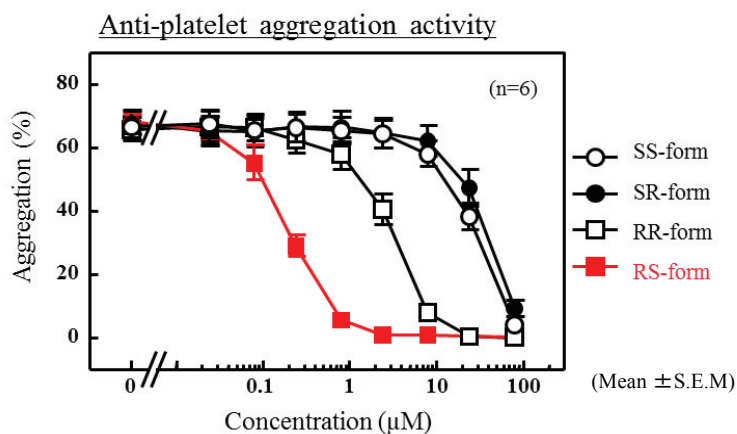


Compounds	4-position of piperidyl group	1'-position of benzyl group
SS-form	S	S
SR-form	S	R
RR-form	R	R
RS-form	R	S

**Figure 8S Structures of four stereoisomers of the pharmacologically active metabolites of prasugrel.**

(Hasegawa et al. *Thromb Haemost* 2005; 94: 593-598 から引用し、一部改変)

The first letter indicates the configuration at the 4-position of piperidyl group and the second for that at the 1'-position of benzyl group. \*Denotes chiral center.



**Figure 9S Effects of four stereoisomers of the pharmacologically active metabolites of prasugrel, SS-, SR-, RR-, and RS-form, on platelet aggregation induced by 10 μM ADP.**

(Hasegawa et al. *Thromb Haemost* 2005; 94: 593-598 から引用し、一部改変)

*In vitro* platelet aggregation induced by ADP was measured using washed human platelets in the presence or absence of each stereo-isomer. Results are expressed as the mean ± S.E.M (n=6).

## 3.2 実験材料および方法

### 3.2.1 被験物質および試薬

プラスグレル活性代謝物、S-メチル代謝物、R-135766、R-121721 (S-メチル体代謝物の重水素標識体)は宇部興産株式会社 (Ube, Japan) で合成され、プラスグレル活性代謝物の4種光学異性体(RS, RR, SR, SS体)は第一三共株式会社 (Tokyo, Japan) で合成された。

S-メチル代謝物のHPLC測定用内部標準物質として使用した $\alpha$ -naphthoflavone、S-(5'-adenosyl)-L-methionine chloride (SAM)、glucose-6-phosphate dehydrogenase from baker's yeast (G-6-PDH)、D-glucose 6-phosphate disodium salt hydrate (G-6-P)、 $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt (NADP)、L-glutathione reduced (GSH) および ( $\pm$ ) -2,3-dichloro-alpha-methylbenzylamine hydrochloride (DCMB) はSigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入し、チオール体誘導化試薬である3'-methoxyphenacyl bromide (MPBr)、m-anisic acidは東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。その他の試薬は、市販の特級、一級、HPLC用のものを用いた。

### 3.2.2 生物学的試料

プールドヒト肝ミクロソーム (20 mg protein/mL)、プールド雄性ラット (系統: Sprague-Dawley (SD)) 肝ミクロソームおよびプールド雄性イヌ (系統: ビーグル) 肝ミクロソームはBD バイオサイエンス社 (Woburn, MA) から購入し、S-メチル化代謝酵素同定試験に使用したプールドヒト肝ミクロソーム (10 donors) とプールドヒト肝サイトソル (10 donors) は特定非営利活動法人 HAB 研究機構 (Tokyo, Japan) より購入した。

### 3.2.3 実験動物

雄性 SD ラット (n = 4) は日本チャールス・リバー株式会社 (Yokohama, Japan) から8週齢で購入した。雄性ビーグル犬 (n = 4) は日本農産工業株式会社から6ヶ月齢で購入した。全ての動物実験は第一三共株式会社実験動物倫理規定に従って実施した。

### 3.2.4 ヒト肝ミクロソームおよびサイトソル中でのプラスグレル活性代謝物の S-メチル化反応

チオール-S-メチルトランスフェラーゼ (TMT) によるプラスグレル活性代謝物の S-メチル化反応はプールドヒト肝ミクロソームを使用して検討した。

1 mM EDTAと0.5% Triton X-100を含む100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.9) にプールドヒト肝ミクロソーム (終濃度: 2 mg protein/mL) とSAM (終濃度: 0.5 mM) を加え、396  $\mu$ Lの反応液を調製し、37°C下で5分間インキュベートした後、4  $\mu$ Lのプラスグレル活性代謝物DMSO溶液 (終濃度: 50  $\mu$ M) を添加し、37°C下で5、10、20、30および45分間インキュベートした。本反応液50  $\mu$ Lにアセトニトリル100  $\mu$ Lと $\alpha$ -naphthoflavoneアセトニトリル溶液 (5  $\mu$ g/mL) を50  $\mu$ L添加し、遠心分離 (20,800 $\times$ g, 3 min, 4°C) 後、上清2  $\mu$ LをUPLC-UV分析装置に注入し、S-メチル代謝物濃度を測定した。UPLC-UV分析条件は3.2.9.1に記載した。

チオプリンメチルトランスフェラーゼ (TPMT) によるプラスグレル活性代謝物の S-メチル化反応はプールドヒト肝サイトソルを使用して検討した。

400 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.2) にプールドヒト肝サイトソル (終濃度: 2.25 mg protein/mL) とSAM (終濃度: 0.5 mM) を加え、297  $\mu$ Lの反応液を調製し、37°C下で5分間インキュベート後、3  $\mu$ Lのプラスグレル活性代謝物DMSO溶液 (終濃度: 50  $\mu$ M) を添加し、37°C下で5、10、20、30および45分間インキュベートした。その後のサンプル処理はTMT反応試験と同様の操作をした。

### 3.2.5 ヒト肝ミクロソームおよびサイトソル中でのプラスグレル活性代謝物の S-メチル化反応阻害

TMT 阻害剤である DCMB と TPMT 阻害剤である m-アニス酸を用いて S-メチル化反応阻害試験をした。

ヒト肝ミクロソーム中でのプラスグレル活性代謝物 S-メチル化反応阻害は下記条件で検討した。1 mM EDTA と 0.5% Triton X-100 を含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.9) にプールドヒト肝ミクロソーム (終濃度: 2 mg protein/mL)、SAM (終濃度: 0.5 mM) と DCMB (終濃度: 5、50、500  $\mu$ M) を加え、396  $\mu$ L の反応液を調製し、37 $^{\circ}$ C 下で 5 分間インキュベート後、4  $\mu$ L のプラスグレル活性代謝物 DMSO 溶液 (終濃度: 50  $\mu$ M) を添加し、37 $^{\circ}$ C 下で 45 分間インキュベートした。

ヒト肝サイトソル中でのプラスグレル活性代謝物 S-メチル化反応阻害は下記条件で検討した。400 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.2) にプールドヒト肝サイトソル (終濃度: 2.25 mg protein/mL)、SAM (終濃度: 0.5 mM) と DCMB (終濃度: 5、50、500  $\mu$ M) または m-アニス酸 (終濃度: 0.1、1、10 mM) を加え、297  $\mu$ L の反応液を調製し、37 $^{\circ}$ C 下で 5 分間インキュベート後、3  $\mu$ L のプラスグレル活性代謝物 DMSO 溶液 (終濃度: 50  $\mu$ M) を添加し、37 $^{\circ}$ C 下で 30 分間インキュベートした。その後のサンプル処理は 3.2.4 項と同様の操作をした。

### 3.2.6 プラスグレル活性代謝物の 4 種光学異性体の S-メチル化反応評価

1 mM EDTA と 0.5% Triton X-100 を含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.9) に各種 (ラット・イヌ・ヒト) 肝ミクロソーム (終濃度: 2 mg protein/mL)、NADPH-generating system ( $\beta$ -NADP (2.5 mM), G-6-P (22.5 mM), G-6-PDH (2 units/mL), MgCl<sub>2</sub> (10 mM)) および SAM (終濃度: 0.5 mM) を加え、37 $^{\circ}$ C 下で 5 分間インキュベート後、プラスグレル活性代謝物の 4 種光学異性体 (RS, RR, SR, SS 体) DMSO 溶液をそれぞれ終濃度 100  $\mu$ M で添加し、37 $^{\circ}$ C 下で 5、15、30、60、90 および 120 分間インキュベートした。その後のサンプル処理は 3.2.4 項と同様の操作をした。

### 3.2.7 プラスグレル活性代謝物光学異性体の S-メチル化反応における酵素キネティクスパラメータの算出

1 mM EDTA と 0.5% Triton X-100 を含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.9) に各種(ラット・イヌ・ヒト)肝ミクロソーム(終濃度: 2 mg protein/mL)、NADPH-generating system、グルタチオン(終濃度: 5 mM) および SAM(終濃度: 0.5 mM) を加え、247.5  $\mu$ L の反応液を調製し、37 $^{\circ}$ C 下で 5 分間インキュベート後、各反応液にプラスグレル活性代謝物光学異性体 (SR 体、SS 体) DMSO 溶液をそれぞれ 2.5  $\mu$ L 添加し(終濃度: 0.5、1、2、5、10、50、100、200 および 400  $\mu$ M)、37 $^{\circ}$ C 下で 30 分間インキュベートした。本反応液 50  $\mu$ L にアセトニトリル 100  $\mu$ L と 2  $\mu$ M R-135766 アセトニトリル溶液を 50  $\mu$ L 添加し、遠心分離 (20,800 $\times$ g, 3 min, 4 $^{\circ}$ C) 後、上清 5  $\mu$ L を LC-MS/MS 分析装置に注入し、LC-MS/MS Single column 法で S-メチル代謝物濃度を測定した。LC-MS/MS 分析条件は 3.2.9.2 に記載した。

### 3.2.8 プラスグレル活性代謝物投与後のラット・イヌ血漿中 S-メチル代謝物濃度推移

プラスグレル活性代謝物をラット・イヌに静脈内投与後の血漿中 S-メチル代謝物の立体異性体 (RS+RR 体、SR+SS 体) を測定した。

#### 3.2.8.1 投与液ならびに投与方法

プラスグレル活性代謝物を生理食塩水に溶解し、1 mg/mL の投与液を調製した。ラット (n=4)、イヌ (n=4) にプラスグレル活性代謝物投与液を絶食下で 1 mg/kg の用量で静脈内投与した。ヘパリン処理シリンジを用いて投与後 0.033、0.083、0.25、0.5、1 時間の血液 (0.4 mL) を採取した。

#### 3.2.8.2 血漿サンプル前処理

採血後、血液に 10  $\mu$ L の 500 mM MPBr アセトニトリル溶液を添加し、混合後 10 分間室温放置した。その後、血液試料を遠心分離 (21,600 $\times$ g, 3 min, 4 $^{\circ}$ C) し、血漿を得た。

血漿試料50  $\mu\text{L}$ にアセトニトリル／ギ酸（100/1, v/v）で溶解したR-121721溶液（IS, 100 ng/mL）と100  $\mu\text{L}$ とアセトニトリル／ギ酸（100/1, v/v）50  $\mu\text{L}$ を添加し、混合後、遠心分離（20,800 $\times$ g, 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ ）した。上清2  $\mu\text{L}$ をLC-MS/MS分析装置に注入し、LC-MS/MS Single column法とESI-LC-MS/MS Double-Column法でS-メチル代謝物濃度とS-メチル代謝物の立体異性体（RS+RR体、SR+SS体）比率を測定した。

### 3.2.9 分析法

#### 3.2.9.1 UPLC-UV 法による分析

S-メチル代謝物定量の UPLC-UV 条件を以下に記載した。

UPLC装置：Acquity Ultra Performance system（日本ウォーターズ株式会社）

分析用カラム：ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  column

（2.1  $\times$  50 mm, 粒子径1.7  $\mu\text{m}$ , 日本ウォーターズ株式会社）

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

移動相 A：蒸留水/TFA = 1000/0.05 (v/v/v)

移動相 B：アセトニトリル/蒸留水/TFA = 400/600/0.02 (v/v/v)

移動相 A、B を使用したグラジエント分析

グラジエント分析:

Time (min)	移動相 A	移動相 B
0	90%	10%
10	45%	55%
14	0%	100%
19	90%	10%

流速：0.5 mL/min

検出：PDA 検出

検出波長：220 nm: S-メチル代謝物、280 nm:  $\alpha$ -naphthoflavone

測定対象物と内部標準物質の面積比を用いた最小二乗法で検量線を作成した。S-メチル代謝物の LLOQ および ULOQ はそれぞれ 1  $\mu\text{M}$ 、500  $\mu\text{M}$  であった。

### 3.2.9.2 LC-MS/MS 法による分析

LC-MS/MS Single column 法による S-メチル代謝物 (*in vitro*) 分析条件を以下に記載した。

HPLC 装置 : Alliance 2695 Separations Module (Waters Corp)

質量分析装置 : Quattro-LC-MS/MS system (Micromass UK., Ltd.)

分析用カラム : Inertsil ODS-3 column

(2.1 × 150 mm, 粒子径 5 μm, ジーエルサイエンス株式会社)

カラム温度 : 40°C

移動相 : メタノール/蒸留水/TFA = 520/480/0.5 (v/v/v)

流速 : 0.2 mL/min

イオン化法 : Electro-spray ionization (ESI) – positive ion detection mode

デゾルベーション温度 : 350°C

ソース温度 : 120°C

Capillary voltage : 3.5kV

Cone voltage : 20 V

Collision energy : 25 eV

定量時のモニタリングイオン :

S-メチル代謝物,  $m/z$  364 →  $m/z$  206

R-135766 (内部標準物質),  $m/z$  548 →  $m/z$  206

測定対象物と内部標準物質の面積比を用いた最小二乗法で検量線を作成した。S-メチル代謝物のLLOQは0.02 μMであり、0.025-50 μMの範囲で線形を示した。データ解析にはMasslynx version 4.0 SP4 software (Waters Corp.) を用いた。

LC-MS/MS Single column 法による S-メチル代謝物 (*in vivo*) 分析条件を以下に記載した。

UPLC 装置 : LC-20A UFLC system (株式会社島津製作所)

質量分析装置 : API5000 (Biosystems/MDS SCIEX)

分析用カラム : L-column ODS

(2.1 × 150 mm, 粒子径 5 μm, 一般財団法人化学物質評価研究機構)

カラム温度 : 40°C

移動相 A : 蒸留水/ギ酸 = 990/10 (v/v)、移動相 B : アセトニトリル

移動相 A、B を使用したグラジエント分析

グラジエント分析:

Time (min)	移動相 A	移動相 B
0	50%	50%
2	25%	75%
6	25%	75%
6.1	50%	50%

流速 : 0.25 mL/min

イオン化法 : Electro-spray ionization (ESI) – positive ion detection mode

Curtain gas and set value: N<sub>2</sub>, 30 (psi)

Collision gas and set value: N<sub>2</sub>, 5 (arbitrary unit)

Ionspray voltage: 5500 (V)

Ion source temperature: 650 (°C)

Ion source gas 1 and set value: Air, 60 (psi)

Ion source gas 2 and set value: Air, 60 (psi)

Interface heater: On

定量時のモニタリングイオン :

S-メチル代謝物,  $m/z$  364 →  $m/z$  149

R-121721 (内部標準物質),  $m/z$  371 →  $m/z$  153

測定対象物と内部標準物質の面積比を用いた最小二乗法で検量線を作成した。  
S-メチル代謝物のLLOQは0.02 μMであり、2.5-500 ng/mLの範囲で線形を示した。



LC-MS/MS Double column 法による S-メチル代謝物の立体異性体 (RS+RR 体、SR+SS 体) 比率分析条件を以下に記載した。

UPLC 装置 : Acquity Ultra Performance system

(日本ウォーターズ株式会社)

質量分析装置 : API5000 (Biosystems/MDS SCIEX)

分析用カラム① : ACQITY UPLC BEH C<sub>18</sub> column

(2.1 × 100 mm, 粒子径 1.7 μm, 日本ウォーターズ株式会社)

分析用カラム② : Chiralcel OJ-RH column

(2.0 × 150 mm, 粒子径 5 μm; 株式会社ダイセル)

カラム温度 : 40°C

移動相 : アセトニトリル/蒸留水/1M 酢酸アンモニウム/TFA =

275/715/10/0.5 (v/v/v/v)

流速 : 0.25 mL/min

イオン化法 : Electro-spray ionization (ESI) – positive ion detection mode

Curtain gas and set value: N<sub>2</sub>, 30 (psi)

Collision gas and set value: N<sub>2</sub>, 5 (arbitrary unit)

Ionspray voltage: 5500 (V)

Ion source temperature: 650 (°C)

Ion source gas 1 and set value: Air, 60 (psi)

Ion source gas 2 and set value: Air, 60 (psi)

Interface heater: On

定量時のモニタリングイオン :

S-メチル代謝物,  $m/z$  364 →  $m/z$  149

R-121721 (内部標準物質),  $m/z$  371 →  $m/z$  153

データ解析にはAnalyst 1.4.1またはAnalyst 1.4.2 (Biosystems/MDS SCIEX) を用いた。

### 3.2.10 データ解析方法

S-メチル代謝物生成活性 (V, pmol/min/mg protein)、V/S ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ ) および阻害率 (%) は下記式①～③に従って算出し、小数点以下一桁で表記した。

$$V \text{ (pmol/min/mg protein)} = \frac{\text{生成代謝物濃度(nmol/mL)} \times 1000}{\text{Matrixタンパク質濃度(mg protein/mL)} \times \text{インキュベーション時間(min)}} \quad \text{式①}$$

$$V/S \text{ (}\mu\text{L/min/mg protein)} = \frac{\text{平均代謝物生成活性 (pmol/min/mg protein)}}{\text{添加基質濃度 (}\mu\text{M)}} \quad \text{式②}$$

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{(\text{阻害剤非存在下のV} - \text{阻害剤存在下のV}) \times 100}{\text{阻害剤非存在下のV}} \quad \text{式③}$$

S-メチル代謝物生成におけるミカエリス-メンテン定数 ( $K_m$ ,  $\mu\text{M}$ ) と最大反応速度 ( $V_{\max}$ , pmol/min/mg protein) はEadie-Hofsteeプロットにおいて線形であることを確認した後、WinNonlin Professionalのpharmacodynamic compiled model (model no.101、version4.0.1; Pharsight) を使用して算出した。

各種動物肝臓中におけるS-メチル化反応の肝固有クリアランス ( $CL_{\text{int}}$ , ml/min/kg) は式④、⑤に従って算出した。なお、ラット・イヌ・ヒト肝臓中の肝ミクロソームタンパク質含量 (mg/g liver) は各々44.8、77.9および48.8 mg/g liverとし、ラット・イヌ・ヒトの肝重量 (g/kg) は各々10 g/0.25 kg、320 g/10 kg および1800 g/70 kgとした[44, 45]。

$$CL_{\text{int, in vitro}} \text{ (}\mu\text{L/min/mg protein)} = \frac{V_{\max} \text{ (pmol/min/mg protein)}}{K_m \text{ (}\mu\text{M)}} \quad \text{式④}$$

$$\begin{aligned}
& \text{CL}_{\text{int}} \text{ (mL/min/kg)} \\
& = \frac{\text{CL}_{\text{int, in vitro}} \times \text{肝ミクロソーム含量 (mg/g liver)} \times \text{肝重量 (g/kg)}}{1000} \quad \text{式⑤}
\end{aligned}$$

ラットおよびイヌ血漿中 S-メチル代謝物の立体異性体 (RS+RR 体、SR+SS 体) 存在比および濃度は式⑥および⑦に従って算出した。

$$\begin{aligned}
& \text{S-メチル代謝物の各立体異性体 (RS+RR 体または SR+SS 体) 存在比 (\%)} \\
& = \frac{\text{ISに対する各S-メチル代謝物 (RS+RR体またはSR+SS体) ピーク面積比} \times 100}{\text{ISに対するS-メチル代謝物 (RS+RR体 + SR+SS体) ピーク面積比}} \quad \text{式⑥}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& \text{S-メチル代謝物の各立体異性体 (RS+RR 体または SR+SS 体) 濃度 (ng/mL)} \\
& = \frac{\text{S-メチル代謝物濃度 (ng/mL)} \times \text{S-メチル代謝物の各立体異性体存在比 (\%)}}{100} \quad \text{式⑦}
\end{aligned}$$

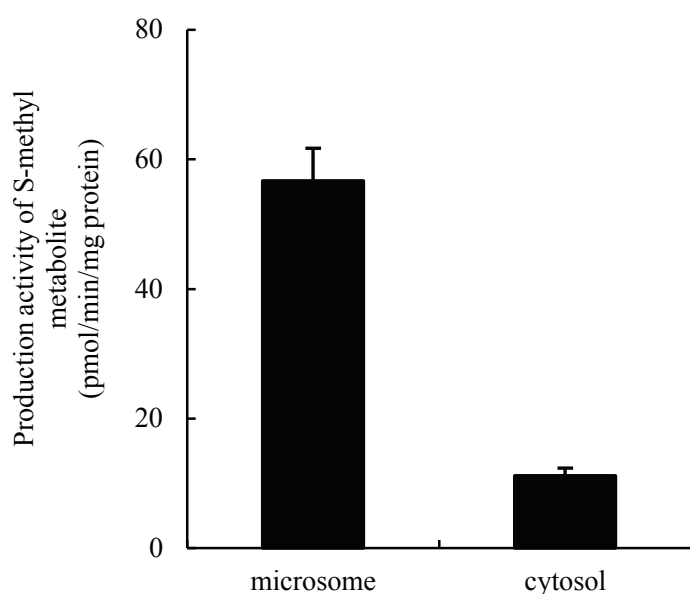
S-メチル代謝物の各立体異性体の薬物動態パラメータ ( $t_{1/2}$ 、 $C_{\text{max}}$ 、 $AUC_{0-1 \text{ h}}$ 、 $AUC_{0-\text{inf}}$ ) は WinNonlin Professional (version 4.0.1; Pharsight Corporation) を使用してノンコンパートメントモデル解析により算出した。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 プラスグレル活性代謝物の S-メチル化反応に関与する酵素

##### 3.3.1.1 ヒト肝ミクロソームおよびサイトソル中でのプラスグレル活性代謝物の S-メチル化反応

ヒト肝ミクロソームおよびサイトソル中のプラスグレル S-メチル代謝物生成活性を比較した (Figure 14)。ヒト肝ミクロソーム中の S-メチル代謝物生成活性はヒト肝サイトソルと比較して約 5 倍高かった。



**Figure 14 S-methylation of the pharmacologically active metabolite of prasugrel in human liver microsomes and cytosol.**

The human liver microsomes or cytosol was incubated with 0.5 mM SAM and 50 mM of the pharmacologically active metabolite of prasugrel at 37°C for 30 minutes or 45 minutes.

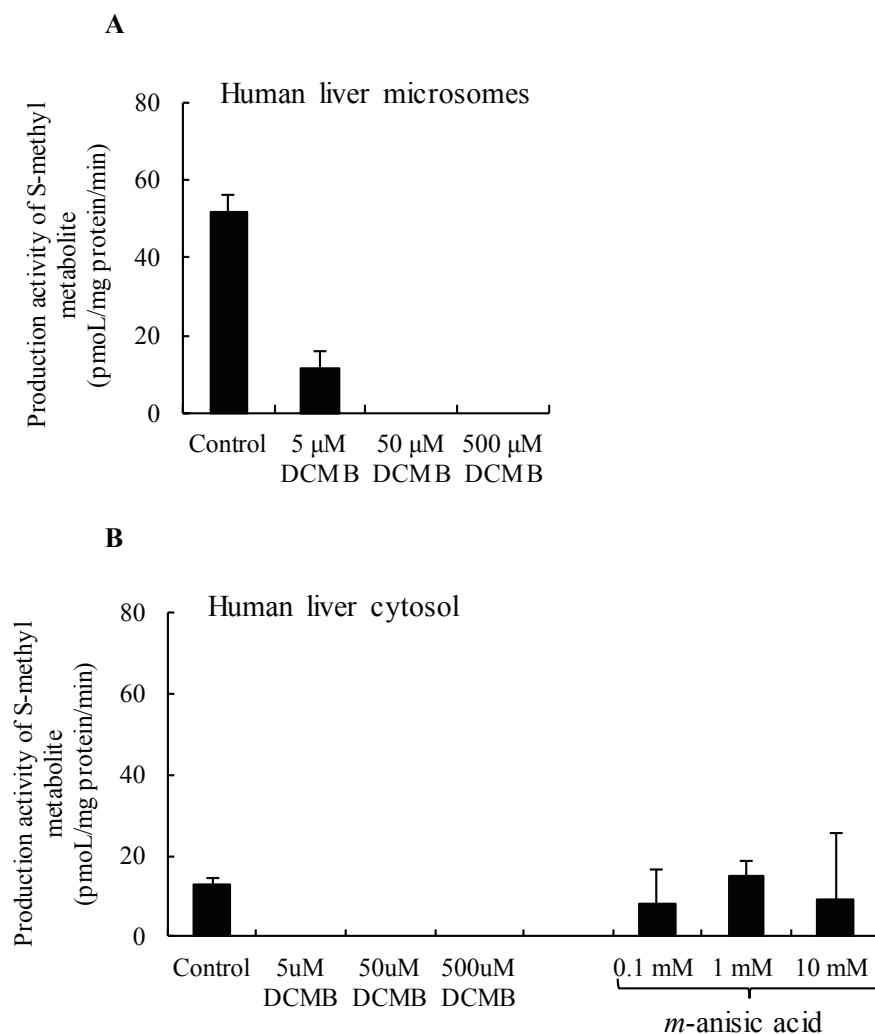
Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three experiments.

### 3.3.1.2 ヒト肝ミクロソームおよびサイトソル中でのプラスグレル活性代謝物の S-メチル化反応阻害

ヒト肝ミクロソームおよびサイトソル中でプラスグレル S-メチル代謝物生成活性に対する DCMB (TMT 阻害剤) と m-アニス酸 (TPMT 阻害剤) の影響を検討した (Figure 15)。

ヒト肝ミクロソーム中で S-メチル代謝物生成活性は 5  $\mu$ M DCMB 添加により阻害され、DCMB 添加濃度 50、500  $\mu$ M でその生成は完全に阻害された。

ヒト肝サイトソル中で S-メチル代謝物生成活性は DCMB 添加濃度 5、50、500  $\mu$ M で完全に阻害されたが、m-アニス酸 (0.1、1、10 mM) では、ほとんど阻害されなかった。



**Figure 15 Inhibitory effects of DCMB and *m*-anisic acid on S-methylation of the pharmacologically active metabolite of prasugrel in human liver microsomes and cytosol.**

(A) S-methyl metabolite formation activity from the pharmacologically active metabolite with or without DCMB in pooled human liver microsomes.

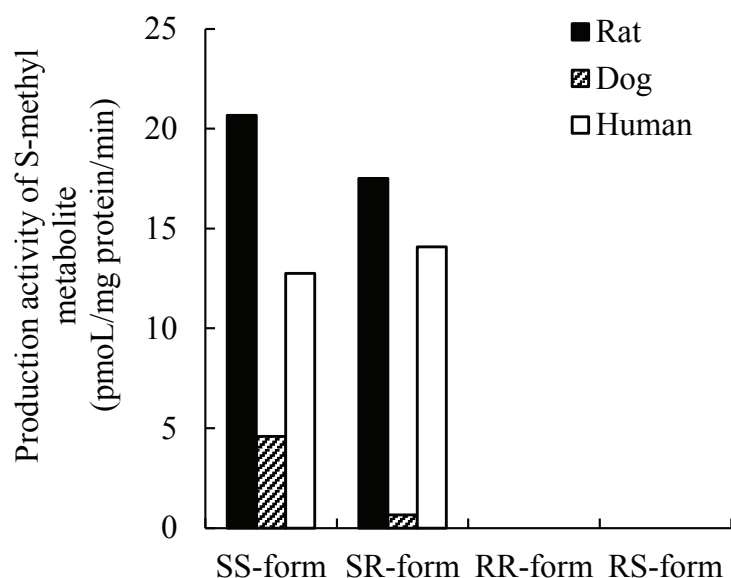
(B) S-methyl metabolite formation activity from the pharmacologically active metabolite with or without DCMB and *m*-anisic acid in pooled human liver cytosol.

Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three experiments.

### 3.3.2 TMT (チオール S-メチルトランスフェラーゼ)の立体選択的代謝活性と酵素活性種差

プラスグレル活性代謝物 4 種光学異性体 (RR, RS, SR, SS 体) を用いて、ラット・イヌ・ヒト肝ミクロソーム中のプラスグレル S-メチル代謝物生成活性を比較した (Figure 16)。

ラット・イヌ・ヒトすべての肝ミクロソーム中で、S-メチル代謝物の生成は基質にプラスグレル活性代謝物光学異性体 SR 体、SS 体を使用した時のみ、認められた。また、S-メチル代謝物生成活性はラット、ヒト、イヌの順に高かった。



**Figure 16 S-methylation of the single enantiomers of the pharmacologically active metabolite of prasugrel in rat, dog, and human liver microsomes.**

The rat, dog, and human liver microsomes were incubated with 0.5 mM SAM and 100 mM the single enantiomer of the pharmacologically active metabolites of prasugrel at 37°C for 30 minutes. Data are expressed as the mean of duplicate experiments.

さらに、プラスグレル活性代謝物光学異性体（SR 体、SS 体）から S-メチル代謝物生成に対する各種肝ミクロソームの  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ )、 $V_{\max}$  ( $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg protein}$ ) を算出し、S-メチル化代謝クリアランス ( $\text{CL}_{\text{int}}$ ,  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{kg}$ ) を各種動物肝臓中で比較した (Table 7)。プラスグレル活性代謝物 SS 体の S-メチル化代謝クリアランスはラット、ヒト、イヌの順に高く、それぞれ 40.41、17.28、11.62  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{kg}$  であった。プラスグレル活性代謝物 SR 体の S-メチル化代謝クリアランスも同様にラット、ヒト、イヌの順に高く、それぞれ 37.61、17.71、2.47  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{kg}$  であった。

**Table 7 Apparent enzyme kinetic parameters and estimated  $\text{CL}_{\text{int}}$  values in S-methylation of SS- and SR-forms of the pharmacologically active metabolite of prasugrel**

Each assay was performed by using rat, dog and human liver microsomes.

$\text{CL}_{\text{int in vitro}}$  and  $\text{CL}_{\text{int}}$  values were scaled to eqs. 4 and 5.

Data were expressed as mean of duplicate experiments.

$K_m$ :  $\mu\text{M}$ ,  $V_{\max}$ :  $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg protein}$ ,  $\text{CL}_{\text{int in vitro}}$ :  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ ,  $\text{CL}_{\text{int}}$ :  $\text{mL}/\text{min}/\text{kg B.W.}$

	SS-form of the pharmacologically active metabolite				SR-form of the pharmacologically active metabolite			
	$K_m$	$V_{\max}$	$\text{CL}_{\text{int in vitro}}$	$\text{CL}_{\text{int}}$	$K_m$	$V_{\max}$	$\text{CL}_{\text{int in vitro}}$	$\text{CL}_{\text{int}}$
Rat	32.58	734.80	22.55	40.41	79.34	1665.74	20.99	37.61
Dog	155.24	722.79	4.66	11.62	208.04	205.30	0.99	2.47
Human	26.29	362.01	13.77	17.28	17.26	243.50	14.11	17.71

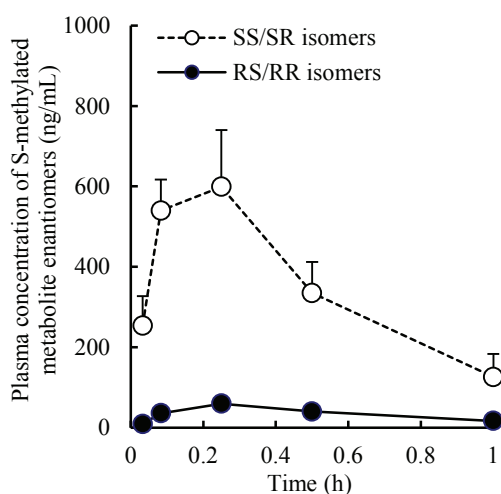


### 3.3.3 プラスグレル活性代謝物投与後のラット・イヌ血漿中 S-メチル代謝物の動態プロファイル

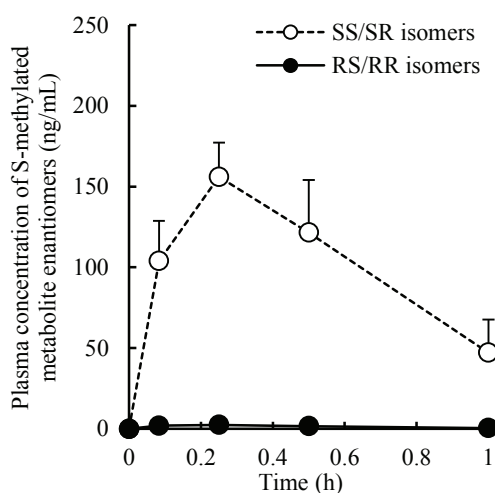
プラスグレル活性代謝物を 1 mg/kg でラットおよびイヌに静脈内投与後の血漿中 S-メチル代謝物の各立体異性体 (RS+RR 体、SR+SS 体) 濃度推移を Figure 24 に、薬物動態パラメータを Table 9 に示した。S-メチル代謝物の RS 体と RR 体および SR 体と SS 体のクロマトグラム上での分離が難しいことから 2 種光学異性体を合わせて測定した。また、TMT の代謝立体選択性を考慮しても、この 2 種光学異性体を合わせて測定することに問題はないと判断した。

ラット、イヌいずれの動物種においても、血漿中 S-メチル代謝物立体異性体濃度は SR+SS 体の方が RS+RR 体より高く、ラットにおける S-メチル代謝物 SR+SS 体の  $AUC_{0-inf}$  は RS+RR 体の約 8.5 倍高く、イヌでは約 76.6 倍高かった。また、S-メチル代謝物 SR+SS 体の  $AUC_{0-inf}$  はラットの方がイヌより約 3 倍高かった。

< A >



< B >



**Figure 24 Plasma concentrations of the S-methylated metabolite enantiomers after intravenous administration of the racemic mixture of the pharmacologically active metabolite of prasugrel to rats and dog at a dose of 1 mg/kg.**

A: Rat plasma concentrations of the S-methylated metabolite enantiomers.

B: Dog plasma concentrations of the S-methylated metabolite enantiomers.

RS/RR isomers (●) and SS/SR isomers (○).

Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of four animals.

**Table 9 Pharmacokinetic parameters of S-methylmetabolite enantiomers after intravenous administration of prasugrel active metabolite to rats and dogs at a dose of 1 mg/kg**

The pharmacokinetic parameters of S-methylmetabolite enantiomers were calculated using the computer program WinNonlin Professional (ver. 4.0.1, Pharsight Corp.) based on the non-compartmental model.

Data were expressed as mean  $\pm$  S.D. of four animals.

Pharmacokinetic parameters	Rat		Dog	
	RS+RR	SS+SR	RS+RR	SS+SR
	isomers	isomers	isomers	isomers
$t_{1/2}$ (h)	0.446 $\pm$ 0.239	0.167 $\pm$ 0.0964	0.270 $\pm$ 0.112	0.424 $\pm$ 0.106
$C_{max}$ (ng/mL)	59.7 $\pm$ 2.15	614 $\pm$ 124	2.40 $\pm$ 1.52	156 $\pm$ 21.2
$AUC_{0-1h}$ (ng·h/mL)	36.0 $\pm$ 3.81	351 $\pm$ 62.6	1.50 $\pm$ 1.04	103 $\pm$ 21.9
$AUC_{0-inf}$ (ng·h/mL)	49.3 $\pm$ 18.1	421 $\pm$ 95.4	1.75 $\pm$ 1.41	134 $\pm$ 42.6

### 3.4 考察

一般的によく知られている S-メチル化代謝酵素は TMT と TPMT である[46]。TMT は肝サイトソル画分にもわずかに存在するが、主に肝ミクロソーム画分に局在する酵素である。一方、TPMT は主に肝サイトソル画分に局在する酵素であり、遺伝的多型を持つと報告されている[47]。本章において、S-メチル代謝物生成活性はヒト肝ミクロソーム中の方がサイトソル中より約 5 倍高く、また、TMT 阻害剤である DCMB により阻害されたが、TPMT 阻害剤である m-アニス酸ではほとんど阻害されなかった。以上の結果から、プラスグレル活性代謝物の S-メチル化反応は遺伝的多型を持たない TMT によって触媒されると考察した。

プラスグレル活性代謝物 4 種光学異性体 (RR 体、RS 体、SR 体、SS 体) からの S-メチル代謝物生成はプラスグレル活性代謝物 2 種光学異性体 SR 体および SS 体からのみ生成し、RR 体、RS 体からの S-メチル代謝物生成は認められなかった。このような代謝酵素反応の立体選択性はラット・イヌ・ヒト全ての肝ミクロソームに共通して観察された。さらに本研究結果から、TMT の代謝立体選択性はプラスグレル活性代謝物の構造中 SH 基の立体配置が重要であることが示された。TMT は 2-メルカプトピラジン、ジエチルジチオカルバメートや統合失調症治療薬であるジブラシドンの代謝物ジハイドロジブラシドンの S-メチル化代謝反応を触媒するが、立体選択性があることについては知られていない[47、48、49]。従って、本研究は TMT の代謝酵素反応に立体選択性があることを初めて明らかにした研究であり、今後の医薬品開発への貢献につながる研究である。

プラスグレル活性代謝物を 1 mg/kg でラットおよびイヌに静脈内投与後の血漿中 S-メチル代謝物立体異性体濃度は SR+SS 体の方が RS+RR 体より高く、ラットにおける S-メチル代謝物 SR+SS 体の  $AUC_{0-\infty}$  は RS+RR 体の約 8.5 倍高く、イヌでは約 76.6 倍高かった。In vitro 試験において、プラスグレル活性代謝物の S-メチル化反応は SR 体、SS 体が優位に進行することを示したが、in vivo 試験においても同様のことが示されたと考察する。また、S-メチル代謝物 SR+SS 体の  $AUC_{0-\infty}$  はラットの方がイヌより約 3 倍高いことは in vitro で得られたプラスグレル活性代謝物の SR 体および SS 体の S-メチル化代謝クリアランス ( $CL_{int}$ )

がイヌと比較してラットの方が高いという結果を反映していると考察する。

プラスグレル活性代謝物の4種光学異性体の薬理活性は、RS体が最も強く、次いでRR体、SS体、SR体の順に薬理活性は低い (*in vitro*)。プラスグレル経口投与後のラット、イヌ、ヒト血漿中活性代謝物4種光学異性体の存在比は活性の強い2種光学異性体が活性の弱い2種光学異性よりも優位に血漿中に存在している[43, 50]。この現象はTMTの代謝立体選択性に起因すると考えられる。つまり、薬効の強い2種光学異性体はTMTによる代謝をほとんど受けないため、活性の弱い2種光学異性体と比較して、高濃度で持続的に血漿中に存在する。本章において「TMTの代謝立体選択性」という酵素特性を明確にしたことは、プラスグレルが低用量で薬効発現し、その効果が確実である理由を説明する上で意味のある研究成果である。

### 3.5 小括

第三章の検討結果から、以下のことが明らかとなった。

- ・ プラスグレル活性代謝物の S-メチル化反応に関与する酵素は遺伝的多型を有さない TMT であった。
- ・ TMT による S-メチル化反応には立体選択性があり、プラスグレル活性代謝物の構造中 SH 基の立体配置が重要であった。
- ・ プラスグレル活性代謝物 SR 体および SS 体の S-メチル化代謝クリアランス ( $CL_{int}$ ) はイヌと比較してラットの方が高かった。
- ・ プラスグレル活性代謝物静脈内投与後のラット、イヌ血漿中 S-メチル代謝物立体異性体濃度は SR+SS 体の方が RS+RR 体より高く、また、S-メチル代謝物立体異性体濃度 SR+SS 体はラットの方がイヌより高かった。本結果は TMT の代謝立体選択性に起因していると考えられた。
- ・ ヒト血漿中に薬効の強い 2 種光学異性体 (RS+RR 体) が優位に存在する理由の 1 つとして、TMT の代謝立体選択性が考えられた。

以上、プラスグレルが低用量で薬効発現し、その効果が確実である要因の 1 つとして TMT の代謝立体選択性が挙げられる。

## 総括

本研究では、まず第1章においてクロピドグレルの個体間変動の要因を明らかにする目的でクロピドグレル代謝物生成に関与する CYP 同定とその寄与率について明らかにした。最初にクロピドグレルからクロピドグレルチオラクトン体生成に関与する CYP 分子種が CYP1A2, 2B6, 2C19 であることを明らかにした。クロピドグレルは加水分解反応により、そのほとんどがクロピドグレルカルボン酸体（不活性代謝物）へ代謝される。著者は更なる試験において、このクロピドグレルカルボン酸体に代謝されなかったクロピドグレルからクロピドグレルチオラクトン体生成に関与するこれら CYP 分子種の代謝寄与率がそれぞれ 35.8%, 19.4% および 44.9% であることを示した。また、クロピドグレルチオラクトン体から活性代謝物生成に関与する CYP 分子種が CYP2B6, 2C9, 2C19 および 3A4 であることを明らかにし、これら CYP 分子種の寄与率はそれぞれ 32.9%, 6.76%, 20.6% および 39.8% であることを示した。クロピドグレルは Figure 4S (page 14) に示したように2段階の酸化反応を経由して活性代謝物を生成する。この2段階の両酸化過程に CYP2C19 が大きく寄与していることがクロピドグレルの個体間変動 (Figure 3S, p13) の要因の一つと考察される。実際、CYP2C19 遺伝子多型の臨床試験において、CYP2C19 PM 群で活性代謝物生成ならびに血小板凝集抑制作用が低いという報告がされている[12]。本研究は「CYP2C19 遺伝子多型と薬効の個体間変動の関連性」に関する臨床試験を起案する上で有用な研究結果である。また、クロピドグレル添付文書に「CYP2C19 遺伝子多型の影響」に関する注意喚起を記載する発端となった研究であり、医療現場での適正使用に貢献した研究である。

次に第2章では、プラスグレルの薬効が低用量で発現し、その効果が迅速、且つ、確実である要因を明らかにするため、プラスグレルの初発代謝である加水分解反応に注目した。すなわち、著者はサル小腸サイトソルからプラスグレルの初発代謝物であるチオラクトン体の生成活性を指標として、新規加水分解酵素を単離精製することに成功し、本酵素が RKIP であることを明らかにした。本研究は RKIP が加水分解代謝活性を持つことを初めて明らかにした研究であり、今後の医薬品開発への貢献につながる研究である。さらに、ヒト小腸 S9 を用いた試験において、小腸 S9 中でのプラスグレル加水分解反応に関与する

hCE2 と RKIP の寄与率がそれぞれ約 60% および 30-40%であることを示した。

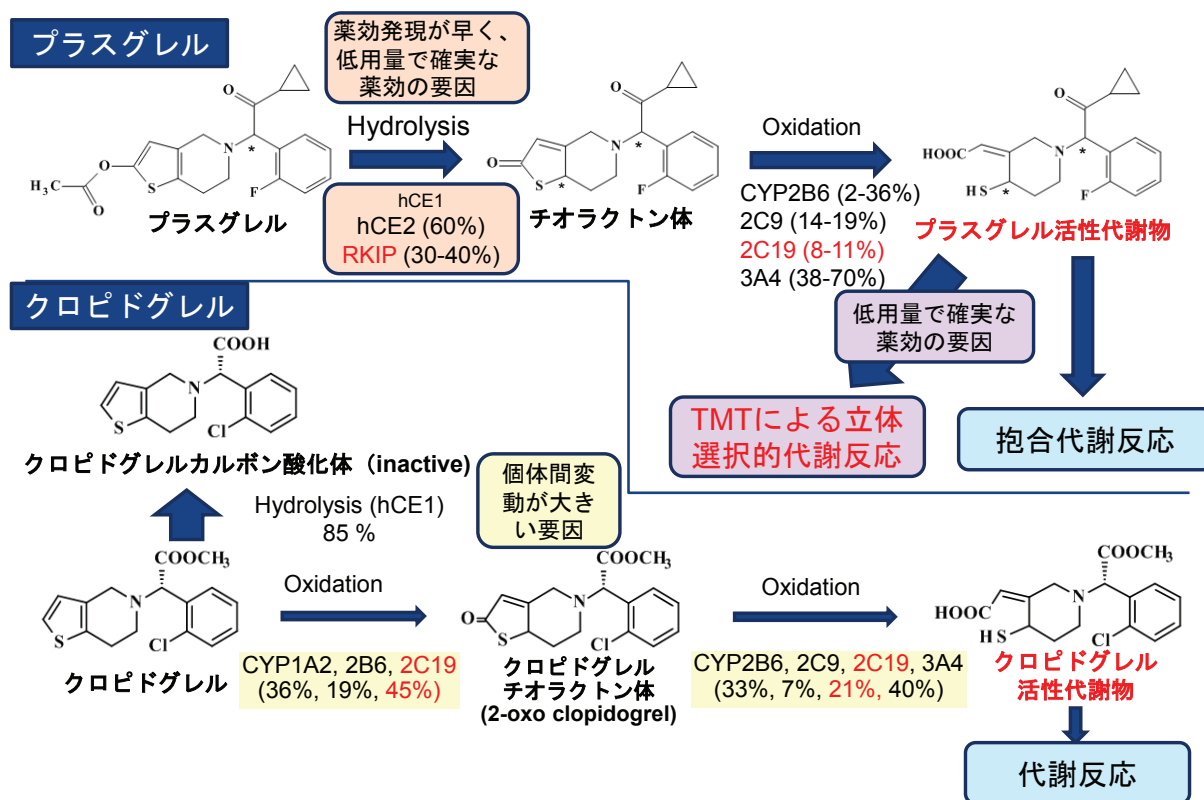
プラスグレルは小腸中でそのほとんどが加水分解反応によりチオラクトン体に代謝され、その後、酸化反応により活性代謝物を生成する。hCE2 は小腸ミクロソーム中に主に発現している加水分解酵素としてよく知られている。プラスグレルの加水分解反応に関与する酵素が hCE1、hCE2 であることはすでに報告されているが、同時に著者らは hCE2 によるチオラクトン体生成活性はプラスグレル濃度 109  $\mu\text{M}$  以上で低下することを報告している。この濃度(109  $\mu\text{M}$ )は 250 mL の水でプラスグレル 10 mg を服薬した際の濃度にほぼ匹敵する。臨床試験において、プラスグレルを 2.5 mg、10 mg、75 mg の用量で服薬した際のチオラクトン体の血漿中濃度は線形であった。*In vitro* の結果を考慮するとプラスグレル加水分解反応に関与する酵素が hCE2 だけでは、チオラクトン体血漿中濃度が用量 75 mg まで線形であることを説明できない。しかし、この *in vitro* と *in vivo* の乖離は RKIP という加水分解酵素が小腸に存在することにより説明可能となった。つまり、本研究において、RKIP という新規加水分解酵素の存在を見出したことがプラスグレルの薬効発現が迅速、且つ確実であるという臨床上の薬理学的優位性を説明する上で重要な成果である。

以上、クロピドグレルとプラスグレルの活性代謝物生成過程に注目した第 1 章と第 2 章の結果から、プラスグレルの薬理学的優位性について両薬物の活性代謝物生成過程に焦点をあてて、以下に考察した。

プラスグレルの活性代謝物生成に関与する CYP 分子種とその寄与率については、すでに Rehmel J.L.F.らにより報告されている[25]。クロピドグレルとプラスグレルの活性代謝物生成経路を比較すると (Figure 10S)、クロピドグレルは hCE1 により、そのほとんどがクロピドグレルカルボン酸体(不活性代謝物)へと代謝される[51]。クロピドグレルカルボン酸体生成の代謝経路はクロピドグレルチオラクトン体生成の競合代謝経路であることを考えると、hCE1 の個体間変動もクロピドグレルの個体間変動の要因の一つと考えられる。一方、プラスグレルは小腸中で hCE1、hCE2、RKIP により加水分解され、そのほとんどが活性代謝物の前駆体であるチオラクトン体へ代謝される。すなわち、プラスグレルの場合、不活性代謝物への代謝経路は存在しないため、活性代謝物への変換効率がクロピドグレルよりも良いと考えられる。また、プラスグレル活性



代謝物生成過程で CYP2C19 の代謝寄与率はクロピドグレルと比較して小さい。このような両薬物の活性代謝物生成過程の違いが、プラスグレルの薬理的優位性、すなわち、プラスグレルがクロピドグレルと比較して、「低用量で薬効発現し、その効果は迅速かつ確実に個人間変動が少ない薬物」である要因の 1 つと考える。



( )内は代謝寄与率

Figure 10S Metabolic pathways of prasugrel and clopidogrel

最後に、第 3 章ではプラスグレルの薬効が低用量で発現し、その効果が確実である要因を明らかにする目的で血漿中の活性代謝物光学異性体 (4 種) のうち活性の強い異性体 2 種が効率的に血漿中に存在する原因を活性代謝物から先の代謝反応、すなわち、S-メチル化反応に注目し、*in vitro* と *in vivo* の両面から評価した。

*In vitro* 評価ではプラスグレル活性代謝物の S-メチル化反応が TMT によって触媒されていることを明らかにし、また、TMT の酵素反応には立体選択性があることも明らかにした。プラスグレル活性代謝物は構造中に 2 箇所不斉中心を持つため、4 種光学異性体の混合物である。これら 4 種光学異性体の *in vitro* 活



性はそれぞれ異なっており、活性が弱い 2 種異性体のみ TMT による S-メチル化反応を受ける。

*In vivo* 評価では、ラットおよびイヌに活性代謝物静脈内投与後の S-メチル代謝物立体異性体の血漿中濃度を測定した。血漿中の S-メチル代謝物立体異性体の曝露は活性の弱い 2 種異性体から生成する S-メチル代謝物 (SR+SS 体) が大部分であった。つまり、*in vitro* で得られた知見が *in vivo* で反映されたと考える。実際、ラット、イヌ、ヒト血漿中 4 種光学異性体活性代謝物の存在比は活性の強い 2 種光学異性体が活性の弱い 2 種光学異性よりも優位に血漿中に存在しており、本現象は TMT の立体選択性に起因すると考えられる。つまり、薬効の強い 2 種光学異性体は TMT による代謝をほとんど受けないため、薬効の低い 2 種光学異性体と比較して高濃度で持続的に血漿中に存在する。「TMT の代謝立体選択性」という酵素特性を本研究で明確にしたことはプラスグレルの薬効発現が低用量で確実である要因の一つとして意味のある研究成果と言える。

以上、プラスグレルとクロピドグレルの活性代謝物生成過程・消失過程の効率的代謝活性化に注目した研究は、臨床上、プラスグレルがクロピドグレルと比較して、「低用量で薬効発現し、その効果は迅速かつ確実で個体間変動が少ない薬物」という薬理学的優位性を説明する上で重要である (Figure 11S)。本研究成果はすでに市販されている両薬剤の適正使用に貢献している。さらに、こうした新規薬物代謝酵素の発見、既知薬物酵素の新たな基質特異性の発見は今後の薬物代謝学の拡充、さらには、プロドラッグの創薬に貢献できると考えられる。

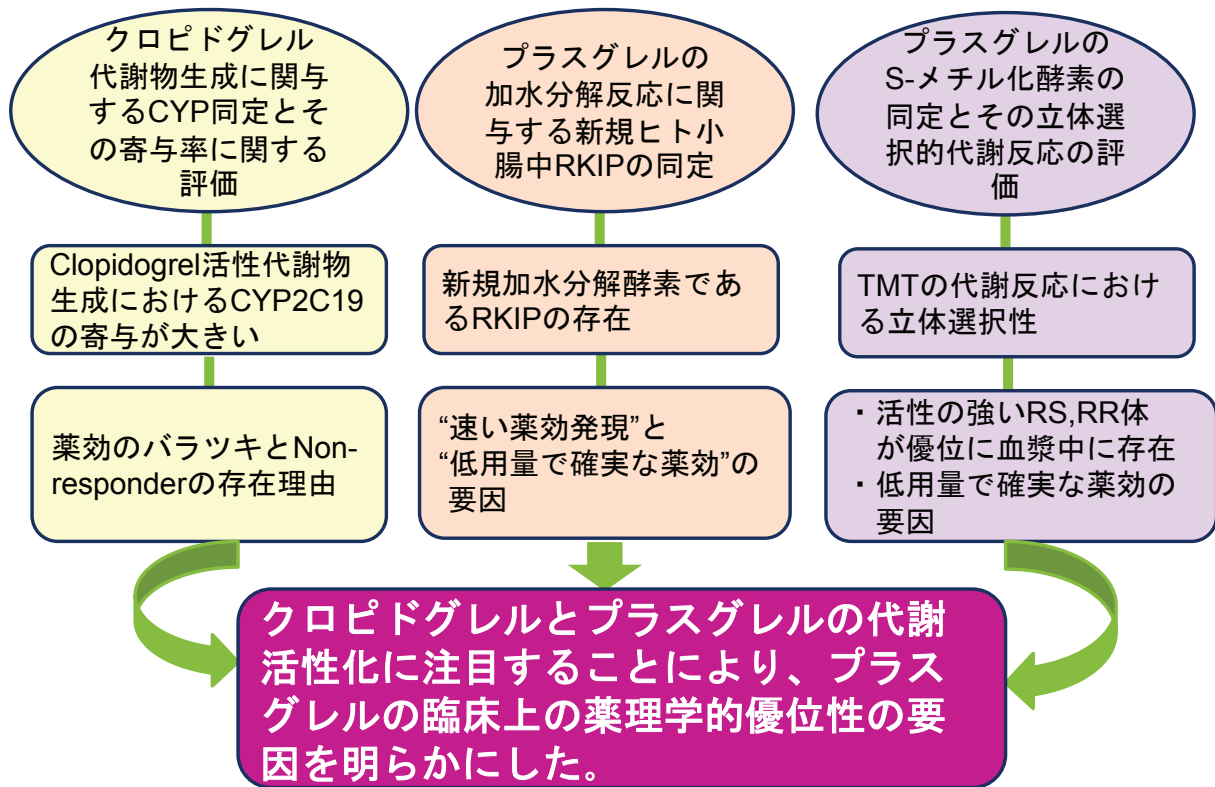


Figure 11S チェノピリジン系抗血小板薬の代謝活性化に関する研究(総括)

## 参考文献

1. 平成 26 年我が国の人口動態 - 厚生労働省
2. 平成 26 年（2014）人口動態統計の年間推計 - 厚生労働省
3. 平成 26 年（2014）患者調査の概況 - 厚生労働省
4. 循環器病の診断と治療に関するガイドライン（2006-2007 年度合同研究班報告）[ダイジェスト版] 急性心筋梗塞（ST 上昇型）の診療に関するガイドライン
5. 非 ST 上昇型急性冠症候群の診断に関するガイドライン（2012 年改訂版）
6. 百瀬 弥寿徳 「病態生理からアプローチした薬物療法虚血性心疾患（Ischemic Heart Disease）」ファーマシストプラス No.20
7. 循環器病の診断と治療に関するガイドライン（1998-1999 年度合同研究班報告）冠動脈疾患におけるインターベンション治療の適応ガイドライン（冠動脈バイパス術の適応を含む）－待機的インターベンション－
8. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, Gordon PC, Cutlip DE, Ho KK, Giambartolomei A, Diver DJ, Lasorda DM, Williams DO, Pocock SJ, Kuntz RE (1998) A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent anticoagulation restenosis study investigators. *N Engl J Med.* 339: 1665-1671.
9. 安定冠動脈疾患における待機的 PCI のガイドライン（2011 年改訂版）
10. プラビックス<sup>®</sup>錠 75 mg 添付文書
11. 15 年度医療用医薬品国内売上高ランキング（AnswersNews, 2016/05/30）
12. Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, Payne CD, Farid NA, Ernest CS 2nd, Lachno DR, Salazar D, Winters KJ (2007) Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J Thromb Haemost* 5: 2429-2436.
13. Saito S, Isshiki T, Kimura T, Yokoi H, Nanto S, Takayama M, Kitagawa K, Nishikawa M, Miyazaki S, Nakamura M (2014) Efficacy and safety of adjusted-dose prasugrel compared with clopidogrel in Japanese patients with acute coronary syndrome: the PRASFIT-ACS study. *Circ J* 78: 1684-1692.

14. Isshiki T, Kimura T, Ogawa H, Yokoi H, Nanto S, Takayama M, Kitagawa K, Nishikawa M, Miyazaki S, Ikeda Y, Nakamura M, Saito S (2014) Prasugrel, a third-generation P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist, in patients with coronary artery disease undergoing elective percutaneous coronary intervention. *Circ J* **78**: 2926-2934.
15. Farid NA, Kurihara A, Wrighton SA (2011) Metabolism and disposition of the thienopyridine antiplatelet drugs ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel in humans. *J Clin Pharmacol* **50**: 126-142.
16. Sugidachi A, Ogawa T, Kurihara A, Hagihara K, Jakubowski JA, Hashimoto M, Niitsu Y, Asai F (2007) The greater in vivo antiplatelet effects of prasugrel as compared to clopidogrel reflect more efficient generation of its active metabolite with similar antiplatelet activity to that of clopidogrel's active metabolite. *J Thromb Haemost* **5**: 1545-1551.
17. Yoneda K, Iwamura R, Kishi H, Mizukami Y, Mogami K, Kobayashi S (2004) Identification of the active metabolite of ticlopidine from rat in vitro metabolites. *Br J Pharmacol* **142**: 551-557.
18. Wallentin L, Varenhorst C, James S, Erlinge D, Braun OO, Jakubowski JA, Sugidachi A, Winters KJ, Siegbahn A (2008) Prasugrel achieves greater and faster P2Y<sub>12</sub>receptor-mediated platelet inhibition than clopidogrel due to more efficient generation of its active metabolite in aspirin-treated patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* **29**: 21-30.
19. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A (2010) Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos* **38**: 92-99.
20. Takahashi M, Pang H, Kawabata K, Farid NA and Kurihara A (2008) Quantitative determination of clopidogrel active metabolite in human plasma by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* **48**: 1219-1224.
21. Roland YK, Rostami HA and Tucker GT (2004) Abundance of cytochromes P450 in human liver: A meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol* **57**: 687-688.

22. Savi P, Combalbert J, Gaich C, Rouchon MC, Maffrand JP, Berger Y and Herbert JM (1994) The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A. *Thromb Haemost* 72: 313-317.
23. Dansette PM, Libraire , Bertho G, MansuyD (2009) Metabolic oxidative cleavage of thioesters evidence for the formation of sulfenic acid intermediates in the bioactivation of the antithrombotiv prodrugs ticlopidine and clopidogrel. *Chem Res Toxicol* 22: 369-373.
24. Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, Uzabiaga MF, Fedeli O, Savi P, Pascal M, Herbert JM, Maffrand JP and Picard C (2002) Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos* 30: 1288-1295.
25. Rehmel JL, Eckstein JA, Farid NA, Heim JB, Kasper SC, Kurihara A, Wrighton SA and Ring BJ (2006) Interactions of two major metabolites of prasugrel, a thienopyridine antiplatelet agent, with the cytochromes P450. *Drug Metab Dispos* 34: 600-607
26. Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvalle C, Aiach M, Lechat P and Gaussem P (2006) Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 108: 2244-2247.
27. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias W, Braunwald E and Sabatine MS (2009) Cytochrome P-450 polymorphism and response to clopidogrel. *N Engl J Med* **360**: 354-362.
28. Simon T, Verstuyft C, Krause MM, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, Steg PG, Ferrière J, Danchin N, and Becquemont L (2009) Genetic Determinants of Response to Clopidogrel and Cardiovascular Events. *N Engl J Med* 360: 363-375.
29. Umemura K and Iwaki T (2016) The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Prasugrel and Clopidogrel in Healthy Japanese Volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev* 0: 1-8.

30. Williams ET, Jones KO, Ponsler GD, Lowery SM, Perkins EJ, Wrighton SA, Ruterbories KJ, Kazui M, Farid NA (2008) The biotransformation of prasugrel, a new thienopyridine prodrug, by the human carboxylesterases 1 and 2. *Drug Metab Dispos.* 36: 1227-1232.
31. Guidance for Industry Drug Interaction Studies – Study Desigh, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations 2012 FDA DRAFT GUIDANCE
32. Asai F, Jakubowski JA, Naganuma H, Brandt JT, Matsushima N, Hirota T, Freestone S, Winters KJ (2006) Platelet inhibitory activity and pharmacokinetics of prasugrel (CS-747) a novel thienopyridine P2Y<sub>12</sub> inhibitor: a single ascending dose study in healthy humans. *Platelets.* 17: 209-217.
33. Kazui M, Ogura Y, Hagihara K, Kubota K, Kurihara A (2016) Human Intestinal Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) Catalyzes Prasugrel as a Bioactivation Hydrolase. *Drug Metab Dispos* 44: 115-123.
34. Ishizuka T, Yoshigae Y, Murayama N, Izumi T. (2013) Different hydrolases involved in bioactivation of prodrug-type angiotensin receptor blockers: carboxymethylenebutenolidase and carboxylesterase 1. *Drug Metab Dispos* 41: 1888-1895.
35. Kubota K, Inaba S, Nakano R, Watanabe M, Sakurai H, Fukushima Y, Ichikawa K, Takahashi T, Izumi T, Shinagawa A (2015) Identification of activating enzymes of a novel FBPase inhibitor prodrug, CS-917. *Pharmacology Research & Perspectives* 2015;3: e00138.
36. Bazzi, M. D.; Youakim, M. a; Nelsestuen, G. L (1992) Importance of phosphatidylethanolamine for association of protein kinase C and other cytoplasmic proteins with membranes. *Biochemistry.* 31: 1125–1134.
37. Yeung K, Janosch P, McFerran B, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, Kolch W (2000) Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol* 20: 3079-3085.

38. Yeung KC, Rose DW, Dhillon AS, Yaros D, Gustafsson M, Chatterjee D, McFerran B, Wyche J, Kolch W, Sedivy JM (2001) Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 21: 7207-7217.
39. Corbit, K. C.; Trakul, N.; Eves, E. M.; Diaz, B.; Marshall, M.; Rosner, M. R. (2003) Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J. Biol. Chem.* 278: 13061–13068.
40. Lorenz K, Lohse MJ, Quitterer U (2003) Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature.* 426: 574-579.
41. Al-Mulla F, Bitar MS, Taqi Z, Yeung KC (2013) RKIP: much more than Raf kinase inhibitory protein. *J Cell Physiol.* 228: 1688-1702.
42. Hasegawa M, Sugidachi A, Ogawa T, Jakubowski JA and Asai F (2005) Stereoselective inhibition of human platelet aggregation by R-138727, the active metabolite of CS-747 (Prasugrel, LY640315), a novel P2Y<sub>12</sub> receptor inhibitor. *Thromb Haemost* 94: 593-598.
43. Wickremsinhe ER, Tian Y, Ruterbories KJ, Verburg EM, Weerakkody GJ, Kurihara A and Farid NA. (2007) Stereoselective metabolism of prasugrel in human using a novel chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Drug Metab Dispos* 35: 917-921.
44. Davies Brain and Morris Tim (1993) Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharma Research* 10: 1093-1095.
45. Iwatsubo T, Suzuki H and Sugiyama Y (1997) Prediction of species differences (rats, dogs, humans) in the in vivo metabolic clearance of TM796 by the liver from in vitro data. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 462-469.
46. Glauser TA, Kerremans AL, Weinshilboum RM (1992) Human hepatic microsomal thiol methyltransferase. Assay conditions, biochemical properties, and correlation studies. *Drug Metab Dispos* 20: 247-255.

47. Glauser TA, Nelson AN, Zembower DE, Lipsky JJ, Weinshilboum RM (1993) Diethyldithiocarbamate S-methylation: Evidence for catalysis by human liver thiol methyltransferase and thiopurine methyltransferase. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 23-32.
48. Lee DH and Kim DH (1999) S-methylation of 2-mercaptopyrazine in rat liver microsomes and cytosol. *Xenobiotica* 29: 909-916
49. Obach RS, Prakash C, Kamel AM (2012) Reduction and methylation of ziprasidone by glutathione, aldehyde oxidase, and thiol S-methyltransferase in humans: an in vitro study. *Xenobiotica* 42: 1049-1057.
50. Kazui M, Hagihara K, Farid NA, Kurihara A (2008) Stereoselectivity of thiol s-methyl transferase responsible for the methylation of the active metabolite of prasugrel, in ISSX Online Abstracts of 15<sup>th</sup> North American Regional ISSX Meeting; 2008 October 12-16; San Diego, CA.  
<http://issx.confex.com/issx/15na/webprogram/Paper10992.html>
51. Hagihara K, Kazui M, Kurihara A, Yoshiike M, Honda K, Okazaki O, Farid NA, Ikeda T (2009) A possible mechanism for the differences in efficiency and variability of active metabolite formation from thienopyridine antiplatelet agents, prasugrel and clopidogrel. *Drug Metab Dispos* 37: 2145-2152.



## 主論文目録

本学位論文は下記の原著論文を元に作成され、東京理科大学薬学研究科に提出されたものである。

1. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A (2010) Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos* 38: 92-99.
2. Kazui M, Ogura Y, Hagihara K, Kubota K, Kurihara A (2016) Human Intestinal Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) Catalyzes Prasugrel as a Bioactivation Hydrolase. *Drug Metab Dispos* 44: 115-123.
3. Kazui M, Hagihara K, Izumi T, Ikeda T, Kurihara A (2014) Hepatic microsomal thiol methyltransferase is involved in stereoselective methylation of pharmacologically active metabolite of prasugrel. *Drug Metab Dispos* 42: 1138-1145.

## 謝辞

本研究論文の作成にあたり、終始懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました東京理科大学薬学部 青山隆夫教授に深甚なる謝意を表します。また、多くの有益なご助言と御指導を賜りました東京理科大学薬学部 鍛冶 利幸教授、岡 淳一教授、花輪 剛久教授、山下 親正教授、信州大学医学部附属病院臨床研究支援センター 廣田 孝司博士（前東京理科大学薬学部教授）に心から御礼申し上げます。

本研究は第一三共株式会社薬物動態研究所で行われたものであり、研究の機会を与えて下さいました元三共株式会社薬物動態研究所 所長 池田 敏彦博士に謹んで感謝申し上げます。また、終始御指導、御支援頂きました第一三共株式会社薬物動態研究所 前所長 泉 高司博士ならびに現所長 安東 治博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、直接御指導およびご助言を頂きました第一三共株式会社薬物動態研究所 栗原 厚博士に心より感謝いたします。また、本研究において多くの有益な御助言および御協力をいただきました共著者を始めとする多くの方々に心から感謝いたします。