

学 位 論 文 題 名

エイコサペンタエン酸エチルエステル (EPA - E)
の脂質代謝に及ぼす作用に関する研究

学位論文内容の要旨

虚血性心疾患の発症率が低いエスキモー人では、血小板凝集能が低下していることや血清脂質レベルが低いことが知られており、その作用本体として多価不飽和脂肪酸（PUFA）の一種である all - cis - 5, 8, 11, 14, 17-icosapentaenoate (EPA) が注目されている。本研究では、EPA を魚油からエチルエステル体 (EPA - E) として高純度（90%以上）に精製したものをを用い、本物質の脂質代謝に及ぼす作用について検討した。

1. 各種病態モデル動物における血中脂質低下作用

病態モデル動物における検討に先立ち、正常動物の血中脂質レベルに対する作用を検討したところ、ラットならびにハムスターに EPA - E を投与することにより血中コレステロール（CH）あるいはトリグリセリド（TG）の低下が認められた。

EPA - E の血中脂質低下作用は、外因性高脂血症モデルである高 CH 飼料誘発高脂血症ラットおよび同ウサギにおいても認められた。高 CH 飼料飼育ウサギにおける EPA - E の血清 CH 低下作用は、超低比重リポ蛋白（VLDL）および低比重リポ蛋白（LDL）に相当するリポ蛋白画分、すなわち atherogenic なリポ蛋白画分において著しかった。

EPA - E はこの他に、コーン油経口負荷による 高 TG 血症ラット、内因性の高脂血症モデルである Triton WR - 1339あるいは高カゼイン飼料で誘発した高脂血症ラットにおいても奏効した。

以上、EPA - E は正常動物、ならびに、実験的に高 CH 血症および高 TG 血症を引き起こした高脂血症モデル動物に対し有効性を示し、動物種においてもラットのみならずハムスターやウサギに対しても有効であった。これらの結果は EPA - E が高脂血症治療薬として臨床上有用となり得る可能性を示唆する。

2. 血中 CH 低下作用機序の解析

EPA - E を投与したラットでは $[^{14}\text{C}]$ 標識 CH を経口投与した後の血漿中放射能の上昇が抑制され、EPA - E が CH の腸管吸収抑制作用を有することが明らかとなった。

また、EPA - E を投与したラットから摘出した肝ミクロソームでは、CH 生合成の律速酵素である 3 - hydroxy 3 - methylglutaryl coenzyme A (HMG - CoA) 還元酵素活性が低下したことから、EPA - E は CH 生合成抑制作用を有することが明らかとなった。膜結合型酵素のひとつである本酵素は、膜中リン脂質 (PL) のアシル基を構成する脂肪酸組成の違いによってその活性発現が影響される。活性測定に供したミクロソームの脂質組成および EPA 含量を測定したところ、EPA - E を投与することにより、ミクロソーム中の PL 画分の EPA 含量が著明に増加していた。同時に遊離 CH 含量の増加も認められた。このことから、EPA - E は膜 PL を構成する脂肪酸組成の変化を介して間接的に HMG - CoA 還元酵素活性を低下させたものと推察される。

カゼイン添加飼料で飼育することにより胆汁分泌が抑制され、このことが高脂血症状態を誘発する要因のひとつと説明されている。EPA - E は、カゼイン添加飼料飼育ラットの胆汁量を増加させ、胆汁中成分である胆汁酸、PL および CH の排泄量をそれぞれ増加させた。

EPA - E 投与ラットから調整したリポ蛋白画分を別のラットに静注したところ、EPA - E 非投与動物から調整したリポ蛋白画分を静注した場合に比較して、血清 CH の低下が速いことが明らかとなった。この結果は、EPA - E 投与ラット由来のリポ蛋白は血中から速やかにクリアランスされ易いことを示している。また、この変化は VLDL 画分および中間比重リポ蛋白 (IDL) + LDL 画分に認められ、高比重リポ蛋白 (HDL) 画分には認められなかった。この実験結果は、VLDL, IDL や LDL のリポ蛋白が、EPA - E 投与によってそれ自身が異化代謝が亢進するよう機能的に修飾されたことを示唆する。

以上の成績から、EPA - E は、CH の主要な代謝過程に多岐に渡って作用し、その結果、血中 CH の低下をもたらものと考えられる。EPA - E がこのような多彩な作用を示すことは、本来このものが脂肪酸の一種であることに由来すると考えられよう。EPA - E 投与をした際には、CH 代謝と密接な関係にある組織を含む種々の生体組織の脂肪酸成分として EPA が分布・置換し、その代謝に影響を及ぼしていると推察される。後述するように血中 CH の運搬体であるリポ蛋白中にも、EPA が取り込まれるが、その異化速度を速めていることは既存の脂質低下薬にはみられない特徴的な作用と考えられる。

3. VLDL の性質と及ぼす影響

EPA - E を投与したラットの血清ではゲル濾過カラムを使用した HPLC 法で測定した VLDL の溶出時間が、EPA - E 非投与の場合と比較して遅滞したことから、その粒子サイズは小型化していることが明らかとなった。VLDL の粒子サイズは TG 含量と正の相関を示すことから予想された通り、EPA - E 投与動物由来の VLDL は非投与動物由来のものに比較して著しい TG 含量の減少が認められた。

EPA - E を投与したラットの肝ミクロソームでは TG 生成活性が低下していた。加えて、EPA - E 投与により TG 分泌速度が低下したことから、EPA - E は肝 TG 分泌を抑制することが明らかとなったが、これは TG 生成が抑制された結果を反映しているものと考えられる。

一方、EPA - E 投与したラットでは、血中で TG を分解する酵素であるリポ蛋白リパーゼの活性が上昇していた。したがって EPA - E は、肝 TG 合成／分泌を抑制する作用と、血中 TG 水解を亢進する両作用を介して、小型の VLDL を産生させると考えられる。小型の VLDL はより速やかに LDL に変換されると考えられていることから、EPA - E を投与した VLDL、すなわち小型 VLDL はこの画分から速やかに消失することを示唆している。

VLDL のアポ蛋白組成を電気泳動法で調べたところ、EPA - E 投与後の VLDL では apo E/apo C の増加が認められた。apo E は apo B/E 受容体に高い親和性を有し、また、その肝細胞に対する結合を apo C あるいは apo CIII が阻害するため、apo E/apo C が高値を示す VLDL は肝に取り込まれ易くなることから、EPA - E 投与動物の VLDL は血中から速やかに消失し易くなっている可能性が示唆された。

最後に、VLDL の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで解析した結果、EPA - E 投与ラットの VLDL では脂肪酸を構成成分に含む TG、PL および CH エステルのいずれの分画においても、EPA を著増していた。このことは、VLDL の PL、TG および CH エステルのアシル基部分を構成する脂肪酸として EPA が置換したことを示している。PUFA を豊富に取り込ませた LDL は肝受容体との親和性が高まり、このことは、PUFA - rich となった LDL の流動性を亢進していることに起因すると報告されていることから、EPA を多量に取り込んだリポ蛋白にも同様のことがいえる可能性が考えられる。

まとめ

- 1) EPA - E が各種高脂血症モデル動物において血中脂質低下作用を有することを明らかにし、この物質が高脂血症治療薬となり得る可能性を示した。

- 2) EPA - E の血中 CH 低下作用機序を解析し, EPA - E は CH の腸管吸収抑制作用, CH の生合成活性抑制作用ならびに胆汁分泌亢進作用を有していることを明らかにした。また, EPA - E 投与後のリポ蛋白は血中から速やかにクリアランスされることを明らかにした。
- 3) さらに, EPA - E 投与後の VLDL には, TG 含量減少に伴う粒子サイズの小型化, apo E / apo C 比の増加, ならびに, 構成脂肪酸として EPA 含量の増加が認められることを明らかにし, EPA - E が異化され易い性質となっていることを示した。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	長 澤 滋 治
副 査	教 授	野 村 靖 幸
副 査	助教授	徳 光 幸 子
副 査	助教授	高 橋 和 彦

急性心筋梗塞で代表される冠動脈疾患は癌と並ぶ死亡率の高い成人病の代表的なものである。その危険因子の一つの, 高脂血症は粥状動脈硬化に最も深い関わりを持つことから, 多くの治療薬が開発されてきた。しかし, これまでの薬剤は腎機能低下などの副作用を誘発するところから, 安全性の高い血清脂質低下薬の開発が望まれていた。

エスキモー人は虚血性心疾患が少なく, かつ血清脂質含量も低いことは周知の事であるが, それは, 彼らが魚に豊富な不飽和脂肪酸, とくにエイコサペンタエン酸 (EPA) を多量に摂取することによることが, 疫学調査により明らかにされた。

EPA の血液凝固抑制効果が血小板凝集抑制活性の高い代謝産物のよることが明らかにされ, 血栓予防薬として医学品開発が活発に進められている。

一方, EPA による血清脂質の低下機構に関しては系統的な研究は殆ど行われていなかった。申請者は, EPA エステル誘導体 (EPA - E) を用いて, EPA による血清脂質の低下機構を詳細に検討し, 下記のような価値のある研究結果を得た。

1) 各種病態モデル動物における血中脂質低下作用

まず, EPA - E が正常動物 (ラット, ハムスター) の血中脂質レベル, 特にコレステロール (CH) とトリグリセリド (TG) を効果的に低下させることを確認した後, 高 CH 飼料誘発高

脂血症ラットおよびウサギを用い EPA - E の効果を調べた。その結果、血中の TG, CH レベルが低下すること、その低下は超低比重リポ蛋白 (VLDL) および低比重リポ蛋白 (LDL) に相当するリポ蛋白部分に顕著に見られることを明らかにした。

この、EPA - E が正常動物や実験的高脂血症動物の血清脂質を効果的に低下させるという知見は、本化合物が高脂血症治療薬として臨床応用の可能なことを示唆するものである。

2) 血中 CH 低下作用機序の解析

放射標識した CH を用いた実験により、EPA - E は CH の腸管吸収を抑制することを明らかにした。また、EPA - E 投与したラットの肝ミクロソームを用いた研究から、CH 合成反応の律速酵素 (3 - hydroxy 3 - methylglutaryl coenzyme A, HMG - CoA) の活性が低下していることを見いだした。この酵素は膜結合酵素であり、この活性低下は膜を構成しているリン脂質 (PL) の脂肪酸組成の変化、即ち、EPA が PL に取り込まれたことによる膜流動性変化によることを明らかにした。

さらにまた、EPA - E 投与により胆汁分泌も増加することを見いだした。この機構によって PL, CH の排泄が高まることも、血清脂質が低下する原因の一つと言える。

一方、EPA - E 投与ラットのリポ蛋白は正常ラットのそれとくらべて体内代謝が速やかなことを見出した。そして、それが VLDL および LDL の分子構造の変化によることを明らかにした。

以上の実験結果は、EPA - E が CH の主要な代謝過程に多岐にわたって作用し、その結果として血中 CH の低下をもたらすことを強く示唆するものである。特に、EPA - E のようにリポ蛋白の異化速度を速める薬物はこれまで報告はなく、EPA - E に特徴的な性質といえる。

3) VLDL 性質に及ぼす影響

EPA - E 投与ラットの VLDL は対象ラット由来の VLDL よりも分子サイズが小さいことを見いだし、これが TG 含量の低下に基づくことを明らかにした。さらに、EPA - E 投与したラットの肝ミクロソームでの TG 生合成活性が低下していることも明らかにした。

一方、EPA - E 投与ラットでは、TG 分解酵素であるリポ蛋白リパーゼ活性が上昇していることを見だした。これは、EPA - E が肝での TG 合成抑制と TG 分解促進の両機構により分子サイズの小さな異化速度の速やかな VLDL を産生させることを強く示唆する。さらに、VLDL のアポ蛋白構成を解析し、アポ E と呼ばれる分子種が増加していることを明らかにした。このアポ E が高いリポ蛋白ほど肝で取り込まれ易いことが良く知られている。

さらに、VLDL の脂肪酸組成分析も行い、EPA - E 投与ラットの VLDL を構成する TG,

PL, CH 画分の脂肪酸部分には EPA が取り込まれていることを明らかにした。これは, EPA がこれら脂質の脂肪酸と置換反応を起こしたことを示唆するものである。EPA などの多価不飽和脂肪酸を多く含むリポ蛋白は流動性が高まり, 肝リポ蛋白受容体との親和性が強まることが知られている。

以上, 申請者は EPA - E の血清脂質低下機構について, 動物レベルから脂質組成という分子レベルまで広範囲にわたって詳細に解析し, EPA - E が多岐にわたる機構で血清脂質を低下させることを明らかにした。この研究成果は, EPA 作用機構を解明した点で価値あるのみならず, 新しい高脂血症薬の開発の手掛かりを与える点でも意義あるもので, 博士 (薬学) の学位に相応しい業績と評価できる。