

原 著

Apo-E KO (ApoE^{-/-}) マウスにおける Ezetimibe の 抗動脈硬化作用

¹⁾ 獨協医科大学内科学 (内分泌代謝)

²⁾ 獨協医科大学薬理学

助川 敦子¹⁾ 内田 幸介²⁾ 城島 輝雄¹⁾

要 旨 Apo-E KO マウス (ApoE^{-/-}) を用いて, コレステロール吸収阻害薬の ezetimibe (EZ) と HMG-CoA reductase 阻害薬の fluvastatin (Fluva) の動脈硬化形成に与える影響について検討した。

高脂肪食負荷 ApoE^{-/-} マウスでは EZ の投与により, 総コレステロールおよび LDL コレステロールをそれぞれ 63%, 74% 減少させ, 胸部大動脈のプラーク形成を明らかに抑制するとともに, 内皮依存性の血管弛緩反応を有意に改善した。一方, Fluva 投与ではその効果が認められなかった。また, EZ 投与は monocyte chemoattractant protein-1, vascular cell adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1 などの白血球走化・接着因子や NADPH oxidase コンポーネントの肺組織中 mRNA 発現を有意に抑制した。

高脂肪食負荷 ApoE^{-/-} マウスにおいて, EZ は明らかな抗動脈硬化作用を示した。

Key Words : エゼチミブ, 抗動脈硬化作用, 高脂肪食 APO-E KO (ApoE^{-/-}) マウス, 酸化ストレス, 血管内皮障害

緒 言

脂質異常症は, 高血圧・糖尿病などとともに脳卒中・冠動脈疾患などの脳・心血管イベントの重要な危険因子である¹⁾。その中でも, 最も重要な因子の一つが脂質異常症であり, 特に高 LDL コレステロール (LDL-C) 血症である。高コレステロール血症は主に, 肝臓でのコレステロール合成と食事性, 胆汁中のコレステロールの小腸からの吸収からもたらされ, コレステロール, 特に劣化 (酸化) コレステロールが食事に多く含まれると, 動脈硬化が進展することが知られている²⁾。近年, 小腸上皮に発現するコレステロール輸送体 Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) がクローニングされ, その阻害薬である Ezetimibe (EZ) が臨床に導入された^{3,4)}。EZ は脂質プロファイルを強力に改善する可能性を秘めているとされているものの, HMG-CoA reductase 阻害薬 (sta-

tin) と比較する報告は少なく, また, EZ の脂質代謝改善作用以外の pleiotropic effect についての報告も少ない。そこで今回著者らは, 動脈硬化症モデルである高脂肪食負荷 ApoE^{-/-} マウスを用いて, EZ と Fluva の動脈硬化形成に与える影響について検討した。

方 法

実験動物と食餌

5 週齢の雄性 ApoE^{-/-} マウス (Taconic Transgenic Modeles Apolipoprotein E Knockout mouse) (20 匹) と対照として雄性同齢の C57/B16 マウス (5 匹) を用いた。対照マウスは通常食 (CRF-1), ApoE^{-/-} マウスは high cholesterol (7.5% cocoa butter fat, 1.25% cholesterol, 7.5% casein, 0.5% sodium cholate) diet (Oriental Yeast Co, Tokyo, Japan) 負荷を 4 ヶ月施行した。この間, 水と餌の摂取は自由に行わせた。ApoE^{-/-} マウスは, 高脂肪食単独負荷 (ApoE^{-/-}) 群, それに加えて EZ (5 mg/kg/day) を tube にて経口投与した +EZ 群, Fluva (10 mg/kg/day) をボトル中の飲水に溶解し連日投与した +Fluva 群, EZ と Fluva 両薬剤を投与した +EZ/Fluva 群の 4 群に分けて飼育した。4 ヶ月後, フォ

平成 23 年 8 月 8 日受付, 平成 23 年 9 月 12 日受理
別刷請求先: 助川敦子

〒 321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880
獨協医科大学 内科学 (内分泌代謝)

表 1 対照マウスおよび高脂肪食負荷 ApoE^{-/-} マウス各群における血清脂質の変化

	Cont	ApoE ^{-/-}	+EZ	+Fluva	+EZ/Fluva
T-C	93±2.8 ^c	2005±220	753±72 ^c	1731±152	1037±177 ^b
LDL-C	28±9.6 ^c	482±75	124±4.2 ^c	434±72	251±60 ^a
TG	106±49	31±21	103±94	40±32	34±23

単位 mg/dl, ^ap<0.05, ^bp<0.01, ^cp<0.005 vs ApoE^{-/-} n = 4 Mean ± SE

表 2 対照マウスおよび高脂肪食負荷 ApoE^{-/-} マウス各群における MCP-1, VCAM-1 および ICAM-1 の遺伝子発現

	Cont	ApoE ^{-/-}	+EZ	+Fluva	+EZ/Fluva
MC-1	1.10±0.49	3.36±0.47	0.80±0.42 ^b	1.52±0.70 ^a	1.11±0.55 ^b
VCAM-1	1.05±0.30	2.13±0.30	1.04±0.53 ^a	1.30±0.46	1.57±0.60
ICAM-1	0.63±0.60	1.69±0.42	0.65±0.19 ^a	0.67±0.42	1.05±0.43

GAPDH mRNA に対する比 1, ^ap<0.05, ^bp<0.01 vs ApoE^{-/-} n = 3 Mean ± SE

表 3 対照マウスおよび高脂肪食負荷 ApoE^{-/-} マウス各群における NADPH oxidase コンポーネントの遺伝子発現

	Cont	ApoE ^{-/-}	+EZ	+Fluva	+EZ/Fluva
gp91 ^{phox}	1.97±0.60	4.29±1.00	2.02±0.68 ^a	4.75±1.10	2.27±0.63
p67 ^{phox}	0.36±0.01	0.87±0.06	0.37±0.04 ^b	0.65±0.30	0.71±0.21
p47 ^{phox}	1.06±0.4	2.45±0.57	1.29±0.18 ^a	2.18±0.95	1.97±0.05

GAPDH mRNA に対する比, ^ap<0.05, ^bp<0.01 vs ApoE^{-/-} n = 3 Mean ± SE

ーレンの吸入麻酔により鎮静後, ネンプタールを腹腔内投与した後, 非空腹時の採血を行い, 胸部大動脈, 肺を摘出した。摘出した胸部大動脈は Krebs-Henseleit 液 (120 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 5.5 mM glucose, pH 7.4) にて保存した。総コレステロール (T-C), LDL-C および中性脂肪 (TG) は, 酵素法にて autoanalyzer で測定した。肺は遺伝子発現の検討のため, 洗浄後, 液体窒素にて直ちに凍結保存した。尚, 本研究は獨協医科大学動物実験指針に基づいて行われた。

内皮依存性の血管弛緩反応の測定

血管内皮機能に関しては, アセチルコリン (Ach) による血管弛緩反応にて評価した。

マウスの摘出胸部大動脈を 3mm のリングに切断し, 5ml の organ bass にて既報の方法によって測定した⁵⁾。また, 培養には Krebs-Henseleit 液を使用し, 37°C で 95% O₂ と 5% CO₂ を連続投与しつつ行った。Prostaglandin F-2α (PGF-2α) を用いて血管収縮を行った後, 種々濃度 (10⁻⁹~10⁻⁵M) のアセチルコリン (Ach) を添加し, ダニッシュマイヨグラフシステム社製

(DMT[®], Aarhus,N,Denmark) のワイヤーミオグラフシステムにて計測した。

摘出大動脈のプラークの測定

摘出大動脈のプラークの oil red による染色とその面積の計測は既報のごとく行った⁵⁾。即ち, 染色した標本を digital camera (Olympus) にて画像を取り込み, Adobe Photoshop 7 と MacSCOPE 解析ソフトを用いて面積を測定した。

Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

肺組織中 mRNA の定量は標準的 RT-PCR 法により既報に従って測定した。1μg の総 RNA を DNase I で 15 分間処理後 cDNA を合成した。cDNA の PCR は Line-Gene system (BioFlux, Tokyo) を用いて, 95°C で 5 分の後, 95°C 15 秒, 60°C 15 秒, 72°C 30 秒を 45 サイクル行った。それぞれの mRNA レベルは glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA レベルを対照として表した。使用した primer を以下に示す^{5,6)}。MCP-1, 5'-CCACTCACCTGCTGCTACTCAT-

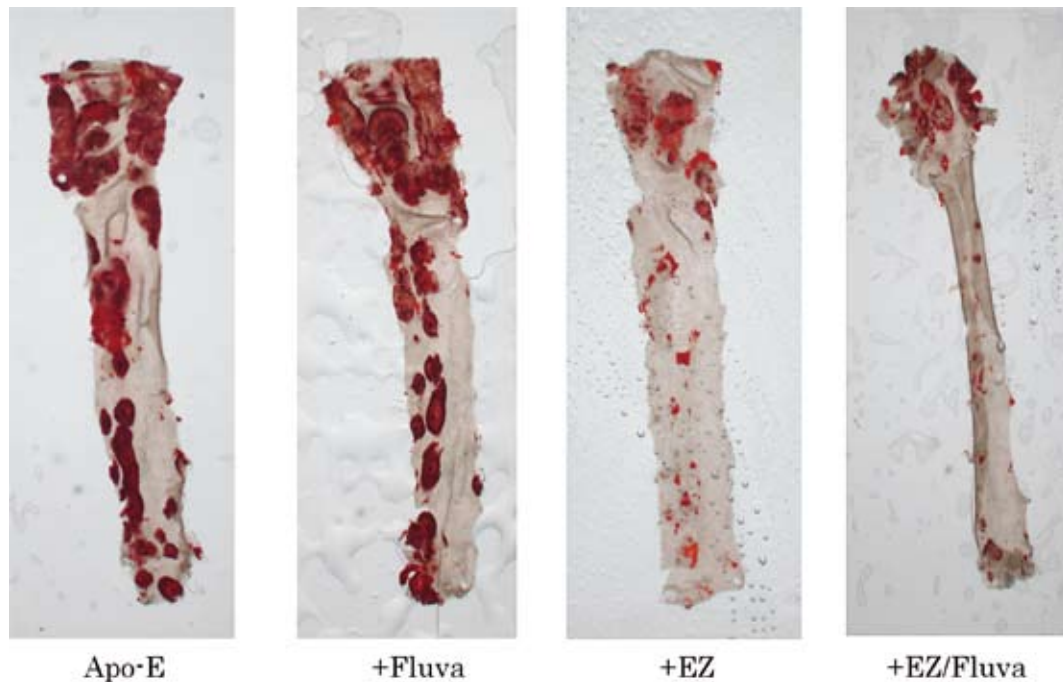


図1 大動脈のプラークの形成 (オイルレッド染色)

3'and 5'-TGGTGATCCTCTTGTAGCTCTCC-3'; VCAM-1, 5'-TTCTGGGGCAGGAAGTTAGA-3'and 5'-CGGGGAGATGTCAACAATA-3'; ICAM-1, 5'-CAGCTGGAGGTCTCGGAAGG-3'and 5'-CAGCGGCAGAGCAAAAGA-3'; p91^{phox}, 5'-TTGGGT-CAGCACTGGCTCTG-3'and 5'-TGGCGGTGTGCAAGT-GC TATC-3'; p67^{phox}, 5'-CTGGCTGAGGCCATCAG ACT-3' and 5'-AGGCCACTGCAGAGTGCTTG-3'; p47^{phox}, 5'-GATGTTCCCCATTGAGGCCG-3' and 5'-GTTTCAGGTCATCAGGCCGC-3'; glyceralde- hyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 5'-GC- CACCAGCTCTTCTG-3' and 5'-GGTGTGGGTGAG- GAGCA-3'.

統計学的処理

全ての評価は, mean ± SE (平均 ± 標準偏差) にて評価し, 統計学的検定は unpaired t-test を用いて検討した. また, 血管弛緩反応は ANOVA にて解析した. P < 0.05 を有意差ありと判定した.

結 果

血清脂質プロファイルへの効果

ApoE^{-/-} 群に比較して, +EZ 群は T-C 及び LDL-C をそれぞれ 63% (p < 0.005), 74% (p < 0.005) 減少させたが, +Fluva 群では, 有意な脂質低下は認められなかった. +EZ/Fluva 群においては, T-C を 51% (p <

0.05), LDL-C を 52% (p < 0.01) 減少させた. しかし, TG には群間に有意な変化は認められなかった (表 1).

大動脈プラーク形成に対する効果

Oil red 染色による動脈硬化巣の定量では, ApoE^{-/-} 群と +Fluva 群での比較では両群に差はなく, +EZ 群および +EZ/Fluva 群において明らかなプラーク面積の減少を認めた. しかし, +EZ 群と +Fluva/EZ 群のプラーク面積の比較では有意差は認められなかった (図 1, 2).

血管内皮弛緩反応に対する効果

胸部大動脈リングの血管弛緩反応において, ApoE^{-/-} 群, +Fluva 群で認められた血管内皮を介する弛緩障害が, +EZ 群及び +EZ/Fluva 群では有意に改善された (図 3).

白血球走化・接着因子および NADPH oxidase

コンポーネントの遺伝子発現に及ぼす効果

白血球走化・接着因子である MCP-1, VCAM-1, ICAM-1 の mRNA 発現誘導は, ApoE^{-/-} 群に比較して, +EZ 群において有意に, +Fluva 群では一部有意に抑制された (表 2). また, NADPH oxidase のコンポーネントである gp91^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} の mRNA 発現も, +EZ 群においてのみ有意に抑制された (表 3).

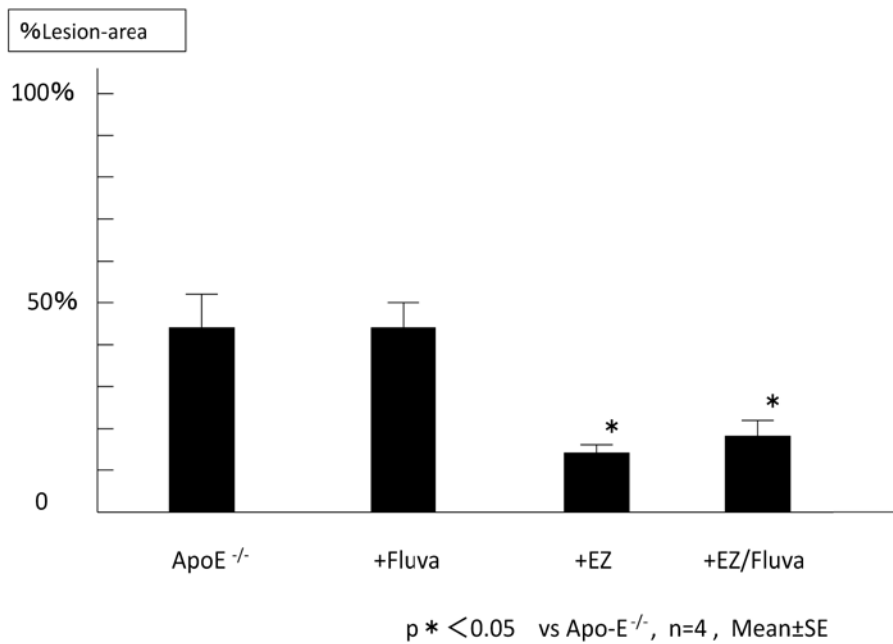


図2 大動脈のプラーク面積

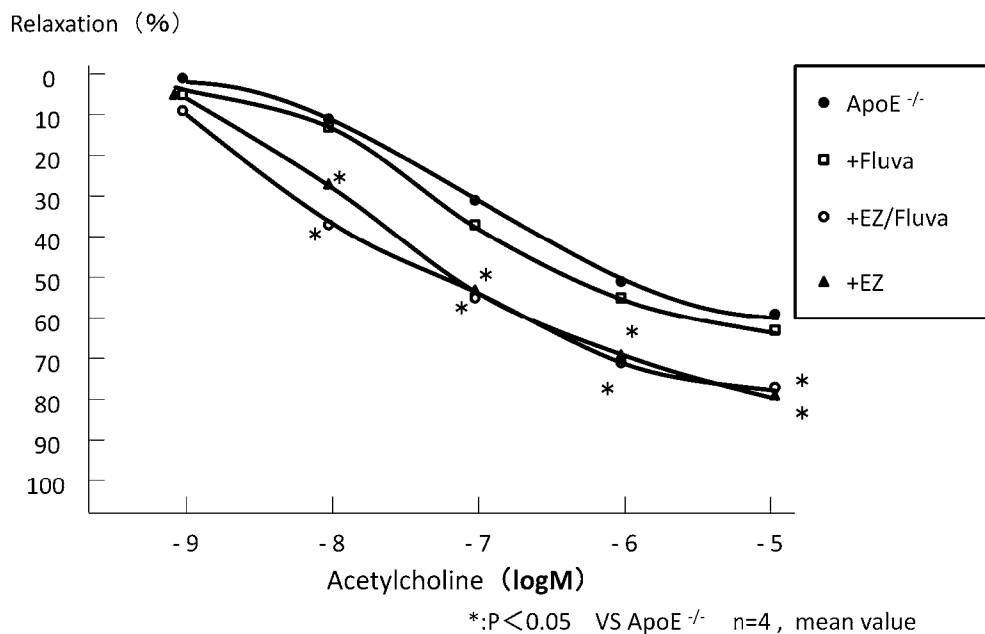


図3 胸部大動脈リングの弛緩反応

考 察

本邦におけるライフスタイルの欧米化を背景に、高コレステロール血症治療においては、エビデンスの集積のある statin が広く使用されている状況にある。しかし、statin の初回投与量にて LDL-C 管理目標に到達しなかった場合、増量を行っても管理目標に到達させることは容易ではないことは、一般臨床上也たびたび経験する事例である⁷⁾。この事象は6%ルールとして知られている

が、これは生体内のコレステロールの供給源には、肝臓における合成と食事や胆汁中のコレステロールの小腸からの吸収があり、合成を阻害しただけでは血清 LDL-C 値を十分に低下させることができないことが要因として挙げられる。大規模臨床試験を例に挙げれば、Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) のサブ解析では、コレステロールの吸収の亢進が心血管イベント抑制効果を減弱することが報告されている⁸⁾。また、Drugs and Evidence based Medicine in the Elderly (DE-

BATE) 試験では、血清 LDL-C 値が同レベルであったにも関わらず、コレステロール吸収の亢進した群で、全死亡、主要心血管イベントの発症リスクが有意に高かったことも報告されている⁹⁾。

今回著者らの検討では ApoE^{-/-} マウスの動脈硬化形成過程を小腸コレステロール輸送体阻害薬である EZ は明らかに抑制したが、Fluva は有意な効果をもたらさなかった。また EZ/Fluva の併用は、EZ の動脈硬化抑制作用を増強させることが出来なかったのみならず、逆に抗動脈硬化作用が減弱する傾向にあった。元々、げっ歯類においての statin の有効性は認められておらず、また、ApoE^{-/-} マウスにおいては statin 投与により動脈硬化がより促進されることが報告されており、それにはコレステロールの腸肝循環が関連しているという指摘がある¹⁰⁾。即ち、肝臓でのコレステロールの合成を阻害すると、小腸でのコレステロールの吸収が促進し、また一方、小腸でのコレステロールの吸収を抑制すると、肝臓や小腸でコレステロールの合成が促進するという機構が働くためと考えられている。実際、ApoE^{-/-} マウスにおいて、NPC1L1 を欠損させると、肝臓や小腸における HMG-CoA reductase の遺伝子発現が増強するという報告がなされている¹¹⁾。

従って、今回の結果も statin の肝内脂肪低下作用が脂肪の腸管吸収に促進的に働き、EZ の作用を減弱させた可能性が考えられた。

また最近の報告では、EZ における pleiotropic effect として、脂質吸収抑制のみならず酸化ストレスの改善や、NO の内因性の阻害物質である非対称性ジメチルアルギニン (ADMA) の低下なども報告されている¹²⁾。本研究においても、高脂肪食負荷 ApoE^{-/-} マウスでは EZ の投与により、白血球走化・接着因子や NADPH oxidase コンポーネントの発現が抑制されており、酸化ストレスの抑制や白血球浸潤過程における抑制が示唆された。従って、EZ がコレステロール吸収阻害作用のみならず、その他の酸化ストレスなどの動脈硬化促進機序の誘導を抑制することで、動脈硬化症の進展抑制や臓器保護の点でも好影響をもたらすものと考えられた。一方臨床では、statin と EZ との併用が脂質異常症に対し、優れた効果を発揮することが報告され、今後のエビデンスの蓄積が期待されている^{13,14)}。

結 論

本研究により、高脂肪食負荷 ApoE^{-/-} マウスという動脈硬化症モデルにおいて、小腸コレステロール輸送体の阻害薬である EZ が、コレステロール吸収阻害によるコレステロール低下作用を主軸として、その他の抗酸化

作用を含めた抗動脈硬化作用を発揮することが明らかとなった。

謝 辞 この度の研究にて、RT-PCR・マウスの脂肪負荷・オイルレッド染色などのご協力いただいた佐藤寛子研究助手に深謝いたします。

文 献

- 1) Scandinavian Simvastatin Survival Study Groups : Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease : the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* **344** : 1383-1389, 1994.
- 2) Staprans I, Pan X-M, Rapp JH, et al : The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* **49** : 1075-1082, 2005.
- 3) Davies JP, Levy B, Ioannou YA : Evidence for a Niemann-Pick C (NPC) gene family : Identification and characterization of NPC1L1. *Genomics* **65** : 137-145, 2000.
- 4) Altmann SW, Davis Jr HR, Zhu LJ, et al : Niemann-Pick C1 Like1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* **303** : 1201-1204, 2004.
- 5) Hattori Y, Hattori S, Wang X, et al : Oral administration of tetrahydrobiopterin slows the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E- knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27** : 865-870, 2007.
- 6) Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al : Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* **114** : 1752-1761, 2004.
- 7) Toth PP, Davidson MH : Cholesterol absorption blockade with ezetimibe. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* **5** : 455-462, 2005.
- 8) Miettinen TA, Gylling H, Strandberg T, et al : Baseline serum cholestanol as predictor of recurrent coronary events in subgroup of Scandinavian simvastatin survival study. Finnish 4S investigators. *Br Med J* **316** : 1127-1130, 1998.
- 9) Strandberg TE, Tilvis RS, Pitkala KH, et al : Cholesterol and glucose metabolism and recurrent cardiovascular events among the elderly : a prospective study. *J Am College Cardiol* **48** : 708-714, 2006.
- 10) Wang Y-X, Martin-McNulty B, Huw L-y, et al : Anti-atherosclerotic effect of simvastatin depends on the

- presence of apolipoprotein E. *Atherosclerosis* **162**: 23-31 2002.
- 11) Davis Jr HR, Hoos LM, Yeyzloff G, et al : Deficiency of Niemann-Pick C1 Like 1 prevents atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**: 841-849, 2007
- 12) Ezetimibe decreases serum levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and ameliorates renal injury in non-diabetic chronic kidney disease patients in a cholesterol independent manner Nakamura T, Sata E, Fujiwara N, et al., *Pharmacol Res* **60** : 525-528, 2009
- 13) Davidson MH, McGray T, Bettis R, et al., Ezetimibe coadministration with simvastatin in patients with primary hypercholesterolemia. *J Am College Cardiol* **40** : 2125-2134, 2002.
- 14) Baigent C, Landray MJ, Reith C, et al : The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection) : a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* **377**: 2181-2192, 2011.

Anti-Atherogenic Effect of Ezetimibe in Apo-E Knockout MiceAtsuko Sukegawa¹⁾, Kosuke Uchida²⁾ and Teruo Jojima¹⁾¹⁾ *Department of Endocrinology and Metabolism, Dokkyo Medical University School of Medicine.*²⁾ *Department of Pharmacology, Dokkyo Medical University School of Medicine.*

The aim of present study was to investigate the effects of ezetimibe, a cholesterol absorption inhibitor, on atherosclerosis in apolipoprotein E knockout (ApoE-KO) mice. Treatment with ezetimibe, but not fluvastatin, significantly decreased serum total and low density lipoprotein (LDL) cholesterol and lesions of atherosclerotic plaque of aorta in western diet-fed ApoE-KO mice. Ezetimibe also restored nitric oxide-mediated vascular relaxation in isolated aortic

rings.

Moreover, ezetimibe treatment significantly decreased the mRNA expression of a chemoattractant, adhesion molecules, and several subunits of NADPH oxidase in lung tissues. These results suggest that ezetimibe may inhibit atherosclerosis by ameliorating vascular inflammation and oxidative stress in ApoE-KO mice independently of lowering serum cholesterol level.