

博士（薬学） 宮崎 敦広

学位論文題名

プラバスタチンの実験動物における HDL-cholesterol
低下機序とコモンマーモセットにおける作用

学位論文内容の要旨

血清コレステロール低下薬として広く臨床で用いられている 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素の阻害薬 Pravastatin sodium (PV)を実験動物に投与し、以下のような点を明らかにした。

1. 反復投与時における PV の肝臓選択的ステロール合成阻害

PV は、肝臓ステロール合成 (SS) を選択的に阻害することが特徴であるが、これは細胞レベルあるいは動物への単回投与による報告であり、連続投与時における SS の組織選択性について示されていなかった。このため、マウスを用い反復投与における SS の組織選択性について検討した。PV および同じ酵素を阻害する simvastatin、lovastatin をそれぞれ 5 および 10 mg/kg、雄性 C57/BL6 マウス（8 週令）に 11 日間連続投与し、8 組織における SS 活性を調べた。いずれの薬剤も、肝臓の SS 阻害を阻害した。PV は、10 mg/kg でさえ肝臓以外の臓器で SS 阻害を示さなかつたが、他の 2 薬剤は肝臓以外の臓器で 5 mg/kg で 20% 以上、10 mg/kg で 30% 以上阻害した。このことから、PV は反復投与においても、肝臓 SS を選択的に阻害することが明らかとなった。

2. Pravastatin のウサギにおける HDL-cholesterol 低下機序

PV は実験動物の血清総コレステロール(Total Cholesterol : TC)を低下させることが知られており、その機序は低比重リポタンパク質 (Low Density Lipoprotein: LDL)受容体タンパク質を増加させることによる LDL-cholesterol (LDL-C)低下に基づくと考えられている。しかし、PV 投与時のリポタンパク質プロファイルを分析すると、高比重リポタンパク質 cholesterol (High Density Lipoprotein-C : HDL-C)も低下している場合多く、その低下の機序は知られていない。この機序を解明するため、雄性日本白色種 (Japanese White: JW) ウサギ（5 ヶ月令）を用いて、PV の血清コレステロール低下作用の機序を検討した。PV 1~30 mg/kg、21 日間連続投与は、肝臓 LDL 受容体タンパク質が 3 mg/kg 以上から用量に依存して増加した。その用量においては、肝臓遊離コレステロール(Free Cholesterol: FC)含量と LDL-C を低下させた。PV は肝臓の HMG-CoA 還元酵素を阻害し、肝臓の FC 含量を低下させ、LDL 受容体タンパク質を増加させるという良く知られた機序により、LDL-C を低下させた。一方 PV 30mg/kg を JW ウサギに 4 日間投与すると HDL-C が選択的に低下した。HMG-CoA 還元酵素阻害薬によって、HDL-C を選択的に低下させた報告はこれまでなかった。この時の肝 LDL 受容体タンパク質は変化がなかったが、肝臓からの超低比重リポタンパク質(Very Low Density Lipoprotein: VLDL)-コレステリルエステル(Cholesteryl ester: CE) 分泌速度が低下していた。また PV 10 mg/kg 以上の用量を 21 日間投与すると、VLDL-CE 分泌速度が有意に低下し、同じ用量で HDL-C も低下した。こ

のことから、PVによるHDL-Cの低下には、VLDL-CEの分泌低下が関与すると考えられた。さらにPV投与群においてはVLDLのタンパク質の分泌速度に変化が認められなかったことから、肝臓からCE-poor VLDL粒子が分泌されていると考えられた。一方、投与期間中、コントロール群とPV投与群の間で、VLDL-Cの濃度に差は認められなかつた。この結果とPVによるHDL-Cの低下にVLDL-CEの分泌低下が関与しているという可能性と合わせた結果、HDL-Cの低下は、HDL粒子からCE-poor VLDL粒子へCEが、cholesterol ester transfer protein (CETP)を介し、移動することによって引き起こされていると考えられた。このことを立証するため、VLDL中のCE分子種の解析を行ったところ、PV投与群のVLDL-CEは、cholesterol linoleateが多かった。このことから、HDLからCETPを介してCEが移動してきていることが明らかとなつた。以上のことから、JWウサギにおいて、PVは、2つの機序により血清TCを低下させることが明らかになった。すなわち、LDL-Cの低下はLDL受容体依存的に、HDL-Cは肝臓からのVLDL-CE分泌低下により誘導されるCETPに依存した機序により低下したことが明らかとなつた。実験動物においてHMG-CoA還元酵素阻害薬がHDL-cholesterolを低下させる機序を明らかにし、ヒトと異なる反応を示す根拠を見出した。

3. 脂質低下モデル動物としてのコモンマーモセットの可能性

マウスやウサギのような動物はヒトと進化の過程を異にしており、ヒトのリポタンパク質および動脈硬化研究のモデル動物としてふさわしいかは十分にはわかっていない。この点を考慮に入れ、薬の開発にふさわしい実験動物を考えると、ヒトの進化の過程と近縁の関係にあるサルのような霊長類における研究は重要である。最近、新世界サルに属するコモンマーモセットの血清脂質およびリポタンパク質プロファイルが、血中の脂質値が正常値を示すヒトのものと非常に類似している事が明らかになり、脂質代謝の研究のために重要な実験動物と考えられてきている。そこで雄性コモンマーモセットを含めた8種類の実験動物の血清脂質およびリポタンパク質プロファイルを比較し、本動物がヒト血清脂質に近いプロファイルを示す事を確かめた。その結果、血清TC値および各種リポタンパク質コレステロール値は、血中の脂質値が正常値を示すヒトのものと非常に類似しており、ヒトの血清脂質およびリポタンパク質研究に有益な動物であると考えられた。さらに、この動物にPVを14日間連続投与したところ、血清TCはPVの用量に依存して低下した。肝LDL受容体タンパク質の増加と、肝臓FC含量およびLDL-Cを低下させた用量は同一であった。これらのことから、コモンマーモセットにおけるLDL-C低下の機序も、JWウサギと同様と考えられた。さらに、本動物における結果とこれまで多くの動物で報告してきた肝LDL受容体タンパク質の上昇率とLDL-C低下量の相関関係を調べたところ、コモンマーモセットにおける相関関係は、ヒトにおける相関関係と近似の関係にあった($r^2=0.967, p=0.0025$)。このことから、コモンマーモセットにおけるLDL代謝はヒトに近いと考えられた。以上のことから、本動物を用いた脂質低下剤の薬理効果を評価を行うことにより、ヒトにおける薬効を推定できるものと考えられた。

4. 血中MVA濃度の臨床的意味合いとその応用

高脂血症の解析および病態の医療的な薬理効果を調べるために、生体内のステロール合成活性を調べることは重要である。これまでには、臨床的な観点からこの活性を測定するには煩雑な方法を用いるしかなく不便であった。近年、コレステロール合成の中間産物であるmevalonate(MVA)の血中濃度が、生体内のSS活性を反映する指標として考えられてきている。しかし、これまでにSS臓器におけるSS活性とこれら中間産物の血中濃度の相関を十分に調べた論文はない。このためPVをコモンマーモセットへ単回投与し、肝臓選択的SS阻害について確かめ、さらに肝臓ステロール合成活性、肝臓中および血中MVA濃度の関係について検討した。その結果、PVはコモンマーモセットにおいて肝臓のSS活性を選択的に阻害していることを

確認し、さらに肝臓の SS 活性と肝臓および血清 MVA に優れた相関関係あった。これらのことから、血清 MVA は大部分肝臓の SS により産生され、血清 MVA レベルが、肝臓の SS 活性をほぼ反映させていると考えられた。さらに薬剤単回投与後の血清 MVA 変化を調べることによって、血清脂質低下の評価を迅速に行えうるパラメータの可能性を示唆した。

学位論文審査の要旨

主査 教授 野村 靖幸
副査 教授 五十嵐 靖之
副査 助教授 井ノ口 仁一
副査 助教授 大熊 康修

学位論文題名

プラバスタチンの実験動物における HDL-cholesterol 低下機序とコモンマーモセットにおける作用

Pravastatin sodium (PV)は、コレステロール合成系の 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素の阻害薬であり、血清コレステロール低下薬として広く臨床で用いられている。

本薬剤は肝臓ステロール合成 (SS) を選択的に阻害することが特徴であるが、これは細胞レベルあるいは動物への単回投与による報告であり、連続投与時における SS の組織選択性について示されていなかった。このため、申請者はマウスを用い反復投与における SS の組織選択性について検討した。その結果、対照薬の simvastatin、lovastatin に比べ、反復投与においても、肝臓 SS を選択的に阻害することを明らかとした。また、PV の血清総コレステロール(Total Cholesterol : TC)低下作用の機序は、低比重リポタンパク質 (LDL) 受容体タンパク質を増加させたことによる LDL-cholesterol (LDL-C) 低下に基づくと考えられている。しかし、実験動物における PV 投与時のリポタンパク質プロファイルを分析すると、高比重リポタンパク質 cholesterol (HDL-C) も低下している場合も多く、その低下の機序は知られていない。このため申請者は、この機序を解明するため、雄性日本白色種 (JW) ウサギを用いて、PV の血清コレステロール低下作用の機序を検討した。その結果、PV による LDL-C 低下作用の機序は、肝臓の HMG-CoA 還元酵素を阻害し、肝臓の FC 含量を低下させ、LDL 受容体タンパク質を増加させるという良く知られた機序に基づくものであったことを確認した。一方 PV 30 mg/kg を JW ウサギに 4 日間投与すると HDL-C が選択的に低下した。この時の肝 LDL 受容体タンパク質は変化がなかったが、肝臓からの超低比重リポタンパク質 (VLDL)-コレステリルエステル(CE) 分泌速度が低下していること、また PV 21 日間投与実験において、VLDL-CE 分泌速度が有意に低下し、同じ用量で HDL-C も低下した結果を得た。このことから、PV による HDL-C の低下には、VLDL-CE の分泌低下が関与すると考えた。また PV 投与群においては、VLDL のタンパク質の分泌速度には変化が認められなかったことから、肝臓から CE-poor VLDL 粒子が分泌されていると考えた。一方、投与期間中、コントロール群と PV 投与群の間で、VLDL-C の濃度に差は認められなかった。以上の結果と PV による HDL-C

の低下に VLDL-CE の分泌低下が関与しているという考察と合わせた結果、HDL-C の低下は、HDL 粒子から CE-poor VLDL 粒子へ CE が、cholesterol ester transfer protein (CETP) を介し、移動することによって引き起こされていると考えられた。VLDL 中の CE 分子種の解析を行ったところ、PV 投与群の VLDL-CE は、HDL 由来の cholesterol linoleate が多かった。このことから、HDL から CETP を介して CE が移動してきていることが明らかとなった。以上のことから申請者は、JW ウサギにおいて、PV は 2 つの機序により血清 TC を低下させることを示した。すなわち、LDL-C の低下は LDL 受容体依存的に、HDL-C は肝臓からの VLDL-CE 分泌低下により誘導される CETP に依存した機序により低下したことを明らかとした。これは、実験動物において HMG-CoA 還元酵素阻害薬が HDL-cholesterol を低下させる機序を示し、ヒトと異なる反応を示す根拠になると考えられた。

また、マウスやウサギのような動物はヒトと進化の過程を異にしており、ヒトのリポタンパク質および動脈硬化研究のモデル動物としてふさわしいかは十分にはわかっていない。この点を考慮に入れ、申請者は薬の開発に適した実験動物を見出すことを目的に、入手可能な 8 種類の実験動物の血清脂質およびリポタンパク質プロファイルを比較した。その結果、コモンマーモセットの血清 TC 値および各種リポタンパク質コレステロール値は、血中の脂質値が正常値を示すヒトのものと非常に類似しており、ヒトの血清脂質およびリポタンパク質研究に有益な動物であることを確認した。さらに、この動物に PV を連続投与した結果、血清 TC は PV の用量に依存して低下することを見出した。肝 LDL 受容体タンパク質の増加と、肝臓 FC 含量および LDL-C を低下させた用量は同一であった。これらのことから、コモンマーモセットにおける LDL-C 低下の機序も、JW ウサギと同様と考えた。さらに、本動物における結果とこれまで多くの動物で報告してきた肝 LDL 受容体タンパク質の上昇率と LDL-C 低下量の相関関係を検討したところ、コモンマーモセットにおける相関関係は、ヒトにおける相関関係と近似の関係にあった。このことから、申請者はコモンマーモセットにおける LDL 代謝はヒトに近いと考え、本動物を用いた脂質低下剤の薬理効果の評価を行うことにより、ヒトにおける薬効を推定できる可能性を示した。

高脂血症の解析および病態の医療的な薬理効果を調べるために、生体内のステロール合成活性を検討することは重要である。これまで、臨床的な観点からこの活性を測定するには煩雑な方法を用いるしかなく不便であった。近年、コレステロール合成の中間産物である mevalonate (MVA) の血中濃度が、生体内の SS 活性を反映する指標として考えられてきている。しかし、これまでに SS 腎器における SS 活性とこれら中間産物の血中濃度の相関を十分に検討した論文は見られない。このため申請者は、PV をコモンマーモセットへ単回投与し、肝臓選択的 SS 阻害について確かめ、さらに肝臓ステロール合成活性、肝臓中および血中 MVA 濃度の関係について検討した。その結果、PV はコモンマーモセットにおいて肝臓の SS 活性を選択的に阻害していることを確認し、さらに肝臓の SS 活性と肝臓および血清 MVA に高い相関関係にあることを見出した。このことから、申請者は、血清 MVA が大部分肝臓の SS により産生され、血清 MVA レベルが、肝臓の SS 活性をほぼ反映させていることを示した。さらに薬剤単回投与後の血清 MVA 変化を比較することが、血清脂質低下の評価を迅速に行いうるパラメータの可能性を示唆した。

以上のような新知見を明らかにした申請者は、博士（薬学）の学位を受領するのに十分な資質を有するものであることを認めた。