

学位論文の内容の要旨

学位論文題目 アンジオテンシン II 受容体拮抗薬の
アラキドン酸代謝に及ぼす影響

指導教員 猪爪 信夫 ㊦

学位申請者 千田 明日菜 ㊦

アラキドン酸は生体膜リン脂質を構成する ω -6系の長鎖不飽和脂肪酸であり、ホスホリパーゼ A2により細胞膜から遊離される。アラキドン酸からはシクロオキシゲナーゼ (COX)、リポキシゲナーゼ (LOX)、CYP 酵素を介して生体内機能調節および維持に関与する種々の生理活性物質が生成する。COX、LOX を介して生成される生理活性物質にはプロスタグランジンおよびロイコトリエンがあり、それぞれ血圧低下や発熱・痛覚伝達作用、生体内での炎症などに関与している。

一方、CYP 酵素を介して生成する生理活性物質にはエポキシエイコサトリエン酸類 (EETs) がある。EETs は主に可溶性エポキシドヒドロラーゼ (sEH) により速やかに代謝され、EETs より生理活性の低いジヒドロキシエイコサトリエン酸類 (DHETs) となる。EETs にはエポキシ基の位置により 4 種の構造異性体 (14,15-, 11,12-, 8,9-, 5,6-EET) が存在する。EETs は血管拡張作用、抗炎症作用、心筋プレコンディショニング作用などの心保護効果があることから、循環器系疾患の改善に関与すると考えられている。EETs 誘導体や sEH 阻害薬には高血圧、アテローム性動脈硬化や心肥大などの心血管系疾患に対する有効性が報告されており、新規治療薬として期待されている。

アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARBs) は糖尿病、心不全、心筋梗塞後などの背景を持つ高血圧患者に対して積極的適応があり、Ca 拮抗薬や利尿薬との合剤も市販されている処方頻度の高い高血圧治療薬である。ARBs の作用はレニン-アンジオテンシン系を介し、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACE-I) の作用部位と類似していることから、ACE-I と同様に心保護効果が期待されている。しかし、近年 ARBs と ACE-I を比較した複数のメタ解析において ARBs 投与群では降圧効果は認められるものの、心血管系イベント抑制に対する有益性を否定する結果が報告された。さらに、脳卒中、心不全、糖尿病の新規罹患は抑制したが、心筋梗塞のリスクを上昇させることも報告された。

これらのメタ解析の結果から、ACE-I と ARBs を同列に扱うべきではないと考えられるが、心血管系イベントに対する有益性の差の要因は明確にされていない。一部の ARBs では CYP 酵素阻害作用が認められているが、ACE-I による CYP 酵素阻害作用は報告されていないことから、心血管系イベントに対する有益性の差が生じる一因として CYP 酵素阻害によるエイコサノイド類 (EETs、DHETs) の生成抑制が関与している可能性がある。

本研究では ARBs のアラキドン酸代謝に及ぼす影響について検討するため、リコンビナント CYP 酵素 (rCYP) およびヒト肝ミクロソーム (HLMs) を用いてアラキドン酸代謝に対する ARBs の阻害強度を求めた。さらに、ARBs 服用患者における血清中エイコサノイド類濃度を測定し、患者背景や併用薬との関連を検討した。

1. エイコサノイド類測定法の信頼性評価

医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーション基準を参照し、*in vitro* 実験に用いる当研究室開発の LC-MS/MS を用いたエイコサノイド類濃度測定法の信頼性評価を行った。本法では 5,6-DHET を除く各エイコサノイド類の重水素標識体を内標準物質として用いた。さらに、患者血中エイコサノイド類測定のための前処理方法を開発し、エポキシ体である EETs の生体試料中の安定性を確認することで、保存条件を検討した。

In vitro 実験条件下での EETs および DHETs 検量線の相関係数は 2-2000 nM の範囲で 0.991-0.999 と良好な直線性を示し、日内、日間再現性の変動係数 (CV%) はそれぞれ 1.2-5.1%、2.4-16.7%であった。一方、血漿中エイコサノイド類の検量線は 0.1-10 ng/mL の範囲で相関係数が 0.994-0.999、日内、日間再現性の CV% は 2.8-19.2%、2.2-23.6%であった。*In vitro* 実験条件下と血漿使用時の測定結果が概ね一致することから、血中エイコサノイド類の測定においても新規開発した測定法を利用可能であると考えられた。また、血漿サンプルを用いて保存条件を検討した結果、安定性の観点から臨床検体は-80℃で保存し、1週間以内にエイコサノイド類の測定を行うことが望ましいと判断した。

2. ARBsによるrCYPsを介したアラキドン酸代謝阻害

EETs生成に関与するCYP2C9、CYP2C8、CYP2J2のrCYPを用いてARBs（ロサルタン、アジルサルタン、カンデサルタン、イルベサルタン、オルメサルタン、テルミサルタン、バルサルタン）の阻害強度を求めた。エイコサノイド類生成速度およびIC₅₀は、EETsおよびDHETs濃度の合計から算出した。ロサルタン添加時のエイコサノイド類生成速度に関しては先行研究である竹内のデータを参考とした。ARBsは添加濃度依存的に各CYP酵素を阻害し、ARBsの種類によって阻害強度が異なることが示された。

3. HLMsにおけるARBsのアラキドン酸代謝阻害

肝臓は生体内の主要代謝臓器であり、一部のARBsには肝蓄積性が報告されていることから、HLMsを用いたアラキドン酸代謝阻害実験を行った。ARBsの添加濃度に依存したエイコサノイド類生成速度の低下が認められ、その阻害強度はARBsの種類によって異なる結果となった。HLMsでの結果は肝臓中の酵素割合を反映していると考えられ、rCYP2C9および2C8での結果と類似していることから、HLMsでのアラキドン酸代謝はCYP2Cの影響が大きいことが示唆された。

4. ARBs服用患者および非服用患者における血清中エイコサノイド類濃度

2013年10月から2015年10月までに医療法人溪仁会手稲溪仁会病院に入院し、血清利用について書面による同意の得られた患者132名を対象とした。医療上必要な生化学検査で使用した余剰血清を用い、エイコサノイド類の測定は採血後1週間以内に行った。研究を行うにあたり手稲溪仁会病院倫理委員会の承認を得た。ARBs服用者群では非服用者群に比べBMIが有意に高く、拡張期血圧（DBP）は有意に低い値を示した。また、高血圧症と診断された割合が有意に高かった。ARBs服用者群と非服用者群との間および服用ARBsの種類によるエイコサノイド類濃度に統計的な差は認められなかった。しかしARBs服用者群において、脂質異常症治療薬であるHMG-CoA還元酵素阻害薬（スタチン系薬）併用群ではエイコサノイド類濃度が低い傾向にあった。また、高血圧症の診断有無によりエイコサノイド類濃度を比較すると、非高血圧症患者群と比較して高血圧症患者群ではARBsの服用有無に関わらずエイコサノイド類濃度の有意な低下が見られたことから、生体内におけるエイコサノイド類濃度低下が高血圧症発症の一要因である可能性が示唆された。

5. 考察

EETs および DHETs の高感度 LC (UPLC) -MS/MS を用いた測定法は Edpuganti らにより 2014 年に報告されたが、本研究では各 EET、DHET 重水素標識体を内標準物質とし、比較的安価な LC-MS/MS を用いて開発した測定法の検証を行った。本法はエイコサノイド類測定に十分適応できる感度および精度を有していると考えられた。

In vitro インキュベーション実験により、ARBs は濃度依存的に CYP 酵素を阻害して、エイコサノイド類生成を低下させること、ARBs の種類によって CYP 酵素に対する阻害強度が異なることが明らかとなった。HLMs を用いた検討結果から、肝への蓄積が報告されているロサルタン、テルミサルタンは主に CYP 酵素を阻害してエイコサノイド類生成を低下させ、心血管系疾患のリスクを増加させる可能性が考えられる。テルミサルタンの CYP2J2 阻害作用は強力であり、臨床における最大用量投与時の血中濃度と本研究で算出した IC₅₀ が同程度であった。高用量のテルミサルタン服用時には CYP2J2 が主に発現している臓器である心臓において、エイコサノイド類生成が低下する可能性が考えられる。

臨床試験対象患者の 56%が経皮的冠動脈形成術 (PCI) や心臓カテーテル検査 (CAG) 目的の入院であり、基礎的に動脈硬化などの心血管系イベントのリスク因子を持っているため、エイコサノイド類濃度が低い患者群であったと推察される。基礎疾患の影響でエイコサノイド類濃度が低値である患者では、ARBs 服用による影響が現れにくい可能性がある。一方、スタチン系薬の併用によりエイコサノイド類濃度の低下傾向が認められたことから、服用薬物によるエイコサノイド類濃度への影響が示唆された。今後はより多くのサンプル集団による健常人と患者群でのエイコサノイド類濃度の比較、およびスタチン系薬の CYP 酵素阻害強度について、CYP 酵素群の遺伝子多型を含めた検討が必要である。

薬物によるエイコサノイド類濃度の低下と心血管系イベントのリスク増加については、さらに症例数を増やして検討する必要がある。さらに、患者の診療データベースを用いた疫学調査による ARBs 服用と心血管系イベント発症の関連性を検討することにより、詳細な解析が可能と考えられる。

本研究におけるエイコサノイド類生成に対する各 ARB の影響に関する検討結果は、高血圧治療患者における ARBs の適正使用に有益な情報と考えられる。