◆原 著◆

2-methyl-3-(1, 4, 5, 6-tetrahydronicotinoyl) pyrazolo [1, 5-a] pyridine (KC-764)の血小板機能抑制作用

村 嶋 正 幸*¹, 成 田 有 吾*², 西 塔 正 広*²,
河 原 宣 子*¹, 檜 本 三 智 子*¹, 橋 爪 永 子*¹,
遠 藤 太 久 郎*², 西 川 政 勝*², 出 口 克 巳*³,
白 川 茂*²

Antiplatelet effects of 2-methyl-3-(1,4,5,6-tetrahydronicotinoyl)
pyrazolo [1, 5-a] pyridine (KC-764)

Seiko MURASHIMA*¹, Yugo NARITA*², Masahiro SAITOH*²,
Noriko KAWAHARA*¹, Michiko KASHIMOTO*¹, Eiko HASHIZUME*¹,
Takurou ENDO*², Masakatu NISHIKAWA*², Katsumi DEGUCHI*³,
Shigeru SHIRAKAWA*²

Key words : KC-764, platelet aggregation, cyclooxygenase

The effect of 2-methyl-3-(1, 4, 5, 6-tetrahydronicotinoyl) pyrazolo [1, 5-a] pyridine (KC-764) on human platelet aggregation and its mechanism of action were investigated. The inhibitory activity of KC-764 on arachidonic acid-induced platelet aggregation was most potent with IC₅₀ of 4.2×10^{-8} M and was about 100 times more potent than that of acetylsalicylic acid (ASA). KC-764 weakly inhibited prostaglandin G₂- and prostaglandin H₂-induced platelet aggregations. Neither KC-764 nor ASA had effect on platelet aggregation induced with STA₂ (thromboxane A₂ analog). KC-764 inhibited strongly human platelet cyclooxygenase activity. The effect of KC-764 on platelet aggregation, differently from ASA, was reversible. The inhibitory effect of KC-764 on cyclic nucleotide phosphodiesterases was weak. KC-764 had no effect on the concentration of cAMP and cGMP.

These results suggest that the reversible inhibitory effects of KC-764 on platelet aggregations are mediated mainly via inhibition of platelet cyclooxygenase.

*¹ 三重県立看護短期大学 [〒 514 津市鳥居町 100] ; Mie Nursing College, Tsu City, Mie, 514, Japan.

*² 三重大学第二内科学教室 [〒 514 津市江戸橋 2-174] ; The 2nd Department of Internal Medicine, Mie University School of Medicine, Tsu City, Mie, 514, Japan.

*³ 三重大学医療技術短期大学部 [〒 514 津市江戸橋 2-174] ; College of Medical Science, Mie University, Tsu City, Mie, 514, Japan. 受付: 1993. 1.13, 受理: 1993. 3.8.

緒 言

抗血小板療法は、血栓性疾患の発症予防あるいは再発予防に有効であることより、血栓性疾患の治療法として注目され、さまざまな機序を有する血小板機能抑制剤が開発されている。しかし、現在臨床上有効とされている薬剤は少なく、副作用の問題もあり、さらに有用な抗血小板剤の登場が待たれている。

今回、新たに開発された血小板機能抑制剤 2-methyl-3-(1, 4, 5, 6-tetrahydronicotinoyl)pyrazolo [1, 5-a] pyridine (KC-764, 図 1) のヒト血小板に対する抑制効果につき *in vitro* にて検討したので報告する。

材料および方法

1. 材料

KC-764 は杏林製薬より, STA₂ (thromboxane A₂ analog) は小野薬品より, 3-morpholinolinosynonimine (SIN-1) は武田薬品工業より提供された。

2. 血小板凝集

薬剤を服用していない健康成人より得たクエン酸加多血小板血漿 (PRP) を用い, turbidimetric 法により観察した。凝集惹起剤として ADP (Sigma, 終濃度: 1.3 μ M), コラーゲン (Hormon-Chemie, 0.8 μ g/ml), アドレナリン (Merck, 1.3 mM), platelet-activating factor (PAF, Avanti Polar Lipids, 0.9 μ g/ml), アラキドン酸 (AA, Sigma, 0.9 mM), プロスタグランディン G₂ (PGG₂, フナコシ, 2.7 μ M), プロスタグランディン H₂ (PGH₂, フナコシ, 2.7 μ M) を用いた。

KC-764 の血小板に対する作用が、可逆的なものか、あるいはアスピリン (ASA) と同様非可逆的なものか知る目的で、以下の実験を行った。PRP を生食, ASA (Sigma, 100 μ M) あるいは KC-764 (10 μ M) と 37°C, 5 分間インキュベーション後、血小板を ACD 加生食にて 2 回洗浄。その洗浄血小板を薬剤を含まないクエン酸加血漿に再浮遊させた。薬剤とのインキュベーション後および洗浄後に AA (1.9 mM) による凝集を観察した。

Fig. 1 Chemical structure of 2-methyl-3-(1, 4, 5, 6-tetrahydronicotinoyl)pyrazolo [1, 5-a] pyridine (KC-764)

3. 血小板内カルシウム濃度

血小板凝集反応に伴う血小板内カルシウム濃度の変化を洗浄血小板を用いて Platelet Ionized Calcium Aggregometer (Chrono-Log) にて既報の方法¹⁾により測定した。血小板刺激剤としてトロンビン (持田製薬, 0.1 U/ml), STA₂ (1 μ M), コラーゲン (2 μ g/ml), AA (10 μ M) を用いた。なお、血小板内カルシウムの変化を刺激剤添加後の最大値 (peak, μ M) と添加前の値 (resting, μ M) とで表した。

4. 血小板シクロオキシゲナーゼ活性

ヒト血小板シクロオキシゲナーゼ活性を Takayama らの方法⁴⁾に基づき測定した。ただし、今回 Bio-solv にかわり 10% Triton X-100 を用いた。すなわち、Hepes-Tyrod 液 (pH 7.4) に浮遊させたゲル濾過血小板 (1×10^8 個) を, KC-764 あるいは生食と 37°C にて 5 分間, さらに 200 μ M AA と 1 分間インキュベーションした。インキュベーション後、チオバルビツール酸試薬 (0.8% チオバルビツール酸 2 容と 7% 過塩素酸 1 容) を加え, 10 分間煮沸。さらに 10% Triton X-100, 1N NaOH を加えて, 548 nm にて吸光度を測定した。

5. 血小板 cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) 活性

ヒト血小板より既報の方法²⁾により cAMP-PDE および cGMP-PDE を分離した。PDE 活性の測定は既報の方法³⁾により 0.5 μ M [³H] cAMP (ICN Pharmaceutical), 0.5 μ M [³H] cGMP (ICN Pharmaceutical) を用いて行った。PDE に対する KC-764 の影響は、KC-764 非存在下の PDE 活性に対する抑制率で表した。

6. 血小板内 cAMP, cGMP 濃度測定

洗浄血小板に KC-764 またはプロスタグラ

Table 1 Effects of KC-764 on human platelet aggregation.

		IC ₅₀ (M)				
		Inducer				
		ADP (1.3 μ M)	Collagen (0.8 μ M)	Adrenaline (1.3 mM)	PAF (0.9 μ g/ml)	AA (0.9 mM)
KC-764	(n=5)	5.0×10^{-6}	4.2×10^{-7}	5.3×10^{-7}	1.4×10^{-5}	4.2×10^{-8}
ASA	(n=3)	1.7×10^{-4}	3.3×10^{-5}	3.0×10^{-5}	7.3×10^{-4}	5.8×10^{-6}

Platelet-rich plasma were pretreated with KC-764 or ASA for 5 min at 37 °C. Platelet aggregation was initiated by addition of the indicated agents and was monitored by the change in light transmission.

Fig. 2 Effects of KC-764 on PGG₂- and PGH₂-induced human platelet aggregations. Platelet-rich plasma were pretreated with indicated concentration of KC-764 or aspirin for 5 min at 37°C before addition of PGG₂ or PGH₂. Platelet aggregation was monitored by the change in light transmission.

ンディン E₁ (PGE₁, フナコシ) あるいは SIN-1 を添加後 37°C にて 1 分間インキュベーションした。その後、過塩素酸を添加し、血小板を超音波破碎した。さらに KOH を加え遠心し、上清中の cAMP または cGMP 濃度をヤマサのキットを用いて測定した。

結 果

1. 血小板凝集能に対する KC-764 の効果

PRP を KC-764, ASA または生食 (コントロール) と 37°C, 5 分間インキュベーション後に各血小板凝集惹起物質を添加した。コントロ

ールの最大凝集率を 50% 抑制する KC-764 または ASA の濃度 (IC₅₀) の平均値を表 1 に示す。KC-764 は ASA よりも低濃度で各血小板凝集を抑制した。

さらに、PGG₂ および PGH₂ 凝集に対する KC-764 の影響も検討した (図 2)。ASA は 1 mM でも PGG₂ による血小板凝集を抑制しなかった。一方、KC-764 は 1 mM で凝集をほぼ完全に抑制した。また PGH₂ 凝集に対しても ASA (1 mM) は抑制効果がなかったが、KC-764 (1 mM) には抑制効果があった。同様の所見は 3 名の健常者から得た血小板で認められ

Fig. 3 Reversible effect of KC-764 on arachidonic acid (AA)-induced human platelet aggregation. A: Platelet-rich plasma was incubated with saline (control), aspirin ($100\ \mu\text{M}$) or KC-764 ($10\ \mu\text{M}$) for 5 min at 37°C and then stimulated with $1.9\ \text{mM}$ AA. Preincubation of the platelets with KC-764 as well as aspirin completely abolished AA-induced platelet aggregation. B: Platelet-rich plasma was incubated with saline (control), aspirin ($100\ \mu\text{M}$) or KC-764 ($10\ \mu\text{M}$) for 5 min at 37°C and then the platelets were washed and resuspended in the drug-free plasma. The resuspended platelets were then stimulated with $1.9\ \text{mM}$ AA. The platelets which had been previously incubated with KC-764 and then washed were aggregated normally as control platelets, while the platelets which had been previously incubated with aspirin and then washed were not aggregated.

た。しかし、これら PGG_2 および PGH_2 凝集に対する KC-764 の抑制作用は、AA 凝集に対する作用より、はるかに弱いものであった。

PRP を生食または ASA あるいは KC-764 とインキュベーションすると、ASA および KC-764 は凝集を完全に抑制した (図 3 A)。インキュベーション後、それぞれの血小板を洗浄し、これらの薬剤を含まない血漿に再浮遊させると、図 3 B に示すように、ASA では凝集能の回復はみられなかったが、KC-764 ではコントロールの生食と同じ凝集能まで回復した。

2. 血小板内カルシウムに対する KC-764 の影響

KC-764 は表 2 に示すように、コラーゲン、AA による凝集および血小板内カルシウム濃度の変化を濃度依存性に強く抑制した。一方、KC-764 のトロンビン凝集抑制効果は弱く、 STA_2 凝集に対して KC-764 は抑制効果を持たなかった。

3. 血小板シクロオキシゲナーゼ活性に対する KC-764 の影響

図 4 に示すように、KC-764 を添加しないコントロールでのシクロオキシゲナーゼ活性は $0.83 \pm 0.12\ \text{nmol MDA}/10^8\ \text{platelets}$ (mean $\pm$ SD, $n=8$) であった。KC-764 はシクロオキシゲナーゼ活性を濃度依存性に抑制し、その IC_{50} は $0.3\ \mu\text{M}$ であった。

4. 血小板 PDE に対する KC-764 の影響

KC-764 と同じ pyrazolo-pyridine 骨格をもつ ibudilast (KC-404, 杏林製薬) の cAMP-PDE 活性に対する IC_{50} は $50\ \mu\text{M}$, cGMP-PDE 活性に対する IC_{50} は $5.2\ \mu\text{M}$ であった³⁾が、KC-764 の cAMP-PDE 活性に対する IC_{50} は $1\ \text{mM}$ 以上、cGMP-PDE 活性に対する IC_{50} は $0.4\ \text{mM}$ であった。KC-764 の PDE 活性に対する抑制効果は、きわめて弱かった。

5. 血小板内 cAMP および cGMP 濃度に対する KC-764 の影響

アデニレートシクラーゼ活性化作用を持つ PGE_1 は、低濃度で血小板内 cAMP 濃度を上昇させた (図 5 上段)。また、グアニレートシクラーゼ活性化作用を持つ SIN-1 は、血小板内 cGMP 濃度を上昇させた (図 5 下段)。一方、

Table 2 Effects of KC-764 on human platelet aggregation and intracellular calcium concentration.

Agonist	KC-764 (μ M)	aggregation (%)	[Ca ²⁺] _i resting (μ M)	[Ca ²⁺] _i peak (μ M)
thrombin (0.1 U/ml)	0	100	1.0	3.8
	1	85	1.3	3.8
	10	67	1.2	3.4
STA ₂ (1 μ M)	0	100	2.2	12.4
	0.1	108	1.9	11.0
	1	114	1.2	8.1
	10	118	1.4	9.2
Collagen (2 μ g/ml)	100	116	1.0	8.2
	0	100	1.8	3.7
	0.1	43	1.7	3.2
	0.2	0	1.9	2.8
	0.5	0	1.9	2.8
AA (10 μ M)	1	0	1.8	2.2
	0	100	1.1	3.2
	0.1	14	1.0	2.2
	1	0	1.0	1.0

Aequorin-loaded platelets were suspended in HEPES-Tyrode buffer containing 1 mM Ca²⁺. The platelets were stimulated with various agents in the presence or absence of KC-764. Aggregation and Aequorin luminescence were simultaneously observed with Platelet Ionized Calcium Aggregometer (Chrono-Log).

Fig. 4 Inhibitory effect of KC-764 on human platelet cyclooxygenase. Platelet cyclooxygenase activity was estimated by quantitating the thiobarbituric acid-reactive substances. KC-764 inhibited dose dependently platelet cyclooxygenase activity with IC₅₀ of 3.0×10^{-7} M.

KC-764 は高濃度 (415 μ M) にても, cAMP 及び cGMP 濃度に影響を示さなかった (図 5)。

考 察

KC-404 は, 血小板 PDE 活性の抑制により血

小板凝集を阻害することを, すでにわれわれは報告した²⁾. 今回, 新たに開発された KC-764 は KC-404 と同じ pyrazolo-pyridine 骨格を持つ薬剤であり, KC-404 と同様に血小板凝集を抑制したが, 非常に興味あることにその作用機序はまったく異なっていた。

KC-764 はコラーゲン, アドレナリンおよび AA 凝集を強く抑制した. 特に, AA 凝集抑制作用は最も強く, その IC₅₀ は PAF 凝集, ADP 凝集に対する IC₅₀ の約 1/1,000 であった. また, KC-764 は PGG₂ あるいは PGH₂ 凝集を抑制したが, その抑制効果は AA 凝集に対する抑制作用よりもはるかに弱かった. さらに, KC-764 は STA₂ 凝集を抑制せず, 本剤の血小板凝集抑制作用は主にシクロオキシゲナーゼ活性抑制によるものと考えられた. そこで, KC-764 の血小板シクロオキシゲナーゼ活性に対する影響を検討したところ, KC-764 は血小板シクロオキシゲナーゼ活性を強く抑制することが明らかとなった (図 4)。

また, KC-764 の血小板凝集に対する IC₅₀ 値

Fig. 5 Effects of KC-764 on cAMP (upper panel) and cGMP (lower panel) contents of human platelets. Washed platelets were incubated with saline (control), KC-764, PGE₁ or SIN-1 for 1 min at 37°C, then cAMP and cGMP contents of the platelets were measured. KC-764 had no effect on the concentration of cAMP and cGMP.

(14 μM~42 nM) は, PDE 活性に対する IC₅₀ 値 (0.4 mM~1 mM 以上) とかけ離れており, KC-404 と異なり KC-764 の血小板 PDE 活性抑制作用はきわめて弱いものであった。

また, 今回データを示していないが, 我々の検討では, KC-764 は ASA と同様に 0.2 mM にてもしクロキシゲナーゼ活性を抑制しなかった。さらに KC-764 は, 血小板 cAMP 及び

cGMP 濃度に対しても影響を及ぼさなかったことより, 本剤にはアデニレートシクラーゼおよびグアニレートシクラーゼ活性を亢進させる作用はないと考えられた。

以上の成績より, KC-764 は AA 代謝系, 特にシクロオキシゲナーゼ活性を抑制することにより血小板凝集を阻害していると考えられた。ASA もシクロオキシゲナーゼ活性抑制剤であ

るが, KC-764 は ASA よりもはるかに低濃度で各凝集を抑制した(表 1). Ohmuro や Momo らも, ASA より強力な KC-764 の血小板凝集抑制作用を認めている⁵⁾⁶⁾. また, KC-764 のシクロオキシゲナーゼ活性抑制作用は可逆的で, KC-764 と反応させた血小板を洗浄後, KC-764 非存在下にて刺激すると血小板凝集が惹起された(図 3). KC-764 は, 血小板シクロオキシゲナーゼ活性を非可逆的に抑制する ASA とは著しく異なっていた.

以上, 今回の検討から, KC-764 は KC-404 と異なり PDE 活性抑制ではなく, 主にシクロオキシゲナーゼ活性抑制により血小板凝集を阻害することが明らかとなった. KC-764 は, より低濃度で血小板凝集を抑制し, その抑制作用が可逆的である点で, 同じシクロオキシゲナーゼ活性抑制作用を有する ASA とは異なっていた.

文 献

- 1) Saitoh, M., Ware, J.A., Watkins, S.C., Slayter, H., Salzman E.W.: Localization of aequorin in human platelets by autoradiography and immunohistochemistry. *Thromb. Haemostas.* **62** Suppl: 485, 1989
- 2) 村嶋正幸, 出口克巳, 岩崎英一, 成田有吾, 橋爪永子, 出口 晃, 西川政勝, 白川 茂: Ibudilast (KC-404) のヒト血小板凝集抑制作用. *日本血栓止血学会雑誌* **3**: 392-398, 1992
- 3) Murashima, S., Tanaka, T., Hockman, S., Manganiello, V.C.: Characterization of particulate cyclic nucleotide phosphodiesterases from bovine brain: Purification of a distinct cGMP-stimulated isoenzyme. *Biochem.* **29**: 5285-5292, 1990
- 4) Takayama, H., Okuma, M., Uchino, H.: A simple method for estimation of lipoxxygenase and cyclo-oxygenase pathways in human platelets-the use of thiobarbituric acid reaction. *Thromb. Haemostas.* **44**: 111-114, 1980
- 5) Ohmuro, S., Sasahara, T., Taga, F., Ohkubo, H., and Uchida, H.: Antiplatelet effects of 2-Methyl-3-(1, 4, 5, 6-tetrahydronicotinoyl) pyrazolo [1, 5-a] pyridin in relation to its disposition in rats, rabbits and dogs. *Arzneim. -Forsch./Drug Res.* **42**: 43-47, 1992
- 6) Momo, K., Someya, K., Tachiiri, T., Mitsuoka, Y., Nakamura, K., Imai, S., and Ohkubo, H.: Effects of new antiplatelet agent 2-Methyl-3-(1, 4, 5, 6-tetrahydronicotinoyl) pyrazolo [1, 5-a] pyridin on platelet aggregation and thrombosis in experimental animals. *Arzneim. -Forsch./Drug Res.* **42**: 32-39, 1992