

2005005172A

厚生労働科学研究費補助金

循環器総合研究事業

各種高脂血症治療薬の糖尿病性心血管病

進展予防効果の総合的検討

(臨床研究実施チームの整備)

平成17年度 総括研究報告書

分担研究者 渡邊 裕司

(浜松医科大学医学部教授)

平成18(2006)年 4月

厚生科学研究費補助金
循環器総合研究事業

各種高脂血症治療薬の糖尿病性心血管病進展予防効果の総合的検討

(臨床研究実施チームの整備)

平成17年度 総括研究報告書

分担研究者 渡邊 裕司

平成18(2006)年 4月

目次

I. 総括研究報告者	
プラバスタチン・アトルバスタチンの脂質低下作用と	
薬物トランスポーター遺伝子多型に関する研究	1
渡邊 裕司	

プラバスタチン・アトルバスタチンの脂質低下作用と
薬物トランスポーター遺伝子多型に関する研究
（臨床研究実施チームの整備）

分担研究者：渡邊 裕司（浜松医科大学医学部臨床薬理学講座教授）

研究協力者：中村 玲子（浜松医科大学医学部臨床薬理学講座）

西尾信一郎（浜松医科大学医学部臨床薬理学講座）

影山美智代（浜松医科大学医学部臨床薬理学講座）

内田 信也（静岡県立大学大学院薬学研究科）

後藤真寿美（静岡県立大学大学院薬学研究科）

研究要旨

スタチン系薬物の体内動態や臨床効果の個人間較差の要因に薬物トランスポーターの遺伝的多型性が示唆され、健常人においては organic anion transporting polypeptide C (OATP-C) の遺伝子多型がプラバスタチンの体内動態に影響を及ぼすことが報告された。しかし、高脂血症患者におけるスタチンの臨床効果に及ぼす薬物トランスポーターの遺伝的多型の影響については不明である。また最近の大規模臨床試験の結果から、スタチンは脳血管疾患の抑制作用を有する事が注目されているが、スタチンが脳血流に及ぼす直接作用については多くの点が明らかではない。平成 17 年度は、研究 1 として、浜松医科大学附属病院において文書同意を取得したプラバスタチン投与患者 81 名およびアトルバスタチン投与患者 73 名の計 154 例を対象とし、OATP-C および OATP-B の二つのトランスポーターの遺伝子における SNPs を解析し、これら遺伝子多型がスタチンによるコレステロール低下作用に及ぼす影響について検討した。スタチン投与により総コレステロール及び LDL コレステロールは有意に低下したが、その変化率は OATP-C および OATP-B 遺伝子型間で有意な差は認められなかった。スタチンのコレステロール低下作用の個人差については、他のトランスポーターや他因子の総合的な検討が必要と考えられた。研究 2 では、組織酸素化モニター法を用いた姿勢変化時の脳循環血液量変化の解析可能性について予備的検討を行った。組織酸素化モニター法を用いた血流評価法は、759nm、797nm、833nm の 3 波長のレーザー光を前額部から照射し、その反射光を連続的に測定することにより組織血液量を求める非侵襲的な検査法である。組織酸素化モニター法で測定した脳血液量は臥位、坐位、立位で有意な変化を示し、その変化は静脈血液量ではなく動脈血液量の変化に一致した。測定結果は再現性が高く、また検者間の誤差は出現せず優れた評価法であることが明らかとなり、今後、長期的なスタチン使用による脳血液量変化の追跡に有用な検査法と考えられた。

A. 研究目的

HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）は強力な LDL コレステロール(LDL-C)低下作用を有することから、高脂血症治療の第一選択薬として用いられている。しかし、スタチンのコレステロール低下作用には個人差があることが明らかとなっている。スタチン系薬物の体内動態や臨床効果の個人間較差の要因に薬物トランスポーターの遺伝的多型性が示唆され、健常人においては organic anion transporting polypeptide C (OATP-C) の遺伝子多型がプラバスタチンの体内動態に影響を及ぼすことが報告された。しかし、高脂血症患者における、スタチンの臨床効果に及ぼす薬物トランスポーターの遺伝的多型の影響について不明である。研究 1 では、スタチン投与後の血清脂質値変化と薬物トランスポーター遺伝子多型の関係を解析することを目的とした。また最近の大規模臨床試験の結果から、スタチンは脳血管疾患の抑制作用を有する事が注目されているが、スタチンが脳血流に及ぼす直接作用については多くの点が明らかではない。研究 2 ではスタチンが脳血流に及ぼす直接作用について検討するため、組織酸化モニター法を用い、姿勢変化時の脳循環血液量変化の解析可能性について予備的検討を行った。

B. 研究方法

研究 1 :

浜松医科大学附属病院においてプラバスタチンおよびアトルバスタチンを服用して

いる患者のうち、スタチン服用開始時の情報がカルテより得られ、かつ服用開始時のスタチンがプラバスタチンまたはアトルバスタチンであった患者で、文書による同意が得られた 154 名（男性；85 名、女性；69 名、年齢；31～84 歳）を対象とした。対象患者より採血を行い（薬剤服用後 12 時間から 24 時間後）、OATP-C (*1a, *1b, *5, *15) および OATP-B (C1457T) を解析した。DNA は DNA Extractor WB Kit を用いて抽出した。カルテより対象患者の血清脂質値、腎・肝機能検査値、併用薬等を調査した。本研究は浜松医科大学倫理委員会の承認を得て施行した。

1-1) OATP-C (A388G および T521C) の genotyping

対象患者の末梢血より抽出した DNA を用いて、OATP-C の A388G と T521C の解析を、Nozawa らの報告に従い制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP) 法または Allele-specific PCR 法により行った。

1-2) OATP-B (C1457T) の genotyping

対象患者の末梢血より抽出した DNA を用いて、OATP-B*3 (C1457T) の解析を Nozawa らの報告に PCR-RFLP 法により行った。

1-3) 統計解析

データは平均値±標準偏差で表示した。スタチン服用前および服用 1、3、6 と 12 ヶ月後の血清脂質値および脂質変化率の統計学的有意差検定には Friedman test を用い、危険率 5%未満であった場合 Dunn' s test を用いて危険率 5%未満を有意差ありと判定した。また遺伝子型間の脂質変化率の統計

学的有意差検定には、2群の場合は Mann-Whitney U-test を、3群以上の場合は Kruskal-Wallis test をそれぞれ用いて危険率 5%未満を有意差ありと判定した。

研究 2:

組織酸素化モニター法を用い、姿勢変化時の脳循環血液量変化の解析が可能かについて予備的検討を行った。組織酸素化モニター法を用いた前額部脳血液量評価は、浜松ホトニクス製 TRS-10 を用い 759nm、797nm、833nm の 3 波長のレーザー光を体表面から照射し、その反射光を連続的に測定することにより組織血液量を求める非侵襲的な検査法である。文書同意を取得した 8 人の健康人を対象とし、前額部にプローブをあて臥位、坐位、立位、坐位、臥位の姿勢変化時の前額部脳血液量変化を測定した。

C. 研究結果

研究 1:

C1-1) 対象患者のプラバスタチンおよびアトルバスタチン服用開始時の背景

対象患者の遺伝子検体採集時の背景を図 1 に示す。

C1-2) 対象患者の OATP-C および OATP-B の遺伝子型 (図 2)

OATP-C については OATP-C*1b/*1b (34.4%) と OATP-C*1a/*1b (33.8%) がほぼ同数で頻度が高く、OATP-C*1b/*15、OATP-C*1a/*1a、OATP-C*1a/*15 と続いた。OATP-C*5 allele をもつ患者は認められなかった。OATP-B(C1457T)については、C/C が 45.5%、C/T が 49.4%、T/T が 5.2%であった。

C1-3) OATP-C 遺伝子型におけるプラバスタチンおよびアトルバスタチンによる TC 値の変化 (図 3)

体重当たりの投与量で補正したプラバスタチン服用患者およびアトルバスタチン服用患者の総コレステロール低下率は、OATP-C の遺伝子型間で有意な差を認めず、補正しない場合でも同様であった。

C1-4) OATP-C 遺伝子型におけるプラバスタチンおよびアトルバスタチンによる LDL-C 値の変化 (図 4)

体重当たりの投与量で補正したプラバスタチン服用患者およびアトルバスタチン服用患者の LDL-コレステロール低下率は、OATP-C の遺伝子型間で有意な差を認めず、補正しない場合でも同様であった。

C1-5) OATP-C 遺伝子型におけるプラバスタチンおよびアトルバスタチン投与後の TC 値の経時的変化 (図 5)

スタチン服用開始前、服用後 1、3、6 および 12 ヶ月の TC 値を全て測定していた患者のこれら時点での TC 変化率 (% change/dose(mg/kg b.w.)) は、プラバスタチンおよびアトルバスタチン服用 1 ヶ月ではほぼ一定の状態に達した。プラバスタチンおよびアトルバスタチン服用 1、3、6 および 12 ヶ月後において、TC 変化率は OATP-C 遺伝子間で有意な差は認められなかった。

C1-6) プラバスタチンおよびアトルバスタチン服用 12 ヶ月後の TC 変化率 (図 6)

プラバスタチン服用 12 ヶ月後の TC 変化率 (% change/dose(mg/kg b.w.)) は、OATP-C 遺伝子型間で有意な差異は認められなかつ

た ($p = 0.1679$, Kruskal-Wallis test)。アトルバスタチン服用 12 ヶ月後の TC 変化率 (% change/ dose (mg/kg b.w.)) においても、OATP-C 遺伝子型間で有意な差異は認められなかった ($p = 0.2814$, Kruskal-Wallis test)。

C1-7) OATP-B 遺伝子多型の影響 (図 7)

プラバスタチンおよびアトルバスタチン服用 1、3、6 および 12 ヶ月後において、TC および LDL-C 変化率は OATP-B 遺伝子間で有意な差は認められなかった。さらに OATP-C が *1b/*1b であり、スタチン服用開始前、服用後 1、3、6 および 12 ヶ月の TC 値を全て測定していた患者を抽出し、TC 変化率 (% change/ dose (mg/kg b.w.)); スタチン一日投与量と体重で補正した TC 変化率) を OATP-B genotype 別に解析したが、TC 変化率 (% change/ dose (mg/kg b.w.)) は、OATP-B 遺伝子間で有意な差は認められなかった。

研究 2 :

組織酸素化モニター法で測定した脳血液量は臥位、坐位、立位で有意な変化を示し、その変化は静脈血液量ではなく動脈血液量の変化に一致した。測定結果は再現性が高く、また検者間の誤差は出現せず優れた評価法であることが明らかとなり、今後、長期的なスタチン使用による脳血液量変化の追跡に有用な検査法と考えられた。

D. 考察

本研究では、OATP-C および OATP-B の二つのトランスポーターの遺伝子における SNPs を解析し、これら遺伝子多型がプラバスタチ

ンおよびアトルバスタチンのコレステロール低下作用に及ぼす影響を検討した。

対象患者において OATP-C*5 allele を持つ患者は全く認められなかったが、これまでの報告においても日本人における OATP-C*5 allele 頻度は低く同様の結果が得られたと考えられる。OATP-C*5 allele の頻度は European-American において 14 % と比較的高く、人種間で allele 頻度が異なることが示されている。

対象患者のうちスタチン服用開始前および服用 1、3、6 と 12 ヶ月後の TC および LDL-C を全て測定していた患者を OATP-C および OATP-B の遺伝子型で分けたところ、症例数の少なさから有意な変化が認められなかった遺伝子型もあるが、全体として服用 1 ヶ月後には TC および LDL-C は顕著に低下した。スタチンの一日投与量と体重で補正した TC 低下率 (%/ dose (mg/kg b.w.)) と LDL-C 低下率 (%/ dose (mg/kg b.w.)) の経時変化は、OATP-C および OATP-B のいずれの遺伝子型も服用 1 ヶ月以降ほぼ一定の状態に達したが、OATP-C および OATP-B の遺伝子型間で有意な差異は認められなかった。スタチン服用 12 ヶ月後の TC 変化率 (%/ dose (mg/kg b.w.)) を OATP-C および OATP-B の各遺伝子型別に示したが、同遺伝子型でも個人差が大きく、遺伝子型間で統計的に有意な差は認められなかった。そこで、OATP-C の遺伝子型が同一の患者において OATP-B の遺伝子型の影響を検討した。OATP-C が *1b/*1b である患者における OATP-B 遺伝子型別の TC 低下率 (%/ dose (mg/kg b.w.))

の経時変化は、プラバスタチンを服用している OATP-B*3/*3 の患者およびアトルバスタチンを服用している OATP-B*1/*3 の患者では OATP-B*1/*1 の患者と比較し低い推移を示したが、遺伝子型間で有意な差は認められなかった。スタチン服用 12 ヶ月後の TC 変化率 (%/dose (mg/kg b.w.)) を OATP-B の遺伝子型別に個々の患者ごと示したが、OATP-B*3 allele を持つことで TC 低下率が低くなる傾向があるが有意な差は認められなかった。これまでに、ヒトにおいて OATP-C 遺伝子の多型がプラバスタチンの薬物動態に影響を及ぼすことがいくつか報告されている。OATP-C*15 allele を持つ被験者ではプラバスタチンの非腎クリアランスが低下し血中薬物濃度時間曲線下面積 (area under the blood concentration-time curve; AUC) が高くなること、また、OATP-C*1b allele を持つ被験者ではプラバスタチンの AUC が低下し OATP-C*5 allele を持つ被験者では上昇することが示されている。さらに、OATP-C*15B allele または OATP-C*17 allele を持つ被験者ではプラバスタチンの AUC が上昇することも報告されており、OATP-C の T521C (OATP-C*5 allele または OATP-C*15 allele) 多型はプラバスタチンの肝取り込みの低下に、OATP-C の A388G (OATP-C*1b allele) 多型はプラバスタチンの肝取り込みの促進にそれぞれ関与している可能性が示唆されている。肝臓はスタチンの標的臓器であるため、スタチンの肝取り込みが変化することでスタチンの肝内濃度も変化しコレステロール低下効果に影響を及ぼす可能性

が考えられる。このような背景のもと、本研究ではこれら OATP 遺伝子の多型がスタチンのコレステロール低下作用に及ぼす影響を検討したが、上述のように OATP-C および OATP-B の遺伝子型によりコレステロール低下作用に有意な差は認められなかった。

脳血液量変化を測定するために研究 2 では、近赤外光による組織酸素化モニター (TRS) 法を用いた。TRS 法は、時間応答関数を測定するために、時間相関単一光子計数法を採用している。昨年度の研究から、非侵襲的かつ連続的に生体組織内のオキシヘモグロビン、デオキシヘモグロビン、全ヘモグロビン量の絶対量変化が測定可能である事が明らかであり、今年度研究では全ヘモグロビン量が血液量に相関することを利用し、全ヘモグロビン量の変化を血液量変化の指標とした。光ファイバーに結ばれた測定プローブ (3 x 5 cm, 重さ 30g) を前額部に装着するのみで脳血液量の変化が、リアルタイムで測定可能であった。また TRS 法は姿勢変化時の脳血液量の変化が検知でき、ダイナミックな状態での脳血流を解析する事が可能であった。最近の多くの大規模臨床試験から、スタチンには脳血管イベントを抑制する作用がある事が示されている。スタチンの持つ動脈硬化進展抑制作用がその要因と思われるが、その他に多面的作用として血管内皮機能の改善作用などが関与する事も示唆される。スタチン投与による脳循環の変化を長期に観察した報告は未だなく、今後、TRS 法を用いて、静的な状態ばかりでなく姿勢変化時のダイナミッ

クな脳血液量の変化も長期的に観察する事により、スタチンの有する脳血管イベント抑制作用の機序の一端が解明されることが期待される。

E. 結論

本研究では、OATP-C および OATP-B の二つのトランスポーターの遺伝子多型を解析し、これら遺伝子多型のプラバスタチンおよびアトルバスタチンのコレステロール低下作用に及ぼす影響を検討した。プラバスタチンおよびアトルバスタチンのコレステロール低下作用の個人差に及ぼす因子は OATP-C および OATP-B の遺伝子多型だけでは説明ができず、他のトランスポーターや薬物代謝酵素、薬物受容体などの遺伝子解析や、他因子の影響を総合的に評価する必要があると考えられた。スタチンの脂質低下作用については個体間差が大きい。本研究調査でも総コレステロール値は、プラバスタチン投与群で平均 17.8%、アトルバスタチン投与群で平均 28%低下するが、一方、プラバスタチン投与群の 14%、アトルバスタチン投与群の 8%は有意なコレステロール値の低下を認めない無効例である。これら無効例には当然、スタチンへの服薬アドヒランスが低下した症例が含まれるが、中にはきちんと内服しても脂質低下作用が認められない真の無効例も存在すると思われる。スタチンの反応例、無効例を対象にして、スタチンの薬剤応答を予測する遺伝子マーカーを構築することも今後の本研究の重要な課題と考えられる。

さらに組織酸素化モニター法により非侵

襲的に脳循環血液量変化の解析が可能であった。大規模臨床試験で示されるスタチンの脳血管保護作用の機序の一端を明らかにするために、今後、組織酸素化モニター法を用いて長期的なスタチン使用による脳血液量の変化を追跡調査することも興味深い課題と思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nishio S., Watanabe H., Uchida S., Hayashi H., Ohashi K.: Interaction between amlodipine and simvastatin in patients with hypercholesterolemia and hypertension. *Hypertension Research* 28: 223-227, 2005.

2) 内田信也、渡邊裕司、後藤真寿美、前田利男、橋本久邦、中野眞況、大橋京一: HMG-CoA 還元酵素阻害薬 Pravastatin 服用患者におけるリスクファクターと血清脂質値に関する調査. *臨床薬理* 36: 81-87, 2005.

2. 学会発表

1) S. Uchida, H. Watanabe, S. Misaka, M. Goto, H. Katoh, H. Satoh, H. Terada, I. Ieiri, H. Hayashi, Y. Sugiyama, S. Yamada, K. Ohashi: Influences of Genetic Polymorphism of OATP-C on Cholesterol Lowering Effects of Pravastatin and Atorvastatin. 13th NA ISSX Meeting/ 20th

JSSX Meeting, 2005 October. (Hawaii, USA)

2) S. Uchida, H. Watanabe, M. Goto, T. Maeda, H. Hashimoto, M. Nakano, K. Ohashi: Risk factors of the patients given HMG-CoA reductase inhibitors in Japan. 2nd Pharmaceutical Sciences World Congress, 2004 June (Kyoto).

3) S. Uchida, H. Watanabe, M. Goto, H. Katoh, H. Satoh, H. Terada, I. Ieiri, S. Yamada, Y. Sugiyama, H. Hayashi, K. Ohashi: Influences of genetic polymorphisms of OATP-C on cholesterol lowering effects of pravastatin and atorvastatin. 12th Annual Meeting of Pacific Rim Association for Clinical Pharmacogenetics, Kyoto, Japan, 17-18 Apr. 2005

4) R. Takahashi, S. Uchida, H. Katou, H. Satoh, H. Hayashi, K. Ohashi, H. Watanabe
Influence of Genetic Polymorphisms of OATP-C on Cholesterol Lowering Effects of Pravastatin

第 70 回記念日本循環器学会総会 (2005 年 名古屋)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

採血時における対象患者の背景

	Pravastatin	Atorvastatin
例数	81	73
男/女	40 / 41	45 / 28
年齢 (歳)	68.9±9.5	63.1±9.6
体重 (kg)	58.8±9.9	63.8±11.7
BMI (kg/m ²)	23.6±3.0	24.7±3.4
一日投与量 (mg)	9.3±3.1	11.8±7.0
投与期間 (年)	4.5±4.2	4.6±3.8

平均値±SD

図 1

対象患者のOATP-CおよびOATP-Bの遺伝子型

	Pravastatin	Atorvastatin
OATP-C		
*1a/*1a	8 (11.0 %)	8 (9.9 %)
*1a/*1b	27 (37.0 %)	25 (30.9 %)
*1a/*15	9 (12.3 %)	5 (6.2 %)
*1b/*1b	21 (28.8 %)	32 (39.5 %)
*1b/*15	7 (9.6 %)	10 (12.3 %)
*15/*15	1 (1.4 %)	1 (1.2 %)
OATP-B (C1457T)		
C/C	33 (40.7 %)	37 (50.7 %)
C/T	42 (51.9 %)	34 (46.6 %)
T/T	6 (7.4 %)	2 (2.7 %)

図 2

OATP-C遺伝子型におけるプラバスタチンとアトルバスタチンによる総コレステロールの変化率

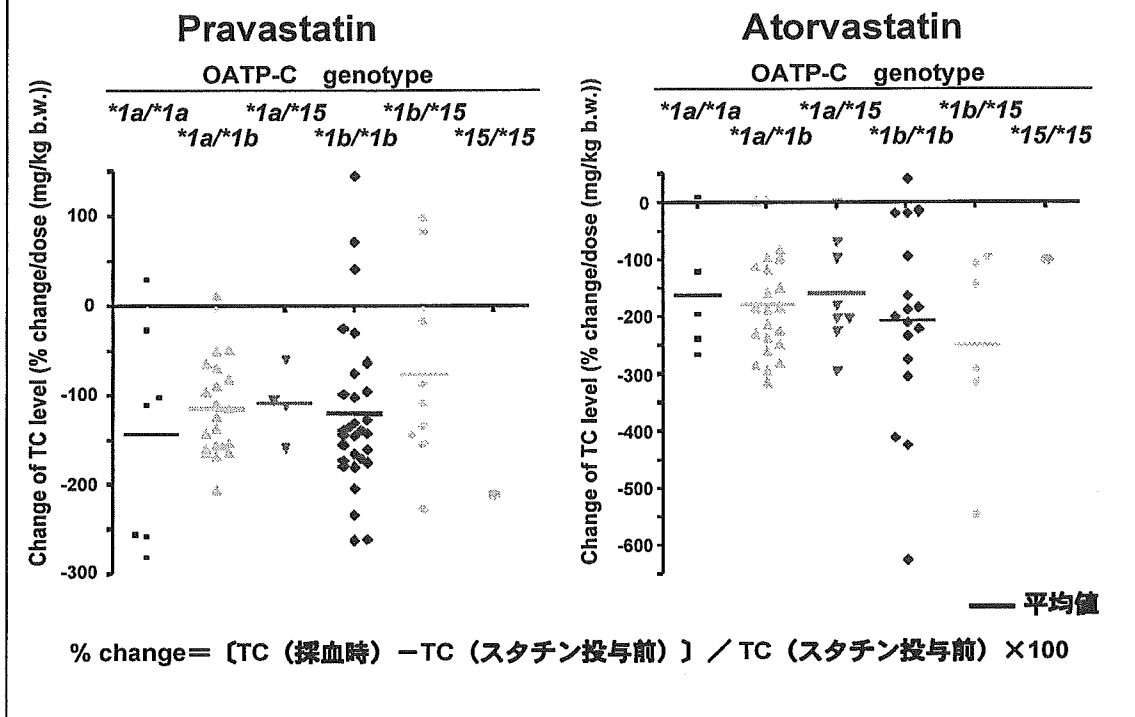


図 3

OATP-C遺伝子型におけるプラバスタチンとアトルバスタチンによるLDLコレステロールの変化率

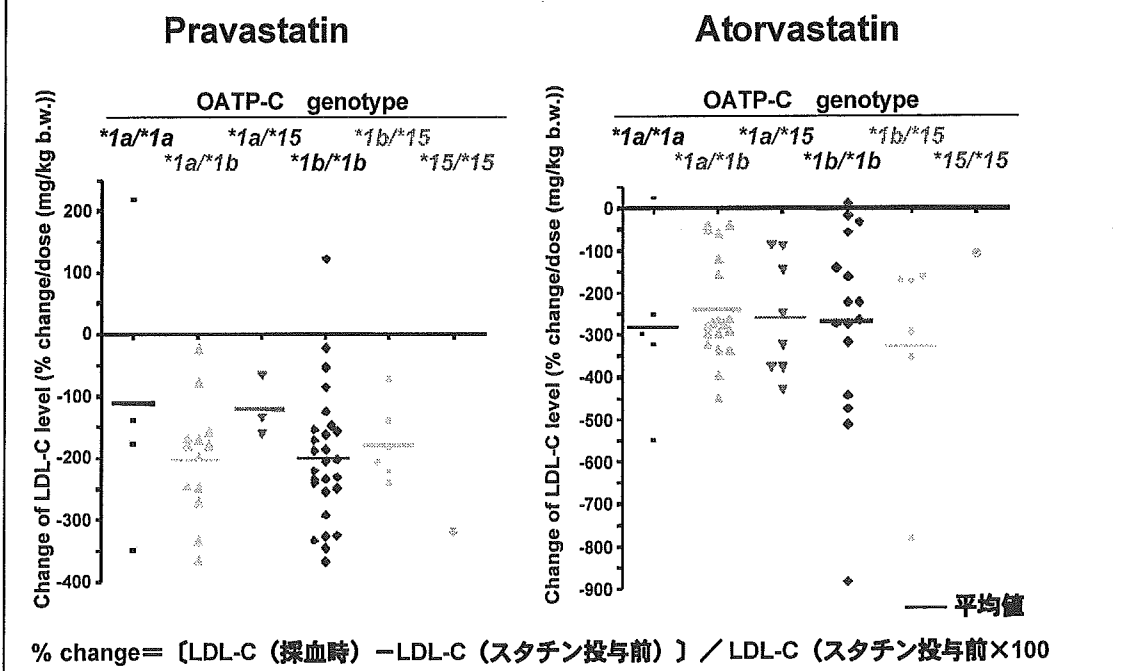


図 4

プラバスタチンとアトルバスタチンによる総コレステロール変化率の経時変化

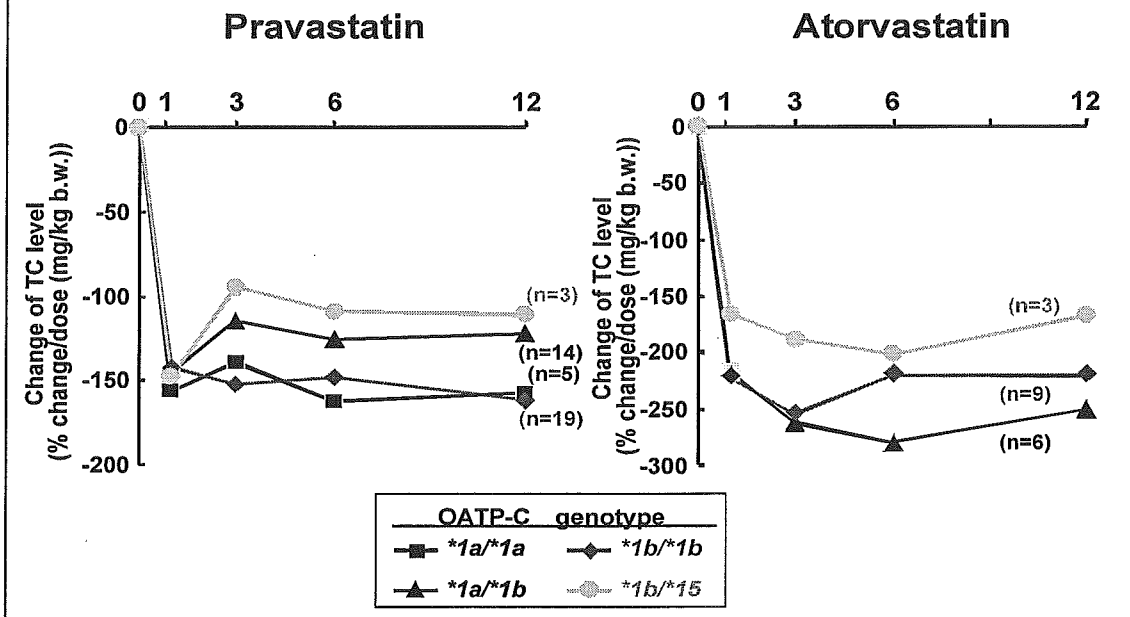


図 5

プラバスタチンとアトルバスタチン投与後 12ヶ月における総コレステロール変化率

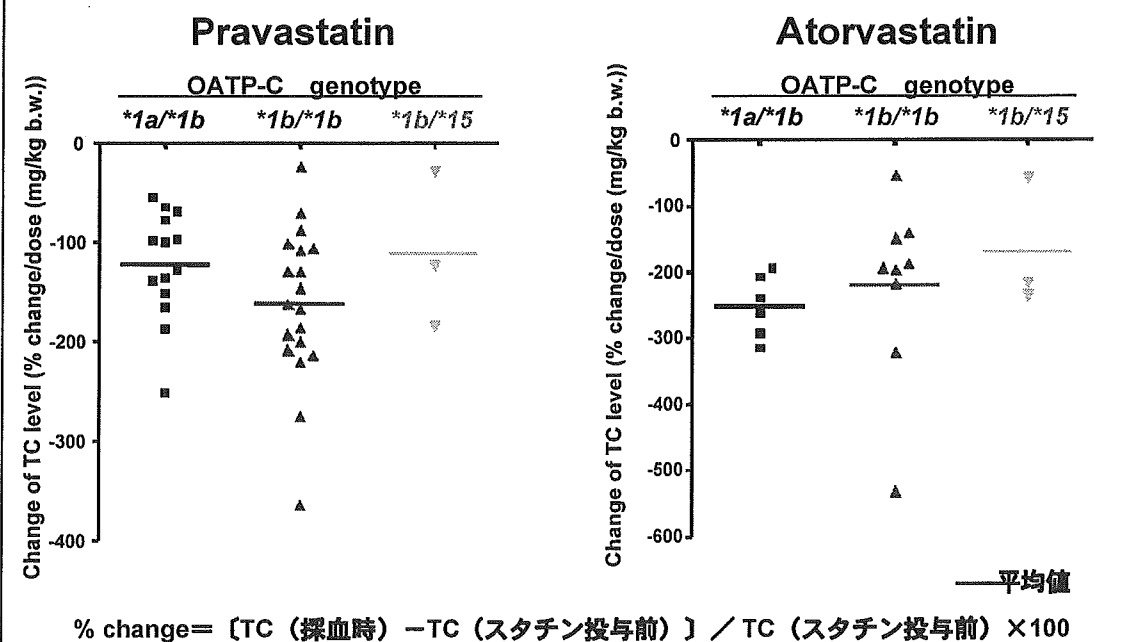


図 6

OATP-C*1b/*1bを有する患者におけるプラバスタチン とアトルバスタチンの総コレステロール変化率に及ぼす OATP-B (C1457T) 遺伝子多型の影響

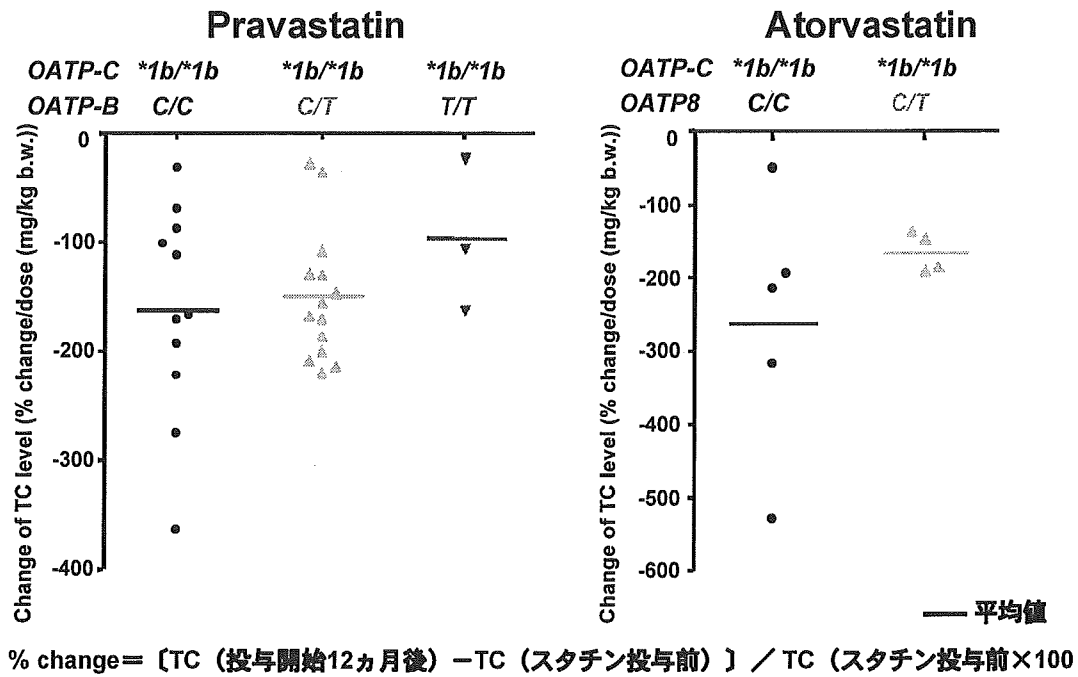


図 7