

スタチン系薬物由来横紋筋融解症の発症機序ならびに 発症リスク軽減に関する研究

学位論文内容の要旨

HMG-CoA 還元酵素はコレステロール生合成経路の HMG-CoA からメバロン酸を生成する過程を触媒する重要な酵素である。HMG-CoA 還元酵素阻害薬(スタチン系薬物)は本酵素を拮抗的に阻害し、血中コレステロール値を強力に低下させるため、高脂血症治療薬として広く使用されている。しかしながらスタチン系薬物の重篤な副作用として横紋筋融解症がある。横紋筋融解症とは骨格筋細胞の融解、壊死により筋体成分が血中へ流出した疾患であり、死に至ることもある。現在までスタチン系薬物による筋障害機序に関して種々検討は行われているものの発症機序は不明であり、スタチン系薬物間での筋障害程度を比較した報告も少ないのが現状である。そこで本研究ではこれまで市販されているすべてのスタチン系薬物が骨格筋由来細胞である RD (ヒト由来) ならびに L6 (ラット由来) に与える影響を明らかにし、薬物間の筋細胞障害性を比較することでスタチン系薬物による筋障害機序の解明を試みた。またこれらの知見をもとにスタチン系薬物の筋障害発症リスク軽減方法を構築し、*in vitro* ならびに *in vivo* においてその効果を評価した。

(1) スタチン系薬物による骨格筋細胞障害性

スタチン系薬物がヒト骨格筋由来 RD 細胞生存率に与える影響を検討した。その結果、全てのスタチン系薬物で、濃度依存的に RD 細胞生存率が低下することが示された。その強さは、セリバスタチン > シンバスタチン > フルバスタチン > アトルバスタチン > ロバスタチン > ピタバスタチン >> プラバスタチン、ロスバスタチンの順であった。またスタチン系薬物それぞれの IC₅₀ 値と薬物の分配係数 (P_{o/w}) には良好な相関が認められた。さらに、脂溶性の高いスタチン系薬物曝露によりアポトーシスの特徴である細胞の球状化と有意なカスパーゼ-3/7 の活性化が認められた。したがってスタチン系薬物による骨格筋細胞障害性にカスパーゼ-3/7 の活性化を伴うアポトーシスの関与が明らかとなった。またこれらの薬物の RD 細胞内蓄積量を測定した結果、筋細胞内薬物蓄積量もまた脂溶性の高さに依存することが示された。これらのことからス

タチン系薬物の骨格筋細胞障害性は筋細胞内蓄積量に依存することが考えられる。

(2) スタチン系薬物による筋障害機序

次に最も障害性の高かったセリバスタチンを用いて筋障害機序の検討を行った。セリバスタチン曝露によりミトコンドリアを介したアポトーシス経路において活性上昇が認められるカスパーゼ-9 が上昇していることが明らかとなった。さらにカスパーゼ-9 阻害剤を共存させるとその活性化は抑制されることが示された。またミトコンドリア経路を介したアポトーシス誘因刺激の一つに乳酸蓄積を伴う細胞内の酸性化が知られていることから、次にセリバスタチン曝露時の乳酸蓄積ならびに細胞内 pH 変動について検討を行った。薬物曝露時の細胞内乳酸量は有意に上昇し、さらに骨格筋細胞内 pH は薬物濃度依存的に低下した。そこで乳酸蓄積の原因を探るため、乳酸を筋細胞内から排出する役割を担う monocarboxylate transporter (MCT)4 に着目した。MCT4 の単一強制発現系を用いて乳酸輸送に対するスタチン系薬物の影響を検討したところ、毒性の高いスタチン系薬物により MCT4 の機能は阻害を受けることが確認された。したがって、筋細胞からの MCT4 を介した乳酸排出をスタチン系薬物が阻害することが細胞内を酸性化する一因となっている可能性が示された。

(3) スタチン系薬物による筋障害発症リスク軽減方法

スタチン系薬物による筋障害機序には細胞内酸性化を伴うアポトーシスの関与が明らかとなった。そこで乳酸アシドーシスの治療薬であり、細胞内 pH をアルカリ化する炭酸水素ナトリウムを併用することで筋障害を抑制できるのではないかと考えた。そこで炭酸水素ナトリウムがスタチン系薬物による RD 細胞の障害に与える影響について検討を行った。その結果、炭酸水素ナトリウムはセリバスタチンによる細胞の球状化、細胞内酸性化ならびにカスパーゼ-3/7 活性の上昇に対して抑制効果を示すことが明らかとなった。また L6 細胞においても同様の結果が得られた。次にこの炭酸水素ナトリウムの筋障害抑制効果が *in vivo* においても確認できるか否かを明らかにするため、セリバスタチンを用いて横紋筋融解症モデルラットの作成を試みた。筋障害の評価としては、実際の臨床現場においても横紋筋融解症の指標とされている血中クレアチンホスホキナーゼ (CPK) 活性測定によって行った。セリバスタチンをラットに静脈注射後、2 時間まで濃度依存的に血中 CPK 値の上昇が認められた。そこでこの *in vivo* モデルを用いて炭酸水素ナトリウムの効果を検証した。その結果、セリバスタチンと炭酸水素ナトリウムを同時に投与することにより、セリバスタチンによる CPK 上昇は濃度依存的に抑制されることが示された。従って *in vitro* および *in vivo* における検討から炭酸水素ナトリウムを併用することによりスタチン系薬物の筋障害は抑制されることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	井 関	健
副査	教授	加 茂	直 樹
副査	准教授	宮 内	正 二
副査	准教授	菅 原	満
副査	講 師	平 野	剛

学 位 論 文 題 名

スタチン系薬物由来横紋筋融解症の発症機序ならびに 発症リスク軽減に関する研究

HMG-CoA 還元酵素はコレステロール生合成経路の HMG-CoA からメバロン酸を生成する過程を触媒する重要な酵素である。HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン系薬物）は本酵素を拮抗的に阻害し、血中コレステロール値を強力に低下させるため、高脂血症治療薬として幅広く使用されている。しかしながらスタチン系薬物の重篤な副作用として横紋筋融解症がある。横紋筋融解症とは骨格筋細胞の融解、壊死により筋体成分が血中へ流出した疾患であり、死に至ることもある。現在までスタチン系薬物による筋障害に関して種々検討は行われているものの発症機序は不明であり、スタチン系薬物間での筋障害程度を比較した報告も少ないのが現状である。そこで本研究ではこれまで市販されているすべてのスタチン系薬物が骨格筋由来細胞である RD（ヒト由来）および L6（ラット由来）に与える影響を明らかにし、薬物間の筋細胞障害性を比較することでスタチン系薬物による筋障害機序の解明を試みた。またこれらの知見をもとにスタチン系薬物の筋障害発症リスク軽減方法を構築し、*in vitro* および *in vivo* においてその効果を評価した。

(1) スタチン系薬物による骨格筋細胞障害性

スタチン系薬物による筋障害性については種々検討されているものの、同一評価系ですべてのスタチン系薬物の細胞障害性を検討し、それらを直接比較した例は少ない。そこですべてのスタチン系薬物を用いて筋細胞に与える影響を詳細に検討した。スタチン系薬物の骨格筋細胞障害性には、細胞の縮小化およびカスパーゼ-3/7 の活性化を伴うアポトーシスの関与が示された。またスタチン系薬物によるアポトーシス発生の強さはセリバスタチン > シンバスタチン > フルバスタチン > アトルバスタチン > ロバスタチン > ビタバスタチン >> プラバスタチン, ロスバスタチンの順であり、薬物の分配

係数と高い相関性を示したことから脂溶性の高い薬物ほど障害性が強いことが示された。さらにその障害性は、薬物の筋細胞内蓄積量に依存していることも明らかにした。一方、スタチン系薬物のコレステロール低下率の優劣と脂溶性および筋障害性の強弱は相関しなかった。

(2) スタチン系薬物による筋障害機序

次に最も障害性の高かったセリバスタチンを用いて筋障害機序の検討を行った。セリバスタチン曝露によりミトコンドリアを介したアポトーシス経路において活性上昇が認められるカスパーゼ-9 が上昇していることが明らかとなった。さらにカスパーゼ-9 阻害剤を共存させるとその活性化は抑制されることが示された。またミトコンドリア経路を介したアポトーシス誘因刺激の一つに乳酸蓄積を伴う細胞内の酸性化が知られていることから、次にセリバスタチン曝露時の乳酸蓄積ならびに細胞内 pH 変動について検討を行った。薬物曝露時の細胞内乳酸量は有意に上昇し、さらに骨格筋細胞内 pH は薬物濃度依存的に低下した。そこで乳酸蓄積の原因を探るため、乳酸を筋細胞内から排出する役割を担う monocarboxylate transporter (MCT)4 に着目した。MCT4 の単一強制発現系を用いて乳酸輸送に対するスタチン系薬物の影響を検討したところ、毒性の高いスタチン系薬物により MCT4 の機能は阻害を受けることが確認された。したがって、スタチン系薬物が筋細胞からの MCT4 を介した乳酸排出を阻害することにより、乳酸蓄積および細胞内酸性化を引き起こしている可能性が示された。

(3) スタチン系薬物による筋障害発症リスク軽減方法

スタチン系薬物による筋障害機序には細胞内酸性化を伴うアポトーシスの関与が明らかとなった。そこで乳酸アシドーシスの治療薬であり、細胞内 pH をアルカリ化する炭酸水素ナトリウムあるいはクエン酸を併用することで筋障害を抑制できるのではないかと考えた。臨床現場で用いられているアルカリ化剤である炭酸水素ナトリウムあるいはクエン酸を併用することにより、セリバスタチンによる細胞の球状化、細胞内酸性化ならびにカスパーゼ 3/7 活性の上昇は、抑制されることが明らかとなった。一方でこれらアルカリ化剤はスタチン系薬物の主作用であるコレステロール低下効果には影響を与えないことも明らかとなった。また *in vivo* において実際の臨床現場でも横紋筋融解症の指標とされている血中クレアチンホスホキナーゼ (CPK) 活性を測定することで、スタチン系薬物による筋障害に対する炭酸水素ナトリウムあるいはクエン酸の効果を評価した。その結果、セリバスタチンと炭酸水素ナトリウムあるいはクエン酸を同時に投与することにより、セリバスタチンが誘導する CPK 上昇は濃度依存的に抑制されることが示された。

以上、スタチン系薬物による横紋筋融解症の発症機序ならびに発症リスク軽減方法を明らかにした。本研究によりスタチン系薬物のコレステロール低下率の優劣と筋障害性の強弱は相関しないことが示されたことから、長期間服用することが多いスタチン系薬物の副作用発現抑制を考慮した治療スケジュールを考案する上で、本知見は有益なものとなり得る。またスタチン系薬物の主作用に対しては影響を与えず、副作用のみを軽減する方法を確立したことから、スタチン系薬物の安全使用に関して重要な知見となることが期待さ

れる。以上の点で本論文『スタチン系薬物由来横紋筋融解症の発症機序ならびに発症リスク軽減に関する研究』に含まれる研究成果は優れており、博士（薬学）の学位を受けるに十分値するものと認めた。