

薬物誘発性骨格筋障害の新規バイオマーカー探索に
関する研究

Biomarker exploration for drug-induced
skeletal muscle disorders

2019年 2月

麻布大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程

獣医薬理学

DV1502 大林 久佐邦

要旨

薬剤の副作用の一つである骨格筋毒性は、軽度の筋肉痛から横紋筋融解症まで幅広くみられる。横紋筋融解症は生命に関わる可能性があることから、臨床あるいは医薬品開発の観点からも骨格筋毒性の早期検出が重要である。クレアチンキナーゼ（CK）とアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）は、骨格筋障害マーカーとして従来から広く用いられているが、CK および AST は溶血でも上昇する他、スタチンである atorvastatin では投与後に骨格筋機能に対する有害事象あるいは筋肉痛の発生頻度と関連しない CK 上昇が発生する等、感度および特異性の低さが指摘されており、CK より感度および特異性の優れた新たな骨格筋障害マーカーが期待されている。Skeletal muscle troponin I (sTnI)、myosin light chain 3 (MyI3)、および fatty acid-binding protein 3 (FABP3) は新規骨格筋障害マーカーとして CK と併せて使用することが推奨されているが、血中からの消失の早さや測定値が腎機能の影響を受けるといった欠点が報告されている。本研究では、薬剤あるいは化学物質で骨格筋障害を誘発したラットの骨格筋および血漿のメタボロミクス解析を行い、従来の骨格筋障害バイオマーカーより高感度のマーカーを見出し、その有用性を評価することを目的とした。

第1章 メタボロミクス解析を用いた薬物誘発骨格筋障害の新規バイオマーカーの探索

本章では、骨格筋障害の新たなバイオマーカー候補を見出すことを目的に、セリバスタ

チン (CER) あるいは tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) を投与して骨格筋障害を誘発したラットを用いてメタボロミクス解析を行った。CER (0 あるいは 40 ppm、混餌投与) あるいは TMPD (0 あるいは 9 mg/kg、単回経口投与) を 9 週齢の雄性 Fischer 344 (F344) ラットに投与して骨格筋障害を誘発し、血漿 CK 測定および骨格筋の病理組織学的解析により骨格筋毒性を評価するとともに、骨格筋 (大腿直筋) および血漿について、内因性代謝物を網羅的に測定するメタボロミクス解析を行い、CER 群および TMPD 群の骨格筋および血漿中で共通して増加した代謝物を調べた。CER 群の血漿 CK は Day 11 に顕著に上昇したが、TMPD 群の血漿 CK は投与 24 時間後に有意に低下した。病理組織学的検査では、CER 群の Day 11 に骨格筋細胞の空胞化および壊死を認め、TMPD 群の投与 6 および 24 時間後に骨格筋細胞の軽度の空胞化を認めた。メタボロミクス解析では、大腿直筋で 2-hydroxyglutarate (2HG) が CER 群で、hexanoylcarnitine が CER 群および TMPD 群で増加した。血漿では、2HG が CER 群の Day 8 および 11、TMPD 群の投与 24 時間後に増加し、hexanoylcarnitine が CER 群の Day 11、TMPD 群の投与 6 および 24 時間後に増加した。以上の結果から、血漿中 2HG および hexanoylcarnitine は、ラットの骨格筋障害の初期段階における新たな骨格筋障害マーカーとなる可能性が示唆された。

第 2 章 新規骨格筋障害バイオマーカーとしての血漿中 2HG 濃度の有用性検討

本章では、バイオマーカーとしての血漿中 2HG 濃度の有用性を調べることを目的に、血

漿 2HG の骨格筋障害に対する感度を、従来からの骨格筋障害バイオマーカーである AST、CK、および骨格筋型 CK アイソザイム (CK-MM) と比較し、週齢差、および反復採血の影響について検討した。4 あるいは 9 週齢の雄性 F344 ラットに CER を 0 あるいは 20 ppm (4 週齢)、40 ppm (9 週齢) を 10 日間混餌投与した。また、TMPD を 0 あるいは 9 mg/kg (4 および 9 週齢) を単回経口投与することにより骨格筋障害を誘発した。経時的 (CER 群は Day 4、8、11、TMPD 群は投与 6、24 時間後) に採血し、血漿中 2HG 濃度を LC-MS/MS で測定した。頸静脈からの最終採血後に剖検し、血漿中 AST、CK、CK-MM 活性の測定、ならびに骨格筋 (大腿直筋) の病理組織学的解析を行った。CER 群では AST、CK、CK-MM は両週齢で増加したが、TMPD 群では CK (4 および 9 週齢)、CK-MM (4 週齢) の増加は認められなかった。2HG は CER 群では Day 8 (4 および 9 週齢) から、TMPD 群では投与 6 時間後以降 (4 週齢) あるいは 24 時間後 (9 週齢) に増加した。病理組織学的検査では、CER 群および TMPD 群の両週齢で骨格筋細胞の空胞化または壊死がみられ、病理組織学的変化の程度は TMPD 群では CER 群と比較して軽度であった。CER あるいは TMPD で誘発した骨格筋障害に伴う血漿中 2HG 濃度の増加について、週齢差および反復採血の影響は認められなかった。以上の結果から、血漿中 2HG は骨格筋障害の初期段階において CK および CK-MM より高感度であること、さらに週齢差および反復採血の影響が認められないことが示され、骨格筋毒性評価に有用である可能性が示唆された。

本研究では、CER あるいは TMPD で骨格筋障害を誘発したラットの骨格筋および血漿中で 2HG および hexanoylcarnitine が増加することが明らかとなった。血漿 2HG は CER 群の骨格筋の病理組織学的変化または血漿 CK の増加に先んじて増加した。さらに、血漿 2HG および hexanoylcarnitine は TMPD 群の病理組織学的変化に伴って増加したが、血漿 CK は増加しなかった。これらの結果から、2HG および hexanoylcarnitine が骨格筋障害の新たなバイオマーカー候補である可能性が示唆された。血漿中 2HG のバイオマーカーとしての有用性を検討するために、血漿 2HG と従来の骨格筋障害マーカーである AST、CK、CK-MM を比較した結果、TMPD による軽度の骨格筋障害において、血漿 2HG は CK および CK-MM よりも高感度であった。また、週齢差および反復採血の影響がみられなかった。これらの結果から、血漿 2HG が骨格筋毒性の有望な新規バイオマーカーとして有用であることが示唆されたが、血漿 2HG の骨格筋障害マーカーとしての臓器および種特異性は不明である。また、2HG を骨格筋障害のバイオマーカーとして確立するには、他の骨格筋障害マーカーとの比較と背景データの取得が必要であり、今後の研究が望まれる。しかしながら、本研究はバイオマーカー候補としての 2HG の新たな知見を示すとともに、骨格筋障害を早期に検出するバイオマーカー研究のための有用な基礎情報になると考える。

Abstract

Chemical- or drug-related muscle toxicity, ranging from muscle pain to rhabdomyolysis, is induced by treatment with various compounds, including antilipidemic and hypocholesterolemic drugs, anesthetics, immunosuppressants, and proton pump inhibitors. Early detection of skeletal muscle toxicity is important because it has a critical influence on medical care and drug discovery, as skeletal muscle toxicity can develop into life-threatening rhabdomyolysis. Aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK) are widely used as traditional biomarkers for skeletal muscle disorders. However, novel biomarkers that are superior to the conventional skeletal muscle biomarkers, AST and CK, or that can be combined with conventional biomarkers to compensate for the disadvantages of AST and CK are needed because AST and CK have low sensitivity and specificity. Several new biomarkers, including skeletal muscle troponin I (sTnI), myosin light chain 3 (MyI3), and fatty acid-binding protein 3 (FABP3), have been recommended for use with CK to monitor drug-induced skeletal muscle injury. However, several drawbacks are associated with the use of these biomarkers, including rapid clearance and alteration due to renal dysfunction. In this study, we performed an unbiased metabolomic analysis of skeletal muscle and plasma in a rat model of drug- and chemical-induced skeletal muscle injury to identify new candidate biomarkers with greater sensitivity than conventional biomarkers and examined the usefulness of the candidate biomarkers.

Chapter 1: Identification of New Biomarkers for Drug-Induced Skeletal Muscle Disorders Using Metabolomic Analysis

To identify new candidate biomarkers for skeletal muscle toxicity, an unbiased metabolomic analysis was performed in rats treated with two distinct myotoxicants, cerivastatin (CER) and tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD). Skeletal muscle toxicity was induced in male Fischer 344 rats through the administration of CER or TMPD and then monitored by using established endpoints, such as increased plasma creatine kinase (CK) activity and histopathology, and the metabolomic analysis of skeletal muscle and plasma samples. Plasma CK levels in CER-treated rats were markedly elevated on Day 11; however, those in TMPD-treated rats showed a statistically significant decrease at 24 hr after dosing. Light microscopy revealed the presence of vacuolated or necrotic fibers in all CER-treated rats on Day 11, with slightly vacuolated fibers observed in TMPD-treated rats at 6 and 24 hr after dosing. Metabolomic analysis of the rectus femoris indicated increases in 2-hydroxyglutarate (2HG) in CER-treated rats and hexanoylcarnitine in CER- and TMPD-treated rats. Increases in plasma 2HG were also observed in CER-treated rats on Days 8 and 11 and in TMPD-treated rats at 24 hr after dosing, and increases in plasma hexanoylcarnitine were observed in CER-treated rats on Day 11 and in TMPD-treated rats at 6 and 24 hr after dosing. These experiments demonstrated the potential of plasma 2HG and hexanoylcarnitine as specific and easily detectable biomarkers for skeletal muscle toxicity in rats and demonstrated the value of metabolomics for

biomarker detection and identification in toxicological studies.

Chapter 2: A Study on the Usefulness of Plasma 2HG as a New Biomarker for Skeletal Muscle Disorder

We have demonstrated the potential of plasma 2HG as an easily detectable biomarker for skeletal muscle injury in rats. Therefore, we examined whether plasma 2HG was superior to conventional skeletal muscle damage biomarkers, including aspartate aminotransferase (AST), CK, and skeletal muscle-type CK isoenzyme (CK-MM) levels, in rats. Skeletal muscle injury was induced in 4- and 9-week-old male Fischer 344 rats by CER or TMPD administration. Plasma 2HG levels were measured on Days 4, 8, and 11 (CER group) and at 6 and 24 hr post administration (TMPD group). Plasma AST, CK, and CK-MM activities and histopathological changes in the rectus femoris muscle were evaluated as the study endpoints. In the CER group, AST, CK, and CK-MM increased in 4- and 9-week-old rats; in contrast, increases in CK (4- and 9-week-old rats) and CK-MM (4-week-old rats) were not obvious in the TMPD group. In both 4- and 9-week-old rats, plasma 2HG increased on Day 8 and at 24 hr post administration in the CER and TMPD groups, respectively. Histopathological analysis revealed myofiber vacuolation and necrosis in both groups. The histopathological damage to the rectus femoris muscle was more severe in the CER group than in the TMPD group. Increased plasma 2HG was associated with CER- and TMPD-induced skeletal muscle injuries in rats and was

not affected by age differences or repeated blood collection. The results suggested that plasma 2HG was superior to CK and CK-MM as a biomarker for mild skeletal muscle injury.

The present study showed the elevation of 2HG and hexanoylcarnitine levels in muscle and plasma in a rat model of CER- and TMPD-induced skeletal muscle injury. Plasma 2HG increased prior to histopathological changes in skeletal muscle or the elevation of plasma CK in CER-treated rats. Further, the increases in plasma 2HG and hexanoylcarnitine were accompanied by histopathological changes, even when the plasma level of CK did not change. These results suggested that 2HG and hexanoylcarnitine may be novel plasma biomarkers for skeletal muscle damage. Subsequently, we measured the plasma concentrations of 2HG in rats with skeletal muscle injury and compared those with the levels of conventional biomarkers, such as AST, CK, and CK-MM, to evaluate the potential of plasma 2HG as a biomarker for skeletal muscle toxicity. Plasma 2HG was a more sensitive biomarker than CK and CK-MM in TMPD-induced mild skeletal myopathy. Furthermore, no differences were noted between younger and older rats or after repeated blood collection. These results suggested that plasma 2HG may serve as a promising novel biomarker for skeletal muscle toxicity.

However, the organ or species specificity of plasma 2HG as a biomarker for muscle injury is not known. In addition, to establish 2HG as a biomarker for skeletal muscle disorders, it is necessary to perform a thorough comparison of plasma 2HG with other skeletal muscle injury biomarkers in terms

of sensitivity, organ specificity, species difference and sex difference. The present study provided new and valuable evidence about 2HG as a biomarker for skeletal muscle disorders, and the results of this study will provide useful basic information for biomarker research for skeletal muscle disorder.

目次

要旨	1
Abstract	5
緒言	12
第 1 章　メタボロミクス解析を用いた薬物誘発骨格筋障害の新規バイオマーカーの探索	18
小序	18
実験材料および方法	20
結果	24
考察	36
小括	42
第 2 章　新規骨格筋障害バイオマーカーとしての血漿中 2HG 濃度の有用性検討	43
小序	43
実験材料および方法	44
結果	49
考察	57
小括	62
第 3 章　総括および結論	63

謝辭	64
引用文献	65
出典	77

緒言

2003 年のヒトゲノムの配列決定から 10 年間で、医薬品として開発された化合物数は 62%増加し、研究開発費の合計は倍増したが、米国食品医薬品局 (FDA) による承認された新薬の年間の平均数は 1990 年代以来減少している。研究開発費の増加と新薬承認数の減少という乖離がみられた理由は、規制上の不均衡なリスク・ベネフィット評価や、商業性および財務上の決定による開発プロジェクトの終了、臨床試験の複雑さとコストの増加などとされている (Hay *et al.*, 2014)。医薬品の研究開発の最大のボトルネックは第 2 相試験とされている (Paul *et al.*, 2010; Arrowsmith, 2011)。第 2 相試験は臨床での有効性確認が主な目的であり、失敗原因の 51%が有効性、19%が安全性上の問題である (Allison, 2012) ことから、有効性や安全性を非臨床で予測することの難しさを示している。

一般に、現在の非臨床 *in vivo* モデルで得られた結果は、臨床試験における有害事象と約 70%一致しており、ヒトでの影響との良好な相関がみられる (Olson *et al.*, 2000; Sistare and DeGeorge, 2007)。しかしながら、残りの約 30%は非臨床試験では観察されない相関の低い毒性 (Campion *et al.*, 2013)、あるいは非臨床で認められたものの臨床ではモニターできず、結果として臨床で安全性を評価できない毒性 (Kola and Landis, 2004) であり、しばしば医薬品開発の中止原因となっている (Campion *et al.*, 2013)。

また、現時点では動物実験がヒトに対する有害な影響を予測するための最良のモデルであるにもかかわらず、医薬品開発上の重大な弱点、すなわち非臨床で認められたものの臨床ではモニターできず、結果として臨床で安全性を評価できない毒性も知られている (Kola and Landis, 2004)。このため、医薬品開発初期段階でのより良い毒性予測のための臓器特異的毒性の検出に焦点が当てられており、*in vitro*、あるいは *in vivo* モデルから臨床への橋渡しにおいて使用可能な、かつ早期予測に適用が可能な非侵襲性のバイオマーカーは、医薬品開発において最も価値があるとされている (Campion *et al.*, 2013)。

米国の National Institute of Health (NIH) は、バイオマーカーを「客観的に測定され、評価される特性値であり、正常な生物学的プロセス、病理学的プロセス、または治療処置に対する薬理的反応の指標として用いられるもの」と定義した (Biomarkers Definitions Working Group, 2001)。欧州委員会 (EC) は、2005年に Innovative Medicine Initiative (IMI) の開発を開始し、この取り組みの一環として、薬物安全性評価のバイオマーカーの望ましい特性を以下のように定義した。①特定の種類の障害に特異的である。②種々の実験動物種およびヒトにおいて障害を示す。③非臨床試験を臨床およびサーベイランスタイプの研究に橋渡しするために使用することができる。④現在使用されている他のバイオマーカーよりも障害を示す効果が高い。⑤古典的なバイオマーカーに相加的ではなく、代替的に使用できる。⑥容易に測定することができる。⑦従来のエンドポ

イントよりも再現性が高く、感度が高い。⑧被験个体（動物またはヒト）の数を減少させる。これらの IMI による定義は、米国 Critical Path Institute の Predictive Safety Testing Consortium (PSTC) の活動に反映されている。PSTC は、米国 FDA、欧州医薬品庁 (EMA)、日本の医薬品医療機器総合機構 (PMDA) など世界の規制当局と数多くの製薬企業との幅広い連携を導いており、肝臓、骨格筋および心毒性などのバイオマーカー研究と開発が行われている (Campion *et al.*, 2013)。

骨格筋毒性は医薬品開発における課題としてますます取り上げられるようになり、PSTC においても骨格筋障害を予測する取り組みが行われている。骨格筋障害の診断およびモニタリングは、臨床および非臨床ともに多くの課題を抱えている。臨床現場では、顕微鏡検査のための筋生検は侵襲性が高く実現困難である (Clarkson and Hubal, 2002; Goodwin, 2011)。磁気共鳴イメージング (MRI) などの他の非侵襲的方法は、筋組織を画像化するために利用可能であるが、臨床試験で日常的に使用することは非実用的である (Goodwin, 2011)。したがって、骨格筋障害に対する感受性および特異性の高い血中バイオマーカーの同定は、薬剤開発に大きな利益をもたらすと考えられる。

薬物あるいは化学物質による骨格筋毒性は、筋肉痛から横紋筋融解症まで幅広くみられ、高脂血症治療薬、コレステロール低下薬、麻酔薬、免疫抑制薬、プロトンポンプ阻害薬、およびその他の化合物によって誘発される (Nozaki *et al.*, 2004; Oshima, 2011; Tanaka *et al.*, 2014)。重度の骨格筋障害（横紋筋融解症）の典型的な臨床徴候としては、

筋肉痛、衰弱および褐色尿が挙げられる (Bagley *et al.*, 2007)。3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) 還元酵素阻害薬 (スタチン) の場合、致死的な横紋筋融解症はまれだとされているが (Joy and Hegele, 2009)、スタチンの中でもセリバスタチン (CER) は 1.0%と他のスタチンと比較して高い割合で横紋筋融解症を誘発し (Kashani *et al.*, 2006) 市場から撤退している。横紋筋融解症に起因する重大な合併症は、薬物誘発性筋障害 (Owczarek *et al.*, 2005; Kuncel, 2009) とともに生じ得る急性腎不全である (Abassi *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2005; Bagley *et al.*, 2007)。骨格筋毒性が生命を脅かす横紋筋融解症に発展しうることを考慮すると、臨床でのリスクマネジメントあるいは医薬品開発上のリスクアセスメントの観点からも早期に骨格筋毒性を検出することが重要である。

クレアチンキナーゼ (CK)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)、ピルビン酸キナーゼ (PK)、およびミオグロビン (Mb) は、骨格筋障害診断のためのバイオマーカーとして使用されている (Wu and Perryman, 1992; Bagley *et al.*, 2007; Brancaccio *et al.*, 2010)。しかしながら、これらのマーカーは骨格筋組織に対する特異性が欠如しており、骨格筋障害と心筋障害とを区別することができない (Wu and Perryman, 1992; Matsumura *et al.*, 2007; Van Hoof, 2012)。また、CK、AST および LDH は、溶血によっても高値を示すことが知られている。

CK は、ヒトにおける骨格筋障害の最も一般的に使用されている臨床的指標であり、

薬物の安全性評価 (Shepherd *et al.*, 2004; Lee and Vasani, 2005; Owczarek *et al.*, 2005; Kuncl, 2009) や筋疾患研究 (Okinaka *et al.*, 1961; Zatz *et al.*, 1991) にも広く用いられている。CK は、クレアチンリン酸のリン酸基をアデノシン二リン酸 (ADP) に転移し、アデノシン三リン酸 (ATP) とクレアチンが生成される反応を触媒する酵素である (Wallimann *et al.*, 1992)。CK は 2 つの異なるポリペプチドサブユニット M (筋肉型) および B (脳型) からなる二量体蛋白であり、3 つのアイソザイム、CK-MM、CK-MB、および CK-BB として存在する。CK アイソザイムの種類は組織によって異なるため、骨格筋マーカーとして CK-MM、心筋マーカーとして CK-MB、脳組織マーカーとして CK-BB を用いて病変部位を同定できる。しかしながら、バイオマーカーとしての血中 CK の有用性には限界があり、グルタチオン枯渇を伴う状態では、アッセイ系に影響して CK 活性が低下することが知られている (Gunst *et al.*, 1998)。

さらに、AST および CK の生理値は年齢とともに変化することが知られている (Cherian and Hill, 1978; Morandi *et al.*, 2006)。化学物質との生体反応には個人差や年齢差があるため、バイオマーカー研究ではこれらの要因を考慮する必要がある (Ishikawa *et al.*, 2014)。

以上、従来の骨格筋バイオマーカーは、その感度および特異性の低さから、より優れた新規バイオマーカーが必要とされている (Matsuzawa *et al.*, 1993; Bohlmeier *et al.*, 1994; Sorichter *et al.*, 1999; Koseoglu *et al.*, 2011)。

本研究では、薬剤あるいは化学物質で骨格筋障害を誘発したラットの骨格筋および血漿を用いて、従来の骨格筋障害バイオマーカーより高感度のマーカーを見出し、その有用性を評価することを目的とした。第 1 章では CER あるいは tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) を投与して骨格筋障害を誘発したラットの骨格筋および血漿のメタボロミクス解析を行うことでバイオマーカー候補を探索した。第 2 章では第 1 章で見出したバイオマーカー候補と従来のバイオマーカーの感度を比較し、さらに反復採血の影響および週齢差について検討した。

第 1 章 メタボロミクス解析を用いた薬物誘発骨格筋障害の新規バイオマーカーの 探索

小序

薬物あるいは化学物質による骨格筋毒性は、筋肉痛から横紋筋融解症まで幅広くみられ、高脂血症治療薬、コレステロール低下薬、麻酔薬、免疫抑制薬、およびその他の化合物によって誘発される (Oshima, 2011)。重症な横紋筋融解症は生命に関わるため、骨格筋毒性の早期段階での検出が重要である。3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) 還元酵素阻害薬 (スタチン) の場合、致死的な横紋筋融解はまれであるが (Joy and Hegele, 2009)、スタチンの中でもセリバスタチンは 1.0% と他のスタチンと比較して高い割合で横紋筋融解症を誘発した (Kashani *et al.*, 2006)。

骨格筋毒性の早期検出は、非臨床毒性試験のみならず、臨床においても重要である。CK および AST は、筋障害に対して従来から用いられているバイオマーカーであるが、感度および特異性の低さが指摘されている (Bohlmeyer *et al.*, 1994; Sorichter *et al.*, 1999)。これまでの研究では、アトルバスタチン投与後の CK の増加は、骨格筋機能または筋肉痛の発生率と相関しないことが示され (Ballard *et al.*, 2013)、CK よりも感度および特異性の高いバイオマーカーが筋障害の早期検出に必要であることが示唆された

(Laaksonen, 2013)。薬物による骨格筋障害をモニタリングするために、skeletal muscle troponin I (sTnI)、myosin light chain 3 (Myl3)、および fatty acid-binding protein 3 (FABP3) を CK と併用することが推奨されている (Muntean *et al.*, 2017)。しかしながら、これらの新しいバイオマーカーには、血中からの消失の早さおよび腎機能障害によって値が影響を受けるといった欠点が指摘されている (Tonomura *et al.*, 2012)。

生体液、細胞、および組織中の代謝産物のプロファイリングを行うメタボロミクス解析は、バイオマーカー探索のためのツールとして利用されている (Johnson *et al.*, 2016)。古典的な診断方法および従来の臨床バイオマーカーと比較して、メタボロミクスは感度および特異性の点で優位な可能性があるとされている (Monteiro *et al.*, 2013)。Cannabinoid-1 受容体拮抗薬によるイヌの骨格筋および心筋障害では、メタボロミクス手法によって血漿中 acylcarnitine および尿中 ethylmalonate、methylsuccinate、adipate、suberate、hexanoylglycine、sarcosine、dimethylglycine、isovalerylglycine が変化を示したと報告されている (Tomlinson *et al.*, 2012)。

本章では、CK よりも感度の優れた新たなバイオマーカー候補を探索するために、薬剤誘発性骨格筋障害ラットにおける骨格筋および血漿のメタボローム解析を実施した。

実験材料および方法

動物

8 週齢の雄性 F344/DuCrIj ラット（日本チャールズ・リバー株式会社, Kanagawa, Japan）40 例を、相対湿度 30~70%、室温 21~26°C、照明 12 時間（午前 7 時~午後 7 時）に設定した試験室にてステンレス鋼ワイヤブラケットケージに群飼育し、1 週間馴化飼育したのち 9 週齢で実験に供した。1 群につき 5 例で 8 群に群分けし、20 例を CER 投与に、残りの 20 例を TMPD 投与に供した。飼料および飲水（水道水）は自由に摂取させた。動物実験は、第一三共株式会社（Tokyo, Japan）の動物実験委員会の承認下で実施した。

CER 投与

ラットに CER を 0 ppm（粉末飼料 CRF-1, オリエンタル酵母工業株式会社, Tokyo, Japan）あるいは 40 ppm の濃度で 7 あるいは 10 日間混餌投与し、投与開始日を Day 1 として Day 8 および Day 11 に剖検した（n = 5 例/群/時点）。

TMPD 投与

ラットに TMPD 0 mg/kg（溶媒：0.5%メチルセルロース溶液, ナカライテスク株式会

社, Kyoto, Japan) あるいは 9 mg/kg を単回強制経口投与し、投与 6 あるいは 24 時間後に剖検した (n = 5 例/群/時点)。飼料は固形飼料 CRF-1 を摂取させた。

剖検および採材

投与終了後の各時点で、イソフルラン麻酔下で腹大動脈から採血を行った後、放血安楽死させ速やかに剖検して骨格筋（ヒラメ筋、大腿直筋、および前脛骨筋）を採取した。血液は、CK 測定用にヘパリン、あるいはメタボローム解析用に EDTA で処理して直ちに氷冷し、遠心分離（3000 rpm、15 分間、4°C）後に血漿を-80°Cに保存した。骨格筋は、病理組織学的検査用に 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、メタボロミクス解析用に液体窒素で凍結し、-80°Cで保存した。

血漿 CK 測定

血漿中の CK 活性は、市販のアッセイキット（L-Type CK、和光純薬工業株式会社, Osaka, Japan）および自動分析装置（7180、日立ハイテクノロジーズ株式会社, Tokyo, Japan）を用いて測定した。CK のアイソザイムである CK-MM（骨格筋由来）は高速自動電気泳動装置（株式会社ヘレナ研究所, Saitama, Japan）を用いて測定した。

病理組織学的検査

ホルマリン固定した骨格筋を常法に従って脱水・パラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。作製した病理組織標本は、光学顕微鏡で観察した。病理組織学的変化は、Mann ら (Mann *et al.*, 2012) および Greaves ら (Greaves *et al.*, 2013) の分類を参考に、重篤度に応じて正常 (-)、軽度 (+)、中等度 (++) または重度 (+++) の範囲で評価した。

メタボロミクス解析

骨格筋は、病理組織学的変化が顕著であった大腿直筋を用い、CER 群の Day 11 (0 および 40 ppm) および TMPD 群の投与 24 時間後 (0 および 9 mg/kg) のサンプルを使用した。血漿は、全ての採材時点のサンプルを使用した。メタボロミクス解析は、3 種類の測定系 (UHPLC/MS/MS optimized for basic species, UHPLC/MS/MS optimized for acidic species, GC/MS) を用いて Evans らの報告 (Evans *et al.*, 2009) に従って分析し、Dehaven らの報告 (Dehaven *et al.*, 2010) に従って内因性代謝物を同定した。内因性代謝物の欠測値は、それらが検出限界未満であると仮定して最小検出値を代入した。

統計学的解析

定量的データは平均値±標準偏差で表示した。メタボロミクス解析データについては、各代謝物の値を、対照群の平均値に対する投与群の値の比 (Fold change) として示

した。対照群および投与群間で、血漿 CK 値に関しては F 検定による結果が P 値 < 0.05 の場合は Welch の t 検定を、F 検定による結果が P 値 > 0.05 の場合は Student の t 検定を行い、検定結果の P 値 < 0.05 を有意な差とみなした。メタボロミクス解析に関しては Welch の t 検定を行い、検定結果の P 値 ≤ 0.05 を有意な差とみなした。これらの統計学的解析は、SAS[®]System Release 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。また、大腿直筋のメタボロミクス解析データについては、MetaboAnalyst 3.0 (Xia and Wishart, 2016) を用いて、CER 群および TMPD 群に共通して増加した内因性代謝物について主成分分析 (PCA) を実施した。

結果

血漿 CK

CER 群および TMPD 群の血漿 CK 値を、それぞれの対照群と比較した。CER 群の Day 8 の血漿 CK 値は対照群と有意な差はみられなかったが、Day 11 では対照群より有意に高かった（対照群 135 ± 17 IU/L, CER 群 18550 ± 14258 IU/L, $P < 0.05$, Fig. 1A）。

TMPD 群の投与 6 時間後の血漿 CK 値は対照群と同等であり、投与 24 時間後では対照群よりも有意に低かった（対照群 252 ± 27 IU/L, TMPD 群 177 ± 13 IU/L, $P < 0.001$, Fig. 1B）。

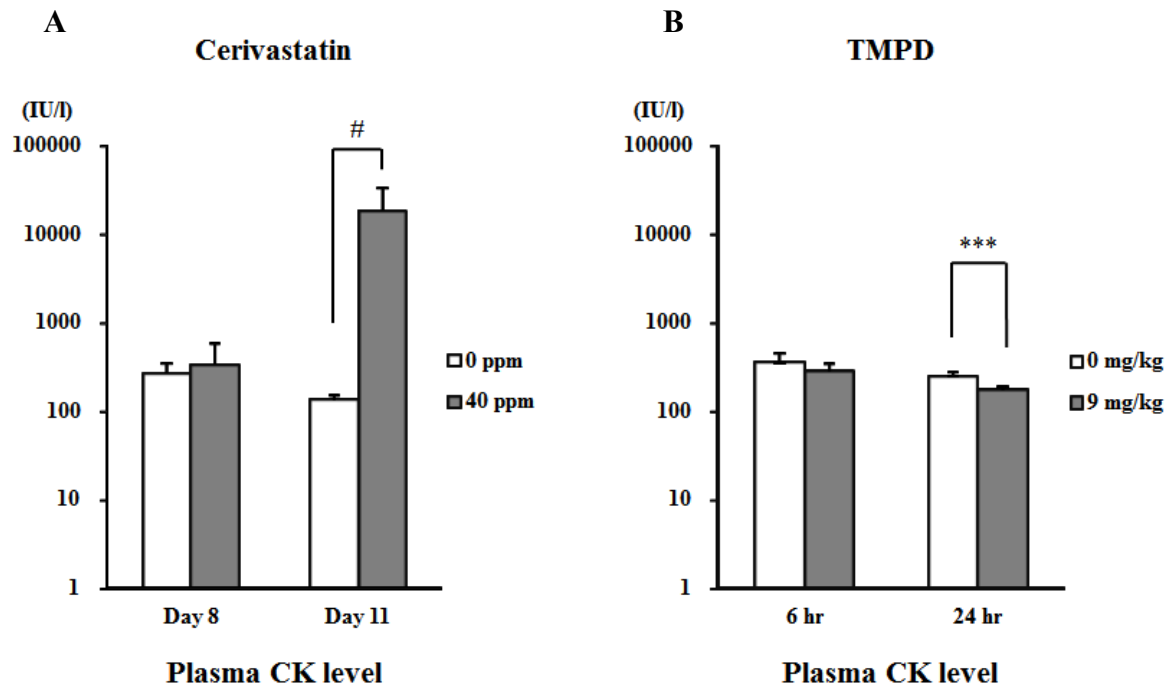


Fig. 1. Plasma creatine kinase (CK) levels in cerivastatin (CER)- and tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD)-treated rats. Plasma CK levels (mean \pm S.D., $n = 5$ per group) of rats treated with 0 or 40 ppm of CER on Days 8 and 11 (A) and 0 or 9 mg/kg of TMPD at 6 and 24 hr after dosing (B). # $P < 0.05$: compared with the control group by Aspin-Welch's t -test. *** $P < 0.001$: compared with the control group by Student's t -test.

病理組織学的検査

全ての対照群 (Table 1, Table 2, Fig. 2B, Fig. 2D) および CER 群の Day 8 (Table 1) に異常な所見はみられなかった。CER 群の Day 11 では、全例の大腿直筋で骨格筋細胞の

空胞化および壊死がみられた (Fig. 2A)。これらのラットでは、前脛骨筋にも同様の所見が軽度に認められた。また、5 例中 1 例のヒラメ筋でも同様の所見がみられた。TMPD 群では、投与 6 および 24 時間後に採材した全ての筋の全例で骨格筋細胞の空胞化が認められた (Table 2, Fig. 2C)。

Table 1 Histopathology of the cerivastatin-treated and control rats

Cerivastatin	Dose (ppm)	0		40	
		8	11	8	11
	Day				
No. of animals	5	5	5	5	
Soleus muscle					
Vacuolar degeneration, muscle fibers	-	-	-	1	(+)
Necrosis, muscle fibers	-	-	-	1	(+)
Rectus femoris muscle					
Vacuolar degeneration, muscle fibers	-	-	-	5	(++)
Necrosis, muscle fibers	-	-	-	5	(++)
Cellular infiltration	-	-	-	3	(+/++)
Tibialis anterior muscle					
Vacuolar degeneration, muscle fibers	-	-	-	5	(+)
Necrosis, muscle fibers	-	-	-	5	(+)

Grades: -, within normal limits; +, slight; +/++, slight to moderate; ++, moderate

The numbers of animals with pathological changes are listed.

Table 2 Histopathology of the tetramethyl-p-phenylenediamine-treated and control rats

Tetramethyl-p-phenylenediamine		0		9	
Dose (mg/kg)					
Time after dosing (hr)		6	24	6	24
No. of animals		5	5	5	5
Soleus muscle					
Vacuolar degeneration, muscle fibers		-	-	5 (+)	5 (+)
Rectus femoris muscle					
Vacuolar degeneration, muscle fibers		-	-	5 (+/++)	5 (++)
Tibialis anterior muscle					
Vacuolar degeneration, muscle fibers		-	-	5 (++)	5 (+)
Necrosis, muscle fibers		-	-	1 (+)	1 (+)

Grades: -, within normal limits; +, slight; +/++, slight to moderate; ++, moderate

The numbers of animals with pathological changes are listed.

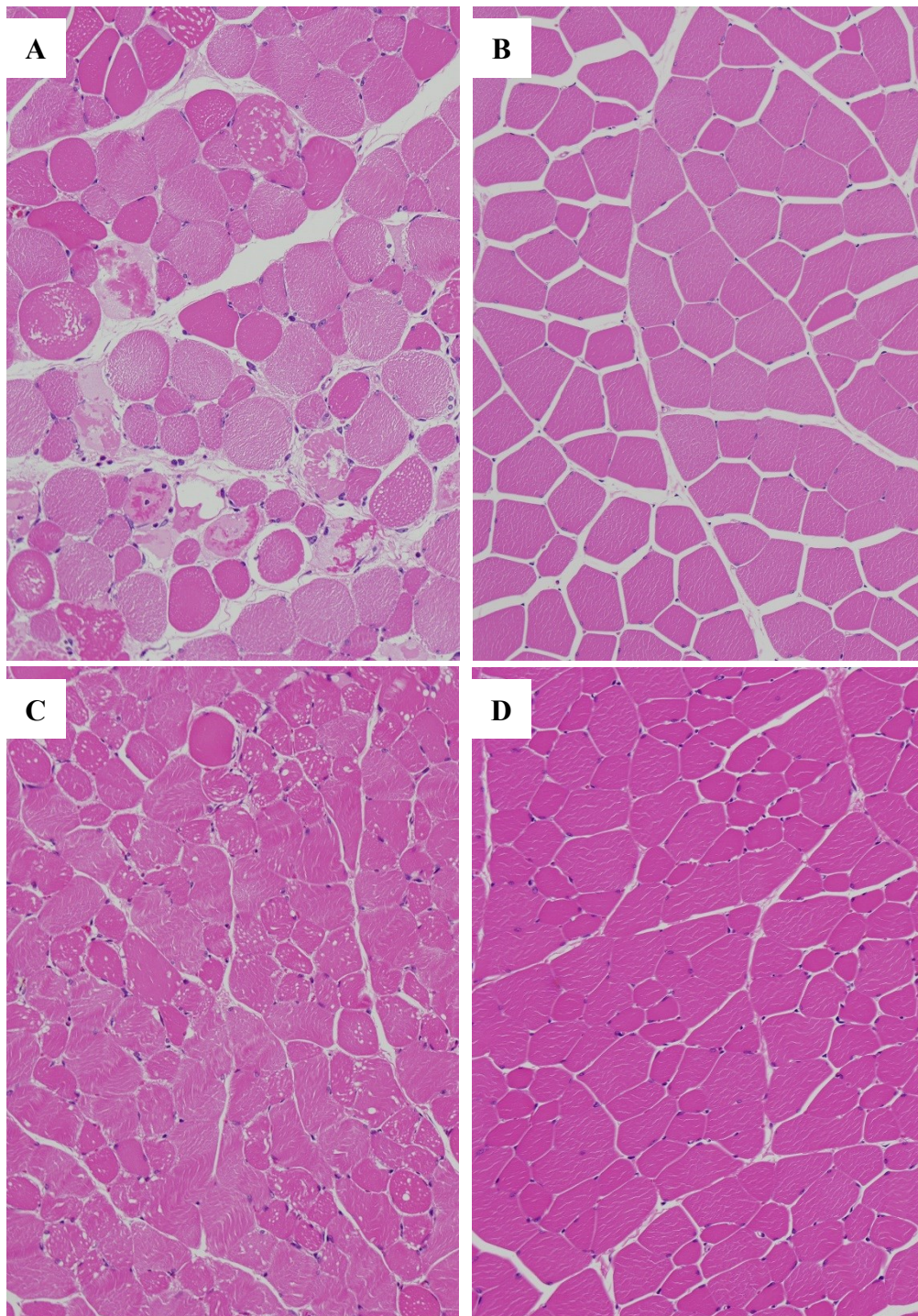


Fig. 2. Histopathological analysis of muscle fibers. The rectus femoris muscle from rats treated with 40 ppm CER (A) or 0 ppm CER (B) on Day 11, the tibialis anterior muscle from rats 6 hr after treating with 9 mg/kg TMPD (C), and control vehicle (D). The following findings were

noted: (A) marked variation in fiber size with moderately vacuolated and necrotic fibers; (C) moderately vacuolated and slightly necrotic fibers; and (B) and (D) no abnormalities.

Hematoxylin and eosin staining.

大腿直筋および血漿のメタボロミクス解析

CER 群の Day 11 および TMPD 群の投与 24 時間後のラット大腿直筋についてメタボロミクス解析を行った。この解析により、402 種の内因性代謝物（命名されたもの 279 種、命名されていないもの 123 種）が同定された。命名されていない物質が見つかったが、本研究では命名された内因性代謝物のみを扱った。CER 群および TMPD 群それぞれの増加率上位 50 種の内因性代謝物のうち両群で共通して増加したのは 19 種であった（Table 3）。Table 3 に示した内因性代謝物に関する主成分分析によって、CER 群または TMPD 投与群とそれぞれの対照群との間には明確な差が認められた（Fig. 3）。

Table 3 Identified biochemicals in the rectus femoris muscle with the highest fold-change values common to the CER- and TMPD-treated groups

Super Pathway	Sub Pathway	Biochemical Name	Fold Change	
			CER 40 ppm Day 11	TMPD 9 mg/kg 24 hr
Amino acid	Valine, leucine, and isoleucine metabolism	isovalerylcarnitine	22.8	4.65
Amino acid	Valine, leucine, and isoleucine metabolism	isobutyrylcarnitine	19.3	2.89
Lipid	Fatty acid, dicarboxylate	2-hydroxyglutarate (2HG)	9.56	1.64
Amino acid	Valine, leucine, and isoleucine metabolism	2-methylbutyrylcarnitine	8.37	3.13
Lipid	Carnitine metabolism	stearoylcarnitine	6.75	1.64
Lipid	Carnitine metabolism	myristoylcarnitine	5.89	1.86
Amino acid	Glutamate metabolism	N-acetyl-aspartyl-glutamate (NAAG)	5.78	1.90
Nucleotide	Pyrimidine metabolism, uracil containing	uracil	4.57	3.53
Lipid	Carnitine metabolism	hexanoylcarnitine	4.00	3.11
Lipid	Sphingolipid	sphingosine	3.60	1.60
Lipid	Ketone bodies	3-hydroxybutyrate (BHBA)	2.94	2.42
Lipid	Carnitine metabolism	octanoylcarnitine	2.80	2.65
Lipid	Lysolipid	1-stearoylglycerophosphocholine	2.74	1.68
Nucleotide	Pyrimidine metabolism, cytidine containing	cytidine	2.40	2.58
Amino acid	Glutathione metabolism	ophthalmate	2.17	5.09
Nucleotide	Pyrimidine metabolism, cytidine containing	cytidine 5'-monophosphate (5'-CMP)	2.16	2.34
Energy	TCA cycle	fumarate	1.91	1.52
Amino acid	Valine, leucine, and isoleucine metabolism	hydroxyisovaleroyl carnitine	1.85	1.49
Lipid	Fatty acid metabolism	butyrylcarnitine	1.72	2.87

CER, cerivastatin Na; TMPD, tetramethyl-p-phenylenediamine. Data are expressed as a ratio of the value relative to the mean value of the respective control group. Data represent the mean of four samples. Red shaded cells indicate a statistically significant increase ($P \leq 0.05$ by Welch's t-test). Light red shaded cells indicate that the mean values trend higher for that comparison ($0.05 < P < 0.10$).

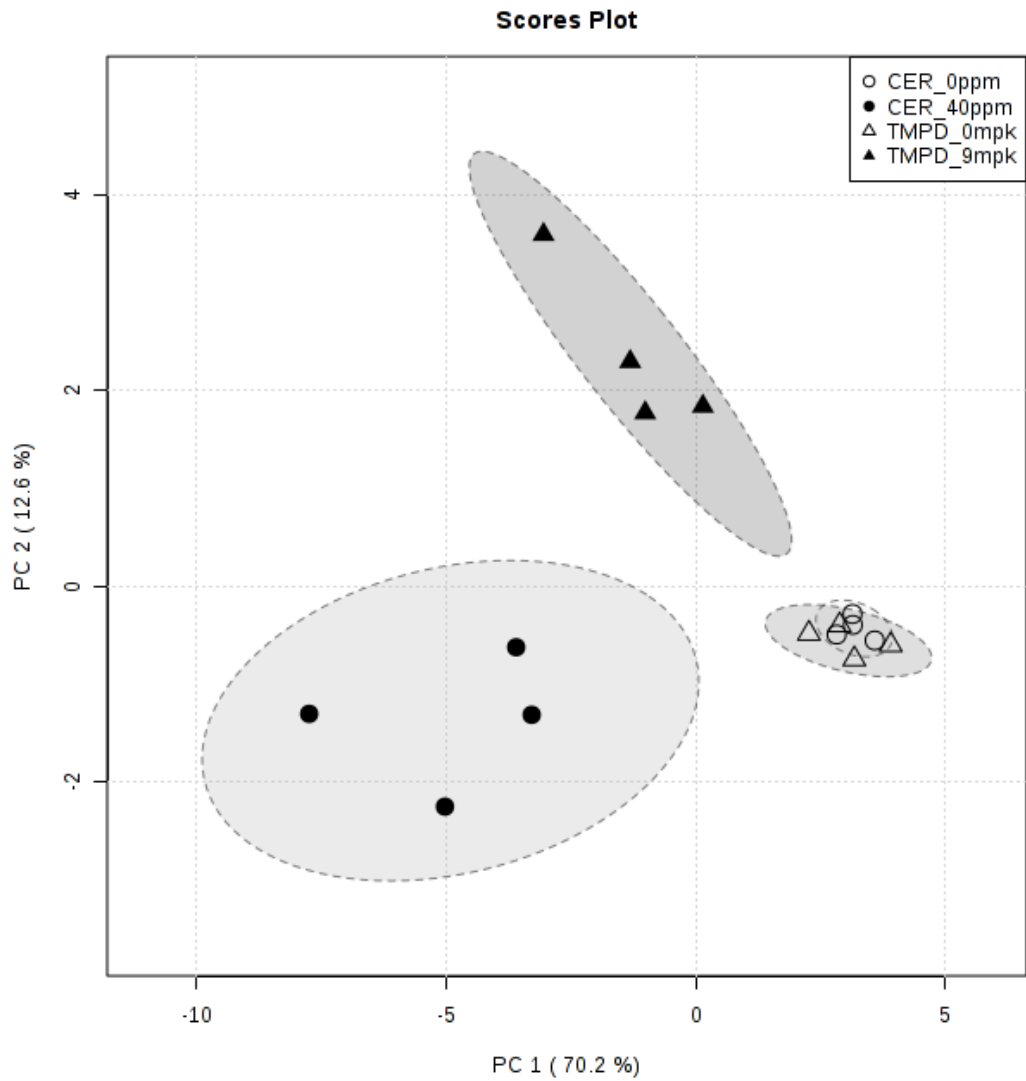


Fig. 3. Principal component analysis (PCA) score plots of the identified biochemicals in the rectus femoris muscle with the highest fold-change values common to the CER- and TMPD-treated groups.

CER, cerivastatin Na; TMPD, tetramethyl-p-phenylenediamine.

CER 群および TMPD 群の骨格筋で共通して増加した 19 種の内因性代謝物のうち、血漿中の 2HG、2-methylbutyroylcarnitine、uracil、および hexanoylcarnitine が骨格筋と同時点で増加した。しかしながら、CER 群の Day 8 では 2-methylbutyroylcarnitine は有意に減少し、TMPD 群の投与 24 時間後の uracil は変化しなかった (Table 4)。すなわち、2HG および hexanoylcarnitine が、CER または TMPD を投与したラットの骨格筋および血漿で共通して上昇した内因性代謝物であった (Fig. 4, Fig. 5)。

Table 4 Plasma biochemicals with altered levels in CER- and TMPD-treated rats

Super Pathway	Sub Pathway	Biochemical Name	Fold Change			
			CER 40 ppm		TMPD 9 mg/kg	
			Day 8	Day 11	6 hr	24 hr
Amino acid	Valine, leucine, and isoleucine metabolism	isovalerylcarnitine	0.80	1.83	1.79	1.29
Amino acid	Valine, leucine, and isoleucine metabolism	isobutyrylcarnitine	0.65	0.93	0.97	0.99
Lipid	Fatty acid, dicarboxylate	2-hydroxyglutarate (2HG)	2.58	2.22	0.87	1.91
Amino acid	Valine, leucine, and isoleucine metabolism	2-methylbutyrylcarnitine	0.83	1.39	1.25	1.42
Lipid	Carnitine metabolism	stearoylcarnitine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Lipid	Carnitine metabolism	myristoylcarnitine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Amino acid	Glutamate metabolism	N-acetyl-aspartyl-glutamate (NAAG)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Nucleotide	Pyrimidine metabolism, uracil containing	uracil	1.38	1.84	1.24	1.03
Lipid	Carnitine metabolism	hexanoylcarnitine	0.84	2.45	1.77	2.54
Lipid	Sphingolipid	sphingosine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Lipid	Ketone bodies	3-hydroxybutyrate (BHBA)	1.11	1.42	2.83	1.82
Lipid	Carnitine metabolism	octanoylcarnitine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Lipid	Lysolipid	1-stearoylglycerophosphocholine	1.28	0.42	0.91	1.22
Nucleotide	Pyrimidine metabolism, cytidine containing	cytidine	1.50	0.90	0.97	1.08
Amino acid	Glutathione metabolism	ophthalmate	1.34	1.76	0.92	1.59
Nucleotide	Pyrimidine metabolism, cytidine containing	cytidine 5'-monophosphate (5'-CMP)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Energy	TCA cycle	fumarate	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Amino acid	Valine, leucine, and isoleucine metabolism	hydroxyisovaleroyl carnitine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Lipid	Fatty acid metabolism	butyrylcarnitine	0.87	0.85	0.80	0.76

CER, cerivastatin Na; TMPD, tetramethyl-p-phenylenediamine; N.D., not detected. Data are expressed as a ratio of the value relative to the mean value of the respective control group. Data represent the mean of four samples. Shaded cells indicate a statistically significant increase (red) or decrease (green) ($P \leq 0.05$ by Welch's t-test). Shaded cells indicate that the mean values trend higher (light red) and lower (light green) for that comparison ($0.05 < P < 0.10$).

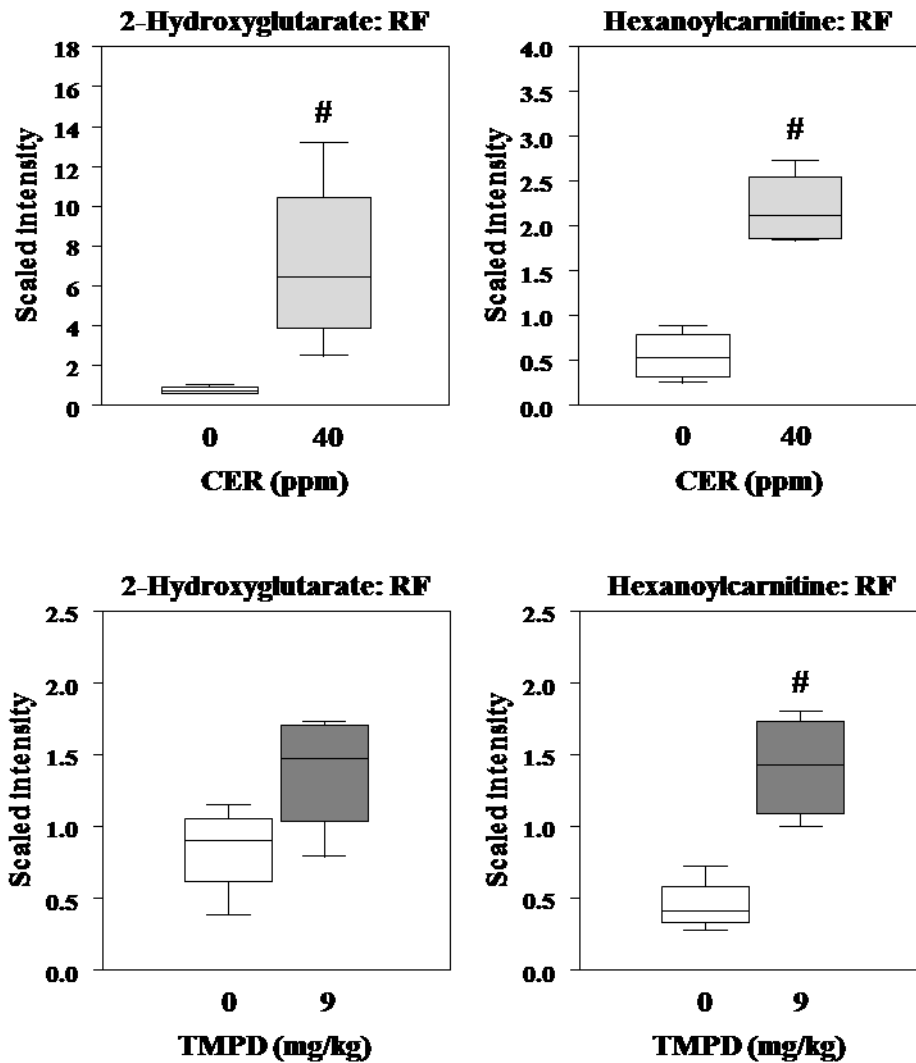


Fig. 4. Box-and-whisker plots of 2-hydroxyglutarate and hexanoylcarnitine in rectus femoris muscle samples. Metabolites in the rectus femoris muscle from rats treated with CER on Day 11 or TMPD at 24 hr after dosing. The box represents the middle 50% of the distribution, and the upper and lower “whiskers” represent the entire spread of the data. The hyphen indicates the median. The name of each metabolite is indicated on the top of the plot. The y-axis is the median scaled value. # $P \leq 0.05$: Significantly different from the control group by Welch’s t-test. CER, cerivastatin Na; TMPD, tetramethyl-p-phenylenediamine; RF, rectus femoris muscle.

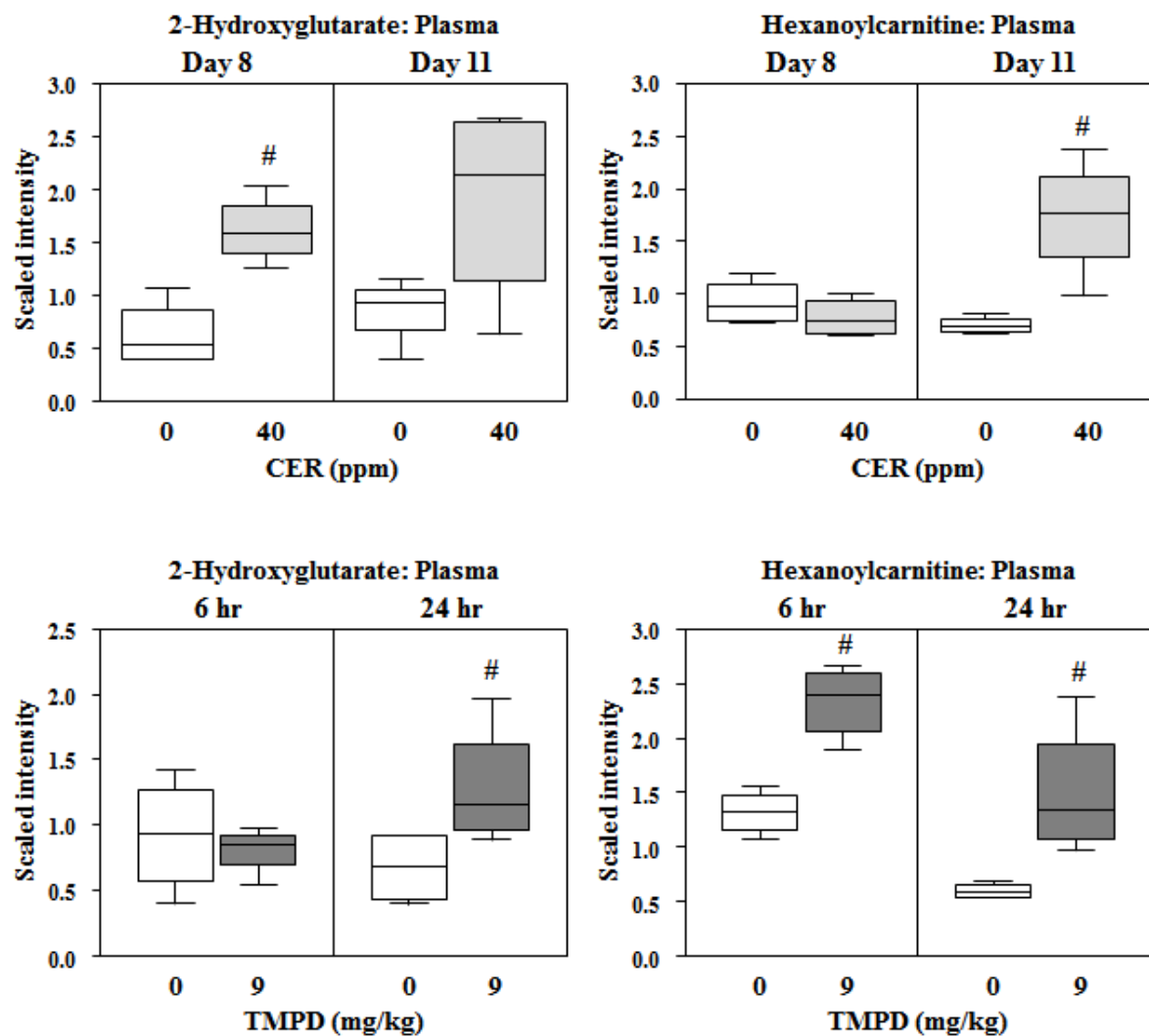


Fig. 5. Box-and-whisker plots of 2-hydroxyglutarate and hexanoylcarnitine in plasma samples.

The box represents the middle 50% of the distribution, and the upper and lower “whiskers” represent the entire spread of the data. The hyphen indicates the median. The name of each metabolite is indicated on the top of the plot. The y-axis is the median scaled value. # $P \leq 0.05$: Significantly different from the control group by Welch’s t-test. CER, cerivastatin Na; TMPD, tetramethyl-p-phenylenediamine.

考察

本章では、骨格筋障害の新規バイオマーカー候補を探索するために、2つの異なる骨格筋毒性物質（CER および TMPD）で骨格筋障害を誘発したラットの骨格筋および血漿についてメタボローム解析を行い、以下のことが見出された。①CER および TMPD 誘発性骨格筋障害において、骨格筋および血漿中の 2HG および hexanoylcarnitine の増加を特徴とする内因性代謝物の変化を示した。②CER 群において、骨格筋の病理組織学的変化または血漿 CK の増加に先んじて血漿 2HG が増加した。③TMPD 群において、血漿 CK は投与 6 時間後では変化せず、24 時間後に減少したが、血漿 2HG および hexanoylcarnitine は、病理組織学的変化に伴って増加した。

これらの結果から、2HG および hexanoylcarnitine が骨格筋障害の新たなバイオマーカー候補である可能性が示唆された。

我々は、毒性機序の異なる CER および TMPD を骨格筋障害誘発物質として用い、メカニズムに依存しないバイオマーカー候補を同定した。スタチンによる骨格筋障害は HMG-CoA 還元酵素阻害に直接関連することが示唆されているが (Flint *et al.*, 1997; Nishimoto *et al.*, 2003; Obayashi *et al.*, 2011)、メカニズムの詳細は依然として不明である。ミトコンドリアがスタチンによる骨格筋毒性の主要な標的かどうかは議論の余地がある (Waclawik *et al.*, 1993; Schaefer *et al.*, 2004; Westwood *et al.*, 2008) が、ミトコンドリアが直接的な標的であることが *in vivo* (De Pinieux *et al.*, 1996; Schaefer *et al.*, 2004; Obayashi

et al., 2011) および *in vitro* (Nishimoto *et al.*, 2003; Sirvent *et al.*, 2005a; Kaufmann *et al.*, 2006) の研究で示唆されている。本研究では、II 型（速筋）線維優位の筋、すなわち大腿直筋および前脛骨筋は CER で顕著に障害されたが、I 型（遅筋）線維優位のヒラメ筋の障害は軽度であった。このことは、スタチンによる骨格筋毒性が主に II 型線維優位の筋を標的とする報告した先行研究と一致した (Reijneveld *et al.*, 1996; Westwood *et al.*, 2005; Westwood *et al.*, 2008)。この線維型特異的な毒性は、筋線維型によるミトコンドリア含量とエネルギー供給メカニズムの違いに関係している可能性がある (Phillips and Haas, 2008)。対照的に、線維型特異的变化は TMPD 処置ラットでは明らかではなかった。TMPD 誘発性筋障害は、自己酸化によって形成される安定なラジカルカチオンによって引き起こされると考えられる (Munday, 1988; Munday *et al.*, 1989)。このように、CER および TMPD による骨格筋障害は異なるメカニズムに起因するが、本研究で同定されたバイオマーカー候補は、CER あるいは TMPD 群が対照群に対して明確に分離されることが PCA によって確認された (Fig. 3)。

ラットに骨格筋障害を誘発する用量の CER および TMPD を投与した結果、対照群と比較して、大腿直筋および血漿中のアシルカルニチン類が増加した。Cannabinoid-1 受容体拮抗薬である *ibipinabant* によって誘導されたイヌにおけるアシルカルニチンの血漿中濃度の上昇を伴う筋毒性では、ミトコンドリア ADP/ATP 交換の阻害が関与することが報告されている (Schirris *et al.*, 2015)。アシルカルニチンの血漿中濃度の増加は、骨

骨格筋における脂肪酸酸化の障害に起因することが示唆されている (Tomlinson *et al.*, 2012)。カルニチンは、長鎖脂肪酸の細胞質からミトコンドリアマトリックスへの取り込みに必須であり (Bartlett and Eaton, 2004)、脂肪酸の代謝に必須であることが知られている (Bieber, 1988)。したがって、hexanoylcarnitine および octanoylcarnitine の骨格筋内濃度の上昇は、脂肪酸 β 酸化の亢進によるものと考えられた。脂肪酸の β 酸化で生じたアセチル CoA の一部は、ケトン体 (acetoacetate および 3-hydroxybutyrate) に変換されることが知られている。本研究では、3-hydroxybutyrate の骨格筋中濃度が増加しており、 β 酸化活性の増加が支持された。

本研究では、CER または TMPD を投与した各群の骨格筋および血漿の両方で 2HG が上昇したが、これはミトコンドリアの機能障害によるものと推察された。過去の研究では、2HG がミトコンドリアのエネルギー代謝、特にチトクロム c 酸化酵素活性を著しく低下させることが示されている (Latini *et al.*, 2005)。2HG は、トリカルボン酸 (TCA) 回路の中間体である α -ケトグルタル酸 (α KG) と酸化還元平衡にあり、 α KG から malate dehydrogenase および lactate dehydrogenase A よって産生される (Intlekofer *et al.*, 2015)。2HG は、フラビンアデニンジヌクレオチド依存性ミトコンドリア酵素である 2HG dehydrogenase (Rzem *et al.*, 2004) による α KG への変換によって除去されるため、2HG の血漿中濃度は、正常な条件下では 300 μ M 未満に維持される (Dang *et al.*, 2016)。低酸素状態では、2HG dehydrogenase のダウンレギュレーションにより 2HG が増加し、2HG

の増加は 2HG dehydrogenase の抑制によるミトコンドリア機能障害に起因する酸化還元ストレスを生じる。スタチンによる骨格筋毒性病変におけるミトコンドリアの異常は、ヒトを含む複数の動物種において、シンバスタチン、ロスバスタチン、およびプラバスタチンを含むスタチンについて観察されている (Bergman *et al.*, 2003; Gambelli *et al.*, 2004; Seachrist *et al.*, 2005; Sirvent *et al.*, 2005b; Westwood *et al.*, 2005; Westwood *et al.*, 2008) 。骨格筋はミトコンドリアに富み、エネルギー要求量を満たすために好氣的代謝に大きく依存するため、TMPD のミトコンドリアでの酸化はその筋毒性の発現に重要であると考えられる (Munday *et al.*, 1990) 。CER および TMPD が 2HG の合成を増加させるのか、2HG の分解を減少させるのかは不明であるが、2HG の蓄積が TCA 回路から電子を迂回させ、電子伝達機構に影響を及ぼし、CER および TMPD が誘発する骨格筋障害の一因となることが示唆される。

2HG および hexanoylcarnitine が骨格筋および血漿において増加したことは、CER および TMPD による骨格筋障害を血漿サンプルでモニター可能であることを示唆しており、このことは通常の動物実験において有用である。さらに、Tomlinson ら (2012) は、cannabinoid-1 受容体拮抗薬によって誘発されたイヌの骨格筋および心筋の障害において 2HG および hexanoylcarnitine が増加したことを報告していることから、2HG および hexanoylcarnitine は、イヌにおいても骨格筋毒性のバイオマーカー候補であると考えられる。CER 投与ラットの血漿 2HG レベルは、病理組織学的変化の発現および血漿 CK

レベルの増加に先立って、Day 8 に増加した。また、TMPD 投与ラットの血漿中 2HG および hexanoylcarnitine レベルは病理組織学的変化に伴って上昇したが、血漿中 CK レベルは変化しなかった。これらの結果は、血漿 2HG および hexanoylcarnitine が骨格筋障害の早期段階において CK よりも感度が高いことを示唆している。

対照的に、TMPD 投与 6 時間後には病理組織学的変化がみられたにもかかわらず、血漿 2HG および CK レベルは増加しなかった。TMPD 投与ラットでみられた血漿 2HG および CK レベルと病理組織学的変化との間のこの不一致の理由は明らかではないが、骨格筋障害の重篤度と関連している可能性がある。軽度の骨格筋病変は主に細胞質の空胞化からなることが知られており、このような病理学的変化では、血漿 2HG および CK レベルは骨格筋中濃度を反映しないかもしれない。実際、過去の研究において、T 管系の空胞化を特徴とするスタチン関連筋障害では血漿 CK の上昇がみられないことが示唆されている (Mohaupt *et al.*, 2009)。対照的に、CER 群の血漿 CK レベルは対照群の 100 倍以上に増加したが、血漿 2HG および hexanoylcarnitine レベルの増加は約 2.5 倍であった。したがって、CER 群の Day 11 にみられるような比較的重度の筋障害においては、血漿中 CK は血漿中 2HG および hexanoylcarnitine よりも感度が高いと考えられる。

我々が知る限り、これはラットにおける化学物質誘発性骨格筋障害での血漿 2HG および hexanoylcarnitine レベルの増加を示す最初の報告である。しかしながら、今回の研究にはいくつかの課題が残されている。①本実験では、ラットを用いたメタボロミクス

解析による骨格筋障害マーカーの探索に焦点を当てたため、今後は total CK 以外の骨格筋障害マーカー（AST、CK-MM、sTnI、Myl3 および FABP3 など）と比較することで新たな知見が得られるであろう。②本研究での内因性代謝物の変動は対照群に対する相対的評価であり、今後は定量的評価が必要である。③臓器または種特異性を検討するため、他の毒性モデルあるいは動物種を用いたさらなる研究が望まれる。

本章の検討において、血漿中 2HG および hexanoylcarnitine は、薬剤誘発性骨格筋障害ラットにおいて CK よりも感度の優れた新たなバイオマーカー候補であることが示唆された。

小括

本章の検討において、薬剤誘発性骨格筋障害ラットにおける CK よりも感度の優れた新たなバイオマーカー候補として、血漿中 2HG および hexanoylcarnitine を見出し、毒性研究におけるバイオマーカー探索のためのメタボロミクス手法の価値を実証した。

第2章 新規骨格筋障害バイオマーカーとしての血漿中 2HG 濃度の有用性検討

小序

第1章の結果から、化合物で誘発したラットの骨格筋障害の初期段階において、血漿中 2HG および hexanoylcarnitine は CK と比較して骨格筋障害に対する感度が優れていることが明らかとなった。骨格筋毒性は致命的な横紋筋融解症に進展する可能性があることから、骨格筋毒性の早期検出は臨床および創薬の観点からも重要である。しかしながら、骨格筋障害マーカーとして血漿中 2HG および hexanoylcarnitine を研究している報告は他にはなく、さらなる研究が必要である。

血漿 2HG はミトコンドリアおよび細胞質で産生され (Prensner and Chinnaiyan, 2011)、ミトコンドリア障害によって増加すると考えられている (Oldham *et al.*, 2015)。ミトコンドリアはエネルギーを産生する細胞内小器官であり、ミトコンドリアに異常が生じると、大量のエネルギーを必要とする骨格筋および中枢神経系に異常が現れる。このことから、本章では血漿 2HG に着目し、バイオマーカーとしての血漿 2HG の有用性を調べることを目的に、血漿 2HG の筋障害に対する感度を AST、CK、および骨格筋由来の CK アイソザイム (CK-MM) と比較し、週齢差、および反復採血の影響について検討した。

実験材料および方法

動物

3 あるいは 8 週齢の雄性 F344/DuCrIj ラット（日本チャールズ・リバー株式会社）各 20 例を、相対湿度 30~70%、室温 21~26°C、照明 12 時間（午前 7 時~午後 7 時）に設定した試験室にてステンレス鋼ワイヤブラケットケージに群飼育し、1 週間馴化飼育中したのち 4 あるいは 9 週齢で実験に供した。それぞれの週齢について、1 群につき 5 例で 4 群に群分けし、10 例を CER 投与に、残りの 10 例を TMPD 投与に供した。飼料及び飲水（水道水）は自由に摂取させた。動物実験は、第一三共株式会社（Tokyo, Japan）の動物実験委員会の承認下で実施した。

4 週齢（immature）ラット

CER 群には、CER を 0 ppm（粉末飼料 CRF-1）あるいは 20 ppm の濃度で 10 日間混餌投与し、投与開始日を Day 1 として Day 11 に剖検した。

TMPD 群には、TMPD 0 mg/kg（溶媒：0.5%メチルセルロース溶液）あるいは 9 mg/kg を単回強制経口投与し、投与 24 時間後に剖検した。飼料は固形飼料 CRF-1 を摂取させた。

9 週齢 (young adult) ラット

CER 群には、CER を 0 ppm (粉末飼料 CRF-1) あるいは 40 ppm の濃度で 10 日間混餌投与し、投与開始日を Day 1 として Day 11 に剖検した。

TMPD 群には、TMPD 0 mg/kg (溶媒 : 0.5%メチルセルロース溶液) あるいは 9 mg/kg を単回強制経口投与し、投与 24 時間後に剖検した。飼料は固形飼料 CRF-1 を摂取させた。

剖検および採材

血漿 2HG 測定のために、CER 群は Day 4、8、11、TMPD 群は投与 6、24 時間後に、頸静脈から血液約 100 μ L を採取した。麻酔が血漿 2HG に及ぼす影響は不明であるため、同一個体から無麻酔下で反復採血した。血液はヘパリンで処理し、遠心分離 (15,000 rpm、10 秒) 後に血漿を -80°C に保存した。血漿 AST、CK、および CK-MM 測定のために、血漿 2HG 測定用の最終採血終了後 (CER 群は Day 11、TMPD 群は投与 24 時間後) に、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血した後、放血安楽死させ速やかに剖検して大腿直筋を採取した。血液はヘパリン処理し、遠心分離 (3000 rpm、15 分間) 後に血漿を -80°C に保存した。大腿直筋は、病理組織学的検査用に 10%中性緩衝ホルマリンで固定した。

血漿 2HG 測定

血漿 40 μL にメタノール 120 μL を加えた後、遠心分離 (3,000 rpm、5 分間) して除タンパクした。次に、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 用にそれぞれの上清画分 100 μL と水 100 μL を混合した。その後、上清を Oasis MAX $\mu\text{Elution}$ plate (Waters Corporation, Milford, MA, USA) で前処理した。各ライセート 80 μL に 100 μL の d_5 -3HG (2 μM) を内部標準として添加し、さらに水 20 μL を加えた。混合物を抽出プレートに移し、メタノール 200 μL および水 200 μL でプレコンディショニングした。次いで、抽出プレートを 50%メタノール 200 μL で洗浄し、ギ酸 2%を含むメタノール 100 μL で分析対象物質を溶出した。溶離液を水 100 μL と混合し、混合物を ACQUITY UPLC 装置 (Waters Corporation) および Xevo TQ MS 装置 (Waters Corporation) からなる LC-MS/MS システムに注入した。分析対象物質および内部標準を Hypercarb column (2.1mm \times 150mm, 5 μm ; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) を用いて外因性物質から分離した。移動相 A はメタノール/水/ギ酸 (100/900/5, v/v/v)、移動相 B はメタノール/水/ギ酸 (900/100/5, v/v/v) からなり、流速は 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ とした。分析対象物質および内部標準を、陰イオンモードでのエレクトロスプレーイオン化法でイオン化し、質量電荷比 147 \sim 129 および 152 \sim 89 の多重反応モニタリングトランジションでそれぞれ検出した。キャピラリー電圧は 2.0 kV、ソース温度は 150 $^{\circ}\text{C}$ 、脱溶媒和温度は 600 $^{\circ}\text{C}$ とした。

血漿 AST、CK、CK-MM 測定

血漿 AST および CK 濃度は、標準的な市販のアッセイキット(L-Type Wako; 和光純薬工業株式会社, Osaka, Japan) を用い、自動分析装置 (7180; 日立ハイテクノロジーズ株式会社, Tokyo, Japan) で測定した。CK-MM は高速自動電気泳動装置 (REP8JF71000; 株式会社ヘレナ研究所, Saitama, Japan) を用いて測定した。

病理組織学的検査

骨格筋障害の発生を確認するため、第 1 章で観察した 3 つの骨格筋 (ヒラメ筋、大腿直筋、前脛骨筋) の中で、CER 群で確認された壊死の重篤度および変化がみられた例数を根拠に最も重篤な変化を示したと判断した大腿直筋を使用した。ホルマリンで固定した大腿直筋を常法に従って脱水・パラフィン包埋して薄切病理組織標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。作製した病理組織標本は、光学顕微鏡で検査した。病理組織学的変化は、Mann らの分類 (Mann *et al.*, 2012) を参考に重篤度に応じて正常 (-)、軽度 (+)、中等度 (++) または重度 (+++) の範囲で評価した。

統計解析

定量的データは平均値±標準偏差で表示した。対照群および投与群間で、F 検定によ

る結果が P 値 < 0.05 の場合は Welch の t 検定を、F 検定による結果が P 値 > 0.05 の場合は Student の t 検定を行い、検定結果の P 値 < 0.05 を有意な差とみなした。統計解析はすべて、SAS[®]System Release 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。

結果

血漿中 2HG 濃度

CER 群および TMPD 群の血漿中 2HG 濃度を測定し、それぞれの対照群と比較した。

9 週齢の CER 群のラット 5 例のうち 1 例は、大林らの報告 (Obayashi *et al.*, 2011) と同様に全身状態の悪化を伴い Day 11 に死亡したため、4 例で評価した。血漿中 2HG 濃度は、CER 群の Day 8 以降、TMPD 群の投与 6 時間後以降に増加傾向を示した。一方、反復採血は血漿中 2HG 濃度に影響しなかった。

4 週齢では、CER 群の Day 4 に血漿中 2HG 濃度の有意な変化はみられなかったが、Day 8 (CER 群 : 2.20 ± 0.37 、対照群 : $1.60 \pm 0.20 \mu\text{M}$ 、 $P < 0.05$) および Day 11 (CER 群 : 2.53 ± 0.53 、対照群 : $1.29 \pm 0.16 \mu\text{M}$ 、 $P < 0.01$) に有意に高値を示した (Fig. 1A)。TMPD 群は、投与 6 時間後 (TMPD 群 : 1.87 ± 0.38 、対照群 : $1.36 \pm 0.21 \mu\text{M}$ 、 $P < 0.05$) および 24 時間後 (TMPD 群 : 2.28 ± 0.35 、対照群 : 1.85 ± 0.21 、 $P < 0.05$) に有意に高値を示した (Fig. 1B)。

9 週齢では、CER 群の Day 8 (CER 群 : 1.74 ± 0.26 、対照群 : $1.31 \pm 0.12 \mu\text{M}$ 、 $P < 0.05$) に有意に高値を示した (Fig. 1C)。さらに、9 週齢の TMPD 群の投与 24 時間後 (TMPD 群 : 1.87 ± 0.37 、対照群 : $1.30 \pm 0.27 \mu\text{M}$ 、 $P < 0.05$) に有意に高値を示した (Fig. 1D)。

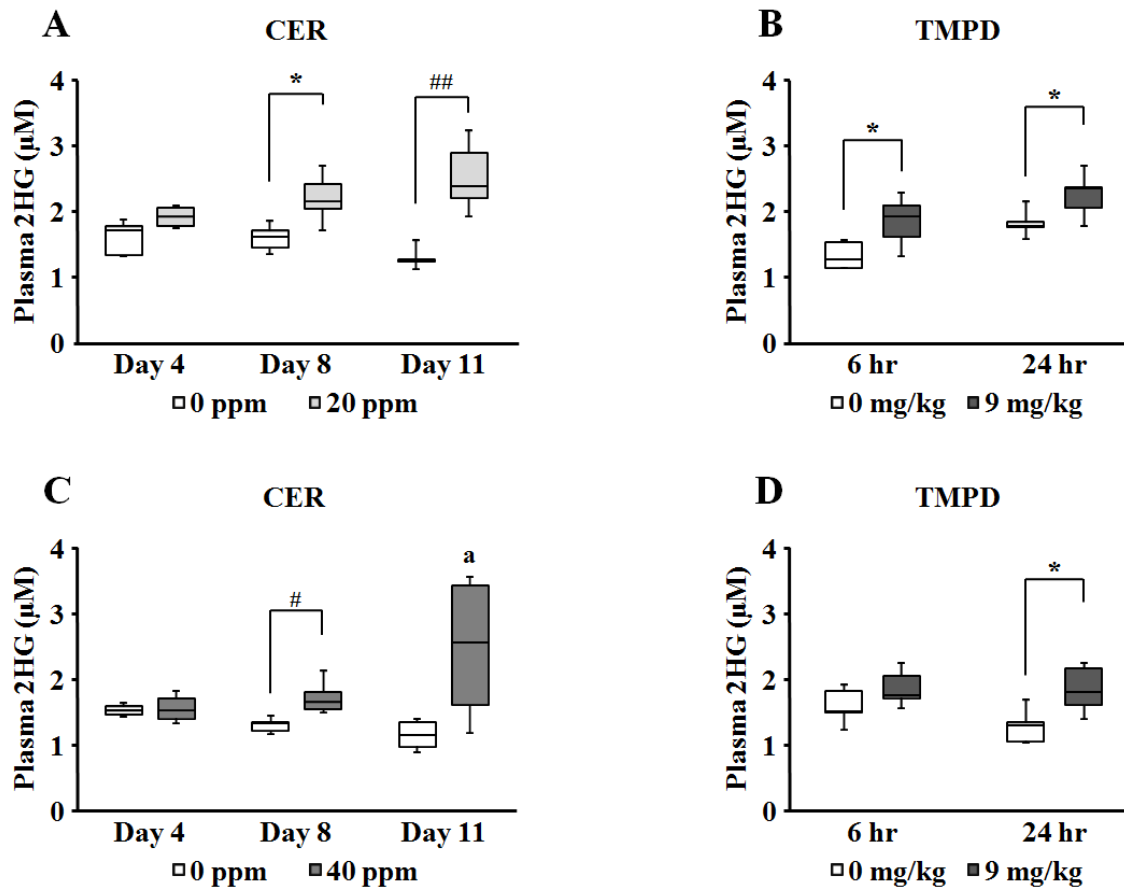


Figure. 1. Box-and-whisker plots of plasma 2-hydroxyglutarate (2HG) levels: (A) in 4-week-old rats treated with 0 or 20 ppm CER; (B) in 4-week-old rats treated with 0 or 9 mg/kg TMPD; (C) in 9-week-old rats treated with 0 or 40 ppm CER; and (D) in 9-week-old rats treated with 0 or 9 mg/kg TMPD for the indicated times after dosing. The box represents the middle 50% of the distribution, and the upper and lower whiskers represent the entire spread of the data ($n = 5$ per group; a, $n = 4$ per group because of death). The horizontal line indicates the median.

* $P < 0.05$ compared with the control group using the Student's t -test. # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$

compared with the control group using the Aspin–Welch *t*-test. CER, cerivastatin Na; TMPD, tetramethyl-*p*-phenylenediamine.

血漿中 AST、CK および CK-MM 活性

CER あるいは TMPD を投与された 4 週齢 (Fig. 2A、2B) および 9 週齢 (Fig. 2C、2D) ラットにおいて、血漿 AST、CK および CK-MM 活性を測定し、それぞれの対照群と比較した。CER 群では 4 週齢および 9 週齢ラットのいずれにおいても、AST、CK および CK-MM は高値を示した。4 週齢では CER 群の Day 11 で AST、CK、CK-MM が有意 ($P < 0.01$) に高値を示した (Fig. 2A)。TMPD 群の投与 24 時間後に AST のみが有意 ($P < 0.001$) に高値を示した (Fig. 2B) が、CK および CK-MM の変化は明らかではなかった。

9 週齢では、CER 群の AST が対照群に比べて有意 ($P < 0.05$) に高値を示したが、CK および CK-MM に統計学的有意差は認められなかった (Fig. 2C)。TMPD 群の AST、CK、CK-MM は対照群との間に差は認められなかった (Fig. 2D)。

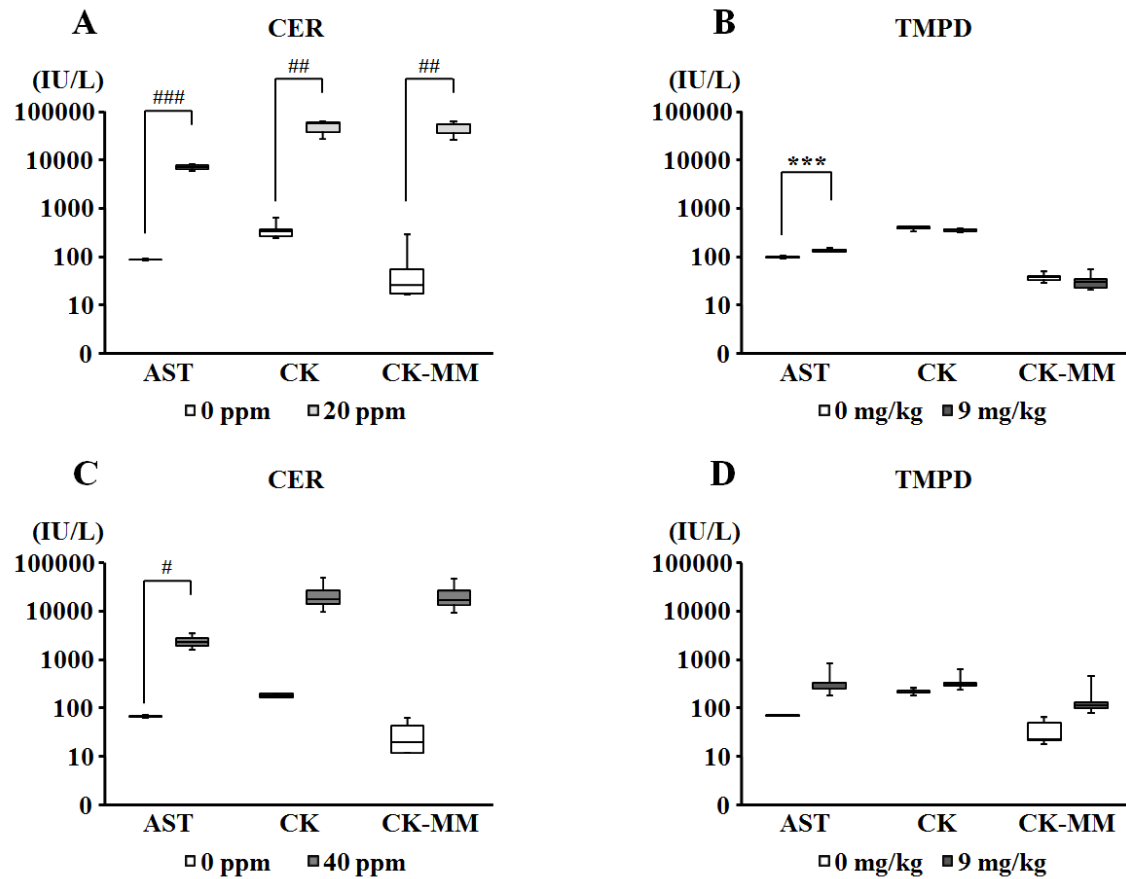


Figure 2. Box-and-whisker plots of plasma aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK), and muscle-type CK (CK-MM) levels: (A) in 4-week-old rats treated with 0 or 20 ppm CER, measured on day 11 (n = 5 per group); (B) in 4-week-old rats treated with 0 or 9 mg/kg TMPD, measured at 24 hr after dosing (n = 5 per group); (C) in 9-week-old rats treated with 0 or 40 ppm CER, measured on day 11, (n = 4 per group); and (D) in 9-week-old rats treated with 0 or 9 mg/kg TMPD at 24 hr after dosing (n = 5 per group). The box represents the middle 50% of the distribution, and the upper and lower whiskers represent the entire spread of the data. The horizontal line indicates the median. #P < 0.05, ##P < 0.01, and ###P < 0.001 compared with

the control group using the Aspin–Welch t-test. *** $P < 0.001$ compared with the control group using the Student’s t-test. CER, cerivastatin Na; TMPD, tetramethyl-p-phenylenediamine.

病理組織学的検査

対照群のいずれの大腿直筋にも異常所見は認められなかった (Table 1 および 2、Fig. 3A-D)。CER 群では、4 週齢 (Table 1、Fig. 3E) および 9 週齢 (Table 2、Fig. 3G) ラットの全例の大腿直筋で中等度の空胞化 (Fig. 3E および 3G の矢印)、壊死、および細胞浸潤を認めた。TMPD 群では、4 週齢 (Table 1、Fig. 3F) および 9 週齢 (Table 2、Fig. 3H) ラットで、筋線維の中等度の空胞化 (Fig. 3F および 3H の矢印) および少数の壊死が認められた。

Table 1. Histopathology of the rectus femoris muscle in 4-week-old rats treated with

cerivastatin or tetramethyl-*p*-phenylenediamine.

Observation	CER		TMPD	
	0 ppm n = 5	20 ppm n = 5	0 mg/kg n = 5	9 mg/kg n = 5
Vacuolar degeneration, muscle fibers	–	++ (5)	–	++ (5)
Necrosis, muscle fibers	–	++ (5)	–	+ (4)
Cellular infiltration	–	+/ (5)	–	–

Grade: –, within normal limits; +, slight injury; +/+, slight to moderate injury; ++, moderate injury. Numbers in parentheses represent the number of animals with pathological changes. CER, cerivastatin Na; TMPD, tetramethyl-*p*-phenylenediamine.

Table 2. Histopathology of the rectus femoris muscle in 9-week-old rats treated with

cerivastatin or tetramethyl-*p*-phenylenediamine.

Observation	CER		TMPD	
	0 ppm n = 5	40 ppm n = 4	0 mg/kg n = 5	9 mg/kg n = 5
Vacuolar degeneration, muscle fibers	–	++ (4)	–	++ (5)
Necrosis, muscle fibers	–	++ (4)	–	+ (1)
Cellular infiltration	–	+ (4)	–	–

Grade: –, within normal limits; +, slight injury; +/+, slight to moderate injury; ++, moderate injury. Numbers in parentheses represent the number of animals with pathological changes.

CER, cerivastatin Na; TMPD, tetramethyl-*p*-phenylenediamine.

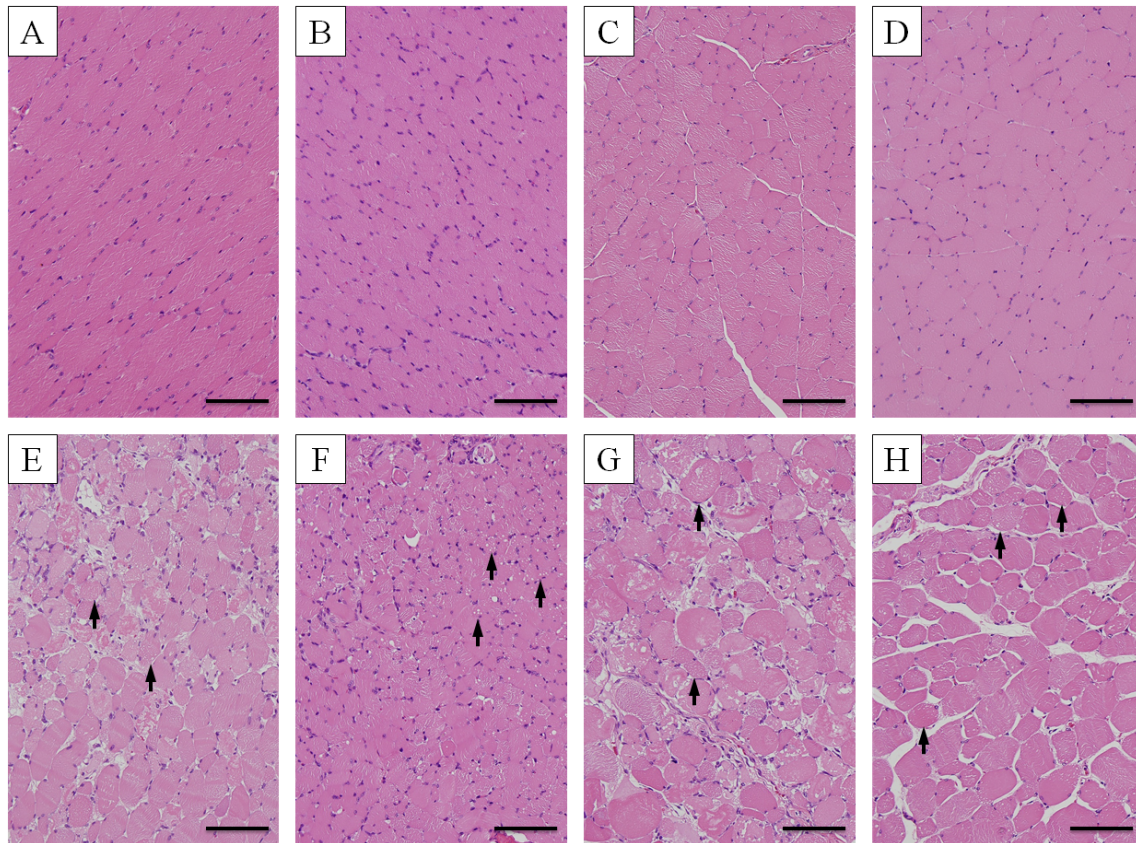


Figure. 3. Histopathological analysis of muscle fibers. Rectus femoris muscle tissues from 4-week-old rats treated with 0 ppm CER (A) or 20 ppm CER (E) were collected on day 11, and those from 4-week-old rats treated with 0 mg/kg TMPD (B) or 9 mg/kg TMPD (F) were collected at 24 hr after dosing. Tissues from 9-week-old rats treated with 0 ppm CER (C) or 40 ppm CER (G) were collected on day 11, and those from 9-week-old rats treated with 0 mg/kg TMPD (D) or 9 mg/kg TMPD (H) were collected at 24 hr after dosing. The following findings were noted: (A–D) no abnormalities; (E, G) marked variation in fiber sizes, with moderately vacuolated (arrow) and moderately necrotic fibers; (F, H) moderately vacuolated (arrow) and moderately necrotic fibers.

necrotic fibers. Hematoxylin and eosin staining. Scale bar = 100 μ m. CER, cerivastatin Na;

TMPD, tetramethyl-p-phenylenediamine.

考察

骨格筋毒性のバイオマーカーとしての血漿 2HG の有用性を評価するために、骨格筋障害ラットにおける 2HG の血漿中濃度を測定し、従来の骨格筋バイオマーカー (AST、CK、および CK-MM) と比較した。本章の新たな知見は以下の通りである。①TMPD 投与による軽度の骨格筋障害において、血漿 2HG は CK-MM よりも高感度であり、②血漿中 2HG 濃度は反復採血によって有意な影響を受けず、③骨格筋障害を有する 4 週齢 (immature) ラットと 9 週齢 (young adult) ラットとの間で血漿中 2HG 濃度に有意な差は認められなかった。血漿 2HG の骨格筋障害に対する感度が障害の初期段階では従来の骨格筋バイオマーカーより高感度であるという第 1 章の結果も再現された。これらの結果は、血漿 2HG が骨格筋毒性の有望な新規バイオマーカーとして有用であることを示唆している。

骨格筋は、その質量と豊富な血流量、およびミトコンドリアのエネルギー代謝のために、薬物による障害を受けやすい (Valiyil and Christopher-Stine, 2010)。骨格筋毒性の早期検出は新薬の開発に重要であり、これまで主に CK および AST の測定に依存してきた。これらのバイオマーカーは、ヒトの骨格筋障害を評価するための有用な手段であるが、非臨床では、測定値のばらつきの大きさおよび特にラットにおける筋特異性の低さによりの有用性が高いとはいえない (Bohlmeyer *et al.*, 1994; Sorichter *et al.*, 1999)。この

ため我々は、第 1 章においてラットにおける骨格筋障害に対する特異的かつ容易に検出可能なバイオマーカーを探索し、血漿 2HG を見出した (Obayashi *et al.*, 2017)。

本章では、異なる機序により骨格筋障害を誘発する CER および TMPD を用いた (Munday, 1988; Munday *et al.*, 1990; De Pinieux *et al.*, 1996; Nishimoto *et al.*, 2003)。病理組織学的解析により、CER または TMPD を投与されたラットの大腿直筋で骨格障害が確認され、病理組織学的変化は TMPD 群よりも CER 群でより重篤であった。骨格筋障害の発現は、CER 群では緩徐であったが、TMPD 群では急性であり、第 1 章の結果 (Obayashi *et al.*, 2017) と一致した。さらに、血漿 AST は 4 および 9 週齢の CER 群および 4 週齢の TMPD 群で有意に増加したが、9 週齢の TMPD 群では増加しなかった。CK または CK-MM については、CER 群 (9 週齢) または TMPD 群 (4 および 9 週齢) は対照群と比較して統計的有意差は認められなかったが、CER 群の CK および CK-MM は明らかに増加し、病理組織学的変化を反映していた。これらのデータは、CER 投与後に CK および CK-MM の上昇を伴う骨格筋障害が誘発されたことを示す報告 (Seachrist *et al.*, 2005) と一致した。

血漿 2HG は、4 週齢および 9 週齢ラットの CER 群および TMPD 群で有意に増加した。対照的に、AST は 9 週齢ラットの TMPD 群では有意な増加は認められなかった。さらに、CK および CK-MM は、9 週齢ラットの CER 群、4 週齢または 9 週齢の TMPD 群では有意な増加は認められなかった。また、血漿中 AST、CK、および CK-MM は、

TMPD 群よりも重篤な骨格筋障害を示した CER 群では 2HG と比較して大きく変動したが、TMPD 群ではそうではなかった。したがって、血漿 2HG はラットにおいて CK および CK-MM よりも感度の高い骨格筋障害バイオマーカーであると思われる。血漿 2HG が骨格筋障害の検出感度が高いメカニズムは不明である。考えられることは、CK は筋組織に常に豊富に存在し、障害時に筋細胞から漏出するが、2HG は骨格筋障害時に骨格筋組織で特異的に増加するということである (Obayashi *et al.*, 2017)。他に考えられる理由は、これらのマーカーの半減期の差である。血液中の AST の半減期は、ラットで約 2.3 時間、イヌで 3.3~4.4 時間、ヒトで 4~46 時間であり (Evans, 1996a)、CK の半減期は、ラットで約 0.6 時間、イヌで 0.6~16.2 時間 (Evans, 1996b)、ウサギで最大 9 時間、ヒトで 12 時間である (Walker, 2006)。我々が知る限り、2HG の血中半減期は不明であり、血液から消失することが困難であるかどうかは不明である。しかしながら、第 1 章のデータが再現されたことから、2HG はバイオマーカーとして有用であると思われる。

本章では、血漿 2HG に対する反復採血の影響についても検討した。4 週齢および 9 週齢ラットの対照群における血漿中 2HG 濃度は、それぞれ 1.12~2.18 μM および 0.89~1.94 μM であった。この血漿中 2HG 濃度の範囲は、過去の報告 (Dang *et al.*, 2016) と一致した。さらに、今回の実験では血漿 2HG レベルのばらつきが小さいことが示された。骨格筋障害の従来バイオマーカーである AST および CK は、破壊された細胞膜

から漏出し、採血時の穿刺による組織障害および溶血とともに血中レベルが増加する。実際に、CK 活性は血液サンプルの取扱い (Yerroum *et al.*, 1999; Goicoechea *et al.*, 2008) および採血部位 (Matsuzawa *et al.*, 1993) の違いにより、未処置ラットでも 100～1,300 IU/L とばらつくことが報告されている。このように、血漿 2HG は反復採血によって影響を受ける可能性は低い。

今回、骨格筋障害を誘発された 4 週齢および 9 週齢ラットで血漿 2HG が増加した。2HG は、動物の成長過程で変化するホルモンとは無関係に TCA 回路における代謝産物として産生されることが知られている (Prensner and Chinnaiyan, 2011)。したがって、2HG の血漿中濃度はラットの年齢とは無関係であると思われる。

血漿 2HG の増加は、骨格筋におけるミトコンドリア障害の存在を示唆している。スタチンで誘発した骨格筋障害におけるミトコンドリアの異常は、他のスタチン (シンバスタチン、ロスバスタチン、プラバスタチンなど) においてもヒトを含めた複数の動物種で一貫して観察されている (Bergman *et al.*, 2003; Gambelli *et al.*, 2004; Seachrist *et al.*, 2005; Sirvent *et al.*, 2005b; Westwood *et al.*, 2005; Westwood *et al.*, 2008)。筋肉は特にミトコンドリアが豊富で、必要とするエネルギー量を満たすために好気性代謝に大きく依存することから、TMPD によるミトコンドリアの酸化は TMPD の筋毒性発現に重要な役割を果たしている (Munday *et al.*, 1990)。2HG の蓄積は TCA 回路の電子の流れが変化し、電子伝達機構に影響があったことを示唆しており、CER および TMPD による筋障

害の一因と考えられる。

本研究にはいくつかの問題が残されている。骨格筋障害バイオマーカーとしての血漿 2HG の臓器または種特異性を評価しなかった。したがって、骨格筋毒性の他のモデル、ラットやその他の動物種における肝毒性、腎毒性または心毒性のモデルを含む他の一般的な毒性モデルでの血漿中 2HG 濃度の測定が必要と思われる。また、2HG が骨格筋障害バイオマーカーとして確立されるためには、血漿 2HG と sTnI、Myl3、および FABP3 などの他の骨格筋障害バイオマーカーとの比較が必要である。さらに、バイオマーカーとしての血漿 2HG の有用性を確認するためには、動物種、遺伝子系統、性別、年齢などのいくつかのパラメータに関する背景値も必要であろう。

本研究は、血漿 2HG が血漿 CK-MM よりも骨格筋障害と密接に関連していることを示し、血漿 2HG のモニターが非臨床および臨床における骨格筋毒性の検出に貢献することを示唆している。さらに、検査のたびに動物を安楽死させることなく、同じ動物から繰り返し採血して測定できることから、骨格筋障害バイオマーカーとして血漿 2HG を用いることにより、創薬研究、特に毒性試験における動物数を減らすことができる。

結論として、本章では血漿 2HG が軽度の骨格筋毒性を検出するための有望なバイオマーカー候補であることを示した。血漿 2HG は CK および CK-MM よりも感度が高く、ラットの週齢（4 週齢と 9 週齢）および反復採血による差は認められなかった。

小括

本章の研究において、血漿中 2HG は初期の骨格筋障害において CK および CK-MM より高感度であること、さらに週齢差および反復採血の影響が認められないことが示され、骨格筋毒性評価に有用である可能性が示唆された。

第3章 総括および結論

CER あるいは TMPD で骨格筋障害を誘発したラットにおいて、メタボロミクス解析によって骨格筋障害のバイオマーカー候補を探索し、血漿中 2HG を見出した。血漿中 2HG のバイオマーカーとしての有用性を検討した結果、2HG は初期の骨格筋障害において CK および CK-MM より高感度であること、週齢差および反復採血の影響がみられないことから、毒性評価に有用なマーカーであることが示唆された。本研究は、2HG のバイオマーカーとしての新たな知見を示すとともに、骨格筋障害を早期に検出するバイオマーカー研究のための有用な基礎情報になると考える。

謝辞

稿を終えるにあたり、本論文の執筆に対し、終始懇切なるご指導とご校閲を賜りました麻布大学薬理学研究室 浅井史敏 教授に深甚の謝意を表します。また、本論文をご精読いただきました同学部小動物臨床研究室 斑目広郎 教授ならびに同学部薬理学研究室 白井明志 准教授に深謝致します。

博士課程への進学にあたり、温かいご支援を頂きました第一三共株式会社 高崎渉 博士、森和彦 博士、古川忠司 博士に深く感謝致します。加えて、研究の細部にわたり、絶えず有意義なご指導を頂きました第一三共生命科学研究振興財団 矢本敬 博士に心から御礼申し上げます。

さらに、本研究を進めるにあたり、実験にご協力いただきました第一三共株式会社 根津義和 氏、小林尚子 氏らをはじめとする第一三共株式会社の方々に心から感謝致します。

最後に、これまで応援し常に支えてくれた家族に深い感謝の意を表して謝辞と致します。

引用文献

Hay, M., Thomas, D.W., Craighead, J.L., *et al.* (2014): Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat. Biotechnol.*, **32**, 40-51.

Paul, S.M., Mytelka, D.S., Dunwiddie, C.T., *et al.* (2010): How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature reviews. Drug discovery*, **9**, 203-214.

Arrowsmith, J. (2011): Trial watch: Phase II failures: 2008-2010. *Nature reviews. Drug discovery*, **10**, 328-329.

Allison, M. (2012): Reinventing clinical trials. *Nat. Biotechnol.*, **30**, 41-49.

Olson, H., Betton, G., Robinson, D., *et al.* (2000): Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **32**, 56-67.

Sistare, F.D. and DeGeorge, J.J. (2007): Preclinical predictors of clinical safety: opportunities for improvement. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **82**, 210-214.

Campion, S., Aubrecht, J., Boekelheide, K., *et al.* (2013): The current status of biomarkers for predicting toxicity. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, **9**, 1391-1408.

Kola, I. and Landis, J. (2004): Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature reviews. Drug discovery*, **3**, 711-715.

- Biomarkers Definitions Working Group (2001): Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **69**, 89-95.
- Clarkson, P.M. and Hubal, M.J. (2002): Exercise-induced muscle damage in humans. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, **81**, S52-69.
- Goodwin, D.W. (2011): Imaging of skeletal muscle. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, **37**, 245-251, vi-vii.
- Nozaki, M., Suzuki, T. and Hirano, M. (2004): Rhabdomyolysis associated with omeprazole. *J. Gastroenterol.*, **39**, 86.
- Oshima, Y. (2011): Characteristics of drug-associated rhabdomyolysis: analysis of 8,610 cases reported to the U.S. Food and Drug Administration. *Intern. Med.*, **50**, 845-853.
- Tanaka, K., Nakada, T.A., Abe, R., *et al.* (2014): Omeprazole-associated rhabdomyolysis. *Crit Care*, **18**, 462.
- Bagley, W.H., Yang, H. and Shah, K.H. (2007): Rhabdomyolysis. *Internal and emergency medicine*, **2**, 210-218.
- Joy, T.R. and Hegele, R.A. (2009): Narrative review: statin-related myopathy. *Ann. Intern. Med.*, **150**, 858-868.
- Kashani, A., Phillips, C.O., Foody, J.M., *et al.* (2006): Risks associated with statin therapy: a systematic overview of randomized clinical trials. *Circulation*, **114**, 2788-2797.

- Owczarek, J., Jasinska, M. and Orszulak-Michalak, D. (2005): Drug-induced myopathies. An overview of the possible mechanisms. *Pharmacological reports* : PR, **57**, 23-34.
- Kuncl, R.W. (2009): Agents and mechanisms of toxic myopathy. *Curr. Opin. Neurol.*, **22**, 506-515.
- Abassi, Z.A., Hoffman, A. and Better, O.S. (1998): Acute renal failure complicating muscle crush injury. *Semin. Nephrol.*, **18**, 558-565.
- Singh, D., Chander, V. and Chopra, K. (2005): Rhabdomyolysis. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **27**, 39-48.
- Wu, A.H. and Perryman, M.B. (1992): Clinical applications of muscle enzymes and proteins. *Curr. Opin. Rheumatol.*, **4**, 815-820.
- Brancaccio, P., Lippi, G. and Maffulli, N. (2010): Biochemical markers of muscular damage. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **48**, 757-767.
- Matsumura, T., Saito, T., Fujimura, H., *et al.* (2007): Cardiac troponin I for accurate evaluation of cardiac status in myopathic patients. *Brain Dev.*, **29**, 496-501.
- Van Hoof, V. (2012): Skeletal muscle biomarkers in heart disease. *Biomarkers in medicine*, **6**, 5-8.
- Shepherd, J., Hunninghake, D.B., Stein, E.A., *et al.* (2004): Safety of rosuvastatin. *Am. J. Cardiol.*, **94**, 882-888.

- Lee, D.S. and Vasan, R.S. (2005): Novel markers for heart failure diagnosis and prognosis. *Curr. Opin. Cardiol.*, **20**, 201-210.
- Okinaka, S., Kumagai, H., Ebashi, S., *et al.* (1961): Serum creatine phosphokinase. Activity in progressive muscular dystrophy and neuromuscular diseases. *Arch. Neurol.*, **4**, 520-525.
- Zatz, M., Rapaport, D., Vainzof, M., *et al.* (1991): Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.*, **102**, 190-196.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., *et al.* (1992): Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.*, **281** (Pt 1), 21-40.
- Gunst, J.J., Langlois, M.R., Delanghe, J.R., *et al.* (1998): Serum creatine kinase activity is not a reliable marker for muscle damage in conditions associated with low extracellular glutathione concentration. *Clin. Chem.*, **44**, 939-943.
- Cherian, A.G. and Hill, J.G. (1978): Age dependence of serum enzymatic activities (alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, and creatine kinase) in healthy children and adolescents. *Am. J. Clin. Pathol.*, **70**, 783-789.
- Morandi, L., Angelini, C., Prella, A., *et al.* (2006): High plasma creatine kinase: review of the

literature and proposal for a diagnostic algorithm. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, **27**, 303-311.

Ishikawa, M., Maekawa, K., Saito, K., *et al.* (2014): Plasma and serum lipidomics of healthy white adults shows characteristic profiles by subjects' gender and age. *PloS one*, **9**, e91806.

Matsuzawa, T., Nomura, M. and Unno, T. (1993): Clinical pathology reference ranges of laboratory animals. Working Group II, Nonclinical Safety Evaluation Subcommittee of the Japan Pharmaceutical Manufacturers Association. *J. Vet. Med. Sci.*, **55**, 351-362.

Bohlmeyer, T.J., Wu, A.H. and Perryman, M.B. (1994): Evaluation of laboratory tests as a guide to diagnosis and therapy of myositis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, **20**, 845-856.

Sorichter, S., Puschendorf, B. and Mair, J. (1999): Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury. *Exerc. Immunol. Rev.*, **5**, 5-21.

Koseoglu, M., Hur, A., Atay, A., *et al.* (2011): Effects of hemolysis interferences on routine biochemistry parameters. *Biochem. Med. (Zagreb)*, **21**, 79-85.

Ballard, K.D., Parker, B.A., Capizzi, J.A., *et al.* (2013): Increases in creatine kinase with atorvastatin treatment are not associated with decreases in muscular performance.

- Atherosclerosis, **230**, 121-124.
- Laaksonen, R. (2013): STOMPing forward: statins, muscle complaints and CK. *Atherosclerosis*, **230**, 256-257.
- Muntean, D.M., Thompson, P.D., Catapano, A.L., *et al.* (2017): Statin-associated myopathy and the quest for biomarkers: can we effectively predict statin-associated muscle symptoms? *Drug Discov Today*, **22**, 85-96.
- Tonomura, Y., Matsushima, S., Kashiwagi, E., *et al.* (2012): Biomarker panel of cardiac and skeletal muscle troponins, fatty acid binding protein 3 and myosin light chain 3 for the accurate diagnosis of cardiotoxicity and musculoskeletal toxicity in rats. *Toxicology*, **302**, 179-189.
- Johnson, C.H., Ivanisevic, J. and Siuzdak, G. (2016): Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 451-459.
- Monteiro, M.S., Carvalho, M., Bastos, M.L., *et al.* (2013): Metabolomics analysis for biomarker discovery: advances and challenges. *Curr. Med. Chem.*, **20**, 257-271.
- Tomlinson, L., Tirmenstein, M.A., Janovitz, E.B., *et al.* (2012): Cannabinoid receptor antagonist-induced striated muscle toxicity and ethylmalonic-adipic aciduria in beagle dogs. *Toxicol. Sci.*, **129**, 268-279.
- Mann, P.C., Vahle, J., Keenan, C.M., *et al.* (2012): International harmonization of toxicologic

- pathology nomenclature: an overview and review of basic principles. *Toxicol. Pathol.*, **40** (Suppl), 7S-13S.
- Greaves, P., Chouinard, L., Ernst, H., *et al.* (2013): Proliferative and non-proliferative lesions of the rat and mouse soft tissue, skeletal muscle and mesothelium. *Journal of toxicologic pathology*, **26**, 1S-26S.
- Evans, A.M., DeHaven, C.D., Barrett, T., *et al.* (2009): Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Anal. Chem.*, **81**, 6656-6667.
- Dehaven, C.D., Evans, A.M., Dai, H., *et al.* (2010): Organization of GC/MS and LC/MS metabolomics data into chemical libraries. *J Cheminform*, **2**, 9.
- Xia, J. and Wishart, D.S. (2016): Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Current protocols in bioinformatics*, **55**, 14.10.11-14.10.91.
- Flint, O.P., Masters, B.A., Gregg, R.E., *et al.* (1997): HMG CoA reductase inhibitor-induced myotoxicity: pravastatin and lovastatin inhibit the geranylgeranylation of low-molecular-weight proteins in neonatal rat muscle cell culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **145**, 99-110.
- Nishimoto, T., Tozawa, R., Amano, Y., *et al.* (2003): Comparing myotoxic effects of squalene

- synthase inhibitor, T-91485, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors in human myocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **66**, 2133-2139.
- Obayashi, H., Nezu, Y., Yokota, H., *et al.* (2011): Cerivastatin induces type-I fiber-, not type-II fiber-, predominant muscular toxicity in the young male F344 rats. *J. Toxicol. Sci.*, **36**, 445-452.
- Waclawik, A.J., Lindal, S. and Engel, A.G. (1993): Experimental lovastatin myopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **52**, 542-549.
- Schaefer, W.H., Lawrence, J.W., Loughlin, A.F., *et al.* (2004): Evaluation of ubiquinone concentration and mitochondrial function relative to cerivastatin-induced skeletal myopathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **194**, 10-23.
- Westwood, F.R., Scott, R.C., Marsden, A.M., *et al.* (2008): Rosuvastatin: characterization of induced myopathy in the rat. *Toxicol. Pathol.*, **36**, 345-352.
- De Pinieux, G., Chariot, P., Ammi-Saïd, M., *et al.* (1996): Lipid-lowering drugs and mitochondrial function: effects of HMG-CoA reductase inhibitors on serum ubiquinone and blood lactate/pyruvate ratio. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **42**, 333-337.
- Sirvent, P., Mercier, J., Vassort, G., *et al.* (2005a): Simvastatin triggers mitochondria-induced Ca²⁺ signaling alteration in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **329**, 1067-1075.

- Kaufmann, P., Török, M., Zahno, A., *et al.* (2006): Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 2415-2425.
- Reijneveld, J.C., Koot, R.W., Bredman, J.J., *et al.* (1996): Differential effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors on the development of myopathy in young rats. *Pediatr. Res.*, **39**, 1028-1035.
- Westwood, F.R., Bigley, A., Randall, K., *et al.* (2005): Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution, development, and fibre selectivity. *Toxicol. Pathol.*, **33**, 246-257.
- Phillips, P.S. and Haas, R.H. (2008): Statin myopathy as a metabolic muscle disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, **6**, 971-978.
- Munday, R. (1988): Generation of superoxide radical, hydrogen peroxide and hydroxyl radical during the autoxidation of N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine. *Chem. Biol. Interact.*, **65**, 133-143.
- Munday, R., Manns, E., Fowke, E.A., *et al.* (1989): Muscle necrosis by N-methylated p-phenylenediamines in rats: structure-activity relationships and correlation with free-radical production in vitro. *Toxicology*, **57**, 303-314.
- Schirris, T.J., Ritschel, T., Herma Renkema, G., *et al.* (2015): Mitochondrial ADP/ATP exchange inhibition: a novel off-target mechanism underlying ibipinabant-induced myotoxicity. *Sci Rep*, **5**, 14533.

- Bartlett, K. and Eaton, S. (2004): Mitochondrial beta-oxidation. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 462-469.
- Bieber, L.L. (1988): Carnitine. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 261-283.
- Latini, A., da Silva, C.G., Ferreira, G.C., *et al.* (2005): Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol. Genet. Metab.*, **86**, 188-199.
- Intlekofer, A.M., Dematteo, R.G., Venneti, S., *et al.* (2015): Hypoxia Induces Production of L-2-Hydroxyglutarate. *Cell Metab*, **22**, 304-311.
- Rzem, R., Veiga-da-Cunha, M., Noël, G., *et al.* (2004): A gene encoding a putative FAD-dependent L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase is mutated in L-2-hydroxyglutaric aciduria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 16849-16854.
- Dang, L., Yen, K. and Attar, E.C. (2016): IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Ann. Oncol.*, **27**, 599-608.
- Bergman, M., Salman, H., Djaldetti, M., *et al.* (2003): Ultrastructure of mouse striated muscle fibers following pravastatin administration. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **24**, 417-420.
- Gambelli, S., Dotti, M.T., Malandrini, A., *et al.* (2004): Mitochondrial alterations in muscle biopsies of patients on statin therapy. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **36**, 85-89.
- Seachrist, J.L., Loi, C.M., Evans, M.G., *et al.* (2005): Roles of exercise and pharmacokinetics in cerivastatin-induced skeletal muscle toxicity. *Toxicol. Sci.*, **88**, 551-561.

- Sirvent, P., Bordenave, S., Vermaelen, M., *et al.* (2005b): Simvastatin induces impairment in skeletal muscle while heart is protected. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1426-1434.
- Munday, R., Manns, E., Fowke, E.A., *et al.* (1990): Structure-activity relationships in the myotoxicity of ring-methylated p-phenylenediamines in rats and correlation with autoxidation rates in vitro. *Chem. Biol. Interact.*, **76**, 31-45.
- Mohaupt, M.G., Karas, R.H., Babiychuk, E.B., *et al.* (2009): Association between statin-associated myopathy and skeletal muscle damage. *CMAJ*, **181**, E11-18.
- Prensner, J.R. and Chinnaiyan, A.M. (2011): Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer. *Nat. Med.*, **17**, 291-293.
- Oldham, W.M., Clish, C.B., Yang, Y., *et al.* (2015): Hypoxia-Mediated Increases in L-2-hydroxyglutarate Coordinate the Metabolic Response to Reductive Stress. *Cell Metab*, **22**, 291-303.
- Valiyil, R. and Christopher-Stine, L. (2010): Drug-related myopathies of which the clinician should be aware. *Current rheumatology reports*, **12**, 213-220.
- Obayashi, H., Kobayashi, N., Nezu, Y., *et al.* (2017): Plasma 2-hydroxyglutarate and hexanoylcarnitine levels are potential biomarkers for skeletal muscle toxicity in male Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Sci.*, **42**, 385-396.

- Evans, G.O. (1996a): General enzymology. In: Animal Clinical Chemistry: A Primer for Toxicologists (Evans, G.O., ed.), pp. 54-65, Taylor & Francis, London.
- Evans, G.O. (1996b): Assessment of cardiotoxicity and myotoxicity. In: Animal Clinical Chemistry: A Primer for Toxicologists (Evans, G.O., ed.), pp. 141-148, Taylor & Francis, London.
- Walker, D.B. (2006): Serum chemical biomarkers of cardiac injury for nonclinical safety testing. *Toxicol. Pathol.*, **34**, 94-104.
- Yerroum, M., Braconnier, F. and Chariot, P. (1999): Influence of handling procedures on rat plasma creatine kinase activity. *Muscle and Nerve*, **22**, 1119-1121.
- Goicoechea, M., Cía, F., San José, C., *et al.* (2008): Minimizing creatine kinase variability in rats for neuromuscular research purposes. *Lab. Anim.*, **42**, 19-25.

出典

本論文の一部は、以下に公表した。

Obayashi, H., Kobayashi, N., Nezu, Y., *et al.* (2017): Plasma 2-hydroxyglutarate and hexanoylcarnitine levels are potential biomarkers for skeletal muscle toxicity in male Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Sci.*, **42**, 385-396.

Obayashi, H., Kobayashi, N., Nezu, Y., *et al.* (2018): Plasma 2-hydroxyglutarate, a promising prognostic biomarker candidate for skeletal muscle injury in Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Sci.*, **43**, 601-610.