—Review—

脂質異常症治療薬の副作用・薬物相互作用における モノカルボン酸トランスポータの役割

小林正紀

Role of Monocarboxylate Transporter in Statin-induced Cytotoxicity

Masaki Kobayashi

Laboratory of Clinical Pharmaceutics and Therapeutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University; Kita-12-jo, Nishi-6-chome, Kita-ku, Sapporo 060–0812, Japan.

(Received June 20, 2015)

Although exercise and drug therapy are important to prevent progression of arteriosclerotic disease, exercise leads to an increase in muscular disorder induced by HMG-CoA reductase inhibitors (statins). Elucidation of this mechanism is needed to prevent the occurrence of muscular disorders. Since exercise induces expression of monocarboxylate transporter (MCT) 4, we focused on the association between MCT4 function and statin-induced muscle injury. First, we examined the transport of L-lactate *via* MCT4 using MCT4 cRNA-injected *Xenopus laevis* oocytes. L-lactate uptake by MCT4-expressing oocytes was markedly reduced by alkalizing the buffer pH and saturated at higher L-lactate concentrations. On the other hand, AMP-activated protein kinase (AMPK) and protein kinase C (PKC) are activated by exercise. We next examined whether AMPK and PKC activation affects the expression and function of MCT4 in rat skeletal muscle and RD cells as an *in vitro* skeletal muscle model. AMPK and PKC activation increased MCT4 expression level and lactate efflux by MCT4. Finally, we examined the association between MCT4 function and statin-induced cytotoxicity. Statins inhibited transport of L-lactate *via* MCT4 in a concentration-dependent manner. Statin-induced cytotoxicity was associated with intracellular acidification and caspase-3/7 activation. On the other hand, bicarbonate suppressed statin-induced pH alteration, caspase activation, and morphological change. The results suggest that statin-induced muscle injury exacerbated by exercise is associated with intracellular acidification and that the effects of statins on L-lactate transport are mediated by MCT4.

Key words——monocarboxylate transporter 4; HMG-CoA reductase inhibitor; cytotoxicity

はじめに

HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）は，low density lipoprotein（LDL）コレステロールの低下薬として全世界で最も汎用されている脂質異常症治療薬である．その一方で，副作用として 1–10％の割合で筋肉痛などの筋障害を引き起こす.[1] この筋障害は運動により悪化するが,[2,3] 現在でもこの機序については諸説があり，運動刺激との関連も不明である．一方で運動刺激は解糖系の産物である乳酸の生成を促進する．乳酸は細胞内 pH の調節因子かつエネルギー源であり，monocarboxylate transporter（MCT）により輸送される．MCT のなかでも MCT4 は骨格筋において細胞内からの乳酸排出に関与すると示唆されており，細胞内外の乳酸濃度調節に寄与している．また動物実験においてスタチンの筋障害は心筋では起こらず，MCT4 が心筋に発現しないことから 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.[4] そこで筆者らは運動による薬剤性筋障害の増強と MCT の発現・機能になんらかの関連があるとの仮説を立てた．本仮説を検証するため，①MCT4 の機能解析，②運動刺激と MCT4 発現・機能との関連，③スタチン誘導性筋障害と MCT4 との関連について検討を行った．本稿ではこれら検討により得られた研究成果について概説する．

北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室（〒060–0812 札幌市北区北 12 条西 6 丁目）
e-mail: masaki@pharm.hokudai.ac.jp

本総説は，平成 26 年度日本薬学会北海道支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである.

1. MCT4 の機能解析

MCT4（SLC16A3）は，MCT ファミリーのうちの 1 つであり,[5] 乳酸などのモノカルボン酸を輸送することが知られている.[6] また MCT4 は骨格筋な

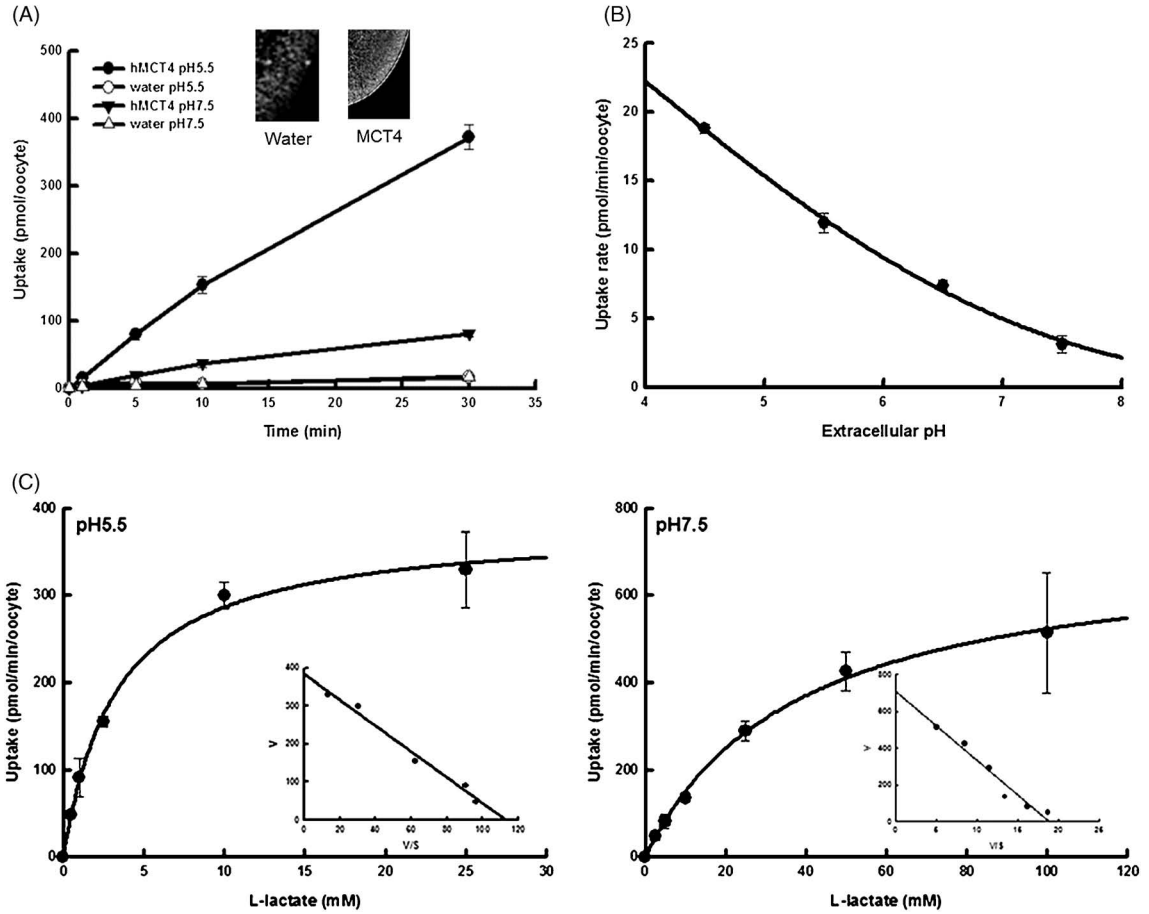
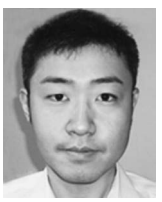


Fig. 1. Time Course (A), pH (B) and Concentration (C) Dependence of L-lactate Uptake by hMCT4-expressing Oocytes

(A) Oocytes were incubated for various periods at 25℃ with transport buffer of pH 5.5 or pH 7.5 containing 0.1 mM L-lactate. Control oocytes were injected with the same volume of water instead of MCT4 cRNA. Each point represents the mean±S.E. of 3–5 experiments. (B) Uptake by oocytes was assayed for 10 min at 25℃ in the presence of 0.1 mM L-lactate. Each point represents the mean±S.E. of 3–5 experiments. The background uptake values of water-injected oocytes were subtracted. (C) Uptake of L-lactate was measured with 10-min incubation at 25℃ in transport buffer of pH 5.5 or pH 7.5 in the presence of an increasing concentration of L-lactate. MCT4-specific uptake was calculated by subtracting the uptake in water-injected oocytes from the uptake in MCT4 cRNA-injected oocytes. Only the MCT4-specific uptake was used for kinetic analysis. The inset shows an Eadie-Hofstee plot of L-lactate transport activity. Each point represents the mean±S.E. of 3–5 experiments. Reproduced from Ref. 8).

どの解糖の盛んな組織に発現し，エネルギー代謝において重要な役割を担うことが示唆されている[7]が，その機能についてはいまだ不明な点が多い．そこでMCT4の機能を明らかにすべく，アフリカツメガエル卵母細胞にヒトMCT4を発現させたMCT4発現oocyteを用いて基質である乳酸取り込み機構を検討した.[8] その結果，水注入oocyteに比較してMCT4発現oocyteでは顕著な乳酸取り込みの上昇が認められ，10分まで直線性を示した［Fig. 1(A)］．また細胞外pHの低下に伴い，乳酸取り込みは顕著に上昇した［Fig. 1(B)］．さらにMCT4の輸送特性を明らかにすべく，乳酸取り込みの濃度依存性について検討を行ったところ，乳酸取り込みは濃度依存性を示し，pH 5.5の酸性条件下においてK_mは3.4±0.4 mM，V_{max}は383±17 pmol/min/oocyteと算出され，pH 7.5ではそれぞれ37.6±4.1 mM，710±54 pmol/min/oocyteであった［Fig. 1(C)］．K_mの値はラットのMCT4発現oocyteで報告されているMCT4の値とほぼ同様であった.[9] これまでにMCT4は細胞からの乳酸排出に寄与し，細胞内pHを制御していることが示唆されており,[6] 本結果と合わせて考察すると，MCT4はpH依存的に乳酸を輸送し，細胞内pHの調節に係わる



小林正紀

2002年北海道大学薬学部卒業，2004年同修士課程修了後，同博士課程進学，2006年同助手に着任(同博士課程中退)，2007年博士（薬学）［北海道大学］取得，北海道大学病院診療補助従事者兼務，同助教，2014年より現職，2011年北海道大学病院・東日本大震災医療救護班として復興支援活動に従事.

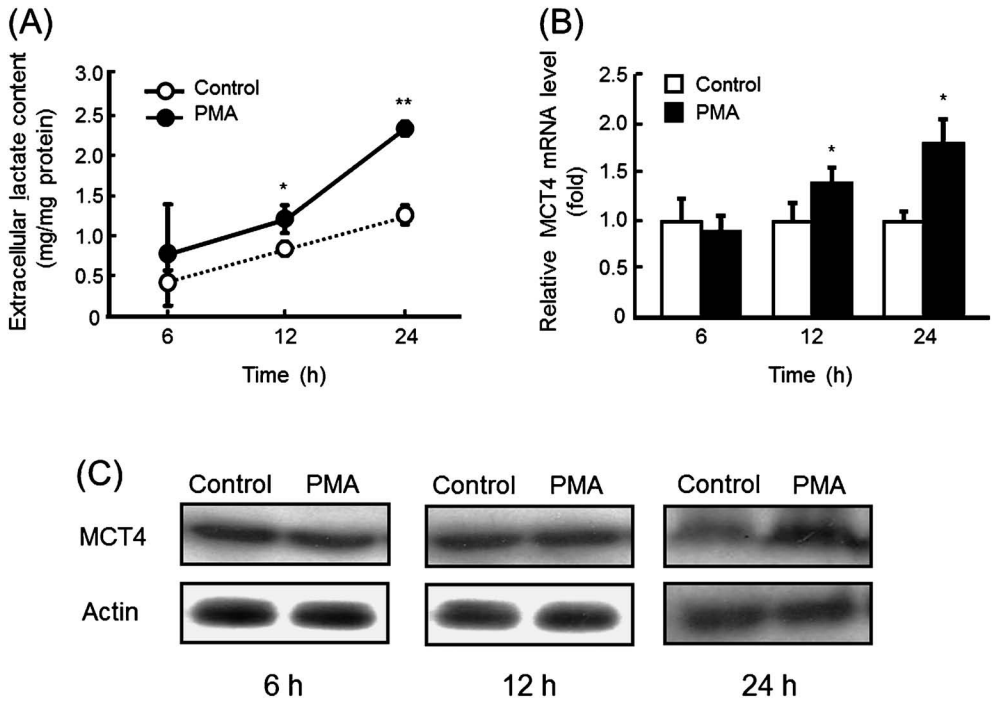


Fig. 2. Changes in Lactate Contents in the Culture Medium (A), MCT4 mRNA (B) and Protein (C) Levels after Treatment of RD Cells with PMA

(A) RD cells were incubated in the absence or presence of 0.1 μM PMA for various periods time (6, 12 and 24 h). Lactate was determined in the condition media at the indicated times. Each column represents the mean ± S.D. of 3 determinations. Untreated (control) and PMA-treated cells are indicated by a white symbol and a black symbol, respectively. *,**significantly different from control at $p<0.05$, $p<0.01$. (B) RD cells were exposed to PMA (0.1 μM) for 6, 12 and 24 h. MCT4 mRNA levels were determined using quantitative real-time reverse transcription-PCR. Each column represents the mean with S.D. of 6 determinations. *significantly different from control at $p<0.01$. (C) RD cells were exposed to PMA (0.1 μM) for 6, 12 and 24 h. Whole cell extracts were prepared from the cells and resolved using SDS-PAGE. Western blotting was carried out with antibodies to MCT4 or β-actin. Two separate experiments gave similar results. Reproduced from Ref. 13).

ことが示された.

2. 運動刺激と MCT4 発現・機能との関連

運動時の骨格筋では運動強度に伴い, protein kinase C (PKC)[10]や AMP activated protein kinase (AMPK)[11]が活性化し, 糖代謝や脂質代謝に係わるタンパク質を制御することが明らかにされている. 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おり, 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. そこで MCT4 発現・機能がこれら刺激により変化するかを明らかにするため, 骨格筋細胞における AMPK 及び PKC の活性化が MCT4 の発現に及ぼす影響を検討した. 骨格筋のモデルとして, ヒト横紋筋肉腫由来 RD 細胞を用いた. 検討に先立ち RD 細胞における MCT 発現を解析したところ MCT4 が発現していること, またこの MCT4 が細胞内からの乳酸の排出に関与することを確認している.[12] そこで PKC 活性化剤である phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 処理が乳酸の細胞外への排出及び MCT4 発現に及ぼす影響を検討した.[13] その結果, 細胞外乳酸量は PMA 添加後 12–24 時間でコントロールよりも有意に増大し [Fig. 2(A)], また MCT4 mRNA 量は PMA 添加 12–24 時間後にかけて時間依存的に増大した [Fig. 2(B)]. さらに MCT4 タンパク質量は PMA 添加 24 時間後に顕著に増大することが示された [Fig. 2(C)]. したがって, PMA 処理による細胞外乳酸量の増大に伴って MCT4 の発現量が時間依存的に増大することが明らかとなった. 次に, 細胞外への乳酸排出における MCT4 の寄与について検討した. PMA による細胞外乳酸量の増大は MCT4 の一過性のノックダウンにより有意に減少した (データは示さない). したがって, PMA による乳酸産生の増大に伴い MCT4 の発現が増大し, 細胞外への乳酸排出を亢進させることが明らかとなった.

次に AMPK 活性化剤として汎用されている 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside

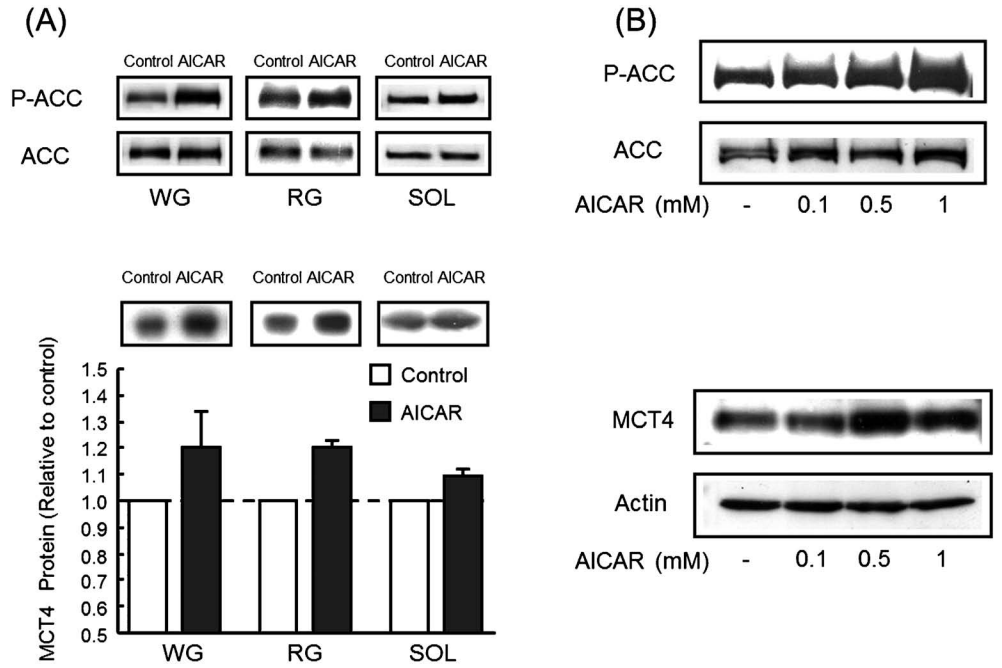


Fig. 3. Total Phospho-ACC (P-ACC) and MCT4 Levels in Muscles of Rats (A) and RD Cells (B) Treated with AICAR

(A) Rats were injected subcutaneously with AICAR (0.5 mg/g) or saline (control). White gastrocnemius (WG), red gastrocnemius (RG), and soleus (SOL) muscles were removed from rats at 1 h (upper) or 5 days (lower) after AICAR injection. Each column represents the mean with S.D. of 3 determinations. (B) RD cells were treated with AICAR (0.1–1 mM) for 1 h (upper) or 5 days (lower). Data shown are typical results of three independent experiments. Reproduced from Ref. 14).

(AICAR) がラット骨格筋の AMPK 活性に与える影響を明らかにするため，AMPK の下流ターゲットである acetyl CoA carboxylase (ACC) のリン酸化に及ぼす AICAR の影響を western blotting により評価した．その結果，AICAR の投与により各筋組織におけるリン酸化 ACC 量は顕著に増大した．したがって，ラット骨格筋において AICAR 投与により AMPK が活性化されることを確認した［Fig. 3(A)，upper］．続いて，AICAR がラット骨格筋の MCT4 タンパク質量に及ぼす影響について検討した．その結果，腓腹筋［white gastrocnemius (WG), red gastrocnemius (RG)］において AICAR 投与により MCT4 タンパク質発現は増大した．一方，ヒラメ筋［soleus (SOL)］において MCT4 タンパク質量はほとんど変化しないことが明らかとなった［Fig. 3(A)，lower］．次に RD 細胞を用いて AMPK 活性化が MCT4 発現に及ぼす影響を検討した．*In vivo* における検討と同様，ACC のリン酸化に及ぼす AICAR の影響を western blotting により評価した．その結果，AICAR の処理により RD 細胞におけるリン酸化 ACC 量は顕著に増大した［Fig. 3(B)，upper］．続いて AICAR が RD 細胞の MCT4 のタンパク質量に及ぼす影響を検討したところ，AICAR の処理により MCT4 タンパク質が増大することが示された［Fig. 3(B)，lower］.[14]

以上の結果より，骨格筋において MCT4 の発現は運動強度に応じて活性化される 2 つのシグナル分子 AMPK 及び PKC を介して発現上昇し，機能変動を生じることが示された．

3. スタチン誘導性筋障害と MCT4 との関連

前述の検討により MCT4 は pH 依存的な輸送機構を示し，運動シグナルにより発現が上昇することが示された．またこれまでに筆者らはスタチンが生体成分を輸送するトランスポータの発現を変動させることを明らかにしている.[15,16] そこでまず MCT4 機能に及ぼすスタチンの影響を検討することとした.[17] 検討に先立ちヒト MCT4/CD147 強制発現細胞を構築すべく MCT4 と MCT4 の膜への局在を補助するタンパク質である CD147 を共発現させた．cm は，MCT4 及び CD147 を共発現させたもの，vm は MCT4 のみ発現させたもの，cv は CD147 のみ発現させたもの，vv はベクターのみを発現させたものであり，いずれも導入したタンパク質発現のみが認められ，さらに cm のみ MCT4 が膜へ発現

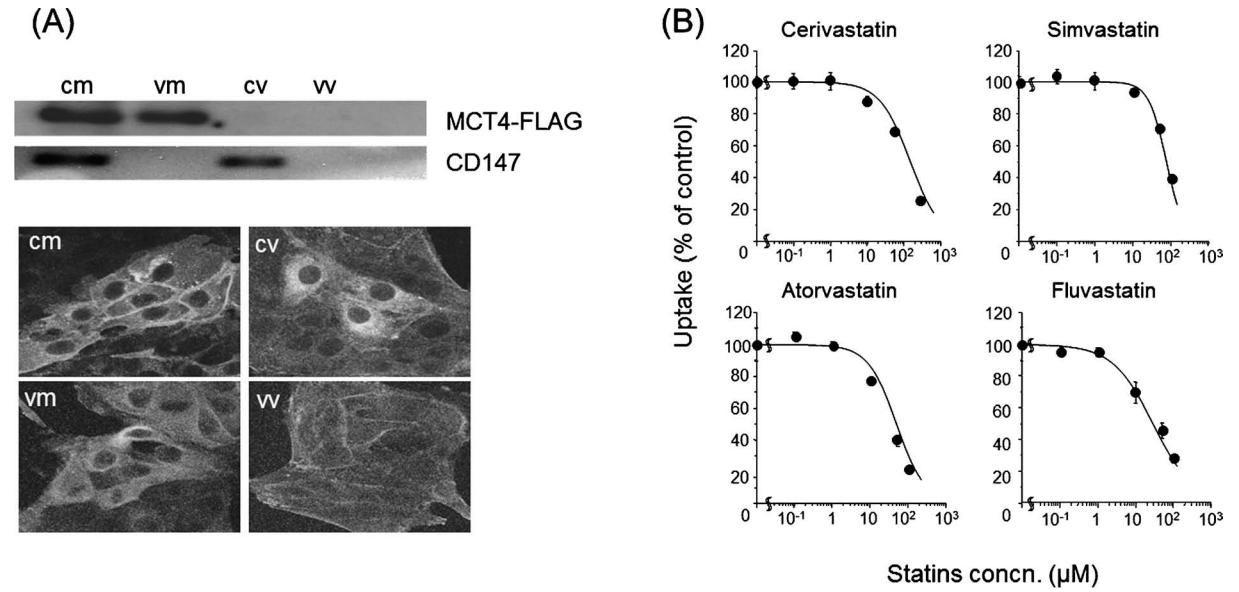


Fig. 4. Expression and Localization of MCT4-FLAG and CD147 in cm, vm, cv and vv Cells (A) and Inhibitory Effects of Statins on L-lactate Uptake by cm Cells (B)

(A) Western blotting and immunohistochemistry were performed with antibodies against CD147 and FLAG. (B) L-lactate uptake by cm cells was measured at pH 6.0 for 30 min. Each point represents the mean±S.D. of 3–6 determinations. Reproduced from Ref. 17).

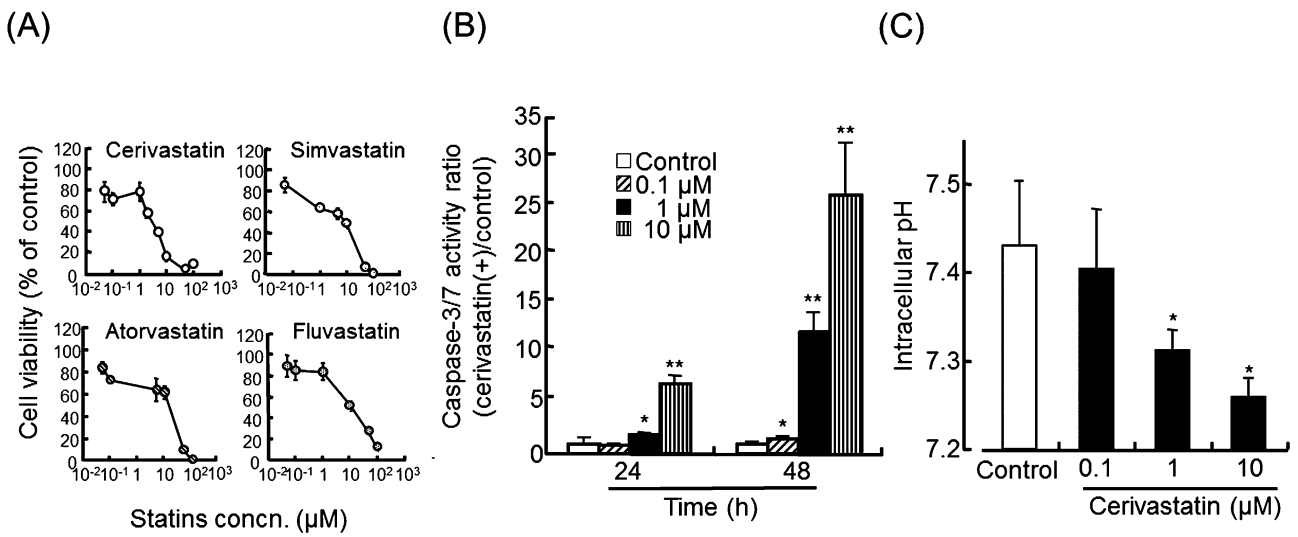


Fig. 5. Effects of Statins on Cell Viability (A) and Effects of Cerivastatin on Caspase-3/7 Activity Ratio (B) and Intracellular pH (C) in RD Cells

(A) Cell viability was measured by the MTT assay. RD cells were exposed to various concentrations of all statins for 48 h. Each point represents the mean± S.D. of 3–18 determinations. (B) RD cells were exposed to various concentrations of cerivastatin for 24–48 h, and the cell lysate was used to determine the caspase-3/7 activity ratio. Each column represents the mean with S.D. of 3 determinations. *,**significantly different from control (no addition) at $p<0.05$, $p<0.01$. (C) Intracellular acidification was measured with BCECF-AM at 48 h. Each column represents the mean with S.D. of 3–6 determinations. *significantly different from control (no addition) at $p<0.05$. Reproduced from Refs. 18, 22).

していることを確認した［Fig. 4(A)］．そこで cm を用いて乳酸輸送に及ぼすスタチンの共存効果を検討したところ，スタチンは MCT4 を介した乳酸輸送を濃度依存的に阻害した［Fig. 4(B)］．一方で同じ条件下で vv を用いて検討したところ，スタチンの阻害効果は極めて弱いものであった（データは示さない）．したがってスタチンは乳酸排出に寄与する MCT4 を阻害し，細胞内 pH を変動させる可能性が示唆された．

次に MCT4 に対する阻害効果が得られたスタチン類が骨格筋のモデル細胞である RD 細胞の生存率に及ぼす影響を検討した．[18] その結果，スタチンは

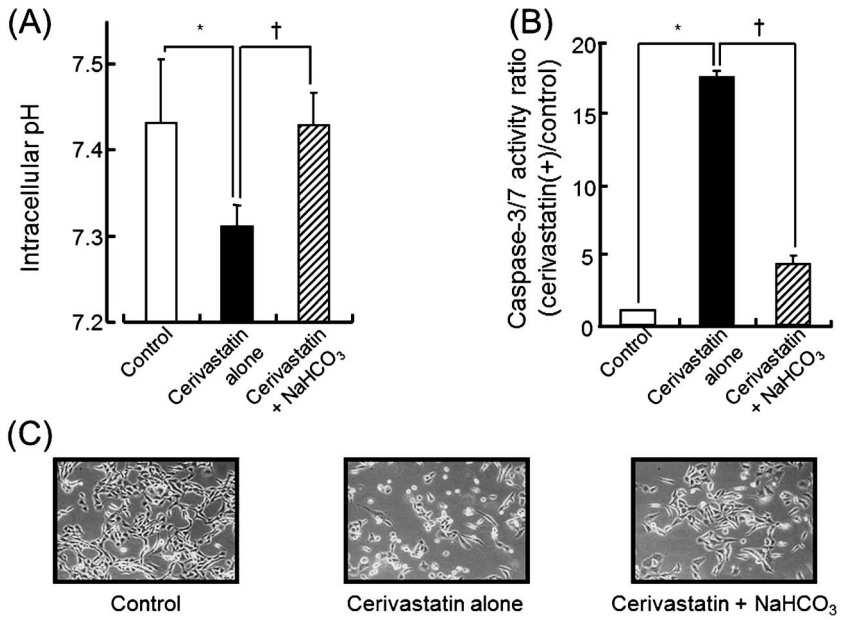


Fig. 6. Effects of Sodium Bicarbonate on Acidification (A), Caspase-3/7 Activity Ratio (B) and Morphological Degeneration (C) in Cerivastatin-treated RD Cells

(A) RD cells were exposed to cerivastatin (1 μM) in the absence or presence of 25 mM sodium bicarbonate (pH 7.4) for 48 h. Each column represents the mean with S.D. of 3–6 determinations. *significantly different from control (no addition) at $p<0.05$, †significantly different from cerivastatin alone at $p<0.05$. (B) RD cells were exposed to cerivastatin (1 μM) in the absence or presence of 25 mM sodium bicarbonate (pH 7.4) for 48 h. Each column represents the mean with S.D. of 3 determinations. *significantly different from control (no addition) at $p<0.01$, †significantly different from cerivastatin alone at $p<0.05$. (C) RD cells were exposed to cerivastatin (1 μM) in the absence or presence of 25 mM sodium bicarbonate (pH 7.4) for 48 h. Reproduced from Ref. 22).

濃度依存的に RD 細胞の生存率を低下させた［Fig. 5(A)］．続いてスタチン類による細胞障害のメカニズムを明らかにする目的で，アポトーシス時に活性が上昇するカスパーゼ-3/7 活性を測定した．スタチンの 1 つであるセリバスタチン処理によるカスパーゼ活性は時間依存的かつ濃度依存的に上昇したこと［Fig. 5(B)］から，スタチンによる細胞生存率の低下はアポトーシスによるものであることが示唆された．アポトーシス誘因刺激の 1 つに細胞内の酸性化が知られている.[19–21] そこでスタチンによるアポトーシスに細胞内酸性化が関与しているか否かを明らかにするためにスタチン曝露時の細胞内 pH 変動について検討を行った.[22] その結果，セリバスタチン曝露時の骨格筋細胞内 pH は，薬物濃度依存的に低下することが明らかになった［Fig. 5(C)］．すなわち，スタチンの細胞障害は細胞内酸性化の過程を経てアポトーシスを誘導することが示唆された．

次に，セリバスタチンが誘導する細胞死に細胞内酸性化の関与をさらに明確にすべく，アルカリ化剤である炭酸水素ナトリウム併用による効果を検討した.[22] その結果，炭酸水素ナトリウム 25 mM を併用することによってセリバスタチンによる細胞内酸性化は抑制されることが示された［Fig. 6(A)］．またそれに伴いセリバスタチン添加によるカスパーゼ-3/7 活性の上昇及び細胞の形態変化は，抑制されることが示された［Figs. 6(B) and (C)］．

以上の結果よりスタチンは細胞内からの乳酸排出及び細胞内 pH の調節を担う MCT4 に作用することで，細胞内 pH を低下させ，筋障害を悪化させる可能性が示唆された．現在スタチンの細胞毒性と MCT4 発現との直接的な関連を明らかにすべく，MCT4 ノックダウン細胞を構築し，MCT4 発現低下時におけるスタチンの細胞障害性を検討中である．

おわりに

本稿では，日本薬学会北海道支部奨励賞の受賞研究成果を中心に紹介した．研究成果として MCT4 の機能解析を進め，スタチンの骨格筋への副作用における MCT4 の役割について検討を行った．これまでの研究を基礎とし今後の更なる研究が，薬剤性の副作用の回避へ貢献し，より安全な薬物治療を遂行する上で有用な知見となることを期待する．

謝辞　学部 4 年時より終始ご指導・ご鞭撻を賜り，研究の場を与えて下さいました，北海道大学大

学院薬学研究院臨床薬剤学研究室・井関　健教授に心より感謝申し上げます．また研究協力者である臨床薬剤学研究室のスタッフ・学生の皆様，北海道大学病院薬剤部の皆様に厚く御礼申し上げます．

利益相反　開示すべき利益相反はない．

REFERENCES

1) Dirks A. J., Jones K. M., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **291**, C1208–C1212 (2006).
2) Meador B. M., Huey K. A., *Muscle Nerve*, **42**, 469–479 (2010).
3) Sinzinger H., O'Grady J., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **57**, 525–528 (2004).
4) Sirvent P., Bordenave S., Vermaelen M., Roels B., Vassort G., Mercier J., Raynaud E., Lacampagne A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1426–1434 (2005).
5) Price N. T., Jackson V. N., Halestrap A. P., *Biochem. J.*, **329**, 321–328 (1998).
6) Manning Fox J. E., Meredith D., Halestrap A. P., *J. Physiol.*, **529**, 285–293 (2000).
7) Halestrap A. P., Price N. T., *Biochem. J.*, **343**, 281–299 (1999).
8) Sasaki S., Kobayashi M., Futagi Y., Ogura J., Yamaguchi H., Takahashi N., Iseki K., *PLoS One*, **8**, e67690 (2013).
9) Dimmer K. S., Friedrich B., Lang F., Deitmer J. W., Broer S., *Biochem J.*, **350**, 219–227 (2000).
10) Perrini S., Henriksson J., Zierath J. R., Widegren U., *Diabetes*, **53**, 21–24 (2004).
11) Steinberg G. R., Kemp B. E., *Physiol. Rev.*, **89**, 1025–1078 (2009).
12) Kobayashi M., Fujita I., Itagaki S., Hirano T., Iseki K., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1197–1201 (2005).
13) Narumi K., Kobayashi M., Otake S., Furugen A., Takahashi N., Ogura J., Itagaki S., Hirano T., Yamaguchi H., Iseki K., *Int. J. Pharm.*, **428**, 25–32 (2012).
14) Furugen A., Kobayashi M., Narumi K., Watanabe M., Otake S., Itagaki S., Iseki K., *Life Sci.*, **88**, 163–168 (2011).
15) Kobayashi M., Gouda K., Chisaki I., Ochiai M., Itagaki S., Iseki K., *Eur. J. Pharmacol.*, **662**, 9–14 (2011).
16) Kobayashi M., Gouda K., Chisaki I., Asada K., Ogura J., Takahashi N., Konishi T., Koshida Y., Sasaki S., Yamaguchi H., Iseki K., *Int. J. Pharm.*, **452**, 36–41 (2013).
17) Kobayashi M., Otsuka Y., Itagaki S., Hirano T., Iseki K., *Int. J. Pharm.*, **317**, 19–25 (2006).
18) Kobayashi M., Chisaki I., Narumi K., Hidaka K., Kagawa T., Itagaki S., Hirano T., Iseki K., *Life Sci.*, **82**, 969–975 (2008).
19) Hirpara J. L., Clement M. V., Pervaiz S., *J. Biol. Chem.*, **276**, 514–521 (2001).
20) Matsuyama S., Llopis J., Deveraux Q. L., Tsien R. Y., Reed J. C., *Nat. Cell Biol.*, **2**, 318–325 (2000).
21) Jeong D., Kim T. S., Lee J. W., Kim K. T., Kim H. J., Kim I. H., Kim I. Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 1141–1149 (2001).
22) Kobayashi M., Kaido F., Kagawa T., Itagaki S., Hirano T., Iseki K., *Int. J. Pharm.*, **341**, 181–188 (2007).