

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790126
 研究課題名 (和文)
 高脂血症薬の副作用回避ストラテジーの構築～新規薬物相互作用の解明～
 研究課題名 (英文)
 The strategy to avoid the side effect of lipid-lowering agents
 研究代表者 小林 正紀 (KOBAYASHI MASAKI)
 所属研究機関・部局・職名：北海道大学・大学院薬学研究院・助教
 研究者番号：70431319

研究成果の概要 (和文)：

本研究はトランスポータの発現制御を担う核内受容体 LXR (liver X receptor) に着目し、LXR の活性に影響を及ぼす脂質異常症治療薬 (スタチン) 投与時の薬物動態変動の可能性を明らかにし、薬物-薬物相互作用の要因の一端を明らかにすることを目的としている。本研究により脂質異常症に対する安全かつ適正な薬物治療の一助となる。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we focused on a nuclear receptor, LXR (liver X receptor) and examined the effect of statins, lipid-lowering agents, on LXR function in HepG2 cells and the rat liver. Therefore this study can lead to precise drug therapy of hyperlipidemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
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：医療系薬学

キーワード：薬学、臨床、薬物相互作用、トランスポータ、スタチン

1. 研究開始当初の背景

LDL-コレステロール (LDL-C) やその酸化物質である酸化 LDL は、動脈硬化の発症、進展に重要な役割を果たし、冠動脈疾患 (CHD) の最も重要な危険因子であることは国内外の数多くの疫学的研究から示されている。HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) は、現在臨床に供されている薬剤の中でこの LDL-C を最も強力に低下させる薬剤であり、高コレステロール血症の治療薬として全世界で広

く使用されている。スタチンは、HMG-CoA 還元酵素を阻害することによりコレステロールの産生を強力に抑制するが、様々な生体内分子変動を引き起こすことが明らかにされつつある。スタチンにより合成が低下するコレステロール誘導体としてオキシステロールが挙げられるが、これは核内受容体 LXR (liver X receptor) の内因性リガンドとして機能することが報告されている。LXR はリガンドの結合により、核内受容体 RXR

(retinoid X receptor) とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子のプロモーター部位に結合することで転写活性を調節する。また脂質代謝に関わる多くの因子および、ラットでは CYP3A といった代謝酵素を誘導することが報告されており、薬物動態の制御において LXR は重要な役割を果たしている。一方、スタチンによるメバロン酸合成の低下に伴い、GGPP (geranyl geranyl pyrophosphate) の低下が引き起こされる。GGPP の低下により Rho の低下を引き起こし、続いて生ずる核内受容体 PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) の活性化は、LXR の活性化につながることを報告されている。

前述したようにスタチンが核内受容体 LXR に及ぼす影響は、オキシステロールの低下に伴う LXR 活性低下作用と GGPP 低下に伴う LXR 活性上昇作用という相反する二つの経路が考えられる。これまでに PPAR の活性化により薬物トランスポータおよび薬物代謝酵素の発現や機能が影響を受けることが報告されている。スタチンは PPAR の活性に影響を与えることからスタチン投与時の薬物トランスポータの発現は変動することが予想され、スタチンのみならず併用薬の薬物動態は変動することが推察される。申請者はこれまでスタチンの副作用である横紋筋融解症の発症機序およびリスク軽減に関する研究を行ってきており、スタチンによる副作用において血中濃度の増大が危険因子になることを明らかにしている。これまでの検討結果とスタチンによる薬物動態変動の解析とを合わせることでより安全かつ適正なスタチンの使用に貢献できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、LXR に着目し、スタチンが肝臓でのトランスポータ発現に与える影響およびその制御機構の解明を目的とした。この機構を明らかにすることでスタチン投与時の薬物動態変動を予測することが可能となり、スタチンの適正使用につながると考えられる。さらに薬物-薬物相互作用を考察する上で重要な知見になることが想定される。

3. 研究の方法

ヒト肝臓癌由来 HepG2 細胞 およびラット肝初代培養細胞を用いて、real-time PCR 法、ウェスタンブロット法にスタチン曝露後のトランスポータ mRNA 量および蛋白発現量の測定を行った。検討には LXR を介する調節機構によって変動が報告されている ABCA1 (positive control)、薬物動態に密接に関与する P-glycoprotein (P-gp)、Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)、Breast cancer resistance protein (BCRP) に焦点を当てた。また in vivo における検討としてラットにスタチンを経口投与後の肝

臓を摘出し、前述したトランスポータ発現変動を確認した。また変動が認められたトランスポータについてその変動メカニズムを LXR siRNA および免疫染色にて評価した。

4. 研究成果

まずスタチンが肝臓でのトランスポータ発現に及ぼす影響およびその制御機構の解明を目的に種々検討を行った。その結果、HepG2 細胞 (Fig. 1) およびラット肝臓 (Fig. 2) においてスタチン曝露により MRP2 mRNA および蛋白質発現が誘導されることを見出した。またスタチン間でトランスポータに及ぼす影響は異なることが明らかとなった。

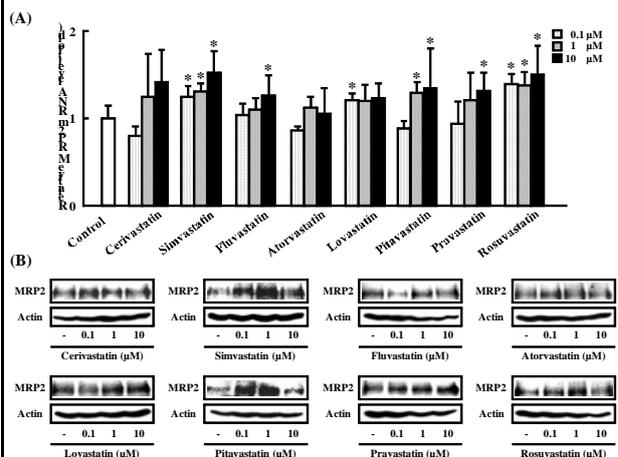


Fig. 1. Effects of statins on MRP2 mRNA (A) and protein (B) levels in HepG2 cells.

(A) HepG2 cells were treated with various concentrations of statins for 24 h. Each column represents the mean with S.D. of 3-40 determinations. *, significantly different from control (no addition) at $p < 0.05$.

(B) HepG2 cells were treated with various concentrations of statins for 24 h. Data shown are typical results of three independent experiments.

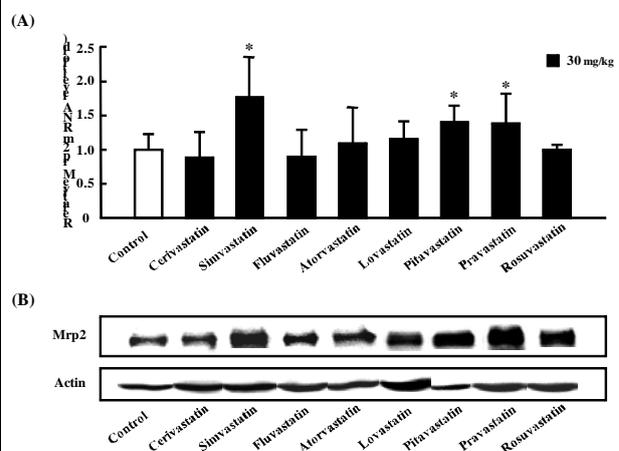


Fig. 2. Effects of statins on Mrp2 mRNA (A) and protein (B) levels in the rat liver.

(A) Male Wistar rats were administered methylcellulose with or without 30 mg/kg statins for 24 h. Each column represents the mean with S.D. of 3-5 determinations. *, significantly different from control at $p < 0.05$.

(B) Male Wistar rats were administered methylcellulose with or without 30 mg/kg statins for 24 h. Data shown are typical results of three independent experiments.

次に LXR アゴニスト(TO901317)を用いて MRP2 の発現調節に LXR が関与するか否かの検討を行った。その結果 LXR により調節を受けると報告されている ABCA1、MRP2mRNA は TO901317 処置により有意に増大した。一方で MDR1,BCRPmRNA は変動しないことが示された (Fig. 3)。

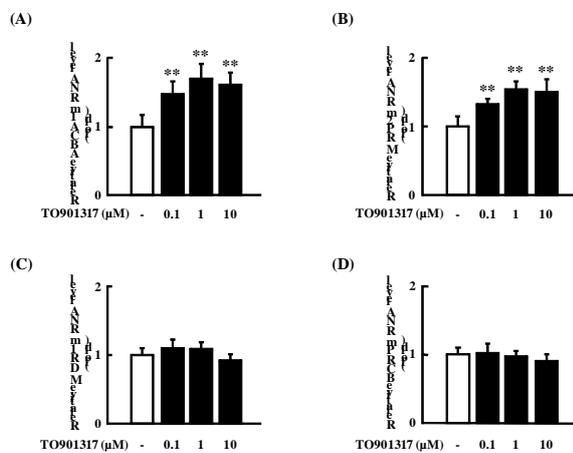


Fig. 3. Effects of TO901317 on ABCA1 (A), MRP2 (B), MDR1 (C) and BCRP (D) mRNA levels in HepG2 cells

HepG2 cells were treated to TO901317 (0.1-10 μM) for 24 h. Each column represents the mean with S.D. of 6 determinations. **, significantly different from control (no addition) at $p < 0.01$.

さらに *in vivo* において同様の検討を行ったところ、TO901317 経口投与においてラット肝 Abca1、Mrp2 mRNA および蛋白質発現は増大することが示された。一方で MDR1,BCRPmRNA は変動しないことが示された (Fig.4)。以上の結果より、LXR の活性化は MRP2 発現は誘導するが、P-gp および BCRP の発現には影響を与えないことが示唆された。

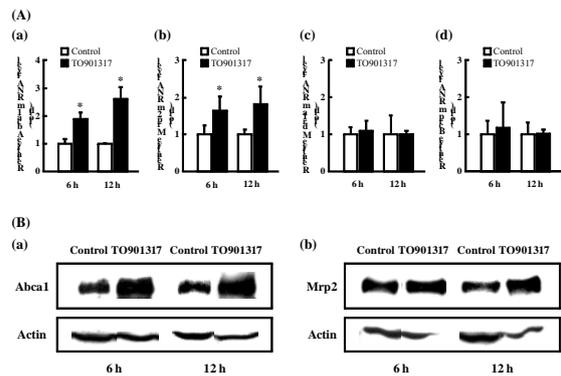


Fig. 4. Effects of TO901317 on Abca1 (a), Mrp2 (b), Mdr1a (c) and Bcrp (d) mRNA levels (A) and Abca1 (a) and Mrp2 (b) protein levels (B) in rat liver

(A) Male wistar rats were given drinking methyl cellulose with or without 10 mg/kg TO901317 for 6, 12 h. Each column represents the mean with S.D. of 3-4 determinations. *, significantly different from control at $p < 0.05$.

(B) Male wistar rats were given drinking methyl cellulose with or without 10 mg/kg TO901317 for 6, 12 h. Data shown are typical results of three independent experiments.

続いてスタチンが核内受容体 LXR に及ぼす影響を検討した。スタチン曝露後の LXR の核への移行を免疫染色により検討したところ、核移行を促進し、LXR を活性化することを明らかにした (Fig. 5)。したがって前述したスタチンが LXR に及ぼす分子メカニズムとして GGPP 低下に伴う LXR 活性の上昇が優位に寄与していることが推察された。

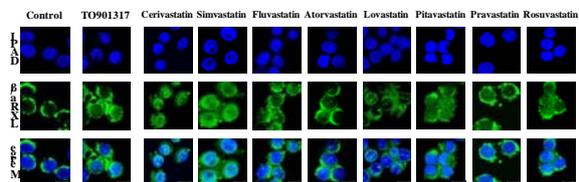


Fig. 5 Nuclear translocation of LXRα/β induced by statins in HepG2 cells.

HepG2 cells were treated with statins (10 μM) for 24 h. Localization of LXRα/β was determined using an antibody against LXRα/β (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar shows 10 μm. Data shown are typical results of three independent experiments.

最後に LXR siRNA を用いてスタチンによる MRP2 mRNA の増大に対する影響を確認した。その結果、Fig. 1 で示された MRP2 の増大は LXR siRNA 処置により完全に抑制された (Fig. 6)。したがってスタチンによる肝 MRP2 の増大に LXR 経路が関与していることが示唆された。

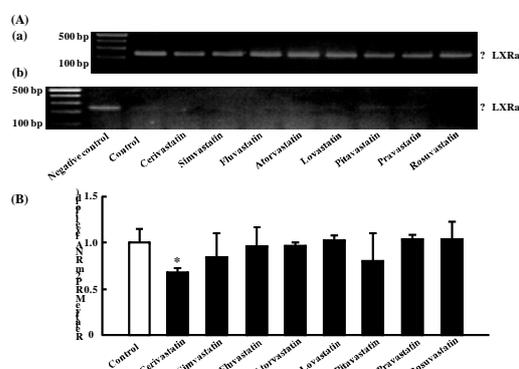


Fig. 6. Effects of LXR α siRNA on LXR α mRNA (A) and 10 μ M statin-induced MRP2 mRNA (B) levels in HepG2 cells. (A) HepG2 cells were transfected with LXR α siRNA (10 nM) for 72 h and treated with statins (10 μ M) for 24 h. (B) HepG2 cells were transfected with LXR α siRNA (10 nM) for 72 h and treated with statins (10 μ M) for 24 h. Each column represents the mean with S.D. of 3-21 determinations. *: significantly different from control at $p < 0.05$.

以上、本検討によりスタチンの投与が肝臓からの薬物排出に寄与するトランスポータを誘導したことから、基質となる薬物の効果減弱の可能性が示唆された。またスタチン間で変動の程度が異なることから、併用薬に応じたスタチンの選択が重要になると考えられた。今後は、MRP2 の機能面に及ぼす影響および詳細な機構を明らかにすることでスタチン投与時の薬物動態変動を予測することが可能となり、スタチンの適正使用につながると思われる。

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 1 件)

Chisaki, I., Kobayashi, M., Itagaki, S., Hirano, T. Iseki, K.
Liver X receptor regulates expression of MRP2 but not that of MDR1 and BCRP in the liver.
Biochim. Biophys. Acta 1788(11): 2396-2403. 2009 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

1. 知寄 郁美、小林 正紀、板垣 史郎、平野 剛、井関 健

肝 MRP2 発現に与えるスタチン系薬物の影響
第 23 回日本薬物動態学会
2008 年 10 月 30 日、熊本

2. 合田 圭佑、小林 正紀、知寄 郁美、板垣 史郎、井関 健

スタチン系薬物による肝 ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) 発現に及ぼす影響

第 24 回日本薬物動態学会
2009 年 11 月 28 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 正紀 (KOBAYASHI MASAKI)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 70431319

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し