

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790159

研究課題名（和文） 肝障害リスクを低減した動脈硬化予防薬の開発

研究課題名（英文）

Development of anti-arteriosclerosis medicines that reduced the risk of hepatotoxicity

研究代表者

窪田 敏夫（KUBOTA TOSHIO）

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：50533006

研究成果の概要（和文）：

スタチン系薬は脂質異常症に対する薬であり、動脈硬化を防ぐ作用が知られている。その一方で、まれに肝臓に障害を与えることがある。申請者は、動脈硬化予防作用と肝臓障害作用のそれぞれのメカニズムを検証、比較することにより、肝臓への障害のリスクを低減した動脈硬化に対する薬の開発を目指した。本研究により、細胞内に存在する **RhoA/ROCK** という蛋白質に対する効果に違いがあることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Statins are the most widely used cholesterol-lowering agents. It is known that statins prevent arteriosclerosis. On the other hand, statins sometimes influence the hepatic function. The aim of this study is the comparison of molecular mechanism between anti-arteriosclerosis effect and hepatotoxicity by statins to develop anti-arteriosclerosis medicines that reduced the risk of hepatotoxicity. This study indicated the difference of the influence of statins against **RhoA/ROCK**.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：

マクロファージ、泡沫化、スタチン、**RhoA/ROCK**、ゲラニルゲラニルピロリン酸、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

高脂血症治療薬であるスタチン系薬は、全世界において最も使用されている薬の一つである。その一方、肝機能値の上昇が数%頻度で起き、まれであるが重篤な肝障害が発生

することが報告されている。申請者はこれまでヒト培養肝細胞を用いて、スタチン系薬による肝障害発現の機序の研究に取り組んできた(Kubota T et al., *Biochem Pharmacol.* 67: 2175-2186, 2004; Kubota T et al.,

Apoptosis. 10: 349-358, 2005)。

スタチン系薬は HMG-CoA 還元酵素を選択的に阻害し、メバロン酸合成を低下する。そして、メバロン酸経路下流のコレステロール合成が低下し、高脂血症が改善する。また、スタチンには、コレステロール低下作用以外に、多面的効果として、抗酸化作用・抗炎症作用、抗動脈硬化作用などが知られており、これらはコレステロール低下作用と異なる機序によることが知られている。

申請者は、スタチン系薬による肝細胞障害は、コレステロール低下作用ではなく、メバロン酸経路の中間代謝物であるセラニルセラニルピロリン酸の低下によることを明らかにした。また、セラニルセラニルピロリン酸は低分子量 G 蛋白質の活性化に必要であり、RhoA 蛋白質が関与することを示してきた。しかし、RhoA 蛋白質の下流に位置する Rho kinase の一つである ROCK の関与は見られなかった。

これまでスタチン系薬による多面的効果に RhoA/ROCK 経路が関与することが報告されている。動脈硬化の要因の一つであるマクロファージへの酸化低比重リポ蛋白質 (酸化 LDL) の取り込みをスタチン系薬が抑制することが知られている。しかし、この酸化 LDL の取り込み抑制に RhoA/ROCK 経路が関与するかは不明であった。

申請者がこれまで明らかにしてきたスタチン系薬の副作用である肝障害の機序と抗動脈硬化作用の違いを明らかにすることで、肝障害を回避できる新規の抗動脈硬化薬の開発につながることを期待し、本研究を実施した。

2. 研究の目的

(1) ヒト培養細胞 *in vitro* 評価系を用いて、スタチン系薬のマクロファージによる酸化 LDL 取り込み抑制における RhoA/ROCK 経路の関与について検討を行う。

① マクロファージへの酸化 LDL 取り込み *in vitro* 評価系を構築する。

② スタチンによる酸化 LDL 取り込み阻害を指標に、RhoA/ROCK の関与について検証を行う。

3. 研究の方法

(1) マクロファージへの酸化 LDL 取り込み評価系の構築

ヒト由来急性単球性白血病細胞 THP-1 を使用した。THP-1 を PMA

(phorbol-12-Myristate 13-Acetate) 刺激によって、単球からマクロファージ様へ分化させた。48 時間 PMA 刺激した THP-1 細胞に対して酸化 LDL を添加後 48 時間培養し、細胞内に取り込まれた酸化 LDL を Oil-red O 染色液により染色した。Oil red O 染色液はアゾ

色素の一種であり、無極性・脂溶性のため細胞内の脂溶性物質に溶け込む性質を利用している。染色後、水で染色液を除去した後、画像撮影を行った。また、染色した細胞から Oil-red O を抽出し OD540nm で定量を行った。

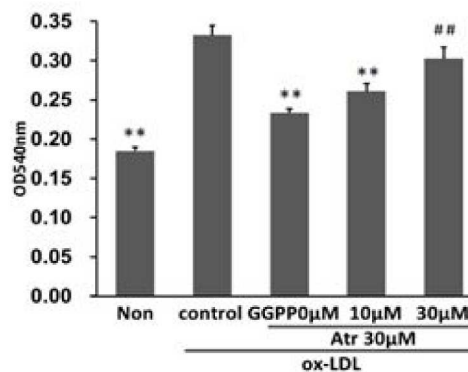
(2) スタチンによる酸化 LDL 取り込み阻害の機序について

アトルバスタチン (Atr) を酸化 LDL 処置 30 分前に加え、酸化 LDL 取り込み阻害活性を評価した。Atr による酸化 LDL 取り込み阻害が HMG-CoA 還元酵素阻害によるものであるか検討するため、メバロン酸中間代謝物であるメバロン酸 (MVA)、セラニルセラニルピロリン酸 (GGPP)、フェルネシルピロリン酸 (FPP) が Atr による取り込み阻害を抑制するか評価した。いずれも Atr と同時処置を行った。また、セラニルセラニル転移酵素阻害薬である GGTI-2147 (以下 GGTI)、RhoA 阻害剤 C3 toxin、ROCK 阻害剤 Y-27632 により酸化 LDL 取り込みが阻害されるか評価した。

4. 研究成果

酸化 LDL (ox-LDL) 添加群 (control) において、非添加群 (Non) と比べ、顕微鏡観察における細胞内の染色強度の増加が見られ、Oil-red O 抽出液の吸光度が上昇した。そして、Atr により酸化 LDL のマクロファージへの取り込みは濃度依存的に阻害され、10 μ M、30 μ M の Atr で有意な阻害が見られた。この Atr による酸化 LDL の取り込み阻害は MVA により抑制した。同様に、Atr による酸化 LDL 取り込み阻害は GGPP により濃度依存的に抑制した (図 1)。一方、FPP では有意な抑制は見られなかった。

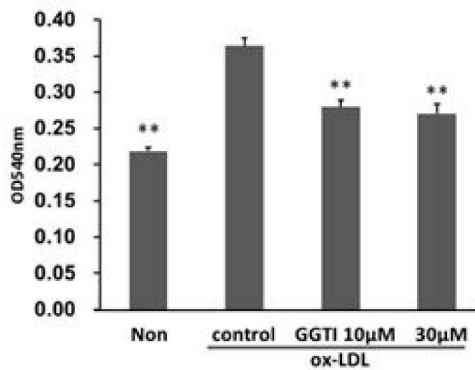
図 1 酸化 LDL のマクロファージへの取り込みに対するセラニルセラニルピロリン酸の効果



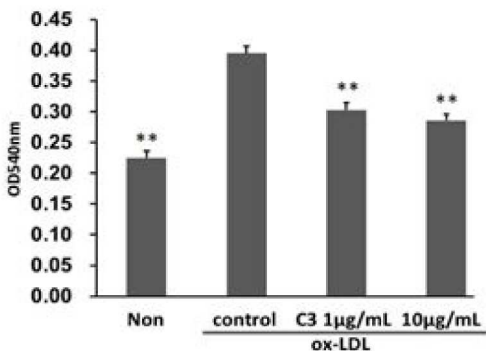
GGPP はゲラニルゲラニル転移酵素により RhoA に結合する。そして、ゲラニルゲラニルが転移した RhoA は細胞膜に局在し、GTP 結合型となり、活性化されることが知られている。GGTI 10, 30 μ M 単独で酸化 LDL 取り込みが阻害された。そこで、酸化 LDL 取り込みに関わる GGPP 下流の因子を明らかにするため RhoA 阻害剤、RhoA のリン酸化を抑制する ROCK 阻害剤の効果を検討した。その結果、RhoA 阻害剤 C3 1, 10 μ M/mL、ROCK 阻害剤 Y-27632 30 μ M において酸化 LDL 取り込みを有意に阻害した (図 2 a, b, c)。

図 2 酸化 LDL のマクロファージへの取り込みに対する各種阻害剤の効果

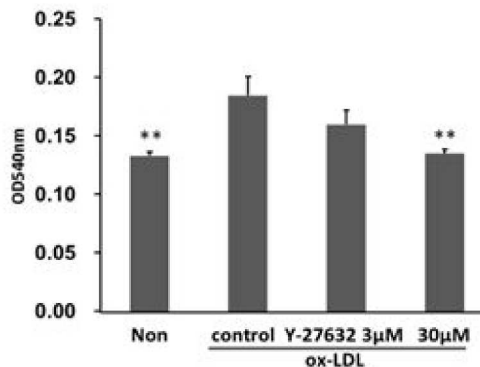
(A)GGTI



(B)C3 toxin



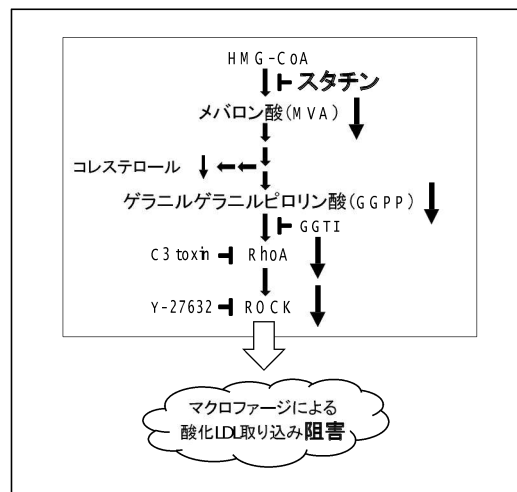
(C) Y-27632



Oil-red O 染色の定量によるマクロファージへの酸化 LDL 取り込み評価系が構築できた。この評価系により、スタチンのマクロファージへの酸化 LDL 取り込み阻害は MVA により抑制されたため、スタチンの主作用である HMG-CoA 還元酵素阻害活性によることが示された。また、GGPP による Atr の効果の抑制、GGTI による取り込み阻害が見られたことから、多面的効果に關与する下流の RhoA/ROCK の関与が考えられた。そして、RhoA 阻害剤、あるいは ROCK 阻害剤によりマクロファージへの酸化 LDL 取り込み阻害が見られたことから、酸化 LDL 取り込みに RhoA/ROCK が關与することが示唆された (図 3)。今後、Atr により RhoA 活性が低下するか否か検証していく必要がある。

スタチンによるマクロファージへの酸化 LDL 取り込み阻害は、肝細胞障害の機序と同様に細胞内 GGPP の低下、その下流の RhoA の不活性化が關与していた。しかし、培養ヒト肝細胞に対し ROCK 阻害薬 Y-27632 を暴露した場合、細胞障害がほとんど見られないことをすでに報告している。本研究の知見から、スタチンによる肝障害と抗動脈硬化作用の機序が、ROCK 下流において異なる可能性を見出すことができた。今後は、スタチンによる肝障害と抗動脈硬化作用における RhoA 下流の因子について、さらに検討していく必要がある。

図 3 スタチンによるマクロファージへの酸化 LDL 取り込み阻害機構



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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

塚本裕貴、中村雅子、八木竜太、矢野貴久、大石了三、窪田敏夫、ヒト単球由来マクロファージの酸化LDL取り込みに対するスタチンの効果、日本薬学会第132年会、平成24年3月31日、北海道大学(北海道)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 敏夫 (KUBOTA TOSHIO)

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号 50533006