

## 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25年 6月17日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390179

 研究課題名（和文） スタチン製剤による筋障害予防のためのスクリーニング法と遺伝子解析  
 研究課題名（英文） Screening and gene analysis for the protection from muscle damage by statin drugs

研究代表者

清島 満 (SEISHIMA MITSURU)

岐阜大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10171315

研究成果の概要（和文）：ヒトリンパ球にコレステロール低下薬であるスタチン製剤を添加し、リンパ球内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の増加度を測定した。ロスバスタチンを服用して血中 CK が上昇した群は上昇しない群に比べて有意に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ が増加した。 $\text{Ca}^{2+}$ 増加異常を示した症例のうち RyR1 遺伝子に 1 例、CPTII 遺伝子に 2 例の変異が認められた。本測定は  $\text{Ca}^{2+}$ 輸送関連遺伝子変異のスクリーニングおよび筋障害副作用の予知に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We determined  $\text{Ca}^{2+}$  increase in CD19+ cells by FCM. Rosuvastatin user patients with CK elevation showed a significant increase in  $\text{Ca}^{2+}$  within CD19+ cells compared with that in patients without CK elevation. Out of 18 patients with an elevated  $\text{Ca}^{2+}$ , we found out one case with a mutation in exon 34 in RyR1 gene and two cases with a mutation in exon 4 in CPTII gene. These findings show that this method is useful for the screening of a mutation in genes that relate to  $\text{Ca}^{2+}$  transport and for the prediction of muscle damage by statins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2012年度	2,000,000	600,000	2,600,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：スタチン製剤・筋障害・細胞内カルシウム・リアノジン受容体・遺伝子解析・フローサイトメトリー

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在日本では HMG CoA reductase 阻害剤であるスタチン製剤が約 200 万人の高コレステロール血症の患者さんに用いられている。この薬剤による副作用として、肝障害などのほかに筋肉痛や脱力症状など、骨格筋に関連した症状がよく知られており、服用を中止せざるを得ない場合がある。また稀では

あるが重篤な横紋筋融解症となるケースもあり、筋障害の発現に関しては臨床的に注意が必要である。

(2) スタチン製剤による副作用として筋障害があり、重篤な例では横紋筋融解症がある。そのメカニズムの一つとして Ryanodine receptor gene 1 (RyR1) の mutation による細

胞内への過剰のカルシウム放出が関与している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究はスタチン製剤による筋障害を予知する検査法の確立を目的とする。服薬前の簡便なスクリーニング法により、その筋障害発症の可能性が予知できれば、副作用からの健康被害を回避できるだけでなく、その可能性の少ない人には、より積極的な治療が可能となる。

## 3. 研究の方法

まず、基礎検討として RyR 1 の発現を確認した THP-1 cell を用いてスタチンあるいは陽性コントロールとしての 4Cmc を添加し、細胞内  $Ca^{2+}$  の増加の程度を  $1\mu M$  fluo-3/AM 存在下にて flow cytometry にて測定した。次いでヒト末梢血単核細胞 (CD19+lymphocyte) に RyR1 遺伝子が発現していることを確認し (図 1, 2)、以下のプロトコール (表 1) に従って測定をした。

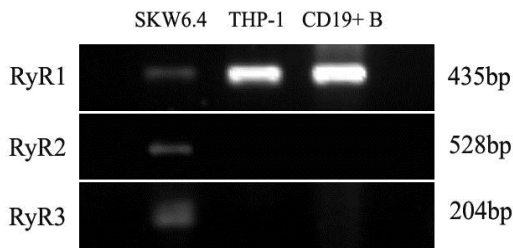


図 1 各細胞の RT-PCR

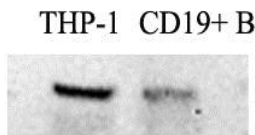


図 2 Western blot

表 1 Flow cytometry による測定法

THP-1 cell を RPMI1640 で培養
↓
PBS (-) で 2 回洗浄
$2 \times 10^6$ 個に PBS (-) 1ml で再浮遊
↓
$1\mu M$ fluo-3/AM 室温 30min (遮光)
↓
PBS (-) で 2 回洗浄
CD19-PE 4°C 30 min (遮光)
↓
PBS (-) で 2 回洗浄
$2 \times 10^6$ 個に PBS (-) 1ml で再浮遊
↓
FCM で測定 (pre-stimulation)
↓
← stimulation (4Cmc or Statin)
FCM で測定 (post-stimulation)

## 4. 研究成果

(1) THP-1 細胞において RyR1 受容体のアゴニストである 4Cmc にて刺激後、simvastatin を添加すると第 2 のピークが認められたが、simvastatin を最初に加え、次いで 4Cmc にて刺激しても第 2 のピークは認められなかった。すなわち第 2 のピークは simvastatin の細胞内  $Ca^{2+}$  動員に RyR1 由来以外の存在を推測させた (図 3 A)。これを確認するため  $100nM$  thapsigargin にて小胞体内  $Ca^{2+}$  を枯渇させ、8 分後に  $1mM$  4Cmc と  $100mM$  simvastatin でそれぞれ刺激した。その後ミトコンドリアから  $Ca^{2+}$  リリースさせるため  $1mM$  ionomycin で刺激した。その結果、simvastatin の添加で第 2 のピークが出現し、その後の ionomycin ではピークが見られず、一方 4Cmc 添加ではピークが見られなかったが、その後の ionomycin にてピークが出現したことより、simvastatin による  $Ca^{2+}$  release は小胞体のみならずミトコンドリア由来のものも存在していることが推測された。(図 3 B)。

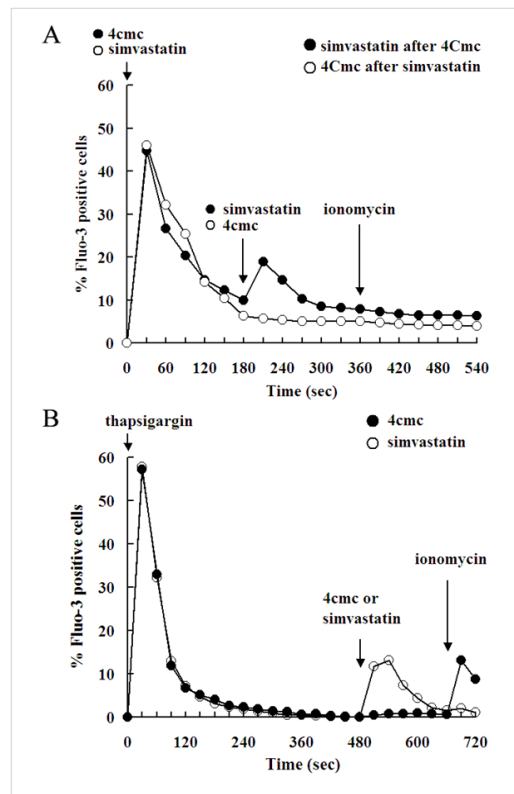


図 3 simvastatin による細胞内  $Ca^{2+}$  輸送の検討

(2) 各スタチン製剤による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化 pravastatin, simvastatin, fluvastatin, cerivastatin, pravastatin の 5 種類にて各  $100\mu M$  濃度まで検討したところ、rosuvastatin が最も濃度依存性に細胞内  $Ca^{2+}$

濃度の増加が大きかった (図4)。しかし pravastatin においては全く細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が増加しなかった。

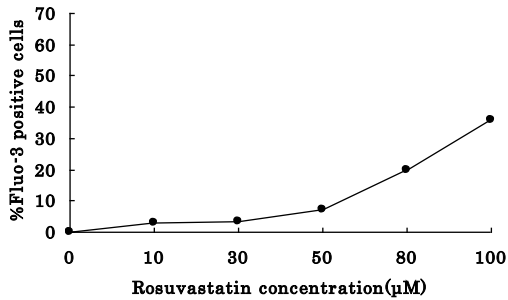


図4 rosuvastatin 濃度による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化

(3) 健常者および rosuvastatin 服用者で血中 CK 濃度が不変あるいは筋症状のない群、および服用者で CK 上昇あるいは筋症状の認められる群について検討を行った。

その結果、rosuvastatin 30μM と 80μM の 2 種類の濃度において測定した結果、健常者群に比べて CK 上昇群がいずれの濃度においても有意に  $Ca^{2+}$  濃度の増加が認められた (図5)。一方、CK 不変群においては健常者群と差は認められなかった (data not shown)。

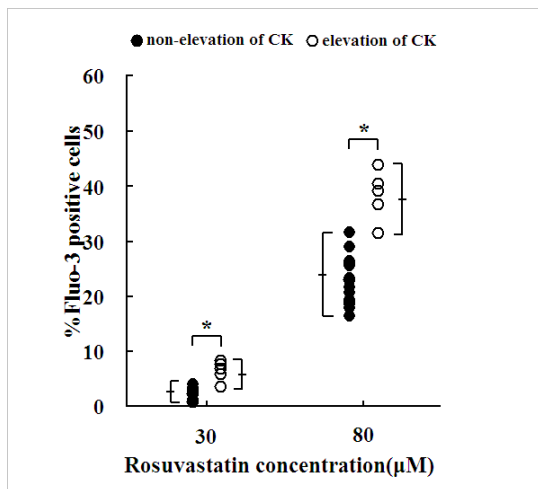


図5 rosuvastatin 服用者で CK 上昇例と非上昇例者の比較

(4)  $Ca^{2+}$  輸送関連遺伝子の解析

細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に影響を与える可能性のある遺伝子として RyR1, CPTII, VLCAD, OATP-C, MDR1, MRP2, CYP3A4 などが知られている。上記測定法にて rosuvastatin 服用者で CK 上昇例の 12 症例で direct sequence による遺伝子解析を行った。

①RyR1 遺伝子

図6のような変異が発見され、このほかにも

7581C>T 変異が認められた症例があったが、silent mutation (proline) であった。

Exon 34		4960 4970 4980 4990 5000															
RyR1 H	CTGTGGAGC	GCCTGGACCT	GCAGGCTTC	CACTGGACA	CCCTG	SCT											
No.1 F	CTGTGGAGC	GCCTGGACCT	GCAGGCTTC	CACTGGACA	CCCTG	SCT											
No.1 R	CTGTGGAGC	GCCTGGACCT	GCAGGCTTC	CACTGGACA	CCCTG	SCT											
RyR1	4996	CGC	CTC	TAC	CGC	GCT	GTG	TGC	GCC	CTG	GCC	AAC	AAT	CGC	GTG	GCG	5040
	1666	Arg	Leu	Tyr	Arg	Ala	Val	Cys	Ala	Leu	Gly	Asn	Asn	Arg	Val	Ala	1680
Case	4996	TCC	CTC	TAC	CGC	GCT	GTG	TGC	GCC	CTG	GCC	AAC	AAT	CGC	GTG	GCG	5040
	1666	Cys	Leu	Tyr	Arg	Ala	Val	Cys	Ala	Leu	Gly	Asn	Asn	Arg	Val	Ala	1680

図6 RyR1 遺伝子 Exon34 の point mutation

②CPTII (carnitine palmitoyltransferase II) 遺伝子

血中 CK の上昇例あるいは筋肉症状を発現した症例で、かつカルシウム濃度変化の大きかった 18 例について CPTII 遺伝子の Exon 2, 3, 4, 5 の 4 つの部位 (図7) における変異を direct sequence にて検討した。その結果、増幅可能だった Exon4 の 13 例中 2 例に c. 1102G>A (p. Val368Ile) の変異が見出された。一方、変異 Exon3 および Exon5 については異常が認められなかったが、Exon2 について 18 例すべて c. 147G>C (p. Leu49Leu) であり、全例が silent mutation とは考えにくい。

Exon2 Exon3 Exon4 Exon5

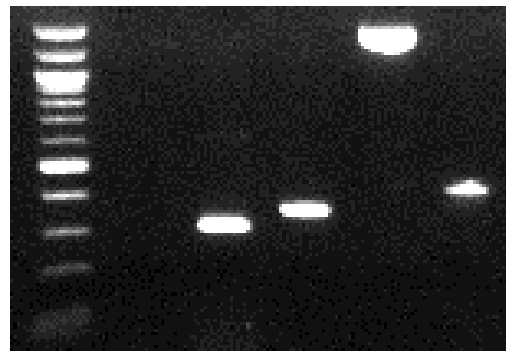


図7 CPTII Exon 2, 3, 4, 5 の PCR

既知の報告とは異なっており、これについてはさらに検討を進める必要がある。

(5) まとめ

基礎的検討の結果、スタチン系薬剤のうちロスバスタチンが最もカルシウム濃度変化が大きかった。本薬剤を服用した患者のなかで、血中 CK の上昇例あるいは筋肉症状を発現した症例で遺伝子解析を行った。今回は RyR1 および CPTII 遺伝子のみ検討し、他の細胞内カルシウム濃度に影響を与える可能性のある他の遺伝子については未解析である。しかし本研究の FCM method によるリンパ球内カルシウム濃度変化の測定はこれらカルシウム

ム輸送関連遺伝子変異による異常すべてを包括的に評価している可能性がある。さらにスタチン服用前の筋障害副作用発現の予知検査として有用である可能性が示唆された。

#### 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 10 件)

- ① Resveratrol reverses remodeling in hearts with large, old myocardial infarctions through enhanced autophagy-activating AMP kinase pathway.  
Kanamori H, Takemura G, Goto K, Tsujimoto A, Ogino A, Takeyama G, Kawaguchi T, Watanabe T, Morishita K, Kawasaki M, Mikami A, Fujiwara T, Fujiwara H, Seishima M, Minatoguchi S. *Am J Pathol* 2013;182:701-13. doi:10.1016/j.ajpath.2012.11.009. (査読有)
- ② L-tryptophan-mediated enhancement of susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease is dependent on the mammalian target of rapamycin.  
Osawa Y, Kanamori H, Seki E, Hoshi M, Ohtaki H, Yasuda Y, Ito H, Suetsugu A, Nagaki M, Moriwaki H, Saito K, Seishima M. *J Biol Chem* 2011;286:34800-8. doi. 10.1074/jbc.M111.235473. (査読有)
- ③ Acid sphingomyelinase regulates glucose and lipid metabolism in hepatocytes through AKT activation and AMP-activated protein kinase suppression.  
Osawa Y, Seki E, Kodama Y, Suetsugu A, Miura K, Adachi M, Ito H, Shiratori Y, Banno Y, Olefsky JM, Nagaki M, Moriwaki H, Brenner DA, Seishima M. *FASEB J* 2011;25:1133-44. doi. 10.1096/fj.10-168351. (査読有)
- ④ Comparison of chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) with ELISA for the determination of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies.  
Tanaka R, Takemura M, Sato M, Yamada Y, Nakagawa T, Horibe T, Hoshi M, Ohtaki H, Ito H, Seishima M, Shimizu K. *Clin Chim Acta* 2010;411:22-5. doi. 10.1016/j.cca.2009.09.032. (査読有)
- ⑤ Statin-induced Ca<sup>2+</sup> release was increased in B lymphocytes in patients who showed elevated serum creatine kinase during statin treatment.

Hattori T, Saito K, Takemura M, Ito H, Ohta H, Wada H, Sei Y, Kawamura M, Seishima M. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16:870-7.

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jat> (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

- ①脂質異常症の治療～動脈硬化予防の戦略として～ 清島 満  
第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 (招待講演) 京都市 2012. 11. 29-12. 2
- ②検査情報を生かすための病態情報解析医学に学ぶ. 清島 満  
第 4 回日本臨床一般検査学会学術集会 (招待講演) 岐阜市 2012. 10. 27
- ③Is the measurement of Ca<sup>2+</sup>-release in CD19+ B cells stimulated by statin useful for prediction of muscle damage as a side effect?  
Mori I, Hattori T, Osawa Y, Kanamori H, Kajita K, Morita H, Ishizuka T, Saito K, Ito H, Seishima M  
第 44 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 福岡市 2012. 7. 19-20.
- ④Ca<sup>2+</sup> releasing effect of stains on human CD19+primary B cells.  
Hattori T, Saito K, Takemura M, Ito H, Ohta H, Wada H, Sei Y, Kawamura M, Seishima M.  
第 42 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 岐阜市 2010. 6. 15.
- ⑤Inhibition of acid sphingomyelinase causes hepatic glucose intolerance and insulin resistance.  
Osawa Y, Ito H, Suetsugu A, Nagaki M, Moriwaki H, Seishima M.  
DDW 2010 New Orleans, USA 2010. 5. 3.
- ⑥高脂血症治療剤による培養細胞に対する Ca<sup>2+</sup>放出効果の基礎的検討.  
服部高幸、竹村正男、太田浩敏、大澤陽介、金森寛充、伊藤弘康、斎藤邦明、清島 満  
第 49 回日本臨床検査医学会東海・北陸支部総会 第 320 回日本臨床化学会東海・北陸支部例会 連合大会 名古屋 2010. 3. 14.

[図書] (計 2 件)

- ①脂質・リポ蛋白  
清島 満  
標準臨床検査医学 (高木 康・山田康幸編) p163-177, 医学書院, 東京, 2012.
- ②臨床検査  
清島 満  
病理学入門 (内藤通孝編) p52-66, 昭和堂, 京都, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~labmed/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清島 満 (SEISHIMA MITSURU)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：10171315

### (2) 研究分担者

伊藤 弘康 (ITO HIROYASU)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：80373075  
(H21 年度)

大澤 陽介 (OSAWA YOUSUKE)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：60447787

森 一郎 (MORI ICHIRO)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：40444327  
(H22 年度～)

金森 寛充 (KANAMORI HIROMITSU)  
岐阜大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：20456502

斎藤 邦明 (SAITO KUNIAKI)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号：80262765

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：