



ダイレクトトロンビン・インヒビター アルガトロバン

奥宮, 明子

(Citation)

神戸大学大学院保健学研究科紀要, 25:29-40

(Issue Date)

2009

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/81002139>



ダイレクトトロンビン・インヒビター アルガトロバン

奥宮明子¹

ランニングタイトル：アルガトロバン

【要 旨】

血栓性疾患は日本人の死因の上位を占めている。止血・血栓形成においてはトロンビンが主役を演じる。本総説ではトロンビン・インヒビター アルガトロバンの開発者の一人として、私どもの研究の一端を紹介したい。アルガトロバンは選択的なトロンビン・インヒビターであり、現在、慢性動脈閉塞症、脳血栓症、ATIII欠損乃至減少患者における腎透析そしてヘパリン起因性血小板減少症（HIT）へと適応を広げ、臨床の場で役立っている。ダイレクトトロンビン・インヒビターという新しい治療手段を医療現場に提供するという幸せな果実に加えて、この研究は、トロンビンの様々な機能および酵素活性部位の立体地勢に関する興味深い知見を私どもに与えてくれた。

索引用語：アルガトロバン、ダイレクトトロンビン・インヒビター、トロンビン、トリプシン、構造—活性相関

【緒 言】

血液凝固系において中心的役割を担うトロンビンは蛋白分解酵素である。凝固系では酵素とインヒビターが動的平衡を保っており、平衡の破綻は病態を生じる。したがって酵素の活性をコントロールするインヒビターは病態の解明のみならず、治療薬となる可能性がある。40年前私どもが「トロンビンを制御する」ことに取り組んだ当時、臨床薬として使用されていた抗凝固剤はヘパリンとワーファリンであった。ヘパリンはその作用を発揮するためにアンチトロンビンⅢを必須とし、血中のアンチトロンビンⅢ減少時には効力が著しく低下する。また、ワーファリンは肝臓でのビタミンK依存性凝固因子（プロトロンビン、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ、プロテインC）の生合成を阻害することによって薬効を発揮するという複雑な作用機作を持つ。私どもはこれら既存の薬剤と異なり、「トロンビンを直

接阻害し、かつトロンビンに選択的なインヒビター」を目標に選んだ。

基本骨格はアルギニン

当時、トロンビンの構造に関する情報は皆無と言っていい状況の中で、興味深い示唆を与える報告があった。

1. 酵素の基質読み取り部位

Schechter & Bergerは蛋白分解酵素（パパイン）の活性部位は約25 Åであるとし、酵素の触媒部位から左右にのびた酵素のサブサイト（ $\cdots S_3 S_2 S_1 S_1' S_2' S_3' \cdots$ ）に基質サブサイト（ $\cdots P_3 P_2 P_1 P_1' P_2' P_3' \cdots$ ）が対応するモデルを提唱した¹⁾。すなわち、酵素による基質情報読み取りは、立体的に配置された酵素（蛋白質）分子の一領域と基質（蛋白質）分子の一領域との間で行われており、分子量の大きな酵素および基質の一部の情報が相互作用の鍵となっていると考えられた。

1. 神戸大学大学院保健学研究科

2. フィブリノペプチドの情報

トロンビンは血漿タンパクであるフィブリノーゲンを不溶性のフィブリンにして血液を凝固させる蛋白分解酵素である。 α 、 β 、 γ のダイマーからなるフィブリノーゲン（分子量340,000）の α 、 β 鎖各2個、計わずか4個のArg-Gly結合（Arg:アルギニン、Gly:グリシン）を切断するだけで可溶性のフィブリノーゲンを不溶性のフィブリンにする。フィブリノーゲンには約370個のArg / Lys-X結合（Lys:リジン）があるが、トロンビンは特定の4個のArg-Gly結合のみを切断する^{2,4)}。（ちなみに消化酵素トリプシンはほとんどのArg / Lys-X結合を切断する。）この時遊離されるフィブリノペプチドAは、調べた19種の動物のすべてにおいて、(i) C末がArgであり、(ii) C末のArgから数えて9番目にフェニルアラニン（Phe）が位置していた。Blombäck等は、ArgとPheの間のアミノ酸の数nを0～7個まで変化させた化合物Phe-（Val）n-Arg-OCH₃を合成し、それらの抗トロンビン作用を測定した結果、nが1個の場合、抗トロンビン作用が強く、2個、3個と弱くなり、4個で再び増強し始めて、7個（Argから数えて9番目にPheが位置する）でもっとも抗トロンビン作用が強いことを見出した⁵⁾。

3. 合成アミノ酸エステル

トロンビンはアルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸の合成エステル化合物を分解することが知られている。Sherryらはアルギニンおよびリジンのエステル化合物のトロンビン、プラスミン、トリプシン、カリクレイン等による分解を調べた結果、酵素により基質分解性が異なるが、一般的に α -アミノ基を保護したほうが分解されやすいことを明らかにした⁶⁾。さらに、トロンビンに対する阻害作用は概してアルギニン化合物がリジン化合物より強く、TAMe（tosyl-L-arginine methylester）が最も強い阻害作用を示すことを報告した⁷⁾。

これらの先達の仕事は“トロンビンはアルギニンを読み取る（P特異性はArgである）”ことを示していた。一方で、東独のMarkwardtらは

アミジノベンゼンを骨格とする一連の化合物の抗トロンビン作用を報告した^{8,9)}。自然基質においてトロンビンが読み取る情報はあくまでアルギニンであることから、私共はトロンビン・インヒビターの基本骨格としてアルギニンを選んだ¹⁰⁾。

選択的トロンビン・インヒビターの基本構造

多くの化合物の構造—抗トロンビン活性相関を調べ、トロンビン・インヒビターとして必須の構造要件を探り出していく、という研究方法には簡単且つ阻害効果をはっきりみることでできる測定法を用いることが肝要となる。この目的のためにトロンビンによるフィブリノーゲン—フィブリン変換系を用い、凝固時間を2倍に延長するインヒビター濃度（I₅₀）を阻害効果の指標とした。I₅₀値が小さい程阻害作用は強いことになる。この系で前記のTAMeのI₅₀を測定したところ、1,000 μ Mと弱いながら阻害効果が認められた（表1）。アルギニン骨格を保った

$$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \diagup \\ \text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}-\text{CO}-\text{R1} \\ \diagdown \\ \text{NH} \\ \text{R2} \end{array}$$

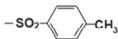
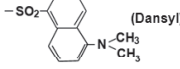
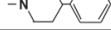
R1	R2	I ₅₀ (μ M)
-OCH ₃ (TAMe)	-SO ₂ -  -CH ₃	1000
-OCH ₃	-SO ₂ -  -N(CH ₃) ₂ (Dansyl)	20
-OCH ₂ CH ₃	Dansyl	8
-OCH ₂ CH ₂ CH ₃	Dansyl	2
-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Dansyl	2
-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Dansyl	50
-NHCH ₂ CH ₃	Dansyl	100
-NHCH ₂ CH ₂ CH ₃	Dansyl	5
-NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Dansyl	2
-NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Dansyl	130
-N 	Dansyl	1
-N  -CH ₃	Dansyl	0.3
-N  -CH ₂ CH ₃ (No.205)	Dansyl	0.1
-N 	Dansyl	100

表1. アルギニン誘導体の構造—抗トロンビン活性相関

ままC端およびN端の構造を系統的に変化させる、という手法で構造－活性相関を調べ、205番目にTAMeに比べ10,000倍阻害活性の強い化合物No.205を得た¹¹⁻¹⁶⁾。

構造－活性相関から得られたトロンビン・インヒビターとしての必須要件は次のようにまとめることができる。

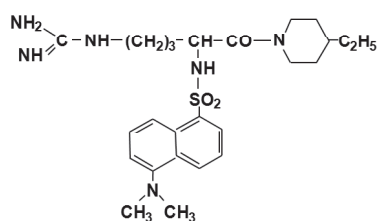
1. 骨格はL-アルギニンであること（リジンあるいはD-アルギニンは作用がない）。
2. α -カルボキシル基（ α -COOH）の置換基は炭素数4のアルキル鎖に相当するエステルまたはアミド、あるいはピペリジンのようなcyclic alkyl鎖であること
3. α -アミノ基（ α -NH₂）の置換基はナフタレンスルフォニル基に代表される芳香環であること。

すなわちアルギニンの側鎖、C端置換基、N端置換基の3本足は抗トロンビン活性を持つ上で極めて大切であることが明らかになった。

表2は合成ペプチド基質を利用して速度論的解析を行った結果である¹⁶⁾。No.205のトロンビンに対する阻害は競合的であり、阻害定数Kiは37nMと非常に小さく、トロンビンに対する

親和性が極めて高いことを示していた。また、塩基性のアミノ酸残基アルギニン及びリジンにP₁特異性を示す他の酵素、すなわち、トリプシン、プラスミン、FXaおよびウロキナーゼに対するKiは、トロンビンに対するKiよりも約300～15,000倍も大きく、No. 205は極めて高度のトロンビン選択性を持っていた。中でも“線溶酵素プラスミンを阻害しない”という、抗血栓薬を目指す上で必須の要件を完璧にクリアしていた。No.205はアンチトロンビンⅢなどの補助因子を必要とせず、トロンビンの活性部位に直接可逆的に結合するトロンビンに選択的なインヒビターであった。当初求めていた夢はここに現実に私どもの手中にあった。1974年のことである。

トロンビン・インヒビターは生体内で有効か？トロンビンを急激に注入するとウサギは死亡するが、ゆっくり少量ずつ注入すると、ウサギは死亡しないで血液中のフィブリノーゲンと血小板が漸次減少していく。このフィブリノーゲンと血小板の減少をトロンビン・インヒビターの点滴静注により濃度依存的に阻止することができた¹⁷⁾。この実験は非常に単純ではあるが、試験管内で強力且つ選択的な作用を持つトロンビン・インヒビターが生体内でも有効であることを示しており、トロンビン・インヒビターを用いて血栓症をコントロールできる可能性をin vivoで初めて示したものである。この時点で“トロンビンを制御する”ということの方向性は確立したと考える。この成果は1975年神戸で開催された日米セミナーで報告した。これは日本から発信された世界で初めての“選択的且つ強力なトロンビン・インヒビター”であった。



酵素	Ki (μM)
トロンビン	0.037
トリプシン	10
プラスミン	500*
FXa	570*
ウロキナーゼ	170*

*Calculated from I50 value.

表2. NO.205の酵素選択性

毒性低減

No.205は選択的トロンビン・インヒビターとしての構造要件を備えているが、急性毒性が強く（LD₅₀: 80mg/kg i.p., マウス）、医薬としての応用が難しいという問題があった。構造－毒性相関を調べる中で、C端へのカルボキシル基（-COOH）の導入が画期的な低毒化をも

たらしした（図1）。このシリーズの化合物で阻害活性も急性毒性もほぼ満足できる候補としてNo.407を得た。さらにアルギニン骨格はそのままで、N端とC端に化学修飾を重ねて、低毒性で高活性を持つトロンビン・インヒビターNo.700を得た。No.700のC端の4つの立体異性体のうち抗トロンビン作用は（2R,4R）体がもっとも強く、（2R, 4S）、（2S, 4R）、（2S, 4S）と順に弱くなり、最も強い（2R, 4R）体と最も弱い（2S, 4S）体では約15,000倍もの驚くべき

差がみられた（表3）^{18, 19)}。

選ばれた（2R, 4R）体はその合成番号からNo.805、あるいはMD805、次いでアルギピジン、そしてアルガトロバンと命名され、多くの臨床試験を経て1990年に慢性動脈閉塞症、1996年に脳血栓症、アンチトロンビンⅢ欠損患者の腎臓透析への臨床適応が日本で認可された。2000年には米国で、2008年には日本でHITへの適応が認可されるに至り、さらに拡大されつつある。

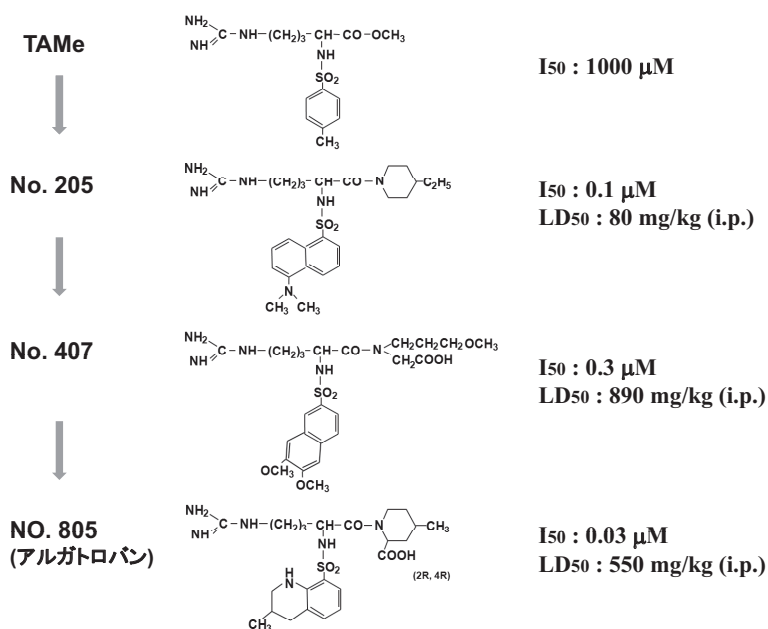
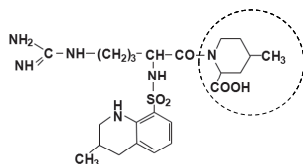


図1. TAMeからアルガトロバンへ——毒性低減



立体異性体	トロンビン	Ki (μM) トリプシン	FXa	プラスミン
2R, 4R (アルガトロバン)	0.019	5.0	210	800
2R, 4S	0.24	30	>500	>500
2S, 4R	1.9	690	>1500	>1500
2S, 4S	280	>500	>500	>500

表3. アルガトロバンおよびその立体異性体の酵素選択性

アルガトロバンの位置づけ

抗凝固剤としては、ワルファリンに代表される経口抗凝固剤、ヘパリンに代表される間接的抗トロンビン剤およびアルガトロバンに代表される直接的トロンビン・インヒビター（ダイレクトトロンビン・インヒビター、DTI、**D**irect **t**rombin **i**nhibitor）の三つにわけられる（図2）。

1. 経口抗凝固剤

ワルファリンに代表されるクマリン誘導体はビタミンKの構造類似体である。ビタミンKは肝臓におけるプロトロンビン、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ、プロテインCの生合成に必須であり、クマリン誘導体はビタミンKに拮抗して活性のない蛋白質であるPIVKA（protein induced by **V**K **a**ntagonist）を生成することにより抗凝固作用を発揮する。経口剤であるという利点はあるが、生合成過程に効いていくために薬効発現までに数日を要する、個体差がある、骨代謝に影響を与える、等の難点がある。

2. 間接的抗トロンビン剤—ヘパリン

ヘパリンは血液中の凝固阻止物質アンチトロンビンⅢの存在下に、トロンビンおよびFXaを不活化し、抗凝固作用を発揮する。体外循環、透析、血栓症の治療に幅広く用いられている。しかし当然の帰結としてATⅢ欠損または減少の場合には薬効は期待できない。アルガトロバンはATⅢを必要としないので、ATⅢ欠損における透析時の抗凝固剤として適応を受けた。近年、ヘパリン療法中に時に血小板数の減少と血栓症の惹起（heparin-induced thrombocyto-

penia; HIT）がみられ、臨床上重篤なヘパリンの副作用として知られるところとなった。血小板顆粒から放出される血小板第4因子はヘパリンと結合してヘパリンの作用を中和するためヘパリン中和因子といわれる。ヘパリンそれ自身は抗原性を持たないが、ヘパリン—血小板第4因子複合体は抗原性をもつようになり、抗体が産生されHITを生じる。この場合、原因となっているヘパリンの投与を停止しなくてはならない。このような場合、抗凝固剤として何を用いたらよいのだろうか。ダイレクトトロンビン・インヒビターのHITに対する有用性が検討され、2000年には米国で、また2008年には日本で、アルガトロバンのHITへの適応が認可された。

3. ダイレクトトロンビン・インヒビター（直接的トロンビン・インヒビター、DTI）

DTIは補助因子を必要とせずそれ自身でトロンビン阻害作用を示すトロンビン・インヒビターの総称である。その作用機作の違いから、トロンビンの(i)活性部位に作用する一機能型（活性部位指向型、univalent）DTI、(ii)活性部位と陰イオン結合部位（ABE）の両方に作用する二機能型（divalent）DTIに分類される。

(i) 一機能型DTI

アルガトロバンはこの代表格である。アルギニン骨格とするアルガトロバンに対し、アミノ化合物を中心とする一連のプロテアーゼ・インヒビター研究の流れがある。GeratzらはAPPA（**a**midinophenylpyruvic **a**cid）を始めとするアミノベンゼン誘導体の抗トロンビン作

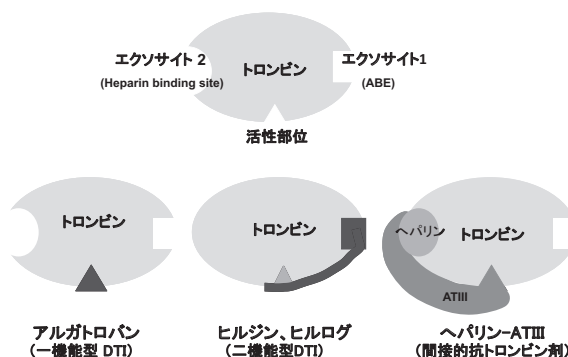


図2. トロンビン活性部位とインヒビター結合部位

用および抗プラスミン作用を報告した²⁰⁾。さらにAPPAの抗トロンビン作用に注目し、多くのアミジノベンゼン誘導体について抗トロンビン物質探索研究が行われたが、これらはトリプシンやプラスミンをも阻害し、選択的かつ強力な抗トロンビン物質はこのシリーズからは見出されていない^{8,9)}。その後、アミジノベンゼンに三脚構造を持たせたアミジノフェニールアラニンを骨格とする一連の研究から、アルガトロバンに比べて抗トロンビン作用がやや強く、酵素選択性は同程度のNAPAP (Na-(2-naphthylsulfonyl-glycyl)-4-amidinophenylalanine piperidine amide) が得られたが、この物質は臨床薬としては日の目を見ていない²¹⁾。近年、酵素-インヒビター複合体構造を基にしてドラッグデザインを行い、経口抗トロンビン剤 ximelagatran が開発されたが、肝障害の副作用のため撤退を余儀なくされている^{22,23)}。

(ii) 二機能型DTI

トロンビンの活性部位と陰イオン結合部位 (ABE) の2点で阻害するインヒビターを指し、ヒルジン、ヒルログなどがこれに当たる。ヒルジンは吸血ヒルの唾液腺から得られた65個のアミノ酸からなる分子量約5,000の強力かつ選択的な抗トロンビン物質である²⁴⁾。そのN末ドメインでトロンビンの活性部位と、また陰イオンに富むC末ドメインでトロンビンの陰イオン結合部位と結合し、極めて強い阻害を示す ($K_i = 10^{-11}M$)。しかしヒルジンはヒトへの投与により抗原性を示すことが報告されている。

アルガトロバンの特徴

1. アルガトロバンはトロンビンを瞬時に阻害する。
2. 補助因子不要
トロンビンの活性部位を直接阻害し、なんらの補助因子を要しない (ダイレクトトロンビン・インヒビターといわれるゆえんである)。これはアンチトロンビンⅢを必須とするヘパリンと異なる点であり、アルガトロバンの安定な薬効につながっている。

3. トロンビンに選択的

アルガトロバンはトロンビンに選択性が高く、プラスミンはほとんど阻害しない。すなわち凝固は阻止するが、線溶は阻止しない。

4. フィブリン結合トロンビンをも強く阻害する。

トロンビンはフィブリンを生成し、生じたフィブリン塊に取り込まれる。フィブリン塊にとりこまれたトロンビンはなおも生きており、フィブリン塊のまわりに新たなフィブリン生成をひき起して血栓の成長を促す。アルガトロバンはフィブリン結合トロンビンをつリーのトロンビンと同様に強く阻害する²⁵⁾。一方、アンチトロンビンⅢ-ヘパリンやヒルジンはフィブリン結合トロンビンを阻害できない。このことは、抗血栓薬としてのアルガトロバンの有利な特徴となっている。

5. スタフィロトロンビンを阻害する。

黄色ブドウ球菌の産生するコアグラゼはプロトロンビンをスタフィロトロンビンに活性化する。スタフィロトロンビンはトロンビンと同様フィブリン塊を生成し、心内膜炎における病態への関与が示唆されている。アルガトロバンはスタフィロトロンビンを強く阻害するが、ヒルジンやヘパリンはスタフィロトロンビンを全く阻害できない (図3)²⁶⁾。

酵素選択性の謎

消化酵素トリプシンは塩基性アミノ酸 (アルギニンやリジン) のC末側のペプチド結合を、キモトリプシンは芳香族アミノ酸 (フェニールアラニンやチロシン) のC末側のペプチド結合を切断する。この基質特異性の違いはこれら酵素の特異性ポケット (S_1) の構造とよく対応しており、トリプシン型酵素ではAsp¹⁸⁹が、キモトリプシンではSer¹⁸⁹が特異性ポケットの底にあることによるとされる。凝固・線溶・キニン系の因子 (酵素) のほとんどは特異性ポケットにAsp¹⁸⁹をもつトリプシン型である。

No.205およびアルガトロバンはトロンビンの活性部位に可逆的に結合する。したがって私ど

もの一連のアルギニン誘導体の構造—活性相関研究は対応する酵素の活性部位の立体地勢に関して興味深いデータを提供した。前述（表3）のようにアルガトロバンのC端の2-カルボキシル基（2-COOH）と4-メチル基（4-CH₃）に関する4つの立体異性体の抗トロンビン活性は（2R、4R）、（2R、4S）、（2S、4R）、（2S、4S）と順に弱くなり、最も強い（2R、4R）体と最も弱い（2S、4S）体では約15,000倍という驚異的な差を示す^{18,19}。同様の結果は抗トリプシン活性についてもみられ、全体に弱いながら、（2R、4R）、（2R、4S）、（2S、4R）、（2S、4S）の順に弱くなっていく。FXaやプラスミンに対する阻害は全体に極めて弱い、（2R、4R）体が最も強いインヒビターであることには変わり

なかった。このことから、トロンビンとトリプシン（そしておそらくFXaやプラスミン）における疎水性結合ポケット（ピペリジン結合部位）はきわめてよく似た立体地勢を持っていると考えられた。

さらに興味深いことには、ピペリジンの4位へのフェニル基の導入は抗トロンビン活性を著しく低下させたのに対し、トリプシン、プラスミン、カリクレインについては低下させないばかりかむしろ増強させる傾向にあったのである（表4）²⁷。ピペリジンの4位にフェニル基を導入した化合物は抗トロンビン作用を失い、ここにトロンビン・インヒビターから派生した選択的なトリプシン・インヒビター MNAPPA（表5）が見出された²⁸。

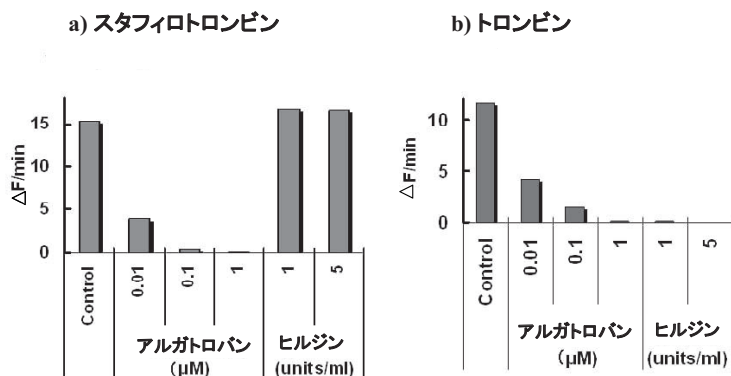
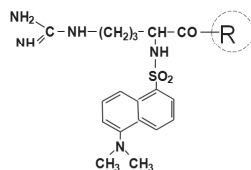


図3. スタフィロトロンビンはアルガトロバンによって阻害されるがヒルジンは阻害されない
縦軸はトロンビンおよびスタフィロトロンビンの酵素活性（蛍光基質分解活性）を1分あたりの蛍光強度変化量（ $\Delta F/\text{min}$ ）で示す。



R	トロンビン Iso (μM)	トリプシン Ki (μM)	プラスミン Ki (μM)	カリクレイン Ki (μM)
	0.1	6.8	2000	100
	100	3.2	700	30

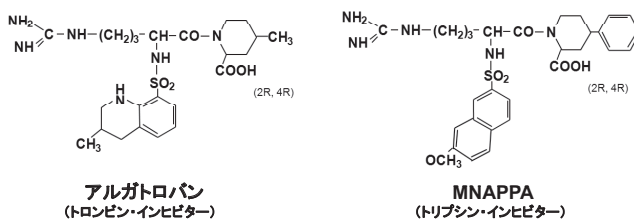
表4. 4-フェニル基導入の効果

現在、多くの蛋白質のX線解析のデータが蓄積され、酵素の立体構造について原子レベルで見ることができる。1990年代には、トロンビンの結晶解析データが次々と報告され、アルガトロバン・トロンビン複合体のX線結晶解析が報告された²⁹⁾。小分子合成インヒビターは結晶化に有用であるばかりでなく、酵素の活性中心を視覚化する上でもおおいに役立った。

構造一阻害活性相関から得られた酵素活性部位の立体地勢は、アルガトロバンとトロンビンのX線結晶解析のデータを利用して確かめることができる²⁹⁾ (PDB:1DWC)。トロンビンとトリプシンはともにAsp¹⁸⁹を特異性ポケットの底に持ち、アミノ酸配列は相同性が高いが、トロンビンにはアミノ酸挿入 (insertion) が多い。活性部位近傍のアミノ酸残基60 (アミノ酸配列で60番目のアミノ酸残基) には残基数9個よりなる挿入ループ (60挿入ループ) がある。アルガトロバンのC-末ピペリジンの4-CH₃の代わりに4-フェニル基を導入すると明らかにトロンビンの60挿入ループと衝突する。すなわち、トロンビンでは60挿入ループでポケットの底がふさがれていたのである。トリプシンでは挿入ループは無く、トリプシン・インヒビター MNAPPA におけるピペリジンの4-フェニル基はぶつからない²⁸⁾。

関節腔でのトロンビン

慢性関節リウマチ患者関節においてフィブリン様物質の沈着がみられる。私どもは慢性関節リウマチ (RA) 患者関節液中のトロンビン・アンチトロンビンⅢ複合体 (TAT) が変形性関節症 (OA) 患者関節液のそれに比べ約10倍も高いことを見出し、慢性関節リウマチ患者関節腔内でトロンビンが活性化されていることを示した (図4a)³⁰⁾。さらにトロンビンは関節軟骨からのプロテオグリカン (軟骨の構成成分) の放出を促し、軟骨破壊に関与すると報告されているが、このトロンビンによる軟骨プロテオグリカンの放出はアルガトロバンで強く阻害された (図4b)³¹⁾。また、関節滑膜細胞でのトロンビン・レセプター (PAR) の発現は慢性関節リウマチ患者では変形性関節症患者に比べ10倍高いと報告されている。PARは多くの細胞に存在し、トロンビンは止血・血栓に絡んだいわゆる凝固作用以外に骨、軟骨をはじめとする種々の細胞に対し広範な作用を有する。トロンビンのこれらの作用をアルガトロバンがどのように修飾するかは、病態解明のみならず新しい治療原理の開拓につながる興味ある分野である。



酵素	Ki (μM)	
	アルガトロバン	MNAPPA
トロンビン	0.02	2
トリプシン	5	0.1
プラスミン	800	>60
カリクレイン	2000	>60
ウロキナーゼ	>60	>60
トリプターゼ	>60	>60

表5. トロンビン・インヒビター アルガトロバンとトリプシン・インヒビター MNAPPA

【おわりに】

長年にわたって抗凝固剤としてヘパリンおよびワルファリンが使用されてきた。自然界に産生されたこれらとは異なり、構造—阻害活性相関研究に基づくドラッグデザインによりトロンビン・インヒビター アルガトロパンは誕生した。アルガトロパンの誕生によりトロンビン—トロンビン・インヒビター複合体の構造研究が行われ、現在その形を立体的に見ることができ、酵素活性部位に関する知見は飛躍的に進んだ。トロンビン・インヒビターの研究はアルガトロパンから経口抗トロンビン剤へと治療の選択肢をさらに広げようとしている。

【謝 辞】

トロンビン・インヒビターの開発研究は神戸大学医学部生理学第一講座（岡本彰祐教授）と三菱化成（株）との間で行われた共同研究である。

【文 献】

1. Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27 : 157-162, 1967.
2. Doolittle RF, Blombäck B. Amino-acid sequence investigations of fibrinopeptides from various mammals : Evolutionary implications. *Nature* 202 : 147-152, 1964.
3. Blombäck B, Blombäck M, Hessel B, et al. Structure of N-terminal fragments of fibrinogen and specificity of thrombin. *Nature* 215 : 1445-1448, 1967.
4. Scheraga HA. Active site mapping of thrombin. In : *Chemistry and Biology of Thrombin*. Lundblad RL, Fenton JWII, Mann KG (Eds.), Ann Arbor, Ann Arbor Science, pp.145-158, 1977.
5. Blombäck B, Blombäck M, Olsson P, et al. Synthetic peptides with anticoagulant and vasodilating activity. *Scand J Clin Lab Invest* 107 (Suppl.) : 59-61, 1969.
6. Sherry S, Troll W. The action of thrombin on synthetic substrates. *J Biol Chem* 208 : 95-105, 1954.
7. Sherry S, Alkjaersig N, Fletcher AP. Comparative activity of thrombin on substituted arginine and lysine esters. *Am J Physiol* 209 : 577-583, 1965.
8. Markwardt F, Landmann H, Walsmann P.

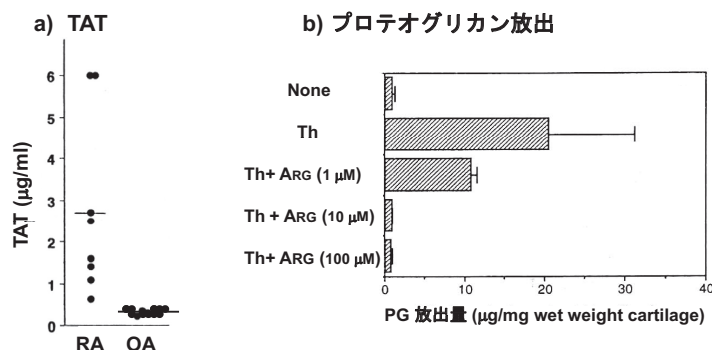


図4. 関節腔でのトロンビン活性化(a)とトロンビンによる軟骨プロテオグリカン放出に対するアルガトロパンの抑制効果(b)

変形性関節症 (OA) および慢性関節リウマチ (RA) 患者関節液中のTAT濃度、(b) ウシ関節軟骨をトロンビン (Th) あるいはトロンビンとアルガトロパン (Th + ARG) と反応させた後、培養液中に放出されたプロテオグリカン量。TAT: トロンビン—ATIII複合体、PG: プロテオグリカン。

- Comparative studies on the inhibition of trypsin, plasmin, and thrombin by derivatives of benzylamine and benzamidine. *Eur J Biochem* 6 : 502-506, 1968.
9. Markwardt F, Klöcking HP, Nowak G. Antithrombin and antiplasmin effect of 4-amidinophenylpyruvic acid in vivo. *Thromb Diath Haemorrh* 24 : 240-247, 1970.
10. Okamoto S, Hijikata A. Rational approach to proteinase inhibitors. In : *Drug Design. Medical Chemistry* 11, Ariens EJ (Ed.) , New York, Academic Press, pp.143-169, 1975.
11. Okamoto S, Hijikata A, Ikezawa K, et al. A new series of synthetic thrombin-inhibitors (OM-inhibitors) having extremely potent and selective action. *Thromb Res* 8 (Suppl) : 77-82, 1976.
12. Tonomura S, Kikumoto R, Tamao Y, et al. A novel series of synthetic thrombin-inhibitors. II. Relationships between structure of modified OM-inhibitors and thrombin inhibitory effect. *Kobe J Med Sci* 26 : 1-9, 1980.
13. Okamoto S, Kinjo K, Hijikata A, et al. Thrombin inhibitors. 1. Ester derivatives of Na-(arylsulfonyl)-L-arginine. *J Med Chem* 23 : 827-830, 1980.
14. Kikumoto R, Tamao Y, Ohkubo K, et al. Thrombin inhibitors. 2. Amide derivatives of Na-substituted L-arginine. *J Med Chem* 23 : 830-836, 1980.
15. Hijikata A, Okamoto S. A strategy for a rational approach to designing synthetic selective inhibitors. *Semin Thromb Hemost* 18 : 135-149, 1992.
16. Hijikata A, Okamoto S, Kikumoto R, et al. Kinetic studies on the selectivity of a synthetic thrombin-inhibitor using synthetic peptide substrates. *Thromb Haemost* 42 : 1039-1045, 1979.
17. Hijikata A, Okamoto S, Mori E, et al. In vitro and in vivo studies of a new series of synthetic thrombin-inhibitors (OM-inhibitors) . *Thromb Res* 8 (Suppl) : 83-89, 1976.
18. Okamoto S, Hijikata A, Kikumoto R, et al. Potent inhibition of thrombin by the newly synthesized arginine derivative No. 805. The importance of stereo-structure of its hydrophobic carboxamide portion. *Biochem Biophys Res Commun* 101 : 440-446, 1981.
19. Kikumoto R, Tamao Y, Tezuka T, et al. Selective inhibition of thrombin by (2R,4R)-4-methyl-1-[N²-(3-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-8-quinoliny)-sulfonyl]-L-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid. *Biochemistry* 23 : 85-90, 1984.
20. Geratz JD. Inhibition of thrombin, plasmin and plasminogen activation by amidino compounds. *Thromb Diath Haemorrh* 23 : 486-499, 1970.
21. Stürzebecher J, Markwardt F, Voigt G, et al. Cyclic amides of N α -arylsulfonylamino acylated 4-amidinophenylalanine—tight binding inhibitors of thrombin. *Thromb Res* 29 : 635-642, 1983.
22. Boos CJ, Lip GY. Ximelagatran : an eulogy. *Thromb Res* 118 : 301-304, 2006.
23. Lee ML, Larrey D, Olsson R, et al. Hepatic findings in long-term clinical trials of ximelagatran. *Drug Safety* 28 : 351-370, 2005.
24. Markwardt F. Die Isolierung und chemische Charakterisierung des Hirudins. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 308 : 147-156, 1957.
25. Berry CN, Girardot C, Lecoffre C, et al. Effects of the synthetic thrombin inhibitor argatroban on fibrin- or clot-incorporated thrombin : comparison with heparin and recombinant Hirudin. *Thromb Haemost* 72 : 381-386, 1994.
26. Hijikata-Okunomiya A, Kataoka N.

- Argatroban inhibits staphylothrombin. *J Thromb Haemost* 1 : 2060-2061, 2003
27. Hijikata-Okunomiya A, Okamoto S, Kikumoto R, et al. Similarity and dissimilarity in the stereogeometry of the active sites of thrombin, trypsin, plasmin and glandular kallikrein. *Thromb Res* 45 : 451-462, 1987.
28. Hijikata-Okunomiya A, Tamao Y, Kikumoto R, et al. Selective inhibition of trypsin by (2R,4R)-4-phenyl-1-[Na-(7-methoxy-2-naphthalenesulfonyl)-L-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid. *J Biol Chem* 275 : 18995-18999, 2000.
29. Banner DW, Hadvary P. Crystallographic analysis at 3.0-Å resolution of the binding to human thrombin of four active site-directed inhibitors. *J Biol Chem* 266 : 20085-20093, 1991.
30. 奥宮明子、石川斉 関節液のトロンビン・アンチトロンビンⅢ複合体について 神戸大学医療技術短大部紀要7 : 81-86, 1992.
31. Hirata S, Hijikata-Okunomiya A, Ishikawa H, et al. Inhibition of thrombin-induced cartilage proteoglycan release by argatroban. *BAMS (Kobe)* 11 : 35-41, 1995.

Argatroban, the Direct Thrombin Inhibitor

Akiko Hijikata-Okunomiya¹

ABSTRACT : Thromboembolic disorders are known as the major cause of mortality in Japan. Thrombin is a key enzyme in hemostasis and thrombosis. This review describes a short story of our research work which led to the discovery of the selective thrombin inhibitor argatroban. Argatroban was approved for treatment of peripheral arterial occlusion, acute cerebral thrombosis, hemodialysis in patients with a deficiency or decrease in ATIII and heparin-induced thrombocytopenia (HIT). In addition to supply a new remedy as “direct thrombin inhibitor” in practical fields, our research gave us information about pathophysiological function of thrombin and stereogeometric surfaces of the active sites of thrombin and other related enzymes.

Key Words : Argatroban, Direct thrombin inhibitor, Thrombin, Trypsin, Structure-activity relationship

1 . Department of Rehabilitation, Kobe International University