ネクセトール錠 180 mg

第2部（モジュール2）：CTDの概要（サマリー）

2.6.1 緒言

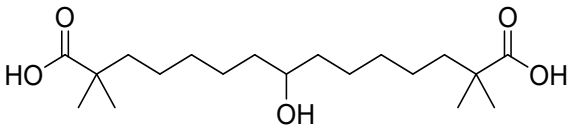
大塚製薬株式会社

目次

目次 2
2.6.1 緒言 3

2.6.1　緒言

ベムペド酸（8-Hydroxy-2,2,14,14-tetramethylpentadecanedioic acid，ETC-1002，又はESP55016；図 2.6.1-1）は，高コレステロール血症患者の治療のための新規の低分子経口脂質低下薬である。ベムペド酸は，第II相及び第III相（短期間及び長期間）国際共同臨床試験において高コレステロール血症の成人患者で低比重リポ蛋白コレステロール（LDL-C）を低下させることが示されている。



ベムペド酸

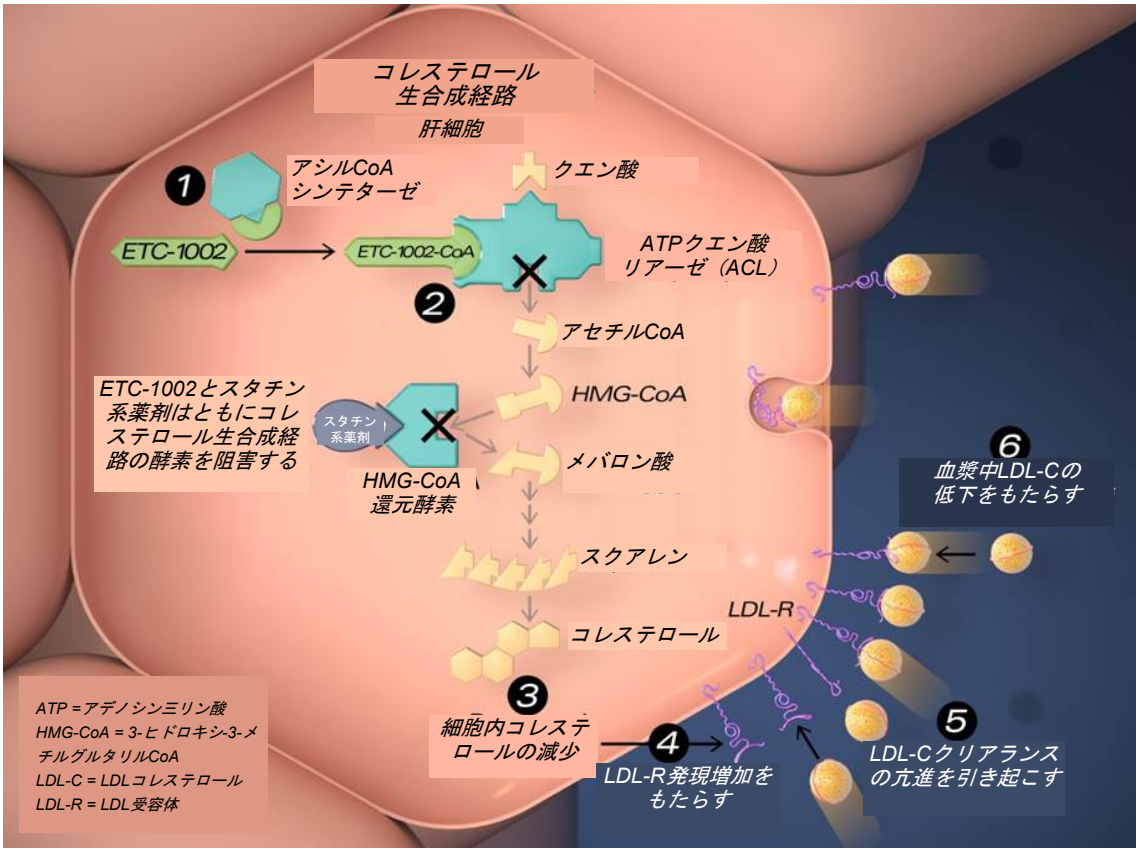
図 2.6.1-1　　ベムペド酸の構造

ベムペド酸錠：

ベムペド酸錠は，ベムペド酸180 mgに加えて，添加剤として軽質無水ケイ酸，ヒドロキシプロピルセルロース，乳糖水和物，ステアリン酸マグネシウム，結晶セルロース，及びデンプングリコール酸ナトリウムを内核錠に含有するフィルムコーティング錠である。内核錠のフィルムコーティングには，ポリビニルアルコール（部分けん化物），マクロゴール4000，タルク，及び酸化チタンで構成されるコーティング剤を使用している。ベムペド酸錠に配合している添加剤の量は，いずれも日本での経口投与における使用実績の範囲内である。ベムペド酸のヒト推奨用量は180 mg/日である。

ベムペド酸の作用機序：

肝臓において，ベムペド酸はETC-1002コエンザイムA（ETC-1002-CoA）へと活性化されてから，アデノシン三リン酸クエン酸リアーゼ（ACL）を阻害する。ACLは細胞質のアセチルCoAを生成する酵素であり，アセチルCoAはコレステロール及び脂肪酸の*de novo*合成に利用される。3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイムA（HMG-CoA）還元酵素阻害と同様に，ACL阻害を介してコレステロール生合成経路を阻害することにより，肝臓での低比重リポ蛋白受容体（LDLR）の密度及び総活性の上昇が引き起こされることで，血中からの低比重リポ蛋白（LDL）粒子のクリアランスが亢進し，血中LDLコレステロール（LDL-C）が低下する（図 2.6.1-2）。



ベムペド酸（ETC-1002）の作用機序の概要図。**（1）**ベムペド酸は肝臓でETC-1002-CoAに変換されてから，**（2）**コレステロール合成経路のHMG-CoA還元酵素の上流の酵素であるACLを阻害する。コレステロール合成の阻害により**（3）**細胞内のコレステロール量が減少し，これにより**（4）**肝臓でのLDLR発現増加が引き起こされることで，**（5）**血中からのLDL粒子のクリアランスが亢進し，**（6）**血中LDL-Cが低下する。

図 2.6.1-2　　ベムペド酸の作用機序

ベムペド酸の非臨床プロファイルについて，薬理試験，薬物動態試験，及び毒性試験で詳細に検討した。非臨床薬理試験では，効力を裏付ける試験（*in vitro*及び*in vivo*作用機序及び有効性試験），副次的薬理試験，及び安全性薬理試験を実施した。非臨床薬物動態試験では，ベムペド酸の吸収，分布，代謝，及び排泄を検討し，ヒトの毒性予測に動物を用いた毒性試験は妥当であることが確認された。非臨床毒性試験では，ベムペド酸の単回投与及び反復投与毒性，遺伝毒性，がん原性，生殖発生毒性，及び幼若毒性試験を実施した。その他の毒性試験として，ベムペド酸及びESP15228のペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）サブタイプの活性化に関する評価，原薬の出発物質及び中間体不純物の変異原性評価を実施した。ベムペド酸のラット1ヵ月間投与試験及びサル3ヵ月間投与試験で認められた死亡を検討する探索的試験を実施した。ベムペド酸とエゼチミブ又はアトルバスタチンの併用について，エゼチミブとの併用投与試験としてラットを用いた13週間反復併用投与毒性試験及び胚胎児試験，アトルバスタチンとの併用投与試験としてサルを用いた13週間反復併用投与試験を実施した。

ネクセトール錠 180 mg

第2部（モジュール2）：CTDの概要（サマリー）

2.6.2 薬理試験の概要文

大塚製薬株式会社

目次

目次 2
略号一覧 3
2.6.2 薬理試験 7
2.6.2.1 まとめ 7
2.6.2.1.1 開発戦略 8
2.6.2.1.2 実施した試験 8
2.6.2.1.3 効力を裏付ける試験の主な所見： 9
2.6.2.1.4 副次的薬理試験の主な所見： 9
2.6.2.1.5 安全性薬理試験の主な所見： 10
2.6.2.1.6 代謝物の薬理試験の主な所見： 10
2.6.2.1.7 薬力学的薬物相互作用試験の主な所見： 10
2.6.2.1.8 全般的結論 11
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 11
2.6.2.2.1 *In vitro*の効力を裏付ける試験 11
2.6.2.2.2 *In vivo*の効力を裏付ける試験 21
2.6.2.3 副次的薬理試験 37
2.6.2.3.1 *In vitro*副次的薬理試験 37
2.6.2.3.2 *In vivo*副次的薬理試験 47
2.6.2.4 安全性薬理試験 70
2.6.2.4.1 HEK293細胞を用いたhERGアッセイ 70
2.6.2.4.2 ラットにおける中枢神経系に対する影響 71
2.6.2.4.3 ラットにおける呼吸器系に対する影響 71
2.6.2.4.4 覚醒下サルにおける心血管系に対する影響 71
2.6.2.5 代謝物，異性体，及び不純物の薬理学的プロファイル 71
2.6.2.5.1 代謝物の薬理学的プロファイル 71
2.6.2.5.2 異性体の薬理学的プロファイル 72
2.6.2.5.3 不純物の薬理学的プロファイル 72
2.6.2.6 薬力学的薬物相互作用 72
2.6.2.7 考察及び結論 73
2.6.2.8 図表 74
2.6.2.9 参考文献 74

略号一覧

ACC	アセチルコエンザイムAカルボキシラーゼ
ACSVL，FATP	極長鎖アシルコエンザイムAシンテターゼ
アセチル-CoA	アセチルコエンザイムA
ACL	アデノシン三リン酸クエン酸リアーゼ
ACLY	アデノシン三リン酸クエン酸リアーゼコード遺伝子領域
ACO	アシルコエンザイムAオキシダーゼ，パルミトイル
ACS	アシルコエンザイムAシンテターゼ
ACSL	長鎖アシルコエンザイムAシンテターゼ
ACSLV1	極長鎖アシルコエンザイムAシンテターゼ1
Adgre1	接着G蛋白共役受容体E1
ADMA	非対称性ジメチルアルギニン
ADP	アデノシン二リン酸
AEC	アデニル酸エネルギーチャージ
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AMP	アデノシン一リン酸
AMPK	アデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼ
AMPK β1 DKO	アデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼβ1ダブルノックアウト
AMPK β1 KO	アデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼβ1ノックアウト
AMPKα	アデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼα
ANOVA	分散分析
ApoB	アポリポ蛋白B
ApoB100	アポリポ蛋白B100
ApoE KO；*Apoe* −/−	アポリポ蛋白Eノックアウト
Arg1	アルギナーゼ1
ASCVD	アテローム動脈硬化性心血管疾患
α-SMA	α平滑筋アクチン
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
α-Toc	αトコフェロール
Atorva	アトルバスタチン
ATP	アデノシン三リン酸
AUC	濃度－時間曲線下面積
AUC_{24hr}	投与後0時間から24時間までの濃度－時間曲線下面積
AUC_{2hr}	投与後0時間から2時間までの濃度－時間曲線下面積
AUC_{4hr}	投与後0時間から4時間までの濃度－時間曲線下面積
BemA	ベムペド酸
β-HBA	β-ヒドロキシ酪酸
BPM	心拍数
CCL2，Ccl2	C-Cモチーフケモカインリガンド2
CCL3，Ccl3	C-Cモチーフケモカインリガンド3
CD163	分化抗原群163
CDC	ケノデオキシコール酸
CE	コレステロールエステル
ChD	一般飼料
C_{max}	最高濃度

CMC	カルボキシメチルセルロース
CNS	中枢神経系
CoA，CoASH	コエンザイムA
CPT-I	カルニチンパルミトイル基転移酵素I
CYP	チトクロームP450
Cyp7A1	チトクロームP450 7A1
DCA	ジカルボン酸
DHA	ドコサヘキサエン酸
DiI-LDL	1,1’-dioctadecyl-3,3,3’,3’-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate標識低比重リポ蛋白
DIO	食事誘発性肥満
DKO	ダブルノックアウト
DMSO	ジメチルスルホキシド
EC_{50}	50%有効濃度
EIA	酵素免疫測定法
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法
EPA	エイコサペンタエン酸
ERK	細胞外シグナル制御キナーゼ
ESP15228	ベムペド酸の活性代謝物
ESP55016	ベムペド酸
ETC-1002	ベムペド酸
ETC-1002-CoA	ETC-1002コエンザイムA
FATP	脂肪酸輸送蛋白（極長鎖アシルCoAシンテターゼ）
FATP2	脂肪酸輸送蛋白2（極長鎖アシルCoAシンテターゼ1）
FCR	分画異化率
Feno	フェノフィブラート
FOB	観察総合評価法
FOXO1	肝臓中のフォークヘッドボックス蛋白O1
FXR	ファルネソイドX受容体
Gapdh	グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素
GF-AFC/bis-AAF-R110	Glycylphenylalanyl-aminofluoroumin/bis-alynyl-alynyl-phenylalynyl-rhodamine 110
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HDL	高比重リポ蛋白
HDL-C	高比重リポ蛋白コレステロール
hERG	ヒトether-a-go-go related gene
HF	高脂肪
HFCD	高脂肪高コレステロール食
HFD	高脂肪食
HFHC	高脂肪高コレステロール
HMG-CoA	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイムA
HMGR	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルコエンザイムA還元酵素
HOMA-IR	Homostatic model assessment-insulin resistance
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
HPLC-ELSD	高速液体クロマトグラフィー蒸発光散乱検出法
HSD	Honest significant difference
HTC	肝臓中トリグリセリド量
IC_{50}，IC50	50%阻害濃度

IEL	内弾性膜
IHC	免疫組織化学
Il1b	インターロイキン1β
IL-6	インターロイキン6
IκBα	B細胞阻害因子α内κ軽鎖ポリペプチド遺伝子エンハンサー核内因子
IKK	B細胞阻害因子内κ軽鎖ポリペプチド遺伝子エンハンサー核内因子キナーゼ
JNK1	c-Jun N末端プロテインキナーゼ1
JNK2	c-Jun N末端プロテインキナーゼ2
JNK	c-Jun N末端プロテインキナーゼ
Ki	阻害定数
Km	ミカエリス定数
L	管腔
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィータンデム質量分析法
LC-UV	液体クロマトグラフィー紫外線検出法
LDL	低比重リポ蛋白
LDL-C	低比重リポ蛋白コレステロー
LDLR	低比重リポ蛋白受容体)
$Ldlr^{-/-}$	低比重リポ蛋白受容体欠損
LKB1	肝臓キナーゼB1
LPL	リポ蛋白リパーゼ
LPS	リポ多糖
LXR	肝臓X受容体
M	中膜
m/z	質量電荷比
マロニル-CoA	マロニルコエンザイムA
MAP	平均血圧
MAPK	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ
MDM	単球由来マクロファージ
mRNA	メッセンジャーリボ核酸
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NEFA	遊離脂肪酸
NF-κB	核内因子κBシグナル
NI	新生内膜
non-HDL-C	非高比重リポ蛋白
Non-SAP	非けん化
Nos2	一酸化窒シンテターゼ2
NPC1L1	ニーマンピックC1-Like 1
NS，N.S.	有意差なし
ORO	オイルレッドO
p38	p38マイトジェン活性化プロテインキナーゼ
P-ACC	リン酸化アセチルコエンザイムAカルボキシラーゼ
P-AMPK	リン酸化アデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼ
PCSK9	プロ蛋白質転換酵素サブチリシン/ケキシン9型
PGC-1α	ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γコアクチベーター1α
Pioglit	ピオグリタゾン
PK	薬物動態
PPAR	ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体

PP2Cα	プロテインホスファターゼ2Cα
QUICKI	Quantitative insulin sensitivity check index
RER	呼吸交換比
Rosiglit，Rosi	ロシグリタゾン
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応法
SAA	血清アミロイドA
SAP	けん化
SBP	収縮期血圧
SD	Sprague-Dawley
SEM	標本平均の標準誤差
SHROB	高血圧自然発症肥満
Simva	シンバスタチン
siRNA	低分子干渉リボ核酸
SkM	骨格筋
SM	平滑筋
SNP	一塩基多型
SREBP2	ステロール応答エレメント結合蛋白2
SAA	血清アミロイドA
$T_{1/2}$	半減期
T-ACC	総アセチルコエンザイムAカルボキシラーゼ
T-AMPK	総アデノシン一リン酸活性化蛋白キナーゼ
TG	トリグリセリド
Tg	トランスジェニック
TICE	経腸コレステロール排出
T_{max}	最高濃度到達時間
TNF	腫瘍壊死因子
TNF-α	腫瘍壊死因子α
Troglit	トログリタゾン
TZD	チアゾリジンジオン
UCP2	脱共役蛋白質2
Veh	溶媒
VLDL	極低比重リポ蛋白
VLDL-C	極低比重リポ蛋白コレステロール
WT	野生型

2.6.2　薬理試験

2.6.2.1　まとめ

ベムペド酸（8-Hydroxy-2,2,14,14-tetramethylpentadecanedioic acid，ETC-1002，又はESP55016；図 2.6.2.1-1）は，高コレステロール血症患者の治療のための低分子の経口脂質低下薬である。大規模な国際共同臨床プログラムにおいて，ベムペド酸は高コレステロール血症患者でLDL-Cを低下させることが示されている。肝臓において，ベムペド酸はACSVL1によりETC-1002-CoAへと変換されてから，ACLを阻害する。ACLは細胞質のアセチルCoAを生成する酵素であり，アセチルCoAはコレステロール及び脂肪酸の*de novo*合成に利用される。ACSVL1は肝臓で高発現しているが，その他のほとんどの末梢組織（骨格筋を含む）では発現していない。HMG-CoA還元酵素阻害と同様に，ACL阻害を介してコレステロール生合成経路を阻害することにより，肝臓でのLDLRの密度及び活性の上昇が引き起こされることで，血中からのLDL粒子のクリアランスが亢進し，LDL-Cが低下する（図 2.6.2.1-2）。

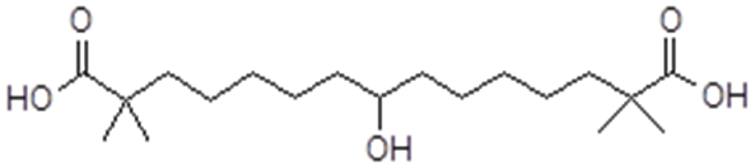


図 2.6.2.1-1　　ベムペド酸の構造

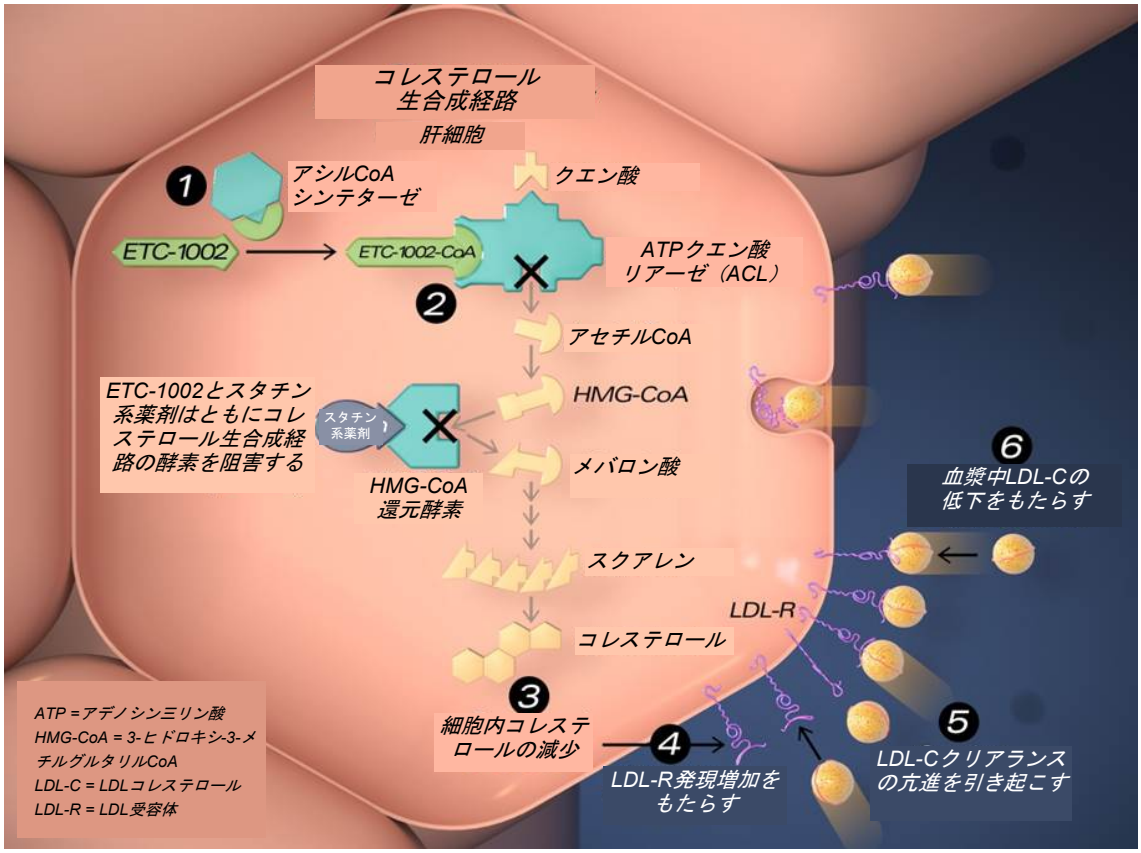


図 2.6.2.1-2　　ベムペド酸の作用機序

ベムペド酸（ETC-1002）の作用機序の概要図。 **(1)** ベムペド酸は肝臓でETC-1002-CoAに変換されてから，**(2)** コレステロール合成経路におけるHMG-CoA還元酵素の上流にあるACLを阻害する。コレステロール合成の阻害により **(3)** 細胞内のコレステロール量が減少することにより， **(4)** 肝臓でのLDLR発現増加が引き起こされ， **(5)** 血中からのLDL粒子のクリアランスが亢進し， **(6)** 血中LDL-Cが低下する。

2.6.2.1.1 開発戦略

ベムペド酸は，ラット肝細胞を用いた*de novo*の総脂質（コレステロール及び脂肪酸）合成速度低下作用を指標にした低分子創薬スクリーニングで同定された（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-22，4.2.1.1-23）。ベムペド酸とその主要代謝物ESP15228はともに，評価した他の化合物よりも優れた効力を示した。ESP15228は，ベムペド酸の中央のヒドロキシル基が酸化されたケトン体である。*In vivo*二次スクリーニング評価において，肥満モデルである雌Zuckerラットを用いてベムペド酸及びESP15228の脂質に及ぼす影響を評価した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-17，4.2.1.1-21）。高コレステロール血症やそれに付随する代謝障害を示すこのモデルにおいて，ベムペド酸及びESP15228は血清中のHDL-C値を増加させ，TG値を減少させた。

*In vivo*でベムペド酸及びESP15228によりリポ蛋白代謝に対して有益な効果が認められたことから，コレステロール及び脂肪酸生合成阻害作用の分子メカニズムを解明するために追加試験を実施した。追加試験では，コレステロール及び脂肪酸生合成経路内の酵素の阻害と関連する以下の分子メカニズムを評価した。

- コレステロール及び脂肪酸生合成経路それぞれの律速酵素である HMG-CoA 還元酵素及び ACC の直接制御
- AMPK 活性化による抑制性リン酸化を介した HMG-CoA 還元酵素及び ACC の阻害
- コレステロール及び脂肪酸生合成それぞれの分岐を担う HMG-CoA 還元酵素と ACC 両方の上流に位置する ACL の阻害

2.6.2.1.2 実施した試験

*In vitro*の効力を裏付けるため，ベムペド酸のCoAエステル形成及びACL阻害作用，HMG-CoA還元酵素及びACCに対する作用，及びLDLR発現に及ぼす影響を評価するとともに，ETC-1002-CoAエステル形成に関与するACSを特定した。*In vivo*の効力を裏付ける試験では，正常脂質代謝モデル，食事誘発性高コレステロール血症モデル，及び遺伝性高コレステロール血症モデルにおいて血清脂質に対するベムペド酸の効果を評価するとともに，遺伝子改変した食事誘発性動脈硬化症モデルにおいてベムペド酸の効果を評価した。これらの試験について「2.6.2.2項 効力を裏付ける試験」に要約する。

副次的薬理試験において，ベムペド酸の以下に対する影響を評価した：*in vitro*での各受容体，イオンチャネル，酵素，及びトランスポーターへの結合，ヒト初代筋管細胞のコレステロール合成，脂肪酸の合成及び酸化，*in vitro*におけるAMPK活性やPPAR活性，*in vitro*及び*in vivo*での炎症，コレステロールの腸管吸収，胆汁酸の合成又は排泄の活性化，TICEの賦活化，LDLRノックアウトマウスやKKAyマウスの脂質パラメータ，DIOマウスや果糖摂取マウスの体重，インスリン，グルコース，及び脂肪肝，高血圧自然発症肥満ラットの血圧。これらの試験について「2.6.2.3項 副次的薬理試験」に要約する。

安全性薬理試験において，hERGチャネル電流，ラットのCNS及び呼吸機能，並びにサルの心血管機能に対するベムペド酸の影響を評価した。これらの試験について，2.6.2.4項に要約する。

代謝物の薬理学的プロファイルとして，ESP15228とその他2種の代謝物（ベムペド酸グルクロニド及びESP15228グルクロニド）の薬理活性を評価するために*in vitro*試験を実施した。

薬力学的薬物相互作用試験として，LDLRノックアウトマウスを用いてベムペド酸とHMG-CoA還元酵素阻害薬であるアトルバスタチンとの薬力学的薬物相互作用試験を実施した。

効力を裏付ける試験，副次的薬理試験，及び薬力学的薬物相互作用試験は，GLP規制に準拠して実施していない。安全性薬理試験は，GLPに準拠して実施した。

2.6.2.1.3　効力を裏付ける試験の主な所見：

- ベムペド酸は ACL を阻害して LDL-C を低下させた。
- ベムペド酸の ACL 及び脂質合成の阻害作用には，ACSVL1 による ETC-1002-CoA への変換を要した。
- ETC-1002-CoA がヒト ACL 組み換えタンパク質の活性を阻害し，親化合物であるベムペド酸は ACL の活性を阻害しなかった。
- ETC-1002-CoA により ACL が阻害されると，コレステロールの合成が阻害され，肝臓の LDLR 蛋白の密度及び活性が上昇した。
- *In vivo* での ACL の阻害に伴い，複数のげっ歯類モデルにおいてベムペド酸はコレステロール生合成マーカーを低下させ，血清脂質を改善し，食事誘発性アテローム性動脈硬化症の進展を抑制した。
- ベムペド酸と ETC-1002-CoA のいずれもラットから部分精製した HMG-CoA 還元酵素の活性を阻害しなかった。
- メンデルランダム化解析において，LDL-C 低下をもたらす ACL 遺伝子領域の SNP は ASCVD リスクの低下と関連することが示された。
- AMPK β1KO マウスを用いた試験において，ベムペド酸は AMPK 活性非依存的に LDL-C，肝臓の TG 及びコレステロールを減少させた。

2.6.2.1.4　副次的薬理試験の主な所見：

- ベムペド酸は，100 μM［臨床用量（180 mg/日）を投与時の定常状態の最高総血漿中濃度（C_{max}, Total）の約 1.1 倍又は定常状態の最高非結合型血漿中濃度（C_{max}, Free）の約 36 倍］で以下と顕著な相互作用は認められなかった：ドパミン受容体，セロトニン受容体，γ アミノ酪酸（GABA）受容体，オピオイド受容体，カンナビノイド受容体，カルシウムイオンチャネル，ナトリウムイオンチャネル，カリウムイオンチャネル，塩素イオンチャネル，ノルエピネフリントランスポーター，ドパミントランスポーター，及びセロトニントランスポーター。
- ヒトの筋肉に ASCVL1 は発現していないため，ベムペド酸は骨格筋細胞のコレステロール生合成を阻害せず，関連する筋毒性を示さなかった。

- ベムペド酸により ACL が阻害されると，脂肪酸合成が減少し，ミトコンドリア内の脂肪酸 β 酸化が亢進した。
- げっ歯類肝細胞でベムペド酸は AEC 非依存的に AMPK シグナルを活性化した。この作用は，ETC-1002-CoA と AMPK β1 制御性サブユニットとの直接的かつ特異的なアロステリック相互作用を介する作用で，β2 を含む AMPK ヘテロ三量体では認められなかった。
- げっ歯類と異なり，ヒト肝臓では β2 を含む AMPK ヘテロ三量体が優位であり，ETC-1002-CoA 形成は主に肝臓で認められた。ETC-1002-CoA は β2 を含む複合体を活性化しないことから，ヒトでのベムペド酸の薬理作用に対する AMPK 活性化の寄与はごくわずかと考えられた。
- *In vitro* 及び *in vivo* モデルでベムペド酸は抗炎症作用を示した。
- ベムペド酸は，コレステロール腸管吸収，胆汁酸合成，及び TICE に影響を及ぼさなかった。
- HFHC 食を摂取させた LDLR ノックアウトマウスにおいて，ベムペド酸は血清中及び肝臓内の脂質を減少させ，アテローム性動脈硬化症の進展を抑制し，血糖異常を改善した。
- インスリン抵抗性マウス，DIO マウス，及び果糖を摂取させたハムスターにおいて，ベムペド酸は高 TG 血症，脂肪肝，及び血糖値を改善した。

2.6.2.1.5　安全性薬理試験の主な所見：

- ベムペド酸は300 μmol/L（103 μg/mL）までの濃度でhERGチャネル電流に影響を及ぼさず，1000 μmol/L（345 μg/mL）でhERGチャネル電流を5.4%のみ阻害した。
- ラットにベムペド酸を100 mg/kgまで単回経口投与しても，覚醒/活動性，自律神経機能，神経筋機能，及び生理機能に対する影響は認められなかった。100 mg/kgで熱に対する反応潜時の短縮が認められた。
- ラットにベムペド酸を100 mg/kgまで単回経口投与しても，呼吸数，一回換気量，及び分時換気量に対する影響は認められなかった。
- サルにベムペド酸を100 mg/kgまで単回経口投与しても，心拍数，血圧，及び心電図パラメータに対する影響は認められなかった。

2.6.2.1.6　代謝物の薬理試験の主な所見：

- 代謝物である ESP15228 は薬理活性を示し，ベムペド酸と同等の効力を有する。
- ベムペド酸グルクロニドと ESP15228 グルクロニドのいずれも薬理活性を示さない。

2.6.2.1.7　薬力学的薬物相互作用試験の主な所見：

- LDLR ノックアウトマウスにおいてベムペド酸とアトルバスタチンの併用投与による脂質低下作用が確認された。

2.6.2.1.8　全般的結論

これらの非臨床試験の結果から，ベムペド酸のアテローム性脂質を減少させる薬理学的作用機序，効能，副次的薬理，及び安全性薬理プロファイルが明らかにされ，ベムペド酸のヒト医薬品としての承認申請が支持される。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　*In vitro*の効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1.1　*In vitro*及び*in vivo*でベムペド酸はCoAエステルを形成し，ACLの阻害により脂質合成を阻害する

（概要表2.6.3.1，報告書番号ETI-100-079-RR，RR 1002-100-007，ETI-100-081-RR）

*In vitro*の一次スクリーニングアッセイでは，絶食下のSDラットから採取した肝細胞を用いて，ベムペド酸が[^{14}C]酢酸の脂質への取り込み速度に及ぼす作用を検討した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-15）[1]。ベムペド酸は[^{14}C]酢酸の脂肪酸SAP及びステロールnon-SAP分画への取り込みを減少させ，IC_{50}はともに2-10 μM であった（図 2.6.2.2.1.1-1）。[^{3}H]H_2O，[^{14}C]ピルビン酸，及び[^{14}C]グルコースを含む他の放射標識基質を用いても同様の効力が示された。これらの基質は，細胞質にクエン酸として放出される前に，ミトコンドリアにて脂質生合成前駆体として代謝される。中間代謝反応により特異的に取り込まれる複数の基質を用いても，ベムペド酸の効力は一貫しており，また基質プールの濃度を変えても[^{3}H]H_2Oの取り込みに影響が認められないことから，ベムペド酸は肝細胞でのコレステロール及び脂肪酸の*de novo*合成の絶対速度を低下させると結論された。

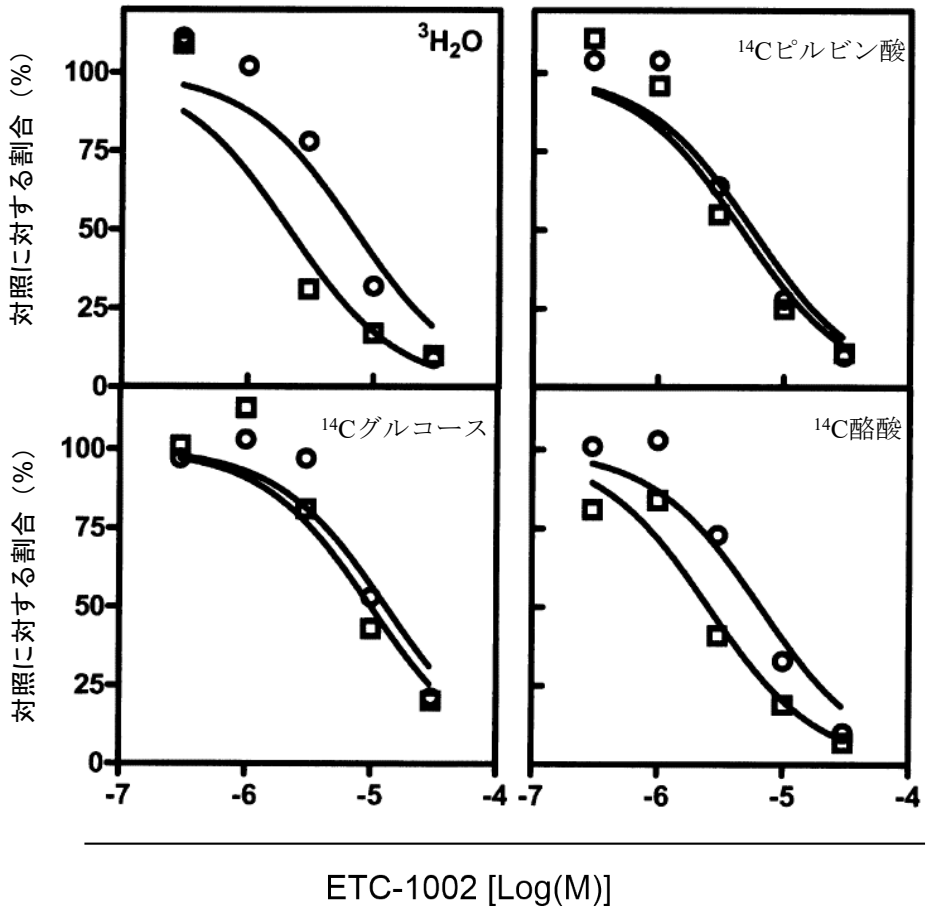


図 2.6.2.2.1.1-1　ラット肝細胞でのベムペド酸によるSAP及びnon SAP脂質合成.の阻害（ETI-100-079-RR試験）[1]

ベムペド酸（ETC 1002）は，単離ラット肝細胞でSAP（黒丸）及びnon SAP（白丸）脂肪酸の合成を阻害した。各データポイントは，同一実験内における3ウェル間の相対的な平均値［対照に対する割合（%）］を示す。

ベムペド酸が標的とする脂質合成経路内の酵素を特定するために，ラット初代肝細胞を用いて脂質合成における複数の代謝中間体をLC-MS/MSで定量評価した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-07）。ベムペド酸はACLが生成するアセチルCoAを含む複数の代謝物の産生を濃度依存的に抑制し，一方ACLの基質であるクエン酸を一過性に増加させた（図 2.6.2.2.1.1-2，パネルA）。これらの所見から，ベムペド酸はACL阻害を介して脂質合成経路を阻害することが示唆された。ACLはクエン酸をオキサロ酢酸とアセチルCoAへと切断する細胞質内酵素であり，アセチルCoAはコレステロール及び脂肪酸の*de novo*合成の共通の基質である[2]。*In vivo*でのACL阻害の裏付けとして，ベムペド酸（30 mg/kg）を単回投与したラットから採取した肝臓試料においてもACLの下流のすべての代謝中間体で同様の減少が示され，一方クエン酸の一過性の増加も認められた（図 2.6.2.2.1.1-2，パネルB）。

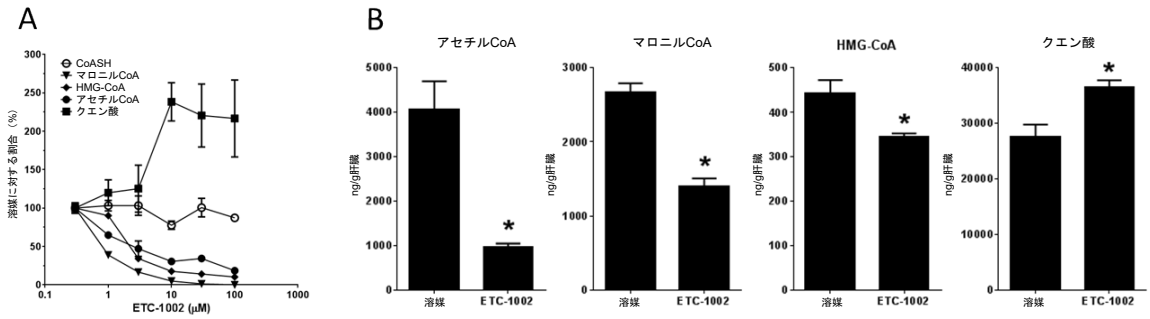


図 2.6.2.2.1.1-2　*In vitro*及び*in vivo*でベムペド酸はACLを阻害する（RR 1002-100-007試験）

パネルA：ラット初代肝細胞を所定濃度のベムペド酸（ETC-1002）で2時間処理し，細胞内のCoASH，マロニルCoA，HMG-CoA，アセチルCoA，及びクエン酸をLC-MS/MSで測定した。**パネルB**：正常な絶食下/再摂餌下Wistarラットにベムペド酸30 mg/kgを単回投与した。投与2時間後の凍結固定肝臓試料中のアセチルCoA，マロニルCoA，HMG-CoA，及びクエン酸を測定し，ng/g肝臓（湿重量）で示した。データは平均値 ± SEMである（n = 3-5）。

次に，ヒトACL組み換えタンパク質を用いてベムペド酸が酵素活性に与える直接的な作用を評価した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-07）。予想に反して，これらの試験でベムペド酸のACL活性に対する直接の阻害作用は示されなかった。しかし，ACL反応機構がクエン酸-CoA反応中間体の形成に関与しており，この中間体の類似化合物はACL活性を阻害する有用なアプローチであることは既に示されている[2]。そのため，ラット肝ミクロソームと反応させベムペド酸のCoAエステルが検出されるか検討した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-14）。ラット肝ミクロソームをベムペド酸100 μM及びCoA 100 μMと共に37°Cで60分間反応させた。反応上清を分離し，LC-UV（254 nm）で分析した。この試験では8.1分時点にCoAエステルの形成と一致する，ベムペド酸に由来するピークが検出された。負イオンモードでこの分子種を質量分析すると，ETC-1002-CoAの予測質量である*m/z*1092.34862 $[M-H]^-$が検出された。その一ナトリウム体及び二ナトリウム体も存在し，*m/z*はそれぞれ1114.32979 $[M+Na-2H]^-$及び1136.32521 $[M+2Na-3H]^-$であった（図2.6.2.2.1.1-3）。

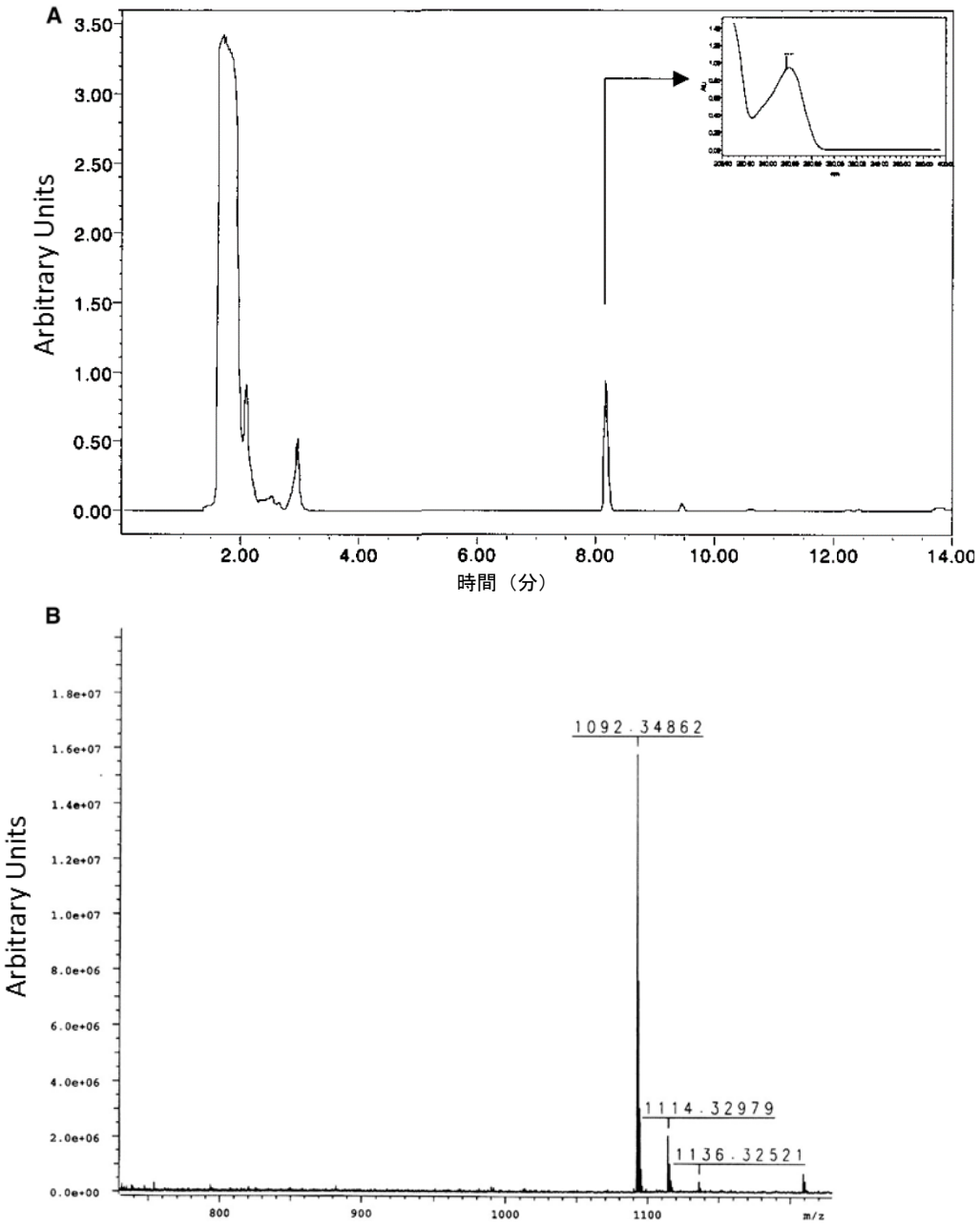


図 2.6.2.2.1.1-3　　ラット肝ミクロソームとの反応によりETC 1002 CoAは形成される（ETI-100-081-RR試験）

パネルA：図は，HPLCのクロマトグラム（254 nmで検出）で，8.1分時点に主ピークがある。挿入図は，8.1分時点のピークのUV吸収スペクトルである。**パネルB**：8.1分時点のピークの質量スペクトルで，　*m/z*1092.34862 $[M-H]^-$とそのナトリウムイオン体が示されている。

ベムペド酸のCoA活性体がACL活性を阻害するか否かを評価するために，セルフリーACL酵素活性評価試験でベムペド酸及びETC-1002-CoAの両方を評価した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-07）[3]。ETC-1002-CoAはヒトACL組み換えタンパク質の活性を濃度依存的に阻害し（図 2.6.2.2.1.1-4，パネルA），一方でベムペド酸は阻害しなかった（図 2.6.2.2.1.1-4，パネルB）。酵素の反応速度論的解析により，ETC-1002-CoAはACLに対してCoAと競合する競合的阻害薬であり（Ki = 2 μM）（図 2.6.2.2.1.1-4，パネルC），ATPとは競合しないことが示された。これらの

試験から，ETC-1002-CoAはACLを直接阻害し，これにより下流の代謝中間体を減少させ，コレステロール及び脂肪酸の*de novo*合成を阻害することが強く裏付けられる。

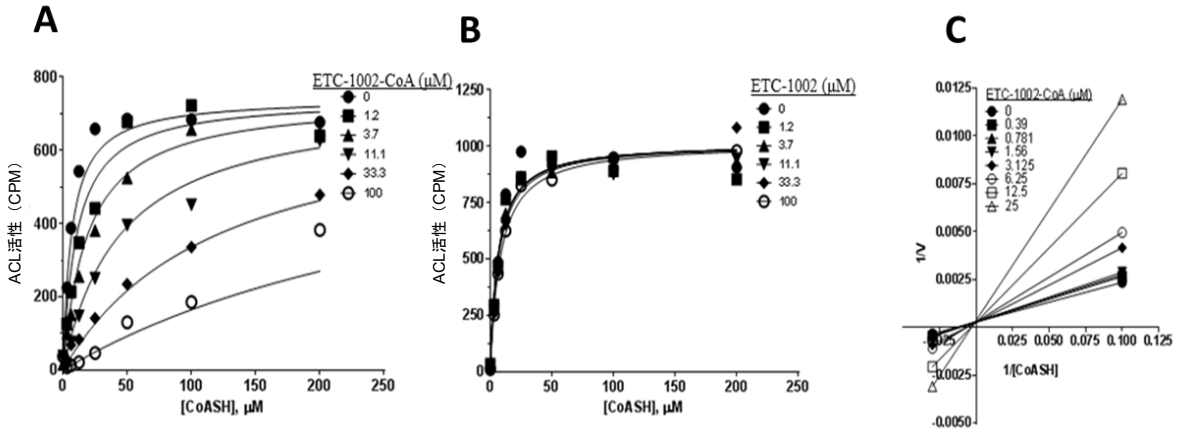


図 2.6.2.2.1.1-4　*In vitro*でETC 1002 CoAはACLを阻害するが，ベムペド酸はACLを阻害しない（RR 1002-100-007試験）

ヒトACL組み換えタンパク質を補因子，ETC-1002-CoA（**パネルA**）又はベムペド酸（ETC-1002；**パネルB**）の存在下で反応させ，[^{14}C]クエン酸の[^{14}C]アセチルCoAへの変換を測定した。ETC-1002-CoAは，CoASHと競合するヒトACL組み換えタンパク質に対する競合的阻害薬である（**パネルC**）。

さらに，図 2.6.2.2.1.1-5に示すとおり，ラット初代肝細胞を用いたさらなる*in vitro*試験でベムペド酸処理は[^{14}C]酢酸（白四角）のステロールへの取り込みを効率的に阻害するが，[^{14}C]メバロノラクトン（白丸）のステロールへの取り込みは阻害しないことが示された（図 2.6.2.2.1.1-5，パネルA）[1]。

これらの所見から，ベムペド酸はメバロン酸合成の1段階上流でステロールの合成を阻害することが示唆される。本試験でのメバロノラクトンからのステロール合成の阻害に対する陽性対照としてスクアレンシンテターゼ阻害薬であるザラゴジン酸を用いた。ベムペド酸がコレステロール及び脂肪酸の生合成経路内の他の重要な律速酵素に影響を及ぼさないことをさらに検討するために，ACC及びHMG-CoA還元酵素の部分精製物を用いてセルフリー酵素活性評価試験を実施したところ，ベムペド酸とETC-1002-CoAはいずれもHMG-CoA還元酵素を阻害しなかった[1]。ミクロソームを用いてACC活性を評価したところ，ベムペド酸はACC活性（[^{14}C]CO_2のマロニルCoAへの取り込みにより測定）も阻害しないことが示された[1]。ETC-1002-CoAエステル（30 μM）はACCを弱く阻害することが示されたが，50%阻害濃度は29 ± 5 μM（平均値 ± SEM，N = 7）に過ぎなかった（図 2.6.2.2.1.1-5，パネルB）[1]。これらの試験から，ベムペド酸とETC-1002-CoAはいずれも脂質生合成経路内の他の律速酵素に大きな影響を及ぼさないことが示された。

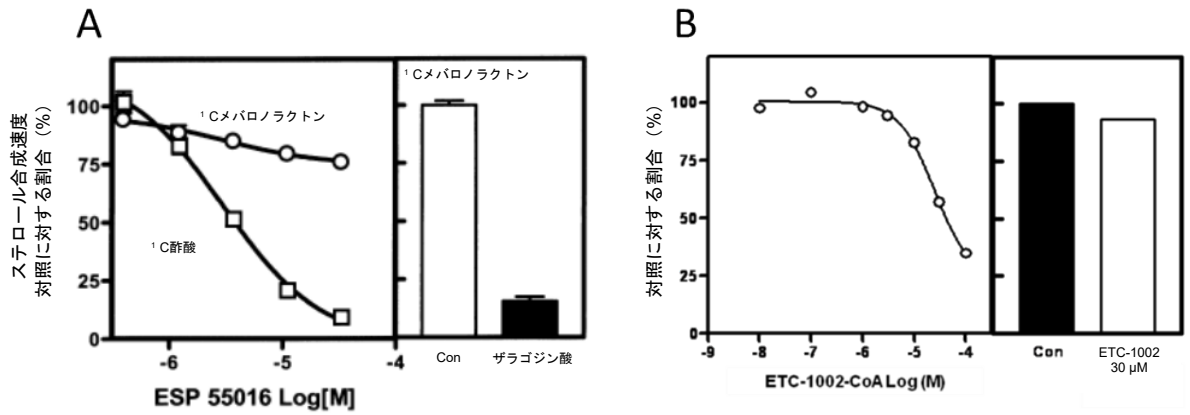


図 2.6.2.2.1.1-5　ベムペド酸はラット初代肝細胞におけるステロール合成を阻害するが，ETC 1002 CoAがACCを阻害する一方でベムペド酸はACCを阻害しない[1]

パネルA：ラット初代培養肝細胞を[^{14}C]メバロノラクトン（丸）は[^{14}C］酢酸（四角）の存在下で0.1%DMSO（溶媒）又はベムペド酸（ESP55016）0.3，1，3，10，30 μMで4時間処理した時のステロールの合成速度。右パネル：[^{14}C]メバロノラクトンからのステロール合成の阻害に対する陽性対照としてスクアレンシンテターゼ阻害薬であるザラゴジン酸（200 nM）を用いた。各データポイントは，同一実験内における3ウェル間の平均値±SEMである。**パネルB：**ETC-1002-CoAによるACC活性の阻害。これらの結果は代表的な実験の結果であり，同じ条件で複数の実験が行われたCon（Control）。右パネル：ベムペド酸（ETC-1002）は30 μMの濃度でACC活性に作用を示さなかった。

2.6.2.2.1.2　ヒト肝臓でのETC-1002-CoAの形成及びETC-1002-CoAシンテターゼの特定

概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-100-007，RR 1002-100-010）

ACLの阻害にはベムペド酸のETC-1002-CoAへの活性化が必要であることが示されていることから，肝臓でのETC-1002-CoA形成を確認し，その合成を触媒するアイソザイムを明らかにするために一連の試験を実施した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-07，4.2.1.1-08）[3]。ACSは26のアイソフォームからなる酵素ファミリーに属し，これらはその組織発現及び基質特異性により大別される。これらのうち11のアイソフォームは，炭素鎖長がC16～C22の脂肪酸を活性化するACSL及びACSVL（FATPとも呼ばれる）サブファミリーのメンバーである[4]。個々のアイソフォームの生理学的役割はほとんど知られていないが，その基質特異性，細胞内局在，及び組織発現パターンは詳細に解明されている。これらの既に定義されている特性を利用して，ETC-1002-CoA形成を触媒する特異的なACSアイソフォーム（以下，ETC-1002-CoAシンテターゼ）を特定するために一連の試験を実施した。最初に，50のヒトプール肝臓から得られた複数の細胞成分分画の活性を測定し，ETC-1002-CoAシンテターゼの細胞内局在を検討した。これらの試験により，ETC-1002-CoAシンテターゼはミクロソーム分画に発現していることが示され，ミトコンドリア分画及び細胞質分画では活性がほとんど認められなかった（図 2.6.2.2.1.2-1，パネルA）。

次に，標準的な動態パラメータを明らかにするためと，以降の試験で至適分析条件を確立するために，ミクロソームのETC-1002-CoAシンテターゼ活性を測定した。ETC-1002-CoAシンテターゼ活性は経時的に，また蛋白濃度の上昇に伴い直線的に上昇し，ATP及びCoAに対して典型的なACSのK_mを示した（図 2.6.2.2.1.2-1，パネルB）。ドナー間のばらつきを検討するために，ドナー8例（男性4例，女性4例）のミクロソーム調製物中のETC-1002-CoAシンテターゼ活性を測定し

たところ，平均活性は784.8 ± 124 pmol/mg/min（平均値 ± SEM）であり，複数のドナー間のETC-1002-CoA形成に一貫性があることが裏付けられた。

ACSの基質特異性はあまり正確でなく，ごく少数の特異的阻害薬しか特定されていないが，これらの特性を解明することによってアイソフォームを識別することができる。ACSの望ましい天然基質を明らかにするために，複数の非標識の天然の短鎖，中鎖，長鎖，及び極長鎖飽和脂肪酸の3倍のモル過剰濃度の存在下で[^{14}C]ETC-1002-CoAシンテターゼ活性を測定した。これらの試験により，C22以上の脂肪酸についてもETC-1002-CoAシンテターゼに対して阻害的に働くが，C12～C20の炭素鎖長の脂肪酸が特に阻害を示した（図 2.6.2.2.1.2-1，パネルC）。短鎖，中鎖，及び長鎖DCAを用いて同様の試験を実施したところ，C16及びC18の炭素鎖長でETC-1002-CoAシンテターゼ活性の強力な阻害が認められた。さらに，ACSVL1/FATP2の効率的な基質として知られるオメガ3脂肪酸であるDHA及びEPAもETC-1002-CoAシンテターゼ活性を顕著に阻害した（図 2.6.2.2.1.2-1，パネルC）。一方，肝臓特異的にACSVL6/FATP5活性を示す胆汁酸リガーゼ活性については，コール酸及びCDCは活性を示さなかったことにより否定された（図 2.6.2.2.1.2-1，パネルC）。

ラット初代肝細胞でトリアクシンCはETC-1002-CoA形成を約40%～50%阻害し，ベムペド酸処理のACL活性及び脂質合成阻害作用を同程度減弱させることがこれまでに示されている（概要表 2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-07）[5]。トリアクシンCは，ACSL1及びACSL4の強力な阻害薬で，ACSLV1の中程度の阻害薬であることが示されている[6, 7]。これを受けて，ヒト肝ミクロソームでトリアクシンCがETC-1002-CoAシンテターゼ活性を直接阻害する可能性を評価した。肝細胞で認められた作用と一致し，トリアクシンCはETC-1002-CoAシンテターゼ活性を約40%～50%阻害した。また，ACSL4の特異的阻害薬[6]であることが示されているTZD系薬は活性を示さなかった（図 2.6.2.2.1.2-1，パネルC，左下）。天然基質によるETC-1002-CoAシンテターゼ活性の阻害が競合的であることを確認するためにLineweaver-Burkプロットを作成したところ，[^{14}C]ベムペド酸との共反応時にパルミチン酸及びヘキサデカン二酸の標準的な競合阻害が示された（図 2.6.2.2.1.2-1，パネルD）。

ETC-1002-CoAシンテターゼとしてのACSVL1の特定をさらに裏付けるために，ヒト肝臓の複数の細胞成分分画を測定したところ，ETC-1002-CoAシンテターゼ活性はACSVL1蛋白量と相関した（$r^2 = 0.984$）（図 2.6.2.2.1.2-1；パネルE）。McArdle細胞にてACSVL1（遺伝子名：*Slc27a2*）の遺伝子サイレンシングを行い，ベムペド酸のCoA形成はACSVL1依存的であることが確認された（概要表2.6.3.1，報告書番号4.2.1.1-08）[3]。McArdle（RH7777）細胞にACSVL1（*Slc27a2*）に対するsiRNAを処理すると，ACSVL1タンパク質発現量が陰性対照siRNAと比較して80%以上低下した。これはETC-1002-CoA形成が85%低下したことと一致した。さらに，ACSVL1のノックダウンはベムペド酸による*de novo*の脂質合成阻害を完全に抑制した（図 2.6.2.2.1.2-1，パネルF）。

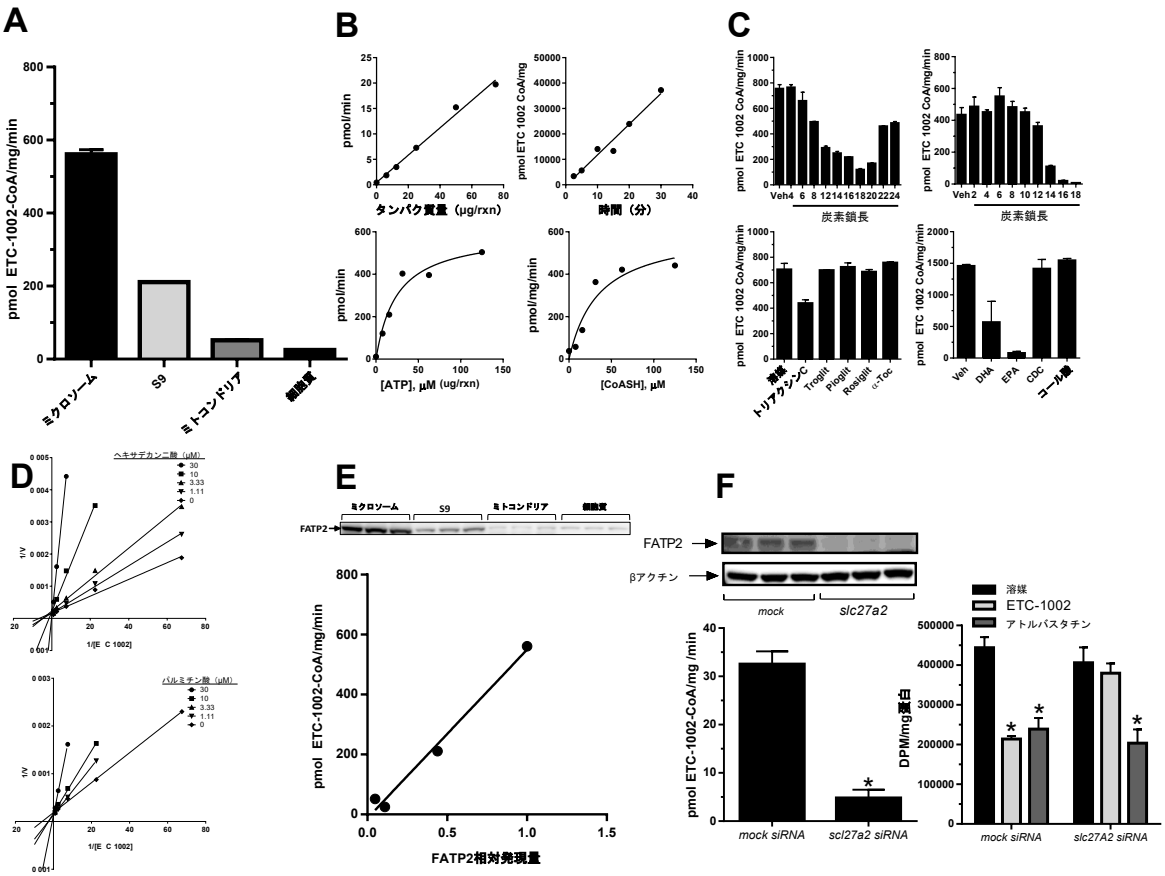


図 2.6.2.2.1.2-1　　ヒト肝臓でのETC 1002 CoAの形成（RR 1002-100-007試験，RR 1002-100-010試験）[3]

パネルA：ヒト肝臓ホモジネートの細胞成分分画を[^{14}C]ベムペド酸とともに反応させ，[^{14}C]ETC-1002-CoAへの変換を測定した。**パネルB**：ヒトミクロソームでETC-1002-CoAシンテターゼ活性を測定し，標準的な反応速度論解析を行った。**パネルC**：ヒト肝ミクロソームでの[^{14}C]ベムペド酸（10 μM）の[^{14}C]ETC-1002-CoAへの変換を30 μMの放射線同位元素非標識の競合的脂肪酸基質（上2つのグラフ），オメガ3脂肪酸であるDHA及びEPA，並びに胆汁酸リガーゼ基質のCDC及びコール酸（右下のグラフ），並びに10 μMの阻害薬のトリアクシンC，Troglit，Pioglit，Rosiglit及びα-Toc（左下のグラフ）の存在下で測定した。**パネルD**：Lineweaver-Burkプロットは，パルミチン酸及びヘキサデカン二酸によるETC-1002-CoAとの競合によるETC-1002-CoAシンテターゼ活性の競合的阻害を示す。**パネルE**：プールしたヒト肝臓ホモジネートの細胞成分分画中のACSVL1（FATP2）発現量をウエスタンブロット法で測定した。各細胞成分分画の相対的なACSVL1発現量をETC-1002-CoAシンテターゼに対してプロットし，線形回帰分析を行った。**パネルF**：McArdle（RH7777）細胞を陰性対照又はslc27a2（ACSVL1）siRNAで48時間処理し，ACSVL1発現量をウエスタンブロット法で測定した。陰性対照及びACSVL1 siRNA処理RH7777細胞の両方を溶媒，ベムペド酸（ETC-1002）30 μM，又はアトルバスタチン（0.5 μM）で処理し，*de novo* コレステロール合成を4時間測定した。データは3回の独立した実験（それぞれトリプリケートにて実施）を示す。*$p < 0.05$

以上より，遺伝子サイレンシング，ヒト肝臓での細胞内局在，基質特異性，及びトリアクシンCに対する感受性はすべて，ACSVL1がETC-1002-CoAシンテターゼであることを裏付ける。

2.6.2.2.1.3　ヒト初代肝細胞でベムペド酸は脂質合成を阻害する

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-100-007）

ベムペド酸による脂質合成の阻害を確認するために，ヒト初代肝細胞で[^{3}H]H_2OのSAP及びnon-SAP脂質分画への取り込みを測定した。3例のドナーからのヒト初代肝細胞をベムペド酸（100 µM）又は対照としてACL阻害薬であるBMS303141（30 µM）で18時間処理した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-07）。[^{3}H]H_2OのSAP及びnon-SAP脂質分画への取り込みは，ベムペド酸及びBMS303141の両方により同程度（約50%～60%）阻害された（図 2.6.2.2.1.3-1，パネルA）。次に，2例のドナーからの初代肝細胞を用いて[^{14}C]酢酸のnon-SAP脂質分画への取り込み速度を測定し，ベムペド酸のステロール合成阻害作用を評価した。肝細胞を3～300 µMのベムペド酸に曝露したときの最大阻害率は55%で，50%阻害濃度（IC_{50}）は9.7 µMであった（図 2.6.2.2.1.3-1，パネルB）。これらの試験により，既知のACL阻害薬と同様に，ヒト肝細胞でベムペド酸は脂質合成の絶対速度を低下させることが示された。

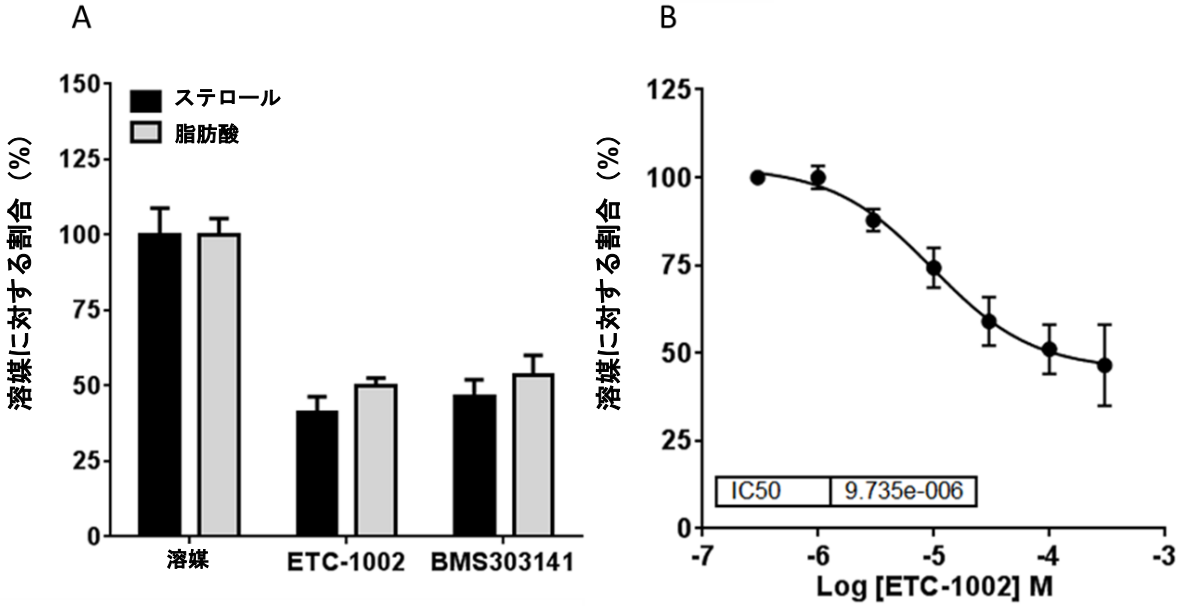


図 2.6.2.2.1.3-1　ヒト初代肝細胞でベムペド酸は脂質合成を阻害する（RR 1002-100-007試験）

パネルA：3例のドナーからのヒト初代肝細胞を[^{3}H]H_2Oの存在下で溶媒，ベムペド酸（ETC-1002；100 µM），又は対照としてACL阻害薬であるBMS303141（30 µM）で18時間処理した。non-SAP脂質分画（ステロール）及びSAP脂質分画（脂肪酸）への取り込み数を算出し，溶媒に対する割合（%）として示した。**パネルB：**2例のドナーからのヒト初代肝細胞を所定濃度のベムペド酸で1時間前処理してから，[^{14}C]酢酸で3時間パルス処理した。non-SAP脂質分画への取り込み数を算出し，対照に対する割合（%）として示した。IC50＝50%阻害濃度。

2.6.2.2.1.4　ACLの阻害によりSREBP2を介した転写が上昇し，LDLR活性が上昇する

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-100-007）

血中LDL-C濃度は，肝臓からのVLDL粒子（LDLの前駆体）の分泌と，肝臓のLDLRを介したLDLのクリアランス速度によって主に制御されている。ヒト初代肝細胞を用いて実施した*in vitro*試験でベムペド酸はVLDL分泌を直接調節しないことが示唆されたため，ベムペド酸がLDLRを制御する可能性を評価した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-07）。肝臓のコレステロール量が減少すると，代償的なSREBP2介在遺伝子転写プログラムが誘導され，コレステロール合成酵素及びLDLRの発現が増加することが知られている[8, 9]。

重要なこととして，これらの作用はHMG-CoA還元酵素阻害薬（スタチン系薬剤）の投与によって生じることが示されており，ヒトでのスタチン系薬剤によるLDL-C低下の主要な機序であることが知られている。ACL活性の低下によりLDLRの発現に対して同様の作用がもたらされるかを明らかにするために，RH7777細胞でsiRNAによるACLの遺伝子サイレンシングを実施した。ACL siRNA処理により，陰性対照siRNA処理細胞と比較し，ACL蛋白量が90%超減少し，これはLDLR蛋白量の50%超増加及びLDLR活性の2倍超上昇と関連した（図 2.6.2.2.1.4-1，パネルA及びパネルB）。これらの結果から，ステロール合成経路でACL活性が重要な役割を果たしていることが示され，薬理学的阻害によるLDL-C低下メカニズムの根拠が示された。siRNA介在ACL遺伝子サイレンシングと同様に，ベムペド酸で処理したRH7777細胞において濃度依存的なLDLR蛋白量の増加と，これに対応する濃度依存的なLDLR活性の上昇が示された（図 2.6.2.2.1.4-1，パネルC及びパネルD）。

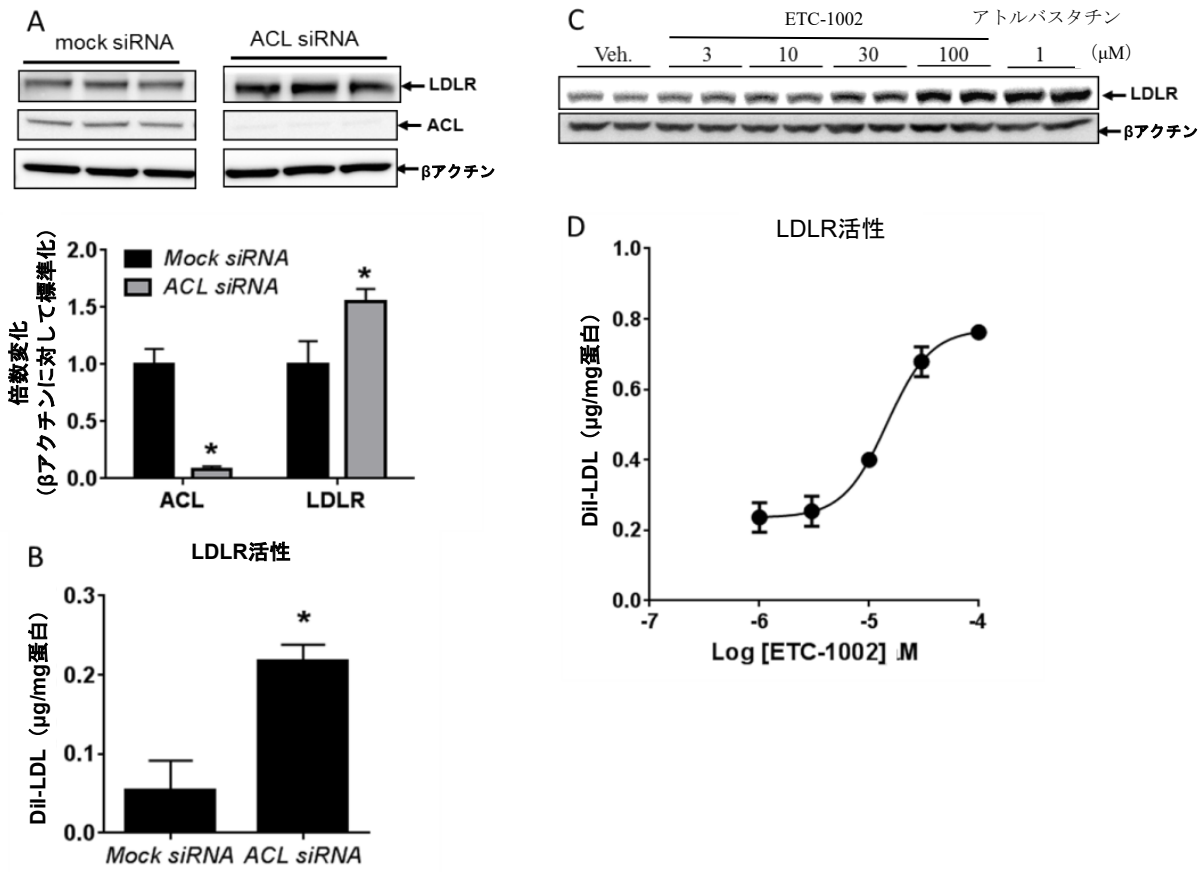


図 2.6.2.2.1.4-1　ACLの阻害はLDLR活性を上昇させる（RR 1002-100-007試験）

RH7777細胞にmock又はACL siRNAを用いた遺伝子サイレンシングを行い，ACL及びLDLRの蛋白量（**パネルA**），あるいはLDLR介在DiI-LDLの取り込み（**パネルB**）を測定した。RH7777細胞を所定濃度のベムペド酸（ETC-1002）で処理し，LDLR（**パネルC**）又はLDLRを介したDiI-LDL取り込み（**パネルD**）をブロットした。アトルバスタチンを陽性対照として用いた。値は平均値 ±SEMである（n = 3ウェル）。比較は対応のないStudentのt検定を用いて行った；*p < 0.05（溶媒との比較）。

ヒト初代肝細胞でベムペド酸によるステロール合成阻害のLDLR活性に対する作用を評価した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-07）。RH7777細胞で認められた作用と同様に，ベムペド酸（100 μM）処理により溶媒処理と比較してLDLR活性が2倍超上昇した（図 2.6.2.2.1.4-2，パネル

A）。スタチン系薬によるHMG-CoA還元酵素阻害と同様に，ベムペド酸によるACL阻害がSREBP2介在遺伝子転写応答を引き起こすかを明らかにするために，ドナー2例から単離したヒト初代肝細胞をベムペド酸（30及び100 μM）又はアトルバスタチン（1 μM）で一晩処理した。

ベムペド酸とアトルバスタチンがともに重要なコレステロール制御遺伝子であるHMG-CoA還元酵素（*HMGR*），SREBP2（*SREBP2*），プロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシン9型（*PCSK9*），及びLDLR（*LDLR*）のmRNAの発現を増加させたことから，ベムペド酸によるACL阻害はスタチン系薬と同様にコレステロール欠乏応答性のmRNA発現を誘導することが示された（図 2.6.2.2.1.4-2，パネルB）。これらの*in vitro*試験において，ベムペド酸はコレステロール合成を阻害することによって，LDLRの発現亢進を介してLDL粒子のクリアランスを亢進させ，血漿中LDL-Cを低下させることが示された。

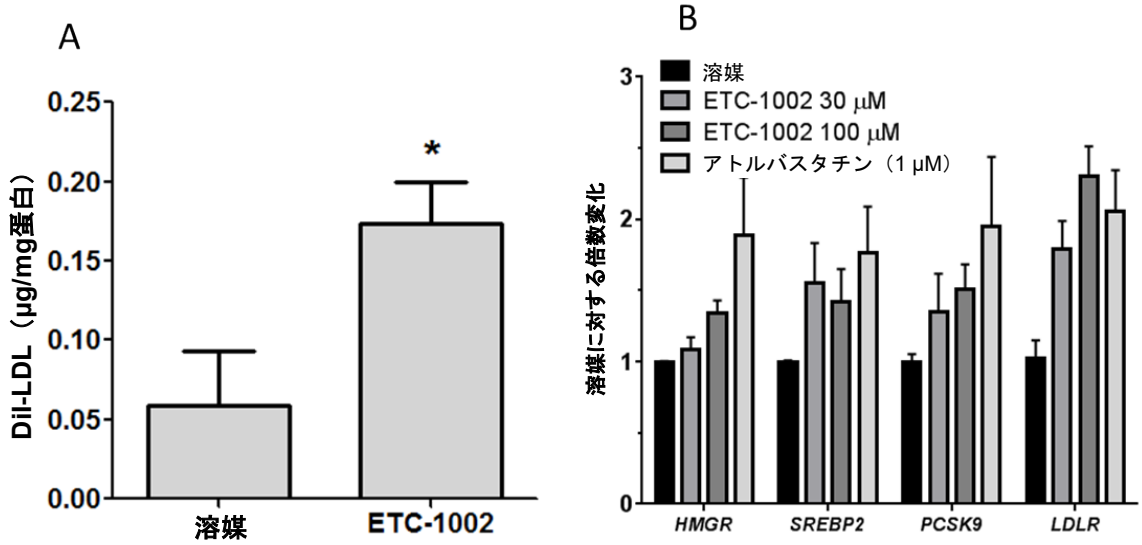


図 2.6.2.2.1.4-2　ヒト初代肝細胞でベムペド酸はLDLR活性を上昇させ，SREBP2を介した遺伝子転写を上昇させる（RR 1002-100-007試験）

パネルA：ヒト初代肝細胞をベムペド酸（ETC-1002；100 μM）で20時間処理し，LDLR特異的DiI-LDLの取り込みを測定した。データは6ウェルの平均値 ± SEMで示す。比較は対応のないStudentのt検定を用いて行った；*$p < 0.05$（溶媒との比較）。**パネルB：**ヒト初代肝細胞を所定濃度のベムペド酸又はアトルバスタチンで18時間処理し，RT-qPCRを用いて*HMGR*，*SREBP2*，*PCSK9*，及び*LDLR*の相対的なmRNA量を測定した。データはドナー2例（各2回）の平均値 ±SEMで示す。

2.6.2.2.2　*In vivo*の効力を裏付ける試験

2.6.2.2.2.1　げっ歯類の正常脂質代謝モデルでのベムペド酸の薬理作用

(1)　ChDを摂取させたSDラット

（概要表2.6.3.1，報告書番号55016-350-001）

げっ歯類の正常脂質代謝モデルでのACL阻害の短期・中期的な薬理作用を評価するために，正常脂質代謝モデルとしてChDを摂取させた雄SDラットにベムペド酸を0.1～100 mg/kg/日の7用量で14日間連日強制経口投与した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-24）。投与前（ベースライン），投与1週間後，及び投与2週間後に血液を採取し，血清脂質を測定した（図 2.6.2.2.2.1-

1）。ベムペド酸100 mg/kg/日投与は血清脂質を改善し，1週時点でVLDL-Cは67%減少し（$p < 0.05$，ベースラインとの一対比較），LDL-Cは43%減少した。これらの変化は，1週時点のnon-HDL-Cの48.5%減少に反映された。ベムペド酸100 mg/kg/日投与は総コレステロールを1週時点では変化させず，2週時点で35%の増加が認められた。ベースラインとの比較で，30及び100 mg/kg/日投与でのHDL-Cは1週時点にはそれぞれ35.0%及び10.2%増加し，2週時点にはそれぞれ12.4%及び40.4%増加した。100 mg/kg/日でのHDL/(VLDL+LDL)比は，1週時点には有意に2.6倍に上昇し，2週時点には1.9倍に上昇した。ベースライン値との比較で，100 mg/kg/日投与での血清中TG値は，1週時点に53%低下し，2週時点には変化を認めなかった。血清中のNEFA濃度は，1週時点には大半の用量で概して低下していたが，2週時点には変化を認めなかった。ベムペド酸は2週時点で1 mg/kgを除く0.3 mg/kg/日以上の全用量でβ-HBAを用量依存的かつ有意に増加させた（100 mg/kg/日では3.7倍）。げっ歯類モデルで認められた血清脂質及びリポ蛋白の変化は薬理学的な脂質制御を示し，代謝の代償又は「リバウンド」反応によって，初期の変化（1週間後）は2週間後には認められなくなる[10]。低用量での代謝の代償反応による薬理作用の消失は，ベムペド酸で認められているように，より高い薬理学的曝露量によって克服される場合が多い。

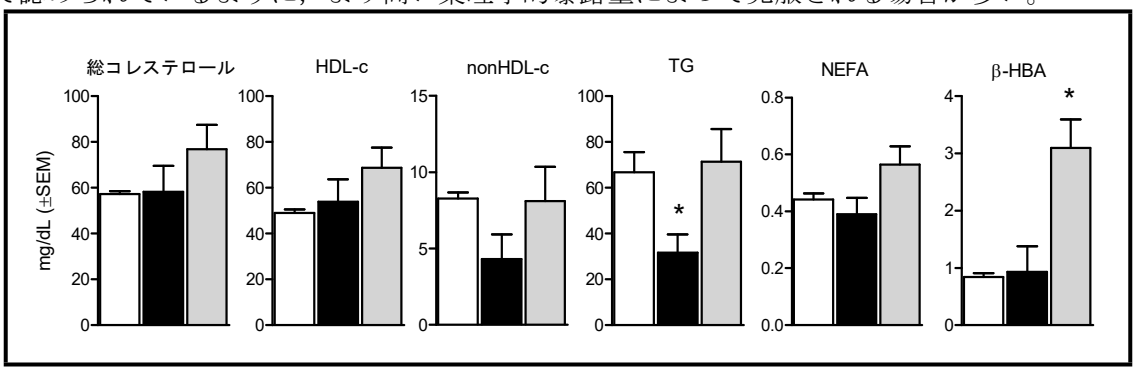


図 2.6.2.2.2.1-1　ChDを摂取させた雄SDラットにベムペド（100 mg/kg/日）を2週間投与したときの血清中の脂質及びリポ蛋白濃度（55016-350-001試験）

ベースライン（白色バー），ベムペド酸100 mg/kg/日の投与1週間後（黒色バー）及び投与2週間後（灰色バー）の血清中の総コレステロール， HDL-C，non-HDL-C，TG，NEFA，及びβ-HBA。値は平均値 ± SEMである（n = 5）。*対応のあるt検定によるベースラインとの比較での有意差（$p < 0.05$）を示す。

(2)　ChDを摂取させた雌Golden Syrianハムスター

（概要表2.6.3.1，報告書番号ETl-100-071-RR）

正常脂質代謝モデルとしてChDを摂取させた雌Golden Syrianハムスターを用いて，ベムペド酸3，10，30又は100 mg/kg/日を3週間連日強制経口投与した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-20）。ベムペド酸投与によりnon-HDL-C（LDL-C + VLDL-C）値は10, 30mg/kg投与のみWeek1-2で上昇した（代償的な反応の可能性がある）。一方，HDL-C値の有意な増加は3 mg/kg投与ではWeek 1と3，10 mg/kg投与ではWeek 1～3，30及び100 mg/kg投与ではWeek 3のみで認められた（対応するt検定によるベースラインとの比較；$p < 0.05$）。

2.6.2.2.2.2　食事誘発性高コレステロール血症モデルでのベムペド酸の薬理作用

(1)　SDラットの食事誘発性脂質生合成モデル

（概要表2.6.3.1，報告書番号ETI-100-087-RR，ETI-100-088-RR，ETI-100-090-RR，ETI-100-096-RR）

SDラットを用いた食事又はコレスチラミン誘発性の脂質生合成モデルを用いて，ベムペド酸の脂質合成に対する薬理作用を評価した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-09，4.2.1.1-10，4.2.1.1-11，4.2.1.1-13）。ETI-100-087-RR試験では溶媒若しくはベムペド酸3，10，30又は100 mg/kgを強制経口投与し，ETI-100-096-RR試験では溶媒又はベムペド酸30 mg/kg/日を投与した。

被験物質の投与1時間後に[^{14}C]酢酸を腹腔内（IP）注射した。この1時間後に安楽死させ，血清，肝臓，及び腓腹筋を採取し，SAP脂質（脂肪酸）及びnon-SAP脂質（ステロール）の組織抽出物を分析した。ベムペド酸はすべての用量において，血清及び肝臓中のSAP生成物及びnon-SAP生成物への[^{14}C]酢酸の取り込み速度を低下させた（図 2.6.2.2.2.2-1）。100 mg/kgで，血清中のSAP脂質及びnon-SAP脂質への酢酸の取り込みは77%低下し，肝臓中のSAP脂質及びnon-SAP脂質への酢酸の取り込みはそれぞれ86%及び77%低下した。筋肉中の[^{14}C]酢酸標識SAP脂質量はベムペド酸処理により顕著に変化しなかった。筋肉中のnon-SAP脂質の変化は，組織の脱血が一定ではなかったためかばらつきが大きく，明らかな用量依存性は認められなかった。

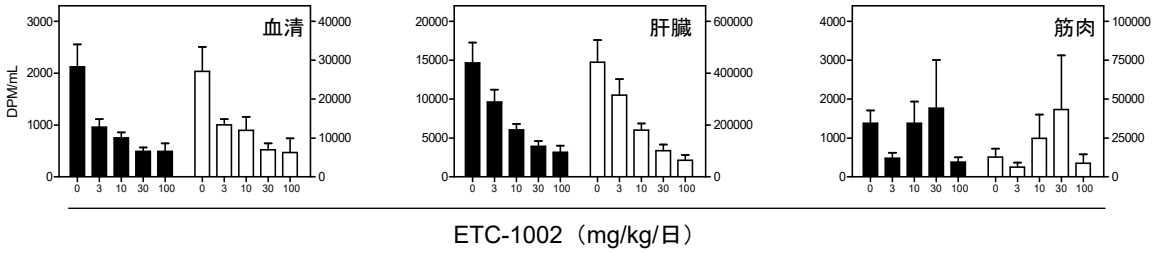


図 2.6.2.2.2.2-1　SDラットの食事誘発性脂質生合成モデルにおいて，ベムペド酸は血清，肝臓non-SAP脂質及びSAP脂質を減少させる（ETI-100-087-RR試験）

SDラットの食事誘発性脂質生合成モデルでのベムペド酸（ETC-1002）単回投与の血清，肝臓，及び筋肉由来脂質に対する作用。バーは平均値 ± SEMを示す［non-SAP脂質（黒色バー；左Y軸）及びSAP脂質（白色バー；右Y軸）でn = 4又は5］。

コレスチラミンを摂取させたラットでのベムペド酸30 mg/kg/日の血清及び肝臓中の脂質に対する作用（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-10）は，食事誘発性高コレステロール血症モデルラットで認められた作用と同様であった。

絶食後に高炭水化物食を摂取させたSDラットでのベムペド酸の薬理作用は顕著であったが，脂質生合成低下モデルでのベムペド酸の作用は明らかにされていなかった。雄SDラットを48時間絶食したところ，血清及び肝臓の有機可溶性分画への[^{14}C]酢酸の基礎的な取り込みはそれぞれ1/50～1/90に低下した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-11，4.2.1.1-13）。本モデルにおいて，ベムペド酸0.3，1，3又は10 mg/kgを単回経口投与したところ，血清及び肝臓中の脂質合成速度に顕著な変化は認められなかった（図 2.6.2.2.2.2-2）。この結果から，脂質生合成速度が生理的に到

達可能な最低レベルまで低下している場合，薬理学的介入によりさらなる作用は得られないことが示された。

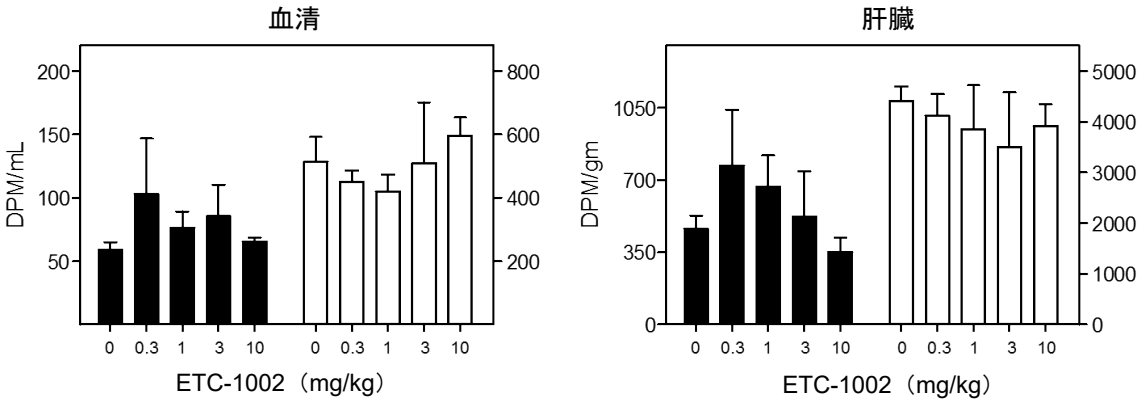


図 2.6.2.2.2.2-2　絶食下SDラットにおいて，ベムペド酸は血清又は肝臓中のnon-SAP脂質及びSAP脂質の生成速度に影響を及ぼさないETI-100-088-RR試験）

絶食下SDラットでのベムペド酸（ETC-1002）単回投与の血清及び肝臓由来脂質に対する作用。バーは平均値±SEMを示す［non-SAP脂質（黒色バー；左Y軸）及びSAP脂質（白色バー；右Y軸）でn＝5］。

(2)　雄Golden Syrianハムスターの脂質異常症モデル

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-150-002）

ベムペド酸が食事誘発性脂質異常症に関連する組織及び血漿パラメータに有益な影響を及ぼすか否かを明らかにするために，HFHC食を摂取させた雄Golden Syrianハムスターを用いて試験を実施した。HFHC食を摂取させたハムスターにベムペド酸3，10又は30 mg/kg/日，若しくはフェノフィブラート100 mg/kg/日を3週間経口投与した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-06）。ベムペド酸の投与により肝臓中のETC-1002濃度の用量依存的な増加，及び体重増加の用量依存的な減少［最大減少率13.4%（$p < 0.01$）］が認められたが，摂餌量，並びに血漿中ALT及びASTに有意な変化は認められなかった。アテローム生成を促進するリポ蛋白であるLDL及びVLDLのコレステロール量に関して，ベムペド酸30 mg/kg/日を投与したハムスターでのLDL-C及びVLDL-C値はそれぞれ71%及び64%低下したが（$p < 0.05$）（図 2.6.2.2.2.2-3），HDL-C値は変化しなかった。さらに，ベムペド酸30 mg/kg/日の投与によって，肝臓中のTG（−64%，$p < 0.001$），コレステロールエステル（−67%，$p < 0.05$）及び遊離コレステロール（−31%，$p < 0.05$）量の減少が認められ（図 2.6.2.2.2.2-4），これは血漿中のTG（−49%，$p < 0.05$）及び総コレステロール（−41%，$p < 0.05$）の減少を伴った（図 2.6.2.2.2.2-5）。

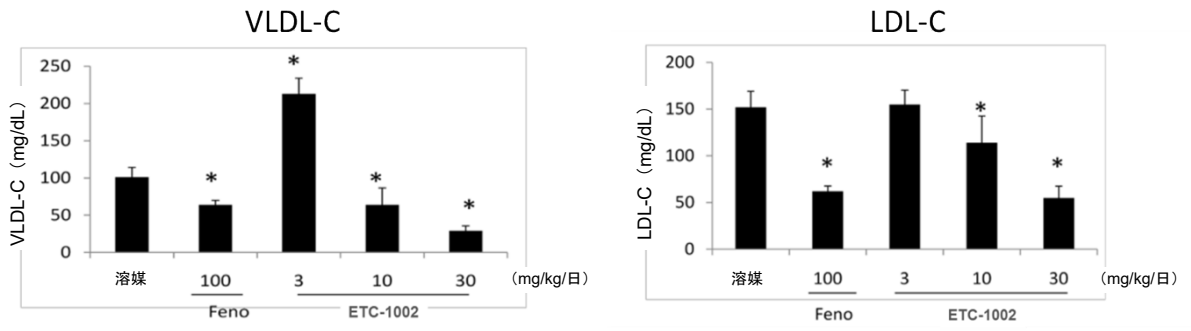


図 2.6.2.2.2.2-3　HFHC食を摂取させたハムスターにおける、ベムペド酸のVLDL-C及びLDL-Cに対する作用（RR 1002-150-002試験）[11]

ハムスターにFeno又はベムペド酸（ETC-1002）を3週間投与後に18時間絶食させてから血液を採取し，高速タンパク質液体クロマトグラフィーで血漿中のリポ蛋白を分画し，リポ蛋白のコレステロール値を測定した。*溶媒対照との比較での統計学的有意差（$p < 0.05$）を示す。

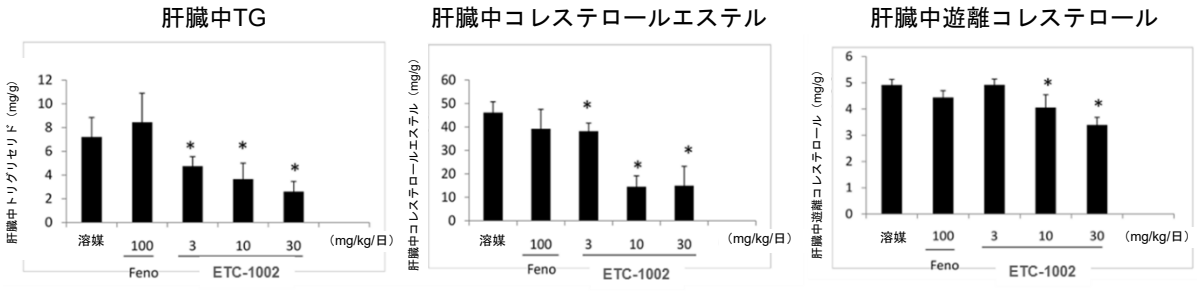


図 2.6.2.2.2.2-4　HFHC食を摂取させたハムスターにおける、ベムペド酸の肝臓中TG量，コレステロールエステル，及び遊離コレステロールに対する作用（RR 1002-150-002試験）[11]

ハムスターにFeno又はベムペド酸（ETC-1002）を3週間投与後に18時間絶食させてから肝臓試料を採取し，HPLC-ELSDでTG，コレステロールエステル，及び遊離コレステロールを測定した。*溶媒対照との比較での統計学的有意差（$p < 0.05$）を示す。

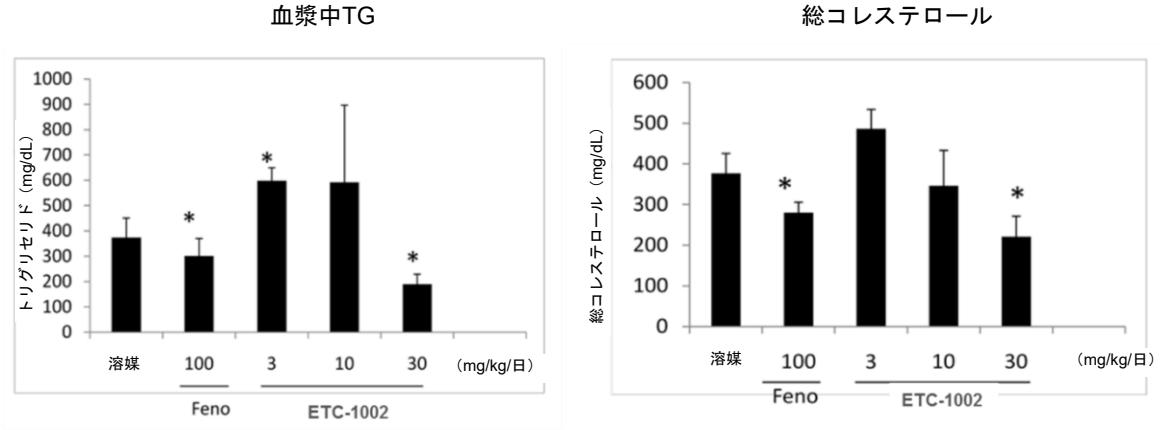


図 2.6.2.2.2.2-5　HFHC食を摂取したハムスターにおける、ベムペド酸の血漿中TG及び総コレステロールに対する作用（RR 1002-150-002試験）[11]

ハムスターにFeno又はベムペド酸（ETC-1002）を3週間投与後に18時間絶食させてから血液を採取し，血漿中の

TG及び総コレステロールを測定した。*溶媒対照との比較での統計学的有意差（$p < 0.05$）を示す。

2.6.2.2.2.3　遺伝的高コレステロール血症モデルにおけるベムペド酸の薬理作用

（概要表2.6.3.1，報告書番号ETI-100-069RR，ETI-100-072-RR，ETI-100-086-RR）

肥満Zucker Fattyラットは，ヒト様メタボリックシンドロームを誘発するレプチン受容体変異を有する。本モデルの病態は進行性であり，VLDL-C上昇，HDL-C低下，ケトン体産生増加を伴う高TG血症，インスリン感受性低下，過食，及び肥満を示す。本モデルにおいて，ベムペド酸が代謝性疾患の病態に及ぼす影響を評価した。1.5%CMC/0.2% Tween-20［v/v］又は20%エタノール/80%ポリエチレングリコール200を混合したものを溶媒として用いて複数の試験を実施した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-12，4.2.1.1-18，4.2.1.1-19）。これらの各試験で動物に溶媒又はベムペド酸を1～100 mg/kg/日で2週間連日経口投与した。ベムペド酸の2週間投与によりHDL-Cの用量依存的な上昇が示され，両溶媒データを統合した場合，投与前との比較で10，30又は100 mg/kgでそれぞれ1.57，2.45，及び2.79倍に上昇した（図 2.6.2.2.2.3-1）。これらの試験のデータを統合したところ，投与前との比較で，HDL-C増加の最小有効用量は10 mg/kgであり，投与1及び2週間後に認められた。

ベムペド酸の投与は総じてnon-HDL-C（VLDL-C＋LDL-C）低下を引き起こした。本モデルのnon-HDL-Cは，LDL-Cがごくわずかしか存在しないため，大部分がVLDL-C分画に含まれる。ベムペド酸のnon-HDL-Cに対する作用は一貫性がなく，両溶媒データを統合した場合，投与1週間後に（10 mg/kgを除く）ほぼすべての用量でnon-HDL-Cの低下が認められたが，投与2週間後には10及び30 mg/kgでそれぞれ1.38及び1.33倍の上昇が認められた。げっ歯類の疾患モデルにおいて，他の脂質制御化合物でも薬理学的なリバウンド作用が認められている。ただし，ベムペド酸100 mg/kgでは投与1及び2週間後のnon-HDL-Cがそれぞれ81%及び80%低下した。non-HDL-C低下の最小有効用量は1 mg/kgであり，投与1週間後に認められた。

ベムペド酸は用量依存的に血清TG値の低下を引き起こし，すべての用量で投与1週時点の低下は投与2週間後より大きかった。投与1週間後にベムペド酸は1，3，10，30，及び100 mg/kgの用量で溶媒投与群と比べてTG値をそれぞれ16%，30%，52%，78%及び91%低下させることが示された。このデータは，投与2週間後のTG値の「リバウンド」による上昇が高用量ではより小さいことを裏付ける（図 2.6.2.2.2.3-1）。

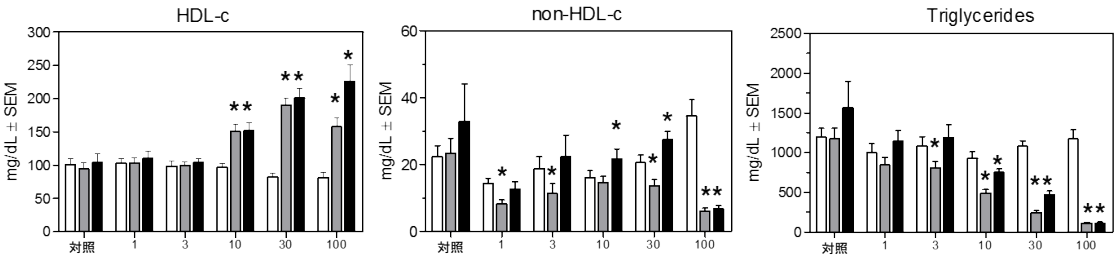


図 2.6.2.2.2.3-1　肥満Zuckerラットにベムペド酸を2週間投与したときの脂質及びリポ蛋白値に対する作用（ETI-100-072-RR試験）

ベースライン時（白色バー），並びにベムペド酸1，3，10，30，又は100 mg/kg/日の投与1週間後（灰色バー）及び投与2週間後（黒色バー）の血清中のHDL-C，non-HDL-C，及びTG。値は平均値 ± SEMである（n = 8-17/群）。*対応のあるt検定によるベースラインとの比較での有意差（$p < 0.05$）を示す。

ベムペド酸の投与1及び2週間後に血清中NEFAの変化が認められた。2試験の2週時点の統合データから，ベムペド酸は1，3，10，30及び100 mg/kg/日で溶媒投与群と比べて血清中NEFAをそれぞれ30%，28%，39%，44%及び47%低下させることが示された（図 2.6.2.2.2.3-2）。NEFA低下の最小有効用量は1 mg/kg/日であり，投与1週間後に認められた。ベムペド酸に依存的な血清中TG値及びNEFAの低下から脂肪酸の*de novo*合成低下及びTGの代謝利用亢進が示唆され，これは細胞を用いた試験結果と一致する。本モデルでの過食及び代謝調節障害の進展はWeek 1からWeek 2までの2試験の統合データにおけるβ-HBA生成の72%上昇により示されるが，ベムペド酸はTG及びNEFA値の低下と関連してβ-HBA生成をさらに上昇させた。ベムペド酸は10 mg/kg/日以上の用量で投与1及び2週間後に血清中β-HBAを有意に上昇させた（図 2.6.2.2.2.3-2）。ベムペド酸は試験期間中を通じて体重増加を抑制し，2試験の統合データにおいて30及び100 mg/kg/日の用量でそれぞれ38%及び61%抑制した（図 2.6.2.2.2.3-2）。

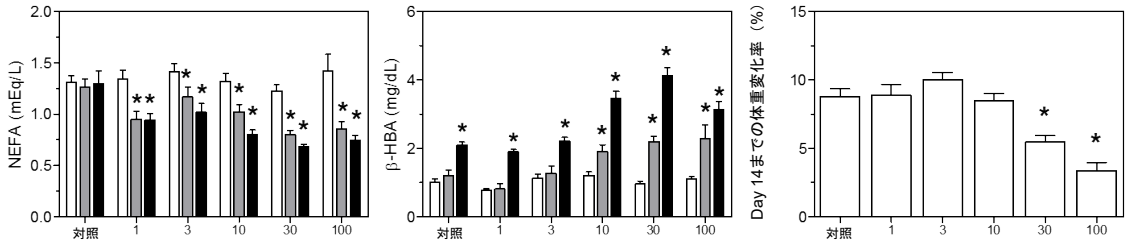


図 2.6.2.2.2.3-2　Zuckerラットにベムペド酸を2週間投与したときのNEFA，βHBA，及び体重増加に対する作用（ETI-100-072-RR試験）

ベースライン時（白色バー），並びにベムペド酸1，3，10，30及び100 mg/kg/日の投与1週間後（灰色バー）並びに投与2週間後（黒色バー）の血清中のNEFA及びβ-HBA。投与14日後の体重増加は右側のグラフに示す。値は平均値 ± SEMである（n = 8-17/群）。*対応のあるt検定によるベースラインとの比較での有意差（$p < 0.05$）を示す。（体重増加のみ対応のない両側t検定を実施。）

2.6.2.2.2.4　遺伝子改変した食事誘発性動脈硬化症モデルでのベムペド酸の薬理作用

(1)　ApoE KOマウス

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-150-008）

ApoEノックアウト（ApoE KO；*Apoe*$^{-/-}$）マウスは，脂質異常症及びアテローム性動脈硬化症の一般的なモデルマウスである[12, 13, 14]。重要なこととして，これらのマウスでは，LDLR機能が正常に維持されているなかで，ウェスタンダイエットの摂取によってコレステロール濃度がHDL分画からVLDL及びLDL分画へと劇的にシフトする。HFCDを摂取させ，左頸動脈を結紮した*Apoe*$^{-/-}$雄マウスにおける血清中脂質プロファイル及び血管病変形成に対するベムペド酸の薬理作用を評価した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-04）。雄*Apoe*$^{-/-}$マウス30例を3群（n = 10/群）に分け，HFCDとして高脂肪（45%，大部分がバター）高コレステロール（0.9%）食をDay 0から6週間摂取させた。Day 14に全動物に左総頸動脈結紮術を実施した。Day 28に1群（10例）の剖検を実施し，組織及び血液試料を採取した。Day 28（術後14日時点）より，各群（各10例）に溶媒（0.5% CMC）又はベムペド酸30 mg/kg/日を14日間（Day 28～42）連日強制経口投与した。HFCD

（Day 0～28）の4週間摂取によって，血清中の総コレステロール値は530 ± 55 mg/dLから680 ± 36 mg/dLに上昇し（p < 0.05），LDL-C値は91 ± 6 mg/dLから160 ± 8 mg/dLに上昇した（p < 0.05）。溶媒群と比較して，ベムペド酸の2週間投与群ではLDL-C値は61%低下した（溶媒151 ± 10 mg/dL；ベムペド酸59 ±4 mg/dL，p < 0.001（図 2.6.2.2.2.4-1）。ベムペド酸を投与した動物において，VLDL-Cは580 ± 29 mg/dLから712 ± 47 mg/dLに上昇し（p = 0.03），HDL-Cは2 ± 1 mg/dLから8 ± 1 mg/dLに上昇した（p < 0.001）。ベムペド酸の投与によって血管中コレステロールエステル量が溶媒投与動物と比較して減少傾向を示したが，統計学的有意な差はなかった。

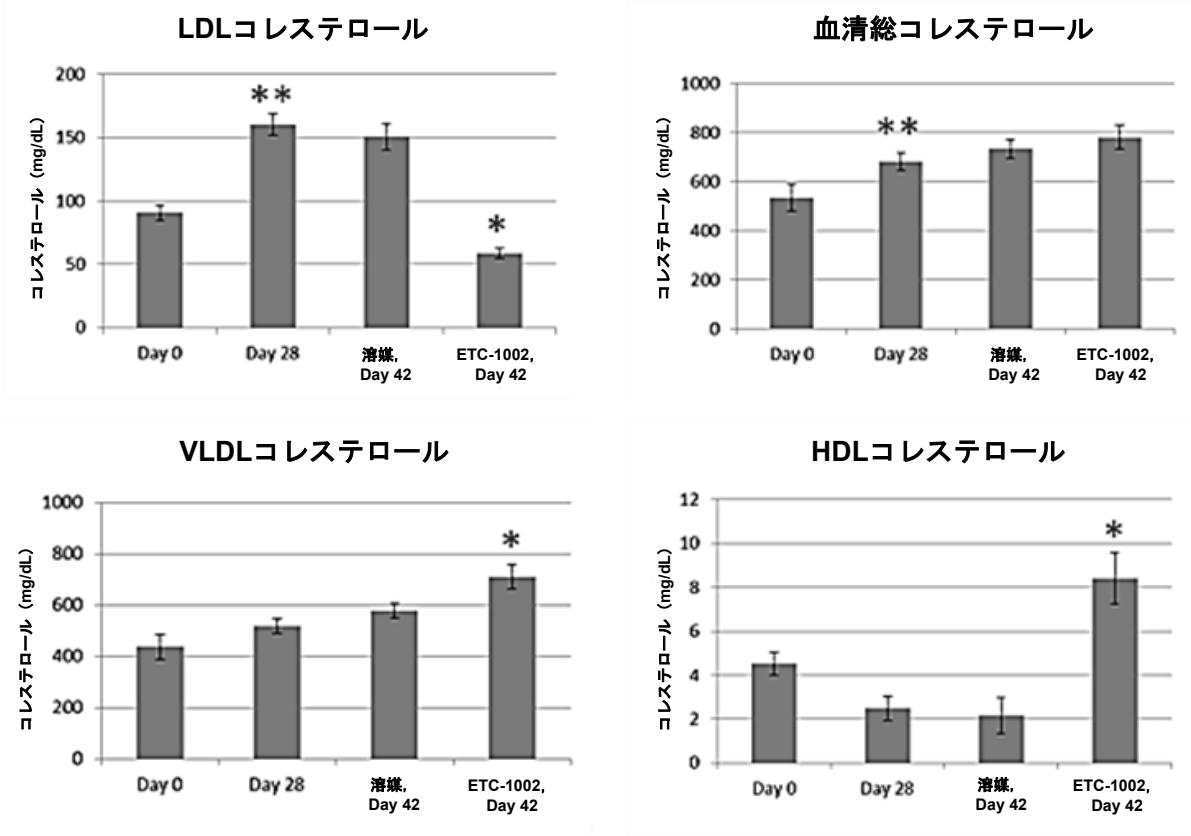


図 2.6.2.2.2.4-1　HFCDを6週間摂取させたApoE KOマウスでのベムペド酸の血清中の総コレステロール及びリポ蛋白コレステロール濃度に対する作用（RR 1002-150-008試験）

HFCDを6週間摂取させたApoE KOマウスにおけるベムペド酸（ETC-1002）30 mg/kg/日（4週目から2週間投与）のLDL-C，血清総コレステロール，VLDL-C及びHDL-Cに対する作用。データは10例/群の平均値（mg/dL） ± SEMで示す。*溶媒との比較での有意差（p < 0.05）を示す。**Day 0（対照）との比較での有意差（p < 0.05）を示す。

(2)　ApoEとAMPKβ1のDKOマウス

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR1002-150-017）

初期の検討でベムペド酸の作用機序としてACLの阻害はAMPK経路の活性化を伴うことが示された（2.6.2.3.1.4項で考察）。AMPKは，炎症性シグナル及び脂質代謝に関与する多くの基質のリン酸化を触媒する代謝センサーである。ACL経路とAMPK活性の制御はいずれも血中のアテローム生成性リポ蛋白量に影響を及ぼす可能性があることから，ベムペド酸のLDLR依存性コレステ

ロール低下作用及び抗アテローム作用に対するこれらの経路の重要性を評価した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-02）[3]。*Apoe*$^{-/-}$マウスとAMPK β1ノックアウトマウスを交雑してDKOマウスを作製した。*Apoe*$^{-/-}$マウス及びDKOマウスに溶媒又はベムペド酸30 mg/kg/日を連日経口投与し，HFHC食を12週間摂取させた。予測されたとおり，DKOマウスにおいて肝臓でのAMPK活性の劇的な（90%超の）低下が示された。AMPK活性はAMPKαのT172のリン酸化（活性化）とその下流の基質であるACCのリン酸化の有意な低下を検出した（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルA）。これまでの結果と同様に，ETC-1002-CoAはβ1選択的AMPK活性化を制御し，ベムペド酸は*Apoe*$^{-/-}$マウスで肝臓のAMPK活性を上昇させるが，DKOマウスでは上昇させないことが示唆された（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルA）。陰性対照として骨格筋を用いて，*Apoe*$^{-/-}$マウス由来肝臓におけるACSVL1発現も確認した（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルB）。

HFHC食を摂取させたマウスでは，ChDを摂取させたマウスと比較して，有意な体重増加，肥満，空腹時血糖値上昇，及び耐糖能低下が示され，これらのパラメータに関して，遺伝子型及びベムペド酸（30 mg/kg/日）投与による統計学的有意差は認められなかった。*Apoe*$^{-/-}$マウスにおいて，HFHC食の摂取によりVLDL-C（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルC），LDL-C（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルD），及び総コレステロール（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルF）が2.5倍超上昇したが，血漿リポ蛋白プロファイルに遺伝子型間で差は認められなかった。*Apoe*$^{-/-}$マウス及びDKOマウスの両方において，ベムペド酸の投与によりLDL-Cが同程度低下し（それぞれ38%及び44%）（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルD），他のリポ蛋白分画に対する作用は認められなかった（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルC及びE）。ベムペド酸はLDL-Cを顕著に低下させたが，*Apoe*$^{-/-}$マウスは血漿中のコレステロールの大部分をVLDL分画で保持していることから，この作用は血漿総コレステロールのわずかな低下と対応しているに過ぎず（*Apoe*$^{-/-}$マウス18%，DKOマウス13%），DKOマウスではこの作用は統計学的に有意な差はなかった（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルF）。HFHC食摂取及びベムペド酸投与の肝臓中脂質に対する作用を評価したところ，*Apoe*$^{-/-}$マウスにおいてHFHC食摂取は肝臓中のコレステロール量を約2倍に増加させ，この作用はベムペド酸投与によりほぼ完全に阻害された（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルG）。HFHC食摂取により肝臓中のTGも約2倍増加した。両遺伝子型でベムペド酸投与は肝臓中のTG増加を完全に阻害し，*Apoe*$^{-/-}$マウス及びDKOマウスでそれぞれ74%及び69%減少した（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルH）。

肝臓での脂質生合成速度及び脂肪酸酸化速度の変化は，肝臓の脂質量の重要な制御因子である。*Apoe*$^{-/-}$マウス及びDKOマウスの両方において，脂質生合成の低下と脂肪酸酸化の上昇と同じく，ベムペド酸は暗期（摂餌下）のRERを低下させたが（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルI及びJ），明期（絶食下）には作用が認められなかった（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルI及びK）。*In vivo*でのAMPK依存性の有無をさらに検討するために，AMPK β1 KOマウス由来の初代肝細胞を用いて検討したところ，*in vivo*で認められたAMPK非依存性の肝臓脂質及びRERの低下と同様に，WT肝細胞及びAMPK β1 KO肝細胞の両方でベムペド酸は総脂質合成を阻害した（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルL）。これらのデータから，ベムペド酸はAMPK非依存的経路を介してLDL-C，並びに肝臓中のTG及びコレステロールを低下させることが示された。

ベムペド酸がLDL-Cを低下させる機序を検討した。これまでにベムペド酸の脂質合成及び肝臓中のコレステロールに対する作用が明らかになっていることから，ここではAMPK β1の存在下又

は非存在下での肝臓SREBPに依存した遺伝子発現に対するベムペド酸の作用を検討した。興味深いことに，DKOマウスでの*Srebf2*の発現は*Apoe*$^{-/-}$マウスより増加していたが，遺伝子型による血漿中LDL-C値への影響が認められないことと一致して，この*Srebf2*発現増加はさらなる*Ldlr*発現上昇をもたらさなかった。また*Acly*の発現に遺伝子型間で差は認められなかった。重要なこととして，*Apoe*$^{-/-}$マウス及びDKOマウスの両方において，HFHC食摂取群と比較して，ベムペド酸は*Srebf2*及び*Ldlr*の発現を2倍超増加させ（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルM），この作用はベムペド酸を投与したマウスから採取した肝臓切片中の細胞膜におけるLDLRの発現上昇によってさらに裏付けられた（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルN）。両遺伝子型でベムペド酸は*Pcsk9*，*Acly*及び*Srebf1c*も増加させた（ただし，DKOマウスでは統計学的有意でなかった）。*Srebf2*と同様に，DKOマウスでの*Slc27a2*（ACSVL1）の発現は*Apoe*$^{-/-}$マウスより増加しており，ベムペド酸投与によっても増加したことから（図 2.6.2.2.2.4-2，パネルM），*Slc27a2*はSREBP2による転写制御も受けている可能性が示された。*Apoe*$^{-/-}$ / AMPK β1 DKOマウス及び初代肝細胞でのこれらの所見から，ベムペド酸がLDL-Cを低下させる機序としては，AMPK非依存性のコレステロール合成阻害に反応した代償的なSREBP2依存性のLDLR発現増加であることが示された。

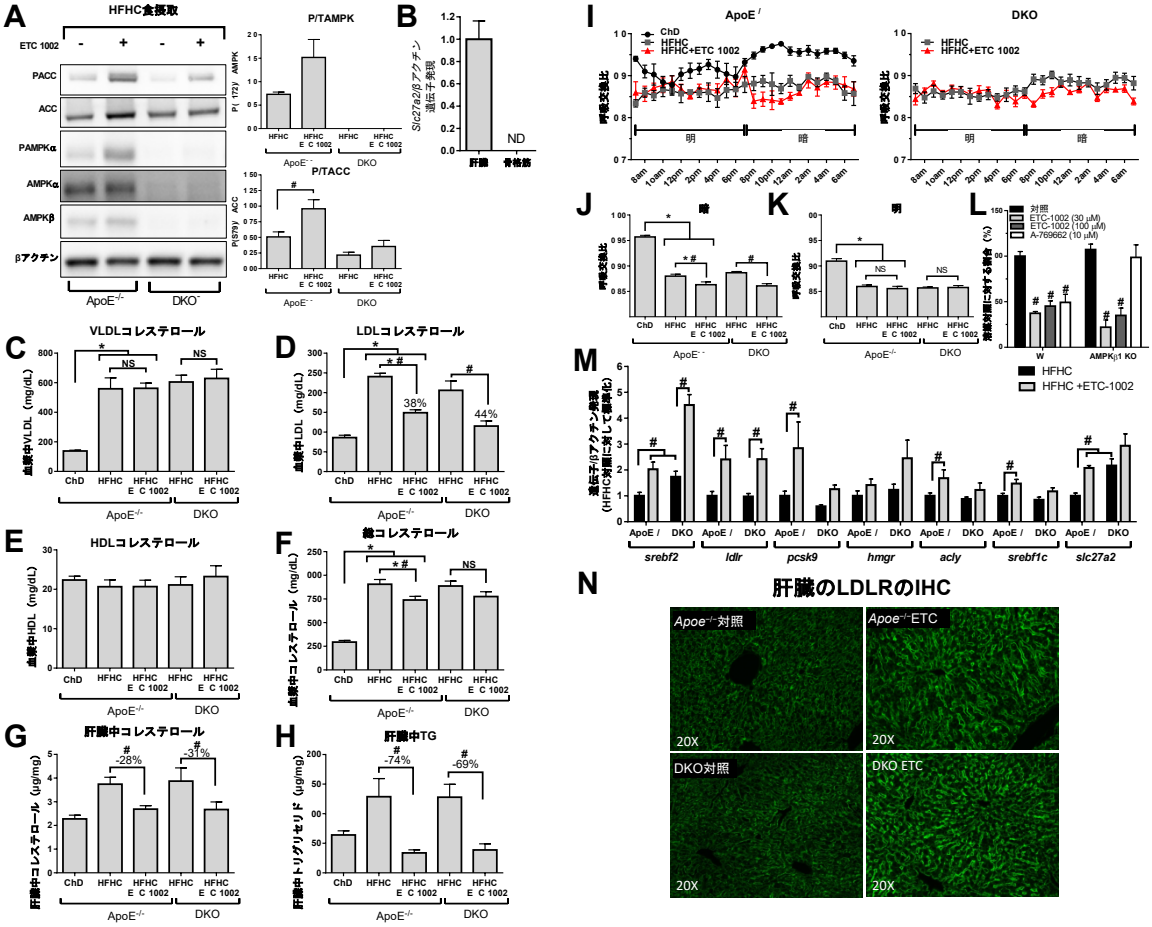


図 2.6.2.2.2.4-2　ApoE KO（*Apoe*−/−）マウス及びDKO（*Apoe*−/− /AMPK β1−/−）マウスにおいて，ベムペド酸は肝臓中の脂質を減少させ，LDLRの発現を増加させ，LDL-Cを減少させた（RR 1002-150-017試験）[3]

Apoe$^{-/-}$マウス及び*Apoe*$^{-/-}$ / AMPK β1$^{-/-}$（DKO）マウスにベムペド酸（ETC-1002）を30 mg/kg/日投与し，HFHC

食を12週間摂取させた。**パネルA：***ApoE*$^{-/-}$マウス（n＝4）及びDKOマウス（n＝3）由来肝臓中の総AMPKα及びリン酸化（T172）P-AMPKα，並びに総ACC及びリン酸化（S79）ACC；P/TAMPK＝リン酸化AMPK/総AMPK比；P/TACC＝ リン酸化ACC/総ACC比。**パネルB：**ベムペド酸非投与*Apoe*$^{-/-}$マウス由来肝臓及び前脛骨筋中のACSVL1（Slc27a2）発現（n＝6）。試験終了時に測定した血漿中のVLDL-C（**パネルC**），LDL-C（**パネルD**），HDL（**パネルE**）（ChDを摂取させたマウスn＝4；残りの投与群n＝6），及び総コレステロール（**パネルF**，n＝10），並びに肝臓中のコレステロール（**パネルG**）及びTG（**パネルH**）（ChDを摂取したマウスn＝4及び残りの投与群n＝6）。**パネルI：**10週間摂餌後にRERを24時間測定したときの暗期（7 pm～7 am；**パネルJ**）及び明期（7 am～7 pm；**パネルK**）の平均RER。**パネルL：**WTマウス及びAMPK β1 KOマウスから単離した初代肝細胞を[^{3}H]酢酸の存在下でベムペド酸，A-769622（AMPK活性化薬），又は溶媒（対照）で4時間処理したときの総脂質合成（n＝3-8の独立した実験を2点測定（duplicate）で実施）。**パネルM**：試験終了時に測定した*Srebf2*，*Ldlr*，*Pcsk9*，*Hmgr*，*Acly*，*Srebf1c*及び*Slc27a2*遺伝子発現（ChDを摂取させたマウスn＝4及び残りの投与群n＝5）。（**パネルN**）：ベムペド酸を投与した*Apoe*$^{-/-}$マウス及びDKOマウスから採取した凍結肝臓切片のLDLRの代表的なIHC染色像。*1元配置分散分析（*Apoe*$^{-/-}$投与群内）又は#2元配置ANOVA（*Apoe*$^{-/-}$投与群とDKO投与群の間）を用いて複数の比較を行った；Bonferroniの事後検定；*及び#$p < 0.05$。

(3) *Apoe*$^{-/-}$マウス及びDKOマウスでのベムペド酸のアテローム性動脈硬化性病変に対する作用

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-150-017）

Apoe$^{-/-}$マウス及びDKOマウスにおいて，ベムペド酸による血漿中コレステロール低下作用が血管のアテローム性動脈硬化性病変サイズに及ぼす影響を検討した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-02）。これらのマウスの大動脈洞のヘマトキシリン・エオシン染色切片を用いた形態学的な病変評価により，HFHC食を摂取させた*Apoe*$^{-/-}$マウスではChDを摂取させた*Apoe*$^{-/-}$マウスと比較して，有意な病変進展が示された（図 2.6.2.2.2.4-3，パネルA）。ただし，HFHC食を摂取させた*Apoe*$^{-/-}$マウスとDKOマウスで病変サイズに差は認められず，AMPK β1ノックアウトはアテローム性動脈硬化症を促進しないことが示唆された。ベムペド酸の投与による血漿中の総コレステロールの低下はわずかであったが，ベムペド酸を投与した*Apoe*$^{-/-}$マウスから採取した大動脈洞切片を定量したところ，病変サイズの顕著な縮小（21%；$p < 0.05$）が示された（図 2.6.2.2.2.4-3，パネルA）。血漿中の総コレステロールで認められた所見と同様に，ベムペド酸を投与したDKOマウスの大動脈病変はDKO対照群より縮小する傾向が認められたが，その縮小の程度は*Apoe*$^{-/-}$マウスより小さく，統計学的に有意な差はなかった。大動脈全体のコレステロール値を測定したところ，HFHC食により上昇した大動脈中コレステロール値（2倍超）に対して，ベムペド酸は*Apoe*$^{-/-}$マウス（-38%）及びDKOマウス（-31%）の両方で顕著に抑制させることが示され（図 2.6.2.2.2.4-3，パネルB），この作用はAMPK非依存的であることが示唆された。ベムペド酸の肝臓脂質代謝に対する作用と低グレード全身性炎症状態の抑制との関連性を評価するために，血漿中のSAA（HFHC食により上昇することが示されている肝臓由来急性期蛋白質）を測定した。*Apoe*$^{-/-}$マウス及びDKOマウスの両方でベムペド酸の投与により血漿中SAA値が30%超低下し，食事誘発性低グレード炎症の抑制が示された（図 2.6.2.2.2.4-3，パネルC）。これらの所見から，ベムペド酸の抗動脈硬化作用は主としてAMPK非依存性の肝臓脂質代謝への作用による低グレード炎症の抑制及び動脈硬化を促進させるLDL-C値の低下による可能性が示された。

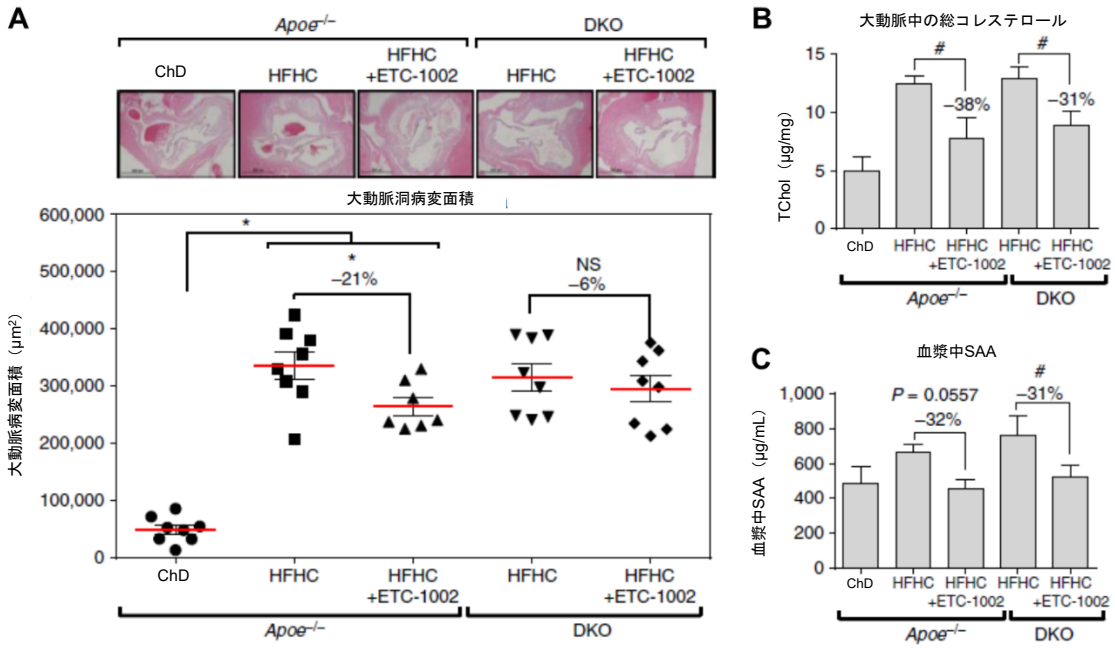


図 2.6.2.2.2.4-3　*Apoe*−/−マウス及びDKOマウスにおいて，ベムペド酸はアテローム性動脈硬化症の進行を抑制する（RR 1002-150-017試験）[3]

Apoe$^{-/-}$マウス及び*Apoe*$^{-/-}$ / AMPK β1$^{-/-}$（DKO）マウスにベムペド酸（ETC-1002）30 mg/kg/日を投与し，HFHC食を12週間摂取させた。**パネルA：**対照及びベムペド酸を投与したマウスから採取した大動脈洞切片をヘマトキシリン・エオシン染色し，アテローム性動脈硬化性病変サイズを測定した；ベムペド酸投与*Apoe*$^{-/-}$群（n = 7）を除くすべての投与群n = 8。**パネルB：**大動脈全体の総コレステロール（TChol）を測定した（HFHC食摂取マウスn = 7-8）。**パネルC：**試験終了時に血漿中のSAAを測定した（HFHC食摂取マウスn = 8-10）。*1元配置分散分析（*Apoe*$^{-/-}$投与群内）又は#2元配置分散分析（*Apoe*$^{-/-}$投与群とDKO投与群の間）を用いて複数の比較を行った；Bonferroniの事後検定；*及び#p < 0.05；NS = 有意差なし。

(4)　LDLRノックアウトミニブタでのベムペド酸の血漿脂質及びアテローム性動脈硬化症に対する作用

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-150-012）

本試験では，LDLRヘテロノックアウト（LDLR$^{+/-}$）又はLDLRホモノックアウト（LDLR$^{-/-}$）ユカタンミニブタを用いて，ベムペド酸の食事誘発性血漿中コレステロール及びLDL-C，アテローム性動脈硬化症に対する作用を検討した[12, 15]。LDLR$^{+/-}$ミニブタ及びLDLR$^{-/-}$ミニブタに高脂肪コレステロール含有食（脂質由来のカロリー比34%；0.2%コレステロール）を摂取させ，プラセボ又はベムペド酸120又は240 mg/日を23週間連日経口投与した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-01）。ベムペド酸の用量は，ヒトと同様のベムペド酸PKパラメータ［C_{max}及びAUC_{0-24}］を示した薬物動態比較試験に基づいて選択した（図 2.6.2.2.2.4-4）。

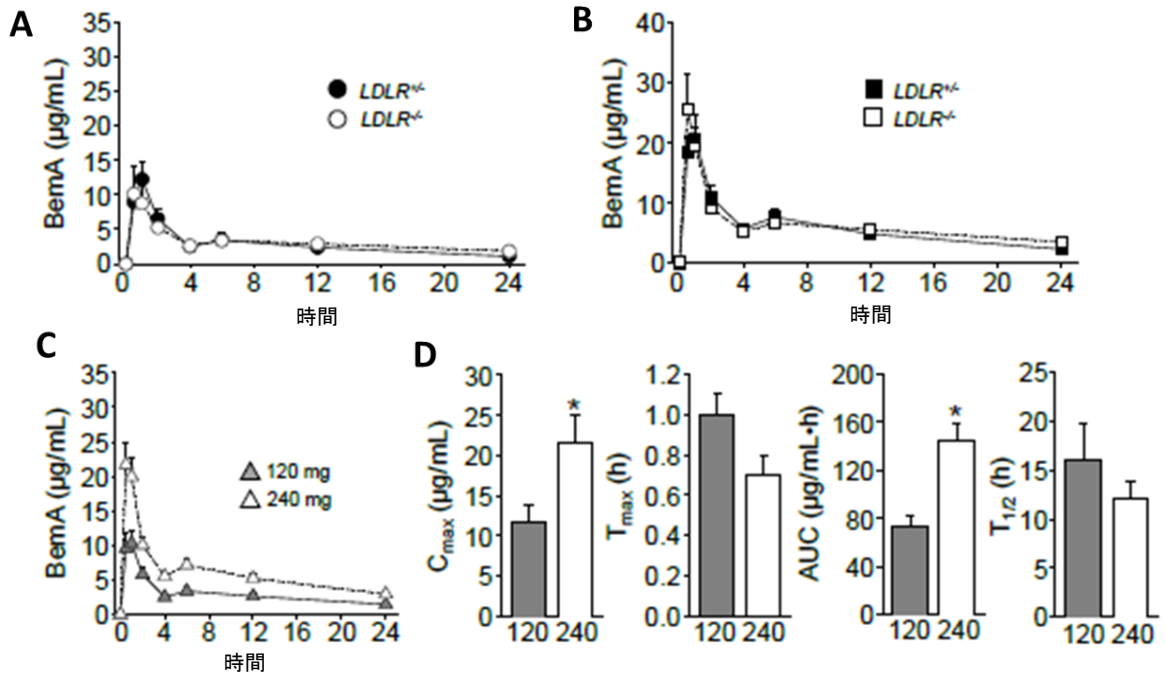


図 2.6.2.2.2.4-4　LDLRノックアウトミニブタでのベムペド酸の薬物動態（RR 1002-150-012試験）[16]

LDLR$^{+/-}$ミニブタ及びLDLR$^{-/-}$ミニブタにHFHC食を2週間摂取後，ベムペド酸（BemA）120又は240 mgを単回投与した。BemA120 mg投与後（**パネルA**），240 mg投与後（**パネルB**）並びに120 mg及び240 mgの併合データ（**パネルC**）の24時間の血漿中ベムペド酸濃度プロファイル。**パネルD**：LDLR$^{+/-}$ミニブタ及びLDLR$^{-/-}$ミニブタの併合データでのC_{max}，T_{max}，AUC0-24，$T_{1/2}$。*p < 0.05（Studentのt検定）。データは平均値 ±SEMで示す（LDLR$^{+/-}$ミニブタ及びLDLR$^{-/-}$ミニブタで各n = 6）。

LDLR$^{+/-}$ミニブタ及びLDLR$^{-/-}$ミニブタの両方にプラセボ含有HFHC食を摂取させたところ，160日間にわたりLDL-Cは高値を示した。LDLR$^{+/-}$ミニブタにおいて，ベムペド酸120 mg/日はDay160におけるLDL-Cをベースラインから32%，プラセボより54%低下させた。ベムペド酸240 mg/日はDay160におけるLDL-Cをベースラインから41%，プラセボより63%低下させた（図 2.6.2.2.2.4-5，パネルA）。さらにLDLR$^{-/-}$ミニブタにおいて，ベムペド酸120 mg/日はDay 160におけるLDL-Cをベースラインから17%（統計学的有意差なし），プラセボより27%低下させ，ベムペド酸240 mg/日はDay 160におけるLDL-Cをベースラインから19%，（統計学的有意差なし），プラセボより29%低下させた（図 2.6.2.2.2.4-5，パネルB）。LDLR$^{+/-}$ミニブタ及びLDLR$^{-/-}$ミニブタの両方でベムペド酸120及び240 mg/日の両用量ともLDL-Cを低下させたが，HDL-Cに対する明確な作用は認められなかった（図 2.6.2.2.2.4-5，パネルC及びD）。

コレステロール合成のバイオマーカーである血漿中ラソステロール濃度に対するベムペド酸の作用を検討した[16]。予測通り，LDLR$^{-/-}$ミニブタでのラソステロール値はLDLR$^{+/-}$ミニブタより高く（図 2.6.2.2.2.4-5，パネルE），これはホモノックアウトでのコレステロール合成亢進を反映していた。Day 28及びDay 160において，ベムペド酸はラソステロール濃度をLDLR$^{+/-}$ミニブタ（−50%～−51%）及びLDLR$^{-/-}$ミニブタ（−43%～−55%）の両方で低下させた。ラソステロールを総コレステロールに対する比で示したところ，両用量ともに持続的な低下を示した（図

2.6.2.2.2.4-5，パネルF）。ベムペド酸を投与したミニブタでラソステロールが低値を示すことは，ベムペド酸による肝臓でのコレステロール合成の阻害と一致する。

いずれの遺伝子型においても，ベムペド酸の投与により血漿中TG値，血漿中HDL-C値，空腹時血糖値，空腹時インスリン値，及び肝臓脂質に対する作用は認められなかった（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-01）。apoB100の動態を解析する別の予備的試験において，HFHC食摂取LDLR$^{+/+}$ミニブタ及びLDLR$^{+/-}$ミニブタでベムペド酸240 mg/日の4週間投与はapoB100プールサイズの低下，並びにVLDL及びLDLのFCRの上昇と関連することが示された。VLDL及びLDLのFCRの上昇は，受容体を介したapoB100クリアランスの亢進と一致する。ただし，LDLR$^{-/-}$ミニブタを用いたapoB100動態試験の結果は，評価動物数が少数のため確定的なことは言えない。

LDLR$^{+/-}$ミニブタの大動脈において，ベムペド酸（120及び240 mg投与動物の統合データ）は大動脈染色病変総面積（−58%，$p < 0.02$）及び腹部大動脈隆起病変面積（-58%，$p < 0.03$）を減少させた。LDLR$^{-/-}$ミニブタの大動脈病変総面積（6倍）及び腹部大動脈隆起病変面積（12倍）はLDLR$^{+/-}$ミニブタより大幅に大きく，ベムペド酸（120及び240 mg投与動物の統合データ）は大動脈病変総面積（−47%，$p < 0.01$）及び腹部大動脈隆起病変面積（−50%，$p < 0.05$）を有意に減少させた（図 2.6.2.2.2.4-6）。

LDLR$^{+/-}$ミニブタ及びLDLR$^{-/-}$ミニブタを用いたこれらの試験の結果は，ベムペド酸のLDL-C低下作用機序においてLDLRのアップレギュレーションとは独立したメカニズムが存在することを示唆している。LDLR$^{-/-}$ミニブタでのベムペド酸の病変縮小作用はプラセボとの比較で認められたLDL-C低下作用と同程度だったが，ベムペド酸によるLDL-C低下作用はベースラインと比較して有意差が認められなかったことから，この作用は高コレステロール血症の進行抑制と関連する可能性がある。

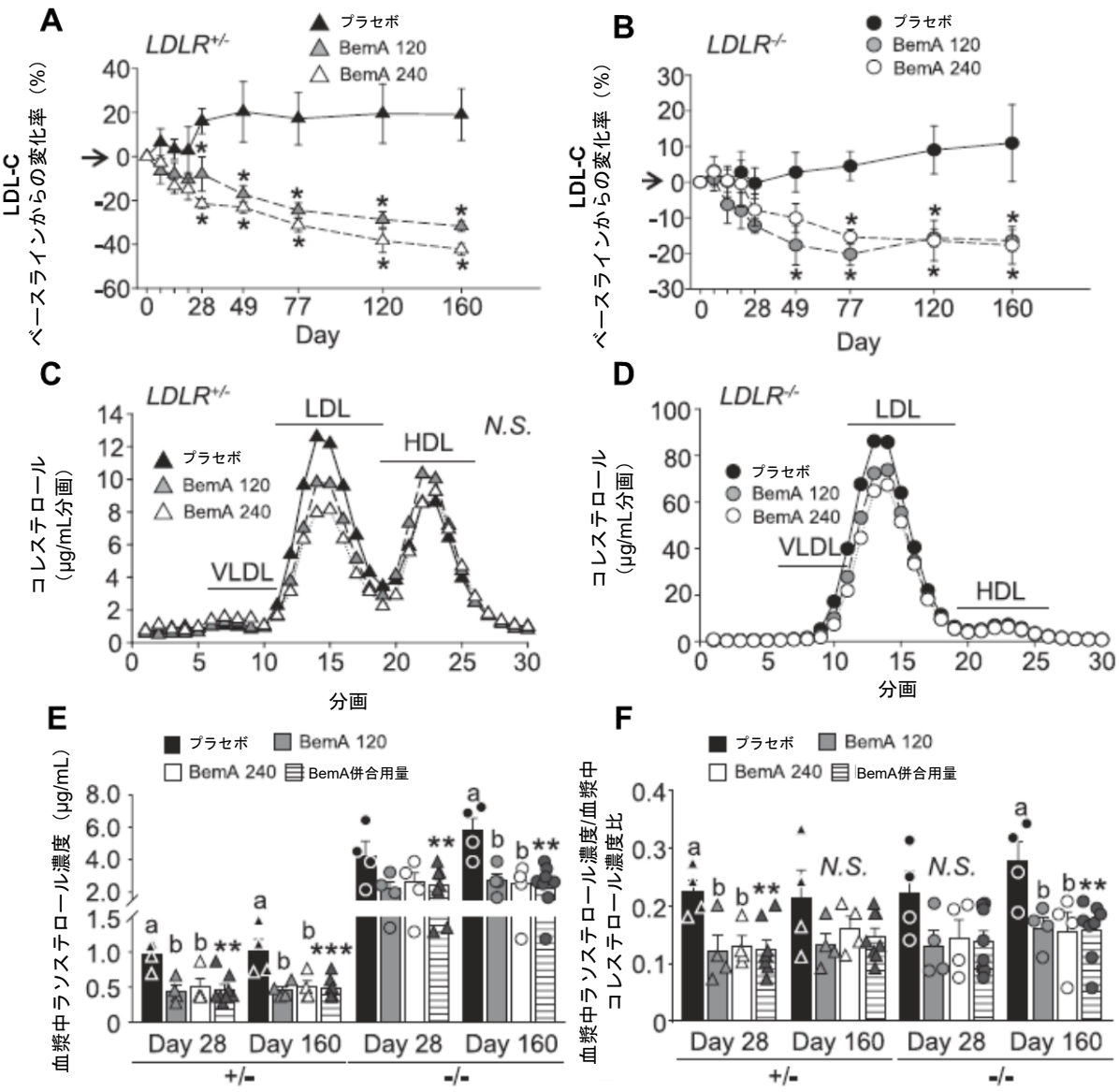


図 2.6.2.2.2.4-5　LDLR+/−ミニブタ及びLDLR−/−ミニブタにおいて，ベムペド酸は血漿中のLDL-C及びラソステロール濃度を低下させる（RR 1002-150-012試験）[16]

LDLR$^{+/-}$ミニブタ及びLDLR$^{-/-}$ミニブタにHFHC食を摂取させ，ベムペド酸（BemA）を0，120又は240 mg/日で160日間投与した。LDLR$^{+/-}$ミニブタ（**パネルA**）及びLDLR$^{-/-}$ミニブタ（**パネルB**）でのLDL-C濃度の変化率（%）（n = 3-4/群）。LDLR$^{+/-}$ミニブタ（**パネルC**）及びLDLR$^{-/-}$ミニブタ（**パネルD**）でのDay 160のリポ蛋白プロファイル（n = 3/群）。Day 28及び160の血漿中ラソステロール濃度（**パネルE**）及び血漿中ラソステロール濃度/血漿中コレステロール濃度比（**パネルF**）（n = 34/群）。データは平均値 ±SEMで示す。*プラセボとの比較でのp < 0.05（ANOVA）。異なる記号は有意差を示す；Tukeyの事後検定によるANOVA（p < 0.05）。**プラセボとの比較でのp < 0.05（Studentのt検定）。***プラセボとの比較でのp < 0.05（Mann-Whitneyの順位和検定）。N.S.は有意差なしを示す（ANOVA）。

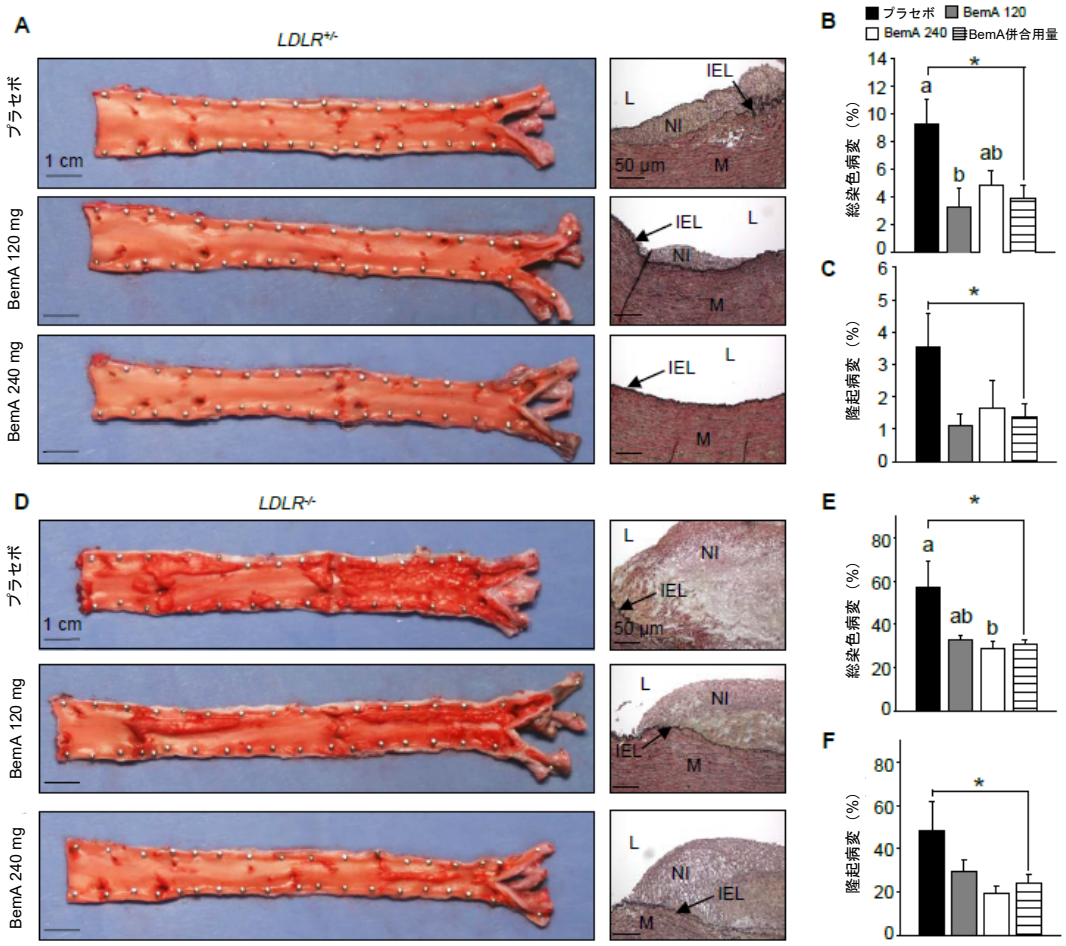


図 2.6.2.2.2.4-6　LDLR+/−ミニブタ及びLDLR−/−ミニブタにおいて，ベムペド酸は大動脈のアテローム性動脈硬化症を抑制する（RR 1002-150-012試験）[16]

LDLR$^{+/-}$ミニブタ及びLDLR$^{-/-}$ミニブタにHFHC食を摂取させ，ベムペド酸（BemA）を0，120又は240 mg/日で23週間投与した。**パネルA及びD**：LDLR$^{+/-}$ミニブタ及びLDLR$^{-/-}$ミニブタから採取した腹部大動脈の代表的なen face標本のスダンIV染色像及び断面のモバットペンタクローム染色像。病理組織所見のL，IEL，M，及びNIを示す。LDLR$^{+/-}$ミニブタ（**パネルB**）及びLDLR$^{-/-}$ミニブタ（**パネルE**）のアテローム性動脈硬化病変で覆われた大動脈総表面積を大動脈総面積に対する割合として示した。LDLR$^{+/-}$ミニブタ（**パネルC**）及びLDLR$^{-/-}$ミニブタ（**パネルF**）の隆起病変で覆われた表面積を腹部大動脈総面積に対する割合として示した。LDLR$^{+/-}$ 120 mg/日群及びLDLR$^{-/-}$120，240 mg/日群はn = 4で，それ以外の群はn =3。データは平均値 ± SEMで示す。異なる小文字は有意差を示す；Tukeyの事後検定による分散分析（$p < 0.05$）。*Studentのt検定によるプラセボとの比較での $p < 0.05$。

(5)　ACLの遺伝学的バリデーション：メンデルランダム化研究

メンデルランダム化法は，大規模な心血管アウトカム試験を実施する前に新規医薬品の標的と関連する心血管リスク/ベネフィット情報を取得するために使用することができる。本法の妥当性は，HMGR遺伝子（遺伝子：*HGMR*）コード領域のヒト遺伝子多型を用いてASCVDに対してレトロスペクティブに確認されており，またHMGR/NPC1L1遺伝子（遺伝子：*NPC1L1*；エゼチミブの標的）変異体及び*PCSK9*変異体をそれぞれ用いたImproved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial（IMPROVE-IT）[17, 18]及びFurther Cardiovascular Outcomes Research With

PCSK9 Inhibition in Subjects With Elevated Risk（FOURIER）試験のアウトカム予測によりプロスペクティブに確認されている[17, 19]。

同じ方法を用いて，ACL（遺伝子：*ACLY*）のコーディング領域における複数の独立遺伝した一塩基多型を介した血中LDL-C低値の影響を検討する試験を実施した。これらの試験により，*ACLY*遺伝子多型を介したLDL-C低値はASCVDリスク低下と因果関係があることが示された。また，オッズ比をLDL-C 10 mg/dL低値で補正したところ，この相対リスクの低下は，他の検証済み遺伝子（*HMGR*，*NPC1L1*，*PCSK9*，及び*LDLR*を含める）の遺伝子多型を介した血漿中LDL-C低値で認められた低下と同程度と考えられた。ランダム化臨床試験での併用療法の作用を模擬してデザインした2 × 2因子分析を用いて，被験者を最初にLDL-C低下作用を有する*ACLY*遺伝子多型に基づいてランダム化し，次にLDL-C低下作用を有する*HMGR*又は*NPC1L1*遺伝子多型に基づいてランダム化した。これらの解析により，*ACLY*遺伝子多型は*HMGR*又は*NPC1L1*の遺伝子多型との組み合わせで相加的なLDL-C低下作用及びASCVDリスク低下をもたらした。この所見から，高コレステロール血症患者においてACL阻害薬はスタチン系薬剤及びエゼチミブなどの既存のLDL-C低下薬との併用によってASCVDに対して相加的なベネフィットをもたらし得ることが示唆される。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 *In vitro*副次的薬理試験

2.6.2.3.1.1 各種受容体，イオンチャネル，酵素，及びトランスポーターへのベムペド酸の*in vitro*結合

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-100-009）

単離受容体，イオンチャネル，トランスポーター，及び酵素の幅広い*in vitro*結合スクリーニングパネルを用いて，ベムペド酸100 μMの副次的薬理活性を評価した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.2-01）。表 2.6.2.3.1.1-1に示すとおり，ベムペド酸は対照化合物の結合に対して顕著な（50%超の）阻害作用を示さなかった。

表 2.6.2.3.1.1-1 各種受容体，イオンチャネル，トランスポーター，及び酵素への参照薬の*in vitro*結合に対するベムペド酸（100 μM）の作用

標的	対照特異的結合の阻害率（%）	標的	対照特異的結合の阻害率（%）	標的	対照特異的結合の阻害率（%）
受容体					
アデノシンA_1	−2.2	ガラニンGAL$_2$	−11.1	κオピオイド	6.7
アデノシンA_{2A}	−2.6	CXCR2（IL-8B）	0.1	μオピオイド	−15.5
アデノシンA_3	−8.5	ケモカインCCR1	−0.3	ノシセプチンオピオイドNOP（ORL1）	4.1
α_1アドレナリン受容体	5.2	ヒスタミンH_1	5.5	プロスタグランジンE2（EP_4）	−1.9

標的	対照特異的結合の阻害率（%）	標的	対照特異的結合の阻害率（%）	標的	対照特異的結合の阻害率（%）
α_2アドレナリン受容体	−8.3	ヒスタミンH_2	−3.4	セロトニン5-HT_{1A}	−6.5
β_1アドレナリン受容体	2.1	メラノコルチンMC_4	8.6	セロトニン5-HT_{1B}	−7.5
β_2アドレナリン受容体	4.3	メラトニンMT_1（ML_{1A}）	9.9	セロトニン5-HT_{2A}	11.3
アンジオテンシンAT_1	1.0	ムスカリンM_1	−21.6	セロトニン5-HT_{2B}	−6.7
ベンゾジアゼピン（中枢）	−15.2	ムスカリンM_2	−15.4	セロトニン5-HT_3	−8.6
ブラジキニンB_2	−0.6	ムスカリンM_3	6.2	セロトニン5-HT_{5a}	−6.3
カンナビノイドCB_1	10.4	ニューロキニンNK_2	14.0	セロトニン5-HT_6	−1.4
コレシストキニンCCK_1（CCK_A）	−4.7	ニューロキニンNK_3	−1.1	セロトニン5-HT_7	−10.7
ドパミンD_1	−2.2	ニューロペプチドY$_1$	0.2	ソマトスタチン（sst）	2.5
ドパミンD_{2S}	−1.2	ニューロペプチドY$_2$	−1.3	血管作動性腸ペプチド$VPAC_1$（VIP_1）	−1.9
エンドセリンET_A	−17.4	ニューロテンシンNTS_1（NT_1）	−19.5	バソプレシンV_{1a}	2.3
GABA	−9.1	δ_2オピオイド	6.5		
イオンチャネル					
Ca^{2+}（L）	3.2	SK_{Ca}	9.8	Cl^-（GABAゲート）	−6.2
K_v	−32.5	Na^+（site 2）	15.1		
トランスポーター					
ノルエピネフリン	−1.9	ドパミン	−4.2	5-HT（セロトニン）	−17.8
その他の酵素					
ACE	−14.8	ACE-2	−38.9		

2.6.2.3.1.2　ベムペド酸が筋毒性を有さない根拠

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-100-010）

スタチン系薬剤は全般的に忍容性が良好であるが，筋肉関連の愁訴は最も多い有害作用であり，筋肉痛や筋力低下から稀に生命を脅かす横紋筋融解症まで報告されている[20]。さらに，特定のスタチン系薬（例：セリバスタチン）及び用量（例：シンバスタチン80 mg，ロスバスタチン80 mg）は，一部の患者では重大な筋肉関連有害事象のため承認されていない。スタチン系薬誘発性筋肉痛の生理学的基礎は完全には解明されていないが，骨格筋のメバロン酸欠乏が病態形成において重要であることが報告されている[21]。骨格筋において，メバロン酸は主として複数の生物学的中間体（イソプレノイドの共代謝物である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を含む）の合成のための前駆体として使用される。これらの代謝物は，ドリコール及

びユビキノンの合成，並びに蛋白のプレニル化（多くの細胞機能を制御することが知られている重要な翻訳後修飾）に必要とされる。これと一致して，スタチン系薬は骨格筋におけるイソプレノイド代謝の阻害及びアポトーシスを促進することが示されている[22]。ACLはコレステロール生合成経路においてHMG-CoA還元酵素の上流に位置するため，理論上，骨格筋におけるACL阻害もメバロン酸欠乏を引き起こし，これに続いてスタチン系薬剤と同様に筋毒性を促進すると予測される。ただし，ACLの阻害にはベムペド酸のACSVL1によるCoA活性化が必要とされるため，ベムペド酸の活性はACSVL1を発現する細胞タイプに限定される。重要なこととして，ACSVL1の組織発現プロファイルは別の研究グループからも報告されており，肝臓及び腎臓にのみ顕著に発現し，骨格筋には発現していないことが示されている[23]。したがって筋毒性に関して，ベムペド酸はスタチン系薬剤とは異なる可能性がある。

この仮説を検証するために，大腿四頭筋細胞から分化させたヒト初代筋管を用いてスタチン系薬剤及びベムペド酸のコレステロール合成に対する作用を検討した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-08）。溶媒，シンバスタチン（10 μM），アトルバスタチン（10 μM），又はベムペド酸（100 μM）を12時間処置し，細胞毒性が認められる前に[^{14}C]グルコースのnon-SAP脂質への取り込みを測定した（図 2.6.2.3.1.2-1，パネルB）。仮説と一致して，シンバスタチン及びアトルバスタチンはともにコレステロールの*de novo*合成を有意にそれぞれ約75%及び45%有意に阻害したのに対し，ベムペド酸は阻害しなかった（図 2.6.2.3.1.2-1，パネルA）。これらの所見は，ベムペド酸のコレステロール合成阻害にACSVL1依存性CoA形成が必要であることを裏付け，骨格筋にACSVL1が発現していない知見と一致する。ACSVL1蛋白はヒト初代筋管の細胞可溶化物において検出されなかった。筋管ではACSVL1 mRNA発現が検出されなかったのに対し，ヒト初代肝細胞では発現が顕著に認められた（図 2.6.2.3.1.2-1，パネルC）。ベムペド酸の細胞毒性を筋管の形態変化を指標に評価した。48時間処理後の肉眼観察にて，シンバスタチン（10 μM）及びアトルバスタチン（10 μM）処理は溶媒処理と比較して多核化筋管の減少と剥離細胞の増加が認められた。シンバスタチン処理筋管で細胞膜での水泡形成が認められ，シンバスタチン処理及びアトルバスタチン処理ともに筋管径の減少が認められた。メバロン酸（500 μM）の同時処理によってこれらの筋管の形態変化が抑制されたことから，メバロン酸欠乏が筋毒性に寄与していることが示唆される。一方，ベムペド酸を100 μMまでの濃度で処理したが，筋管の形態及び生存率に影響はなかった（図 2.6.2.3.1.2-1，パネルD）。

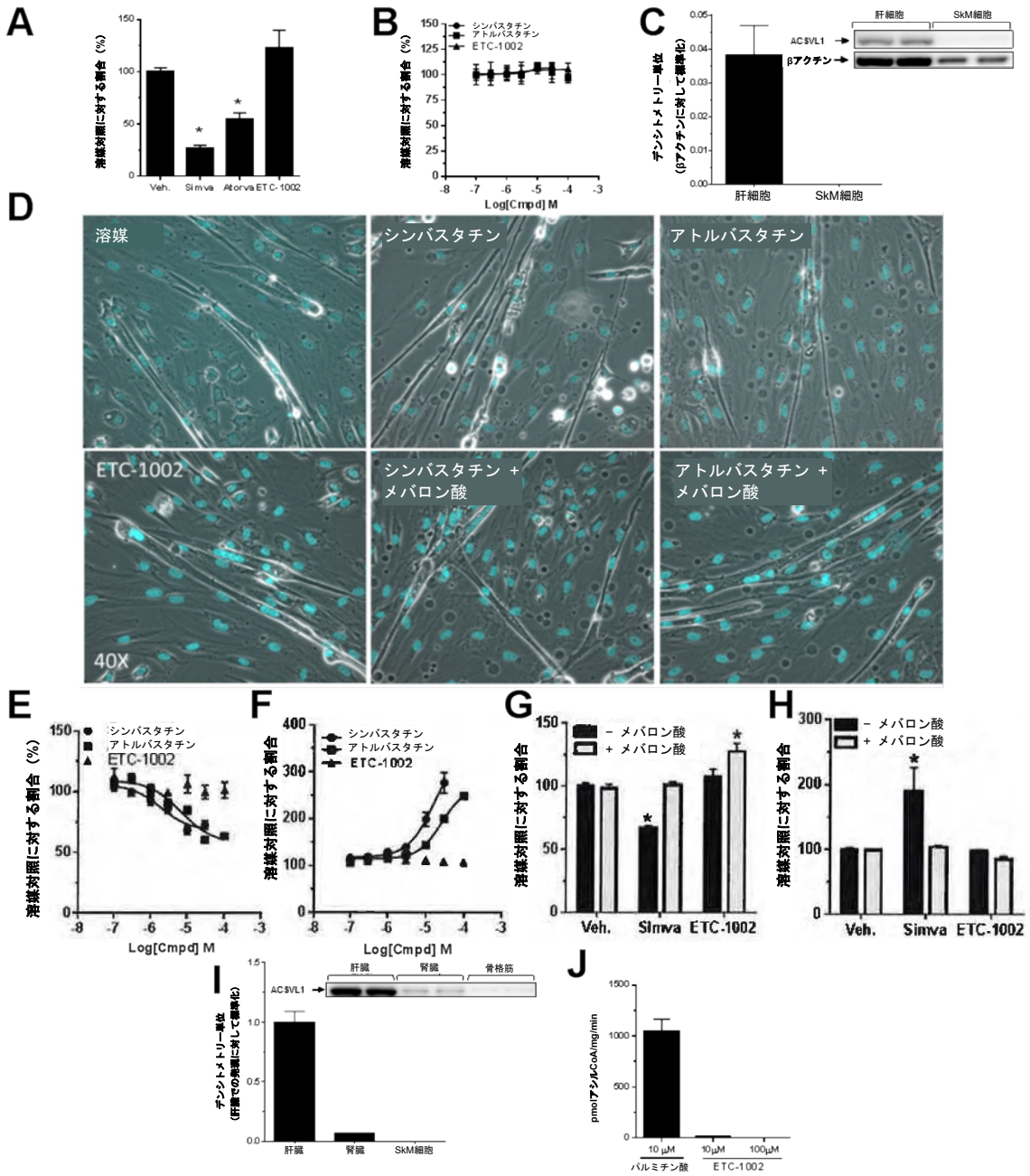


図 2.6.2.3.1.2-1　ヒト骨格筋におけるACSVL1発現欠如により、ベムペド酸はスタチン系薬剤と異なり筋毒性が認められない（RR 1002-100-010試験）[3]

ヒト初代筋管を[^{14}C]グルコースの存在下で溶媒（Veh.），シンバスタチン10 μM（Simva），アトルバスタチン10 μM（Atorva），又はベムペド酸（ETC-1002；100 μM）で12時間処理し，[^{14}C]グルコースのnon-SAP脂質への取り込みを測定した。**パネルA：**Simva，Atorva，及びベムペド酸のコレステロール合成に対する作用［溶媒対照に対する割合（%）］。**パネルB：**Simva，Atorva，又はベムペド酸で12時間処理後にMTTアッセイで筋管生存率を測定し，溶媒対照に対する割合（%）で示した。**パネルC：**ヒト初代肝細胞（肝細胞）及びヒト初代骨格筋細胞（SkM細胞）でのACSVL1の発現量をウエスタンブロット法で測定し，βアクチンに対する相対値として示した。**パネルD：**溶媒，シンバスタチン10 μM（± メバロン酸500 μM），アトルバスタチン10 μM（± メバロン酸500 μM），又はベムペド酸（100 μM）で48時間処理したヘキスト染色ヒト初代筋管の明視野及び蛍光捕捉のマージ画像。筋管を0.1～100 μMのSimva，Atorva，又はベムペド酸で48時間処理した。筋管の生存率を細胞内ATP量

（**パネルE**）又は生存率/細胞毒性をGF-AFC/bis-AAF-R110切断（**パネルF**）により測定した。メバロン酸（500 µM）の添加によって，48時間処理後のSimva（10 µM）誘発性細胞内ATP量の減少（**パネルG**）及びカスパーゼ3,7活性（**パネルH**）が抑制された。**パネルI：**ヒト肝臓（プール試料n = 50），腎臓（プール試料n = 50），及び骨格筋（プール試料n = 4）から調製したミクロソーム中のACSVL1の相対発現量。データは肝臓での発現量に対する相対値として示す。**パネルJ：**ヒト骨格筋ミクロソーム（プール試料n = 4）中のパルミトイルCoAシンテターゼ活性（10 µM）及びETC-1002-CoAシンテターゼ活性（10 µM及び100 µM）。*各溶媒処理との比較での $p < 0.05$（**パネルA**，**G**，及び**H**）。

メバロン酸の欠乏は，ミトコンドリア機能の異常，並びにアポトーシスの重要な指標であるカスパーゼ3及び7の活性化につながることが示されている。ベムペド酸とスタチン系薬剤の筋毒性の差異をさらに明らかにするために，シンバスタチン，アトルバスタチン，及びベムペド酸を0.1～100 µMの濃度範囲で処理後に細胞生存率，細胞毒性，及びアポトーシスの複数のマーカーを測定した。前述のとおり，シンバスタチン及びアトルバスタチンは濃度依存的に細胞生存率を低下させ，細胞毒性を誘発し，IC_{50}はそれぞれ6.5 µM及び13.6 µMであった（図 2.6.2.3.1.2-1，パネルE）。さらに，シンバスタチン及びアトルバスタチンは濃度依存的にカスパーゼ3及び7活性を上昇させ，50%有効濃度（EC_{50}）はそれぞれ13.0 µM及び26.0 µMであった（図 2.6.2.3.1.2-1，パネルF）。ベムペド酸は100 µMまでの濃度で検討したが，細胞生存率，細胞毒性，及びカスパーゼ活性に対して作用を示さなかった（図 2.6.2.3.1.2-1，パネルE及びF）。外因性メバロン酸の添加によってスタチン系薬の処理による細胞生存率，細胞毒性，並びにカスパーゼ3及び7活性化に対する作用が抑制されたことから，スタチン系薬剤誘発性の筋毒性においてメバロン酸欠乏が重要な役割を果たしていることがさらに裏付けられた（図 2.6.2.3.1.2-1，パネルG及びH）。

初代骨格筋細胞のACSVL1発現が*in vivo*ヒト骨格筋のACSVL1発現と一致するかを明らかにするために，ヒト肝臓（プール試料n = 50），腎臓（プール試料n = 50），及び骨格筋（プール試料n = 4）から調製したミクロソーム中のACSVL1蛋白量を比較した。これまでの公表文献[23, 24]と一致し，ACSVL1の発現量は肝ミクロソームで最も高く，ヒト腎臓ミクロソーム中の発現量は肝臓の10%未満であった。骨格筋ミクロソーム中にACSVL1の発現は検出されなかった（図 2.6.2.3.1.2-1，パネルI）。ACSVL1発現の欠如は，骨格筋ミクロソーム中のETC-1002-CoAシンテターゼ活性を直接測定することによって機能的にも確認された。骨格筋ミクロソームと [^{14}C]ベムペド酸を100 µMまで反応させてもETC 1002 CoAシンテターゼ活性は検出されなかった（図 2.6.2.3.1.2-1，パネルJ）。陽性対照として10 µMの[^{14}C]パルミチン酸を用いたところ，1,042.5 pmol/mg/minのアシルCoAシンテターゼ活性が得られた。

ヒト骨格筋でのこれらの所見から，メバロン酸代謝変化に関連する細胞毒性が，スタチン系薬剤とベムペド酸を区別する根拠として提示される。ヒト骨格筋はACSVL1を発現しておらず，ベムペド酸のCoA形成を引き起こさないことが示されている。スタチン系薬と異なり，*in vitro*においてベムペド酸は骨格筋におけるコレステロール合成を阻害せず，コレステロール合成阻害に由来した細胞毒性を示さない。これらの所見は，マウスに対して150 mg/kg/日までの用量で104週間，ラットに対して60 mg/kg/日までの用量で26週間又は30 mg/kg/日までの用量で104週間，サルに対して60 mg/kg/日までの用量で52週間反復投与した非臨床安全性試験において，生化学的評価及び病理学的評価で筋肉関連変化が認められないことによってさらに裏付けられる（2.6.6 毒性試験の概要文参照）。この仮説を検証するようデザインされた試験において，このような臨床所見

は認められていない。

2.6.2.3.1.3　ベムペド酸の脂肪酸の合成及び酸化に対する作用

（概要表2.6.3.1，報告書番号ETI-100-079 RR）

脂肪酸合成と脂肪酸酸化のバランスは，脂肪酸合成の律速酵素であるACCの発現量で調整されている。ACCはマロニルCoAを生成し，マロニルCoAはミトコンドリア長鎖脂肪酸トランスポーター蛋白であるCPT-Iの強力なアロステリック阻害物質であり，無益回路（脂肪酸の同化と異化を同時に行う反応）を抑制する[25, 26, 27]。これまでにベムペド酸処理でマロニルCoA量の減少が示されていることから，絶食下の雄SDラットから単離した肝細胞を用いて，ベムペド酸の脂肪酸異化に対する作用を[^{14}C]パルミチン酸の酸化速度を指標に評価した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-15）。ベムペド酸は濃度依存的に[^{14}C]パルミチン酸酸化速度を上昇させ，この作用はCPT-I活性補因子であるL-カルニチン500 µMの添加により有意に増強し，CPT-I阻害薬であるR-アミノカルニチン500 µMの添加により阻害された（図 2.6.2.3.1.3-1，パネルA）。CPT-I依存性β酸化と一致して，ベムペド酸10 µMはL-カルニチン又はR-アミノカルニチンの存在下又は非存在下で[^{14}C]カプリル酸又は[^{14}C]ラウリン酸の酸化速度に対して作用を示さなかった。また，ベムペド酸はパルミチン酸酸化速度を30分以内に有意に上昇させ（$p \leq 0.05$），これはベムペド酸の脂質合成阻害が行われるタイミングと一致している（図 2.6.2.3.1.3-1，パネルB）。これらの結果から，ベムペド酸の脂肪酸合成阻害によってCPT-I依存性の長鎖脂肪酸のミトコンドリア内への輸送と続くβ酸化が活性化し，ベムペド酸はミトコンドリアの酸化経路に悪影響を及ぼさないことが示唆される。

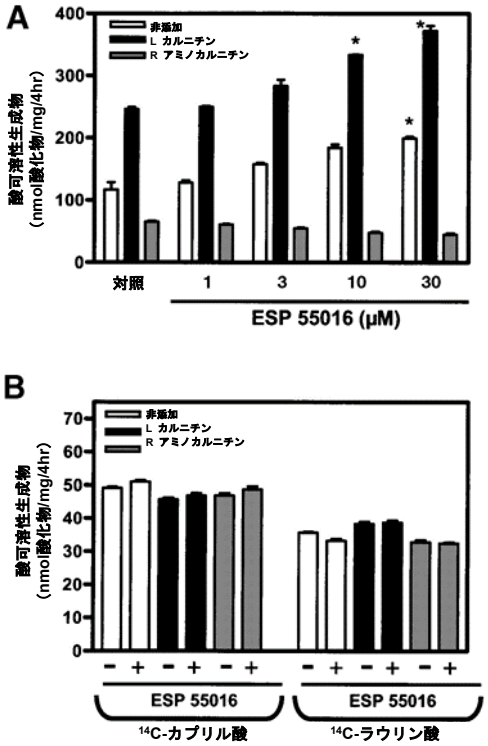


図 2.6.2.3.1.3-1　　ラット初代肝細胞でのベムペド酸のパルミチン酸酸化に対する作用（ETI-100-079-RR試験）[1]

パネルA：ベムペド酸（ESP 55016）の存在下又は非存在下での非処理時（白色バー），L-カルニチン500 µM処理

時（黒色バー）又はR-アミノカルニチン500 μM処理時（灰色バー）の[^{14}C]パルミチン酸の酸化速度。**パネルB：**中鎖脂肪酸である[^{14}C]カプリル酸及び[^{14}C]ラウリン酸に対する作用をベムペド酸 10 μMの存在下又は非存在下でDMSO（対照）（白色バー），L-カルニチン500 μM（黒色バー）又はR-アミノカルニチン500 μM（灰色バー）と培養して評価した。各データポイントは平均値 ± SEMである（n = 3ウェル）。溶媒との比較は対応のあるStudentのt検定を用いて行った。*溶媒との有意差（$p < 0.05$）を示す。

2.6.2.3.1.4　ベムペド酸のAMPK活性に対する作用

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-100-004）

AMPKは，脂質代謝を調節するα触媒サブユニット及びβ/γ制御性サブユニットからなるヘテロ三量体複合体である[28]。AMPKは，細胞刺激に対する反応，若しくはγ又はβ制御性サブユニットが関与する直接のアロステリック機序を介して，上流のキナーゼによりα触媒サブユニット内の172番目スレオニン（T172）残基がリン酸化されることで活性が上昇する。典型的な活性化は細胞エネルギー状態の低下（AMP/ATP比の上昇）に反応して生じ，AMPがγサブユニットへ優先的に結合促進し，立体構造シフトを引き起こしてキナーゼ活性を上昇させることによりT172のリン酸化を維持する。

AMPKは活性化されると，HMG-CoA還元酵素（872番目セリン；S872）及びACC（79番目セリン；S79）の抑制性リン酸化を触媒し，コレステロール及び脂肪酸の合成を抑制し，脂肪酸の異化を活性化することによって，一部エネルギー状態を回復させる[28]。*In vitro*及び*in vivo*試験において，ベムペド酸の処理及び投与はAMPKα T172及びACC（S79）のリン酸化の上昇させることが示されている（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.2-07）。ベムペド酸がAMPKシグナルを活性化する分子メカニズムの解明を目的とした試験において，*in vitro*（図 2.6.2.3.1.4-1，パネルA）及び*in vivo*（図 2.6.2.3.1.4-1，パネルB）でこの活性化はアデニル酸エネルギー状態変化に非依存的に生じることが明らかにされ，AMPK複合体との直接の相互作用が示唆された（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.2-07）。

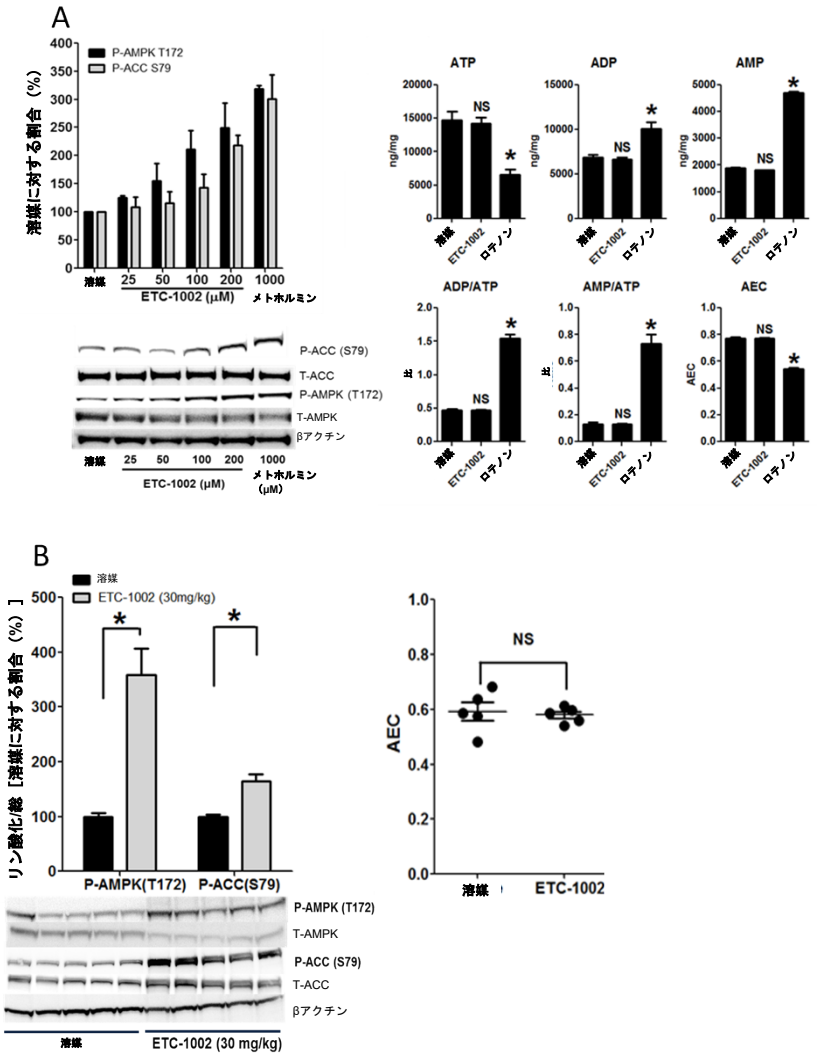


図 2.6.2.3.1.4-1　　ベムペド酸はAEC変化非依存的にAMPKを活性化する（RR 1002-100-004試験）

パネルA：HepG2細胞をVeh.，ベムペド酸（ETC-1002）又はメトホルミンで4時間処理し，細胞可溶化物中のAMPKα（T172）及びACC（S79）のリン酸化をウエスタンブロット法で評価した。データは，リン酸化/総AMPKα（T172）比として，Vehに対する割合（%）の平均値 ±SEMで示す（n＝2ウェル）。エネルギーチャージ試験では，HepG2細胞をベムペド酸100 μM又はロテノン10 μMで4時間処理し，ATP，ADP及びAMPの量をLC-MS/MSで測定し，ADP/ATP，AMP/ATP及びAECを算出した。**パネルB**：Veh又はベムペド酸30 mg/kg/日を14日間投与したChDを摂取したラットから採取した凍結固定肝臓ホモジネート中のリン酸化AMPKα（T172）（P-AMPK），総AMPKα（T-AMPK），リン酸化ACC（S79）（P-ACC），総ACC（T-ACC）及びβアクチンをウエスタンブロット法で測定した。リン酸化/総蛋白比を算出し，Vehに対する割合（%）の平均値 ± SEMで示す（n＝5）。比較は対応のないStudentのt検定を用いて行った；*p＜0.05。NS＝ 有意差なし。

ベムペド酸がAMPKを直接活性化するかを明らかにするために，セルフリーAMPK活性評価試験でベムペド酸及びETC-1002-CoAを評価した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.2-07）。これらの試験でETC-1002-CoAは組み換えヒトAMPKαβγ複合体をβ1依存的に活性化し，ベムペド酸は活性化しないことが示された。ETC-1002-CoAを評価したいずれの濃度においてもAMPK β2の活性化は認められなかった（図 2.6.2.3.1.4-2，パネルA）。ETC-1002-CoAはPP2Cαを介したAMPKα T172脱リン酸化によるAMPK β1活性低下も減弱させた（図 2.6.2.3.1.4-2，パネルB）。これらの

所見から，ETC-1002-CoAはβ2含有AMPK複合体では認められないアロステリックな機序を介してAMPK β1複合体を直接活性化することが示唆される。ただし，これらの所見にもかかわらず，*Apoe*$^{-/-}$ / AMPK β1$^{-/-}$ DKOマウスを用いた試験でベムペド酸の作用のAMPK依存性を示すことができなかった（2.6.2.2.2.4(2)項参照）。さらには，マウスと異なりヒト肝臓ではAMPK β2含有ヘテロ三量体が優位であることが示されている[29]。ETC-1002-CoAはβ1選択性であることが示されていることと，ETC-1002-CoA形成は主に肝臓に限局することから，ヒトでのベムペド酸の薬理作用に対するAMPK活性化の寄与はごくわずかと考えられる。

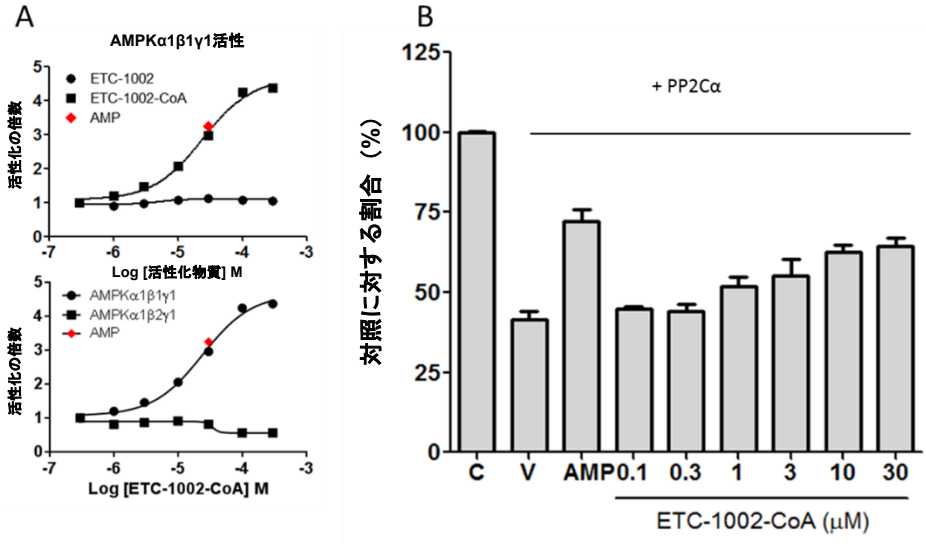


図 2.6.2.3.1.4-2　ベムペド酸はAMPKヘテロ三量体複合体をβ1依存的に直接活性化し，PP2Cα介在AMPKαT172脱リン酸化を抑制する（RR 1002-100-004試験）

パネルA：ベムペド酸（ETC-1002），ETC-1002-CoA，AMPの組み換えヒトアデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼα1β1γ1（AMPK$_{α1β1γ1}$）及びα1β2γ1（AMPK$_{α1β2γ1}$）に対する作用。**パネルB：**ベムペド酸のPP2CαによるAMPKαT172脱リン酸化反応性AMPK β1活性に対する作用。C＝対照；V＝ 溶媒；AMP＝ アデノシン一リン酸。データは平均値 ±SEMで示す（n＝2-3ウェル）。

2.6.2.3.1.5　ベムペド酸のPPAR結合及びトランス活性化に対する作用

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-500-013, RR 1002-150-003）

げっ歯類モデルを用いた非臨床試験（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.2-04，概要表2.6.7.7.3，資料番号4.2.3.2-05）[30]から，ベムペド酸の投与はミトコンドリア及びペルオキシソームでの脂肪酸β酸化のマーカーの上昇を促進する可能性が示された。脂肪酸のβ酸化は，マロニルCoA依存的CPT-I活性阻害によるアロステリック制御に加え，PPARにより転写レベルで一部制御されることも知られている。PPARは，コレステロール代謝及び脂肪酸酸化を含む多くの細胞機能を制御するα，γ，及びβ/δサブタイプからなるリガンド依存性転写因子である。PPAR活性化がベムペド酸の薬理作用に直接寄与する可能性を明らかにするために，PPAR α，γ，及びβ/δ結合，並びにトランス活性化を評価する試験でベムペド酸及びESP15228の両方を評価した（2.6.6 毒性試験の概要文 参照）。これらの試験の所見から，ベムペド酸とESP15228はいずれもほとんど影響しないことが示された。肝細胞への処理直後に脂質合成阻害が生じることが示された結果と合わせると，ベムペド酸はPPARを介した転写機序非依存的に脂質生合成経路に直接作用すると結論付けられ

た。以上より，PPARの活性化はベムペド酸の効力に寄与する分子標的ではないと考えられた。

2.6.2.3.1.6　ベムペド酸の抗炎症作用

臨床試験で顕著なhsCRP低下作用が認められたことから，ヒト初代MDM及び*in vivo*炎症モデルでベムペド酸の抗炎症作用を検討した[31]。ベムペド酸を処理した細胞において，AMPKリン酸化レベルの上昇は炎症性サイトカイン及びケモカイン産生の減少と一致した（図 2.6.2.3.1.6-1）。ベムペド酸のAMPKリン酸化作用及び可溶性炎症メディエーター阻害作用は，マクロファージのLKB1のsiRNAにより有意に抑制され，ベムペド酸はAMPKを活性化し，LKB1依存的に抗炎症作用を発揮することが示された（図 2.6.2.3.1.6-2）。*In vivo*において，ベムペド酸はチオグリコール酸誘発性のマウス腹腔内白血球遊走を抑制した。同様に，DIOモデルマウスにおいて，ベムペド酸は脂肪組織のAMPK活性を回復させ，JNKのリン酸化を低下させ，マクロファージ特異的マーカーであるF4/80の発現を減少させた。これらのデータは，精巣上体脂肪重量の減少及び炎症脂肪組織によるIL-6放出の減少と一致した（図 2.6.2.3.1.6-3）。MDM及び*in vivo*炎症モデルでベムペド酸の抗炎症作用を検討したが[31]，これらの作用がヒトで認められるか否かは不明である。

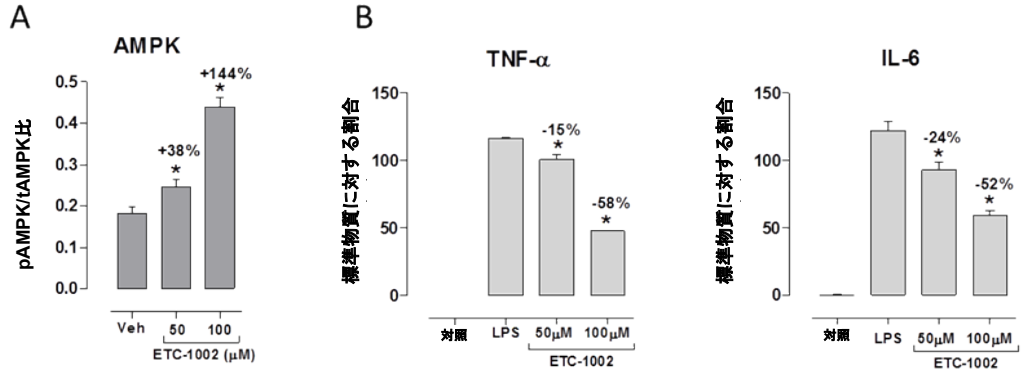


図 2.6.2.3.1.6-1　ヒト初代MDMでベムペド酸はAMPKを活性化し，急性期サイトカインの発現を減少させる[31]

パネルA：ヒト初代MDMをベムペド酸（ETC-1002）の非存在下又は存在下で，自己血清中で5日間分化させた。細胞可溶化物中の蛋白質をSDS-PAGEにより分離し，PVDF膜に転写し，リン酸化AMPKα（T172）及び総AMPKに対して生じた抗体をブロットした。データはリン酸化蛋白/総蛋白比で示した。**パネルB：**自己血清中で5日間分化させたマクロファージをベムペド酸の非存在下又は存在下でLPS 100 ng/mLにより刺激した。12時間培養した培地中の炎症性サイトカインであるTNF-α及びIL-6の量をサイトカインアレイ法で測定した。データは平均値 ± SEMで示す。Bonferroniの事後検定，1元配置ANOVA *p < 0.05。

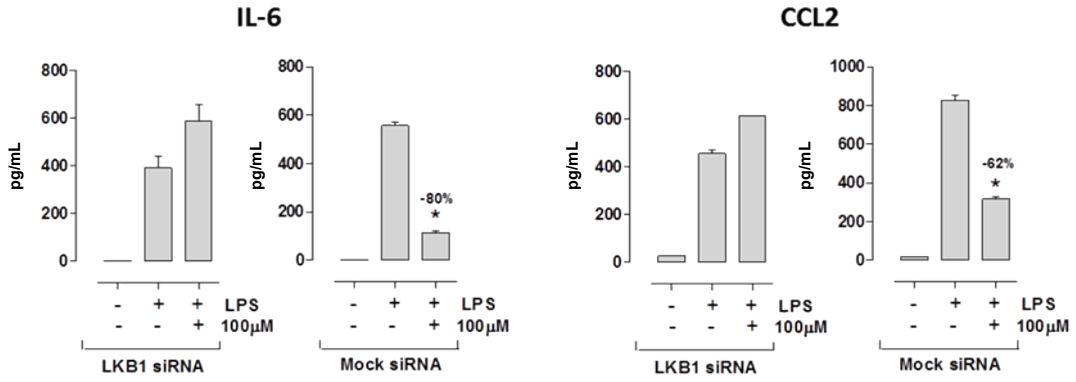


図 2.6.2.3.1.6-2　ベムペド酸はLKB1依存性機序を介して免疫反応を阻害する[31]

自己血清中で5日間分化させたヒト初代MDMに，陰性対照「mock」又はLKB1 siRNAを5時間導入処理してから24時間の回復期間を設けた。次に，非刺激マクロファージ又はLPS100 ng/mL誘導細胞を溶媒又はベムペド酸100 µMで処理した。培地を回収し，IL-6及びCCL2の量をELISA法で測定した。データは平均値 ±SEMで示す。Bonferroniの事後検定，1元配置ANOVA *p < 0.05。

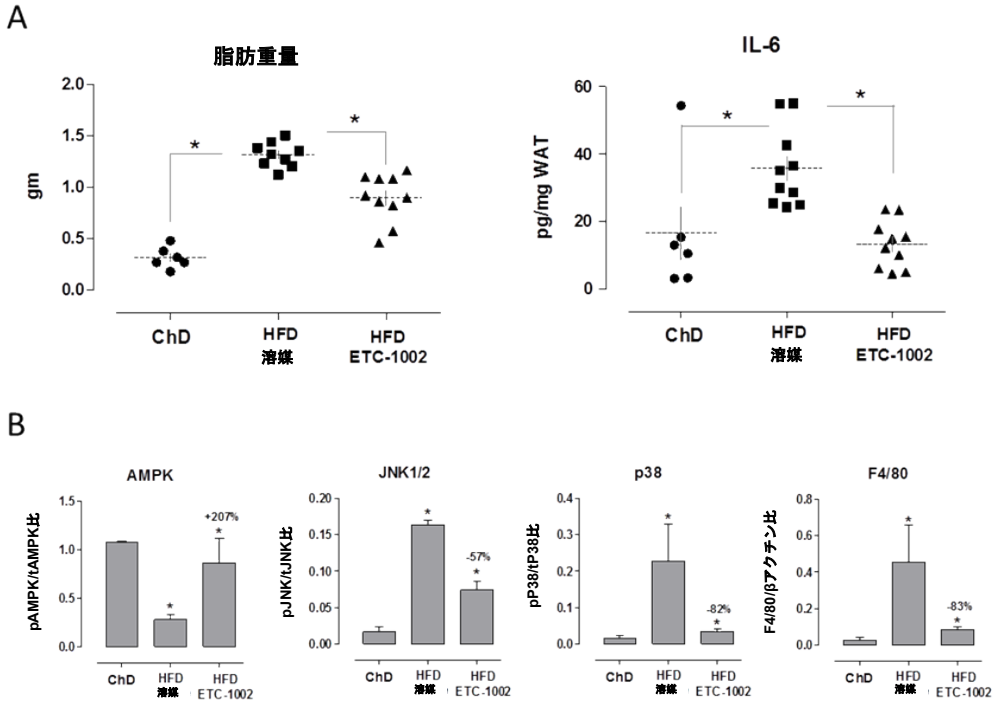


図 2.6.2.3.1.6-3　DIOモデルマウスにおいて，ベムペド酸は精巣上体脂肪体重量を減少させ，脂肪組織炎症を抑制する（RR 1002-100-003, RR 1002-100-005試験）[31]

C57BL/6マウスにChD又は60%HFDを9週間摂取させた。HFD群（n = 10/群）に溶媒又はベムペド酸（ETC-1002）30 mg/kg/日を強制経口投与した。**パネルA：**ChD摂取動物，並びに溶媒（HFD溶媒）又ETC-1002を投与した。左グラフ：各試験群のマウスから採取した精巣上体脂肪体の重量。右グラフ：*Ex vivo*で培養した脂肪組織の培地へのIL-6放出。*Ex vivo*で精巣上体脂肪体の一部を無血清のRPMI培地中に維持培養し，12時間培養後の培地中のIL-6量を測定した。**パネルB：**脂肪組織可溶化物中のAMPK，p38，及びJNK1/2のリン酸化，並びにF4/80の発現量を各免疫反応バンドの強度測定により定量した。AMPK，p38，及びJNK1/2のデータはリン酸化蛋白/総蛋白比で示した（平均値 ±SEM）。Bonferroniの事後検定，1元配置ANOVA *p < 0.05。

2.6.2.3.2　*In vivo*副次的薬理試験

2.6.2.3.2.1　マウスでのベムペド酸のTICE，胆汁中排泄，及びコレステロール吸収に対する作用

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-150-011）

ベムペド酸のLDL-C低下作用は肝臓でのコレステロール合成阻害とLDLR発現増加に関連することを示す重要なデータが得られているが，マウスを用いた2試験でLDL-C低下機序に糞中コレステロール排泄，腸管コレステロール吸収，胆汁脂質，及びTICEが関与する可能性を検討した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-05）。両試験ともマウスの表現型及び対照薬に対する反応はこれまでの報告と一致した。試験1では，正常C57BL/6NHsd雄マウスに溶媒，T0901317（LXR作動薬）25 mg/kg/日，エゼチミブ（NPC1L1阻害薬）10 mg/kg/日，又はベムペド酸10 mg/kg/日又は

30 mg/kg/日を7日間経口投与した。ベムペド酸30 mg/kg/日は，溶媒と比較して，糞中の中性コレステロール排泄量を27%増加させ（図 2.6.2.3.2.1-1），胆嚢中の胆汁性コレステロールを222%増加させ，胆嚢中の胆汁リン脂質量には影響を及ぼさなかった（図 2.6.2.3.2.1-2）。ベムペド酸はコレステロール分画の吸収に対して作用を示さなかった（図 2.6.2.3.2.1-3）。試験2では，肝臓NPC1L1過剰発現Tg雄マウス及びWT同腹児に溶媒，T0901317 25 mg/kg/日，アトルバスタチン15 mg/kg/日，又はベムペド酸30 mg/kg/日を7日間経口投与したところ、試験1と同様の結果が認められた。TgマウスではNPC1L1過剰発現と一致してWTマウスより胆汁性コレステロールが少なかったが，コレステロールの排泄及び胆汁クリアランスに対するベムペド酸の作用がTgマウスとWTマウスで同程度であったことは，TICEがコレステロール排泄の若干の増加に関与していないことを裏付ける。ベムペド酸の投与によって糞中の中性コレステロール排泄量が試験1と同様に若干増加したが，この作用は統計学的に有意でなかった。試験2においてWTマウス及びTgマウスで胆嚢中の胆汁性コレステロールが若干増加した（図 2.6.2.3.2.1-4）。肝臓での胆汁酸合成の代替指標である糞中胆汁酸はベムペド酸によって変化しなかった。胆汁性コレステロール飽和指数の平均値は溶媒投与WTマウスの0.24からベムペド酸投与マウスの0.57に上昇し，飽和には達しなかった。以上より，これらの試験から，ベムペド酸は腸管コレステロール吸収及びTICEに顕著な影響を与えることなく，ベムペド酸投与で認められた胆汁中及び糞中コレステロール排泄の増加は脂質生合成の阻害及びコレステロールの肝臓への輸送の増加により二次的に生じた可能性がある。

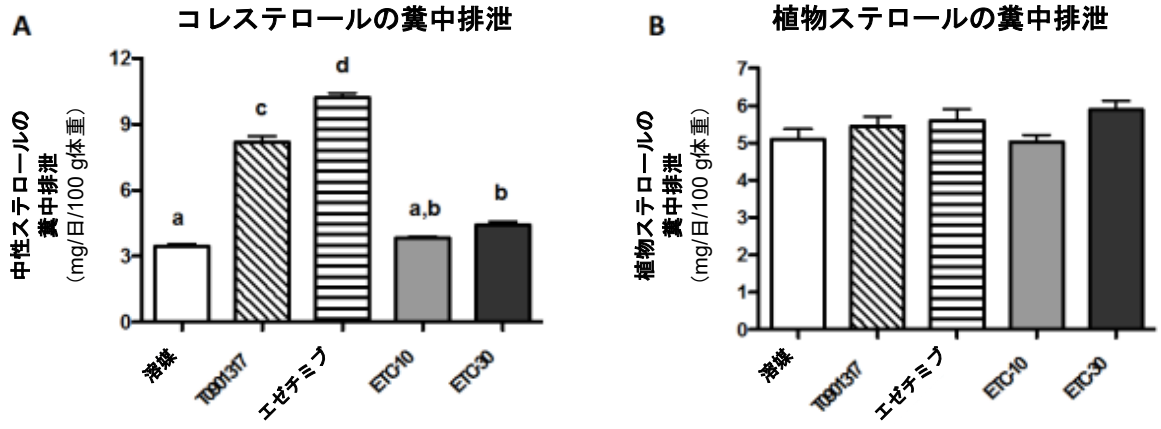


図 2.6.2.3.2.1-1　ベムペド酸，エゼチミブ，又はLXR作動薬T0901317のマウスでのコレステロール及び植物ステロールの糞中排泄に及ぼす影響（RR 1002-150-011試験）

溶媒，T0901317 25 mg/kg/日，エゼチミブ10 mg/kg/日，ベムペド酸10 mg/kg/日（ETC-10），又はベムペド酸30 mg/kg/日（ETC-30）を7日間連日経口投与後に，糞を3日間収集し，中性脂質をけん化してからヘキサンで抽出した。抽出した中性ステロールの量をガス-液体クロマトグラフィーで測定した。**パネルA：**1元配置分散分析と続くTukey-Kramerの事後検定により，中性ステロールの糞中排泄に対して投与の作用が認められた。小文字のアルファベットで異なる記号は群間の有意差を示す。$p < 0.05$。値は平均値 ± SEMである（n = 10/群）。**パネルB：**植物ステロールの糞中排泄に対して投与の作用は認められなかった。$p > 0.05$。値は平均値 ± SEMである（n = 10/群）。

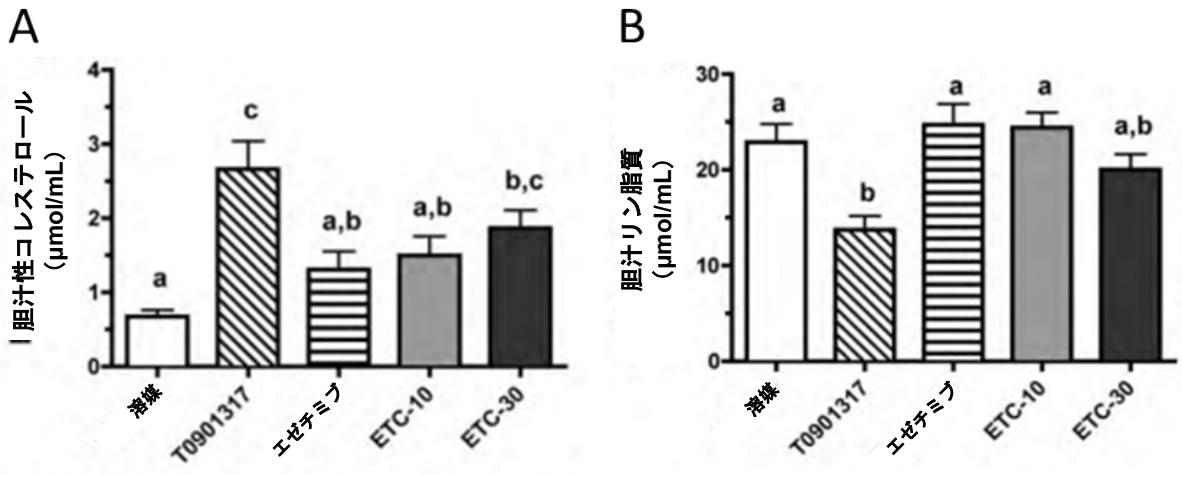


図 2.6.2.3.2.1-2　ベムペド酸，エゼチミブ，又はLXR作動薬T0901317のマウスでの胆汁性コレステロール及び胆汁リン脂質に及ぼす影響（RR 1002-150-011試験）

溶媒，T0901317 25 mg/kg/日，エゼチミブ10 mg/kg/日， ベムペド酸10 mg/kg/日（ETC-10），又はベムペド酸30 mg/kg/日（ETC-30）を7日間連日経口投与後に，胆嚢胆汁を収集し，脂質をクロロホルム:メタノールで抽出した。コレステロール量をガス-液体クロマトグラフィーで測定し，リン脂質を酵素アッセイで測定した。**パネルA：**1元配置ANOVAと続くTukey-Kramerの事後検定により，胆嚢胆汁中コレステロール濃度に対して投与の作用が認められた。小文字のアルファベットで異なる記号は群間の有意差（$p < 0.05$）を示す。値は平均値 ± SEMである（n = 8-11/群）。**パネルB：**1元配置ANOVAと続くTukey-Kramerの事後検定により，胆嚢胆汁中リン脂質濃度に対して投与の作用が認められたが，ベムペド酸群では作用は認められなかった。小文字のアルファベットで異なる記号は群間の有意差（$p < 0.05$）を示す。値は平均値 ± SEMである（n = 7-11/群）。

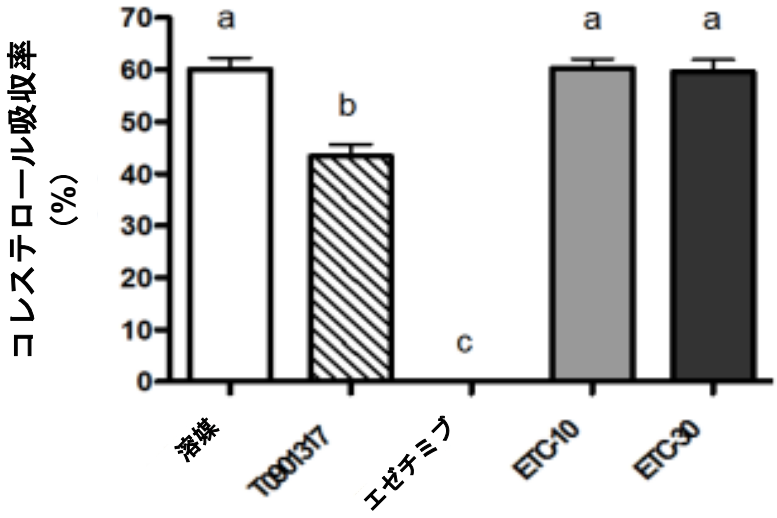


図 2.6.2.3.2.1-3　ベムペド酸，エゼチミブ，又はLXR作動薬T0901317のマウスでのコレステロール分画の吸収に及ぼす影響（RR 1002-150-011試験）

溶媒，T0901317 25 mg/kg/日，エゼチミブ10 mg/kg/日， ベムペド酸10 mg/kg/日（ETC-10），又はベムペド酸30 mg/kg/日（ETC-30）を7日間連日経口投与後に，ダイズ油50 μLに[4-^{14}C]コレステロール0.1 μCi及び[22,23-^{3}H]シトステロール0.2 μCiを溶解して経口投与した。糞を収集し，中性ステロールを抽出し，シンチレーションカウンターで計数した。コレステロール吸収率（%）を下式で算出した。

コレステロール吸収率（%） = ((^{14}C/^{3}H投与量比) – (糞中^{14}C/^{3}H比))/(^{14}C/^{3}H投与量比) × 100

1元配置ANOVAと続くTukey-Kramerの事後検定により，コレステロール分画の腸管吸収に対して投与の作用が認

められた。ETC-10及びETC-30の結果は溶媒と統計学的有意差がなかった。T0901317及びエゼチミブは溶媒と有意差（$p < 0.05$）があった。値は平均値 ± SEMである（n = 10/群）。

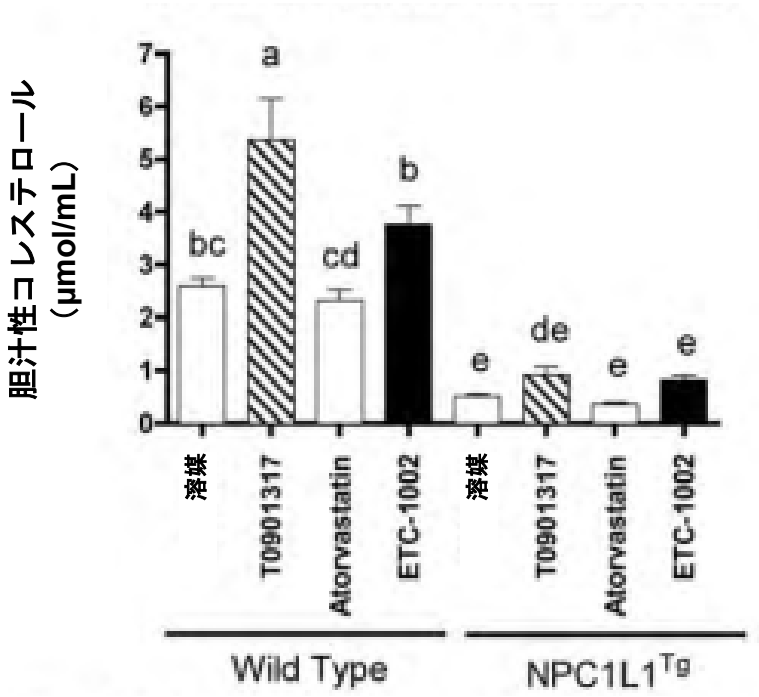


図 2.6.2.3.2.1-4　ベムペド酸，アトロバスタチン，又はLXR作動薬T0901317を投与したWTマウス及びNPC1L1Tgマウスでの胆汁性コレステロールに及ぼす影響（RR 1002-150-011試験）

WTマウス及びNPC1L1Tgマウスに溶媒，T0901317 25 mg/kg/日，アトルバスタチン15 mg/kg/日，又はベムペド酸（ETC-1002） 30 mg/kg/日を7日間連日経口投与後に，胆嚢胆汁を収集し，脂質をクロロホルム:メタノールで抽出した。コレステロール量をガス-液体クロマトグラフィーで測定した。胆嚢に対して遺伝子型 × 投与の交互作用が認められた（$p = 0.0007$）。遺伝子型 × 投与に対するTukey HSD検定で，小文字のアルファベットで異なる記号は群間の有意差を示す。ベムペド酸の投与によって胆汁性コレステロールが若干増加したが，溶媒との比較は統計学的に有意でなかった。値は平均値 ± SEMである（n = 10/群）。

2.6.2.3.2.2　LDLRノックアウトマウスでのベムペド酸の作用

雄LDLRノックアウトマウスに対照食又はベムペド酸3，10又は30 mg/kg/日を添加したHFHC食（カロリー比42%脂質；0.2%コレステロール）を12週間連日摂取させた[30]。本試験の目的は，ベムペド酸のリポ蛋白代謝及び血管病変に対する作用，並びに脂肪肝，骨格筋での脂肪酸合成，及びその他の関連代謝パラメータに対する潜在的な作用を確認することであった。

食事誘発性脂質生合成モデルラットにおける試験と同様に（2.6.2.2.2.2(1)項参照），ベムペド酸30 mg/kg/日は[^{14}C]酢酸の骨格筋脂質への取り込みに影響を及ぼさなかった（図 2.6.2.3.2.2-1）。

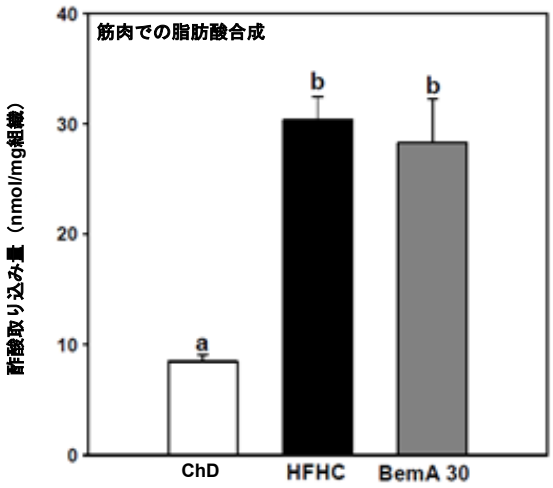


図 2.6.2.3.2.2-1　0.2%コレステロール食を12週間摂取させたLDLRノックアウトマウスの骨格筋での脂質合成に及ぼすベムペド酸の影響[30]

LDLRノックアウトマウスにChD，HFHC食又はベムペド酸（BemA） 30 mg/kg/日を添加したHFHC食（BemA 30）を12週間摂取させた。[^{14}C]酢酸の（腹腔内）注射60分後に骨格筋での脂肪酸合成を測定した。データは平均値 ±SEMである（n = 14/群）。小文字のアルファベットで異なる記号は有意差（$p < 0.05$）を示す

本試験において，ベムペド酸30 mg/kg/日投与により血漿中のコレステロール及びTGはそれぞれ最大41%及び52%低下した。脂質組成及び炎症/ストレスマーカーなども評価したところ，ベムペド酸30 mg/kg/日投与により大動脈洞切片の動脈硬化病変サイズが44%減少した（図 2.6.2.3.2.2-2，パネルA）。ベムペド酸30 mg/kg/日投与マウスでは病変内マクロファージもHFHC食単独摂取マウスより有意に少なかったが（−46%），総病変面積に対するマクロファージの割合（%）に差は認められなかった（図 2.6.2.3.2.2-2，パネルB）。

ベムペド酸30 mg/kg/日投与マウスでの病変内α-SMA陽性面積もHFHC食単独摂取マウスより小さかったが（−8%），この差は有意でなかった（図 2.6.2.3.2.2-2，パネルC）。コラーゲン染色の結果も同様に有意でなかった（図 2.6.2.3.2.2-2，パネルD）。

ベムペド酸30 mg/kg/日投与マウスでの活性カスパーゼ3陽性核の割合はHFHC食単独摂取マウスより有意に低かった（0.6% 対 対照1.1%，$p < 0.05$）（図 2.6.2.3.2.2-2，パネルE）。病変サイズの減少と一致して，大動脈全体の脂質分析によりベムペド酸30 mg/kg/日投与は遊離コレステロール（−22%）及びコレステロールエステル（−50%）を有意に低下させることが示された（図 2.6.2.3.2.2-3，パネルA）。ベムペド酸30 mg/kg/日投与することにより大動脈のTG量も有意に51%低下した（図 2.6.2.3.2.2-3，パネルA）。これらの分析によって，ベムペド酸は大動脈壁内の脂質の蓄積と，これに続くアテローム性動脈硬化病変の進行を抑制することが示された。

全長大動脈において，アテローム性動脈硬化の発生に関与することが知られているサイトカイン発現の変化を評価した（図 2.6.2.3.2.2-3，パネルB）。予測されたとおり，HFHC食はマクロファージM1マーカーであるTNF-α（*Tnf*），インターロイキン1β（*Il1b*），IL-6（*Il6*），CCL2（*Ccl2*），及び一酸化窒素シンターゼ2（*Nos2*）のmRNAの発現を有意に増加させ，ベムペド酸30 mg/kg/日によってこれらのマーカーはすべて有意に低下した。HFHC食は*Nos2*/*Arg1*比を上昇させ（2.4倍），これはマクロファージのM1からM2への極性変化と一致し，ベムペド酸はこの発現

パターンを逆方向に戻した（-32%）。

次に，大動脈において，マクロファージ炎症反応を制御することが知られている細胞シグナルカスケードを評価した（図 2.6.2.3.2.2-3，パネルC）。ERK1/2及びJNK2のリン酸化は、食事による影響及びベムペド酸による作用は認められなかった。一方，HFHC食によってp38及びJNK1のリン酸化が有意に上昇したが，ベムペド酸30 mg/kg/日はこれらのリン酸化を有意に低下させた（それぞれ−30%，$p < 0.05$及び−45%，$p < 0.05$）（図 2.6.2.3.2.2-3，パネルD）。これらの所見から，ベムペド酸は作用の一部として，食事誘発性の炎症シグナルカスケードを抑制することによって，大動脈炎症を抑制することが示唆される。

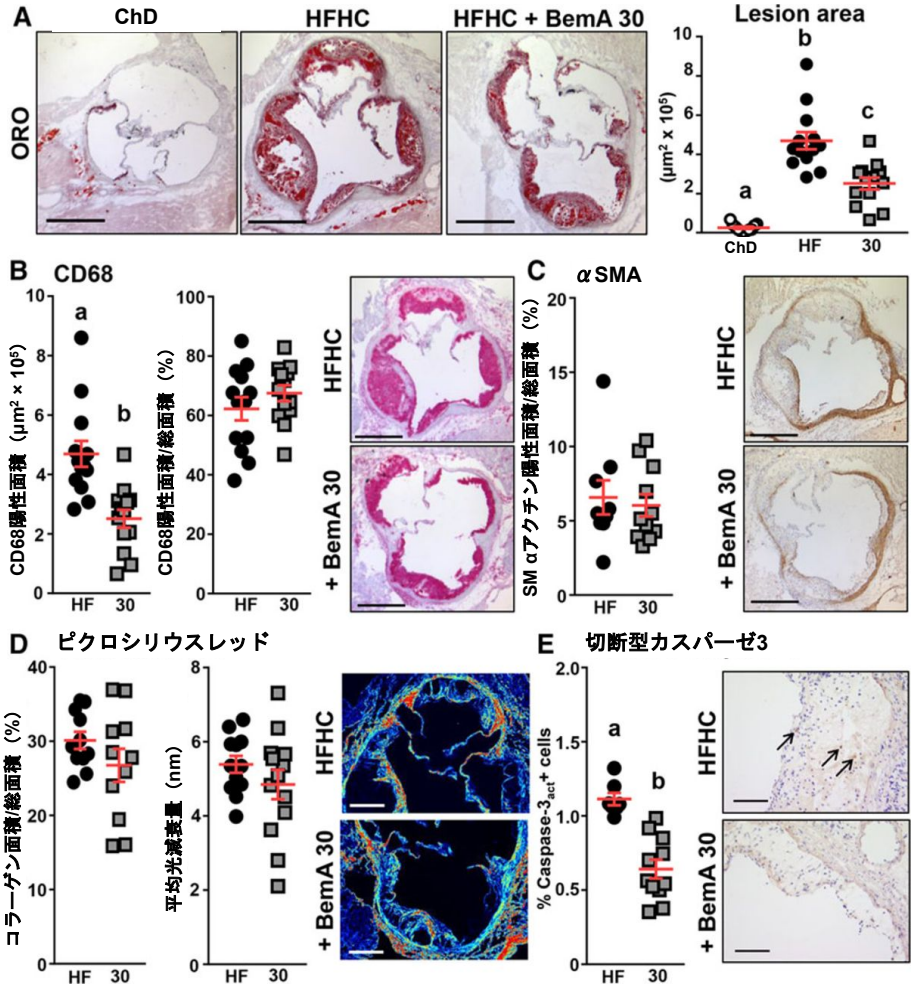


図 2.6.2.3.2.2-2　HFHC食を12週間摂取させたLDLRノックアウトマウスのアテローム性動脈硬化病変に及ぼすベムペド酸の影響[30]

パネルA：ChD，HFHC（又はHF），又はベムペド酸（BemA）30 mg/kg/日を添加したHFHC食を摂取した動物のORO染色・ヘマトキシリン対比染色大動脈洞切片の代表的な写真（横棒 ＝500 μm）。染色病変面積の定量データを示す。各マウスの値を記号で示し，平均値を単一の水平線で示す。抗CD68抗体でマクロファージ（**パネルB,** 横棒 ＝500 μm），抗αSMA抗体でSM細胞（**パネルC**，横棒 ＝500 μm），ピクロシリウスレッドでコラーゲン（**パネルD**，横棒 ＝250 μm），抗カスパーゼ3抗体でアポトーシス細胞（**パネルE**，横棒 ＝100 μm）を染色した大動脈洞切片の代表的な写真。矢印は陽性細胞を示す。定量データを各顕微鏡写真の横に示す。データは平均値±SEMである（n＝8-13/群）。小文字のアルファベットで異なる記号は有意差（$p < 0.05$）を示す。

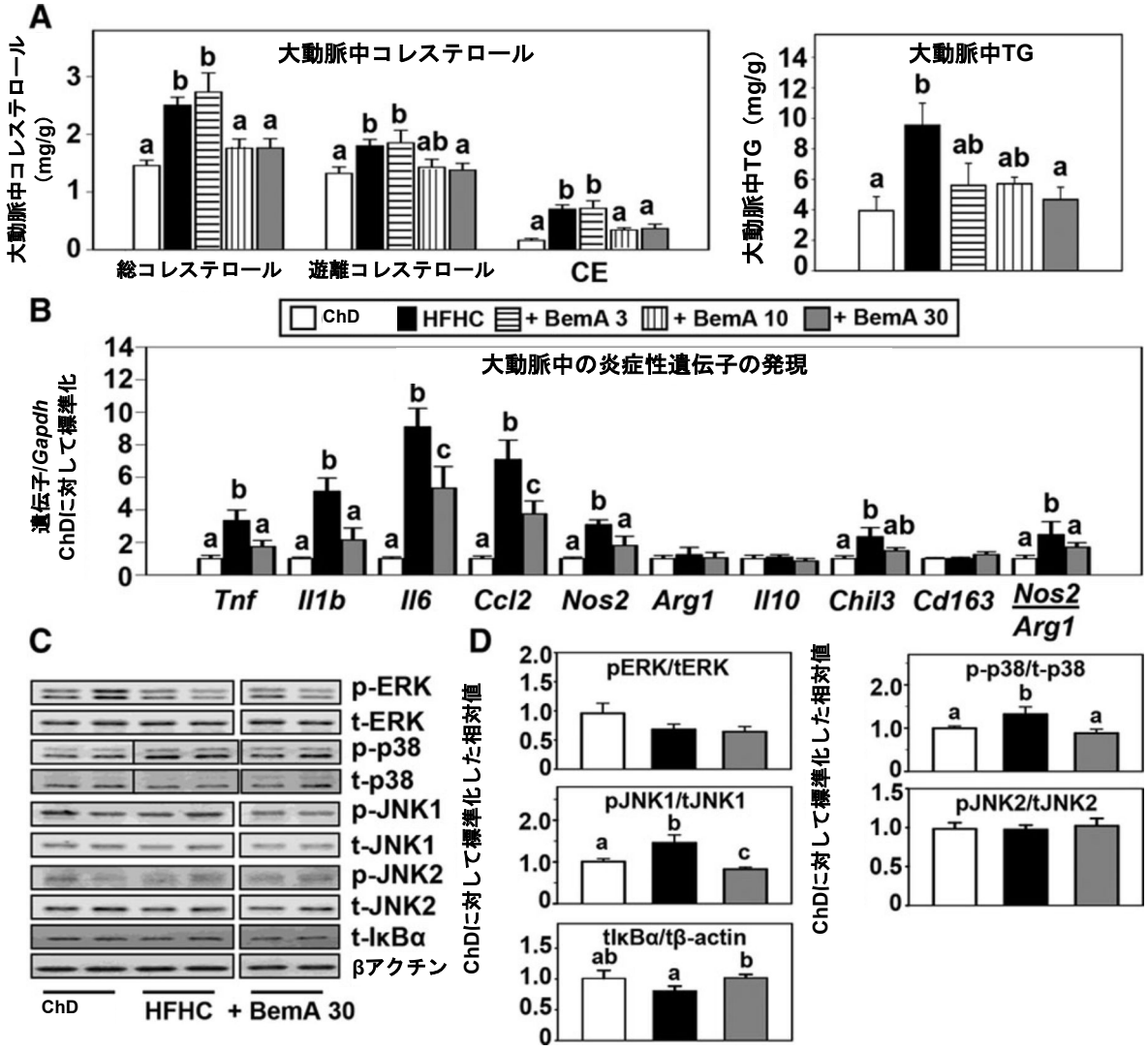


図 2.6.2.3.2.2-3　HFHC食を12週間摂取させたLDLRノックアウトマウスの全長大動脈における脂質蓄積，炎症性サイトカイン発現，及び炎症性シグナルに及ぼすベムペド酸の影響[30]

パネルA：大動脈抽出物中のコレステロール（chol）［総コレステロール，遊離コレステロール，及びコレステロールエステル（CE）］及びTG濃度を測定した（n = 11～12/群）。**パネルB**：全長大動脈中のM1マーカー及びM2マーカーのmRNA量（ChDを摂取したマウスで標準化）（n = 5-8/群）。**パネルC**：ERK1/2，p38，JNK1及びJNK2のリン酸化（p）蛋白及び総（t）蛋白並びにIκBα及びβアクチンの総（t）蛋白の代表的な免疫ブロット（マウス2例/群，すべて同一ブロットからのブロット）と，定量データ（**パネルD**，n = 6-8/群）。同一免疫ブロットのChD摂取マウスに対して標準化した相対値を示す。データは平均値 ± SEMで示す。小文字のアルファベットは有意差（$p < 0.05$）を示す。

HFHC食により誘発されたマイルドな血糖値の上昇は，ベムペド酸30 mg/kg/日投与により有意に抑制された（−14%）。HFHC食摂取マウスでの血漿インスリン高値は，ベムペド酸10 mg/kg/日（−23%）及び30 mg/kg/日（−50%）で抑制傾向を示した。耐糖能及びインスリン抵抗性を評価したところ，ベムペド酸10及び30 mg/kg/日で用量依存的かつ有意な耐糖能改善作用，及びインスリン抵抗性改善傾向が示された。

肝臓において，12週間のHFHC食は総コレステロール（TC，4.3倍），遊離コレステロール

（FC，1.5倍），及びコレステロールエステル（CE，16倍）の有意な増加を誘発した（図 2.6.2.3.2.2-4，パネルA）。肝臓中のTC，FC，及びCEは，ベムペド酸10 mg/kg/日（それぞれ−54%，−23%及び−65%）及び30 mg/kg/日（それぞれ−60%，−33%及び−70%）で有意に減少した。HFHC食誘発性の肝臓中TG量の増加（2.2倍）は，ベムペド酸10 mg/kg/日（−40%）及び30 mg/kg/日（−52%）投与により有意に抑制された（図 2.6.2.3.2.2-4，パネルB）。

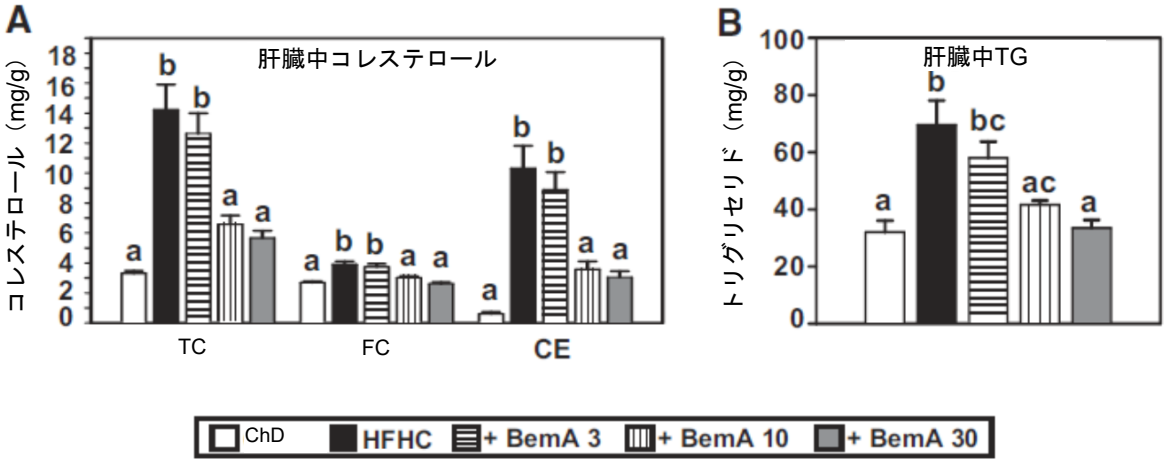


図 2.6.2.3.2.2-4　HFHC食を12週間摂取させたLDLRノックアウトマウスの脂肪肝に対するベムペド酸の影響[30]

パネルA：肝臓中のTC，FC，及びCE量。**パネルB**：肝臓中のTG量。データは平均値 ± SEMで示す（n = 14/群）。小文字のアルファベットは有意差（$p < 0.05$）を示す。

ベムペド酸30 mg/kg/日投与は肝臓での脂肪酸のβ酸化をHFHC食と比較して有意に増加させた（1.5倍）（図 2.6.2.3.2.2-5，パネルA）。HFHC食により誘発された肝臓での脂肪酸合成の増加（2.8倍）は，ベムペド酸30 mg/kg/日投与により有意に30%抑制された（図 2.6.2.3.2.2-5，パネルB）。肝臓でのTG及びCEの合成はベムペド酸10 mg/kg/日投与（それぞれ−42%及び−48%）及び30 mg/kg/日投与（それぞれ−52%及び−65%）の両方で有意に抑制された（図 2.6.2.3.2.2-5，パネルC及びD）。肝臓でのコレステロールの合成はHFHC食（−85%）により有意に抑制され，ベムペド酸30 mg/kg/日投与によるさらなる抑制効果は認められなかった（図 2.6.2.3.2.2-5，パネルE）。

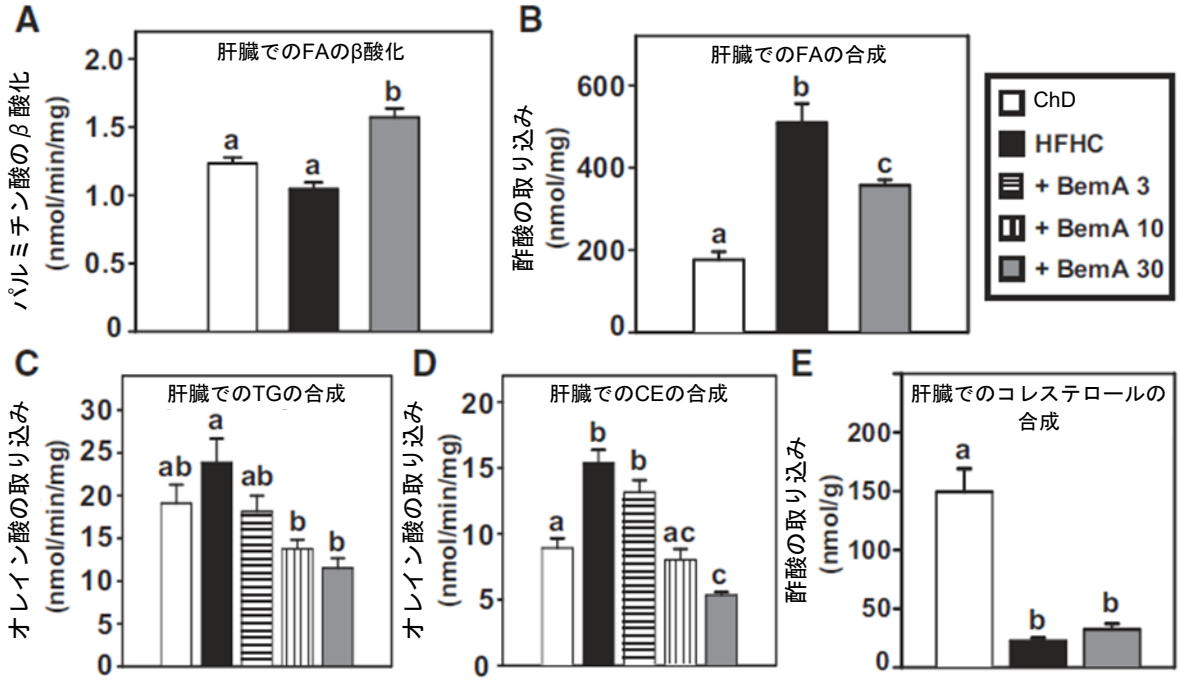


図 2.6.2.3.2.2-5　HFHC食を12週間摂取させたLDLRノックアウトマウスにおいて，ベムペド酸は肝臓での脂肪酸の酸化を上昇させ，脂肪酸，TG，及びCEの合成を低下させる[30]

パネルA：肝臓ホモジネート中の^{3}Hパルミチン酸β酸化。**パネルB**：[^{14}C]酢酸腹腔内投与60分後の肝臓におけるFA合成。肝臓ホモジネート中の[^{14}C]オレイン酸のTG（**パネルC**）及びCE（**パネルD**）への取り込み。**パネルE**：[^{14}C]酢酸腹腔内投与60分後の肝臓におけるコレステロール合成。データは平均値 ±SEMで示す（n = 8/群）。小文字のアルファベットは有意差（$p < 0.05$）を示す。

HFHC食誘発性の肝臓炎症及びベムペド酸の効果について，脂肪肝と関連する2つの主要炎症経路であるMAPK及びNF-κBの関連因子を免疫ブロット法により評価した。肝臓のp38及びERK1/2のリン酸化に対するHFHC食の影響はないかあってもわずかであるのに対し，ベムペド酸30 mg/kg/日はこれらのリン酸化を有意に低下させた（それぞれ−40%及び−52%；図 2.6.2.3.2.2-6，パネルA及びB）。炎症性遺伝子の発現はNF-κBの活性化を介することが多く，NF-κBの活性化は，IκBαやNF-κBαのリン酸化酵素であるIKKによって制御される。しかし，肝臓のIκBα及びIKKのリン酸化は，HFHC食とベムペド酸のいずれによっても影響を受けなかった（図 2.6.2.3.2.2-6，パネルB）。

肝臓炎症に関して，マクロファージM1（炎症性）又はM2（抗炎症性）表現型マーカーとして知られている遺伝子発現量を測定したところ，HFHC食摂取マウスでの*Tnf*，*Il1b*及び*Ccl2*の有意な発現増加は，ベムペド酸30 mg/kg/日投与で抑制傾向が認められ，*Ccl3*及び*Nos2*は有意に抑制されることが示された（図 2.6.2.3.2.2-6，パネルC）。HFHC食摂取マウスでのM2マクロファージマーカー遺伝子*Arg1*の発現低下はベムペド酸投与により回復した。HFHC摂取マウスでの*Nos2*/*Arg1*比の上昇はベムペド酸により有意に抑制され，これはM2表現型マクロファージが優位であることを示唆している（図 2.6.2.3.2.2-6，パネルC）。慢性全身性炎症に関して，血漿中のSAA値を測定したところ，肥満マウスにおいて，炎症刺激により肝臓及び脂肪組織中のSAA発現

が増加した（ただし，血中SAA値に反映されるのは肝臓由来SAAのみである）。HFHC摂取マウスにおいて，12週時点に血漿中SAA濃度がベースラインと比較して1.3倍増加することが示され，この増加はベムペド酸30 mg/kg/日投与により抑制された（−45%）（図 2.6.2.3.2.2-6，パネルD）。

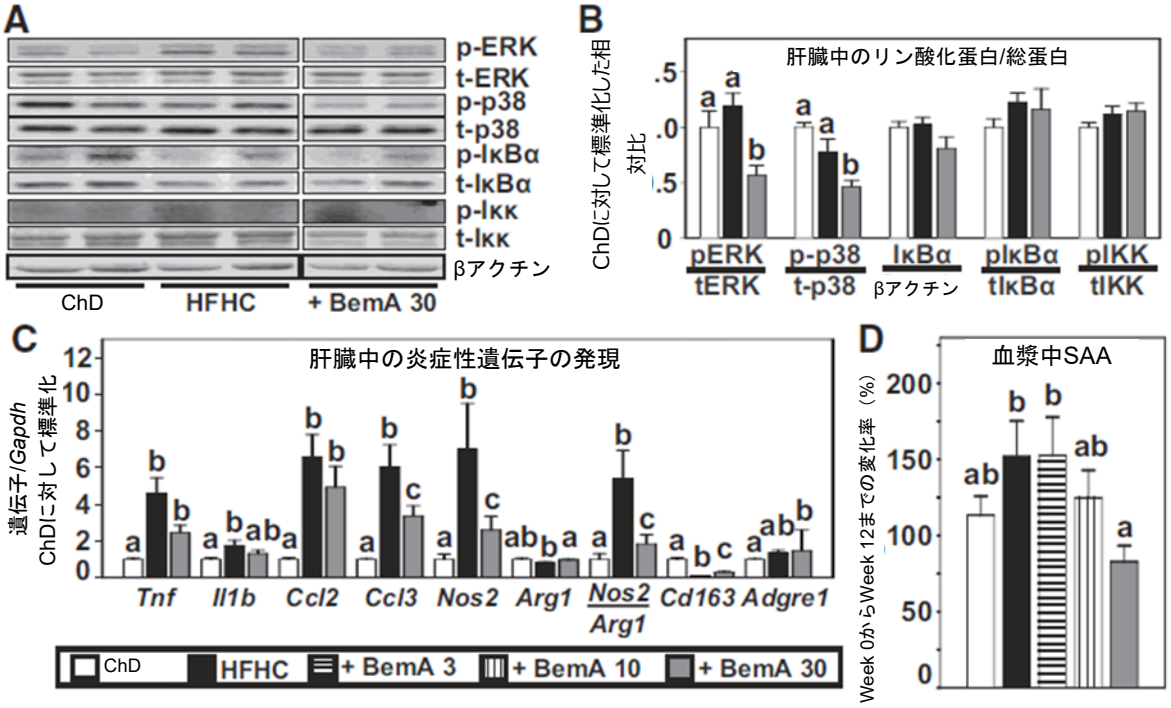


図 2.6.2.3.2.2-6　HFHC食を12週間摂取させたLDLRノックアウトマウスの肝臓恵尿に対するベムペド酸の影響[30]

パネルA：肝臓可溶化物中の炎症性シグナル蛋白であるERK1/2，p38，IκBα，及びIKKのリン酸化（p）蛋白及び総（t）蛋白の代表的な免疫ブロット（n = 2/群；すべて同一ブロットからのブロット）と，定量データ（**パネルB**，n = 7～8/群）。比は，同一免疫ブロットのChD摂取マウスに対して標準化した。**パネルC**：肝臓中の*Tnf*，*Il1b*，*Ccl2*，*Ccl3*，*Nos2*，*Arg1*，*Cd163*，及び*Adgre1*のmRNA量であり，*Gapdh*に対して示し，ChD摂取マウスの値で標準化した（n = 5～8/群）。**パネルD**：SAAのWeek 0からWeek 12までの変化率（%）（n = 10～16/群）。データは平均値 ± SEMで示す。小文字のアルファベットは有意差（$p < 0.05$）を示す。

2.6.2.3.2.3　KKA^{y}マウスでのベムペド酸の作用

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-150-003）

インスリン抵抗性の高TG血症肥満モデルであるKKA^{y}マウスを用いて，ベムペド酸の肝臓中TG，血糖値，及び体重に対する作用を検討した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.2-04）。6週齢KKA^{y}マウスにCMC/Tween-20（溶媒），ベムペド酸10又は60 mg/kg/日若しくは陽性対照であるメトホルミン300 mg/kg 1日2回（600 mg/kg/日）又はピオグリタゾン30 mg/kg/日を12週間経口投与した。疾患進行の対照として並行して，KKA^{a}同腹児に溶媒を投与した。

KKA^{a}マウスを用いた薬物動態試験において，ベムペド酸10 mg/kg/日で薬理学的に意義のある血漿中濃度（C_{max} = 3 μg/mL）が得られ，一方60 mg/kg/日では想定薬理学的曝露量を大幅に上回った（C_{max} = 91 μg/mL）。摂餌量，体重，経口耐糖能，肝臓中TG量，肝臓中遺伝子発現，脂質代謝及び糖代謝の血漿パラメータを測定した。KKA^{y}マウスは高インスリン血症，高血糖となり，血中及び肝臓中のTGがKKA^{a}同腹児と比較して劇的に上昇した。KKA^{y}マウスにおいて，ベ

ムペド酸（10 mg/kg/日）は血中TGを34%低下させ（60 mg/kg/日では変化なし），肝臓中TG量を10及び60 mg/kg/日でそれぞれ33%及び57%低下させた（図 2.6.2.3.2.3-1）。一方，メトホルミンは肝臓中TG量に影響を及ぼさなかった。ベムペド酸（10 mg/kg/日）は空腹時血糖を最大23%低下させ（図 2.6.2.3.2.3-2），経口耐糖能を改善し，1 g/kgグルコース負荷後の高血糖を41%低下させた（図 2.6.2.3.2.3-3）。ベムペド酸（10 mg/kg/日）は空腹時の血漿インスリンを37%低下させたが，ばらつきのため統計学的に有意でなかった。メトホルミンにより今回測定したすべての血糖指標に有意な変化が認められた。メトホルミンにより摂餌量及び体重が減少したのに対し，ベムペド酸による摂餌量及び体重の変化は認められなかった（図 2.6.2.3.2.3-4）。ベムペド酸の投与後に肝臓中遺伝子発現量の増加が以下の代謝制御因子で認められた：ミトコンドリア呼吸（UCP2，PGC-1α）；ミトコンドリア及びペルオキシソームでのβ酸化（CPT-I，ACO，Cyp4A10）；脂肪分解（LPL），及び胆汁形成（Cyp7A1，FXR）。結論として，インスリン抵抗性を示すKKA^{y}マウスにおいて，ベムペド酸は，摂餌量及び体重に影響を及ぼすことなく，高TG血症，脂肪肝，及び高血糖を改善した。

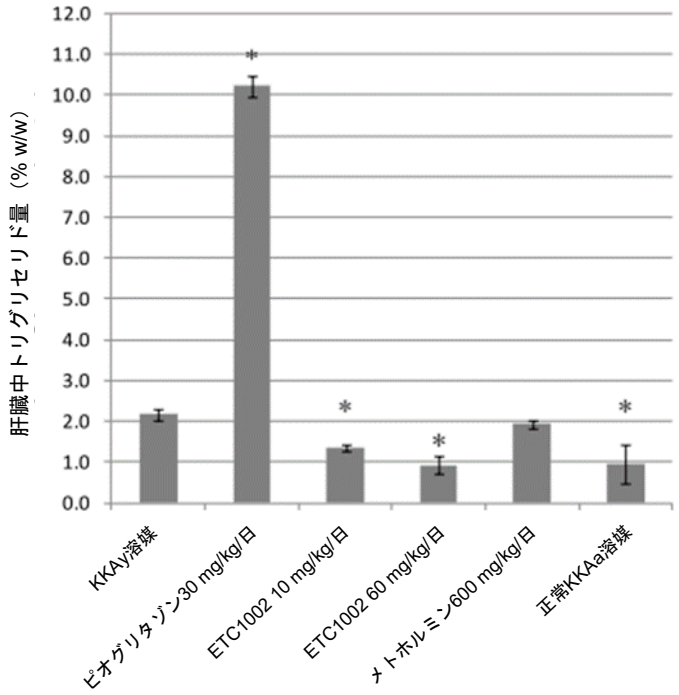


図 2.6.2.3.2.3-1　KKAyマウスの肝臓中TG量に及ぼすベムペド酸の影響（RR 1002-150-003試験）

KKA^{y}マウスにCMC/Tween溶媒（KKA^{y}溶媒），ピオグリタゾン30 mg/kg/日， ベムペド酸（ETC1002）10 mg/kg/日， 60 mg/kg/日，又はメトホルミン600 mg/kg/日を12週間経口投与した。疾患進行の対照として，KKA^{a}同腹児にCMC/Tween溶媒を投与した。投与終了時に肝臓を瞬間凍結し，肝臓中TG量を脂質抽出物のHPLC-ELSDにより測定した。値は平均値 ± SEMである（n = 5-7/群）。KKA^{y}溶媒群の値との比較は，対応のない両側等分散Studentのt検定を用いて行った（*$p \leq 0.05$）。

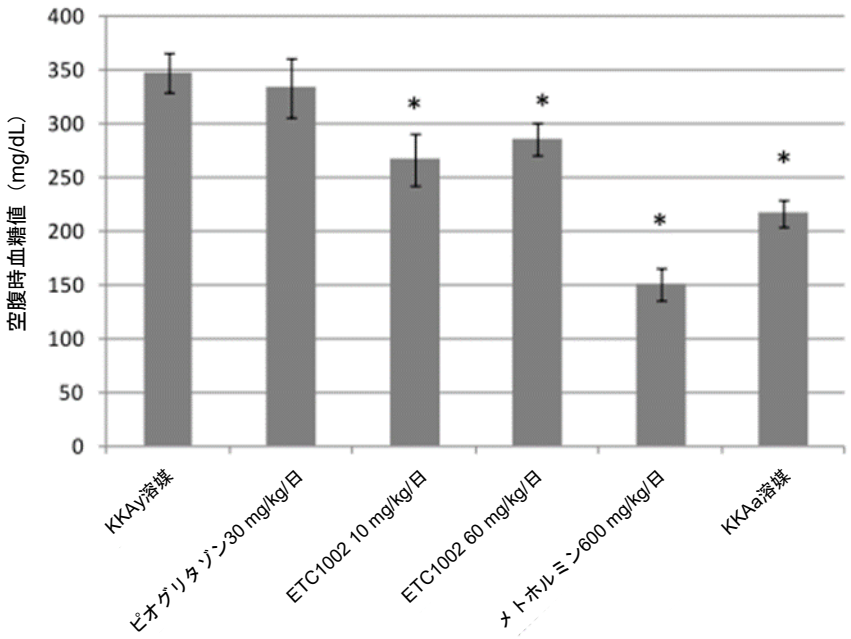


図 2.6.2.3.2.3-2　KKAyマウスの空腹時血糖に及ぼすベムペド酸の影響（RR 1002-150-003試験）

KKA^{y}マウスにCMC/Tween溶媒（KKA^{y}溶媒），ピオグリタゾン30 mg/kg/日， ベムペド酸（ETC1002）10 mg/kg/日，60 mg/kg/日，又はメトホルミン600 mg/kg/日を12週間経口投与した。疾患進行の対照として，KKA^{a}同腹児にCMC/Tween溶媒を投与した。4時間の絶食後に，覚醒下尾採血により血糖測定器を用いて血糖値を測定した。値は平均値 ± SEMである（n = 5-7/群）。KKA^{y}溶媒群の値との比較は，対応のない両側等分散Studentのt検定を用いて行った（*$p \leq 0.05$）。

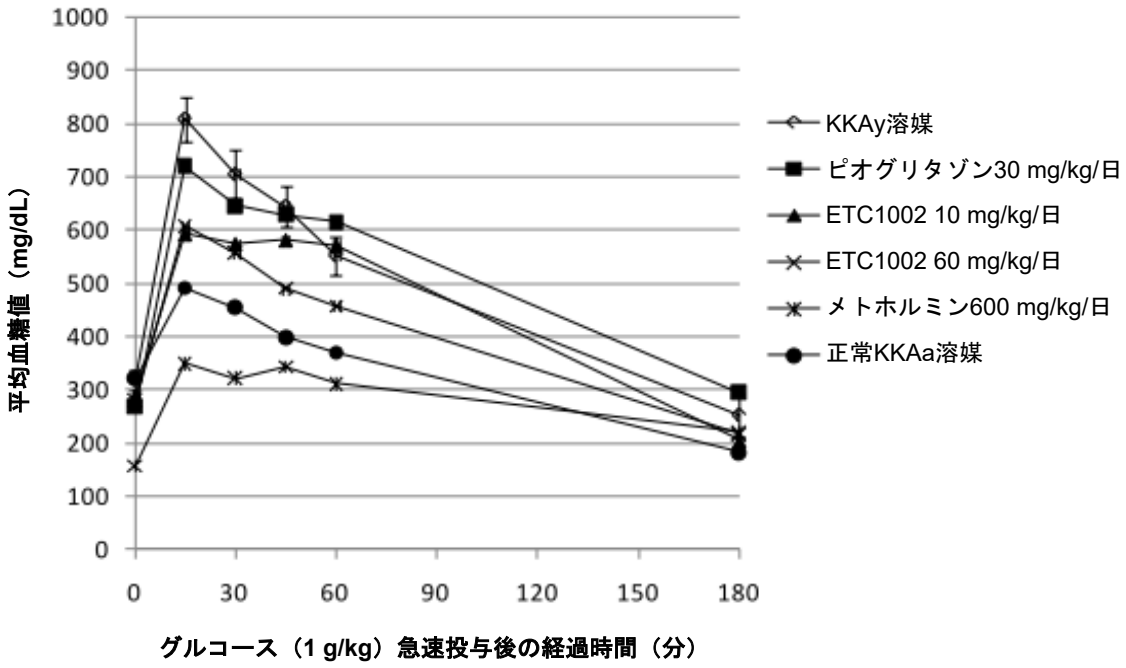


図 2.6.2.3.2.3-3　KKAyマウスの耐糖能異常に及ぼすベムペド酸の影響（RR 1002-150-003試験）

KKA^{y}マウス（n = 5-7/群）にCMC/Tween溶媒（KKAy溶媒；白ひし形）， ピオグリタゾン30 mg/kg/日（黒四

角），ベムペド酸（ETC1002） 10 mg/kg/日（黒三角），ETC1002 60 mg/kg/日（×），又はメトホルミン600 mg/kg/日（*）を12週間経口投与した。疾患進行の対照として，KKA^{a}同腹児（n = 6）にCMC/Tween溶媒を投与した（KKAa溶媒；黒丸）。4時間の絶食後に，マウスにグルコース1 g/kgを経口投与した。経口グルコース負荷の実施直前（0時点），15分間隔で60分時点まで，その後180分時点に，覚醒下尾採血により血糖測定器を用いて血糖値を測定した。各群の平均値を示し，KKA^{y}溶媒群ではSEMも示す。

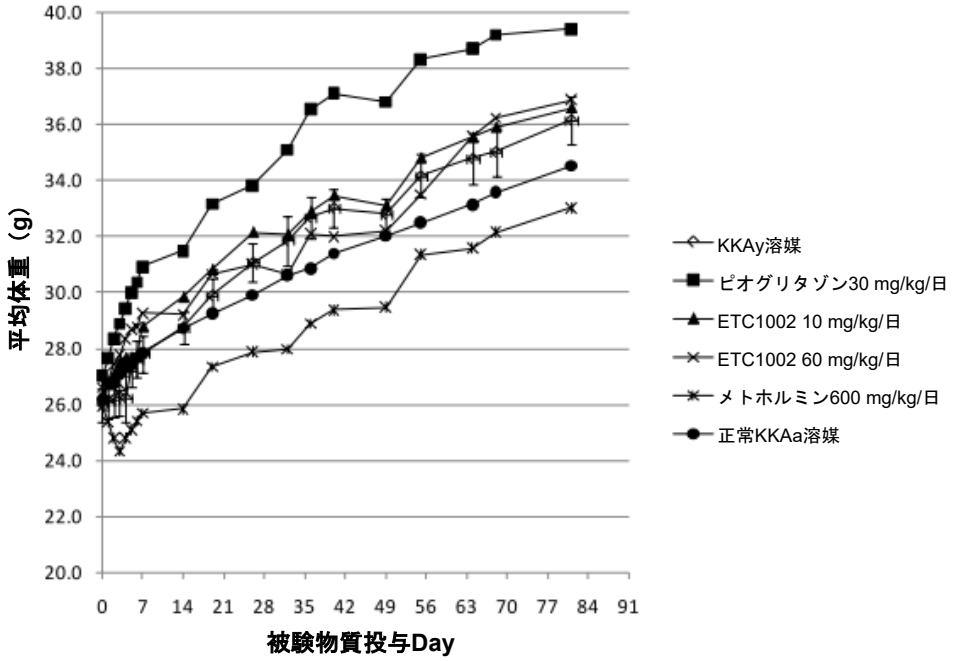


図 2.6.2.3.2.3-4　KKAyマウスの体重に及ぼすベムペド酸の影響（RR 1002-150-003試験）

KKA^{y}マウス（n = 5-7/群）にCMC/Tween溶媒（KKAy溶媒；白ひし形），ピオグリタゾン30 mg/kg/日（黒四角），ベムペド酸（ETC1002） 10 mg/kg/日（黒三角），ETC1002 60 mg/kg/日（×），又はメトホルミン600 mg/kg/日（*）を12週間経口投与した。疾患進行の対照として，KKA^{a}同腹児（n = 6）にCMC/Tween溶媒を投与した（KKA^{a}溶媒；黒丸）。体重を週2回測定した。各群の平均値を示し，KKA^{y}溶媒群ではSEMも示す。

2.6.2.3.2.4　DIOマウスでのベムペド酸の作用

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-150-005）

60%脂肪食を摂取させたC57BL/6マウスを用いて，ベムペド酸（3，10又は30 mg/kg/日；各群n = 10）強制経口投与の体重増加，高血糖，高インスリン血症及び脂肪肝に対する作用を検討した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.2-05）。対照としてロシグリタゾン25 mg/kg/日を用いた（n = 4）。マウスは高脂肪食負荷により肥満，高インスリン血症，軽度の高血糖，インスリン感受性低下，及び肝臓中TG増加を呈した。ベムペド酸のこれらのパラメータに対する作用には用量依存性があり，10及び30 mg/kg/日で統計学的に有意であった。溶媒群と比較して，ベムペド酸10及び30 mg/kg/日群は摂餌量に影響することなく，体重増加をそれぞれ8%及び15%抑制した（図2.6.2.3.2.4-1）。ベムペド酸10及び30 mg/kg/日群の体重変化は，精巣上体脂肪体重量の12%及び32%減少と関連した。ベムペド酸30 mg/kg/日を投与したマウスから採取し*ex vivo*培養した精巣上体脂肪体外植片において，溶媒群と比較して，炎症性マーカーであるIL-6が63%低下した。ベム

ベムペド酸10 及び30 mg/kg/日は肝臓中TG量をそれぞれ34%及び46%減少させ（図 2.6.2.3.2.4-2），空腹時血糖をそれぞれ11%及び16%低下させた（溶媒との比較でそれぞれp = 0.0001及びp < 0.0001；図 2.6.2.3.2.4-3）。またベムペド酸10 及び30 mg/kg/日は血漿中インスリンをそれぞれ80%及び92%低下させ（それぞれp = 0.01及びp < 0.03；図 2.6.2.3.2.4-4），インスリン負荷試験において有意な改善作用を発揮し，AUCをそれぞれ19%及び22%減少させた（それぞれp = 0.05及びp = 0.03；図 2.6.2.3.2.4-5）。さらにベムペド酸30 mg/kg/日でのみ耐糖能の若干の改善傾向が認められた。ベムペド酸30 mg/kg/日において，溶媒と比較して，肝臓中のリン酸化AMPK（総AMPKで標準化）の51%増加（p = 0.02）及び肝臓中のFOXO1量の55%減少が認められ（p < 0.0001），肝臓での糖新生の低下が空腹時血糖の改善に寄与している可能性が示された。

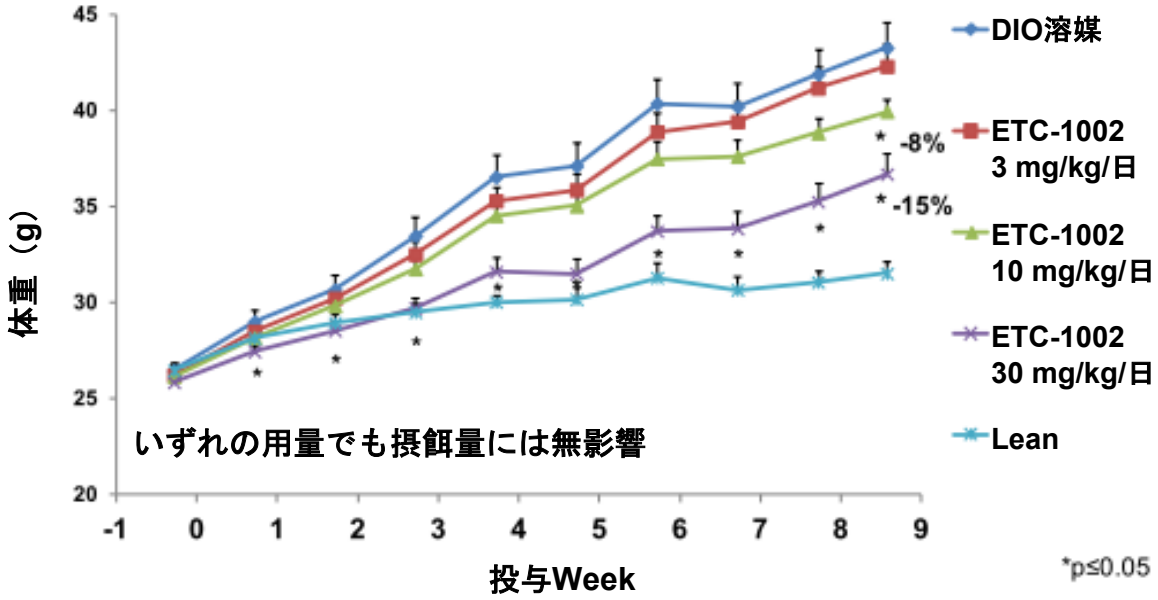


図 2.6.2.3.2.4-1　DIOマウスの体重に及ぼすベムペド酸の影響（RR 1002-150-005試験）

マウスに60%脂肪食を摂取させ，0.5%CMC/0.025% Tween溶媒（DIO溶媒；ひし形，濃い青色），ベムペド酸（ETC-1002）　3 mg/kg/日（四角，赤色），ETC-1002　10 mg/kg/日（三角，緑色），又はETC-1002　30 mg/kg/日（×，紫色）を9週間経口投与した。疾患進行の対照として，マウスにChDを摂取させ，CMC/Tween溶媒を投与した（Lean；*，薄い青色）。値は平均値 ± SEMである（n = 10/群）。各時点での溶媒群と投与群の比較は，対応のない両側Studentのt検定を用いて行った（*p ≤ 0.05）。

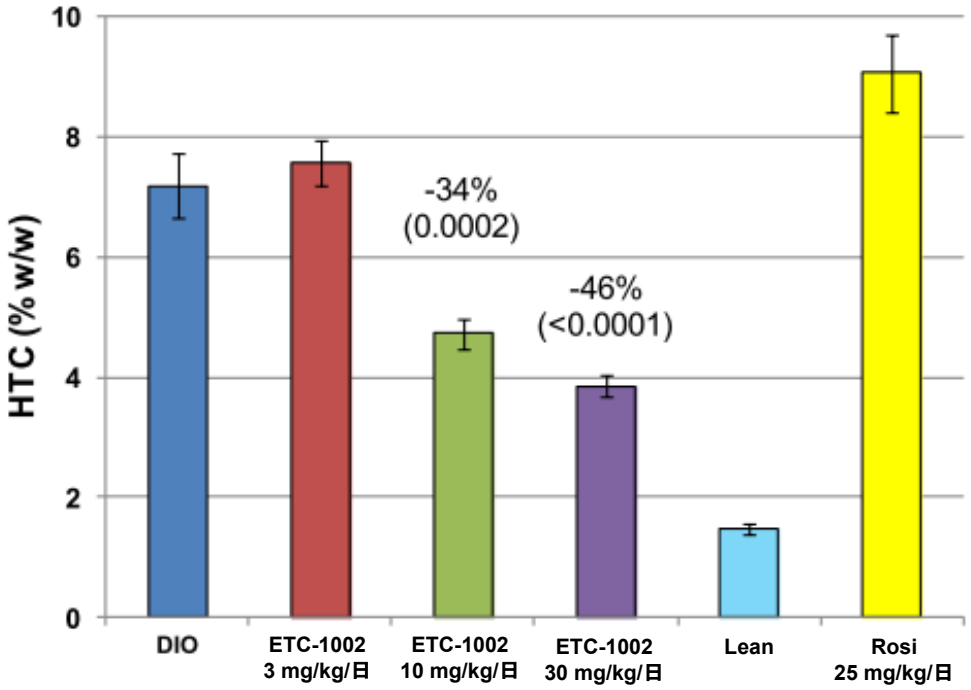


図 2.6.2.3.2.4-2　DIOマウスの肝臓中TG量に及ぼすベムペド酸の影響（RR 1002-150-005試験）

マウスに60%脂肪食を摂取させ，0.5%CMC/0.025% Tween溶媒（溶媒；濃い青色），ベムペド酸（ETC-1002）3 mg/kg/日（赤色），ETC-1002 10 mg/kg/日（緑色），ETC-1002 30 mg/kg/日（紫色），又はRosi 25 mg/kg/日（黄色）を9週間経口投与した。疾患進行の対照として，マウスにChDを摂取させ，CMC/Tween溶媒を投与した（Lean；薄い青色）。投与終了時に肝臓を瞬間凍結し，HTCをHPLC-ELSDにより測定した。値は平均値 ± SEMである（Rosi群(n = 4)を除きn=10）。溶媒群の値との比較は，対応のない両側Studentのt検定を用いて行った。DIO溶媒群と比較したときの変化率（%）を示し，$p \leq 0.05$の投与群ではp値を示した。

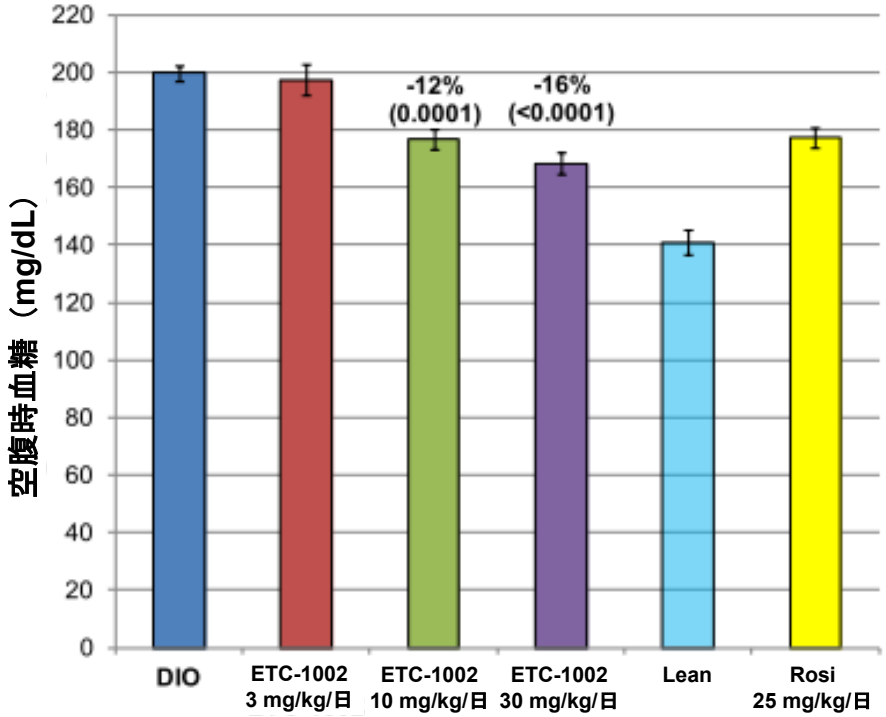


図 2.6.2.3.2.4-3　DIOマウスの空腹時血糖に及ぼすベムペド酸の影響（RR 1002-150-005試験）

マウスに60%脂肪食を摂取させ，0.5%CMC/0.025% Tween溶媒（溶媒；濃い青色），ベムペド酸（ETC-1002）3 mg/kg/日（赤色），ETC-1002 10 mg/kg/日（緑色），ETC-1002 30 mg/kg/日（紫色），又はRosi 25 mg/kg/日（黄色）を9週間経口投与した。疾患進行の対照として，別コホートのマウスにChDを摂取させ，CMC/Tween溶媒を投与した（Lean；薄い青色）。4時間の朝絶食後に，覚醒下尾部切断により血糖測定器を用いて血糖値を測定した。値は平均値 ± SEMである（Rosi群(n = 4)を除きn=10）。溶媒群の値との比較は，対応のない両側Studentのt検定を用いて行った。DIO溶媒群と比較したときの変化率（%）を示し，p ≤ 0.05の投与群ではp値を示した。

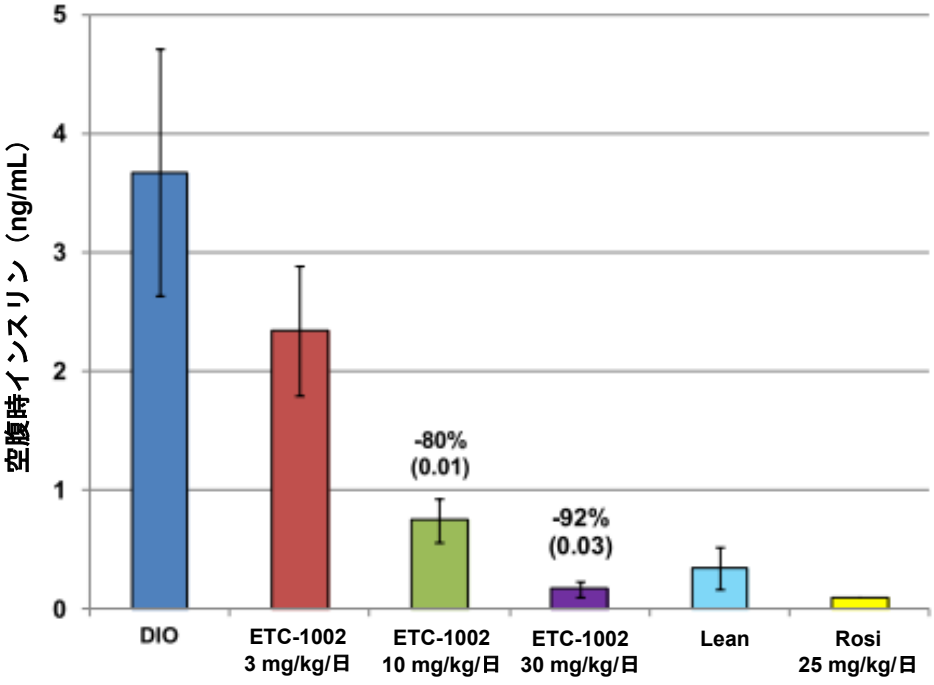


図 2.6.2.3.2.4-4　DIOマウスの空腹時血漿インスリンに及ぼすベムペド酸の影響（RR 1002-150-005試験）

マウスに60%脂肪食を摂取させ，0.5%CMC/0.025% Tween溶媒（DIO；濃い青色），ベムペド酸（ETC-1002）3 mg/kg/日（赤色），ETC-1002 10 mg/kg/日（緑色），ETC-1002 30 mg/kg/日（紫色），又はRosi 25 mg/kg/日（黄色）を9週間経口投与した。疾患進行の対照として，別コホートのマウスにChDを摂取させ，CMC/Tween溶媒を投与した（Lean；薄い青色）。4時間の朝絶食後に，イソフルラン麻酔下に心臓穿刺により血漿を採取し，インスリン値をALPCOマウス用「High Range（広範囲）」EIA法で測定した。値は平均値 ± SEMである（Rosi群(n = 4)を除きn = 10/群）。DIO溶媒群の値との比較は，対応のない両側Studentのt検定を用いて行った。溶媒群と比較したときの変化率（%）を示し，p ≤ 0.05の投与群ではp値を示した。

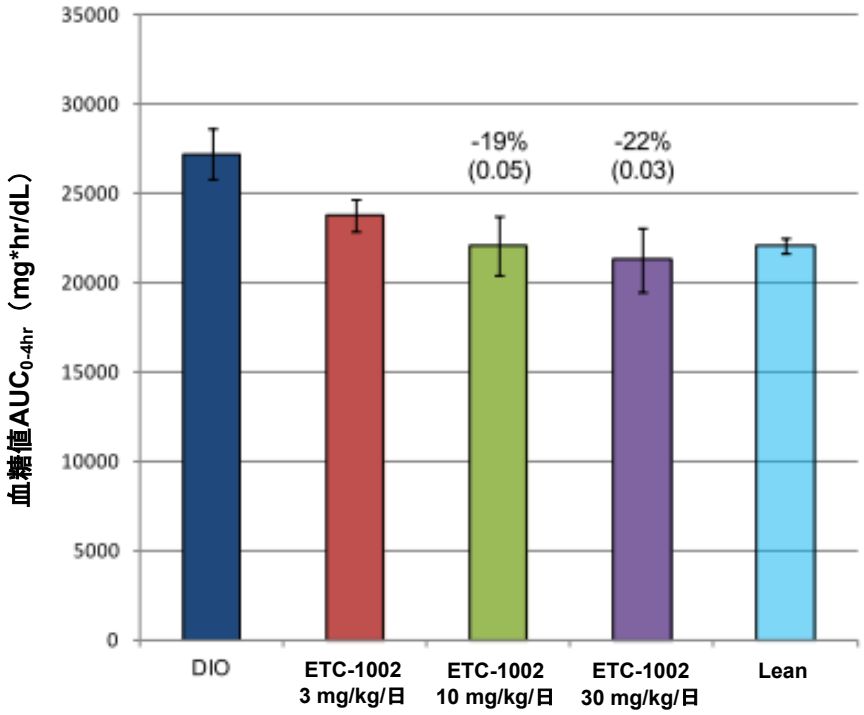


図 2.6.2.3.2.4-5　DIOマウスのインスリン感受性に対するベムペド酸の影響（RR 1002-150-005試験）

マウスに60%脂肪食を摂取させ，0.5%CMC/0.025% Tween溶媒（溶媒；濃い青色），ベムペド酸（ETC-1002）3 mg/kg/日（赤色），ETC-1002 10 mg/kg/日（緑色），又はETC-1002 30 mg/kg/日（紫色）を9週間経口投与した。疾患進行の対照として，別コホートのマウスにChDを摂取させ，CMC/Tween溶媒を投与した（Lean；薄い青色）。5時間の朝絶食後に，組み換えヒトインスリンを0.7 U/kgの用量で含有する生理食塩液を腹腔内注射した。経口グルコース負荷の実施直前（0時点），30分間隔で120分時点まで，その後180及び240分時点に，覚醒下尾部切断により血糖測定器を用いて血糖値を測定した。各投与群の$AUC_{0\text{-}4hr}$を算出した；値は平均値 ± SEMである（Lean群(n = 3)を除きn = 5/群）。溶媒群の値との比較は，対応のない両側Studentのt検定を用いて行った。溶媒群と比較したときの変化率（%）を示し，p ≤ 0.05の投与群ではp値を示した。

2.6.2.3.2.5　DIOマウスでのベムペド酸の治療介入

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-150-006）

DIOマウスを用いた2つ目の試験では，60%脂肪食を摂取させたC57BL/6マウスにベムペド酸3，10又は30 mg/kg/日を6週間強制経口投与し，肥満，高血糖，高インスリン血症及び脂肪肝の改善（治療介入）について検討した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.2-03）。対照としてロシグリタ

ゾン25 mg/kg/日を用いた。高脂肪食を負荷したマウスが肥満，高インスリン血症及び一過性の高血糖（22週齢まで）を呈してから，ベムペド酸の投与を開始した。溶媒投与群と比較して，ベムペド酸30 mg/kg/日群は投与開始2週間後に体重を9%減少し（p = 0.02），この体重減少作用は投与6週間後でも確認された（図 2.6.2.3.2.5-1）。このとき，摂餌量に対する影響は認められなかった。体重変化は，精巣上体脂肪重量のわずかな減少（6%）と一致した傾向を示した（p = 0.3）。ベムペド酸投与6週間後に肝臓中TG量も64%減少した（p < 0.0001）。ベムペド酸30 mg/kg/日は投与2週間後に空腹時血糖値を13%低下させ（p = 0.01），血漿インスリンを42%低下させ（p = 0.02），これによりHOMA-IRスコアが51%低下し（p = 0.04），QUICKIスコアが10%上昇した（p = 0.008）。投与5週後のインスリン負荷試験においてベムペド酸30 mg/kg/日は有意な改善作用を発揮し，$AUC_{0\text{-}4hr}$を62%低下させた（p = 0.01）（表 2.6.2.3.2.5-1）。しかし投与6週間後に，対照として用いたロシグリタゾン（25 mg/kg/日）では耐糖能の有意な改善が認められたが，ベムペド酸による耐糖能の有意な改善は認められなかった。

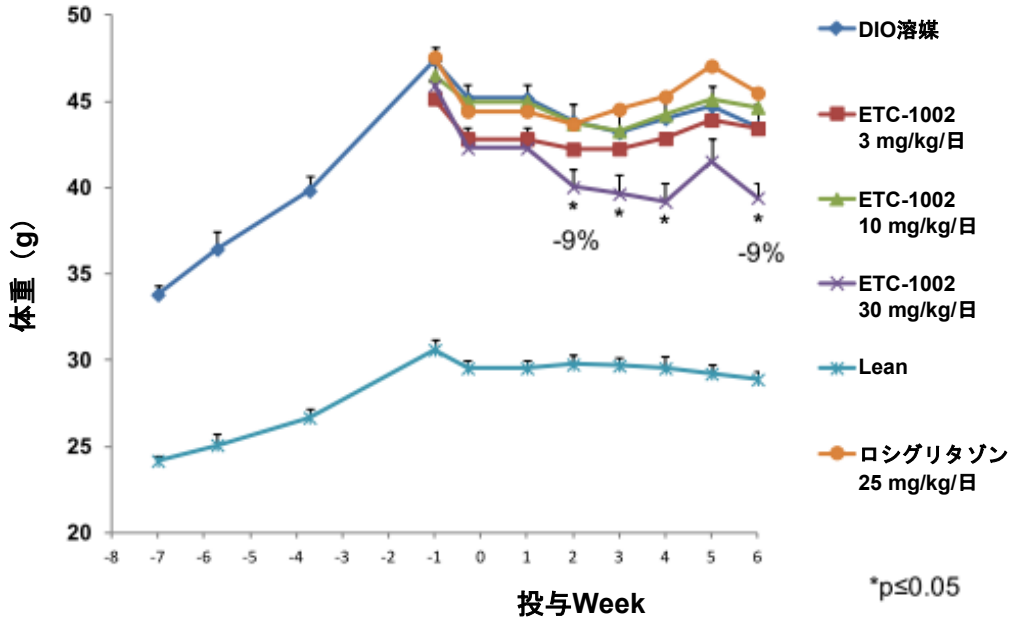


図 2.6.2.3.2.5-1　DIOマウスの体重に及ぼすベムペド酸の影響（RR 1002-150-006試験）

マウスに肥満及び高血糖が生じるまで60%脂肪食を12週間摂取させ，続いて60%脂肪食を継続しながら，0.5%CMC/0.025% Tween溶媒（ひし形，濃い青色），ベムペド酸（ETC-1002）　3 mg/kg/日（四角，赤色），ETC-1002　10 mg/kg/日（三角，緑色），ETC-1002　30 mg/kg/日（×，紫色），又はRosi 25 mg/kg/日（丸，橙色）を1日1回6週間経口投与した。疾患進行の対照として，別コホートのマウスにChDを摂取させ，CMC/Tween溶媒を投与した（Lean；*，薄い青色）。値は平均値 + SEMである（n = 6-10/群）。各時点でのDIO溶媒群と投与群の比較は，対応のない両側Studentのt検定を用いて行った（*p ≤ 0.05）。

表 2.6.2.3.2.5-1　ベムペド酸30 mg/kg/日を6週間投与したDIOマウスでのアウトカムの概要（RR 1002-150-006試験）

薬理学的アウトカム	食事誘発性肥満に対する6週間介入		
	0（溶媒）	30 mg/kg/日	変化率（p値）
1日摂餌量（g/日）	2.5 ± 0.1	2.6 ± 0.1	4%（p = 0.5）
体重（g）	44 ± 1	39 ± 1	−11%（p = 0.02）
脂肪量（mg）	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.1	−5%（p = 0.3）
肝臓中TG（% w/w）	5.1 ± 0.4	1.8 ± 0.1	−65%（p < 0.0001）
空腹時血糖（mg/dL）[a]	174 ± 4	152 ± 6	−13%（p = 0.01）
空腹時インスリン（ng/mL）[a]	2.2 ± 0.3	1.3 ± 0.2	−41%（p = 0.02）
HOMA-IRスコア[a]	27 ± 4	13 ± 4	−52%（p = 0.04）
QUICKIスコア[a]	0.25 ± 0.0	0.28 ± 0.01	12%（p = 0.008）
グルコース負荷試験での$AUC_{0\text{-}2hr}$（mg·hr/dL）	456 ± 24	445 ± 11	−2%（p = 0.7）
インスリン負荷試験での$AUC_{0\text{-}4hr}$（mg·hr/dL）	169 ± 31	64 ± 4	−62%（p = 0.01）

[a.] 溶媒を投与したDIOマウスにおいて，Week 0～Week 2に一過性の高血糖が認められたが，その後Week 6まで正常血糖値であった。提示したデータは投与2週間後のデータである。

2.6.2.3.2.6　果糖を摂取させたハムスターでのベムペド酸の作用

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-150-004）

60%果糖食を摂取させ高血糖を誘発した雄Golden Syrianハムスターを用いて，ベムペド酸のインスリン抵抗性及びインスリン感受性に対する作用を検討した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.2-06）。ベムペド酸の投与2週間前から動物に果糖食を摂取させ，3週間の投与期間中も継続した。ベムペド酸は3，10又は30 mg/kg/日の用量で1日1回強制経口投与した。ベムペド酸30 mg/kg/日群では，溶媒（0.5% CMC/0.025% Tween-20）と比較して，グルコース負荷試験時の食後血糖値を36%改善し（p < 0.001；図 2.6.2.3.2.6-1），外因性インスリン急速投与による血糖値上昇を最大60%改善した（p = 0.03）。このように耐糖能が改善したことで，グルコース負荷投与後90分間の総血糖曲線下面積が47%減少し（p = 0.08），インスリン急速投与後90分間の総血糖曲線下面積が34%減少した（p = 0.05）。30 mg/kg/日群で体重増加が9%減少したが（p < 0.001）（図 2.6.2.3.2.6-2），これは投与直後4日間の有意な摂餌量34%減少を反映しており，以後の試験期間中維持された。脂肪酸β酸化の上昇と一致して，ベムペド酸は用量依存的に血漿中β-HBAを最大85%上昇させ（p < 0.001），30 mg/kg/日群で精巣上体脂肪重量を22%減少させた（p = 0.001）。ChDと比較して，果糖を摂取させたハムスターの肝臓では脂肪蓄積増加は認められなかったが，ベムペド酸は用量依存的に肝臓中TG量を有意に最大62%減少させ（p < 0.0001；図 2.6.2.3.2.6-3），30 mg/kg/日で血漿中TGを27%低下させた（p = 0.03）。

一方，空腹時血漿インスリン，血糖値，ApoB，血漿中コレステロール，血漿中NEFA，及び筋肉中グリコーゲン量に変化は認められなかった。ハムスターの肝臓中にETC-1002-CoAは最大1.6 nmol/mg肝臓の濃度で検出された。投与期間を通じて，溶媒と比較して，ベムペド酸投与による血漿中ALT及びASTの変化は認められなかった。

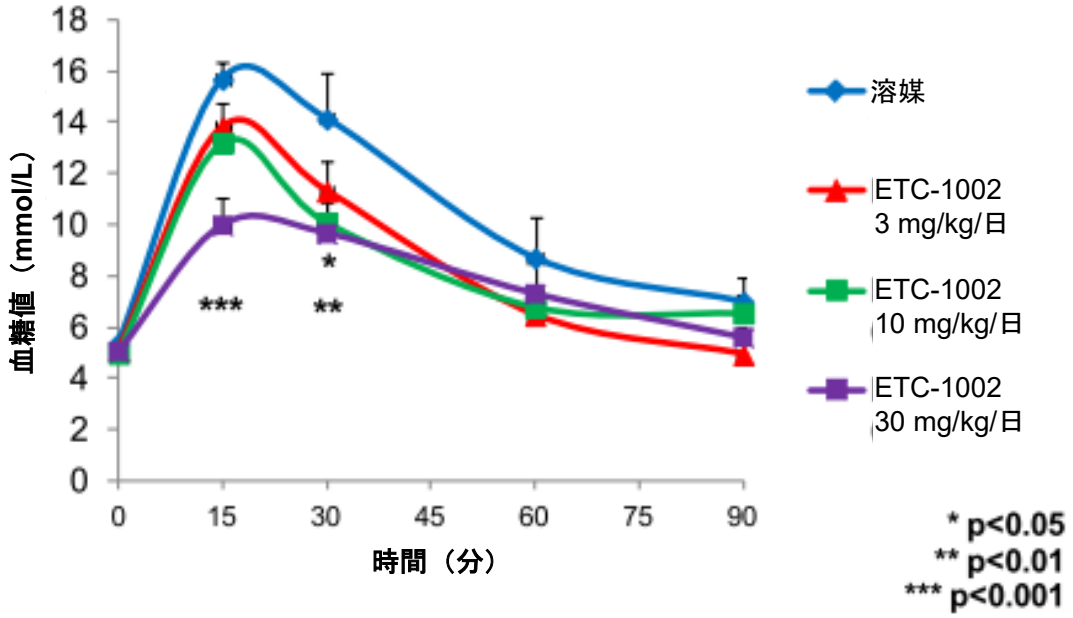


図 2.6.2.3.2.6-1　果糖摂取高血糖Golden Syrianハムスターの耐糖能に及ぼすベムペド酸の影響（RR 1002-150-004）

雄ハムスターに60%果糖食を2週間摂取させて高血糖を誘発し，続いて60%果糖食を継続しながら，0.5%CMC/0.025% Tween-20溶媒（ひし形，濃い青色），ベムペド酸（ETC-1002）3 mg/kg/日（三角，赤色），10 mg/kg/日（四角，緑色）又は30 mg/kg/日（四角，紫色）を3週間経口投与した（n = 8/群）。5時間の朝絶食後に，ハムスターにグルコース2 g/kgを急速腹腔内投与した。グルコース負荷の実施直前（0時点），以降は15，30，60及び90分時点に，覚醒下の血糖値を，ハンドヘルド型血糖測定器を用いて測定した。値は平均値 ＋SEMであり，n = 8/群の値を示す。ベムペド酸10 mg/kg/日群及び30 mg/kg/日群と果糖溶媒群の2元配置反復測定分散分析で有意な投与作用が示された（$p < 0.05$）。各時点の溶媒との比較での有意性をBonferroniのt検定を用いて検定した（*$p < 0.05$，**$p < 0.01$，***$p < 0.001$）。

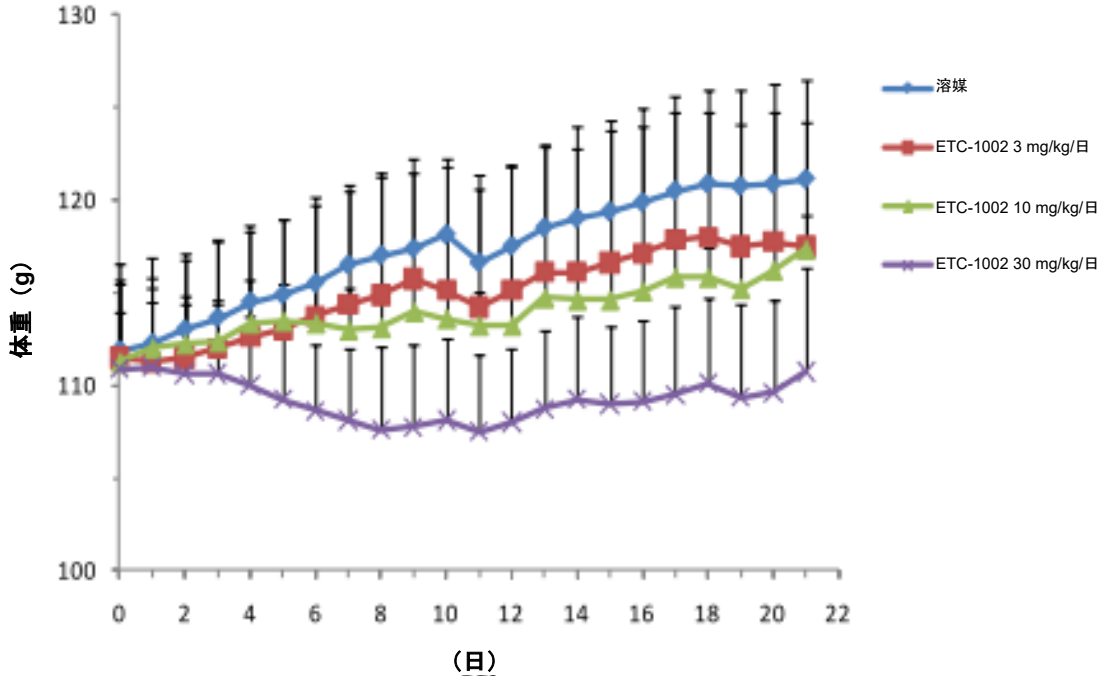


図 2.6.2.3.2.6-2　果糖摂取高血糖Golden Syrianハムスターの体重に及ぼすベムペド酸の影響（RR 1002-150-004）

雄ハムスターに60%果糖食を2週間摂取させて高血糖を誘発し，続いて60%果糖食を継続しながら，0.5%CMC/0.025% Tween-20溶媒（ひし形，濃い青色），ベムペド酸（ETC-1002）3 mg/kg/日（四角，赤色），10 mg/kg/日（三角，緑色），又は30 mg/kg/日（×，紫色）を3週間経口投与した（n = 8/群）。体重を1日1回測定した。

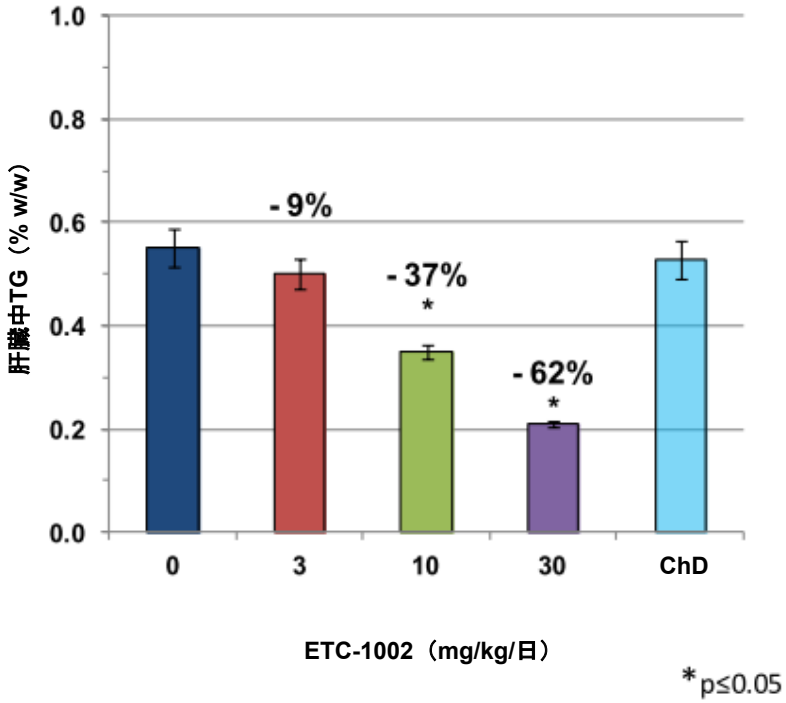


図 2.6.2.3.2.6-3　果糖摂取高血糖Golden Syrianハムスターの肝臓中TG量に及ぼすベムペド酸の影響（RR 1002-150-004）

雄ハムスターに60%果糖食を2週間摂取させて高血糖を誘発し，続いて60%果糖食を継続しながら，0.5%CMC/0.025% Tween-20溶媒（0 mg/kg/日，濃い青色），ベムペド酸（ETC-1002）3 mg/kg/日（赤色），10 mg/kg/日（緑色）又は30 mg/kg/日（紫色）を3週間経口投与した。病態進行の対照として，別コホートのハムスターにChDを摂取させ，0.5% CMC/0.025% Tween-20溶媒を投与した（ChD；薄い青色）。投与終了時に肝臓を瞬間凍結し，肝臓中TG量を脂質抽出物のHPLC-ELSDにより測定した。値は平均値 ± SEMである（n = 8）。溶媒群の値との比較は，対応のない両側Studentのt検定を用いて行った。溶媒群と比較したときの各投与群の変化率（%）を示す（*p ≤ 0.05）。

2.6.2.3.2.7　SHROB Koletskyラットでのベムペド酸の作用

（概要表2.6.3.1，報告書番号RR 1002-150-007）

雌のSHROB Koletskyラットを用いて，ベムペド酸の血圧上昇に対する作用を検討した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.2-02）。SHROBラットは，遺伝性肥満，自然発症高血圧，高インスリン血症，及び高TG血症を含む複数の異常表現型を示すヒトのメタボリックシンドロームと極めて類似した特徴を有する。これらの動物では高血圧が自然発症し，3ヵ月齢頃から高血圧レベルに達し，4～6週齢頃から急速な体重増加が始まる。血清脂質値は早期の5週齢から上昇し，生涯にわたり高値を示す。雌SHROBラットに溶媒（0.5% CMC/0.025% Tween20）又はベムペド酸（1週間

ごとに0，10及び30 mg/kg/日へと強制増量）を経口投与した。雌SHROBラット16例にテレメトリー送信機を外科的に埋め込んだ後個別飼育し，試験期間中にChD及び新鮮な水を自由に摂取させた。投与期間を通じて，血行動態（MAP，SBP，DBP，及び心拍数）を継続的にモニタリングした。ベムペド酸30 mg/kg/日群の最終投与2及び24時間後に血漿を採取し，TG，インスリン，アディポネクチン，及びNOS活性上昇のバイオマーカーであるADMAを測定した。ベムペド酸はMAP（最大−8 mm Hg，p = 0.04；図 2.6.2.3.2.7-1），DBP（最大−7 mm Hg，p = 0.01；図 2.6.2.3.2.7-2），及び心拍数（最大−26 BPM，p = 0.00002；図 2.6.2.3.2.7-3）を有意に低下させた。また，ベムペド酸はSBP（最大−7 mm Hg，p = 0.07；図 2.6.2.3.2.7-4）の低下傾向も示した。この血行動態の変化とともに，30 mg/kg/日群の投与2時間後において，TG（−61%，p = 0.007），アディポネクチン（−19%，p = 0.001），及びADMA（−8%，p = 0.16）といった血漿バイオマーカーの低下又は低下傾向が認められた。最終投与24時間後において，アディポネクチン（−39%，p = 0.000004），インスリン（−24%，p = 0.06）だけでなく，TG（−49%，p = 0.03）も低下又は低下傾向を示した。摂餌量減少は10 mg/kg/日（−24%，p = 0.04）及び30 mg/kg/日（−49%，p = 0.0004）群で認められ，30 mg/kg/日群では体重減少傾向を伴った（−15%，p = 0.12）。1週間の回復期間後に，血行動態，摂餌量，及び体重は元に戻った。

SHROBラットモデルは高血圧の過食性肥満モデルであり，ベムペド酸は摂餌量減少を引き起こしたことから，本試験で認められた血圧降下作用又は他の測定項目の改善がベムペド酸と直接/間接的に関連しているか否かを結論付けることはできなかった。

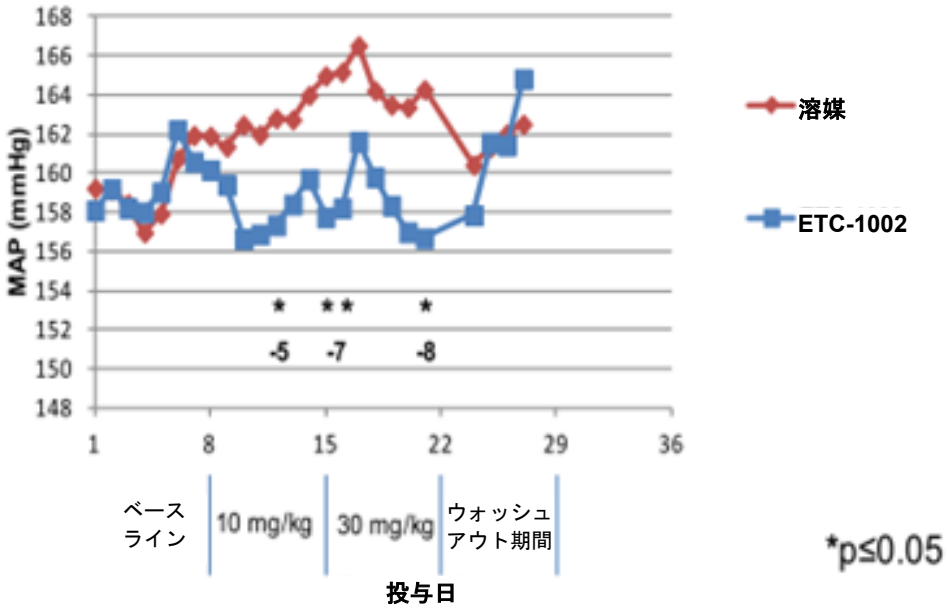


図 2.6.2.3.2.7-1　SHROB KoletskyラットのMAPに及ぼすベムペド酸の影響（RR 1002-150-007試験）

SHROB Koletskyラットにテレメトリー送信機を外科的に埋め込み，その2週間後から順化のために0.5%CMC/0.025% Tween20溶媒を1週間経口投与し（ベースライン），続いて溶媒又はベムペド酸（ETC-1002）を2週間経口投与し（ETC-1002は最初の1週間は10 mg/kg/日，次の1週間は30 mg/kg/日で投与），その後に1週間のウォッシュアウト期間を設けた。血行動態を24時間継続測定し，MAPの24時間平均値（各群n = 7-8）を算出し，対応のない片側Studentのt検定を用いて群間比較した（*p ≤ 0.05）。*p ≤ 0.05の測定値については，溶媒群と比較し

たときの変化量（mmHg）を示す。なお、採血日のDay22と採血時に使用したイソフルランの影響で血圧が変動する可能性のあるDay23とDay24のデータは非表示とした。

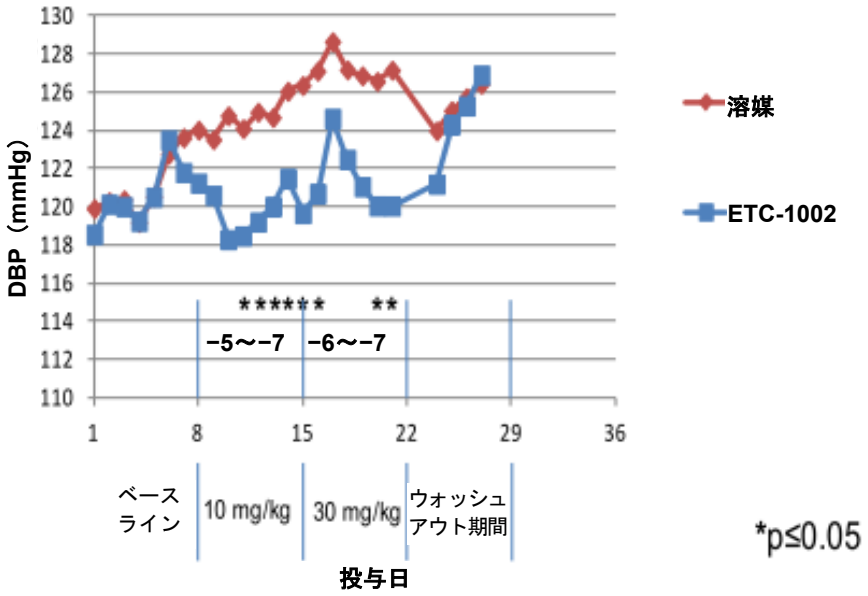


図 2.6.2.3.2.7-2　SHROB Koletskyラットのベムペド酸はDBPを低下させた（RR 1002-150-007試験）

SHROB Koletskyラットにテレメトリー送信機を外科的に埋め込み，その2週間後から順化のために0.5%CMC/0.025% Tween20溶媒を1週間経口投与し（ベースライン），続いて溶媒又はベムペド酸（ETC-1002）を2週間経口投与し（ETC-1002は最初の1週間は10 mg/kg/日，次の1週間は30 mg/kg/日で投与），その後に1週間のウォッシュアウト期間を設けた。血行動態を24時間継続測定し，DBPの24時間平均値（各群n＝7-8）を算出し，対応のない片側Studentのt検定を用いて群間比較した（*p ≤ 0.05）。*p ≤ 0.05の測定値については，溶媒群と比較したときの変化量（mmHg）を示す。なお、採血日のDay22と採血時に使用したイソフルランの影響で血圧が変動する可能性のあるDay23とDay24のデータは非表示とした。

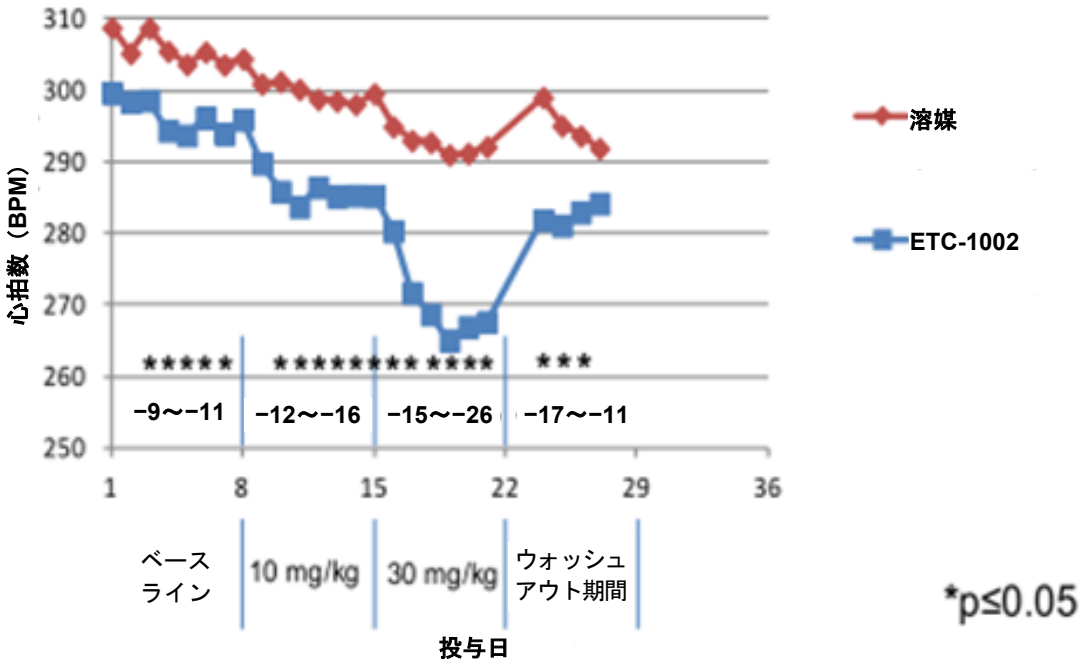


図 2.6.2.3.2.7-3　SHROB Koletskyラットの心拍数に及ぼすベムペド酸の作用（RR

1002-150-007試験）

SHROB Koletskyラットにテレメトリー送信機を外科的に埋め込み，その2週間後から順化のために0.5%CMC/0.025% Tween20溶媒を1週間経口投与し（ベースライン），続いて溶媒又はベムペド酸（ETC-1002）を2週間経口投与し（ETC-1002は最初の1週間は10 mg/kg/日，次の1週間は30 mg/kg/日で投与），その後に1週間のウォッシュアウト期間を設けた。血行動態を24時間継続測定し，BPM（拍/分）の24時間平均値（n = 7-8/群）を算出し，対応のない片側Studentのt検定を用いて群間比較した（*p ≤ 0.05）。*p ≤ 0.05の測定値については，溶媒群と比較したときの変化量（BPM）を示す。なお、採血日のDay22と採血時に使用したイソフルランの影響で血圧が変動する可能性のあるDay23とDay24のデータは非表示とした。

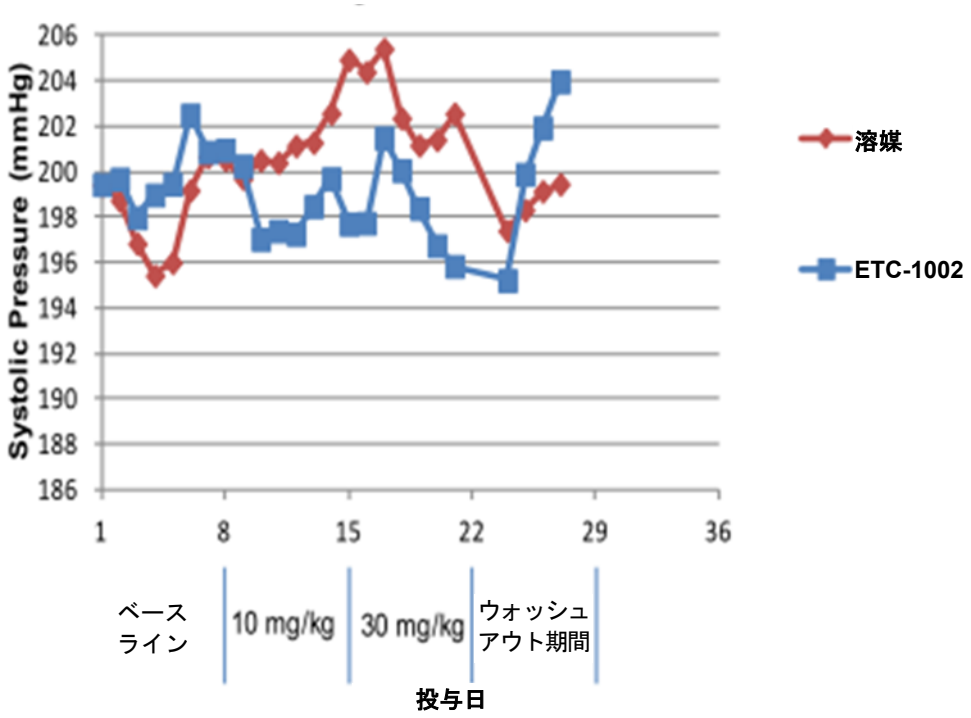


図 2.6.2.3.2.7-4　SHROB KoletskyラットのSBPに対するベムペド酸の作用（RR 1002-150-007試験）

SHROB Koletskyラットにテレメトリー送信機を外科的に埋め込み，その2週間後から馴化のために0.5%CMC/0.025% Tween20溶媒を1週間経口投与し（ベースライン），続いて溶媒又はベムペド酸（ETC-1002）を2週間経口投与し（ETC-1002は最初の1週間は10 mg/kg/日，次の1週間は30 mg/kg/日で投与），その後に1週間のウォッシュアウト期間を設けた。血行動態を24時間継続測定し，収縮期血圧の24時間平均値（n = 7-8/群）を算出し，対応のない片側Studentのt検定を用いて群間比較した（p ≤ 0.05）。なお、採血日のDay22と採血時に使用したイソフルランの影響で血圧が変動する可能性のあるDay23とDay24のデータは非表示とした。

2.6.2.4　安全性薬理試験

2.6.2.4.1　HEK293細胞を用いたhERGアッセイ

（概要表2.6.3.4，報告書番号RR 1002-500-007）

HEK293細胞を用いて，ベムペド酸のhERGチャネル電流に対する作用を評価した。ベムペド酸は300 µmol/L（103 µg/mL）の濃度まで有意な作用を示さなかった。最高濃度の1000 µmol/L（345 µg/mL）でhERGチャネル電流の統計学的有意な阻害が認められ，その阻害率は5.4%であった。この阻害率は重大な臨床リスクを示すものではなく，IC_{50}は1000 µmol/L（345 µg/mL）超と推定された。

2.6.2.4.2　　ラットにおける中枢神経系に対する影響

（概要表2.6.3.4，報告書番号RR 1002-500-005）

雄Wistarラット（n = 10/群）に媒体（0.5% CMC）又はベムペド酸10，30，又は100 mg/kgを単回経口投与し，投与4及び24時間後に神経機能パラメータをFOBで評価した。ベムペド酸は，覚醒/活動性，自律神経機能，神経筋機能及び生理機能に対して有意な作用を示さなかった。100 mg/kg/日投与群の投与4及び24時間後に熱に対する反応潜時（動物を熱板に置いた時に前足を舐め始めるまでの時間）の有意な短縮が認められた。この所見は痛覚過敏反応を反映すると考えられる。

2.6.2.4.3　　ラットにおける呼吸器系に対する影響

（概要表2.6.3.4，報告書番号RR 1002-500-003）

雄Wistarラット（n = 8/群）に媒体（0.5% CMC）又はベムペド酸10，30，又は100 mg/kgを単回経口投与し，少なくとも投与1時間前から投与6時間後まで呼吸器機能を評価した。ベムペド酸に関連した呼吸数，一回換気量，及び分時換気量に対する作用は認められなかった。以上より，ベムペド酸はラットの呼吸機能に影響を及ぼさないと考えられた。

2.6.2.4.4　　覚醒下サルにおける心血管系に対する影響

（概要表2.6.3.4，報告書番号RR 1002-500-004）

雄カニクイザル（n = 4）に媒体（0.5% CMC）又はベムペド酸10，30，又は100 mg/kgを単回経口投与した。各動物に各用量を1週間間隔で漸増投与した。各投与の少なくとも投与2時間前から投与20時間後まで体温，心拍数，血圧，及び心電図を連続記録した。体温，心拍数，血圧（収縮期血圧，拡張期血圧，平均動脈圧）及び心電図パラメータ（QRS時間，PR間隔，RR間隔，QT間隔，補正QT間隔）に対する作用は認められなかった。以上より，ベムペド酸はサルの心血管機能に影響を及ぼさないと考えられた。

2.6.2.5　　代謝物，異性体，及び不純物の薬理学的プロファイル

2.6.2.5.1　　代謝物の薬理学的プロファイル

（概要表2.6.3.1，報告書番号ETI-100-078-RR，ETI-100-073-RR，RR 1002-500-063）

実験動物及びヒトでESP15228はベムペド酸の代謝物である。ESP15228はベムペド酸と同様の薬理特性を有する。ラット肝細胞を用いた*in vitro*試験において，ベムペド酸とESP15228の脂肪酸及びステロール合成阻害の効力は同程度であることが示された（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-16）。また，肥満モデルのZuckerラットを用いた試験でもESP15228の血清脂質の改善作用が認められた（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-17）。

マウス初代培養肝細胞でベムペド酸とその代謝物であるベムペド酸グルクロニド及びESP15228グルクロニドの脂質合成に対する作用を評価した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.1-03）。マウス肝細胞でベムペド酸は30 μM以上の濃度で脂質合成を有意に阻害したが，ベムペド酸グルクロニドとESP15228グルクロニドはいずれも100 μMで脂質合成に有意な作用を示さなかった（図2.6.2.5.1-1）。

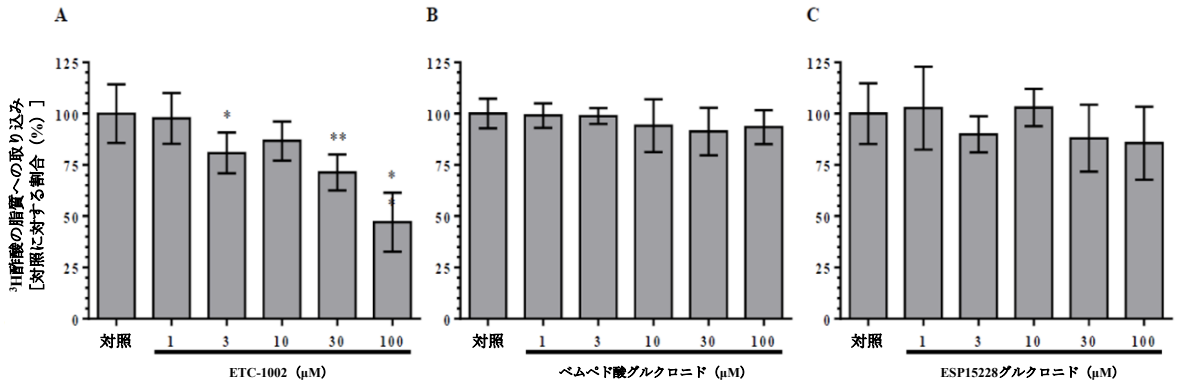


図 2.6.2.5.1-1　　ベムペド酸とその代謝物であるベムペド酸グルクロニド及びESP15228グルクロニドによる脂質合成阻害率（%）（RR 1002-500-063試験）

マウス初代培養肝細胞でのベムペド酸（ETC-1002；**パネルA**），ベムペド酸グルクロニド（**パネルB**），及びESP15228グルクロニド（**パネルC**）による脂質合成阻害率（%）。値は平均値 ± 標準偏差である（N = 6-9）。アスタリスクは対照群との比較での統計学的有意差を示す（Bonferroniの事後検定，1元配置ANOVA *$p < 0.01$；**$p < 0.0001$）。

2.6.2.5.2　　異性体の薬理学的プロファイル

ベムペド酸の異性体は存在しないため試験は実施していない。

2.6.2.5.3　　不純物の薬理学的プロファイル

ベムペド酸の不純物の特性を解明する薬理試験は実施していない。

2.6.2.6　　薬力学的薬物相互作用

（概要表2.6.3.1，報告書番号55016-350-003）

LDLRノックアウトマウスを用いて，血清脂質に対するアトルバスタチン/ベムペド酸の併用療法の試験を実施した（概要表2.6.3.1，資料番号4.2.1.4-01）。ベムペド酸単独（約30，100，又は300 mg/kg/日の混餌），アトルバスタチン単独（約10，30，及び100 mg/kg/日の混餌），又はアトルバスタチン/ベムペド酸併用（10/30，10/100，30/30，及び30/100 mg/kg/日）の1及び2週間投与後の血清脂質及びリポ蛋白に対する作用を検討した。これらの試験において，ベムペド酸30，100，及び300 mg/kg/日の投与1週間後の血清中LDL-C変化量は投与前値のそれぞれ0.3%，−11.4%，及び−16.3%であり，投与2週間後のLDL-C変化量は投与前値のそれぞれ17.4%，6.9%，及び−23.7%であった。一般的にげっ歯類モデルでは脂質生合成に対する代償的な「リバウンド」作用が認められ，投与2週時点に30及び100 mg/kg/日群で認められたLDL-C上昇は基礎脂質合成の変化を反映している可能性が高く，300 mg/kg/日群では消失する。ベムペド酸30及び100 mg/kg/日とアトルバスタチン10 mg/kg/日との併用群のLDL-C変化量は投与前値のそれぞれ−18.3%及び−11.9%であり，アトルバスタチン30 mg/kg/日との併用群のLDL-C変化量は投与前値のそれぞれ−12.8%及び−40.9%であった（いずれも2週間投与）。

2.6.2.7　考察及び結論

作用機序に関する試験によって，ベムペド酸はACL依存性のコレステロール合成阻害を介してコレステロール代謝に影響し，この活性にはETC-1002-CoA形成が必須であることが明らかとなった。ヒト肝ミクロソームでベムペド酸からETC-1002-CoAの形成が確認されており，セルフリー酵素アッセイでETC-1002-CoAは組み換えヒトACLを直接阻害した。*In vitro*及び*in vivo*薬理試験によりETC-1002-CoAの作用機序としてACL阻害が明らかとなり，ベムペド酸の投与はACLの下流の代謝物（アセチルCoA，マロニルCoA，及びHMG-CoA）の減少，並びにACLの基質であるクエン酸の一過性の増加を伴った。ラット及びヒトの初代肝細胞にベムペド酸を処置したところ，コレステロール及び脂肪酸の生合成が阻害された。

*In vitro*試験でベムペド酸の濃度依存的なコレステロール合成阻害はLDLR活性上昇を伴うことが示されており，細胞内ステロール量の減少に反応したSREBP2依存的な転写の代償的な亢進が予測されている。さらに，薬理学的阻害と同様に，ACLの遺伝子サイレンシングはベムペド酸処置と同程度のLDLR蛋白発現増加を誘導した。LDLR活性の上昇によってLDL粒子の分画異化率が上昇することが知られており，これにより血漿中LDL-C値が低下する。同様に，HFHC食を摂取させたApoEノックアウトマウスにおいて，ベムペド酸は肝臓LDLR遺伝子発現を増加させ，肝細胞の細胞膜のLDLR蛋白発現を上昇させ，血漿中LDL-Cを低下させた。LDLR依存性の裏付けとして，LDLRホモノックアウトミニブタでのベムペド酸のLDL-C低下作用はLDLRヘテロノックアウトミニブタと比較して有意に減弱した。一方，LDLRホモノックアウトミニブタ及びLDLRヘテロノックアウトミニブタの両方において，ベムペド酸投与はアテローム性動脈硬化症の進行を抑制した。正常動物，並びにTG過剰生成，高コレステロール血症，及びアテローム性動脈硬化症のげっ歯類モデルにおいても，ベムペド酸はコレステロール及び脂肪酸の生合成マーカーを低下させ，血清脂質を改善し，食事誘発性のアテローム性動脈硬化症の進展を抑制した。

ベムペド酸は単離した受容体，イオンチャネル，酵素，及びトランスポーターの幅広いパネルに対して有意な結合を示さなかった。ベムペド酸とETC-1002-CoAはいずれもHMG-CoA還元酵素を阻害しなかった。他の*in vitro*及び*in vivo*試験において，ベムペド酸は肝細胞でのコレステロール生合成を阻害し，コレステロール代謝に対してスタチン様作用を発揮した。一方，骨格筋細胞ではコレステロール生合成経路を阻害せず，スタチン系薬剤とは異なり，筋毒性を誘発しないことが示された。ベムペド酸によるACL阻害は脂肪酸生合成阻害においてもスタチン系薬剤によるHMG-CoA還元酵素阻害とは異なる。代謝性疾患の複数の食事誘発性及び遺伝的モデルにおいて，ベムペド酸は一貫してミトコンドリアでのβ酸化を促進し，肝臓のTGを減少させることが示された。

ベムペド酸の脂質代謝及びリポ蛋白代謝に関する他の機序（コレステロールの吸収，胆汁酸の合成及び分泌，並びにTICE）についても検討したが，ベムペド酸の脂質又はリポ蛋白代謝への作用におけるこれらの機序の寄与は小さかった。ベムペド酸による脂質合成の阻害はAMPK活性の上昇と一致した。ベムペド酸がAMPKシグナルを活性化する分子メカニズムに関して，*in vitro*及び*in vivo*でこの活性化はAEC非依存的に生じることが示され，AMPK複合体との直接的な相互作用が示唆された。セルフリーのAMPKアッセイでETC-1002-CoAは組み換えヒトAMPKαβγ複合体をβ1依存的に活性化した。ただし，ベムペド酸によるAMPK活性化には肝臓特異的なACSVL1依

存的CoA形成が必要であり，ヒト肝臓においてはAMPK β2含有複合体の発現が優位であることから，ベムペド酸の薬理作用におけるAMPK経路の寄与は小さいと考えられる。また，ApoEとAMPKβ1のダブルノックアウトマウスを用いた検討により，ベムペド酸の薬理作用（LDL-C低下作用及び動脈硬化進展抑制作用）はAMPK経路に非依存的であることが明らかとなった。

さらに，*in vitro*及び*in vivo*でベムペド酸は抗炎症作用を示し，HFHC食摂取LDLR受容体ノックアウトマウスで血糖異常を改善し，血清及び肝臓中の脂質を減少させ，大動脈のアテローム性動脈硬化病変の進展を抑制した。さらにベムペド酸はインスリン抵抗性マウス，DIOマウス，及び果糖摂取ハムスターで高TG血症，脂肪肝，及び血糖コントロールを改善し，SHROBラットで血圧，及び心拍数を低下させた。

安全性薬理試験において，ベムペド酸によるhERGチャネル電流のIC_{50}は1000 μmol/L超と推定され，ベムペド酸投与によるラットのCNS及び呼吸機能，並びにサルの心血管機能に対する有害作用は認められなかった。

薬力学的薬物相互作用試験において，LDLRノックアウトマウスで，ベムペド酸30 mg/kg/日とアトルバスタチン10又は30 mg/kg/日の併用，並びにベムペド酸100 mg/kg/日とアトルバスタチン10 mg/kg/日の併用によって，LDL-C低下作用に関して明らかな薬力学的薬物相互作用は認められなかった。

結論として，これらの非臨床試験の結果から，ベムペド酸の薬理学的作用機序，効力，副次的薬理作用，及び安全性薬理プロファイルが明らかにされ，ヒト医薬品としての承認申請が支持される。これらの結果から，高コレステロール血症の治療に対するベムペド酸の重要な役割が示された。

2.6.2.8　図表

本文中に記載した。

2.6.2.9　参考文献

1 Cramer CT, Goetz B, Hopson KL, Fici GJ, Ackermann RM, Brown SC, et al. Effects of a novel dual lipid synthesis inhibitor and its potential utility in treating dyslipidemia and metabolic syndrome. J Lipid Res 2004;45:1289-1301.（参考文献番号4.3-13）

2 Gribble AD, Ife RJ, Shaw, A McNair D, Novelli CE, Bakewell S, et al. ATP Citrate lyase as a target for hypolipidemic intervention. 2. Synthesis and evaluation of (3R,5S) omega-substituted 3 carboxy 3, 5 dihydroxyalkanoic acids and their gamma lactone prodrugs as inhibitors of the enzyme in vitro and in vivo. J Med Chem 1998;41:3582-95.（参考文献番号4.3-81）

3 Pinkosky SL, Newton RS, Day EA, Ford RJ, Lhotak S, Austin RC, et al. Liver specific ATP citrate lyase inhibition by bempedoic acid decreases LDL C and attenuates atherosclerosis. Nat Commun 2016;7:13457.（参考文献番号4.3-56）

4 Ellis JM, Frahm JL, Li LO, Coleman RA. Acyl-coenzyme A synthetases in metabolic control. Curr Opin Lipidol 2010;21:212-217.（参考文献番号4.3-17）

[5] Pinkosky SL, Filippov S, Srivastava RA, Hanselman JC, Bradshaw CD, Hurley TR, et al. AMP activated protein kinase and ATP-citrate lyase are two distinct molecular targets for ETC 1002, a novel small molecule regulator of lipid and carbohydrate metabolism. J Lipid Res 2013;54:134-51.（参考文献番号4.3-55）

[6] Kim JH, Lewin TM, Coleman RA. Expression and characterization of recombinant rat acyl CoA synthases 1, 4, and 5. Selective inhibition by triacsin C and thiazolidinediones. J Biol Chem 2001;276:24667-24673.（参考文献番号4.3-37）

[7] Li H., Black P. N. & DiRusso C. C. A live-cell high-throughput screening assay for identification of fatty acid uptake inhibitors. Anal. Biochem. 2005; 336, 11–19.（参考文献番号4.3-82）

[8] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell 1997;89:331-340.（参考文献番号4.3-03）

[9] Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: transcriptional mediators of lipid homeostasis. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2002;67:491-498.（参考文献番号4.3-34）

[10] Bisgaier CL, Essenburg AD, Auerbach BJ, Pape ME, Sekerke CS, Gee A, et al. Attenuation of plasma low density lipoprotein cholesterol by select 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in mice devoid of low density lipoprotein receptors. J Lipid Res 1997;38:2502 -2515.（参考文献番号4.3-02）

[11] Srivastava RAK, Hurley TR, Oniciu D, Adeli K, Roger S Newton RS. Discovery of analogues of non-β oxidizable long-chain dicarboxylic fatty acids as dual inhibitors of fatty acids and cholesterol synthesis: Efficacy of lead compound in hyperlipidemic hamsters reveals novel mechanism. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2021;31(8):2490-2506.（参考文献番号4.3-83）

[12] Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012;32:1104-1115.（参考文献番号4.3-25）

[13] Hewing B, Fisher EA. Preclinical mouse models and methods for the discovery of the causes and treatments of atherosclerosis. Expert Opin Drug Discov 2012;7:207-216.（参考文献番号4.3-32）

[14] Mukhopadhyay R. Mouse models of atherosclerosis: explaining critical roles of lipid metabolism and inflammation. J Appl Genet 2013; 54:185-192.（参考文献番号4.3-50）

[15] Davis BT, Wang XJ, Rohret JA, Struzynski JT, Merricks EP, Bellinger DA, et al. Targeted disruption of LDLR causes hypercholesterolemia and atherosclerosis in Yucatan miniature pigs. PLoS One 2014;9:e93457.（参考文献番号4.3-14）

[16] Burke AC, Telford DE, Sutherland BG, Edwards JY, Sawyeh CG, Barrett PHR, et al. Bempedoic acid lowers low-density lipoprotein cholesterol and attenuates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor deficient (LDLR+/- and LDLR-/- Yucatan miniature pigs. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2018;38(5):1178-1190.（参考文献番号4.3-05）

[17] Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP, McCagg A, White JA, Theroux P, et al. Ezetimibe added to statin therapy after acute coronary syndromes. N Engl J Med 2015;372:2387-2397.（参考文献番号4.3-07）

[18] Catapano AL, Ference BA. IMPROVE-IT and genetics reaffirm the causal role of LDL in cardiovascular disease. Atherosclerosis 2015;241:498-501.（参考文献番号4.3-09）

19 Silverman MG, Ference BA, Im K, Wiviott SD, Giugliano RP, Grundy SM, et al. Association between lowering LDL-C and cardiovascular risk reduction among different therapeutic interventions: a systematic review and meta-analysis. JAMA 2016; 316:1289-1297.（参考文献番号4.3-63）

20 Tomlinson SS, Mangione KK. Potential adverse effects of statins on muscle. Phys Ther 2005;85:459-465.（参考文献番号4.3-70）

21 Taha DA, De Moor CH, Barrett DA, Gershkovich P. Translational insight into statin-induced muscle toxicity: from cell culture to clinical studies. Transl Res 2014;164:85-109.（参考文献番号4.3-68）

22 Sewright KA, Clarkson PM, Thompson PD. Statin myopathy: incidence, risk factors, and pathophysiology. Curr Atheroscler Rep 2007;9:389-396.（参考文献番号4.3-61）

23 Steinberg SJ, Wang SJ, Kim DG, Mihalik SJ, Watkins PA. Human very-long-chain acyl-CoA synthetase: cloning, topography, and relevance to branched-chain fatty acid metabolism. Biochem Biophys Res Commun 1999;257:615-621.（参考文献番号4.3-67）

24 Falcon A, Doege H, Fluitt A, Tsang B, Watson N, Kay MA, et al. FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long chain acyl CoA synthetase. Am J Physiol Endocrinol Metab 2010;299:E384-393.（参考文献番号4.3-20）

25 McGarry JD, Foster DW. In support of the roles of malonyl-CoA and carnitine acyltransferase I in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. J Biol Chem 1979;254:8163-8168.（参考文献番号4.3-45）

26 McGarry JD, Leatherman GF, Foster DW. Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. J Biol Chem 1978;253:4128-4136.（参考文献番号4.3-46）

27 McGarry JD, Takabayashi Y, Foster DW. The role of malonyl-CoA in the coordination of fatty acid synthesis and oxidation in isolated rat hepatocytes. J Biol Chem 1978;253:8294-8300.（参考文献番号4.3-47）

28 Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in health and disease. Physiol Rev 2009;89:1025-1078.（参考文献番号4.3-66）

29 Wu J, Puppala D, Feng X, Monetti M, Lapworth AL, Geoghegan KF. Chemoproteomic analysis of intertissue and interspecies isoform diversity of AMP-activated protein kinase (AMPK). J Biol Chem 2013;288:35904-35912.（参考文献番号4.3-78）

30 Samsoondar JP, Burke AC, Sutherland BG, Telford DE, Sawyez CG, Edwards JY, et al. Prevention of diet-induced metabolic dysregulation, inflammation, and atherosclerosis in Ldlr-/- mice by treatment with the ATP-citrate lyase inhibitor bempedoic acid. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2017;37:647-656.（参考文献番号4.3-60）

31 Filippov S, Pinkosky SL, Lister RJ, Pawloski C, Hanselman JC, Cramer CT, et al. ETC 1002 regulates immune response, leukocyte homing, and adipose tissue inflammation via LKB1-dependent activation of macrophage AMPK. J Lipid Res 2013;54:2095-2108.（参考文献番号4.3-21）

ネクセトール錠180 mg

第2部（モジュール2）：CTDの概要（サマリー）

2.6.3 薬理試験概要表

大塚製薬株式会社

目次

目次 2
2.6.3.1. 薬効試験: 一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 – 該当なし 9
2.6.3.3 副次的薬理試験 – 該当なし 9
2.6.3.4 安全性薬理試験 9

2.6.3.1. 薬効試験: 一覧表

一覧表			被験物質：ベムペド酸（JAN）		
試験の表題あるいは内容	動物種	投与方法	実施施設	報告書番号	CTDの記載箇所（資料番号）
Primary Pharmacodynamics					
Effects on lipid synthesis	Rat hepatocytes	In vitro	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	20[redacted]-ETI-100-040-RR	4.2.1.1-23（参考資料）
Effects on lipid synthesis	Rat hepatocytes	In vitro	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	ETI-100-066	4.2.1.1-22（参考資料）
Effects on insulin sensitivity	Rat (Zucker Fatty)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	20[redacted]-ETI-100-039-RR	4.2.1.1-21（参考資料）
Effects of ESP15228 on dyslipidemia, diabetes, and obesity variables	Rat (Obese Zucker Fatty)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	ETI-100-073-RR	4.2.1.1-17（参考資料）
Effects on fatty acid oxidation and lipid synthesis	Rat hepatocytes; Rat (Sprague-Dawley)	In vitro; Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	ETI-100-079-RR	4.2.1.1-15（参考資料）
Pharmacologic mechanism of action: ETC-1002-CoA formation and ATP-citrate lyase inhibition	Rat hepatocytes; human hepatocytes; human liver microsomes; RH7777 cells; rats (Wistar Han)	In vitro; Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	RR 1002-100-007	4.2.1.1-07（参考資料）
Effect on fatty acid and sterol synthesis	Rat (Sprague-Dawley; cholestyramine-fed)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	ETI-100-090-RR	4.2.1.1-10（参考資料）

一覧表			被験物質：ベムペド酸（JAN）		
試験の表題あるいは内容	動物種	投与方法	実施施設	報告書番号	CTDの記載箇所（資料番号）
Synthesis of ETC-1002-CoA	Rat liver microsomes	In vitro	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	ETI-100-081-RR	4.2.1.1-14（参考資料）
Effects on lipid metabolism	Rat (Sprague-Dawley; chow fed)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	55016-350-001	4.2.1.1-24（参考資料）
Effects on insulin sensitivity, and lipid and lipoprotein metabolism	Syrian hamster (chow fed)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	ETI-100-071-RR	4.2.1.1-20（参考資料）
Effects on fatty acid and sterol synthesis (liver, skeletal muscle, serum)	Rat (Sprague-Dawley; fasted/re-fed)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	ETI-100-087-RR	4.2.1.1-13（参考資料）
Effects on fatty acid and sterol synthesis (liver)	Rat (Sprague-Dawley; fasted/re-fed)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	ETI-100-096-RR	4.2.1.1-09（参考資料）
Effects on fatty acid and sterol synthesis (liver, serum)	Rat (Sprague-Dawley; fasted)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	ETI-100-088-RR	4.2.1.1-11（参考資料）
Effects on dyslipidemia	Syrian hamster (high fat, high cholesterol fed)	Oral (gavage	[redacted], [redacted], Canada	RR 1002-150-002	4.2.1.1-06（参考資料）
Effects on insulin sensitivity and lipoprotein metabolism	Rat (Zucker Fatty)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	ETI-100-069-RR	4.2.1.1-18（参考資料）
Effects of bempedoic acid on dyslipidemia, diabetes, and obesity variables	Rat (Obese Zucker Fatty)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	ETI-100-072-RR	4.2.1.1-19（参考資料）

一覧表			被験物質：ベムペド酸（JAN）		
試験の表題あるいは内容	動物種	投与方法	実施施設	報告書番号	CTDの記載箇所（資料番号）
Effects on insulin sensitivity and lipoprotein metabolism	Rat (Zucker Fatty)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	ETI-100-086-RR	4.2.1.1-12（参考資料）
Effects on vascular lesion formation and plasma lipid profile	Mouse ($ApoE^{-/-}$ with carotid ligation)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	RR 1002-150-008	4.2.1.1-04
Effects on plasma lipid, lipoproteins, glucose, insulin, liver lipids, liver gene expression, and atherosclerosis	LDLR-deficient Yucatan miniature pigs (high fat, high cholesterol fed)	Oral (gelatin capsule)	[redacted], Canada	RR 1002-150-012	4.2.1.1-01（参考資料）
Effects of ESP15228 on lipid synthesis	Rat hepatocytes; Rat (Sprague-Dawley; cholestyramine-fed)	In vitro; Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI; [redacted]	ETI-100-078-RR	4.2.1.1-16（参考資料）
Inhibition of lipid synthesis by bempedoic acid, ETC-1002-glucuronide, and ESP15228-glucuronide	Mouse hepatocytes	In vitro	[redacted], Canada	RR 1002-500-063	4.2.1.1-03（参考資料）

一覧表			被験物質：ベムペド酸（JAN）		
試験の表題あるいは内容	動物種	投与方法	実施施設	報告書番号	CTDの記載箇所（資料番号）
Mechanism of liver specificity	RH7777 cells; primary human hepatocytes; human liver microsomes, S9, mitochondrial, and cytosol fractions; human kidney and skeletal muscle microsomes; L6 myotubes; primary human myotubes	In vitro;	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	RR 1002-100-010	4.2.1.1-08
Effects on cholesterol metabolism and experimental atherosclerosis	Mouse (Apoe$^{-/-}$ and Apoe$^{-/-}$ / Ampkβ1$^{-/-}$ double knockout; high fat, high cholesterol diet)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	RR 1002-150-017	4.2.1.1-02（参考資料）
Effects on TICE, biliary excretion, cholesterol absorption	Mouse (C57BL/6)	Oral (gavage)	[redacted]	RR 1002-150-011	4.2.1.1-05（参考資料）
Secondary Pharmacodynamics					
Pharmacology screen	Isolated receptors, ion channels, enzymes, and transporters	In vitro	[redacted], France	RR 1002-100-009	4.2.1.2-01（参考資料）

一覧表			被験物質：ベムペド酸（JAN）		
試験の表題あるいは内容	動物種	投与方法	実施施設	報告書番号	CTDの記載箇所（資料番号）
Effects on AMPK	HepG2 cells; Rat (Wistar Han)	In vitro; Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	RR 1002-100-004	4.2.1.2-07（参考資料）
Mechanism of anti-inflammatory effects	Human monocyte-derived macrophages; Mouse adipose tissue; Mouse (C57BL/6)	In vitro; Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	Filippov et al., 2013	4.3-21（参考資料）
Effects on metabolic dysregulation, inflammation, and atherosclerosis	Mouse ($LDLr^{-/-}$)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	Samsoondar et al., 2013	4.3-62（参考資料）
Anti-diabetic and triglyceride-lowering effects	Mouse (KKA^{y})	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	RR 1002-150-003	4.2.1.2-04（参考資料）
Preventative effects on insulin resistance, hepatic steatosis, and obesity	Mouse (C57BL/6; diet induced obese)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	RR 1002-150-005	4.2.1.2-05（参考資料）
Effects on regression outcomes of insulin resistance, hepatic steatosis, and obesity	Mouse (C57BL/6; diet induced obese)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	RR 1002-150-006	4.2.1.2-03（参考資料）
Effects on carbohydrate and lipid metabolism	Syrian golden hamster (fructose-fed)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	RR 1002-150-004	4.2.1.2-06（参考資料）
Hemodynamic effects	Rat (SHROB)	Oral (gavage)	[redacted]	RR 1002-150-007	4.2.1.2-02（参考資料）
Safety Pharmacology					

一覧表			被験物質：ベムペド酸（JAN）		
試験の表題あるいは内容	動物種	投与方法	実施施設	報告書番号	CTDの記載箇所（資料番号）
hERG assay	HEK293 cells	In vitro	[redacted], [redacted], [redacted]	RR 1002-500-007	4.2.1.3-01
Neurobehavioral effects	Rat (Wistar)	Oral (gavage)	[redacted], [redacted], [redacted]	RR 1002-500-005	4.2.1.3-02
Pulmonary effects	Rat (Wistar)	Oral (gavage)	[redacted], [redacted], [redacted]	RR 1002-500-003	4.2.1.3-03
Cardiovascular effects	Monkey (Cynomolgus)	Oral (gavage)	[redacted], [redacted], [redacted]	RR 1002-500-004	4.2.1.3-04
Pharmacodynamic Drug Interactions					
Effects of Atrovastatin (ESP 31004) and ESP31015/ESP55016 combination on dyslipidemia	Mouse (LDLr-/-)	Oral (gavage)	Esperion Therapeutics, Ann Arbor, MI	55016-350-003	4.2.1.4-01（参考資料）

AMPK = Adenosine monophosphate activated protein kinase; ApoE $^{-/-}$ = Apolipoprotein E knockout; Dept = Department; hERG =Human ether-a-go-go; LDLR = Low density lipoprotein receptor; LDLr$^{-/-}$ = Low density lipoprotein receptor knockout; [redacted] = [redacted]; MI = Michigan; [redacted] = [redacted]; SHROB = Spontaneously hypertensive obese; TICE = Transintestinal cholesterol excretion; Univ = University.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験 – 該当なし

2.6.3.3 副次的薬理試験 – 該当なし

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：ベムペド酸（JAN）

評価対象	動物種/系統	投与方法	投与量 (mg/kg/day)	動物数及び性別／群	特記すべき所見	GLP適用	報告書番号（資料番号）
Cardiovascular system	HEK293 cells stably expressing hERG	In vitro	0, 10, 100, 300, 1000 µmol/L (0, 3.45, 34.5, 103, 345 µg/mL)	at least 3 cells/tested concentration	Inhibition of hERG current (%)[a]: 0.2 ± 0.7, 1.6 ± 0.6, 2.3 ± 0.9, 1.7 ± 0.7, 5.4 ± 0.4* (0, 10, 100, 300, 1000 µmol/L) 80.6 ± 2.2 (Positive Control[b]) IC_{50} estimated to be >1000 µmol/L (>345 µg/mL)	Yes	RR 1002-500-007 (4.2.1.3-01)

*Significantly different from control based on Dunnett's multiple comparison test, $p<0.05$.
GLP = Good Laboratory Practice; HEK = Human embryonic kidney; hERG = Human ether-á-go-go; IC_{50} = Concentration resulting in 50% inhibition of hERG current.
[a] Values are means ± standard error of the mean.
[b] Terfenadine, 60 nmol/L, values are means ± standard deviation.

（Continued）

評価対象	動物種/ 系統	投与方法	投与量 (mg/kg/day)	動物数及び 性別／群	特記すべき所見	GLP 適用	報告書番号 (資料番号)
Central Nervous System (FOB)	Rat (Wistar)	Single oral dose by gavage (10 mL/kg)	0, 10, 30, 100	10M	Decreased thermal response latency at 100 mg/kg at 4 and 24 hours postdose. No other drug-related effects.	Yes	RR 1002-500-005 (4.2.1.3-02)
Pulmonary	Rat (Wistar)	Single oral dose by gavage (10 mL/kg)	0, 10, 30, 100	8M	No bempedoic acid-related changes in respiratory rate, tidal volume, or minute volume.	Yes	RR 1002-500-003 (4.2.1.3-03)
Cardiovascular	Monkey (Cynomolgus)	Single oral dose by gavage [a] (10 mL/kg)	0, 10, 30, 100	4M	No bempedoic acid-related changes in body temperature, heart rate, blood pressure (systolic, diastolic, mean arterial), or ECG parameters (QRS duration, PR, RR, QT intervals, and corrected QT intervals).	Yes	RR 1002-500-004 (4.2.1.3-04)

GLP = Good Laboratory Practice; FOB = Functional Observational Battery; M = Male.

[a] Each animal received each dose in ascending order, with 1 week between doses.