

学位論文の内容の要旨

学位論文題目 アラキドン酸代謝に及ぼすテルミサルタンの影響

指導教員 戸田 貴大



学位申請者 加藤 由佳



「高血圧治療ガイドライン 2014（日本高血圧学会）」における高血圧治療の第一選択薬であるアンジオテンシン II 受容体拮抗薬（ARBs）ならびにアンジオテンシン変換酵素阻害薬（ACE 阻害薬）は、アンジオテンシン II の作用の抑制あるいは生成の阻害による臓器保護作用が期待され、心不全や心筋梗塞の既往がある患者に対し、積極的適応が推奨されている。しかし、最近報告されている ARBs と ACE 阻害薬の臨床効果を比較した複数の大規模メタアナリシスにおいて、ARBs については心血管系イベント抑制に対する有益性に否定的な結果が報告されている。

細胞膜を構成する ω -6 系不飽和脂肪酸であるアラキドン酸（AA）には、CYP2C8、CYP2C9、CYP2J2 を介してエポキシエイコサトリエン酸類（EETs）へ変換される経路がある（Chart 1）。EETs にはエポキシ基の位置が異なる 4 種の構造異性体（14,15-、11,12-、8,9-、5,6-EET）が存在し、さらに可溶性エポキシドヒドロラーゼ（sEH）によりエポキシ基の位置に対応するジヒドロキシエイコサトリエン酸類（DHETs）に代謝される。EETs は血管拡張作用、抗炎症作用などの心保護作用が報告されている。一般的に DHETs が示すこれらの作用は EETs よりも弱いとされるが、14,15-、8,9-DHET は各 EET と同程度、また 11,12-DHET は 11,12-EET よりも強い血管拡張作用を示したという報告もある。また、EETs の生成に関与する CYP2C8 と CYP2J2 の活性低下を伴う遺伝子多型が心血管系イベントの発生に関与すること、血漿中総 EETs、総エイコサノイド類（総 EETs+総 DHETs）濃度の低下が閉塞性冠動脈疾患の発症に関与することが報告されている。これらの知見は、生体における総エイコサノイド類濃度の低下が心血管系イベント発症を惹起する可能性を示している。

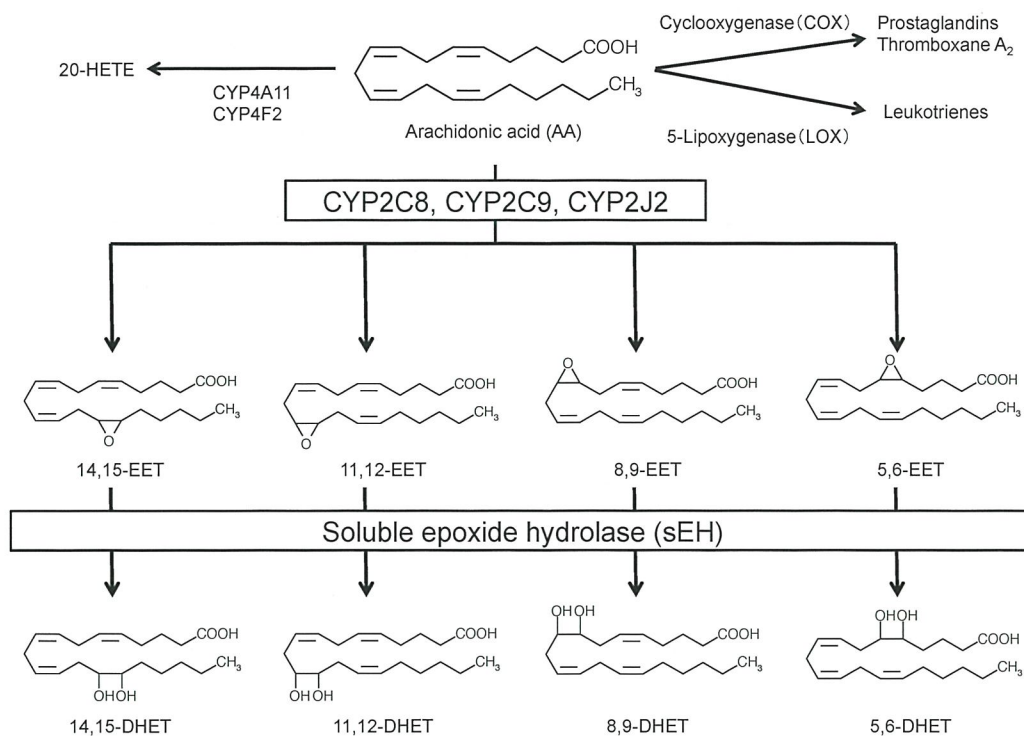


Chart 1 アラキドン酸代謝経路

当研究室の先行研究により、本邦で上市されている 7 種の ARBs が *in vitro* 系において AA からの各エイコサノイド類生成を阻害すること、その阻害強度は ARBs の種類により異なることが明らかとなった。これらの結果は、ARBs が臨床においても CYP 酵素の阻害を介した総エイコサノイド類生成量の低下をもたらす可能性を示しており、これは大規模メタアナリシスにおいて ARBs による心血管系イベント抑制作用が否定された要因になり得る。

テルミサルタン (TEL) は本邦で広く用いられる ARBs であり、検討した ARBs 中で AA からのエイコサノイド類生成に寄与するすべての CYP 分子種に対して強い阻害作用を示した。本研究では、TEL の AA 代謝阻害作用を詳細に検討するため、遺伝子組換え (リコンビナント) 酵素を用いて AA 代謝に対する TEL の阻害形式を明らかにした。また、TEL と併用される症例が多い HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン薬) のうち、フルバスタチン (FLU) との併用が総エイコサノイド類生成に及ぼす影響を検討した。次いでラットを用い、*in vivo* における血漿中エイコサノイド類濃度に及ぼす TEL の影響について検討した。さらに、患者の血清中総エイコサノイド類濃度への ARBs 服用の影響について検討した。

1. テルミサルタンの CYP2C8、CYP2C9 に対する阻害形式の検討

TEL の CYP 酵素阻害作用について詳細に検討するため、リコンビナント CYP(rCYP)2C8、rCYP2C9 を用いて TEL の AA 代謝阻害実験を行い、CYP2C8、CYP2C9 を介した AA 代謝に対する TEL の阻害形式を検討した。

CYP2C8、CYP2C9 による主代謝物である 14,15-および 11,12-エイコサノイド類生成に対する Dixon plot を作成した (Fig. 1)。赤池情報量基準 (AIC) と r^2 値から、TEL の CYP2C8、CYP2C9 に対する阻害形式はともに混合阻害であると判断した。TEL は CYP2J2 の活性中心部位以外に作用し、アロステリックな阻害を示すことが報告されていることから、CYP2C8 および CYP2C9 に対しても同様の機序による阻害を示す可能性が考えられる。

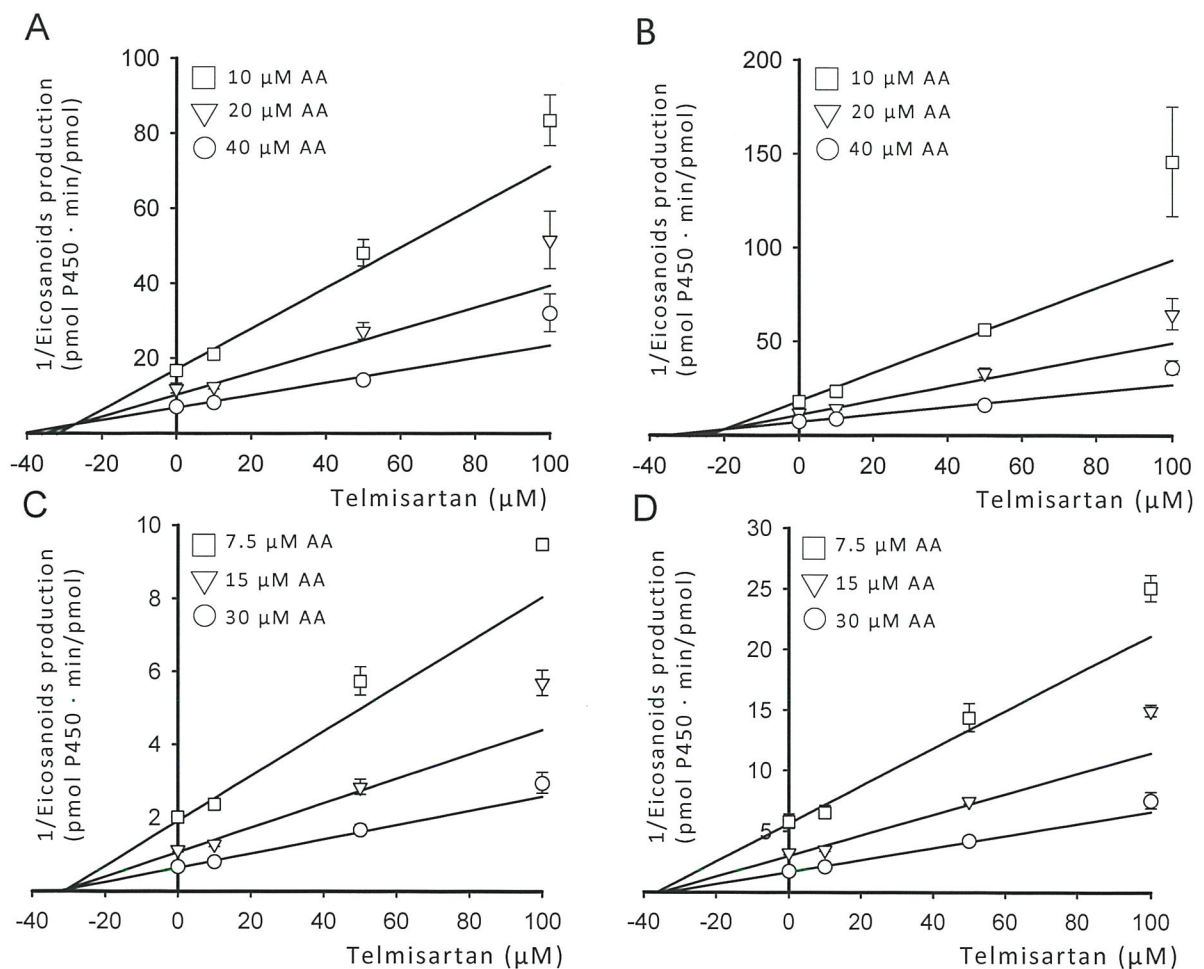


Fig. 1 CYP2C8 (A, B)および CYP2C9 (C,D)を介する AA からのエイコサノイド類生成における Dixon plot (n=3-7, mean±SD)
A, C: 14,15-eicosanoids、B, D: 11,12-eicosanoids、
AA: arachidonic acid

2. テルミサルタンとフルバスタチン共存時の総エイコサノイド類生成

高血圧と脂質異常症を合併する症例は多い。脂質異常症に用いられるスタチン薬のうち、FLUにはCYP2C8、CYP2C9の阻害作用が報告されている。そこでTELとFLUの共存が総エイコサノイド類生成に及ぼす影響についてヒト肝ミクロソームを用いて検討した。

TELとFLUの濃度比を3:1、1:1、1:3に固定（濃度比固定法）し、濃度を変化させたときの総エイコサノイド類生成に対する濃度反応曲線を作成した。2剤共存時の阻害剤濃度には IC_{50} 当量（式1）を用いた。検討したいずれの濃度比においても、濃度反応曲線はTEL、FLU単独時と比較して変化を示さなかった（Fig. 2）。一方、一定濃度の薬物存在下でもう一方の薬物濃度を変化させる濃度固定法の結果からは、TELとFLU共存による濃度依存的な総エイコサノイド類生成阻害作用の増強が明らかとなった。この共存効果は濃度を固定、変化させた両薬物ともに10 μ M以下の場合に顕著であった（Fig. 3）。

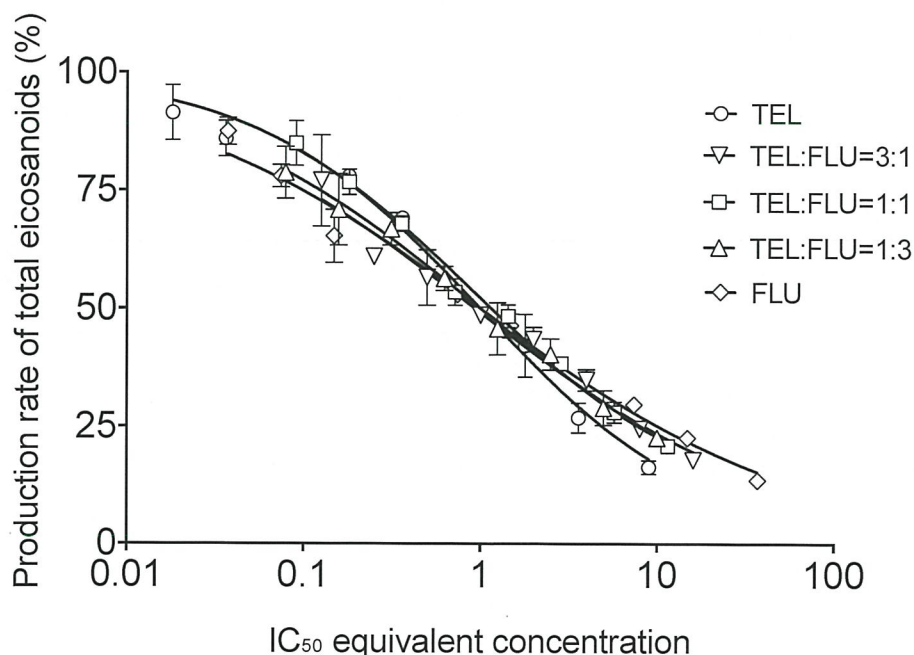


Fig. 2 濃度比固定法によるTEL、FLU共存時の濃度反応曲線
(n=3, mean±SD)

TEL: telmisartan, FLU: fluvastatin

IC_{50} : half maximal inhibitory concentration

$$IC_{50} \text{ equivalent concentration} = \left(\frac{\text{conc. of TEL}}{IC_{50, \text{TEL}}} \right) + \left(\frac{\text{conc. of FLU}}{IC_{50, \text{FLU}}} \right) \dots \quad (\text{式 1})$$

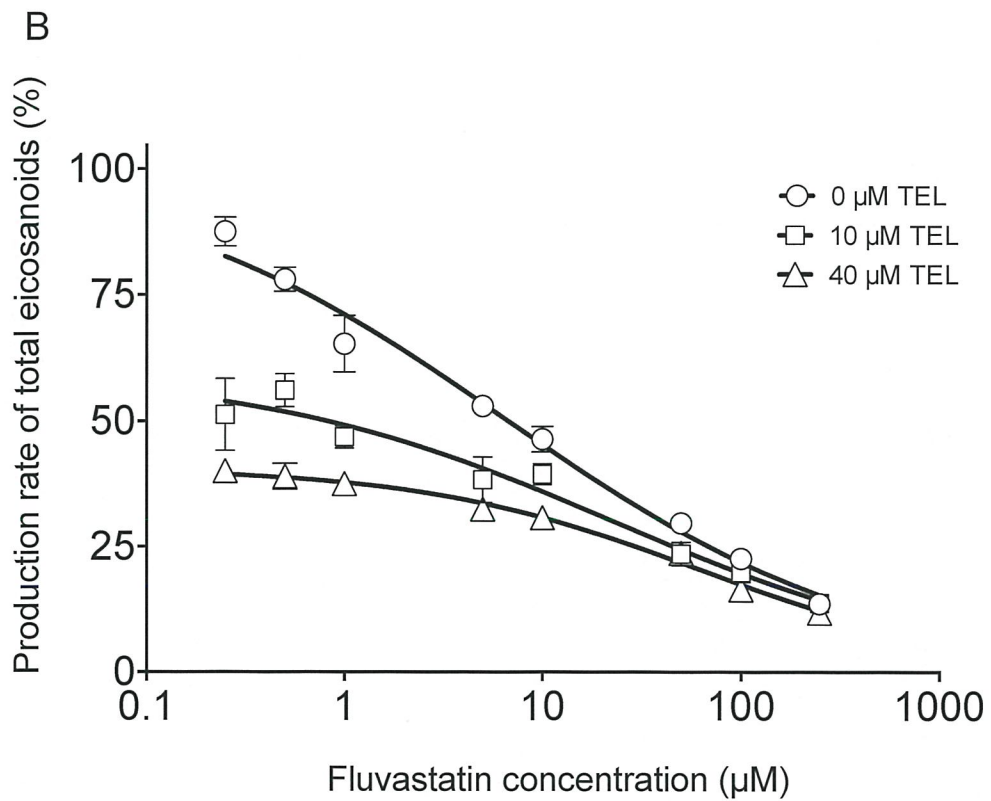
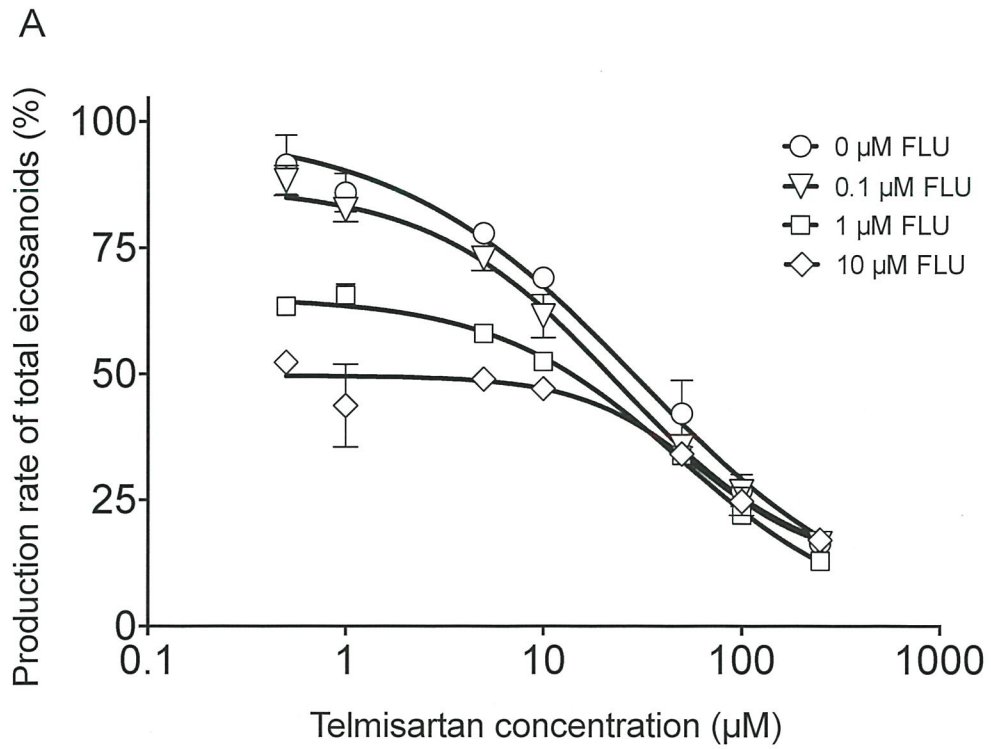


Fig. 3 濃度固定法による TEL、FLU 共存時の濃度反応曲線 (n=3, mean \pm SD)
 A: FLU 共存下における TEL の濃度反応曲線, B: TEL 共存下における FLU の濃度反応曲線 TEL: telmisartan, FLU: fluvastatin

濃度比を固定した場合の総エイコサノイド類生成に対する濃度反応曲線 (Fig. 2) は、検討したいずれの濃度比においても TEL、FLU 単独時と比較して変化がなかったことから、この 2 剤の AA 代謝阻害に対する共存効果は相加的であることが示唆された。患者に臨床用量の TEL と FLU を繰り返し経口投与したときの肝流入部における非結合形最大濃度は、本研究で使用した濃度よりも低いと推定される。しかし、TEL、FLU はいずれも有機アニオントランスポーターの基質であるため、トランスポーターを介した肝細胞内への能動的な取り込みにより、臨床用量においても相加的な AA 代謝阻害作用が起これらと考えられる。

3. ラット血漿中エイコサノイド類濃度に及ぼすテルミサルタンの影響

生体におけるエイコサノイド類生成に及ぼす TEL の影響を検討するため、Wistar 系雄性ラット (230-270 g) に TEL (2, 4 mg/kg) を 1 日 1 回 7 日間繰り返し腹腔内投与し、TEL 投与前後の血漿中エイコサノイド類濃度を比較した。コントロール群には溶媒のみを投与した。血漿中 AA 濃度はラットの成長に伴い上昇したため、TEL のエイコサノイド類生成阻害作用は、各 EET、DHET 濃度を各個体の AA 濃度で除した値で評価した。

11,12-EET/AA、14,15-、11,12-DHET/AA の値は 4 mg/kg の TEL 投与により投与前に対して有意に低下した。それ以外の異性体および総 EETs/AA、総 DHETs/AA、総エイコサノイド類/AA の値はいずれの群においても投与前後で有意な変化は認められなかった (Fig. 4)。一方、4 mg/kg TEL 投与群では 11,12-、5,6-EET/AA、14,15-DHET/AA、総 EETs/AA、総エイコサノイド類/AA の値がコントロール群と比較して有意に低値を示した (Fig. 5)。

体表面積に基づき換算すると、ラットでの 4 mg/kg の投与量はヒトでの 1 日最大用量付近に相当する。したがってこれらの結果は、これまで *in vitro* 系実験で得られている TEL による AA からのエイコサノイド類生成阻害作用が *in vivo* においても認められ、高用量の TEL 服用患者では血漿中エイコサノイド類濃度が低下する可能性を示している。

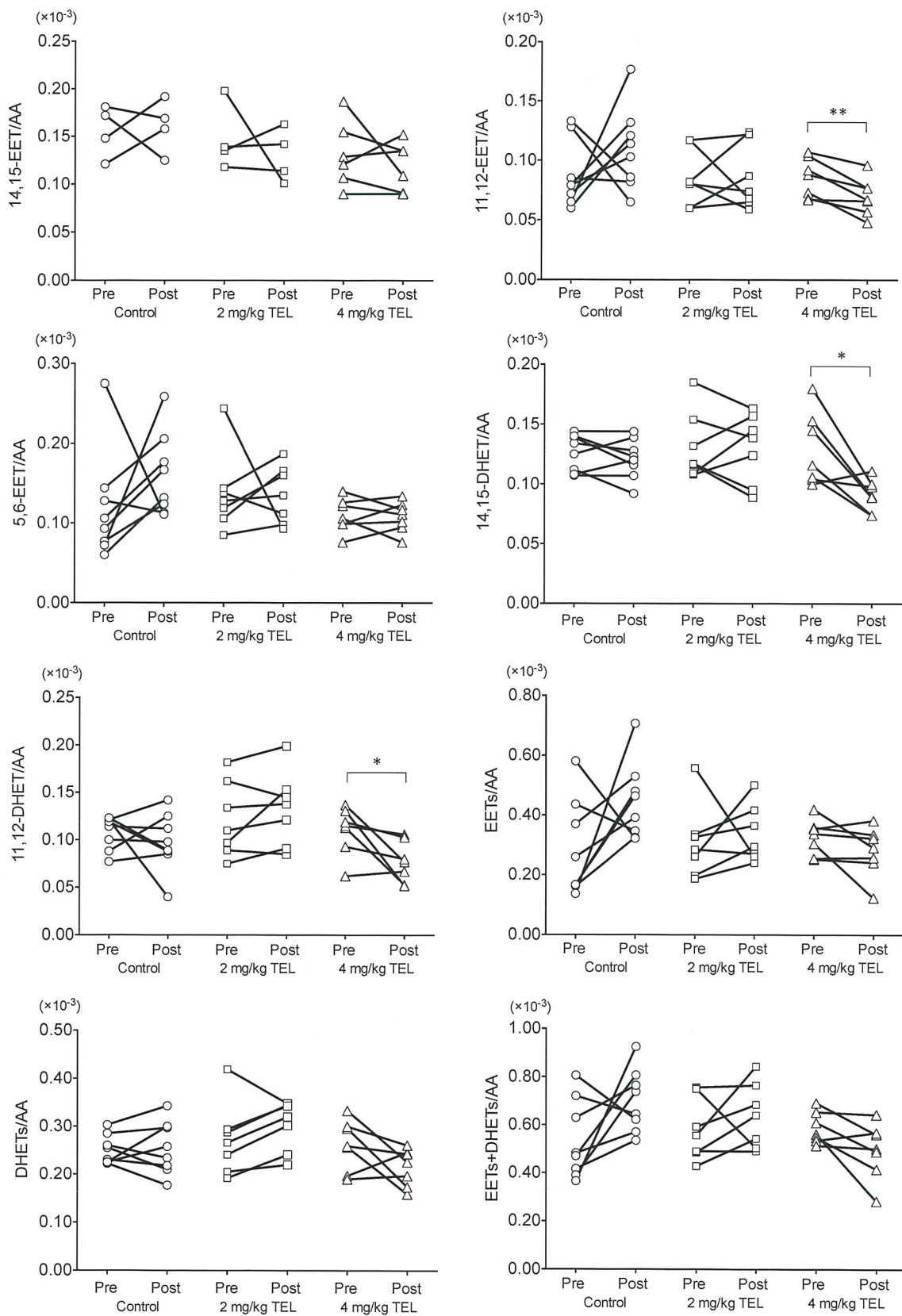


Fig. 4 TEL 投与前後のラット血漿中 EET/AA および DHET/AA 値
 (n=4-8, Paired t test, *p<0.05, **p<0.01) TEL: telmisartan
 Pre: pre-treatment, Post: post-treatment

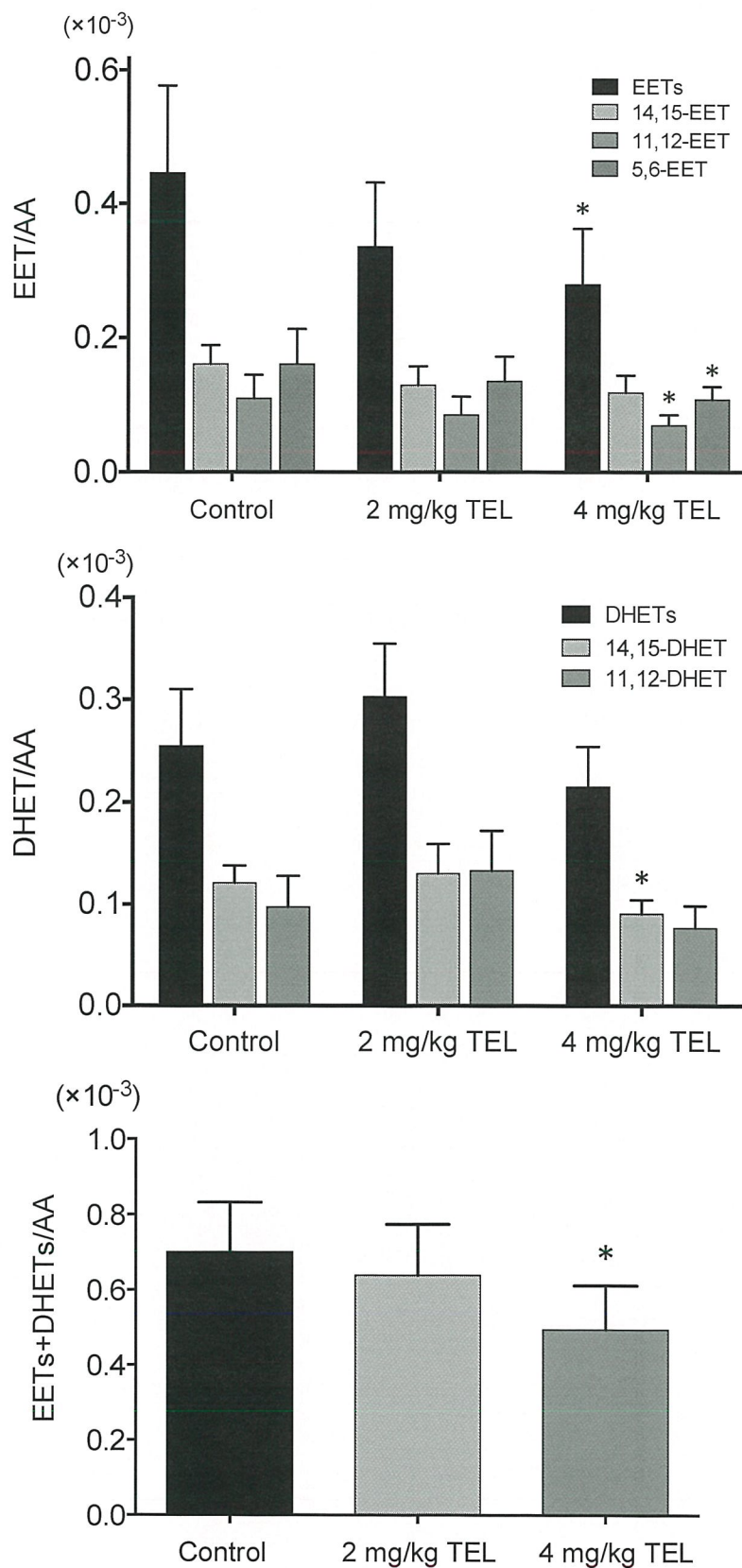


Fig. 5 TEL 投与後の血漿中 EET/AA および DHET/AA 値
(n=4-8, mean±SD, Dunnett's test, *p<0.05 vs. control)

TEL: telmisartan

4. ヒト血清中総エイコサノイド類濃度に及ぼす ARBs の影響

2013年10月から2017年10月までに医療法人溪仁会手稲溪仁会病院に入院し、一般生化学検査に使用後の余剰血清利用について書面による同意が得られた患者223名を対象とし、非服用者(116名)とARBs服用者(107名)の血清中総エイコサノイド類濃度を比較した。さらに多変量解析を行い、血清中総エイコサノイド類濃度に及ぼす因子について検討した。本研究は、医療法人溪仁会手稲溪仁会病院倫理委員会の承認を得て行った。

ARBs非服用者と服用者の群間で血清中総エイコサノイド類濃度に有意差はなかったが、ARBs服用者群の中央値は非服用者群と比較して20%の低下が認められた(Fig. 6)。また服用しているARBsの種類で層別化して解析した結果、非服用者群とすべてのARBs服用者群間の血清中総エイコサノイド類濃度に有意差は認められなかった。患者情報から得られた因子(患者基本情報、既往歴、臨床検査値、併用薬)についてステップワイズ法による多変量解析を行った結果、推定糸球体ろ過速度(eGFR)とARBs服用が総エイコサノイド類濃度の共変量であり、*in vitro*研究で得られたARBsのAA代謝阻害作用と同等の知見が得られた(Table 1)。

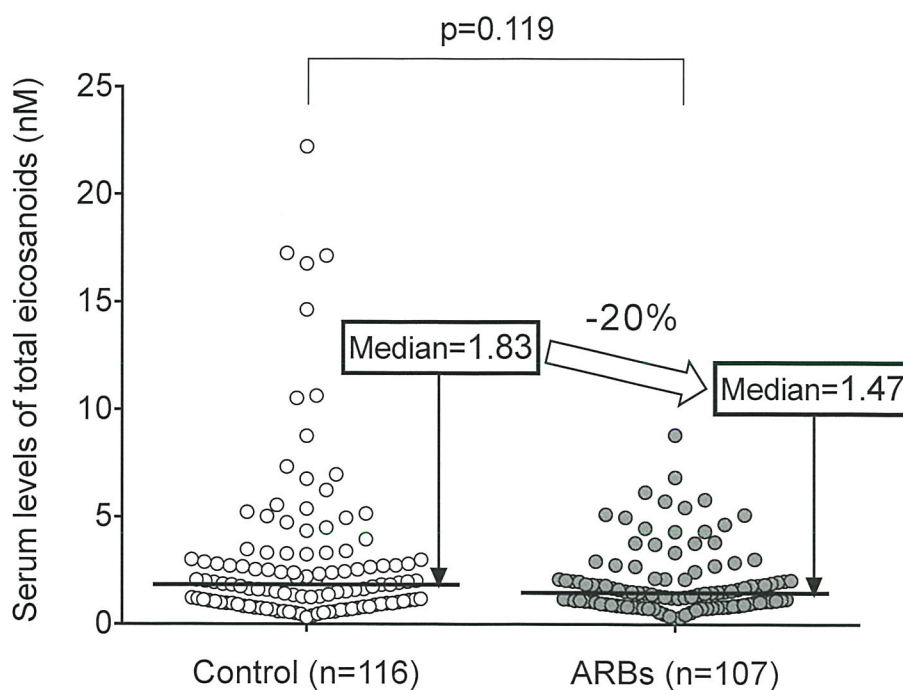


Fig. 6 ARBs非服用者および服用者における血清中総エイコサノイド類濃度(Mann-Whitney test)

Table 1 多変量解析によるヒト血清中総エイコサノイド類濃度の共変量

Variables	Coefficients	SE	p value
Intercept	1.470	0.618	0.018
eGFR	0.023	0.009	0.007
ARBs	-0.878	0.411	0.034

Adjusted R squared: 0.055, SE: standard error

・ Serum levels of total eicosanoids (nM)

$$=1.470+0.023 \times \text{eGFR}-0.878 \times \text{ARBs}$$

ARBs; yes=1、no=0

今回の対象群では、eGFR (5.2-155 mL/min)と年齢 (36-92 歳) の間に有意な負の相関 ($r=-0.547$, $p<0.001$) が見られた。年齢は単回帰分析において総エイコサノイド類濃度に対し有意な負の相関を示した ($y=-0.050x+6.012$, $p=0.006$) ことから、eGFR と総エイコサノイド類濃度の正の相関は、実際には年齢の影響を反映していると推察される。加齢に伴う総エイコサノイド類濃度の低下は、生体内 AA 濃度の減少が影響すると考えられる。

5. 総括

本研究では、AA からのエイコサノイド類生成に及ぼす TEL の影響について詳細な検討を行った。TEL の CYP2C8 および CYP2C9 を介したエイコサノイド類生成に対する阻害形式は混合阻害であったことから、これらの CYP 分子種に対してアロステリックな阻害作用を示すと考えられた。TEL と FLU 共存時にはこれら薬物の AA 代謝阻害作用が相加的に増強することが示された。TEL と FLU は有機アニオントランスポーターの基質として肝細胞内に取り込まれることから、この相加的な阻害作用は臨床用量でも生じる可能性がある。ラットを用いた検討から、TEL のエイコサノイド類生成阻害作用が *in vivo* でも起こりうることを示された。ARBs 服用患者を対象とした多変量解析の結果、ARBs 服用は血清中総エイコサノイド類濃度を有意に低下させる因子であることが明らかとなった。今後は、血清中総エイコサノイド類濃度低下がエイコサノイド類の生理作用に及ぼす影響についてさらなる検討が必要である。