

平成22年5月28日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790210

研究課題名（和文）

スタチンによる横紋筋融解症の発症機序の解明

研究課題名（英文）

Analysis of statin-induced rhabdomyolysis

研究代表者

坂本 多穂 (SAKAMOTO KAZUHO)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80433150

研究成果の概要（和文）：

高コレステロール血症治療薬スタチンの骨格筋毒性の発症機序を調べた。(1)スタチンは小胞体-ゴルジ体輸送系の制御蛋白質 Rab1A を阻害した。小胞体-ゴルジ輸送阻害薬ブレフェルジン A で、スタチン同様に筋空胞化と細胞死を生じた。スタチンの Rab1A 阻害が筋空胞変性に関与すると考えられる。(2)スタチンによる筋力低下を調べた。スタチンによる、筋小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量と細胞内 ATP 低下が原因だった。低分子量 G 蛋白質不活性化の関与が示唆された。(3)スタチン筋毒性と筋の薬物トランスポーターの関連を調べた。筋には有機アニオン輸送体 (Oatp)1a4/2b1 が発現しており、これらが毒性に関与した。スタチンは、Oatp で筋に取込まれ、Rab1A 等の低分子量 G 蛋白質を阻害し、筋空胞変性や筋力低下を招く。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the mechanism behind the statin-induced adverse effects on skeletal muscle. (1) Fluvastatin inactivated Rab1 by inhibiting translocation of Rab1 from cytoplasm to sarcolemma in cultured myofibers. Brefeldin A, a specific inhibitor of ER-to-Golgi traffic, mimicked statin-induced vacuolation and cell death. Thus, we conclude that Rab1 inactivation is involved in statin-induced myofiber vacuolation and death. (2) We investigated the mechanism of statin-induced muscle weakness. Myofibers cultured with fluvastatin showed reduced contractility in response to caffeine, which stimulates Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum. We also observed attenuation of Ca^{2+} release and ATP in statin-treated myofibers. GGPP supplementation with fluvastatin prevented ATP reduction, indicating that inactivation of small GTPases is also critical for the ATP reduction. (3) We examined drug transporters (Oatps) responsible for statin-induced myotoxicity. Skeletal myofibers were more sensitive to hydrophilic pravastatin and lipophilic fluvastatin than fibroblasts and myoblasts. RT-PCR analysis revealed that Oatp1a4/2b1, which take up statins into cells, are expressed in skeletal muscles. Therefore, I conclude that drug transporters in sarcolemma are necessary for the induction of myotoxicity by statins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：HMG-CoA 還元酵素阻害薬，副作用，横紋筋融解症，低分子量 G 蛋白質，小胞輸送，蛋白質グラニルグラニル化，骨格筋，ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

スタチンは HMG-CoA 還元酵素阻害薬であり、メバロン酸合成を抑制して血中コレステロールを低下させる。世界中で一億人以上の高コレステロール血症患者がスタチンを服用しており、2007 年の売上高は約 3 兆円にのぼる。しかしスタチンは、筋痛、筋炎、横紋筋融解症など骨格筋に対する有害作用を引き起こすことがある。特に横紋筋融解症は、骨格筋が壊死・融解し、重篤な場合は、急性腎不全から死に至る (Joy et al., 2009)。筋の空胞変性がスタチンの筋毒性の形態的特徴である (Waclawik et al., 1993)。スタチンは服用者が多いことから、この毒性の発現機序と治療法の研究が急務である。しかし、不明な点が多く治療法も見つかっていない。

私は、初代培養したラット骨格筋線維をスタチン存在下で培養することで、スタチンによる筋空胞化と細胞死を *in vitro* ではじめて再現した。電子顕微鏡により、この空胞は膨張した筋小胞体やミトコンドリアであると分かった。スタチンにより合成が抑制されるメバロン酸は、イソプレノイド類とよばれる脂質の原料でもある。イソプレノイドは、生体機能の分子スイッチである低分子量 G 蛋白質の機能に必須であり、スタチンは低分子量 G 蛋白質の機能を低下させる。さらに行った薬理学的実験から、スタチンによる骨格筋線維の空胞化に、細胞内小胞膜輸送を制御する低分子量 G 蛋白質 Rab の不活性化が関与することを見出した。さらに、フルバスタチン処理筋はカフェイン刺激に対する収縮応答が顕著に低下した。また、より高確率で細胞膜にブレブが出現した。つまり、スタチンは、骨格筋線維の細胞膜と収縮機能を異常にすることが分かった。以上の結果を起点として、本研究課題を遂行した (Sakamoto et al., 2007)。

2. 研究の目的

目的：

ラット初代培養骨格筋線維をもちいて、次の 3 つの疑問を解決し、スタチンによる骨格筋障害の発生機序をさらに明らかにする。

(1) スタチンによる筋小胞体の膨張に Rab1

は関与するか？

Rab 不活性化がスタチンによる筋空胞化の原因と考えられる。Rab には多数のアイソフォームが存在し、それぞれ担当する小胞輸送経路が異なる。このなかで、どれがスタチンによる筋空胞化に関与する Rab アイソフォームおよび小胞輸送系なのか明らかでない。本研究では様々な膜輸送系の根幹をなす ER-Golgi 輸送とそれを制御する Rab1 に着目し、スタチンが骨格筋で Rab1 を実際に不活性化させるか調べ、次いで ER-Golgi 輸送の阻害薬ブレフェルジン A が骨格筋に対するスタチンの効果を再現するか調べた。これにより、スタチンによる筋空胞化に Rab1 が関与するかどうか明らかになる。

(2) スタチンによる筋収縮の減弱はなぜ起こるか？

スタチン存在下で筋線維を培養すると、著しく収縮能が低下した。我々は、これが服用患者や動物実験で見られる筋力低下のモデルになると考えた。骨格筋の収縮には Ca^{2+} と ATP が必要である。また収縮装置である筋原線維が正常に機能する必要がある。そこでスタチンのこれらへの影響を調べた。

(3) スタチンの有害作用が骨格筋選択的なのはなぜか？

スタチンの有害事象は、骨格筋で最も多く報告される。しかし、その理由は不明である。我々は水溶性スタチンであるプラバスタチンが人体や動物の骨格筋で毒性を起こすが、骨格筋芽細胞などでは無毒な点に着目し、これは骨格筋細胞膜上に薬物トランスポーターが存在し、これらがスタチンを骨格筋に取り込むためでないかと考えた。そこで、筋線維と培養細胞として汎用される線維芽細胞・筋芽細胞に対しスタチンを投与し、それぞれの感受性の差異を調べた。また、これと各トランスポーター mRNA の発現とを比較した。本研究は、スタチンの筋毒性の成立機序を明らかにすることによって、より安全性の高い医薬品の開発へと繋がる。また、骨格筋の形態・機能に関与するイソプレノイドや低分子量 G 蛋白質を明らかにすることにより、骨格筋の基礎医学的な機能を明らかにす

ることができる。

3. 研究の方法

骨格筋線維の単離・培養

Wistar ラットの後肢足底の短指屈筋から骨格筋線維を単離した。ウシ胎児血清(10%)、シタラピン(10 μ M)含有ダルベッコ変法イーグル培地で培養した。

細胞死の評価

トリパンブルー(0.2%)を投与し、これを取込んだ細胞を死細胞とした。

mRNA 発現

RT-PCR 法により評価した。

Rab1A 蛋白質膜移行の評価

回収した筋線維を超速心で膜画分と細胞質画分とに分離し、それぞれの画分における Rab1A の分布量をウエスタンブロットで解析した。

小胞体ストレスの解析

回収した筋線維の全細胞画分における、小胞体ストレスマーカー蛋白質 Grp78 の発現量をウエスタンブロットで解析した。

筋線維収縮測定

筋線維の収縮は、筋小胞体からの Ca^{2+} 遊離薬カフェイン(30 mM)、および Ca^{2+} イオノフォアであるイオノマイシン(10 μ M)で誘発させた。収縮前後の筋線維長を指標として筋収縮率を算出した。

筋原線維の機能解析

スキンドファイバー法で行った。

細胞内 ATP 量測定

ATP 量の測定にはルシフェリン・ルシフェラーゼ法を用いた。

4. 研究成果

(1) スタチンによる筋小胞体の膨張にどの Rab が関与するか？

1 μ M フルバスタチン存在下で 96 時間培養した筋線維を回収し、Rab1A 蛋白質の膜画分と細胞質画分での分布変化を調べた。Rab1A は膜では約 1/5 に減少し、細胞質では増加した。フルバスタチンと同時に GGPP を補給するとフルバスタチンによる Rab1A の分布変化は見られなくなった。これは、スタチンが GGPP を枯渇させることで、Rab1A を不活性化させることを意味する。GGPP はまた、フルバスタチンによる筋空胞化と細胞死をほぼ完全に抑制した。ER-ゴルジ輸送阻害薬ブレフェルジン A(30 μ M)を筋線維に投与すると、フルバスタチンと同様に 72-96 時間で空胞化を起こした。よって、スタチンによる筋空胞化に GGPP 枯渇を介した Rab1 の阻害と ER-ゴルジ輸送の停滞が関与することが明らかになった。ER-ゴルジ輸送が停滞すると小胞体内の環境悪化(小胞体ストレス)により細胞死が起るとされる。そこで、Grp78 の発現変化を調べた。しかし、Grp78 発現量とフルバスタチ

ン・ブレフェルジン A 誘発筋毒性の間に相関はなかった。骨格筋線維では膜輸送阻害から細胞死に至る経路が他の細胞とは異なる可能性がある。

(Sakamoto and Kimura,投稿中)

(2) スタチンによる筋収縮の減弱はなぜ起こるか？

骨格筋線維にフルバスタチンを加え、カフェイン(30 mM)で収縮させた。コントロールの収縮率は $81.1 \pm 1.6\%$ (n=5)だったが、10 μ M Flv 72 時間処理で $57.1 \pm 6.9\%$ (n=5)と、有意に低下した。この収縮抑制作用は Flv の濃度・時間依存的だった。細胞内 Ca^{2+} 量を測定してみると、カフェインにより筋小胞体から Ca^{2+} を遊離させても、フルバスタチン 10 μ M 処理の Ca^{2+} 遊離量は低下していた。

次にイオノマイシンで、筋小胞体非依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた。フルバスタチン処理ではカフェイン誘発性収縮と同程度抑制した。よって筋小胞体からの Ca^{2+} 遊離量低下以外に収縮抑制の原因があると考えられる。フルバスタチン処理筋をスキンド標本にし、フルバスタチンの筋原線維への作用を検討した。5.1 mM ATP 存在下で Ca^{2+} 濃度を変化させ収縮との関係を調べた。スキンド骨格筋標本の Ca^{2+} -収縮関係曲線の中央値

(EC_{50}) はコントロール群が 48.2 ± 4.5 nM、フルバスタチン投与群では 44.2 ± 7.6 nM で、有意な差はなかった。また最大収縮率は Control 群が $82.6 \pm 2.0\%$ (n=3)、フルバスタチン投与群では $81.9 \pm 0.6\%$ (n=3)で両群の間に変化はなかった。即ち、フルバスタチンは筋原線維には影響しない。そこで、筋線維内 ATP 量を測定したところ、フルバスタチン処理筋では、ATP 量が Control の $24.4 \pm 5.4\%$ (n=3-5)に低下した。細胞内 ATP の低下が収縮抑制の原因になるか、ATP 脱共役剤である FCCP を用いて調べると、FCCP 1 μ M 投与により有意にカフェイン誘発性骨格筋収縮抑制が観察された。

フルバスタチンによる ATP 量低下の原因を調べるため、メバロン酸の代謝産物であるゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)またはファルネシルピロリン酸(FPP)を 10 μ M フルバスタチンとともに筋線維に投与した。GGPP により ATP 量は有意に回復し、FPP では回復しなかった。カフェイン誘発性収縮率も、Flv に GGPP の同時添加群のみに有意に回復した。GGPP から生合成される電子伝達系構成因子であるユビキノン(CoQ9 (10 μ M)または CoQ10 (10 μ M))を、フルバスタチン(10 μ M)に添加したが、ATP 量も収縮率も回復させなかった。

スタチンによる骨格筋収縮抑制の原因に、細胞内 ATP 濃度及び Ca^{2+} 濃度の低下が関与していることを示す。スタチンにより GGPP が

枯渇し、その結果、蛋白質のプレニル化が抑制され、ATP 低下をきたした可能性が高い。本研究結果は、従来言われていたスタチンによる筋障害のエピキノン原因説を否定する新知見であり、スタチンによる筋力低下の発症機序に寄与する。また、スタチンの副作用の予防および治療法の確立に有意義な知見でもある。

(Tanaka et al., 投稿準備中)

(3) スタチンの有害作用が骨格筋選択的なのはなぜか?

水溶性プラバスタチンと脂溶性フルバスタチンは両者とも筋線維に対し細胞毒性を示した。一方、ラット骨格筋由来線維芽細胞と L6 ラット骨格筋芽細胞ではプラバスタチンは高濃度 (≥ 1 mM) でも有意な毒性は示さなかった。またフルバスタチンも細胞毒性を示したものの、その毒性は筋線維の約 1/30 に減弱した。よって、スタチンは骨格筋線維に選択毒性を示す。RT-PCR 法で、骨格筋線維と L6 細胞でのプラバスタチン輸送担体の mRNA 発現を比較したところ、骨格筋ではどの部位においても有機アニオントランポーターポリペプチド(Oatp)1a4および2b1の発現が認められたが、L6 細胞ではいずれにも発現していなかった。Oatp の基質であるエストロン硫酸(300 μ M)存在下で骨格筋線維にプラバスタチンを作用させたところ、筋毒性は有意に緩和された。水溶性スタチンは骨格筋に発現する Oatp により細胞内へ取り込まれ、筋毒性を発生すると考えられる。

(Sakamoto et al., 2008)

参考文献:

Joy et al., (2009) *Ann Intern Med* **150**, 858-868.
Sakamoto et al., (2007) *FASEB J* **21**, 4087-4094.
Waclawik et al., (1993) *J Neuropathol Exp Neurol* **52**, 542-549.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) Sakamoto K, Owada Y, Shikama Y, Wada I, Waguri S, Iwamoto T, Kimura J (2009). Involvement of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in migration and contraction of rat cultured tendon fibroblasts. *J Physiol*. 587,5345-5359. (査読あり)

(2) Maeda S, Sakamoto K, Matsuoka I, Iwamoto T, Kimura J (2009). Lysophosphatidylcholine increases $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger expression via RhoB-geranylgeranylation in H9c2 cells. *J*

Pharmacol Sci. 109, 565-72. (査読あり)

(3) Kimura J, Ono T, Sakamoto K, Ito E, Watanabe S, Maeda S, Shikama Y, Yatabe MS, Matsuoka I (2009). $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger expression and its modulation. *Biol Pharm Bull*. 32(3):325-331. (査読あり)

(4) Noguchi C, Yang J, Sakamoto K, Maeda R, Takahashi K, Takasugi H, Ono T, Murakawa M, Kimura J (2008). Inhibitory effects of isoliquiritigenin and licorice extract on voltage-dependent K^+ currents in H9c2 cells. *J Pharmacol Sci*. 108, 439-445. (査読あり)

(5) Sakamoto K, Mikami H, Kimura J (2008). Involvement of organic anion transporting polypeptides in the toxicity of hydrophilic pravastatin and lipophilic fluvastatin in rat skeletal myofibres. *Br J Pharmacol*. 154,1482-1490. (査読あり)

[学会発表] (計 15 件)

(1) 坂本 多穂, 和栗 聡, 木村 純子
スタチン誘発性骨格筋毒性への小胞体-ゴルジ体間輸送の関与
第 83 回 日本薬理学会年会 (大阪)
2010/03/16

(2) 田中 祥子, 坂本 多穂, 小野 委成, 木村 純子
フルバスタチンによるラット骨格筋収縮障害の発症機序
第 83 回 日本薬理学会年会 (大阪)
2010/03/16

(3) Kazuho Sakamoto, Satoshi Waguri, Junko Kimura
Disturbance of endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking is involved in statin-induced skeletal myopathy
Biophysical Society 54th Annual Meeting (San Francisco) 2010/02/24

(4)坂本 多穂, 和栗 聡, 木村 純子
スタチンによる骨格筋毒性への小胞輸送障害の関与
筋生理の集い (東京)
2009/12/19

(5)坂本 多穂, 木村 純子
スタチンによる骨格筋毒性に小胞輸送障害が関与する
生理研セミナー「イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能:細胞機能の分子機序とその統合的理解」(岡崎)
2009/11/26

(6)坂本 多穂、木村 純子
スタチンによる骨格筋毒性への有機アニオン
トランスポーターの関与
第 420 回 福島医学会学術研究集会 (福島)
2009/10/22

(7)田中 祥子、坂本 多穂、小野 委成、木村
純子
高脂血症薬スタチンによるラット骨格筋の
収縮障害に ATP 低下が関与する
第 60 回 日本薬理学会北部会 (富山)
2009/09/26

(8)坂本多穂、木村純子
1 型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体ノックダウンによる
ラットアキレス腱由来筋線維芽細胞の機能
変化
第 60 回 日本薬理学会北部会 (富山)
2009/09/26

(9)Kazuho Sakamoto, Yuki Owada, Yayoi
Shikama, Ikuo Wada, Satoshi Waguri, Takahiro
Iwamoto, Junko Kimura
 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger is involved in migration and
contraction of rat tenocytes
the XXXVI International Congress of
Physiological Sciences (Kyoto)
2009/07/28

(10) 田中 祥子、坂本 多穂、小野 委成、木村
純子
スタチンによる初代培養骨格筋線維の収縮
抑制とその機構
第 36 回 日本トキシコロジー学会学術年会
(盛岡)
2009/07/07

(11) 田中 祥子、坂本 多穂、小野 委成、木村
純子
初代培養骨格筋をもちいたフルバスタチン
誘発性骨格筋収縮障害の解明
第 82 回 日本薬理学会年会 (横浜)
2009/03/17

(12) 坂本 多穂、大和田有紀、色摩弥生、和
田郁夫、和栗聡、岩本隆宏、木村純子
ラット腱細胞における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の
発現と機能
第 82 回 日本薬理学会年会 (横浜)
2009/03/16

(13) 坂本多穂、大和田有紀、色摩弥生、和田
郁夫、和栗聡、岩本隆宏、木村純子

ラット腱細胞での $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の発現
と機能
トランスポーターワークショップ福岡 (福
岡) 2008/11/02

(14) 坂本 多穂、大和田 有紀、色摩 弥生、
和田 郁夫、和栗 聡、岩本 隆宏、木村 純子
ラット腱線維芽細胞における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸
送体の発現と機能
第 59 回 日本薬理学会北部会 (仙台)
2008/09/27

(15) 坂本 多穂、三上 博嗣、木村 純子
スタチン誘発性ラット骨格筋毒性に対する
薬物トランスポーターの寄与
第 35 回 日本トキシコロジー学会学術年会
(東京)
2008/06/26

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂本 多穂 (SAKAMOTO KAZUHO)
福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 80433150

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし