

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：30111
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590141
 研究課題名（和文） シトクロム P450(CYP) 酵素を介したロサルタンによるアラキドン酸代謝阻害
 研究課題名（英文） Inhibitory effects of losartan on arachidonic acid metabolism via cytochrome P450 (CYP) enzymes
 研究代表者
 戸田 貴大 (TODA TAKAKI)
 北海道薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号：00254706

研究成果の概要（和文）：

高血圧治療に用いられるロサルタンが、代謝酵素のシトクロム P450 (CYP) を阻害することにより、生体内物質であるアラキドン酸からのエポキシエイコサトリエン酸類 (EETs) の生成量を減少させることを明らかにした。この現象は、同種の高血圧薬であるテルミサルタンでも認められた。EETs は心保護作用を有する。したがって、これら薬物で不整脈など循環器系副作用が生じる原因として、EETs 生成量減少が関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It was shown that losartan, a drug of the treatment for hypertension, decrease the production of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) from arachidonic acid by inhibiting some cytochrome P450 (CYP)s. This inhibitory effect was also found in telmisartan, which is the similar anti-hypertensive as losartan. EETs have cardioprotective effects. Therefore, it was suggested that the decrease of EETs production would be related to the cardiovascular side effects such as arrhythmia of these drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態・代謝学

1. 研究開始当初の背景

ロサルタンは、世界 100 ヶ国以上で承認されているアンジオテンシン II 受容体拮抗薬である。我が国においては 1998 年に販売が開始され、2006 年には利尿薬ヒドロクロロチ

アジドとの配合剤が臨床使用されるなど、高血圧患者の治療に広く用いられている。

ロサルタンは生体内においてシトクロム P450 (CYP) 2C9、3A4 により代謝を受ける。代謝物の一つである E-3174 はロサルタンの

カルボン酸体であり、ロサルタンよりも 10～40 倍の高い活性を有することが明らかになっている。またロサルタンには、頻脈等の調律障害（頻度不明）、胸痛、動悸（頻度 0.1～5%）などの循環器系の有害事象が報告されている。

アラキドン酸は、生体内でエイコサノイドの前駆物質として重要な役割を担う不飽和脂肪酸である。アラキドン酸は、シクロオキシゲナーゼによる代謝を受けプロスタグランジン類やトロンボキサン A₂ を、5-リポキシゲナーゼによる代謝を受けロイコトリエン類を生成する。またアラキドン酸は CYP2C8、CYP2C9、CYP2J2 による代謝も受け、エポキシエイコサトリエン酸類（EETs）を生成する。

EETs は、心保護作用や血管拡張作用、抗血栓作用などを有し、また、強力な血管新生誘導因子であることが知られている。これら代謝酵素には遺伝多型が知られており、特に CYP2J2 の遺伝多型については高血圧症との関連が指摘されている

我々はすでに、ヒト肝ミクロソームを用いた研究により、CYP2C9 の選択的阻害薬であるスルファフェナゾールがアラキドン酸代謝を強力に阻害することを確認した。さらにロサルタンにおいては、スルファフェナゾールよりも強くアラキドン酸代謝を阻害することを見いだした。本結果は、ロサルタンによる循環器系の有害事象は、ロサルタンによりアラキドン酸からの EETs 生合成経路が阻害を受け、生体内の EETs 量が低下したために誘発された可能性を示唆している。医薬品の安全使用のためには、このロサルタンによるアラキドン酸代謝阻害の機序を早急に明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

ヒト CYP 酵素（CYP2C8、CYP2C9、CYP2J2）を単独で発現させたりコンビナント酵素（rCYP）中にロサルタンを共存させることで、ロサルタンによるアラキドン酸代謝阻害に関わる酵素を特定する。また各 CYP 酵素に対するロサルタンの阻害形式、阻害定数等を求める。

ロサルタンがアラキドン酸代謝において、CYP2C9、CYP2C8 を阻害することが明らかとなった場合は、カロリンスカ研究所にてすでに遺伝子型を調査済みのヒト肝ミクロソーム（CYP2C9*1/*1、CYP2C9*1/*2、CYP2C9*1/*3、CYP2C9*2/*2 および CYP2C8*1/*1、CYP2C8*1/*3、CYP2C8*3/*3）、あるいは市販のヒト CYP2C9*2、CYP2C9*3 の rCYP を用いて、ロサルタンによるアラキドン酸代謝阻害活性の遺伝多型差を検討する。

3. 研究の方法

(1) LC-MS-MS を用いたエポキシエイコサトリ

エン酸、ジヒドロキシエイコサトリエン酸の同時定量法の開発

アラキドン酸およびアラキドン酸が CYP 酵素によって代謝を受け生成される 5, 6-, 8, 9-, 11, 12-, 14, 15-EETs の同時定量法を確立する。また、EETs は不安定で代謝されやすいため、EETs のさらなる代謝物質であるジヒドロキシエイコサトリエン酸（dHETEs）についても同時定量を試みる。

(2) リコンビナント酵素を用いたロサルタンのアラキドン酸代謝への影響

rCYP 中にロサルタンを共存したときのアラキドン酸代謝阻害活性を検討する。rCYP としては、CYP2C9、CYP2C8、あるいは CYP2J2 を発現させたものを用いる。また、ロサルタンの活性代謝物である E-3174 が CYP 酵素阻害作用を有する可能性も否定できないことから、E-3174 共存下でのインキュベーション実験も行う。

インキュベーション時間、rCYP のタンパク濃度、アラキドン酸添加濃度については、アラキドン酸代謝物生成速度が線形性を保つ範囲内で設定する。サンプル調製には固相抽出法を用いる。

(3) リコンビナント酵素を用いたロサルタンのアラキドン酸代謝阻害形式

rCYP を用いてアラキドン酸濃度、ロサルタン濃度を適宜変化させることにより、ロサルタンによる CYP 酵素の阻害形式、阻害係数等を求める。E-3174 が CYP 阻害作用を示した場合には、これについても同様に検討する。

(4) 遺伝多型を指標とするロサルタンのアラキドン酸代謝への影響

市販のヒト CYP2C9*2、CYP2C9*3 の rCYP を用いて、ロサルタンによるアラキドン酸代謝阻害活性の遺伝多型差を検討する。

(5) 他のアンジオテンシン II 受容体拮抗薬による検討

ロサルタン以外のアンジオテンシン II 受容体拮抗薬（ARBs）である、テルミサルタン、イルベサルタン、オルメサルタン、バルサルタン、カンデサルタンについて、rCYP 系におけるアラキドン酸代謝への影響について検討する。

4. 研究成果

(1) LC-MS-MS を用いたエポキシエイコサトリエン酸、ジヒドロキシエイコサトリエン酸の同時定量法の開発

EETs および dHETEs における、5, 6-, 8, 9-, 11, 12-, 14, 15-体の LC-MS-MS による同時定量法を開発した。溶出時間は、dHETEs が約 4～7 分、EETs が約 17～26 分であった（図 1）。

定量限界値は、dHETEs が 27 pg、11,12-EET が 64 pg、その他の EETs が 256 pg であり、我々の実験系における定量感度として十分であった。

各エイコサノイド類における検量線の相関係数は 0.972~0.999、回収率は 95.2~118%、日間誤差は 16.7%以内、日内誤差は 6%以内となった。

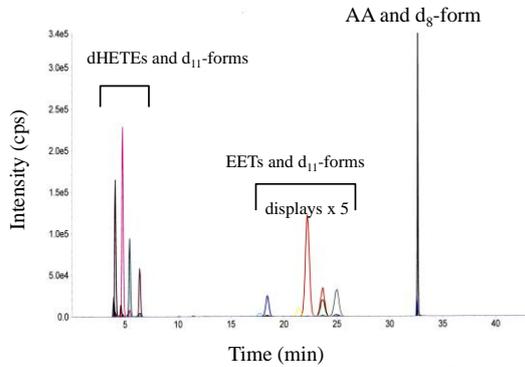


図 1 LC-MS/MS によるアラキドン酸およびエイコサノイド類のクロマトグラム

(2) リコンビナント酵素を用いたロサルタンのアラキドン酸代謝への影響

rCYP 系におけるエイコサノイド類の生成量は、EETs において rCYP2C9 > rCYP2C8 > rCYP2J2、dHETEs において、rCYP2C8 > rCYP2C9 > rCYP2J2 であった。エイコサノイド類全量では、14,15-体 > 11,12-体 > 8,9-体 > 5,6-体の順に生成量が多かった。

ロサルタン添加により、濃度依存的にすべての EETs の生成量が減少した (図 2)。この結果は、ロサルタンにより CYP2C9、2C8 及び 2J2 を介するアラキドン酸代謝が阻害され、EETs の生成量が減少する結果、心血管イベントが増加する可能性を示している。

さらに、ロサルタンの活性代謝物 E-3174 の添加により、rCYP 系において濃度依存的にアラキドン酸の代謝が阻害されることを見出した。これは、ロサルタンによる CYP 酵素阻害は、ロサルタンのみならず E-3174 による影響も考慮しなくてはならないことを示唆している。

(3) リコンビナント酵素を用いたロサルタンのアラキドン酸代謝阻害形式

アラキドン酸を代謝する CYP 酵素のうち、EETs をもっとも多く生成する CYP2C9*1 の rCYP (rCYP2C9*1) を用いて、14,15-EET 生成に対するロサルタンの阻害形式および阻害定数を求めた。その結果、阻害形式は競合的阻害、阻害定数は 10.5 μM であることが明らかとなった (図 3)。

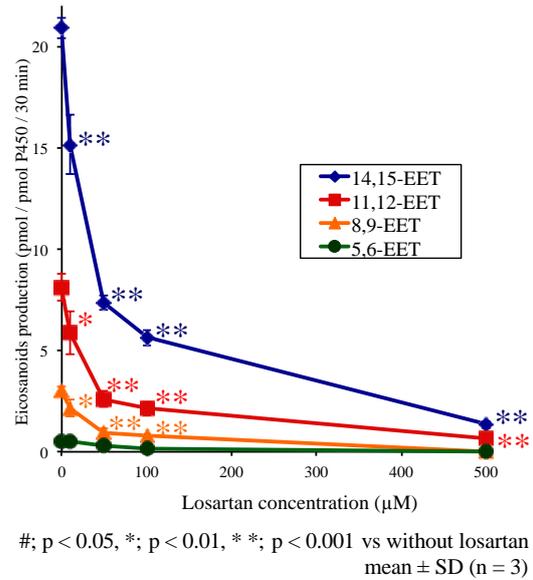


図 2 rCYP2C9*1 におけるロサルタンによる EETs 生成阻害

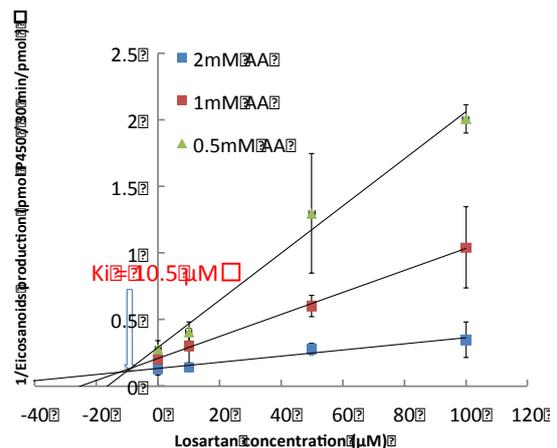


図 3 rCYP2C9*1 系での 14,15-EET 生成におけるロサルタンによる阻害 (Dixon プロット) (AA:アラキドン酸、mean ± S. D., n=3)

(4) 遺伝多型を指標とするロサルタンのアラキドン酸代謝への影響

CYP2C9*3 の rCYP (rCYP2C9*3) を用いて、アラキドン酸の代謝実験を行ったところ、EETs の生成速度は rCYP2C9*1 のおよそ 8 分の 1 であることが明らかとなった。

ロサルタンは rCYP2C9*3 においてもアラキドン酸の代謝を阻害したことから、CYP2C9*3 を持つ患者では、もともとの EETs 生成量が少ない上にロサルタンによりさらにその生成が阻害され、心血管系イベントが生じやすくなる可能性が示唆された。

(5)他のアンジオテンシン II 受容体拮抗薬による検討

ロサルタン以外の ARBs を用いて、rCYP2C9*1、rCYP2C8*1 によりアラキドン酸代謝の阻害を検討した。その結果、ARBs によって阻害の強度は異なることが明らかとなった。rCYP2C9*1 では、阻害の強い順にテルミサルタン \geq ロサルタン $>$ イルベサルタン $>$ カンデサルタン、オルメサルタン、バルサルタンとなった。rCYP2C8*1 では、阻害の強い順にロサルタン \geq テルミサルタン、イルベサルタン $>$ オルメサルタン $>$ カンデサルタン $>$ バルサルタンとなった (図 4)。

これらの結果から、CYP2C9 と CYP2C8 の 2 つの酵素を強く阻害するテルミサルタン、ロサルタンでは、アラキドン酸からの EETs 生成が低下していることにより心保護作用が減弱し、副作用である心血管系イベントが発現しやすい可能性が示唆された。

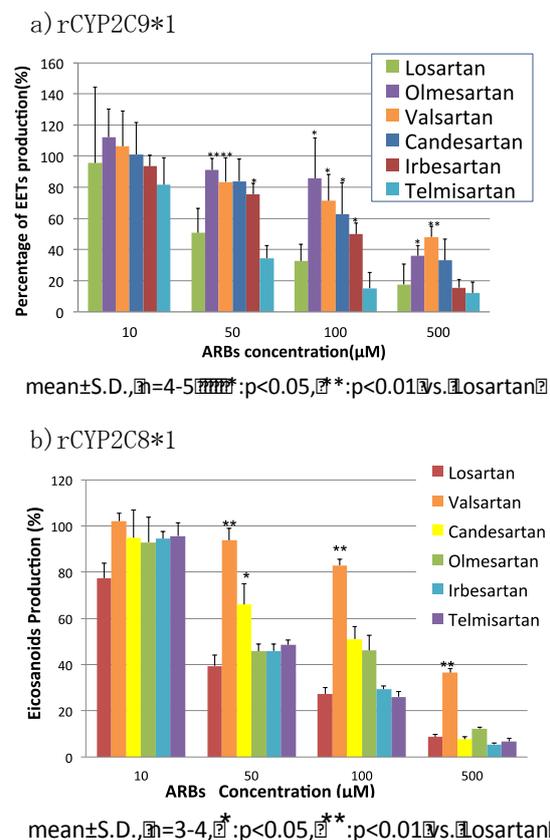


図 4 ARBs 非添加時を 100%としたときの EETs 生成比 (14, 15-EET, 11, 12-EET, 8, 9-EET, 5, 6-EET の総和として計算)

これまで、ARBs には ACE 阻害薬と同様に、心保護作用があると言われてきた。しかし、近年は ARBs の心保護作用に疑問を呈する論文が発表されている (J Hypertens, 25 (5), 951-958, 2007.)。本研究で、ARBs 添加によ

り心保護作用を有する EETs 生成量の低下が認められたことは、これを支持する結果となるかもしれない。

Kamiyama らは、ヒト肝ミクロソーム系において(S)-ワルファリンの 7-水酸化を見ることで、ARBs による CYP2C9 阻害に関して報告している (Drug Metab Pharmacokinet. 22 (4):267-275, 2007)。これによると、ロサルタンの K_i 値は 5.75 μ M であり、本研究での K_i 値 (10.5 μ M) はほぼ同程度の値となった。また、E-3174 に CYP2C9 阻害作用が見られることも、本研究の結果と一致した。

一方でカンデサルタンについては、Kamiyama らでは比較的強い阻害が見られたのに対し、本研究では弱い阻害しか認められなかった。これは、実験系や用いる基質に実験結果が依存することを示唆している。

本研究では ARBs の CYP2C8 阻害についても検討した。Walsky らは、209 種類の薬物における CYP2C8 に対する阻害効果について報告している (J Clin Pharmacol. 45 (1):68-78, 2005) が、ARBs による CYP2C8 の阻害効果について網羅的に検討した論文は見当たらない。現在、阻害強度を定量的に評価するため、 K_i 値を求めるための実験を行っている。

今後は、得られた知見を早急に論文として発表したい。また、次の段階として、健康人ボランティアを対象に、ARBs 服用前後の血中 EETs 量の変化を測定し、ARBs による CYP 酵素阻害の臨床的意義について検討したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 11 件)

① 升井樹、千田明日菜、戸田貴大、早川達、猪爪信夫、ヒト肝ミクロソームにおけるカンデサルタンのエポキシドヒドロラーゼ活性への影響、日本薬学会北海道支部第 140 回例会、2013 年 5 月 19 日、札幌

② 千田明日菜、枝澤瑞記、寒藤雅俊、斎木章太、戸田貴大、早川達、Erik ELIASSON、Anders RANE、福島昭二、猪爪信夫、CYP2C8 を介したエポキシエイコサトリエン酸類生成に及ぼすアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の影響、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 30 日、横浜

③ 橋本茉弥、斎木章太、升井樹、千田明日菜、戸田貴大、早川達、Erik ELIASSON、Anders RANE、福島昭二、猪爪信夫、ヒト肝ミクロソームにおけるエイコサノイド類生成に対するアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の影響、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、横浜

④ Toda T, Senda A, Riu Y, Fujioka K, Hosokawa A, Yoshimura K, Hayakawa T, Inotsume N, Ask B, Rane A, Eliasson E
Different inhibitory effects of angiotensin II receptor blockers on cytochrome P4502C9 dependent formation of epoxyeicosatrienoic acids from arachidonic acid, FIP2012, 2012/10/5-6, アムステルダム(オランダ)

⑤ 吉村和晃、戸田貴大、早川達、猪爪信夫、Ask B、Eliasson E、Rane A、アラキドン酸代謝における CYP2C9 遺伝子多型の影響、第 29 回日本 TDM 学会・学術大会、2012 年 6 月 17 日、神戸

⑥ 千田明日菜、戸田貴大、劉揚、藤岡可奈絵、細川歩美、早川達、猪爪信夫、Ask B、Eliasson E、Rane A、アラキドン酸からのエポキシエイコサトリエン酸類生成に及ぼすアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の影響、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 31 日、札幌

⑦ Toda T, Inotsume N, Takeuchi S, Hayakawa T, Ask B, Eliasson E, and Rane A, Inhibitory effect of losartan on biosynthesis of eicosanoids via arachidonic acid, the 12th Congress of IATDMCT 2011, 2011/10/4,6, シュトゥットガルト (ドイツ)

⑧ 戸田貴大、竹内里哉、清水俊、千田明日菜、吉村和晃、坂本和央、早川達、猪爪信夫、Ask B、Eliasson E、Rane A、アラキドン酸からのエイコサノイド類生成に及ぼすロサルタンの影響、第 28 回日本 TDM 学会・学術大会、2011 年 6 月 18 日、広島

⑨ 竹内里哉、清水俊、千田明日菜、吉村和晃、坂本和央、戸田貴大、早川達、猪爪信夫、Eliasson E、Rane A、各種遺伝子組換え酵素を用いたエイコサノイド類生成に及ぼすロサルタンの影響、日本薬学会北海道支部第 136 回例会、2011 年 5 月 21 日、札幌

⑩ 戸田貴大、シトクロム P450 (CYP) 酵素を介したアラキドン酸からのエイコサノイド類生成、日本薬学会北海道支部第 136 回例会、2011 年 5 月 21 日、札幌

⑪ 竹内里哉、濱克徳、山岡慶子、吉村和晃、坂本和央、戸田貴大、早川達、猪爪信夫、Eliasson E、Rane A、ロサルタンによるアラキドン酸代謝阻害活性の濃度依存性、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 29 日、静岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸田 貴大 (TODA TAKAKI)
北海道薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：00254706

(2) 研究分担者

猪爪 信夫 (INOTSUME NOBUO)
北海道薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：10191892

早川 達 (HAYAKAWA TORU)
北海道薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：50337044