

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790607

研究課題名(和文)腎不全患者で頻発する薬剤性横紋筋融解症の発症機構の解明と薬物適正使用法の確立

研究課題名(英文) Mechanism identification of drug-induced rhabdomyolysis in patients with end-stage kidney disease and promotion of proper drug use

研究代表者

辻本 雅之(Tsujimoto, Masayuki)

京都薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90372739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、末期腎不全患者において生じる薬剤性横紋筋融解症の発症機構の解明を目指した。本研究成果により、末期腎不全患者の体内に蓄積した尿毒症物質が、様々な薬剤の解毒に関与する酵素(チトクロームP450)の機能低下を引き起こすことを明らかにした。また、尿毒症物質は、横紋筋融解症を引き起こすスタチン系高脂血症治療薬の横紋筋毒性を増強すること、この増強にメバロン酸及びゲラニルゲラニルピロリン酸の欠乏が関与していることを明らかにした。以上のことから、末期腎不全患者において生じやすいスタチンによる横紋筋融解症の回避には、メバロン酸及びゲラニルゲラニルピロリン酸の補充が有益であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective in this study is to elucidate mechanism of drug-induced rhabdomyolysis in patients with end-stage kidney disease. In this study, we showed that uremic toxins, accumulated in patients with end-stage kidney disease, induce the functional decrease of metabolic enzyme (Cytochrome P450) with many drugs. In addition, we showed that uremic toxins increase drug-induced rhabdomyolysis by lipid-lowering agent (statins), and the increase results from the decrease in mevalonate and geranylgeranyl pyrophosphate. These results suggest that addition of mevalonate and geranylgeranyl pyrophosphate is useful for avoidance of statin-induced rhabdomyolysis in patients with end-stage kidney disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：応用薬理学

キーワード：末期腎不全 尿毒症物質 横紋筋融解症 スタチン

1. 研究開始当初の背景

腎機能の廃絶した末期腎不全患者においては、本邦において増加の一途をたどっており、毎年4万人以上の患者が合併症により亡くなっている。腎不全患者は、貧血、血圧異常、心血管障害及び神経障害など様々な合併症が認められ、腎からの薬物消失が遅延しているため、よりの確な投与設計が求められている。

腎不全患者では、HMG-CoA 還元酵素阻害薬(スタチン系薬剤)及びフィブラート系高脂血症治療薬(フィブラート系薬剤)による横紋筋融解症や、アシクロビル及びバラシクロビルによるアシクロビル脳症のような重篤な有害事象が生じやすい。

腎不全患者では、3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロパン酸(CMPF)、インドキシル硫酸、インドール酢酸及び馬尿酸などの尿毒症物質が高濃度で蓄積している。すでに、インドキシル硫酸は、腎障害促進因子の一つとして知られており、インドキシル硫酸が臓器障害性を有することは周知の事実である。

腎機能の廃絶している腎不全患者の合併症治療には、肝消失型薬物が頻用されるが、腎不全患者においては肝消失型薬物の体内動態も変動することが知られつつある。例えば、腎不全患者において、肝消失型薬物ロサルタンの消失が遅延していることが知られている。このメカニズムの一つとして研究代表者らは、インドキシル硫酸などの尿毒症物質が、ロサルタン代謝を阻害することを報告している(Tsujimoto *et al.*, J Pharm Pharmacol, 2010)。また同様に、プラバスタチンの腎外クリアランスが、腎不全患者において低下していることも知られている。このメカニズムとして、腎不全患者血清中の成分が消化管に発現する多剤耐性関連蛋白質(MRP)2の発現抑制を引き起こすことを報告している(Tsujimoto *et al.*, Ther Apher Dial, 2012)。さらに、腎排泄型薬物であるジゴキシンの腎外クリアランスも透析患者において顕著に低下していることが知られており、このメカニズムとして研究代表者らは、CMPFなどの尿毒症物質が、ジゴキシンの肝取り込みを阻害することを示している(Tsujimoto *et al.*, Ther Drug Monit 30: 576-582, 2008)。

以上のように研究代表者らは、腎不全患者において、様々な薬物の腎クリアランスだけでなく腎外クリアランスも低下しているメカニズムについて解明してきており、腎不全患者において生じる重篤な有害事象の原因の一つとして薬物血中濃度の上昇が考えられる。しかしながら、血中濃度の上昇が認められない腎不全患者においても、スタチン及びフィブラート系薬剤による横紋筋融解症やアシクロビル等によるアシクロビル脳症などの重篤な有害事象が生じることもしばしばであり、単に血中濃度の上昇のみでは全ての現象は説明できないことも事実である。

それゆえに、組織における薬剤感受性の増大(薬剤の毒性増大や分布の増大を想定)もまた、腎不全患者において発現する重篤な有害事象発現に關与していると考えられる。

以上のような尿毒症物質の影響は、肝臓や消化管など吸収・代謝・排泄過程に關与する酵素及びトランスポーターの発現量や機能への影響に留まらず、横紋筋細胞をはじめとする他の様々な組織、すなわち分布過程においても生じていることは十分考えられる。

2. 研究の目的

末期腎不全患者において、スタチン系薬剤による横紋筋毒性の頻度が高まる原因について明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 末期腎不全患者における薬物代謝酵素の機能低下の可能性

CYP1A2 活性、CYP2D6 活性及び CYP3A4 活性は、ヒト肝ミクロソームにおける、それぞれフェナセチンの O-脱エチル化反応、メトプロロールの O-脱メチル化反応、及びテストステロンの 6β-水酸化反応により評価した。それぞれの代謝物であるアセトアミノフェン、O-脱メチル化メトプロロール及び 6β-水酸化テストステロンは、HPLC-UV 法により定量した。健常者血清及び末期腎不全患者血清は、いずれもプール血清とし、5 倍量のメタノールにより除タンパクしたものを実験に用いた。尿毒症物質は、馬尿酸、インドール酢酸、CMPF、インドキシル硫酸、キサランチン誘導体として、キサランチン、尿酸及びアラントインを選択した。

また、細胞内の CYP3A4 活性の評価には、プレグナン X 受容体及びビタミン D 受容体(VDR)を発現するヒト結腸癌由来 LS180 細胞を用いた。尿毒症物質および血清については、上述した阻害実験に用いたものと同様のものを用いた。CYP3A4 機能は P450-GloTM assay により測定した。また、CYP3A4、多剤耐性タンパク質(MDR)1 及び CYP24A1 mRNA 発現量は、リアルタイム RT-PCR 法により測定した。血清中の活性型ビタミン D3(VD3)は、1,25-(OH)2-Vitamin D ELISA Kit を用いて測定した。

(2) 尿毒症物質による横紋筋毒性の増強の可能性について

実験には、10% FBS 含有 D-MEM で3日間培養後、1% FBS 含有 D-MEM で7日間分化させた RD 細胞を用いた。使用薬物として、スタチン系薬物であるプラバスタチン及びシンバスタチン並びに白金系抗がん剤であるシスプラチンを、尿毒症物質として CMPF、馬尿酸、インドール-3-酢酸及び 3-インドキシ

ル硫酸を選択した。メバロン酸経路関連物質として、メバロン酸、ファルネシルピロリン酸の前駆物質であるファルネソール、ゲラニルゲラニルピロリン酸の前駆物質であるゲラニルゲラニオール、スクアレン、補酵素Q10及びドリコールを用いた。細胞毒性は、スタチンまたはシスプラチン処置3日後に、CellQuanti-Blue™ Cell Viability Kitを用いた細胞生存率測定実験により評価した。アポトーシス誘導については、アネキシン V-FITC 溶液 (Annexin V) 及びヨウ化プロピジウム溶液 (PI) を用いて二重染色し、Annexin V 陽性かつ PI 陰性細胞集団をアポトーシス陽性細胞群としてフローサイトメトリーを用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 末期腎不全患者における薬物代謝酵素の機能低下の可能性

著者らは、末期腎不全患者血清中には、CYP2D6を阻害する物質は存在せず(図1)、CYP1A2を阻害する物質が蓄積していることを明らかにした(図2)。また、その阻害には、末期腎不全患者において蓄積するキサンチン誘導体が一部関与している可能性を示した(図3)。

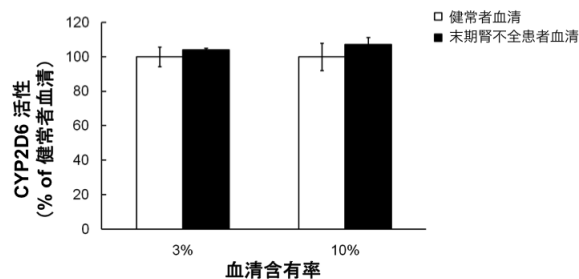


図1 CYP2D6活性に及ぼす末期腎不全患者血清の影響

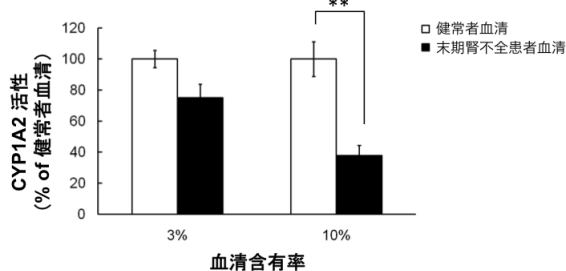


図2 CYP1A2活性に及ぼす末期腎不全患者血清の影響

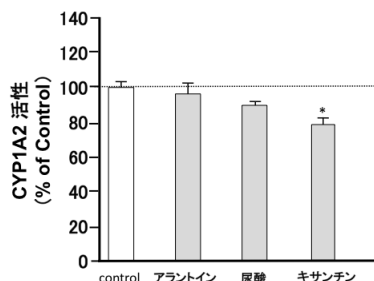


図3 CYP1A2活性に及ぼすキサンチン誘導体の影響

一方で、末期腎不全患者血清中には、直接CYP3A4を阻害する物質は、ほとんど存在しないことを示している(図4)。しかしながら、末期腎不全患者では、CYP3A4 mRNAの発現を制御するVDRの基質である活性型ビタミンD3が顕著に低下していること、VDRの活性化を尿毒症物質が阻害する可能性を示した(図5及び6)。

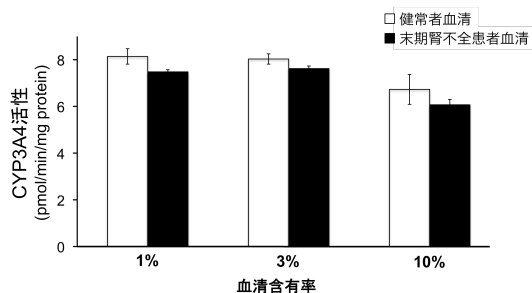


図4 CYP3A4活性に及ぼす末期腎不全患者血清の影響

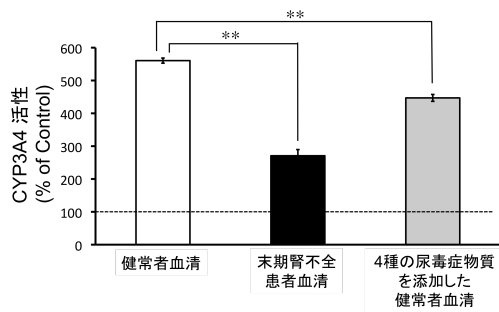


図5 LS180細胞におけるCYP3A4活性に及ぼす末期腎不全患者血清前処置の影響

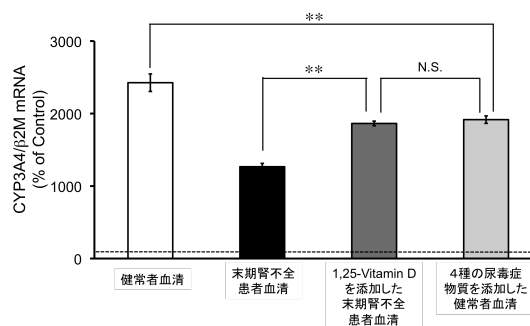


図6 CYP3A4 mRNAに及ぼす末期腎不全患者血清、1, 25-Vitamin D、および尿毒症物質の影響

よって、末期腎不全患者においては、これらの要因が重なってCYP3A4の発現低下が生じている可能性が考えられる。スタチン系薬剤は、アトラスチンやシンバスタチンなど、CYP3A4で代謝される薬剤も存在する。よって、末期腎不全患者におけるCYP3A4の機能低下が、スタチン類による横紋筋毒性増強に一部関与している可能性が考えられた。

(2) 尿毒症物質による横紋筋毒性の増強の可能性について

4種の尿毒症物質(CMPF、インドキシル硫酸、インドール酢酸、馬尿酸)の曝露は、分化型RD細胞におけるCDDPの50%致死濃度(LC50値)に有意な影響を及ぼさなかった。しかしながら、スタチン系薬剤であるプラバスタチン及びシンバスタチンの50%細胞致死濃度(LC50値)を有意に低下させた(図7)。また、4種の尿毒症物質の処置は、スタチンにより誘導されるアポトーシスを増強させた(図8)。よって、尿毒症物質は、スタチン特異的にアポトーシスを促進させ、横紋筋毒性を増強させることが示唆された。さらに、尿毒症物質による横紋筋毒性は、メバロン酸及びゲラニルゲラニルピロリン酸の負荷により明確に緩和された(図9)。

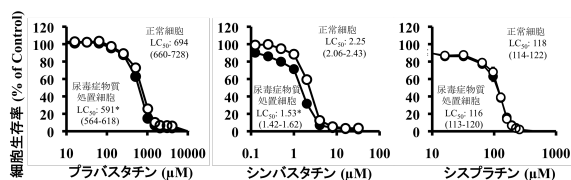


図7 分化型RD細胞におけるプラバスタチン、シンバスタチンおよびシスプラチン毒性に及ぼす尿毒症物質前処置の影響

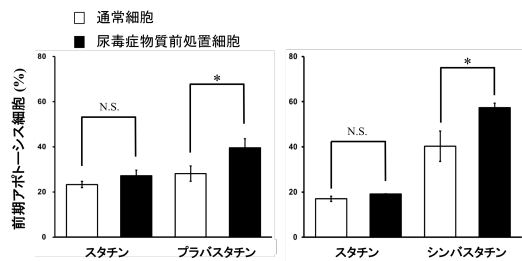


図8 分化型RD細胞におけるプラバスタチン、シンバスタチンによるアポトーシス誘導に及ぼす尿毒症物質前処置の影響

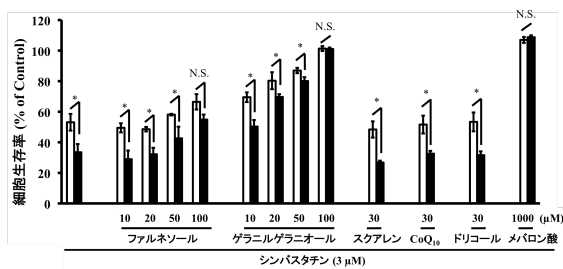


図9 尿毒症物質処置RD細胞におけるスタチンの毒性増強に及ぼすファルネソール、ゲラニルゲラニール、スクアレン、CoQ₁₀、ドリコール及びメバロン酸の影響

以上のことから、尿毒症物質は、スタチンによるメバロン酸経路の阻害を増強し、ゲラニルゲラニルピロリン酸を欠乏させることにより、横紋筋障害を引き起こすことが明らかとなった。

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4件)

- (1) Masayuki Tsujimoto, Sari Sugimoto, Makiko Nagatomo, Taku Furukubo, Satoshi Izumi, Tomoyuki Yamakawa, Tetsuya Minegaki and Kohshi Nishiguchi: Possibility of Decrease in CYP1A2 Function in Patients With End-Stage Renal Disease. *Ther Apher Dial*, 18, 174-180 (2014). (査読あり) doi: 10.1111/1744-9987.12100.
- (2) Masayuki Tsujimoto, Yui Nagano, Satomi Hosoda, Asuka Shiraiishi, Ayaka Miyoshi, Shima Hiraoka, Taku Furukubo, Satoshi Izumi, Tomoyuki Yamakawa, Tetsuya Minegaki and Kohshi Nishiguchi: Effects of Decreased Vitamin D and Accumulated Uremic Toxin on Human CYP3A4 Activity in Patients with End-Stage Renal Disease. *Toxins*, 5, 1475-1485 (2013). (査読あり) doi: 10.3390/toxins5081475.
- (3) Masayuki Tsujimoto, Daisuke Hatozaki, Daisuke Shima, Hitoshi Yokota, Taku Furukubo, Satoshi Izumi, Tomoyuki Yamakawa, Tetsuya Minegaki, Kohshi Nishiguchi: Influence of Serum in Hemodialysis Patients on the Expression of Intestinal and Hepatic Transporters for the Excretion of Pravastatin. *Ther. Apher. Dial.*, 16, 580-587 (2012). (査読あり) doi: 10.1111/j.1744-9987.2012.01100.x.
- (4) 辻本雅之、峯垣哲也、西口工司: 末期腎不全時に腎外クリアランスが変動する薬剤とその要因. *日本腎臓病薬物療法学会誌*, 13-13(2012). (査読あり)

[学会発表](計9件)

- (1) 筒井孝治、辻本雅之、内山仁、島田奈央美、新田彩佳、木村朱季、佐伯崇、結城絵理子、吉田拓弥、和泉智、山川智之、峯垣哲也、立木秀尚、西口工司: 末期腎不全患者血清を長期暴露した横紋筋細胞の作製とその機能評価. *日本薬学会第134年会(熊本)*, 2014.3.28-30.
- (2) 内山仁、辻本雅之、荻野仁未、小田智子、新本唯一、筒井孝治、島田奈央美、新田彩佳、吉田拓弥、和泉智、山川智之、峯垣哲也、立木秀尚、西口工司: ヒト横紋筋モデル細胞を用いたスタチンによる横紋筋障害への尿毒症物質の関与とその増強メカニズムの検討. *日本薬学会第134年会(熊本)*, 2014.3.28-30.
- (3) Masayuki Tsujimoto, Yui Nagano, Satomi Hosoda, Asuka Shiraiishi, Ayaka Miyoshi, Shima Hiraoka, Taku Furukubo, Satoshi

- Izumi, Tomoyuki Yamakawa, Tetsuya Minegaki and Kohshi Nishiguchi. The Influence of Vitamin D and Uremic Toxins on Human CYP3A4 Activity and Expression. Annual Meeting American College of Clinical Pharmacology (Bethesda, MD, U.S.A), 2013.9.22-24.
- (4) 内山 仁、辻本雅之、荻野仁未、小田智子、新本唯一、島田奈央美、筒井孝治、新田彩佳、吉田拓弥、古久保拓、和泉智、山川智之、峯垣哲也、西口工司：ヒト横紋筋モデル細胞における尿毒症物質によるスタチン毒性増強に及ぼすメバロン酸の影響。日本薬学会第 133 年会 (横浜), 2013.3.28-30.
- (5) 小田智子、辻本雅之、荻野仁未、新本唯一、吉田拓弥、古久保拓、和泉智、山川智之、峯垣哲也、西口工司：ヒト横紋筋モデル細胞におけるインドキシル硫酸によるスタチン系薬物の細胞毒性増強メカニズムの解明。第 22 回日本医療薬学会年会 (新潟), 2012.10.27—28.
- (6) 新本唯一、辻本雅之、白石明日香、永野唯、細田さとみ、島田奈央美、筒井孝治、新田彩佳、古久保拓、和泉智、山川智之、峯垣哲也、西口工司：CYP3A4 発現量に及ぼす健常者血清と末期腎不全患者血清との相違性。第 20 回クリニカルファーマシーシンポジウム (福岡), 2012.7.14—15.
- (7) 細田さとみ、辻本雅之、白石明日香、永野唯、島田奈央美、筒井孝治、新田彩佳、古久保拓、和泉智、山川智之、志摩大介、峯垣哲也、西口工司：末期腎不全患者血清による薬物代謝酵素 CYP3A4 の発現低下。日本薬学会第 132 年会 (札幌), 2012.3.28—31.
- (8) 白石明日香、辻本雅之、永野 唯、木村早希、細田さとみ、荻野仁未、小田智子、新本唯一、吉田拓弥、古久保拓、和泉智、山川智之：末期腎不全患者に蓄積する尿毒症物質によるスタチン毒性の増強作用。第 32 回日本臨床薬理学会年会 (浜松), 2011.12.1—3.
- (9) 永野 唯、辻本雅之、白石明日香、木村早希、細田さとみ、荻野仁未、小田智子、新本唯一、古久保拓、和泉 智、山川智之、志摩大介、峯垣哲也、西口工司：末期腎不全患者血清による薬物代謝酵素 CYP3A4 の発現低下。第 5 回日本腎と薬剤研究会学術大会 2011 (小倉), 2011.9.17—18.

〔図書〕(計 0 件)

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻本 雅之 (TSUJIMOTO MASAYUKI)
京都薬科大学・臨床薬学分野・講師
研究者番号：9 0 3 7 2 7 3 9

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：