

## Pharmacological and molecular-biological researches for the generation of new lipid modifying agents

増田, 裕介

<https://hdl.handle.net/2324/1959197>

---

出版情報 : Kyushu University, 2018, 博士 (創薬科学), 論文博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (2)

## Pharmacological and molecular-biological researches for the generation of new lipid modifying agents

### 脂質改善薬の創製に向けた薬理学および分子生物学的研究

増田 裕介

血中の脂質異常は、心筋梗塞や脳梗塞などの重篤な動脈硬化性疾患の発生リスクとなることから、脂質改善薬の創出はその予防に貢献する。PCSK9はLDL受容体(LDL-R)の分解を誘導する働きを持つ分泌タンパク質であり、その阻害はLDL-Rの発現量を高めることで、LDL-コレステロール(LDL-C)を低下させる。近年、臨床試験にてPCSK9に対する中和抗体が強力なLDL-C低下能を持つこと、および心血管イベントの発生を抑制することが示されたことから、抗PCSK9抗体は脂質異常症の新たな治療選択肢として期待されている。一方で、抗体医薬品の問題点として動物細胞における生産にコストを要することと、それに付随して薬価が高額となることが挙げられ、抗PCSK9抗体に関しても薬価の高さが問題視されている。この点に関して、大腸菌によるタンパク質の生産は動物細胞に比べて低コストでの生産が可能であることから、大腸菌において発現可能なPCSK9阻害剤を開発することができれば、その臨床的価値は高いと考えられる。またGPR109Aは主に脂肪細胞に発現するGタンパク質共役受容体で、その活性化は脂肪組織における中性脂肪(TG)水解を抑制し、血中に流出する遊離脂肪酸(NEFA)を低下させる。脂肪組織から流出したNEFAは肝臓におけるTG合成の基質となることから、GPR109Aの活性化は血中TG低下を誘導する可能性があると考えられるが、この点について今日までに相反する結果が報告されており、「GPR109Aの活性化がTG低下を誘導するか否か」統一された見解が存在しない。

本研究では、新規脂質改善薬を創製することを究極の目的として、第1に大腸菌で発現可能な抗PCSK9抗体代替バイオリジクス、DS-9001aの作製とその薬理評価を行った。第2にDS-9001aと既存の薬剤との併用効果についての検証、および他の脂質改善薬との薬効比較を行った。また第3に抗PCSK9抗体療法において、心血管イベント抑制効果を最大化するための投与スケジュールの設定に向けて、コレステロール低下パターンが動脈硬化病変形成に与える影響を解析した。さらに、第4にGPR109AがTG低下を誘導するか否か、GPR109Aを過剰発現するラットを作製し検証を行った。

#### 1) 抗PCSK9抗体代替バイオリジクス、DS-9001aの作製

アンチカリンは可変可能なループ領域を有し、ループ領域に変異を導入することで、抗体に類似の標的の特異性を持たせることができる人工タンパク質である。また、Affibody社が開発したアルブミン結合ドメイン(ABD)は、特定のタンパク質に融合させることで、そのタンパク質の血中半減期を延長させることができる技術である。アンチカリンおよびABDは大腸菌にて発現可能であることから、PCSK9を認識するアンチカリンとABDとの融合タンパク質は、大腸菌にて発現可能な抗PCSK9抗体代替バイオリジクスになり得ると考えられた。

そこで本研究では、ファージディスプレイ法を用いてPCSK9に強く結合するアンチカリンを作製し、そのC末端にABDを融合させた人工タンパク質、DS-9001aを作製した。in vitroの実験において、DS-9001aはPCSK9とLDL-Rとの結合を阻害し、PCSK9によるLDL-Rの分解誘導を抑制することが認められた。in vivoにおいても、DS-9001aはPCSK9によるLDL-Rの分解誘導を抑制し、LDLの血中からのクリアランスを促進することが確認された。さらにカニクイザルにおいて最大62.4%のLDL-C低下を誘導し、このときLDL-Cの低下作用は投与21日後まで持続することが確認された。DS-9001aのヒトにおける薬理プロファイルおよ

び安全性については更なる検証が必要ではあるものの、DS-9001a は大腸菌で発現可能な新規抗 PCSK9 抗体代替バイオリジクスになり得ることが示唆された。

## 2) DS-9001a とスタチンの併用効果、および CETP 阻害剤との薬効比較

スタチンはコレステロール生合成の律速酵素 HMG-CoA 還元酵素の阻害剤で、血中 LDL-C を低下させる薬剤として広く使用されている。スタチンは LDL-R と PCSK9 の転写を誘導することから、スタチンと PCSK9 阻害剤には併用効果があると考えられる。そこで DS-9001a がスタチンとの間に併用効果を持つか調べるため、それぞれの単剤投与、および併用投与時の肝臓 LDL-R の発現量、および脂質改善作用を比較した。その結果、DS-9001a により誘導される肝臓 LDL-R 発現量の上昇が、アトルバスタチンとの併用投与時には増強することが確認された。加えて non-HDL-コレステロール (non-HDL-C) の低下度も併用時には DS-9001a、およびアトルバスタチンをそれぞれ単剤で投与したときと比べて大きくなることが確認された。これらの結果から、DS-9001a とアトルバスタチンとの間には併用効果があることが示唆された。

CETP は HDL 中のコレステロールと VLDL、LDL 中の TG を交換する活性を持つタンパク質で、CETP 阻害剤は LDL-C を低下させ、HDL-C を増加させる。特に近年の大規模臨床試験の結果から、CETP 阻害剤による心血管イベントの抑制には LDL-C 低下作用が寄与すると考えられている。ここで、CETP 阻害剤は脂質改善作用のメカニズムがスタチンと異なるために、CETP 阻害剤とスタチンを併用した場合には相加効果があると推定されることから、DS-9001a と CETP 阻害剤であるアナセトラピブのスタチン併用時の脂質改善作用を比較した。その結果、アナセトラピブとアトルバスタチンを併用投与した時には、それぞれを単剤で投与したときと比べてより大きな non-HDL-C の低下が確認された。一方で、アナセトラピブとアトルバスタチンの併用投与と比べて、DS-9001a とアトルバスタチン併用投与はより強力に non-HDL-C を低下させることが確認された。また LDL の酸化体である ox-LDL は、LDL と比較してより動脈硬化惹起性の強いリポタンパク粒子である。DS-9001a の単剤投与群では血漿 ox-LDL の低下が認められ、アトルバスタチンとの併用群では更なる低下が確認されたさらに、以上の結果から、DS-9001a の方がアナセトラピブに比べて魅力的な脂質改善作用を持つことが示唆された。

## 3) コレステロール低下パターンが ApoE 欠損マウスの動脈硬化病変形成に与える影響

抗 PCSK9 抗体エボロクマブは 140 mg を二週に一回投与する処方と、420 mg を月に一回投与する処方承認されている。これまでの臨床試験の結果から、前者では LDL-C の最大低下が持続するのに対し、後者では LDL-C の最大低下が次回投与まで持続しないためにシーソー型の LDL 低下パターンを示すことがわかっている。しかしながら、この LDL-C の低下パターンの違いが心血管イベントの抑制効果に差をもたらすかどうかについては現状明確な答えがない。そこで陰イオン交換樹脂であるコレステラミンを用いて、持続型およびシーソー型のコレステロール低下パターンを動脈硬化モデルマウス ApoE 欠損マウスにて再現し、コレステロール低下パターンの違いが動脈硬化病変形成に与える影響を解析した。その結果、持続型のコレステロール低下パターンの方が、シーソー型のコレステロール低下パターンに比べて、動脈硬化病変形成を抑制することが確認された。また、コレステロールの濃度時間曲線下面積が動脈硬化病変面積と相関したことから、動脈硬化病変形成を抑制するには、コレステロールの持続的な低下が重要であることが示唆された。この結果から、抗 PCSK9 抗体療法においては、持続的に LDL-C 値を低下させられる処方にて投薬することが心血管イベントの抑制に対して効果的であると思われる。

#### 4) ヒト GPR109A 過剰発現ラットにおける血漿中性脂肪低下

今日までに GPR109A の活性化が血中の NEFA 低下を誘導することは広く認められている一方で、GPR109A が TG 低下を誘導するかに関しては相反する報告があり、統一された見解が存在しない。本研究では、ヒト GPR109A を含むバクテリア人工染色体 (BAC) を染色体に挿入したトランスジェニックラット (Tg ラット) を作製し、GPR109A の活性化が TG 低下につながるかどうか検証を行った。その結果、Tg ラットでは野生型ラットに比べて、NEFA および TG が低値を示したことから、GPR109A の活性化が TG 低下につながる可能性が示唆された。

本研究から、DS-9001a は大腸菌で発現可能な抗 PCSK9 抗体代替バイオロジクスとして、脂質異常症の新たな治療選択肢になる可能性が示唆された。今日までに大腸菌で発現可能な人工タンパク質で、抗体に匹敵する薬理作用と半減期を達成したバイオ医薬品は報告されていないことから、DS-9001a の創製は非常に価値が高いと考えられる。さらに本研究において、持続型のコレステロール低下はシーソー型のコレステロール低下に比べて動脈硬化病変の形成を抑制することが示唆された。本結果は、コレステロール低下療法において心血管イベント抑制効果を最大化するための薬剤投与プロトコールの決定に貢献できるものと考えられる。また本研究により、GPR109A の活性化は TG 低下につながることを示唆された。本結果は新規 TG 低下剤の開発に繋がるものと考えられる。今後本研究に基づき、脂質改善薬の創製および脂質異常症患者の治療法が発展することが期待される。

#### 【発表論文】

- 1 Masuda Y\*, Yamaguchi S\*, Suzuki C, Aburatani T, Nagano Y, Miyauchi R, Suzuki E, Yamamura N, Nagatomo K, Ishihara H, Okuno K, Nara F, Matschiner G, Hashimoto R, Takahashi T., and Nishizawa T, J Pharmacol Exp Ther, 2018, 365: 368-378. \*equal contribution.
- 2 Masuda Y, Yamaguchi S., and Nishizawa T., J Pharmacol Sci, 2016, 132: 271-274.
- 3 Masuda Y, Kurikawa N., and Nishizawa T., Atherosclerosis, 2018, 272: 182-192.