

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：30111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460229

研究課題名(和文) ARBs服用患者における血清中EETs濃度と心血管系イベント発症との関係

研究課題名(英文) Relationship between serum EETs concentrations and cardiovascular events in patients taking angiotensin II receptor blockers

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARBs)が、アラキドン酸代謝物であるエイコサノイド類(エポキシエイコサトリエン酸類およびジヒドロキシエイコサトリエン酸類)の血清中濃度に及ぼす影響について患者を対象に検討した。多変量解析の結果、eGFR(推定GFR)は血清中エイコサノイド類濃度と有意な負の相関があること、ARBs服用により血清中エイコサノイド類濃度は有意に低下することが示された。また、ARBs服用の有無に関わらず、高血圧患者では血清中エイコサノイド類濃度が有意に低下していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the influence of angiotensin II receptor blockers (ARBs) on the serum concentrations of eicosanoids (epoxyeicosatrienoic acids and dihydroxyeicosatrienoic acids, which are arachidonic acid metabolites) in patients. Multivariate analysis showed that eGFR (estimated GFR) was negatively associated with the serum levels of eicosanoids, and ARBs significantly decreased the levels. In addition, the serum levels of eicosanoids were significantly decreased in hypertensive patients regardless of whether they were taking ARBs.

研究分野：臨床薬理学、薬物動態学

キーワード：エポキシエイコサトリエン酸類 アンジオテンシンII受容体拮抗薬 エイコサノイド類 相互作用 ア  
ラキドン酸

### 1. 研究開始当初の背景

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 CYP2C8、CYP2C9、CYP2J2 による代謝を受け、エポキシエイコサトリエン酸類 (14,15-EET、11,12-EET、8,9-EET、5,6-EET) 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 CYP 酵素には遺伝多型が知られており、遺伝多型と心循環器系疾患との関連が指摘されている。

ロサルタンをはじめとするアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARBs) は、世界中で高血圧患者の治療に広く用いられている。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 ARBs の心保護作用には疑問が呈されており、ACE 阻害薬では血圧非依存性の主要冠動脈疾患イベント抑制効果が認められるが、ARBs には認められないとのメタアナリシスが報告された。

我々はすでに、ヒト肝ミクロソーム (HLMs) および遺伝子組み換え酵素 (リコンビナント酵素、rCYP) を用いた研究により、ロサルタンが各種 CYP 酵素を阻害しアラキドン酸からの EETs 生成速度を減少させることを明らかにした。またロサルタン以外の ARBs においても、強度の違いはあるが CYP2C8 および CYP2C9 に対する阻害効果を持つことを見出した。

ARBs には、頻脈等の調律障害、胸痛、動悸などの循環器系の有害事象が報告されている。本結果は、ARBs によるこれらの有害事象は、ARBs によりアラキドン酸からの EETs 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。しかしこれらの結果は *in vitro* 系で得られたものである。この仮説を証明するには、ARBs 服用患者における血清中 EETs 濃度を測定して ARBs 非服用患者での濃度と比較し、また、EETs 濃度と心血管系イベント発症との関連性について検討する必要がある。

### 2. 研究の目的

ARBs を服用している患者のうち、患者情報 (年齢、性別、ARBs の服用歴、併用薬、臨床検査値など) や心血管イベント歴などを収集でき、かつ研究に対する同意を得られた患者、および同様のデータや同意が得られた ARBs を服用していない患者を対象とし、ARBs 服用患者群で、血清中 EETs 濃度および EETs の代謝産物であるジヒドロキシエイコサトリエン酸類 (DHETs) 濃度に有意な低下が認められるか否か検討する。また、血清中 EETs および DHETs 濃度と心血管系イベントの有無との関係について調査する。

### 3. 研究の方法

(1) rCYP2J2 および HLMs におけるアラキドン酸代謝に対する ARBs の阻害効果

申請者の研究グループは、すでにロサルタンをはじめとする 6 種の ARBs に関して rCYP2C8 および rCYP2C9 によるアラキドン酸からのエイコサノイド類生成に対する阻害効果について検討済みである。今回は臨床研究を行う前に、rCYP2J2 によるアラキドン酸からのエイコサノイド類生成に対する、これら ARBs の阻害効果について検討した。また、HLMs を用いた検討もあわせて行った。

(2) 血清中エイコサノイド類測定におけるサンプル精製方法の確立

申請者の研究グループが確立した LC-MS/MS を用いたエイコサノイド類 (EETs および DHETs) 同時定量法 (Mukai Y et al., Biol Pharm Bull., 38, 1673-1679, 2015) を改変し、ヒト血清をサンプルとしたときの適切なサンプル処理法を検討した。ヒト血清については、厚生労働省「献血血液の研究開発等での使用に関する指針」に基づく公募に応募し提供を受けた。測定機器には、研究代表者が所属する大学が所有する LC-MS/MS システム (3200 Q TRAP® LC/MS/MS System, AB Sciex) を使用した。

(3) 患者における血清中 EETs と DHETs 濃度測定

手稲溪仁会病院において ARBs を服用している患者のうち、患者情報 (年齢、性別、ARBs の服用歴、併用薬、臨床検査値など) や心血管イベント歴などを収集でき、かつ研究に対する同意を得られた患者、および同様のデータや同意が得られた ARBs を服用していない患者を対象とした。目標症例数はそれぞれ 200 例とした。エイコサノイド類測定用の血液サンプルとして、臨床検査値用採血検体の残り (血清として最低 300  $\mu$ L 程度) を使用した。採血時期は、ARBs 服用患者においては服用開始 1 ヶ月以降とした。患者への説明と同意は、手稲溪仁会病院循環器内科の医師が行い、病院内における血液サンプルの管理は、手稲溪仁会病院薬剤部が担当した。

血清中エイコサノイド類濃度は、(2) で確立した方法により測定した。測定までの間、申請者の研究室が所有するディープフリーザー (-80 ) にサンプルを保存した。

(4) 患者情報の収集

電子カルテより、該当患者の患者情報 (年齢、性別、ARBs の服用歴、併用薬、臨床検査値、心血管イベントなどの副作用の有無、合併症の有無、体重、BMI など) について情報を収集した。患者個人情報の匿名化のため、患者情報の収集は測定およびデータ解析に関与しない研究協力者が担当した。

(5)血清中エイコサノイド類濃度に及ぼす影響因子の探索

ARBs 服用による血清中エイコサノイド類濃度への影響について検討するため、ARBs 服用患者と非服用患者における血清中エイコサノイド類濃度について Mann-Whitney 検定による有意差検定を行った。また、ARBs 服用群における血清中エイコサノイド類濃度に対する併用薬の影響についても、同様に検討した。さらに、多変量解析により、血清中エイコサノイド類濃度に及ぼす影響因子を探索した。多変量解析には SPSS を用いた。

4. 研究成果

(1) rCYP2J2 および HLMs におけるアラキドン酸代謝に対する ARBs の阻害効果

rCYP2J2 を用いたアラキドン酸の代謝実験において、テルミサルタンは強力にエイコサノイド類の生成を阻害した (Table 1)。この結果は、テルミサルタンが CYP2J2 の強力かつ特異的阻害剤であるとの報告 (Ren S et al., Drug Metab. Dispos., 41, 60-71, 2013) と一致した。

HLMs を用いたアラキドン酸の代謝実験においても、ARBs は濃度依存的にエイコサノイド類の生成を阻害した。その IC<sub>50</sub> は、すでに得られている rCYP2C9 および rCYP2C8 における IC<sub>50</sub> を反映するものであった (Table 1)。これは肝における CYP 酵素含有量が CYP2C9>CYP2C8>>CYP2J2 であるためと考えられる。これらの結果は Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 誌に受理され、印刷中である。

Table 1 エイコサノイド類生成に対する各 ARB の IC<sub>50</sub> 値

ARBs	rCYP2J2	HLMs
Candesartan	>500	104
Irbesartan	62.0	53.9
Losartan	223	12.8
Olmesartan	109	56.2
Telmisartan	3.99	24.1
Valsartan	>500	489

(μmol/L)

(2)血清中エイコサノイド類測定におけるサンプル精製方法の確立

種々検討の結果、以下のような精製方法を確立した。

ヒト血清 250 μL に内標準物質 (エイコサノイド類の重水素標識体) 混液 50 μL、エタノール 950 μL を加え十分に混和  
20 分静置後、遠心分離

得られた上清を水 1 mL で希釈し、固相抽出カラム (Oasis HLB) にマウント  
カラム内の不要な物質を水で洗浄した後、酢酸エチルでエイコサノイド類を抽出

この方法を用いて、0.1-10 ng/mL の濃度範囲で各エイコサノイド類の検量線を作成したところ、原点を通る良好な直線 (r=0.994-0.999) が得られた。

(3)ARBs 服用患者における血清中エイコサノイド類濃度

ARBs 服用患者 (92 名) における血清中エイコサノイド類濃度の中央値は 1.5 nmol/L であり、非服用患者 (99 名) における値 (1.9 nmol/L) に対し約 20% 低下していたが、有意差は認められなかった (p=0.154) (Fig. 1)。

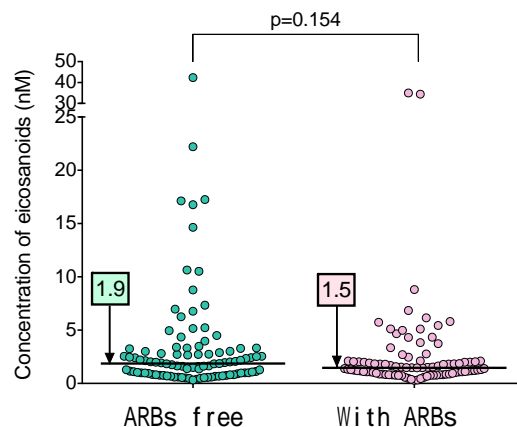


Fig. 1 ARBs 非服用患者および服用患者の血清中エイコサノイド類濃度

しかし、スタチン薬を併用している ARBs 服用患者群 (55 名) では、スタチン薬非併用群 (37 名) に対し血清中エイコサノイド類濃度に低下傾向が認められた (p=0.072, Fig. 2)。一方、抗血栓薬併用群 (78 名)、抗糖尿病薬併用群 (26 名)、プロトンポンプ阻害薬併用群 (51 名) では血清中エイコサノイド類濃度の有意な低下は見られなかった。スタチン薬の多くは CYP2C9、CYP2C8 阻害作用を有するため、血清中エイコサノイド類濃度の低下には ARBs と同様に CYP 酵素阻害が関与していると考えられた。

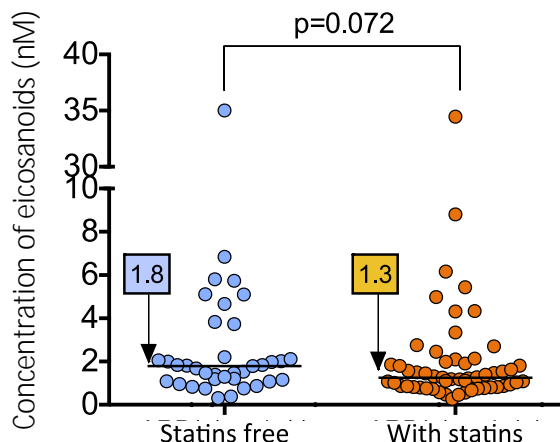


Fig. 2 ARBs 服用患者におけるスタチン薬併用時の血清中エイコサノイド類濃度

また、ARBs 服用に関わらず高血圧患者では血清中エイコサノイド類濃度が有意に低下していた ( $p < 0.01$ )。これは、血清中エイコサノイド類濃度低下が、高血圧発症の一因である可能性を示している。

#### (4) 血清中エイコサノイド類濃度に及ぼす影響因子の探索

年齢、性別、BMI、喫煙、eGFR (estimated GFR)、心筋梗塞の既往、服用薬 (ARBs、スタチン薬、抗血小板薬、抗凝固薬、抗糖尿病薬、カルシウム拮抗薬、遮断薬、利尿薬) が明らかな ARBs 服用患者 90 名および非服用患者 98 名を対象に、多変量解析により血清中 EETs および DHETs 濃度に及ぼす影響因子を探索した。その結果、腎機能の指標である eGFR と血清中エイコサノイド類濃度との間に有意な負の相関 ( $p = 0.012$ ) が、ARBs 服用患者群において有意な血清中エイコサノイド類濃度の低下 ( $p = 0.021$ ) が認められた。ARBs による血清中エイコサノイド類濃度低下に関しては、申請者の研究グループが *in vitro* 系の研究で明らかにした ARBs の CYP 酵素阻害作用 (Senda A et al., Biol Pharm Bull., 38, 1975-1979, 2015; Senda A et al., Basic Clin Pharmacol Toxicol. in press) が関わっていると考えられる。eGFR に関しては、おそらく腎機能低下により DHETs の排泄が遅延することが寄与しているものと思われる。

今回は、例数が予定数に達しなかったため、血清中 EETs および DHETs 濃度と心血管系イベントの有無との関係について検討することができなかった。今後、ARBs 服用群、非服用群ともに 200 例に到達した段階で検討し、その結果を論文、学会等で公表する予定である。

#### 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)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) Asuna Senda, Yuji Mukai, Toru Hayakawa, Yuka Kato, Erik Eliasson, Anders Rane, Takaki Toda, Nobuo Inotsume, Angiotensin II Receptor Blockers Inhibit the Generation of Epoxyeicosatrienoic Acid from Arachidonic Acid in Recombinant CYP2C9, CYP2J2 and Human Liver Microsomes, Basic Clin. Pharmacol. Toxicol., in press

[学会発表] (計 5 件)

(1) 加藤由佳、千田明日菜、向祐志、山下美妃、笹岡佑樹、花田美菜世、本郷文教、佐藤誠二、廣上貢、Anders Rane、猪爪信夫、戸田貴大、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬服用患者の血清中エイコサノイド類濃度へ

の併用薬の影響、第 37 回日本臨床薬理学会学術総会、2016 年 12 月 3 日、米子コンベンションセンター (鳥取県米子市)

(2) 千田明日菜、加藤由佳、向祐志、戸田貴大、山下美妃、笹岡佑樹、花田美菜世、本郷文教、佐藤誠二、廣上貢、Erik ELIASSON、Anders RANE、猪爪信夫、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬服用患者の血清中エイコサノイド類濃度、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

(3) Asuna Senda, Yuji Mukai, Miki Yamashita, Takaki Toda, Yuki Sasaoka, Minayo Hanada, Fuminori Hongo, Mitsugu Hirokami, Seiji Sato, Erik Eliasson, Anders Rane, Nobuo Inotsume, Serum concentrations of eicosatrienoic acids in patients treated with and without angiotensin II receptor blockers, The 14th congress of IATDMCT 2015, 2015 年 10 月 12 日、ロッテルダム (オランダ)

(4) 千田明日菜、向祐志、山下美妃、戸田貴大、梶田絵美、小島雅和、本郷文教、廣上貢、佐藤誠二、Erik Eliasson、Anders Rane、猪爪信夫、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬服用患者における血清中エイコサトリエン類の濃度、第 35 回日本臨床薬理学会学術集会、2014 年 12 月 6 日、ひめぎんホール (愛媛県・松山市)

(5) Asuna Senda, Yuji Mukai, Miki Yamashita, Takaki Toda, Nobuo Inotsume, Development and validation of a new LC-MS/MS method for the quantitation of epoxyeicosatrienoic and dihydroxy-eicosatrienoic acids in human serum, FIP2014, 2014 年 9 月 1 日、バンコク (タイ)

#### 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

##### (4) 研究協力者

山下美妃 (YAMASHITA Miki)