

## 論文の内容の要旨

論文題目「HMG-CoA 還元酵素阻害剤による肝細胞株及び血管内皮細胞における  
遺伝子発現変動の解析」

氏名 森川滋

高齢化社会である日本における死因の2位3位を占めるのは心疾患と脳血管疾患であり、どちらも動脈硬化が原因となって起る血管の病気である。大規模疫学調査より動脈硬化の発症・進展は高脂血症が危険因子であることが分っている。また、血液中の総コレステロール、特に低密度リポ蛋白質(LDL)コレステロールを低下させることにより、動脈硬化を予防することが可能であることが確認されている。

コレステロールは食事によって摂取されるだけでなく、生体内の特に肝臓において合成される。コレステロール及びその合成過程の代謝産物は、生体にとって必須の物質であるが、過剰のコレステロールは動脈硬化を引き起こす原因であるため、一定の濃度に抑制する必要がある。コレステロール生合成の重要な律速酵素として 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA)をメバロン酸に還元する HMG-CoA 還元酵素がある。HMG-CoA 還元酵素を阻害することにより、生体内でのコレステロール合成は抑制される。そして、LDL 受容体は活性化され、血液中の LDL の細胞内への取り込みは促進され、血清総コレステロール値及び LDL コレステロール値を低下させることができる。

HMG-CoA 還元酵素阻害剤は、1973 年のメバスタチンの発見を初めとして開発された高脂血症治療薬である。現在、世界において広くコレステロール代謝異常の是正と動脈硬化の予防、治療に使用され、単一薬剤で1兆円を超えるなど世界最大の市場規模をもつ医薬品となっている。また、各国で90年代から大規模臨床使用の調査が行われ、2つの課題が提起されている。

第一は筋肉障害の副作用である。70年代の開発当初の山本、遠藤らによる使用第一例から、過度のコレステロール合成抑制は筋肉の障害をもたらすことが注目され、HMG-CoA 還元酵素阻害剤の使用は、筋肉障害を起さないレンジに止めることが求められている。しかし、世界での大規模な HMG-CoA 還元酵素阻害剤の使用により横紋筋融解症の発症頻度は6千例に1例程度と推定され、我が国でも毎年各種 HMG-CoA 還元酵素阻害剤で数十名の重症筋肉障害の副作用例が報告されている。

筋肉障害の発症機構は正確には同定されていないが、これまでの研究から筋肉の細胞はコレステロール合成阻害に敏感に反応し、致死性の細胞障害が引き起こされる。しかし筋肉の障害を起さない状態において、肝臓の LDL 受容体を誘導し、血液中の LDL コレステロールを低下させることが可能であることが示されている。そこで、肝細胞において同じ程度のコレステロール合成阻害の濃度で、LDL 受容体遺伝子発現をより誘導できれば、安全で有効性の高いコレステロール代謝制御剤となる可能性がある。

第二は pleiotropic effect(多面的作用)と呼ばれるコレステロール低下以外の作用である。これは最初、HMG-CoA 還元酵素阻害剤の大規模臨床成績の解析においてコレステロール値

の低下から予測される以上に心血管病変のイベント減少が観察され、生存率が延長したところから注目された。HMG-CoA 還元酵素阻害剤の投与により、凝固系の抑制、血管収縮の抑制などに関する遺伝子や蛋白の変動が観察されたことである。しかしこの多面的作用のヒト細胞における全体像は不明であり、また個々の遺伝子変化のメカニズムは不明である。

そこで本研究の目的を、HMG-CoA 還元酵素阻害剤の安全で有用性の高い使用方法の分子生物学基礎を明らかにすることとした。

まず、ヒト培養肝細胞 HepG2 における HMG-CoA 還元酵素及び LDL 受容体 mRNA レベルの変動の正確な測定を、RNase プロテクションアッセイ法を用いて確立した。5 つの HMG-CoA 還元酵素阻害剤を比較し、添加 24 時間後において HMG-CoA 還元酵素の mRNA 量変化についてはプラバスタチン以外の HMG-CoA 還元酵素阻害剤間に差はなかった。一方、LDL 受容体の発現誘導に関して、ピタバスタチンは他の HMG-CoA 還元酵素阻害剤よりも低濃度(0.1  $\mu$ M)から有意に誘導した。また、経時的検討より、ピタバスタチンは他の HMG-CoA 還元酵素阻害剤よりも持続的に LDL 受容体の発現を誘導した。50%コレステロール合成阻害濃度(IC50)の 200 倍濃度では、ピタバスタチンはアトルバスタチン及びシンバスタチンよりも LDL 受容体の発現を有意に誘導した。さらに、ピタバスタチンは他の HMG-CoA 還元酵素阻害剤に比べ mRNA 誘導のみならず、LDL 受容体を活性化していることを、LDL 分解アッセイにより証明した。

次に、HepG2 と血管壁細胞(正常ヒト臍帯血管由来内皮細胞、正常ヒト冠状動脈平滑筋細胞)での、HMG-CoA 還元酵素阻害剤による遺伝子発現の変動を系統的に測定し、多面的作用とよばれる遺伝子変動がどのような細胞において、どのような遺伝子が、いつ、どの程度の変化を起しているかを、DNA マイクロアレー技術を用いて検討した。HMG-CoA 還元酵素阻害剤は血管壁の細胞において、プラスミノゲン活性化阻害因子 1 を抑制し、トロンプモジュリンを誘導することにより抗凝固作用、エンドセリン 1 を抑制し、一酸化窒素合成酵素を誘導することにより血管収縮抑制作用、単球遊走蛋白 1 を抑制することにより抗炎症作用を有することが分った。すなわち、HMG-CoA 還元酵素阻害剤は血管壁細胞の遺伝子発現を変えることにより、臨床的に効果をもたらすことが明らかとなった。また、この効果は HepG2 では観察されず血管壁細胞に特徴的な効果であった。

最後に、血管内皮細胞における網羅的解析より、新たに HMG-CoA 還元酵素阻害剤の作用として見出された Kruppel-like factor 2 (KLF2)の誘導及び pentraxin 3 (PTX3)の抑制について、HMG-CoA 還元酵素阻害剤による制御の分子機構を検討した。KLF2 は血管形成に重要な転写調節因子であり、PTX3 は急性期炎症蛋白である。KLF2 及び PTX3 のピタバスタチンによる変動は、特にガラニルガラニルピロリン酸によって回復した。他の阻害剤を用いた実験よりファルネシルピロリン酸及びゲラニルゲラニルピロリン酸によって修飾される低分子 G 蛋白質が重要であることが示唆された。また、ピタバスタチンによる KLF2 誘導は KLF2mRNA の安定化によるものではなかった。一方、ピタバスタチンは TNF 及び IL1 刺激で誘導される PTX3 を抑制したが、PTX3 の抑制は PTX3mRNA の不安定化による

ものではなく、何らかの蛋白合成を必要とした。

以上の検討により、HMG-CoA 還元酵素阻害剤は肝臓に作用して LDL コレステロールを低下させるだけでなく、血管に作用して遺伝子発現を調節し、動脈硬化を改善することが明らかとなった。今回の研究で示された HMG-CoA 還元酵素阻害剤による遺伝子発現の制御の解明は、有効で安全な治療法開発の基礎として重要であると共に、その分子機構の正確な解明は今後の課題である。