

【要約】

Mechanism of drug interaction between valproic acid and  
carbapenem antibiotics via acylpeptide hydrolase

アシルペプチドハイドロラーゼを介したバルプロ酸  
とカルバペネム系抗生物質の相互作用メカニズム

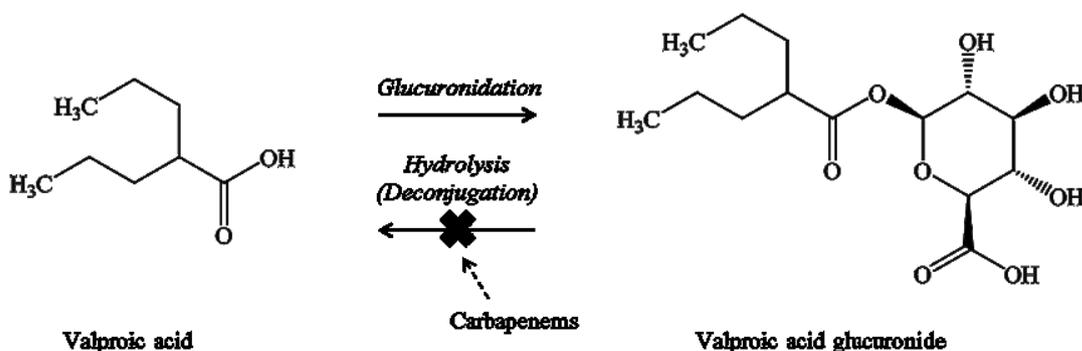
2015 年

鈴木 英子

## 【背景・目的】

バルプロ酸(VPA)は狭い治療濃度域を持った汎用性の高い抗てんかん薬で、カルバペネム系抗生物質との併用で血漿中濃度が急速に低下し、てんかん発作が再発する。本研究は、本薬物相互作用 (DDI) メカニズムの解明を目的とし、VPA の主代謝物であるアシルグルクロナイド (VPA-G) が再び VPA へ加水分解される過程をカルバペネムが阻害することにより血漿中 VPA 濃度の低下が起こる (Fig. 1) との仮説に立って行った。まず、VPA-G 加水分解酵素をヒト肝から精製し、Acylpeptide hydrolase (APEH) と同定した。次にイヌおよびヒト肝キメラマウスに VPA とメロペネム (MEPM) を併用投与し、臨床と同様の血漿中 VPA 濃度の低下と APEH 活性の阻害を確認した。さらに、カルバペネムの APEH 阻害メカニズムを *in vitro* で検討した。

Fig.1 VPA とカルバペネムの相互作用仮説



## 【方法・結果】

### 1. ヒト肝 VPA-G 加水分解酵素の同定

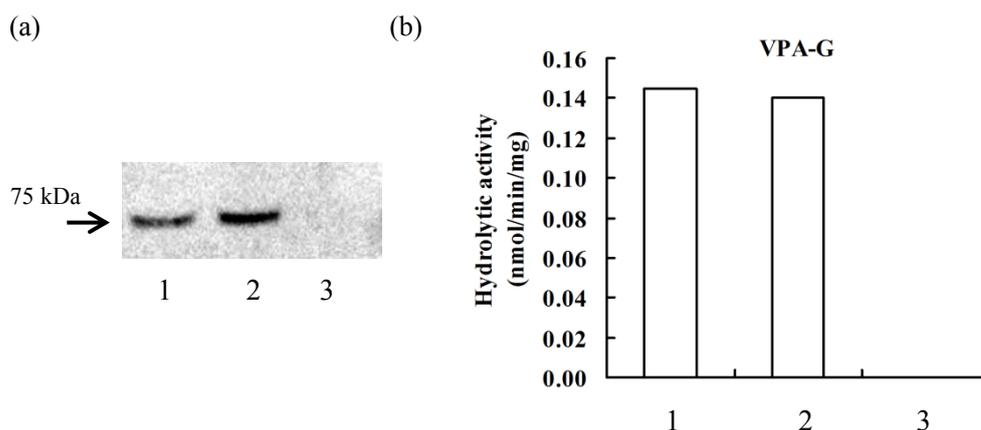
VPA-G 加水分解酵素活性はヒト肝サイトソルで高く、パニペネム(PAPM)で阻害された。各種エステラーゼ阻害剤及び精製酵素を使った検討から、ヒト肝サイトソル中の VPA-G 加水分解酵素はセリンヒドロラーゼの一種であり、 $\beta$ -グルクロニダーゼやカルボキシルエステラーゼ、コリンエステラーゼではないことが示唆された。さらに当該酵素を特定するため、酵素精製を行った。ヒト肝サイトソルから VPA-G 加水分解活性を 2 ステップのカラムクロマトグラフィーで精製し、活性の高いフラクションを SDS-PAGE で分離した。約 75kDa に認めた単一のバンドをゲルの中でトリプシン消化後、ペプチド断片を抽出して LC/MS/MS で分析した。ペプチド断片の MS/MS スペクトルとプロテインデータベース(composite target/decoy International Protein Index (IPI) human database)の比較により、目的酵素を APEH と同定した(IPI accession number: IPI00337741, Sequence coverage: 71%)。エステラーゼ阻害剤への感受性をはじめとした APEH の各種特徴は、ヒト肝サイトソル中 VPA-G 加水分解酵素のものと一致していた (Table 1)。

Table 1 ヒト肝 VPA-G 加水分解酵素と APEH の比較

	ヒト肝 VPA-G 加水分解酵素	APEH
分子量	75 kDa	75 kDa (単量体として)
細胞内局在	Cytosol	Cytosol
阻害剤	DFP, DTNB, PCMB, SL	DFP, DTNB, PCMB, SL

さらに目的酵素が APEH であることを確認するため、ヒトリコンビナント APEH を免疫して得たウサギ抗 APEH 抗血清を用いてヒト肝サイトソルから APEH を除去し、イムノブロットと活性測定を行った。抗血清処理により APEH に相当する 75kDa のバンドが消失すると同時に、VPA-G 加水分解活性も完全に除去された(Fig. 2)。以上から、APEH はヒト肝サイトソルにおける唯一の VPA-G 加水分解酵素であることが示された。

Fig. 2 APEH 除去ヒト肝サイトソルの(a)イムノブロットおよび (b)VPA-G 加水分解活性  
前処理 1: バッファー 2: 免疫前ウサギ血清 3: ウサギ抗 APEH 抗血清

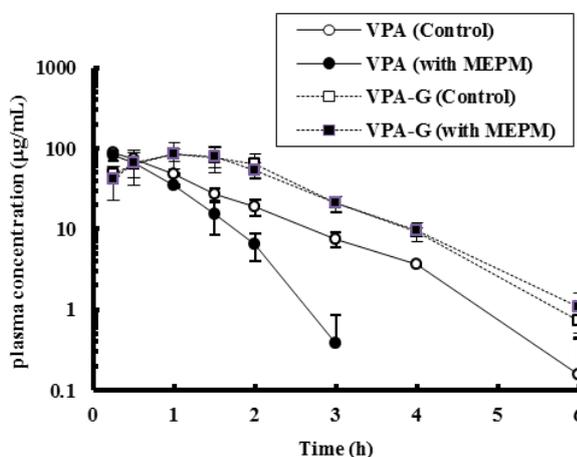


## 2. APEH による VPA-G 加水分解の in vivo 阻害

### 2-1. イヌ in vivo 試験

イヌに VPA と MEPM を同時静脈内投与後の VPA の血漿中濃度は、非併用時と比べて消失が早く、イヌでもヒトと同様の DDI を示した(Fig. 3)。また、投与後 6h までの VPA-G の尿中排泄率は、非併用時 (49.1%) に比べ MEPM 併用時 (73.6%) で増加しており、VPA-G 加水分解の in vivo 阻害が示唆された。In vitro 試験によりイヌ肝及び腎 VPA-G 加水分解酵素も APEH と同定されたため、イヌに VPA 及び

Fig. 3 イヌの血漿中濃度推移



MEPM を同時投与後の肝及び腎中の APEH 活性の阻害を調べた。APEH の代表基質である acetyl alanine p-nitroanilide の加水分解活性は、肝、腎ともに投与後 24 h まで持続的に阻害されていたことから、MEPM による APEH の持続的な阻害がイヌにおける DDI の原因であると考えられた。臨床では、カルバペネム中止後も血漿中 VPA 濃度の回復に数日を要することから、臨床の DDI の原因も APEH の持続的な阻害が原因である可能性が考えられた。

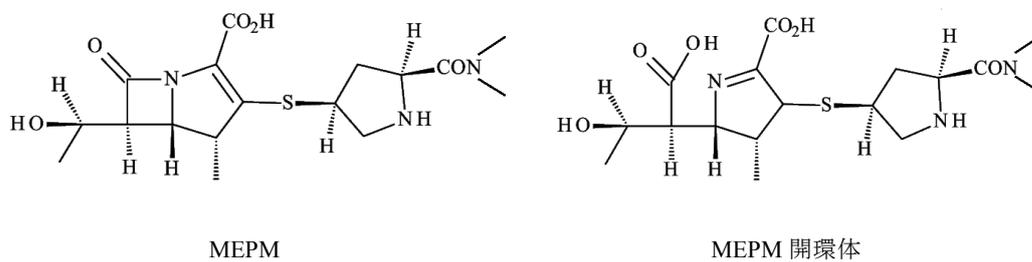
## 2-2. ヒト肝キメラマウス *in vivo* 試験

ヒト肝細胞を移植したヒト肝キメラマウス(入荷時ヒト肝キメラ率 $\geq 70\%$ )に VPA と MEPM を同時静脈内投与すると、イヌやヒトと同様に血漿中 VPA 濃度が低下した。キメラ処置をしていないコントロールマウスでは、MEPM を併用しても DDI は観察されなかったことから、キメラマウスにおいてはヒトキメラ肝が DDI の原因臓器と考えられた。MEPM 併用によりキメラマウスにおける VPA-G の尿中排泄率は増加し、投与後 24 h のキメラ肝 APEH 活性は低下したことから、キメラマウスにおける DDI もイヌと同様に APEH の持続的な阻害が原因であると考えられた。

## 3. カルバペネムによる APEH 阻害メカニズム

カルバペネムは血漿中消失半減期が数分～数時間であるため、持続的な *in vivo* APEH 阻害は非可逆阻害である可能性が高い。そこで PAPM 又は MEPM とプレインキュベーションしたヒト肝サイトソル中の VPA-G 加水分解活性を測定した結果、プレインキュベーション時間依存的な阻害の増強が見られた。ブタ APEH(ヒト APEH との配列相同性=92%)を MEPM とインキュベーション後に一晩透析しても活性が回復しなかったことから、カルバペネムは非可逆的に APEH を阻害することが示された。続いて加水分解酵素の活性中心セリンに共有結合する DFP が  $^{14}\text{C}$ -MEPM とブタ APEH の結合を阻害するか調べた。DFP 未処理に比べ、DFP 処理では  $^{14}\text{C}$ -MEPM の APEH への結合率が 1/5 に低下していた。ウシ血清アルブミンへの MEPM の結合は低く、DFP 処理により変化しなかった。以上から、MEPM は APEH の活性セリンに選択的に結合することが示された。また、MEPM の開環体は APEH 阻害を示さなかったことから、 $\beta$ ラクタム環の開環構造は阻害に必須であると考えられた(Fig. 4)。しかしこの構造は APEH 阻害を示さない全ての  $\beta$ ラクタム剤に共通であるため、カルバペネムに特有な側鎖や  $\beta$ ラクタム環に隣接する複素環構造等も影響していると考えられた。

Fig 4. MEPM 及び開環体の化学構造



**【結語】**

本研究から、VPA とカルバペネムの相互作用の原因は、VPA-G の加水分解を担う APEH のカルバペネムによる非可逆阻害と考えられた。その阻害は、カルバペネムが APEH の活性中心セリンに選択的に結合して起こると考えられた。