●特集／臨床応用可能な PG_x

2. CYP2C19 遺伝子多型は Clopidogrel 活性体の薬物動態と抗血小板作用に影響する

浜松医科大学薬理学講座

梅 村 和 夫

The Genotype Difference of CYP2C19 Affects Pharmacokinetics of and Pharmacodynamics to an Active Metabolite of Clopidogrel in Healthy Subjects

Kazuo UMEMURA

Department of Pharmacology, Hamamatsu University School of Medicine
1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, Japan

In a meta-analysis, 21% of patients treated with clopidogrel, an antagonist for P2Y₁₂ receptors, achieved low or no ex vivo inhibition of ADP-induced platelet aggregation, which may be caused by CYP2C19 polymorphism. However, it remains unresolved whether or not the polymorphism of CYP2C19 would affect the pharmacokinetics of the active metabolite of clopidogrel (AM) and the pharmacodynamics of antiplatelet effects to the AM. Therefore, in this study, we investigated whether the polymorphism of CYP2C19 would affect the formation of the AM and the antiplatelet effects to the AM in healthy subjects. In single dose study, 300 mg clopidogrel was orally given to 47 subjects. The mean AUC and C_{max} of the AM differed significantly ($P < 0.05$) between the extensive metabolizers (EMs, $n = 18$) and the intermediate metabolizers (IMs, $n = 20$), as well as between EMs and the poor metabolizers (PMs, $n = 9$). Moreover, the pharmacokinetic parameters of the AM correlated well with ADP-induced platelet aggregation and the vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation ratio. In another study, 75 mg clopidogrel was orally given to 10 different subjects for 7 days. The non- or lower responsiveness to clopidogrel in the PMs could not be improved by repeated administration. The CYP2C19 pharmacogenomic status is a determinant for the formation of the AM and antiplatelet effects in healthy subjects.

Key words : clopidogrel, CYP2C19, polymorphism, pharmacokinetics, VASP

1. はじめに

Clopidogrel は血小板膜上の ADP 受容体である P2Y₁₂ の拮抗薬であり、脳卒中、心筋梗塞、末梢動脈閉塞症等に使用されている^{1~4)}。しかし、一部の患者で clopidogrel の効果がみられないという報告があり、急性冠動脈症候群を有する高リスクの患者にとっては大きな問題となっている。メタ解析では約 21% の患者が clopidogrel の効果がない、あるいは弱いと報告されている⁵⁾。また、効果のない、あるいは弱い患者では虚血性心イベントの再発やステント後の再血栓の

リスクの増加が報告されている^{6~13)}。

Clopidogrel は CYP の薬物代謝酵素により活性体に変換されて、P2Y₁₂ 受容体に不可逆的に結合する^{14,15)}。同時に clopidogrel はエステラーゼにより不活性体へと代謝される。Clopidogrel は活性体へ 2 段階で変換される。その変換に関わる酵素は CYP2C19, 1A2, 2B6, 2C9, 3A4/5 と報告されている^{16~22)}。最近、CYP2C19 の遺伝子多型が clopidogrel 活性体の薬物動態や ADP 刺激による血小板凝集に対する抑制作用に影響するという報告がされている。そこで、我々は CYP2C19 の遺伝子多型による活性体の薬物動態や血

血小板凝集抑制作用への影響を検討したのでその結果について紹介する。

2. 方 法

1) 被験者

日本人健康男性 57 名を対象として試験を実施した。47 名は clopidogrel 300 mg を 1 回のみ内服した。他の 10 名の被験者は 1 日 1 回 75 mg を 7 日間内服した。この試験は浜松医科大学倫理委員会の承認を得て、エントリー時に文書により説明し、同意を取得した。

2) CYP の遺伝子解析

被験者から採血し白血球から DNA を抽出し、CYP2C19 の変異を解析した。

3) 試験デザイン

(1) 単回投与試験

47 名の被験者に朝 9 時に clopidogrel 300 mg を内服させた。投与前と投与後 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 時間に採血し、活性体を測定するために血清を分離保存した。活性体は、LC/MS で測定した²¹⁾。また、血小板凝集抑制効果を観察するために、投与前と投与後 1, 4, 6, 24 時間に採血し、アグリゴメーター (MCM hematracracer 313-M, SSR Engineering Co. LTD., Tokyo, Japan) にて ADP 凝集を測定した。

(2) 反復投与試験

10 名の被験者に clopidogrel を毎朝 9 時に 7 日間内服させた。血小板凝集抑制効果を観察するために、投与前と 1 日目と 7 日目の投与後 4 時間に採血し、アグリゴメーターにて ADP 凝集を測定した。

4) VASP のリン酸化の測定

VASP (vasodilator stimulated phosphoprotein) のリン酸化を測定するために、投与前と投与後 1, 4, 24 時間に採血した。血液サンプルを PGE₁のみ、もしくは PGE₁ + ADP とともにインキュベートし、細胞透過処理後、リン酸化状態の VASP を特異的なモノクローナル抗体を用いて間接蛍光抗体法により標識し、デュアルカラーフローサイトメトリーにより、2つのテスト条件を比較し各サンプルにおける VASP リン酸化を阻害する ADP の能力を評価した (Platelet VASP-FCM; Biocytex, Marseille, France)²³⁾。

3. 結 果

1) 変異の頻度

CYP2C19 の変異は、extensive metabolizers (EMs; CYP2C19*1/*1) が 22 名、intermediate metabolizers (IMs; *1/*2 or *1/*3) が 24 名、poor metaboliz-

Fig. 1 Clopidogrel 活性体の血中薬物動態の推移

Table Clopidogrel 活性体の Cmax および AUC と CYP2C19 遺伝子多型の関係

CYP2C19	Cmax (ng/mL)	Ratio (95%CI)	AUC (ng·h/mL)	Ratio (95%CI)
EM (n=18)	39.0±15.0	IM/EM 0.67 (0.51~0.83)*	58.3±21.0	IM/EM 0.71 (0.58~0.98)*
IM (n=20)	26.3±11.0	PM/EM 0.61 (0.45~0.82)#	41.5±15.8	PM/EM 0.57 (0.43~0.83)#
PM (n=9)	23.7±5.9		33.0±5.9	

*P<0.05; IM v.s. EM, #P<0.05; PM v.s. EM

ers (PMs; *2/*2, *3/*3, or *2/*3) が 11 名であった。

2) 単回投与試験

(1) CYP2C19 遺伝子多型と活生体の薬物動態

活性体を測定した 47 名の被験者の CYP2C19 の変異の内訳は、EMs が 18 名、IMs が 20 名、PMs が 9 名であった。平均の血中濃度推移を Fig. 1 に示す。投与後 1 時間で血中濃度はピークに達し、その後速やかに消失し 8 時間後には認められなくなった。最高血中濃度は EMs が最も高く、次いで IMs で PMs が最低であった。活性体の薬物動態パラメーターである Cmax と AUC を Table に示す。Cmax および AUC は EMs と IMs および PMs 間に有意な差 (P<0.05) を認めた。

(2) CYP2C19 遺伝子多型と血小板凝集抑制作用

ADP (20 μM) による血小板凝集に対する抑制効果を測定した。投与前と比べ抑制された率を抑制率 (IPA) として評価した。47 名の被験者の IPA の最高値の分布を Fig. 2 に示す。IPA は大きなばらつきを示し、IPA が 30% に達していない効果の弱い被験者は 47 名中 16 名 (34%) に認められた。投与後の IPA

Fig. 2 Clopidogrel の血小板凝集抑制作用の個体差
ADP 20 μ M

Fig. 3 血小板凝集抑制率の時間推移と
CYP2C19 遺伝子多型との関係

の時間推移を Fig. 3 に示す。EMs では IPA は投与後 4 時間でほぼ最高に達し、6 時間は 4 時間とほぼ同程度であった。IMs および PMs は IPA の最高値は EMs のそれと比べ低く、また、最高値には 6 時間後に達した。IMs および PMs の IPA は最高に達するまでの時間が EMs に比べ遅れていた。

VASP のリン酸化率と CYP2C19 の遺伝子多型との関係を Fig. 4 に示す。EMs では VASP のリン酸化率は IMs および PMs のそれに比べ有意に低値であった (PMs v.s. EMs : $P < 0.01$, IMs v.s. EMs : $P < 0.05$)。VASP のリン酸化率は低値であればあるほど血小板凝集能が抑制されていることを示す。ADP (20 μ M) 刺激時の血小板凝集率 (MPA) の関係を Fig. 5 に示す。VASP のリン酸化率と ADP による凝集率との関係はよい相関を示した ($r = 0.67$, $P < 0.0001$)。つまり、clopidogrel により MPA が抑えられているときには、VASP のリン酸化率が低値を示している。また、VASP のリン酸化率と Cmax および AUC との関係を

Fig. 4 VASP のリン酸化率と CYP2C19 遺伝子多型との関係
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ v.s. EM

Fig. 5 VASP のリン酸化率と血小板凝集率 (MPA) との関係

Fig. 6 に示す。Fig. に示すようによい相関を示した (VASP vs. AUC ; $r = 0.677$, $P < 0.0001$, VASP vs. Cmax ; $r = 0.571$, $P < 0.0001$)。一方、IPA と Cmax および AUC との関係は VASP のリン酸化率と比べ相関が弱かった (IPA v.s. AUC ; $r = 0.405$, $P < 0.005$, IPA v.s. Cmax ; $r = 0.307$, $P < 0.05$)。

3) 反復投与試験

75 mg clopidogrel を 7 日間内服した 10 名の被験者の CYP2C19 の変異の内訳は、EMs 4 名、IMs 4 名、PMs 2 名であった。7 日間内服した後の ADP (20 μ M) 刺激による血小板凝集の抑制率は PMs では 10% 以下とほとんど効果が認められなかった (Fig. 7)。

4. 考 察

今回の研究で、我々は日本人における clopidogrel の血小板凝集抑制効果において個体間に大きなばらつきが存在することを示した。また、CYP2C19 の遺伝子多型が clopidogrel 活性体の薬物動態に大きな影響

Fig. 6 VASP のリン酸化率および血小板凝集抑制率(IPA)と薬物動態パラメーター(Cmax および AUC)との関係

Fig. 7 反復投与試験における血小板凝集抑制率(IPA)と CYP2C19 遺伝子多型との関係

をしていることや血小板凝集抑制率や血小板機能を示す VASP のリン酸化率と活性体の薬物動態との相関がよいことを示した。このことから、clopidogrel の凝集抑制効果の個体間の大きなばらつきは血小板機能の個体差でなく、CYP2C19 の遺伝子多型による clopidogrel 活性体の個体間のばらつきが原因であること

が考えられる。活性体の測定は単回投与試験のみで実施したが、反復投与試験でも CYP2C19 の遺伝子多型は血小板凝集抑制効果に大きく影響を与えており、PMs では 7 日間内服しても凝集抑制効果はほとんどみられなかった。

アグリゴメーターによる血小板凝集能測定は、現在一般的に行われている血小板機能検査の 1 つである。しかし、検体の測定前の調整が必要であり、機器や調整する人によるばらつきがあるともいわれており、ベッドサイドで簡便にできる検査とはいえない。一方、VASP のリン酸化率の測定は採血した血液をそのまま測定に使用できることから簡便であり、診療での使用が期待されている。しかし、測定に使用するキットが高額であり、また特殊な機器が必要であるなど、いくつかの問題点がある。

CYP2C19 の遺伝子多型は民族間で大きく異なる。PMs において欧米人では 3~5% の頻度でみられるが、日本人では 18~23% と多く存在する^{24~26)}。メタ解析では欧米人の 21% が clopidogrel の効果がない、あるいは弱いと報告されている⁵⁾。今回の結果やいくつ

かの報告^{18,21,22)}から CYP2C19 の遺伝子多型が clopidogrel の効果に影響しているとする、日本人に対しては効果のない、あるいは効果が弱い患者の割合が欧米人に比べ高くなることが予測される。我々の研究において、ADP 刺激による血小板凝集抑制率が 30% 以下の効果が弱い被験者の割合は 34% (47 名中 16 名) と高頻度に認められている。

5. おわりに

今回の我々の研究から clopidogrel の血小板凝集抑制効果には大きな個体差が認められ、その個体差は CYP2C19 の遺伝子多型が大きく関係していることを示した。

文 献

- CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996 ; **348** : 1329-39.
- Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001 ; **345** : 494-502.
- Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, et al ; COMMIT (Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) collaborative group. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction : randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2005 ; **366** : 1607-21.
- Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, López-Sendón JL, Montalescot G, Theroux P, et al ; CLARITY-TIMI 28 Investigators. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2005 ; **352** : 1179-89.
- Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC van der Bom JG, Jukema JW, Huisman MV. Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting : A systematic review and meta-analysis. *Am Heart J* 2007 ; **154** : 221-31.
- Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, Shechter M, Bienart R, Goldenberg I, et al. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004 ; **109** : 3171-5.
- Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, Gensini GF, Santini A, Panicia R, et al. Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2007 ; **49** : 2312-7.
- Marcucci R, Gori AM, Panicia R, Giglioli C, Buonamici P, Antonucci D, et al. Residual platelet reactivity is associated with clinical and laboratory characteristics in patients with ischemic heart disease undergoing PCI on dual antiplatelet therapy. *Atherosclerosis* 2007 ; **195** : e217-23.
- Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting : response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 2003 ; **107** : 2908-13.
- Wiviott SD. Clopidogrel response variability, resistance, or both? *Am J Cardiol* 2006 ; **98** : S18-S24.
- Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Bhatt DL, Topol EJ. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *J Am Coll Cardiol* 2005 ; **45** : 246-51.
- Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ. Aspirin and clopidogrel resistance : an emerging clinical entity. *Eur Heart J* 2006 ; **27** : 647-54.
- Gurbel PA, Bliden KP, Samara W, Yoho JA, Hayes K, Fissaha MZ, et al. Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis : results of the CREST Study. *J Am Coll Cardiol* 2005 ; **46** : 1827-32.
- Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, Uzabiaga MF, Fedeli O, Savi P, et al. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos* 2002 ; **30** : 1288-95.
- Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, et al. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost* 2000 ; **84** : 891-6.
- Clarke T, Waskell LA. The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab Dispos* 2003 ; **31** : 53-9.
- Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB, Neer CJ, Hopp AS, Carville DG, et al. Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation* 2004 ; **109** : 166-71.
- Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvalle C, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 2006 ; **108** : 2244-7.
- Farid NA, Payne CD, Small DS, Winters KJ, Ernest CS 2nd, Brandt JT, et al. Cytochrome P450 3A inhibition by ketoconazole affects prasugrel and clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics differently. *Clin Pharmacol Ther* 2007 ; **81** : 735-41.
- Suh JW, Koo BK, Zhang SY, Park KW, Cho JY, Jang IJ, et al. Increased risk of atherothrombotic events associated with cytochrome P450 3A5 polymorphism in patients taking clopidogrel. *CAMJ* 2006 ; **174** : 1715-22.
- Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, Payne CD, Farid NA, Ernest CS 2nd, et al. Common polymorphisms of CYP 2C19 and CYP 2C9 after the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J Thromb Haemost* 2007 ; **5** : 2429-36.
- Kim K, Park P, Hong S, Park JY. The Effect of CYP2C19 Polymorphism on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Clopidogrel : A Possible Mechanism for Clopidogrel Resistance. *Clin Pharmacol Ther* 2008 ; **84** : 236-42.
- Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthal M. Flow Cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost* 1999 ; **82** : 1145-52.
- Ishizaki T, Sohn DR, Kobayashi K, Chiba K, Lee KH, Shin SG, et al. Interethnic differences in omeprazole metabolism in the two S-mephenytoin hydroxylation phenotypes studied in Caucasians and Orientals. *Ther Drug Monit* 1994 ; **16** : 214-5.
- Nakamura K, Goto F, Ray WA, McAllister CB, Jacqz E, Wilkinson GR, et al. Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquin and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. *Clin Pharmacol Ther* 1985 ; **38** : 402-8.
- Furuta T, Sugimoto M, Shirai N, Ishizaki T. CYP2C19 pharmacogenomics associated with therapy of Helicobacter pylori infection and gastro-esophageal reflux diseases with a proton pump inhibitor. *Pharmacogenomics* 2007 ; **8** : 1199-210.