

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15503

研究課題名(和文)薬剤性横紋筋融解症の齧歯類動物モデルの作製および新規治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of animal models and treatment methods for drug-induced rhabdomyolysis

研究代表者

織田 進吾(Oda, Shingo)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：10725534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤性横紋筋融解症は薬物療法において稀に生じる骨格筋障害であり、その10-40%は急性腎不全に至ることが報告されている。本研究では、スタチン系およびフィbrate系薬剤の併用による横紋筋融解症モデルマウスを作成し、骨格筋毒性のポテンシャル評価を行った。またグルタチオン枯渇剤単独投与で、骨格筋細胞壊死、ミオグロビンの逸脱、腎障害を誘導することが判明した。作成した本動物モデルは医薬品の筋毒性ポテンシャル評価に有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで汎用されてきたグリセロールを筋肉内投与する横紋筋融解症の動物モデルは、医薬品による横紋筋融解症の特性を必ずしも有しているわけではない。グルタチオン枯渇、フィbrate、及びスタチンの併用により作成した本動物モデルは、医薬品の骨格筋毒性ポテンシャル評価に有用であることが示唆され、医薬品開発における安全性評価に資すると考えられる。また、グルタチオン枯渇による横紋筋融解症/腎障害モデルは、横紋筋融解症に起因する新たな急性腎障害モデルの一つとなり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Rhabdomyolysis is characterized by elevation of plasma creatine phosphokinase (CPK) level, and multiple organ disorders, especially renal failure. In the statin and fibrate coadministration study, we found that coadministration of lovastatin and gemfibrozil under a glutathione (GSH)-depleted condition by L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) for 3 days induced skeletal muscle injury with a CPK of 160,000 U/L. Coadministration of various statins and gemfibrozil to mice demonstrated a comparison of the myotoxic potential of statins. In the study for investigating the contribution of GSH to rhabdomyolysis, mice were treated with BSO twice daily for 7 days under a fasting condition. We found that the mice developed severe skeletal muscle injury. Importantly, renal injury secondary to rhabdomyolysis was observed. The mouse models established in this study would be useful in predicting myotoxic potential of drugs and in establishing remedies for acute kidney injury in drug development.

研究分野：医薬品安全性学

キーワード：医薬品副作用 横紋筋融解症 骨格筋障害 腎障害 動物モデル グルタチオン スタチン フィbrate

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤性横紋筋融解症は、薬剤投与により骨格筋が壊死し、筋細胞中のミオグロビンが血中に漏出することで腎尿細管細胞を障害する重篤な薬剤性副作用である。原因薬には、高脂血症治療薬スタチン系薬剤、フィブラート系薬剤、ニューキノロン系抗菌薬が多く報告されている。スタチン系薬剤単独による発症頻度は非常に低いものの、スタチンおよびフィブラート系薬剤の併用により発症率が10-190倍にも上昇する。この薬剤性副作用を取り巻く問題として、医薬品非臨床開発における横紋筋融解症の評価法が存在しないため、非臨床試験での薬剤性横紋筋融解症の検知が困難であること、臨床/非臨床において最適なバイオマーカーの検討が不十分であること、適切な治療方がないこと、が挙げられる。このような問題が生じる背景に、薬剤性横紋筋融解症の動物モデルの詳細な報告がないことが挙げられる。

ヒトにおいて、スタチン単剤による横紋筋融解症の発症率は非常に稀であり(0.5-5.3件/10,000 person-years) 齧歯類で重篤な薬剤性横紋筋融解症のモデル作製に成功した報告は存在しない。ラットへのプラバスタチン(100 mg/kg/day, p.o.)の3ヶ月間投与は、骨格筋に障害を及ぼさないこと(*J Pharmacol Exp Ther* 275:1490-1496, 1995) セリバスタチン(10 mg/kg, i.v.)の単回投与で血清クレアチンホスホキナーゼ(CPK)が1,200 U/L程度まで上昇することが報告されているのみである。臨床上問題となるケースはCPKが少なくとも5,000~10,000 IU/L以上である場合であり、齧歯類でヒトと同様の病態を再現することは困難とされる。

骨格筋には活性酸素種の解毒化酵素であるカタラーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼ等の発現量が低く、その解毒の多くをグルタチオンに依存している。また *in vitro* の検討でスタチンはミトコンドリア障害を引き起こすことが知られる。以上の背景より、細胞内グルタチオンを枯渇させ、筋細胞を酸化ストレスに対して脆弱化させることで、重篤な横紋筋融解症を急性に発現させることが可能である、との着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、薬剤性横紋筋融解症動物モデルの確立について検討した。本研究内容は2つに大別され、以下、(1)~(2)としてそれぞれの研究について記載した。

(1)スタチンおよびフィブラート系薬剤の併用による横紋筋融解症：スタチン系薬剤およびフィブラート系薬剤による横紋筋融解症は、その併用で10倍以上発症率が上昇することが知られる。本研究では、併用による横紋筋融解症動物モデルの作出を目的とした。

(2)グルタチオン枯渇による横紋筋融解症および腎障害の寄与：グルタチオン(GSH)は細胞内で発生した活性酸素種や過酸化物を還元することにより抗酸化作用を示すトリペプチドである。GSH 抱合により薬物の解毒を行う為、GSH 枯渇モデル動物は薬物の毒性ポテンシャル評価に用いられる。背景でも述べたように、骨格筋における活性酸素種の解毒はグルタチオンに依存している。本研究では GSH 枯渇が骨格筋障害およびそれに付随する腎障害に寄与するか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)スタチンおよびフィブラート系薬剤の併用による横紋筋融解症：検討1) 雌性 C57BL/6J マウスを12時間絶食させた後、L-ブチオニン-(S,R)-スルホキシミン(BSO)700 mg/kgを腹腔内投与することでグルタチオンを枯渇させた。その1時間後にロバスタチン(LV)100-300 mg/kgを経口投与し、さらにその30分後にゲムフィプロジル(GF)1000 mg/kgを経口投与した。この工程を1日1回、3日間行い、最終投与24時間後に剖検し、血漿、骨格筋および腎組織を採取した。血漿 CPK、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、血清尿素窒素(BUN)、クレアチニンおよび miR-206-3p、miR133b-3p を測定した。検討2) 検討1)にて確立した方法をもとに、GF と種々のスタチン系薬剤の併用による骨格筋障害への評価を実施した。スタチンとして、ロスバスタチン、シンバスタチン、ピタバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチンを300 mg/kgで、アトルバスタチンを30 mg/kgとした。骨格筋障害の指標として血漿 CPK を測定した。

(2)横紋筋融解症および腎障害に対するグルタチオン枯渇による寄与：マウスに12時間毎の絶食条件下、BSO 1000 mg/kgを1日2回12時間毎に腹腔内投与にて7日間処置した。8日目に血漿、尿、腎臓、骨格筋および肝臓を採取した。血漿生化学値に加え、腎臓および筋肉の組織評価を行った。さらに各臓器における mRNA 発現量、GSH 量の測定および血漿中 miRNA 発現量の測定を行った。

4. 研究成果

(1)スタチンおよびフィブラート系薬剤の併用による横紋筋融解症：

マウスにLV 300 mg/kg、GF 1000 mg/kg、BSO 700 mg/kgをそれぞれ単独投与し、骨格筋障害が認められるか検討した。その結果、血漿 CPK、AST の上昇は認められなかった。また、BSO およびLVの併用、BSO およびGFの併用でも血漿 CPK、AST に変化は認められなかった。

次に、BSO、LV、GFを三剤併用投与したところ、血漿 CPK(160,000 U/L)およびASTの有意な上昇が認められた。組織学的に BSO/LV/GF の三剤併用群においては骨格筋細胞の壊死が認められた。このCPKの上昇は、投与1および2日後には認められず、骨格筋障害の発症には最低3日

間の投与が必要であった。臨床において CPK 基準値の 10 倍以上の上昇（約 2000 U/L）が筋障害の定義とされることから、本モデルでは、顕著な骨格筋障害を誘導することができた。以上より、BSO によるグルタチオン枯渇下、スタチン系薬剤およびフィブラート系薬剤の併用により骨格筋障害を誘導することが示された。

血漿 microRNA (miRNA) は近年新たな毒性バイオマーカー分子として期待されている。miR-206-3p は骨格筋特異的に、miR-133b-3p は骨格筋および心筋特異的に発現することから、細胞障害により循環血に逸脱すると考えられている。本研究では、血漿中におけるこれら分子を定量 PCR で測定した。その結果、BSO/LV/GF の三剤併用群においては miR-206-3p および miR-133b-3p は共に、対照群と比べ 300 倍程度に上昇がした。骨格筋障害機序を調べるために、骨格筋における遺伝子発現量を測定したところ、BSO/LV/GF の三剤併用群において、Ho-1、Mt2、IL-6 の上昇傾向、S100A8/A9 の有意な上昇が認められた。Ho-1、Mt2 は酸化ストレスの指標であることから、骨格筋障害には酸化ストレスが関与することが示唆された。横紋筋融解症においては、骨格筋障害に伴い腎障害が誘発されることがある。本 BSO/LV/GF の三剤併用群における腎障害を調べた。ところ、組織学的には近位尿細管における空胞が認められたが、腎障害マーカーである血清尿素窒素 (BUN) は上昇しなかった。従って、本モデルマウスにおける腎障害は限定的であることが示唆された。しかしながら、腎組織において Lcn2 (Ngal) mRNA が 70 倍程誘導された。この遺伝子は腎障害に伴い誘導されることが知られることから、本モデルマウスにおいて、腎障害の発症初期であることが示唆された。

BSO/GF 投与マウスに種々のスタチン系薬剤を投与することで、骨格筋障害ポテンシャルを評価した。アトルバスタチンは 300 mg/kg で致死性の毒性を示したため 30 mg/kg で投与した。ロスバスタチン投与により、血漿 CPK が 201,000 U/L を示し、最も骨格筋毒性が顕著であった。血漿 CPK 値の高い順から、ロスバスタチン > LV > シンバスタチン > ピタバスタチン > プラバスタチン > アトルバスタチン > フルバスタチンであった。臨床における横紋筋発症頻度はシンバスタチンが最も高く、アトルバスタチン、LV、ロスバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチンが続く。本研究結果と臨床における発症頻度は完全には一致しなかったものの、本研究においてシンバスタチンにより骨格筋障害が誘導された。従って、本方法は医薬品の横紋筋融解症発症ポテンシャルを評価するツールとなり得る。

(2) 横紋筋融解症および腎障害に対するグルタチオン枯渇による寄与：

マウスに BSO 1000 mg/kg を 1 日 1 回 10 日間腹腔内投与したが、血漿 CPK の上昇は認められなかった。BSO による骨格筋細胞内グルタチオンの減少は、投与後 4-6 時間でピークを迎え、15 時間後には 83% 回復することが報告されている。そこで、12 時間毎の絶食条件下、BSO 1000 mg/kg を 1 日 2 回 12 時間毎に腹腔内投与にて 7 日間処置した。その結果、血漿 CPK が投与 4 日後から上昇し、8 日目にピークを迎えた (350,000 U/L)。投与 8 日後における血漿 miR-206-3p は 600 倍、miR-133b-3p は 3000 倍上昇し、組織学的に筋壊死を認めた。

続いて本マウスにおいて、腎障害の有無について評価した。投与 5 日後から血漿ミオグロビンが上昇し、7-8 日後にピークを迎えた。同様に尿中ミオグロビンも 8 日後に最大を示した。免疫染色を実施したところ、一部の尿細管がミオグロビン陽性を示した。血漿クレアチニンおよび BUN は投与 8 日後に上昇した。腎組織中 Ngal (Lcn2) および Kim-1 の上昇が認められ、組織学的には尿細管閉塞および空胞が認められた。従って、筋障害に誘発された急性腎障害の発症が考えられた。本研究は全身の GSH を枯渇させることにより、骨格筋障害から引き起こされる急性腎障害が発症することを明らかにした。急性腎障害動物モデルには長年、グリセロールを筋肉内投与するモデルが使用されてきたが、グリセロールの高浸透圧による筋細胞膜破壊を原理としたモデルであり医薬品による横紋筋融解症の特性を必ずしも有しているわけではない。BSO を用いることで横紋筋融解症および腎障害を発症させた本モデルは、横紋筋融解症に起因する新たな急性腎障害モデルの一つとなり得ると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akiko Matsubara, Shingo Oda, Ru Jia, and Tsuyoshi Yokoi	4. 巻 39
2. 論文標題 Acute kidney injury model established by systemic glutathione depletion in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 919-930
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jat.3780	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Katsuhito Watanabe, Shingo Oda, Akiko Matsubara, Sho Akai, and Tsuyoshi Yokoi	4. 巻 207
2. 論文標題 Establishment and characterization of a mouse model of rhabdomyolysis by coadministration of statin and fibrate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 49-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.toxlet.2019.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akiko Matsubara, Shingo Oda, Sho Akai, Koichi Tsuneyama, Tsuyoshi Yokoi	4. 巻 291
2. 論文標題 Establishment of a drug-induced rhabdomyolysis mouse model by co-administration of ciprofloxacin and atorvastatin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 184-193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.toxlet.2018.04.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akai Sho, Oda Shingo, Yokoi Tsuyoshi	4. 巻 382
2. 論文標題 Establishment of a novel mouse model for pioglitazone-induced skeletal muscle injury	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Toxicology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tox.2017.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松原 明子, 織田 進吾, 横井 毅
2. 発表標題 全身性グルタチオン枯渇は急性腎障害を引き起こす
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiko Matsubara, Shingo Oda, Sho Akai, Tsuyoshi Yokoi
2. 発表標題 Establishment of a mouse model of rhabdomyolysis by combined use of ciprofloxacin and atorvastatin
3. 学会等名 日本薬物動態学会第32回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松原 明子, 織田 進吾, 赤井 翔, 横井 毅
2. 発表標題 抗菌薬シプロフロキサシン及びアトルバスタチンの併用による横紋筋融解症マウスモデルの作出
3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤井翔, 織田進吾, 横井毅
2. 発表標題 薬物誘導性骨格筋障害モデルの確立及びチアゾリジンジオン誘導体による骨格筋障害機序の解析
3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院医学系研究科統合医薬学領域トキシゲノミクス
<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/toxicogenomics/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	横井 毅 (YOKOI Tsuyoshi) (70135226)	名古屋大学・大学院医学系研究科・教授 (13901)	
研究協力者	渡邊 克仁 (WATANABE Katsuhito)	名古屋大学・大学院医学系研究科・大学院生 (13901)	
研究協力者	松原 明子 (MATSUBARA Akiko)	名古屋大学・大学院医学系研究科・大学院生 (13901)	