

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790138

研究課題名(和文)筋MCTの役割に着目した薬剤性筋障害の回避戦略

研究課題名(英文)The strategy to avoid drug-induced skeletal muscle injury involved in monocarboxylate transporter

研究代表者

小林 正紀(KOBAYASHI, Masaki)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70431319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化性疾患の予防および進展を阻止する上で運動および薬物療法は極めて重要である。しかしながら運動刺激は薬剤性の筋障害を増悪させることから、筋障害の回避には本機序の解明が重要である。そこで申請者は運動時に発現が亢進する乳酸輸送担体(MCT)に着目し、薬剤性筋障害との関連を明らかにすることを目的とした。脂質異常症治療薬であるスタチンは、濃度依存的に筋由来細胞の障害を誘導し、MCT4の発現を上昇させた。またMCT4の発現を低下させた場合にスタチン誘導性の細胞障害は軽減されることが明らかとなった。以上の知見からスタチン誘導性の筋障害の一因にMCT4の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although exercise and drug therapy is important to prevent progress of an arteriosclerotic disease, exercise performance leads to increase drug-induced muscle injury. So the elucidation of this mechanism is needed for avoiding muscular disorder. Since exercise performance induced the expression of monocarboxylate transporter (MCT) 4, we focused on the association between MCT4 and HMG-CoA reductase inhibitors such as statins-induced muscle injury. Atorvastatin, one of statins reduced the number of viable cells and caused dramatic morphological changes and caspase-3/7 activation, and induced MCT4 expression levels in RD cell line as a model of in vitro skeletal muscle. Two siRNAs (10 nM) for MCT4 significantly decreased MCT4 expression at 72 h after transfected to RD cells. Atorvastatin-induced RD cell injury was blocked by MCT4 siRNAs transfected to RD cells. These results suggest that the mechanism of statin-induced muscle injury was associated with MCT4 expression.

研究分野：医療系薬学

科研費の分科・細目：医薬品情報・安全性学

キーワード：薬剤性筋障害 乳酸トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患の主要なリスクファクターである脂質異常症が疑われる人は約 4200 万人以上と推定されており、食事・運動・薬物による複合的な治療はさらに増大すると考えられる。なかでも運動療法は骨格筋の糖代謝を活性化させ脂質異常を改善する一方で、解糖系最終産物である乳酸の生成を促進する。乳酸は細胞内 pH 調節因子かつエネルギー源として知られており、この輸送を担う乳酸トランスポーター (MCT) の機能低下はエネルギーバランスの破綻をきたし、筋障害を惹起する。筋障害はミトコンドリアの遺伝子異常など様々な要因により引き起こされるが、その中でも脂質異常症治療の第一選択薬であるスタチンが誘導する重篤な筋障害に横紋筋融解症がある。横紋筋融解症とは、筋細胞膜が崩壊し筋原性酵素などの筋内容成分が循環血中に逸脱する病態である。古くからスタチンの筋障害は運動により悪化することが知られており、用量に依存しないことが報告されているが、現在でもこの機序については諸説があり、運動刺激の強度との関連も不明である。一方で運動時の骨格筋では運動強度に伴い AMP activated protein kinase (AMPK) や protein kinase C (PKC) が活性化し、糖代謝や脂質代謝に関わるタンパク質を遺伝子レベル、機能レベルで制御することが明らかにされている。AMPK は乳酸閾値レベル以上の運動、すなわち乳酸の産生が急上昇するような高い強度の運動による細胞内 ATP の減少により活性化する一方で、PKC は歩行程度の強度が低い運動でも活性化すると考えられている。そこで申請者等はこれらのキナーゼの活性化と MCT 発現変動に着目し検討した結果、AMPK および PKC の活性化が、乳酸産生を亢進し骨格筋における MCT4 発現を変動させることを報告した。このような背景から申請者は運動による薬剤性筋障害増強と MCT4 に何らかの関連があるとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では MCT4 の機能・発現解析ならびに薬剤性筋障害と MCT4 発現との関連を明らかにすることで薬剤性筋障害の回避に展開するための基盤となる研究を行う。

3. 研究の方法

MCT4 の機能解析は MCT4 を一過性に発現させたアフリカツメガエル卵母細胞への RI 標識基質の取り込みを測定することで輸送活性を評価した。MCT4 の発現調節を評価する *in vitro* 骨格筋モデルには、ヒト横紋筋肉腫由来 RD 細胞を使用し、細胞外乳酸量の測定と MCT4 mRNA 量を半定量的 RT-PCR 法により解析することにより評価を行った。薬剤性筋障害と MCT4 発現との関連については RD 細胞への MCT4 siRNA 導入による MCT4 ノックダウン条件下において、スタチンの細胞障害を細胞生存率・アポトーシスの指標であるカスパーゼ活性を測定することにより評価した。

4. 研究成果

スタチンによる筋障害は心筋では起こらず、また MCT4 は心筋における発現が少ないことから MCT4 はスタチン由来筋障害の重要な因子である可能性が示唆されている。そこで MCT4 に着目し、輸送機構を検証した (図 1)。

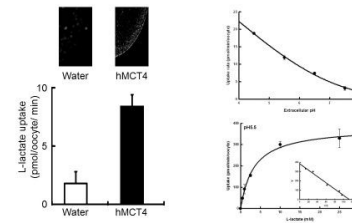


図1. MCT4発現株を用いた機能解析

MCT4 の cRNA を注入した卵母細胞における発現を免疫染色により確認したところ、膜上に MCT4 の発現が確認された。さらにこれら発現株を用いて乳酸取り込みを検証したところ顕著な取り込み活性の増大が認められた。またこの輸送は明確な pH 依存性を示し、さらに高濃度で飽和性を示した (図 1)。このことから筋細胞からの乳酸排出に寄与することが長年示唆されていた MCT4 は、低親和性の乳酸輸送担体であることを見出した。次に MCT4 の発現調節を明らかにすべく運動時に活性化する PKC が RD 細胞の乳酸量に及ぼす影響を検証するとともに PKC 活性化によって発現が誘導される MCT4 発現の調節因子の検討を行った (図 2)。

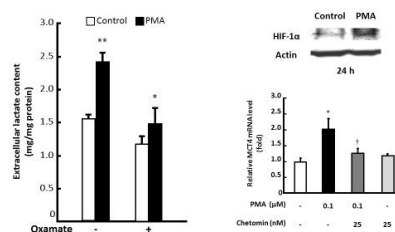


図2. PKC活性化による乳酸産生(左)とMCT4誘導に対するHIF-1の関与(右)

PKC 活性化剤である PMA 処理により細胞外乳酸量は有意に増大した。さらに乳酸産生に関わる乳酸脱水素酵素の阻害剤の oxamate を併用することにより PMA による細胞外乳酸量の増大は抑制された (図 2)。したがって PKC 活性化は乳酸産生を増大させることが示唆された。

Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) は低酸素条件下において機能する転写因子で、その機能は多岐にわたる。HIF-1 は標的遺伝子のプロモーター部位に存在する HIF-1 response element (HRE) に結合することでその下流の遺伝子の転写を制御している。MCT4 のプロモーター部位には HRE が存在することが報告されていることから制御に HIF-1 が関わっている可能性が考えられる。そこで、PMA 処理が HIF-1 の機能調節を担うサブユニットである HIF-1 に及ぼす影響を検討することとした。PMA が HIF-1 タンパク質発現

量に及ぼす影響を評価したところ、HIF-1タンパク質発現量が増大することが確認された(図2)。そこでHIF-1阻害剤であるchetominがPMAによるMCT4発現増大に与える影響を検討した。その結果、PMA添加24時間後におけるMCT4 mRNA量の増大はchetominの併用により完全に抑制された。以上のことから、PKC活性化時にHIF-1を介してMCT4発現が増大することが明らかとなった。次にMCT4発現と脂質異常症治療薬であるスタチンによる筋障害との関連を明らかにすべく検討を行った。まずスタチン処理によるRD細胞のMCT4発現への影響を解析したところ、運動時に発現上昇が認められるMCT4の発現はスタチン濃度依存的に変動することを見出した(データは示さない)。そこで発現変動が認められたMCT4に着目し、MCT4 siRNAを用いてMCT4のノックダウンを試みた(図3)。

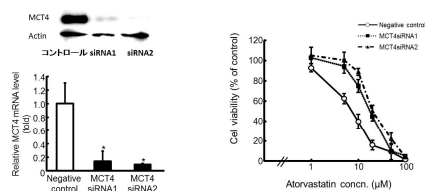


図3. MCT4 siRNA処理後のMCT4発現量とスタチンによる細胞障害性

その結果、MCT4 siRNA トランスフェクション後72時間後に顕著なMCT4発現量の低下が認められた(図3)。そこで本条件下におけるスタチンの筋障害を評価したところ、MCT4をノックダウンすることによりスタチン誘導性の筋細胞生存率の低下は軽減されることが明らかになった(図3)。以上の知見からスタチン誘導性の筋障害の一因にMCT4が関与していることが示唆された。

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 3件)

1. Kobayashi M, Hidaka K, Chisaki I, Takahashi N, Ogura J, Itagaki S, Hirano T, Yamaguchi H, Iseki K. Effects of acidification and alkalization agent on statins-induced muscle toxicity. *Yakugaku Zasshi*. 132(5) 609-615. 2012 査読有 DOI:http://dx.doi.org/10.1248/yakushi.132.609
2. Sasaki S, Kobayashi M, Futagi Y, Ogura J, Yamaguchi H, Takahashi N, Iseki K. Crucial residue involved in L-lactate recognition by human monocarboxylate transporter 4 (hMCT4). *PLOS ONE*. 8, e67690. 2013 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0067690.
3. Otake S, Kobayashi M, Narumi K, Sasaki S,

Kikutani Y, Furugen A, Watanabe M, Takahashi N, Ogura J, Yamaguchi H, Iseki K. Regulation of the expression and activity of glucose and lactic acid metabolism-related genes by protein kinase C (PKC) in skeletal muscle cells.

Biol Pharm Bull. 36, 1435-9. 2013 査読有 DOI:http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b13-00141

〔学会発表〕(計 2件)

1. Kobayashi M, Narumi K, Furugen A, Sasaki S, Iseki K. Regulation of human monocarboxylate transporter 4 in skeletal muscle cells: the role of AMPactivated protein kinase and protein kinase C. AAPS Annual Meeting and Exposition. 2012年10月14日~10月18日、Chicago
2. 小林正紀, 鳴海克哉, 大竹翔, 佐々木将太郎, 井関健. モノカルボン酸輸送担体hMCT4の発現調節機構. 第8回トランスポーター研究会. 2013年6月15日~6月16日、熊本

〔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 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 なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者 なし
()

研究者番号：