

令和元年5月8日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08901

研究課題名(和文) 抗MRSA薬ダプトマイシンによる骨格筋毒性回避のための基盤研究

研究課題名(英文) basic research for avoiding musculoskeletal toxicity induced by daptomycin, a anti-MRSA agent

研究代表者

山田 武宏 (Yamada, Takehiro)

北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号：50568649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗MRSA薬ダプトマイシンによる骨格筋系副作用の発現機序を解明すべく、ダプトマイシン血中濃度とCPK上昇との関連性について検討した。また、骨格筋系細胞に対するダプトマイシンの直接毒性発現有無とその発現機序についても解析を行った。ダプトマイシン投与患者において、CPK上昇が認められた患者のダプトマイシン血中濃度(トラフ値)は、CPK非上昇群に比べて高く、DAPの血中濃度と骨格筋毒性の関連性が示唆された。また、骨格筋系細胞に対して、ダプトマイシンは直接的に細胞膜障害活性を有し、その機序はp-MLKLを介したネクロトーシスの経路によるものであることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダプトマイシンによる骨格筋毒性は、臨床的にはその血中濃度が高いと起きやすい傾向があり、またその毒性は骨格筋細胞への直接的な作用によるものであることが明らかとなった。この成果により、ダプトマイシンの代表的な副作用であるCPK上昇や横紋筋融解症は、ダプトマイシン血中濃度を測定することで、早期に予期・回避できる可能性が示された。このことから、本研究成果はダプトマイシン投与患者の副作用軽減に繋がると期待される。また、抗菌薬であるダプトマイシンが微生物のみならず、ヒト由来の培養骨格筋系細胞の細胞膜障害を惹起することが示された点は、薬理的な観点から考えても意義のあることと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the mechanism of adverse skeletal-muscle system effects caused by daptomycin, an anti-MRSA agent. We investigated the relationship between plasma daptomycin concentration in and CPK elevation in clinical research. In addition, we analyzed the presence of direct toxicity of daptomycin to cultured skeletal muscle cells. In patients who received daptomycin, patients with elevated CPK had higher trough levels of daptomycin than those without CPK, suggesting a relationship between blood levels of DAP and skeletal muscle toxicity. Furthermore, it was revealed that daptomycin has cell membrane toxicity directly on skeletal muscle cells, and the mechanism is due to the p-MLKL-mediated pathway of necroptosis.

研究分野：感染症薬学、薬理学、医療薬学

キーワード：ダプトマイシン CPK hypoxia 横紋筋融解症 TDM 副作用

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA）は医療関連感染における代表的な病原菌であることから、その感染症治療薬すなわち抗 MRSA 薬はわが国の院内感染対策上、重要な抗菌薬と位置付けられている。なかでも、ダプトマイシン(daptomycin; DAP) は 2011 年にわが国において上市された環状ポリペプチド構造を有する抗菌薬であり、MRSA による敗血症・感染性心内膜炎などの血流感染や、外傷・熱傷・手術創、びらん・潰瘍などの二次感染に適応を有する。MRSA 感染症のグローバルスタンダードであり、従来より MRSA 感染症の第一選択薬として使用されてきたバンコマイシン (vancomycin; VCM) と比較すると、腎機能障害の発現は少ないものの、DAP 投与患者ではクレアチンホスホキナーゼ (CPK) 上昇が投与患者の 2~10%に発現するほか、重篤な副作用である横紋筋融解症が認められている。このように、DAP の投与により、臨床的には骨格筋への毒性が知られているものの、その詳細な発現機構については明らかにされていない。2010 年に Bhavnani らにより、CPK 上昇患者において DAP のトラフ（投与直前）血中濃度上昇が報告されている (*Clin Infect Dis*, 2010)。この報告において CPK 上昇例のほとんどが体重 100 kg 以上の肥満患者であったものの、DAP の生体内暴露が骨格筋毒性を惹起することが示唆された。また、DAP の骨格筋に対する直接毒性については、ラットに DAP を 150 mg/kg（ヒトにおいては通常、6 mg/kg/day が治療量）投与した *in vivo* の系において、その標的が筋線維膜であることが確認されている (Kostrominova *et al*, *Muscle & Nerve*, 2010)。しかしながら、日本人における DAP 血中濃度と骨格筋毒性発現との関連性に関して詳細な検討はなされていない。加えて、細胞レベルでの毒性発現の機序についても、細胞死メカニズム等の生化学的な観点からの更なる検証が必要である。一方で、DAP はその抗菌力の強さから、MRSA 血流感染症においては、VCM と並んで第一選択薬として推奨されている。今後の MRSA 感染症治療において重要な位置づけを担う抗菌薬ではあるが、同時に上述の骨格筋毒性に関する解析を実施することが急務であると考えた。そこで、北海道大学病院における DAP 投与患者においてその血中濃度と CPK 上昇有無との関連を調査する臨床面での検討に加え、培養筋芽細胞を用いた *in vitro* の系において、DAP 処理による細胞毒性発現機構の解析を行うに至った。

2. 研究の目的

DAP による骨格筋毒性発現のリスク因子を解明すべく、投与患者の背景や DAP 血中濃度との関連から検討する。また、骨格筋細胞への直接毒性の有無ならびに毒性発現に関わる分子機構を解明する。これにより、MRSA 感染症治療の安全性を向上させ、治療完遂率を高めることで、DAP による MRSA 感染症治療の質を高めることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) DAP 血中濃度と CPK 上昇との関連性に関する臨床研究

- ①DAP 投与患者の血中濃度は、トラフ（投与直前）値、Cmax（最高血中濃度）を HPLC により測定した。
- ②DAP 血中濃度データが得られ、解析対象となった DAP 投与患者は、38 例であった。このうち、CPK が異常高値（400 U/L 以上）を示したのは 5 例（CPK 上昇群）、残り 33 例は、CPK 非上昇群とし、両群の患者背景を比較した。
- ③本臨床研究は北海道大学病院自主臨床研究審査委員会において実施の承認を取得し、倫理的側面に配慮して行った。

(2) DAP の培養骨格筋細胞に対する直接毒性の検出

- ①培養筋芽細胞 (RD 細胞) を用いて、種々の濃度の DAP による直接毒性の有無について、MTT 活性ならびに、LDH leakage アッセイを行った。比較対象の薬物として、同じ抗 MRSA 薬であるが臨床においてほとんど骨格筋毒性が認められないバンコマイシン (vancomycin; VCM) を用いた。
- ②アポトーシスおよびネクローシスの検出：アポトーシスの指標としてカスパーゼ -3/7 の活性を検出するキットを用いた。さらに、Annexin V 等を用いたアポトーシス・ネクローシスの同時検出キットを用い、①の結果を裏付ける検討を経時的に行った。
- ③アポトーシスおよびネクローシス関連タンパク質の DAP 毒性への関与：ウエスタンブロッティングにより、種々のアポトーシス、ネクローシス関連タンパク質の検出を試みた。
- ④敗血症などにより組織の代謝が亢進している場合には、必要とする酸素量が充足されずに組織低酸素状態をきたすことがある。DAP は、感染症患者に対して投与されるため、細胞レベルで低酸素状態とした条件での影響についても検討した。具体的な低酸素の条件は、酸素濃度 1.0% に設定し、上記①~③の検討を行った。

4. 研究成果

(1) DAP 血中濃度と CPK 上昇との関連性に関する臨床研究

①DAP 投与患者の血中濃度は、全 38 例、72 ポイントのトラフ血中濃度が得られた。トラフ値と CPK 値との間に有意な相関は得られなかったものの、DAP のトラフ値 20 mg/L を超えると CPK 上昇発現頻度が高くなる傾向が観察された。

②CPK 非上昇群における DAP トラフ血中濃度の中央値は 8.3 mg/L であった。一方で、CPK 上昇群では、21.5 mg/L であり、CPK 上昇群において DAP のトラフ血中濃度は有意に高かった。また、両群における患者背景の比較を行ったが、併用薬剤や DAP 投与量（実体重 kg あたりの 1 日投与量 mg）・投与期間、腎機能、ベースライン臨床検査値、BMI などにおいて差異は認められなかった。したがって、臨床においては DAP のトラフ血中濃度をモニタリングすることで、CPK 上昇や横紋筋融解症などの骨格筋系の副作用発現あるいは重篤化の予防に繋がることを期待できる。

(2) DAP の培養骨格筋細胞に対する直接毒性の検出

①培養筋芽細胞 (RD 細胞) を用いた *in vitro* での検討において、10~1000 mg/L の濃度の DAP 処理により、MTT 活性は著明に低下した。この現象は同じ濃度範囲での VCM 処理でも観察された。一方で、LDH leakage アッセイでは、DAP 処理で細胞外への LDH の逸脱 (酵素活性として) が増大した一方で、VCM 処理の細胞においてはそれが観察されなかった。低酸素条件下でも傾向は同様であったが、DAP による細胞膜への障害活性はより顕著となった。これらの結果から、DAP は筋芽細胞に対して直接的な毒性、すなわち細胞膜障害と細胞生育性の低下を惹起することが明らかとなった。一方、臨床的に骨格筋毒性を示さないとされている VCM は、細胞増殖能は抑制したものの、細胞膜障害は誘発しなかった。これらの結果から、DAP は骨格筋系の細胞に対して直接的に細胞膜障害活性を示すこと、ならびにその活性は低酸素条件においてより顕著となること示された。また、この細胞膜障害活性は同濃度の VCM では観察されず、DAP に特有のものとして推察された。

②アポトーシスおよびネクロトーシスの検出：DAP 処理した RD 細胞において、アポトーシスの実行型カスパーゼであるカスパーゼ-3/7 の活性は上昇を認めなかった。低酸素条件でも結果は同じであった。さらに、Annexin V 等を用いたアポトーシス・ネクロトーシスの同時検出キットを用いた検討では、低酸素とすることで (通常酸素条件に比して) アポトーシス活性は全体的にベースライン活性が上昇したものの、DAP 処理によるアポトーシス活性への影響は認められなかった。一方で、DAP 処理によるネクロトーシス細胞の増加が認められ、低酸素による影響は 48 時間で増大した。通常酸素、低酸素いずれの条件においても DAP 処理により、ネクロトーシス細胞の増加が惹起されたが、VCM ではこの作用は認められなかった。

③アポトーシスおよびネクロトーシス関連タンパク質の DAP 毒性への関与：ウエスタンブロッティングにより、ネクロトーシスに関連するタンパク質の発現量を解析した結果、低酸素の条件下では、DAP 24 時間処理によって p-MLKL (phosphorylated mixed lineage kinase domain-like) の発現量上昇が認められた。MLKL は、プログラムされたネクロトーシスすなわち、ネクロトーシスが誘導される際に細胞膜障害を誘導する分子である。アポトーシスを誘発せずにネクロトーシスを誘導するという DAP の細胞死誘発機構は当初想定していなかったが、その毒性発現機序の 1 つとして、興味深い知見が得られた。一般に、ネクロトーシスを起こした細胞においては、早期に細胞膜が障害を受け膜構造が破綻するため、DAMPs (damage-associated molecular patterns) などの細胞内容物や DNA が放出されることにより、周囲の免疫細胞を介して炎症を引き起こすことが知られている (他方、一般にアポトーシスでは通常、炎症は伴わないとされている)。このため、p-MLKL は、DAP による骨格筋細胞膜の障害やそれに引き続いて起こる CPK 上昇、さらには横紋筋融解症などの骨格筋毒性発現メカニズムに関わる分子としての役割が想定される。本研究において得られた知見より、p-MLKL を介したネクロトーシス経路を制御することが、DAP 誘発の骨格筋系副作用軽減の一助となることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

①山田武宏、石川修平、小林正紀、石黒信久、井関 健. 抗 MRSA 薬ダプトマイシンは骨格筋細胞にネクロシスを誘導する. 日本薬理学会第 92 回年会、2019 年 3 月 11 日～14 日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：石黒 信久

ローマ字氏名：ISHIGURO NOBUHISA

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学病院

職名：准教授

研究者番号（8 桁）：40168216

研究分担者氏名：井関 健

ローマ字氏名：ISEKI KEN

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学院薬学研究院

職名：教授

研究者番号（8 桁）：40203062

(2) 研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。