

Thesis

マウスおよびラットの骨格筋筋小胞体に対する セリバスタチンのCa²⁺放出作用

埼玉医科大学薬理学教室

(指導：丸山 敬 教授)

井上 亮拓

Ca²⁺-Releasing Effect of Cerivastatin on the Sarcoplasmic Reticulum of Mouse and Rat Skeletal Muscle Fibers

Ryotaku Inoue (Department of Pharmacology, Saitama Medical University, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Ryanodine receptors (RyRs) play an important role as intracellular Ca²⁺-release channels in a wide variety of cells. Previously, our group reported that clofibrac acid, an antihyperlipidemic agent, caused Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum (SR) in a unique mode of action on RyR-Ca²⁺ release channels in skinned skeletal muscle fibers. On the other hand, it was reported that simvastatin, a different type of antihyperlipidemic agent, increased the cytoplasmic Ca²⁺ concentration via the release of stored Ca²⁺ in L6 rat myoblasts and resulted in cell injury, although the exact mechanism is still debated. These results raise the possibility that both types of antihyperlipidemic agent may have a common ability to activate the RyR-Ca²⁺ release channel.

In this study, the effect of cerivastatin (Cer), classified as an HMG-CoA reductase inhibitor as is simvastatin, on Ca²⁺ release from the SR was analyzed using chemically skinned skeletal muscle fibers from the mouse and the rat. The Ca²⁺ released from the SR of the skinned fibers was quantified using Fura-2, and the activity of Ca²⁺ release was expressed in terms of decay rate constants, based on the amount of Ca²⁺ remaining in the SR. Cer (>20 μM) released Ca²⁺ from the SR, while pravastatin showed only a little effect. The rates of Ca²⁺ release were increased by Cer not only at pCa 7-4.5 but also at pCa >8. Cer-induced Ca²⁺ release in the presence of Ca²⁺ was affected by adenosine monophosphate, Mg²⁺ and procaine in essentially the same way as for caffeine-induced Ca²⁺ release. The Ca²⁺-uptake capacity of the SR was reduced after co-treatment with ryanodine and Cer at pCa 6.0 to a much greater extent than with ryanodine alone. Thus, Cer-induced Ca²⁺ release in the presence of Ca²⁺ must be a result of the activation of the Ca²⁺-induced Ca²⁺ release (CICR) mechanism of the ryanodine receptor. However, even under the condition that CICR was maximally inhibited by Mg²⁺ and procaine, or in the practical absence of Ca²⁺ (pCa >8), Cer still caused Ca²⁺ release. These results indicate that Cer causes Ca²⁺ release also by activating some other mechanism(s) in addition to the activation of CICR. Either or both of these effects might be related to its adverse effect, rhabdomyolysis.

Keywords: Calcium release, cerivastatin, ryanodine receptor, sarcoplasmic reticulum, skeletal muscle

【緒言】

リアノジンレセプターは細胞内Ca²⁺放出チャネルとして、種々の細胞において重要な役割を果たしている^{1,2)}。リアノジンレセプターは植物アルカロイドであるリアノジンの特異的結合を利用して、筋小胞体膜から単離、精製された約5000アミノ酸残基からなる分子量560 kDaの巨大な蛋白であり、四量体を形成して機能している³⁾。C末端側では膜貫通部

している^{1,2)}。リアノジンレセプターは植物アルカロイドであるリアノジンの特異的結合を利用して、筋小胞体膜から単離、精製された約5000アミノ酸残基からなる分子量560 kDaの巨大な蛋白であり、四量体を形成して機能している³⁾。C末端側では膜貫通部

位がチャンネルを形成しており、一方、全長の80%以上を占める巨大なN末端側は、foot構造と呼ばれる形状で細胞質側に存在している³⁾。リアノジンレセプターはこれまでに3種類のサブタイプが見つかっており、1型、2型リアノジンレセプターは各々、主に骨格筋、心筋に存在している⁴⁾。3型リアノジンレセプターは多くの組織に存在しており、骨格筋でも発現が見られるが、1型のわずか1%程度である⁵⁾。

骨格筋は多数の横紋筋線維から成り立っており、その構成成分である2種類の筋原線維構成蛋白であるアクチンとミオシンが互いに滑り込みあうことにより筋収縮が起こる。この筋の弛緩と収縮は Ca^{2+} によって制御されている。まず、筋細胞膜上に生じた脱分極刺激により発生した活動電位は、筋細胞膜が細胞質に陥入した構造の横行小管(T管)膜上を細胞内部に伝播する。その活動電位をT管膜上に高密度に存在するジヒドロピリジン感受性の電位依存性L型チャンネルが感知し、筋細胞の Ca^{2+} 貯蔵庫である筋小胞体(SR)膜上の1型リアノジンレセプターに情報が伝達される。その結果、 Ca^{2+} チャンネルであるリアノジンレセプターは開口し、 Ca^{2+} が細胞質内に放出される。 Ca^{2+} はアクチン上のトロポニンCに結合し、種々の構造変化を経て、筋収縮が起こる。この一連の過程は興奮収縮連関(E-C coupling)と呼ばれる。一方で、SR膜にはATPのエネルギーを使って、 Ca^{2+} を細胞質側からSR内腔へと能動輸送する Ca^{2+} ポンプ蛋白が高密度に存在しており、遊離した Ca^{2+} は速やかに再び内腔に取り込まれ、細胞質内 Ca^{2+} 濃度が下がって筋は弛緩する。リアノジンレセプターは、筋小胞体膜の細胞質側の Ca^{2+} 濃度の上昇により開口する性質があることが示されており⁶⁾、 Ca^{2+} による Ca^{2+} 放出(Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release: CICR)機構として知られている。CICR機構を抑制しても、生理的な Ca^{2+} 放出はまったく抑制されないことから^{7,8)}、リアノジンレセプターには興奮収縮連関の際に働く生理的な Ca^{2+} 放出とCICRの2つの異なる開口機構が存在すると考えられる。

筋小胞体内の Ca^{2+} 放出が興奮収縮連関において必須である哺乳動物などの心筋では、リアノジンレセプターのCICR機構が生理的に機能しているが、骨格筋でのCICRの生理的な機能は不明である。しかし、カフェインやハロタンなどの薬物によってCICR機構が促進され、生きた筋でも、その働きが前面に現れることがある。カフェインが骨格筋拘縮を起こすのは、CICR機構促進の結果、静止時における細胞内 Ca^{2+} 濃度でもSRから Ca^{2+} が放出されるようになるためである。また、ハロタン麻酔時などに稀に起こる悪性高熱症は、遺伝的にCICRの起こりやすい患者が、ハロタンによってさらにCICR機構の促進を受けることにより、カフェイン拘縮と同様の過程で細胞内 Ca^{2+} が上

昇し、筋線維の過収縮が生じる結果、発熱を生じ発症するものと考えられる。

池本・遠藤らは、骨格筋スキンドファイバーを用いてリアノジンレセプター Ca^{2+} 放出チャンネルの開口機構に影響を与える種々の薬物について検討を行ってきた。スキンドファイバー標本は筋細胞の細胞膜を機械的に除去するか、または、界面活性剤などで処理をして細胞膜の拡散障壁としての機能を破壊したもので、細胞内に存在する溶性の物質は失われるが、筋原線維や筋小胞体はほぼ生理的狀態のまま保持されている。一方、拡散障壁がないので、任意の物質を任意の濃度、筋原線維や筋小胞体に適用することが容易であるという性質をもつ標本である。CICR機構を促進する薬物はこれまでに多数報告されていたが、生理的な Ca^{2+} 放出機構を促進する薬物は知られていなかった。池本・遠藤らは、骨格筋スキンドファイバー標本において、高脂血症治療薬であるclofibric acidがリアノジンレセプター Ca^{2+} 放出チャンネルに対して、CICR機構の促進作用に加えて、CICRとは異なる機序で Ca^{2+} 放出を引き起こす作用も持ち合わせることを報告している⁹⁾。すなわち、clofibric acidはSR周囲の Ca^{2+} をほとんど完全に除去した条件下において、強い Ca^{2+} 放出作用を示し、この Ca^{2+} 放出作用はCICR阻害薬であるプロカインによっては阻害されず、CICR促進薬であるアデノシン1リン酸(AMP)によって逆に抑制されるという性質を示した。これらの結果およびダントロレンとその誘導体による抑制実験の結果¹⁰⁾は、clofibric acidがこれまでに見出されていなかったリアノジンレセプターを生理的な Ca^{2+} 放出機構で開口させる薬物である可能性を強く示唆している。

Clofibric acidと作用機序は異なるが、同じく高脂血症治療薬のプラバスタチンをはじめとするスタチン系薬剤と呼ばれる3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA)還元酵素阻害剤は、その構造にHMG様の骨格を有しており¹¹⁾、体内でのコレステロール合成の律速であるHMG-CoA還元酵素(HMG-CoAをメバロン酸に変換する酵素)を拮抗的に阻害し、血中LDL濃度を低下させる作用を持つ。スタチン系薬剤はその脂質低下作用の他にも、多様な作用(pleiotropic effect)を持つことが報告されている¹²⁻¹⁴⁾。 Ca^{2+} 放出との関連では、スタチン系薬剤の一つであるシンバスタチンが、L6ラット筋原細胞において、細胞内貯蔵 Ca^{2+} の放出を介して細胞質の Ca^{2+} 濃度を上昇させ、細胞障害を引き起こすことや¹⁵⁾、ヒトの骨格筋において、SRからの Ca^{2+} の放出を引き起こすことが報告されている¹⁶⁾。スタチン系薬剤およびclofibric acidは共に、稀にはあるが重篤な副作用である横紋筋融解症を引き起こすことが知られている^{17,18)}。作用機序の異なる高脂血症治療薬であるスタチンとclofibric acidが共に Ca^{2+} 放出チャンネルであるリアノジンレセプターを活性

化する作用を持ち、それが結果として横紋筋融解症の発症に関与している可能性がある。本研究では、骨格筋のスキンドファイバー標本を用いて、スタチン系薬剤の一つで骨格筋に対する副作用が最も強いと言われるセリバスタチンのCa²⁺放出作用について、リアノジンレセプターCa²⁺チャンネルの2種類の開口様式、すなわち、clofibric acid様の生理的様式でのCa²⁺放出とCICR様式のCa²⁺放出のそれぞれとの関連に注目しながら検討を進めた。実験には主としてマウスを用いたが、一部はスタチン誘発性ミオパチーモデルの実験^{19,20}が報告されているラットの骨格筋スキンドファイバーを用いた。

【材料および方法】

ICRマウスおよびFisherラットを、日本チャールズリバー (Atsugi, Japan) より購入して用いた。セリバスタチンNaおよびプラバスタチンNaは三共 (Tokyo, Japan) にて合成されたものを用いた。Fura-2はMolecular Probes, Inc. (Eugene, USA) より、Na₂ATPはBoehringer Mannheim (Mannheim, FRG) より、サポニンICN Pharmaceuticals, Inc. (Costa Mesa, USA) より、EGTAは同仁堂研究社 (Kumamoto, Japan) より、AMPおよびプロカインはSigma Chemical Co. (St. Louis, USA) よりそれぞれ購入したものを用いた。

1) スキンドファイバー標本の作製

5-9週齢の雄性マウス (ICR) および5-6週齢の雄性ラット (Fisher) をペントバルビタールNaにより麻酔し、頸椎脱臼により安楽殺後、長指伸筋 (extensor digitorum longus muscle bundles; EDL) を摘出し、50 μg/mlサポニンを含む弛緩液 (4.46 mM ATP, 5.54 mM Mg methanesulfonate [MgMs₂], 108.6 mM potassium methanesulfonate [KMs], 20 mM NaN₃, 20 mM PIPES, 1 mM EGTA; pH 7.0) 中で45分間振盪した。これにより筋細胞膜の透過性が増大したスキンドファイバーを作製した²¹。サポニンを弛緩液洗浄により除去した後、3-4本ずつの筋繊維束を切り出し、絹糸でステンレスワイヤーに固定し、マイクロキュベット内に挿入したものを標本として用いた^{9,22}。

2) スキンドファイバー標本におけるCa²⁺放出の測定

スキンドファイバーのSRからのCa²⁺放出をCa²⁺蛍光指示薬であるFura-2を用いて定量した²³。マイクロキュベット内に固定した筋繊維束を、蛍光測定器 (CAM-200, CAM-230; Nihon Bunko Kogyo, Tokyo, Japan) を備えた顕微鏡 (BHS-RFK; Olympus, Tokyo, Japan) の台座に固定し、340および380 nmのいずれかで励起させ、510 nmでFura-2の蛍光強度を測定した。

セリバスタチン、プラバスタチンあるいはカフェインに対する反応におけるCa²⁺放出を直接的に測定するために、Fig. 1に示すように、一定条件 (pCa 6.7, 4 mM MgATP, 60秒間) でCa²⁺を取り込ませたあと、ATP

とEGTAを含まない溶液中で薬物を適用し、35 μM Fura-2の蛍光強度を測定した^{9,24}。

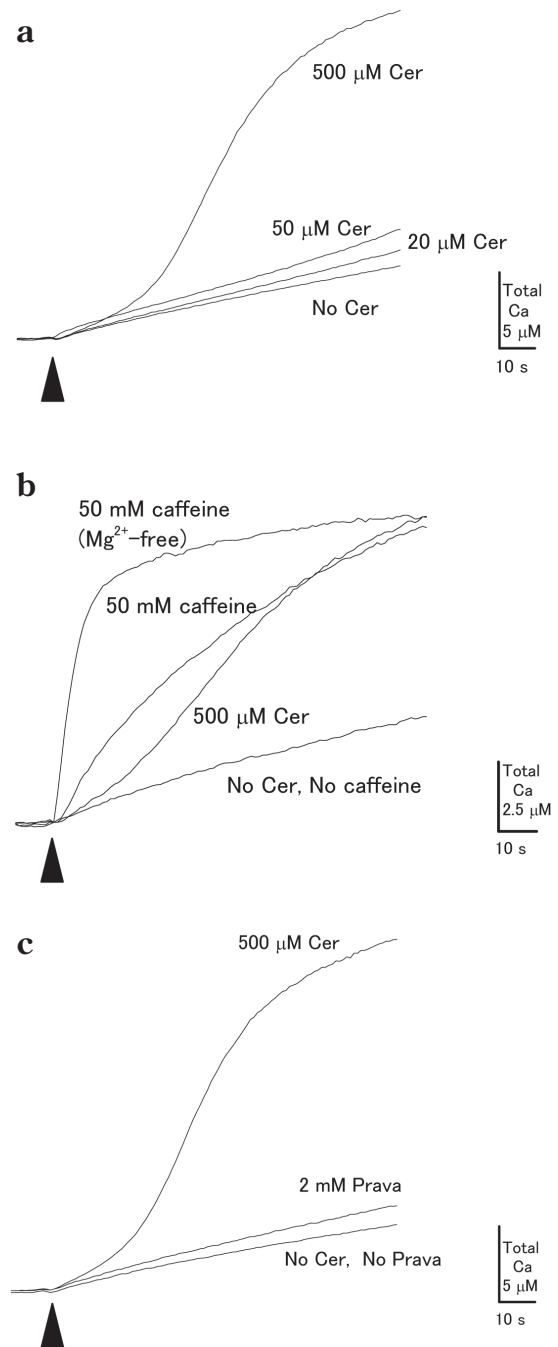


Fig. 1. Cerivastatin (Cer)- and caffeine-induced Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum (SR) of mouse skeletal muscle fibers. Representative traces showing the time course of Ca²⁺ release from the SR in response to agents were obtained by measuring the change in Fura-2 intensity in the absence of ATP and EGTA and in the presence or absence of 0.5 mM Mg²⁺. At the time indicated by the arrowhead, 20-500 μM Cer (a), 50 mM caffeine or 500 μM Cer (b), 500 μM Cer or 2 mM pravastatin (Prava) (c) was applied. SR Ca²⁺ loading was carried out before each trial. The data in each panel were obtained from one and the same preparation, but those in different panels from different preparations.

次にFig. 2に示した図のようなプロトコールに従って、 Ca^{2+} 放出の速度を決定した。すなわち、Step 1) SRに一定量の Ca^{2+} (pCa 6.7, 4 mM MgATP, 60秒間)を取り込ませ、Step 2) Ca^{2+} 負荷溶液を洗浄後、 Ca^{2+} 放出作用を試験する溶液(テスト溶液)を4-600秒間適用し、Step 3) 高濃度のカフェインとAMPを適用することにより、SR内の残存 Ca^{2+} を完全に放出させ、Fura-2の蛍光強度の変化からその残存量を定量した。Step 2では、 Ca^{2+} 緩衝液として10 mM EGTAで調整した種々の濃度の Ca^{2+} 溶液に、スタチンやカフェイン、AMP、 Mg^{2+} やプロカインを加えたテスト溶液を適用し、その後のStep 3での Ca^{2+} 残存量をStep 2を行わなかった場合のものと比較することにより、Step 2で放出された

Ca^{2+} 量を算定した。テスト溶液を適用した時間とSR内の残存 Ca^{2+} 量の関係は、一次の指数関数を用いて表すことができた。さらにスタチンを含むテスト溶液でも同様に、溶液適用時間とSR内残存 Ca^{2+} 量の関係は一次の指数関数を用いて表すことができた。したがって、 Ca^{2+} 放出活性をSR内に残存する Ca^{2+} 量に基づいて、その減衰の速度定数を用いて表した^{9,22)}。セリバスタチンあるいはプラバスタチンを適用後、薬物を洗い流すことによって、増大した Ca^{2+} 放出速度は薬物を適用していないコントロールでの Ca^{2+} 放出速度に戻ることから、これらの薬物の作用は、同一標本を用いて繰り返し調べることが可能であった。

リアノジンによるSRの Ca^{2+} 貯蔵能の変化を調

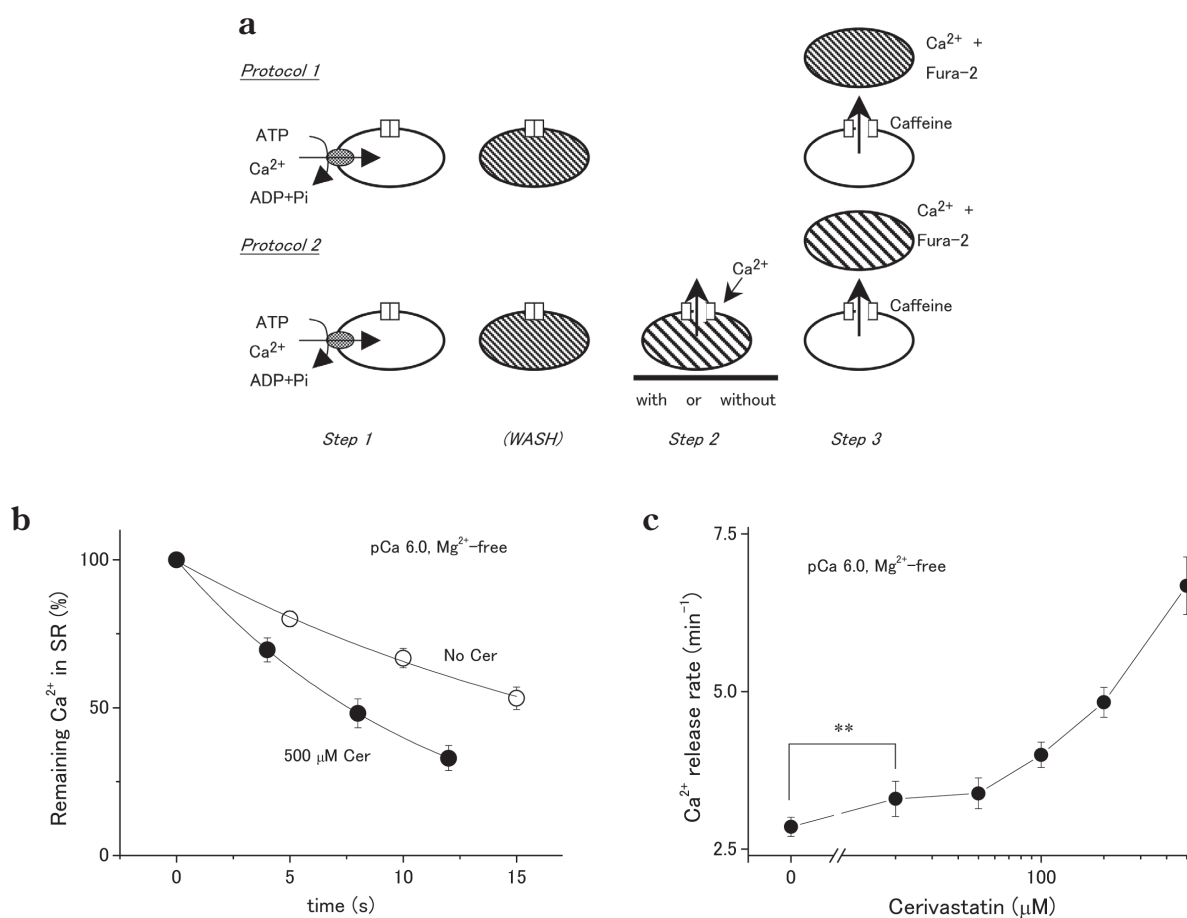


Fig. 2. Enhancing effect of Cer on Ca^{2+} release from the SR of mouse skeletal muscle fibers. (a) Experimental protocols for measurement of CICR rate. Rounded boxes represent the SR. Step 1; in situ Ca^{2+} pump ATPase was used to load the SR in the presence of 4 mM MgATP at pCa 6.7 for 90 s. WASH; MgATP and Ca^{2+} were washed out in the presence of 1 mM EGTA. Step 2; Test solution (various Ca^{2+} concentrations, buffered with 10 mM EGTA and no ATP) was applied to induce CICR in the presence or absence of statins. This procedure was omitted in protocol 1. Step 3; After washout of the test solution, the total release of Ca^{2+} remaining in the SR was induced by addition of the assay solution containing high concentration of caffeine (50 mM) and AMP (25 mM) in the presence of Fura-2 (35 μM). The difference in the amounts of Ca^{2+} assayed between the two types of protocol was taken to represent the amount of Ca^{2+} released during the test procedure in protocol 2. (b) The SR was loaded with a fixed amount of Ca^{2+} , which was then released by treating the fiber with or without 500 μM Cer in the absence of Mg^{2+} at pCa 6.0 for the period of time shown on the abscissa. Remaining Ca^{2+} in the SR after the treatment was plotted on the ordinate (mean \pm standard error of the mean [s.e.m.], $n=3-4$). An exponential curve was fitted by a nonlinear least square method. Error bar smaller than the symbols is not shown. (c) The rates of Ca^{2+} release induced by 20-500 μM Cer were measured at pCa 6.0 in the absence of Mg^{2+} (mean \pm s.e.m., $n=7-16$). ** $P<0.01$ (vs without Cer).

べるためには、Fig. 7におけるように、SRのCa²⁺含量を測定した。まず、通常のプロトコールでSRにCa²⁺を負荷し、テスト溶液の適用は行わずにカフェインで放出されるCa²⁺をFura-2の蛍光強度の変化から測定した (Fig. 2a: protocol 1)^{9,24}。次にリアノジンを適用し、その後、同様にSRに負荷したCa²⁺をカフェイン溶液で放出させ、リアノジン適用前とFura-2の蛍光強度を比較した。

全ての実験は室温 (21-23°C) で行った。統計学的検定はDunnett's test (Fig. 7) あるいはpaired t-testにて行った。

実験溶液

種々のpCa (<8) のテスト溶液は、10 mM EGTAを含む溶液と10 mM CaEGTAを含む溶液を混合して調製した。セリバスタチンおよびプラバスタチンの保存溶液は、それぞれジメチルスルフォキシド (DMSO) および超純水 (Mill-Q; Millipore, Billerica, USA) に溶解し調製した。全てのテスト溶液は0.2% DMSOを含むように調整した。全ての溶液のpHはKOHで7.0に調整した。セリバスタチンおよびプラバスタチンはそれぞれ500 μMおよび2 mMというまでかなりの高濃度で使用したが、2価のカチオンとの結合は検出できなかった。これは、遊離Mg²⁺濃度および遊離Ca²⁺濃度をそれぞれMag-Fura-2およびFura-2の蛍光強度の変化によって測定したときに、いずれも変化が認められなかったことから確かめられた²⁵。

【結果】

Ca²⁺放出に対するセリバスタチンの作用

骨格筋 (マウスEDL) のスキンドファイバー標本において、0.5 mM Mg²⁺を含む溶液中でSRにCa²⁺を負荷した後、Ca²⁺放出を促進させるような薬物を適用しない場合でも、Ca²⁺はわずかにゆっくりとSRから漏れ出していた (Fig. 1a-c)。この条件下において、セリバスタチンは濃度依存的にSRからCa²⁺を放出させた (Fig. 1a)。また、90秒間のセリバスタチン適用によって、高濃度のカフェインとほぼ同程度のCa²⁺放出が観察された (Fig. 1b)。90秒間のセリバスタチン適用後、50 mMカフェインを適用しても、それ以上Ca²⁺の放出は起こらなかった。この結果は、セリバスタチンはカフェインが作用するのと同じCa²⁺貯蔵部位、すなわちSRからのCa²⁺放出を引き起こすことを示している。一方、親水性の高いスタチンであるプラバスタチンは、2 mMの高濃度を適用しても、わずかなCa²⁺放出作用しか示さなかった (Fig. 1c)。

Ca²⁺放出を定量的に測定するためには、Fig. 1のように放出されたSR周囲のCa²⁺濃度を直接モニターすることは適切ではない。なぜなら、このようなCa²⁺緩衝作用が弱い条件では、放出されたCa²⁺によってCICRチャネルが二次的に活性化される正のフィード

バックを受けるからである²⁶。したがって、Ca²⁺放出速度に与えるセリバスタチンの作用は、高濃度のEGTA-Ca²⁺緩衝液中で検討した。Ca²⁺緩衝液でSR周囲を満たすことにより、SRからCa²⁺が放出されても遊離Ca²⁺濃度はほとんど変化しないので、二次的なCICR活性化は起こらず、試験薬物の正味の活性を定量的に調べることができる。Fig. 2bはpCa 6.0におけるSRからのCa²⁺放出の時間経過を見たものである。セリバスタチンの有無に関わらず、テスト溶液の適用時間の経過とともに、SR内のCa²⁺残量は減少した。そのような条件において、セリバスタチンは濃度依存的にCa²⁺放出速度を有意に増大させた (Fig. 2c)。データには示していないが、pCa 7.0および5.0においても同様の結果が観察された。

種々のCa²⁺濃度におけるセリバスタチンによるCa²⁺放出

次に私は、Mg²⁺を含まない種々の遊離Ca²⁺濃度に調整したCa²⁺緩衝液の適用によるCa²⁺放出速度に対するセリバスタチンの作用を調べた。500 μMのセリバスタチンはpCa 7.0-4.5だけでなく、pCa >8、つまりCa²⁺を加えないで調整した10 mM EGTA溶液においても、有意にCa²⁺放出速度を増大させた。また、セリバスタチンによるCa²⁺放出速度は、pCa 5.0までCa²⁺濃度依存的に増大した (Fig. 3a)。同様の実験をラットの骨格筋でも行ったところ、マウスの場合と同様、pCa >8およびpCa 7.0-4.5のすべてのCa²⁺濃度において、セリバスタチンはCa²⁺放出速度を増大させた (Fig. 3b)。

セリバスタチンによるCa²⁺放出に対するCICR調節薬の作用

セリバスタチンにはSRからのCa²⁺放出を引き起こす作用があり、その作用はCa²⁺濃度に依存するというをここまで示してきた。pCa >8での作用は別として、Fig. 3の結果は、セリバスタチンがリアノジンレセプターのCICR機構を活性化することを示唆している。そこで、セリバスタチンによるCa²⁺放出に対するCICR調節薬の作用を検討した。

まず、CICRを促進する薬物としてよく知られているAMPの作用を調べた。pCa 6.0において、AMPは単独で濃度依存的にCa²⁺放出速度を有意に増大させた (Fig. 4)。また、20 mMカフェインのCa²⁺放出速度を、濃度依存的に増大させた。一方、500 μMセリバスタチンのCa²⁺放出速度に対しては、有意に増大させたものの、その作用は2 mMで頭打ちであった (Fig. 4)。pCa >8、7.0および5.0においても、セリバスタチンおよびカフェインによるCa²⁺放出に対してAMPは同様の作用を示した。

次に、CICR阻害薬がセリバスタチンによるCa²⁺放出作用に及ぼす影響を検討した。pCa 6.0において、セリバスタチンのCa²⁺放出促進作用は、CICR阻害薬としてよく知られているMg²⁺により濃度依存的に抑

制された。カフェインに対しても Mg^{2+} は同様の阻害作用を示すが、高濃度 (>1 mM) の Mg^{2+} によるセリバスタチンの Ca^{2+} 放出に対する阻害作用の程度は、カフェインに対する阻害作用と比べて非常に弱かった (Fig. 5a)。 $pCa > 8$ においても、セリバスタチンの Ca^{2+} 放出作用は Mg^{2+} により阻害されたが、その程度は非常に小さいものであった (Fig. 5b)。

プロカインもまた CICR の阻害作用を持つことが知られており、本研究の実験系において、 Ca^{2+} の存在の有無に関わらず、カフェインによる Ca^{2+} 放出作用に対し強力な抑制作用を示すことが分かっている⁹⁾。そこでセリバスタチンの Ca^{2+} 放出に対するプロカインの作用を調べたところ、 pCa 6.0 および 7.0 において、有意な抑制作用を示した (Fig. 6a)。一方、 $pCa > 8$ においては、セリバスタチンにより増大した Ca^{2+} 放出速度は、プロカインによってまったく抑制されなかった (Fig. 6b)。

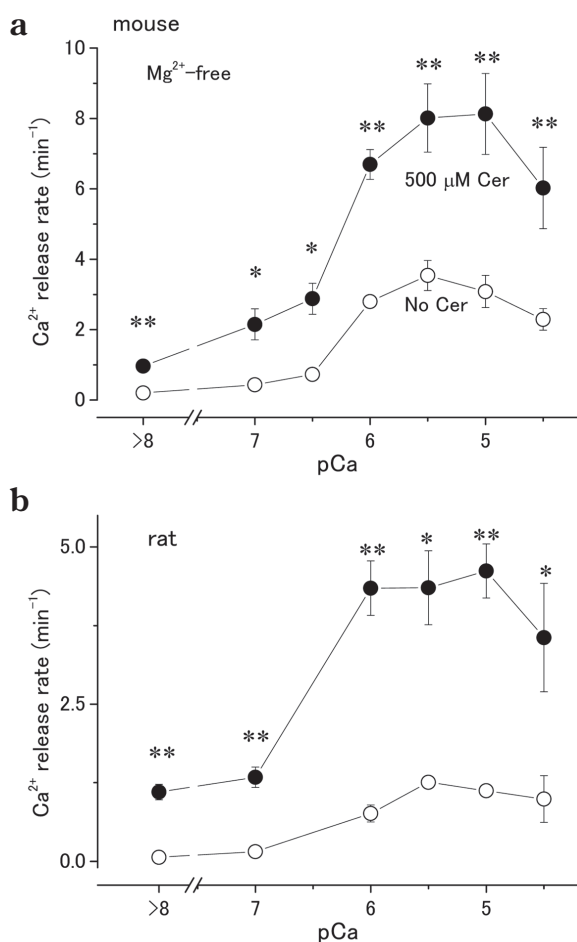


Fig. 3. Effect of Cer on the rate of CICR. The rate of Ca^{2+} release from the SR of mouse (a) or rat (b) skeletal muscle fibers was measured with or without 500 μ M Cer at a range of $pCa > 8-4.5$ in the absence of Mg^{2+} (mean \pm s.e.m., $n=3-9$ for mouse, $n=3-4$ for rat). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (vs without Cer). The paired data with or without Cer were obtained from the same preparation at each Ca^{2+} concentration. Error bars smaller than the symbols are not shown.

次に、プロカインよりも強力に CICR を阻害することが示されているテトラカインの作用を調べた²⁷⁾。テトラカインはまた、プロカインとは異なり CICR 以外に生理的な Ca^{2+} 放出も阻害すると考えられている²⁸⁾。セリバスタチンによる Ca^{2+} 放出に対するテトラカインの作用を調べたところ、プロカインとは対照的に、 pCa 6.0 および 7.0 のみならず、 $pCa > 8$ においても有意に抑制した (Fig. 6c)。

これらの結果から、セリバスタチンが CICR 促進作用をもつことは明らかである。その一方で、セリバスタチンはこの作用とは別の機構、つまり、 $pCa > 8$ で示されたようなテトラカインでは抑制されるがプロカインでは抑制されない Ca^{2+} 放出機構も活性化していることも明らかで、これは生理的 Ca^{2+} 放出に類似した機構の活性化である可能性がある。

リアノジンおよびセリバスタチン共適用後の SR の Ca^{2+} 貯蔵能の低下

CICR はリアノジンレセプター Ca^{2+} チャンネルの活性化によって生じるものであるので、セリバスタチンが CICR 機構を活性化させるのであれば、リアノジンレセプター Ca^{2+} チャンネルは実際にセリバスタチンによって開口するはずである。このことを確かめるためリアノジンをを用いた実験を行った。リアノジンは活性化状態の CICR チャンネルに選択的に結合し、チャンネルを開口状態に固定する性質を持つ。リアノジンレセプター Ca^{2+} チャンネルがリアノジンによって開口固定されると、SR の Ca^{2+} 貯蔵能は不可逆的に低下することが報告

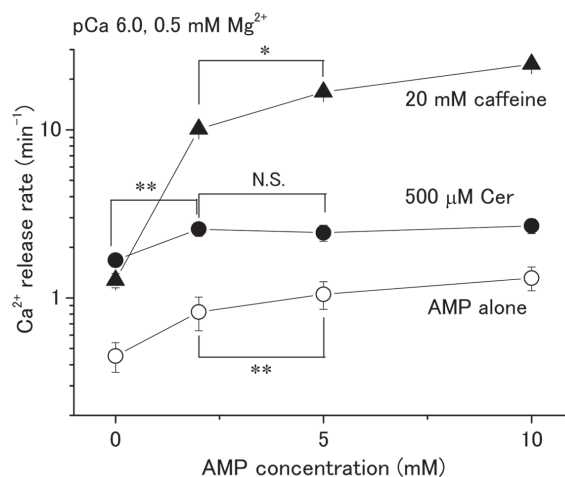


Fig. 4. Dependence on AMP concentration of the rate of Cer- or caffeine-induced Ca^{2+} release in mouse skeletal muscle fibers. The rate of Ca^{2+} release with 500 μ M Cer or 20 mM caffeine was measured under various AMP concentrations (0-10 mM) at pCa 6.0 in the presence of 0.5 mM Mg^{2+} (mean \pm s.e.m., $n=5$ for Cer, $n=3$ for caffeine and AMP alone). The data (0-10 mM AMP) in each line were obtained from the same preparation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (0 mM vs 2 mM or 2 mM vs 5 mM AMP in each line). N.S., not significant. Error bars smaller than the symbols are not shown.

されている^{9, 24, 29}). したがって, セリバスタチンが実際にリアノジンレセプターを活性化しているならば, リアノジンとセリバスタチンを同時適用することによりSRのCa²⁺貯蔵能の低下が起こるはずである. そこで, リアノジンを単独あるいはセリバスタチンと同時適用した時の, マウスおよびラット骨格筋SRのCa²⁺貯蔵能に対する作用を検討した.

まず, 通常のCa²⁺負荷方法でSRに取り込ませたCa²⁺量を, 高濃度のカフェインで完全に放出させ測定し, これを100%とした(run 1). 次にリアノジン単独, セリバスタチン単独, あるいは両薬物を, ATPを含まないpCa 6.0の溶液中で90秒間適用した後, SRへCa²⁺を負荷させ, SR内のCa²⁺をカフェイン適用により放出させた(run 2). Run 2の過程をさらに2回繰り返した(run 3, run 4). その結果, セリバスタチン単独適用では, Ca²⁺貯蔵能の低下はほとんど観察されなかった.

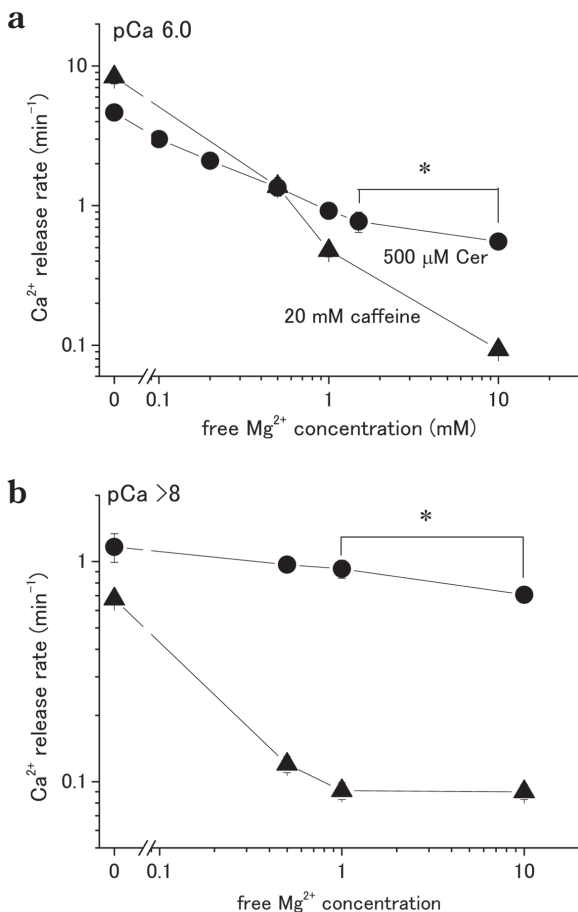


Fig. 5. Inhibition by Mg²⁺ of the rate of Cer- or caffeine-induced Ca²⁺ release in mouse skeletal muscle fibers. The rate of Ca²⁺ release with 500 μM Cer or 20 mM caffeine was measured under various Mg²⁺ concentrations (0-10 mM) at pCa 6.0 (a) (mean ± s.e.m., n=3-10 for Cer, n=4 for caffeine) or at pCa >8 (b) (mean ± s.e.m., n=4 for Cer, n=3 for caffeine). *P<0.05 (1 or 1.5 mM vs 10 mM Mg²⁺). Error bars smaller than the symbols are not shown.

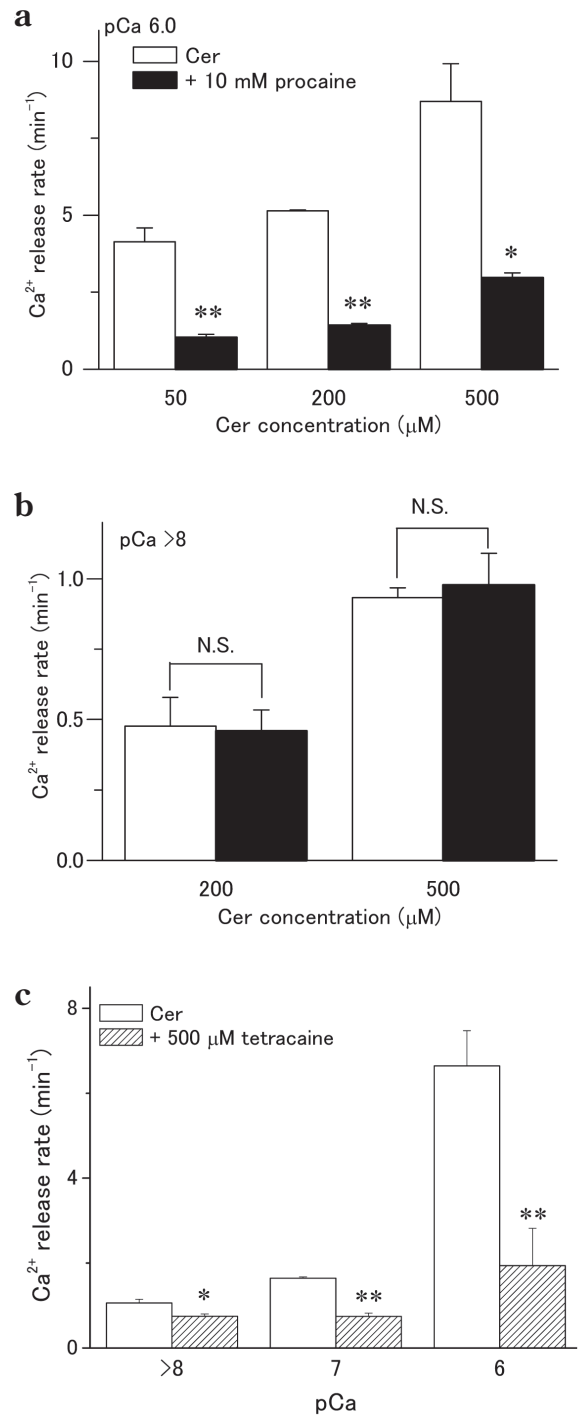


Fig. 6. Effect of procaine or tetracaine on Cer-induced Ca²⁺ release in mouse skeletal muscle fibers. The rate of Ca²⁺ release with 50-500 μM Cer at pCa 6.0 (a) or 200-500 μM Cer at pCa >8 (b) was measured in the presence or absence of 10 mM procaine under Mg²⁺-free conditions (mean ± s.e.m., n=3-4 for pCa 6.0, n=3-6 for pCa >8). The paired data with or without procaine were obtained from the same preparation at each Cer concentration. *P<0.05, **P<0.01 (vs Cer alone). N.S., not significant. (c) The rate of Ca²⁺ release with 500 μM Cer at pCa >8-6.0 was measured in the presence or absence of 500 μM tetracaine under Mg²⁺-free conditions (mean ± s.e.m., n=3). The paired data with or without tetracaine were obtained from the same preparation at each Ca²⁺ concentration. *P<0.05, **P<0.01 (vs Cer alone).

一方、リアノジン単独適用では、これまでに報告されていた通りSRのCa²⁺貯蔵能は低下した⁹⁾が、リアノジンとセリバスタチンを同時に適用した後では、SRのCa²⁺貯蔵能はより大きく低下した(Fig. 7a). これらの結果は、pCa 6.0において、マウス骨格筋のCICRチャンネルが、リアノジンが90秒間で結合するのに十分な活性を示しており、セリバスタチンはCICRチャンネルの活性をさらに上昇させ、より多くのチャンネルがリアノジンにより開口固定された、ということを示唆している。

次に、同様の実験をラット骨格筋を用いて行った。リアノジン単独適用でのCa²⁺貯蔵能は低下したものの、pCa 6.0におけるラット骨格筋SRからのCa²⁺放出速度がマウスに比べてかなり低い(Fig. 3)という結果から予想される通り、その程度はマウスの場合に比べて非常に小さかった。しかしながら、リアノジンとセリバスタチンを同時適用すると、Ca²⁺貯蔵能は顕著に低下した(Fig. 7b). これらの結果は、pCa 6.0条件下、マウス、ラットいずれの骨格筋においてもセリバスタチンはリアノジンレセプターを活性化することによってSRからのCa²⁺放出を引き起こすことを示している。

Ca²⁺濃度に依存しないセリバスタチンのCa²⁺放出促進作用

Ca²⁺存在下では、セリバスタチンはCICR機構を活性化する作用を持っていることを示してきた。一方、Ca²⁺がほとんどない条件においても、セリバスタチンはCa²⁺放出を促進し、その作用はプロカインにより影響を受けなかった。セリバスタチンによるCa²⁺放出促進作用は、SR膜の崩壊やSRタンパクの変性といった不可逆的な物理的障害が原因であるとは考えられ

ない。なぜなら、セリバスタチンをSR周囲から洗い流すことにより、セリバスタチンによるCa²⁺放出は完全に止まり、また、SRのCa²⁺貯蔵能はFig. 7で示したように、セリバスタチン単独適用によっては実質的には低下しないからである。したがって、セリバスタチンのCa²⁺放出作用には、CICRとは異なる何らかの機構も関与していることが考えられた。そこで、その推察を検証し、また、その未知の機構におけるCa²⁺濃度の影響を調べるために、セリバスタチンによるCa²⁺放出のCa²⁺濃度依存性について、既に報告されているような⁹⁾CICRの影響を最大限排除した条件、すなわち、CICR阻害薬であるMg²⁺とプロカインを十分量(ともに10 mM)併用した条件下で調べた(Fig. 8). 本条件下においては、Ca²⁺依存性のCa²⁺放出速度の上昇は、既に報告されている⁹⁾通り完全に消失し、またカフェインによるCa²⁺放出速度の上昇も消失していた(データは示さず)。この結果は、本条件下ではCICR活性が強力に阻害されていたことを示している。一方、本条件下においても、セリバスタチンはCa²⁺の存在の有無に関わらず、Ca²⁺放出速度を上昇させた。本条件がCICR活性を完全に阻害しているわけではないという可能性も否定は出来ないものの、これらの結果は、セリバスタチンがCa²⁺濃度に関わらず、CICRとは異なる機構を介したCa²⁺放出も引き起こしている可能性を強く示唆している。

【考 察】

セリバスタチンによるリアノジンレセプター CICRの促進

今回私は、サポニン処理した骨格筋スキンドファイ

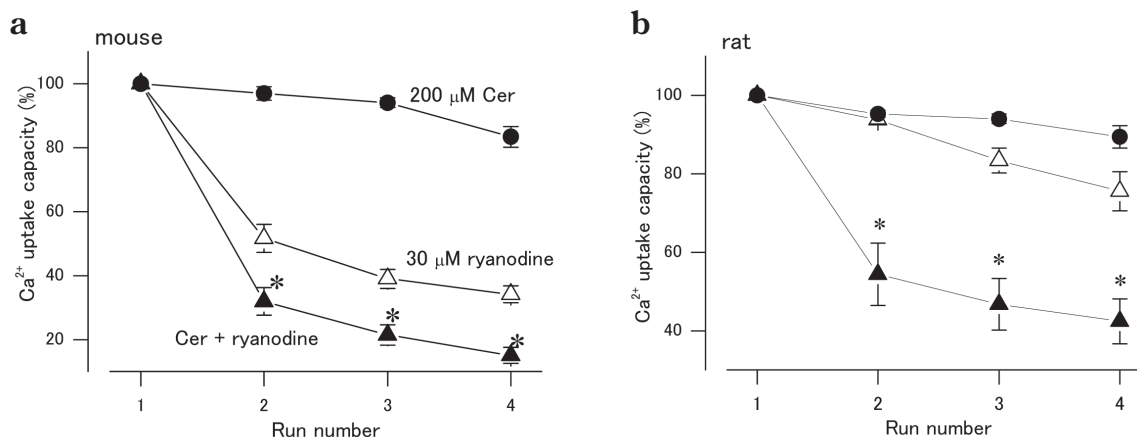


Fig. 7. Enhancement of reduction of the Ca²⁺-uptake capacity of the SR of skeletal muscle fibers after co-application of ryanodine and Cer. Ca²⁺-uptake capacity was determined after active Ca²⁺ loading to the SR, by measuring the amount of Ca²⁺ released by application of 50 mM caffeine. Four successive measurements were made from the same preparations of mouse (a) or rat (b). The data were normalized by the magnitude of the caffeine response in the first run. Between the runs, skinned fibers were treated for 90 s with a solution containing Ca²⁺ (pCa 6.0) in the absence of Mg²⁺ and adenine nucleotide, to which either Cer (200 μM) alone, ryanodine (30 μM) alone, or both ryanodine and Cer were added (mean ± s.e.m., n=5-6 for mouse, n=4-6 for rat). *P<0.05 (vs ryanodine alone, Dunnett's test).

バーにおいて、セリバスタチンが強いCa²⁺放出促進作用を有することを報告した。pCa 7.0-4.5では、セリバスタチンによるCa²⁺放出作用はCICRと次のような共通の性質を持っていた。1点目は、セリバスタチンによるCa²⁺放出速度が低Ca²⁺濃度条件より高Ca²⁺濃度条件の方がかなり高く、CICR促進薬であるAMPによってさらに増大されたこと、2点目は、セリバスタチンによるCa²⁺放出が、Ca²⁺存在下、CICR阻害薬のプロカインによって抑制されたこと、3点目は、CICR阻害薬のMg²⁺が濃度依存的にセリバスタチンによるCa²⁺放出を抑制したことである。Mg²⁺のCa²⁺放出抑制作用の濃度依存性が、セリバスタチンとカフェインの場合で一見異なるが、セリバスタチンにより放出されるCa²⁺には、CICRとは異なる機構を介して遊離したCa²⁺も含まれている可能性がある。したがって、Fig. 5aに示されたCa²⁺存在下におけるセリバスタチンのCa²⁺放出速度が、CICR機構由来の速度成分およびCICRとは異なる機構由来の速度成分の相加であると仮定し、Fig. 5aに示されたセリバスタチンのCa²⁺放出速度からFig. 5bに示されたセリバスタチンのCa²⁺放出速度を各Mg²⁺濃度において減じると、カフェインの場合のMg²⁺濃度依存性とほぼ同様の値が得られる。これら3つのCICRと共通の性質は、セリバスタチンがCa²⁺存在下でCICR機構を促進する作用を有すると解釈してよいことを示している。

セリバスタチンがCICR促進作用を示すには20 μM以上の濃度が必要であるが (Fig. 1a, 2c)、clofibric acidや他のCICR促進薬(カフェインやアデニンヌクレオチドなど)がCa²⁺放出を引き起こす最適な濃度は数百μMとかなり高い。したがって、セリバスタチンは4-クロ

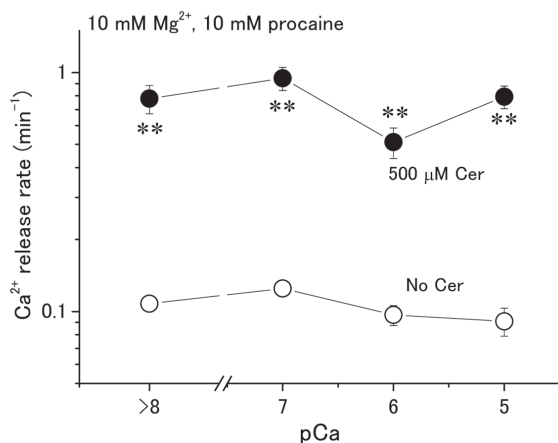


Fig. 8. Enhancing effect of Cer on Ca²⁺ release in the presence of a high concentration of Mg²⁺ and procaine in mouse skeletal muscle fibers. The rate of Ca²⁺ release with or without 500 μM Cer was measured at a range of pCa >8-5.0 in the presence of 10 mM Mg²⁺ and 10 mM procaine (mean ± s.e.m., n=4-9). The paired data with or without Cer were obtained from the same preparation at each Ca²⁺ concentration. **P<0.01 (vs without Cer). Error bars smaller than the symbols are not shown.

ロ-m-クレゾール^{30, 31})やドキシソルピシン^{32, 33})のような、比較的低濃度でCa²⁺放出を引き起こすことができる促進薬のタイプに分類できるであろう。

カフェインとアデニンヌクレオチドは共にCICRを促進する薬物であるが、その促進作用の性質には違いがある。カフェインはCICRのCa²⁺感受性を高めることによって、CICRを強く促進する^{2, 34, 35}。一方、アデニンヌクレオチドはCICRのCa²⁺感受性は変えずに、チャンネルの開口確率を増やすことによりCICRを促進する^{2, 34, 35}。それではセリバスタチンによるCICR促進作用の性質はどうかと言うと、Fig. 3に示されたように、マウス、ラットのいずれにおいても、Ca²⁺感受性を変えることなくCa²⁺放出を起こしているようである。つまり、セリバスタチンのCICR促進作用はアデニンヌクレオチドタイプであると考えられ、したがって、セリバスタチンによるCa²⁺放出に同タイプの促進薬であるAMPを作用させても、Ca²⁺放出増大作用が一定濃度以上では飽和するという結果はその考えと一致する事実である。

Ca²⁺がない条件におけるセリバスタチンによるCa²⁺放出の開口機構

セリバスタチンはCa²⁺やAMPが存在しない条件でさえ、Ca²⁺放出速度を有意に上昇させた。このCa²⁺がない条件におけるセリバスタチンのCa²⁺放出作用は、Ca²⁺存在下の場合とは異なり、CICR阻害薬であるプロカインにより抑制されなかった。これは、Ca²⁺のない条件においてもプロカインにより抑制されるカフェインのCa²⁺放出作用と異なる点である⁹。さらに、CICRを最大限抑制したような条件においても、セリバスタチンはCa²⁺放出を強く促進した。これらの結果は、セリバスタチンがCICRとは異なる何らかのCa²⁺放出メカニズムを活性化することを示唆している。Ca²⁺のない条件で、セリバスタチンがリアノジンレセプターに依存しないメカニズムを介してCa²⁺放出を引き起こした可能性も考えられなくはない。しかし、骨格筋のリアノジンレセプターCa²⁺チャンネルを、CICR機構だけでなく生理的なCa²⁺放出機構においても阻害するテトラカインが、Ca²⁺がない条件でのセリバスタチンのCa²⁺放出作用を抑制したことに注目すると、やはりリアノジンレセプターの活性化を介した作用であると考えられる。この点において、Ca²⁺がない条件でのセリバスタチンの作用は、生理的Ca²⁺放出に類似した機構でリアノジンレセプターを活性化すること clofibric acidと似ている^{9, 10}。しかし、アデニンヌクレオチドであるAMPがclofibric acidによるCa²⁺放出に対しては抑制作用を示すのに対して、セリバスタチンによるCa²⁺放出に対しては、Ca²⁺がない条件でさえ増強作用を示した。また、clofibric acidによるCa²⁺放出に対するMg²⁺の抑制作用は約1 mMで飽和したが、セリバスタチンによるCa²⁺放出に対しては1 mMよりも

高い範囲で抑制作用はさらに強くなった (Fig. 5b). したがって, Ca^{2+} がない条件でのセリバスタチンの作用機構は clofibrilic acid と異なるようである. 以上, 前項に述べたことと併せて, セリバスタチンが性質の異なる二つの機構により骨格筋 SR のリアノジンレセプター Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 放出を引き起こすことを示したが, セリバスタチンがリアノジンレセプター Ca^{2+} チャネルに直接作用するのか, それともリアノジンレセプターに関与する何らかのタンパクなどを介して間接的に作用するのか, という疑問も含め, セリバスタチンによる Ca^{2+} 放出の詳細な分子メカニズムは今後検討されなければならない. 最近, 健康人の骨格筋生検のスキンドファイバーを用いた検討において, シンバスタチンがまずミトコンドリアの呼吸鎖機能を変化させ, 膜の脱分極を介してミトコンドリアから Ca^{2+} が放出され, その結果 SR 内に過剰量の Ca^{2+} が取り込まれることで, リアノジンレセプター Ca^{2+} チャネルから多量の Ca^{2+} が放出される, という報告がなされた¹⁶⁾. 本研究の実験系では, 実験溶液中にアジ化ナトリウムが添加されミトコンドリア呼吸鎖は阻害されているため, 同様の機序で Ca^{2+} が放出されている可能性は低いと考えられるが, スタチンの Ca^{2+} 放出作用を解明する上で非常に興味深い知見である.

セリバスタチンによる Ca^{2+} 放出と横紋筋融解症

臨床で用いられているスタチン系薬剤が, 副作用としてミオパチーを引き起こし, 稀に横紋筋融解症にまで至ることが報告されている^{17, 18, 36)}. スタチン誘発性のミオパチー発症の正確な病因はいまだ良く分かっていない. 骨格筋では, 細胞内の Ca^{2+} レベルが生理的な範囲を過剰に越えると, しばしば筋障害が生じる³⁷⁻⁴¹⁾. したがって, スタチンによって活性化されたリアノジンレセプターを介して放出された Ca^{2+} が筋障害を引き起こし, ミオパチーを誘発する可能性も考えられる. セリバスタチンによる Ca^{2+} 放出作用がプラバスタチンよりも格段に強かったことと, セリバスタチンがプラバスタチンや他のスタチンよりも10倍程度, 筋疾患の発症に関与しているということは注目すべき点である^{42, 43)}. セリバスタチンが Ca^{2+} 放出に必要な濃度 ($>20 \mu\text{M}$) と HMG-CoA 還元酵素阻害に必要な濃度 (nM レベル) には大きな乖離がある^{44, 45)}が, 低濃度のセリバスタチンがリアノジンレセプターに対して慢性的に作用することで, Ca^{2+} 放出が引き起こされてくとも考えられる. あるいは, ある特定の遺伝子型のリアノジンレセプターがセリバスタチンに非常に高い感受性を持っているのかもしれない. また実際には, スタチン系薬剤の血中濃度は他の薬剤などの影響により大きく変動することが知られており⁴⁶⁻⁴⁸⁾, またスタチン系薬剤の取り込みに関与するトランスポーターである MCT4 の筋肉中における発現量は非常に個人差が大きいことが報告されていることから,

筋肉組織中での濃度は明確ではない^{49, 50)}. セリバスタチンを含むスタチン系薬剤には様々な作用があり¹²⁻¹⁴⁾, セリバスタチンによるリアノジンレセプターの活性化がミオパチーを誘発し, さらに横紋筋融解症につながるのかどうかについては, もちろん, 現時点では不明である. セリバスタチンによる Ca^{2+} 放出だけでなく, 他のスタチンによる Ca^{2+} 放出の性質をさらに掘り下げて調べることは, リアノジンレセプター Ca^{2+} 放出チャネルの開口機構を解明する手がかりになるとともに, スタチン系薬剤の副作用である横紋筋融解症の原因究明に役立つかもしれない.

なお, 本論文中のすべての図は, 原著論文 “ Ca^{2+} -Releasing Effect of Cerivastatin on the Sarcoplasmic Reticulum of Mouse and Rat skeletal Muscle Fibers. J Pharmacol Sci 2003;93:279-88” から引用した.

【要 約】

本研究において, HMG-CoA 還元酵素阻害剤が RyR に作用し Ca^{2+} 放出を引き起こすか否かを, 臨床において骨格筋に対する副作用が最も強いと言われるセリバスタチンを用いて, 生理的 Ca^{2+} 放出および CICR という2種の RyR 開口様式との関連に注目しながら検討した. セリバスタチンは濃度依存的に RyR を開口して Ca^{2+} 放出を引き起こした. Ca^{2+} 存在下でのセリバスタチンの Ca^{2+} 放出速度は, CICR 促進薬である AMP により増大され, CICR 抑制薬である Mg^{2+} およびプロカインにより抑制された. 従って, Ca^{2+} 存在下でのセリバスタチンによる Ca^{2+} 放出は, RyR の CICR 機構の促進の結果であると考えられる. 一方, Mg^{2+} とプロカインにより CICR を強く抑制した条件下, あるいは, ほとんど Ca^{2+} がない条件下でもセリバスタチンは Ca^{2+} 放出を引き起こした. これは, セリバスタチンが CICR の促進に加えて, それとは別の機序を通じて, Ca^{2+} 放出を引き起こすことを示唆している. 今後, 更なる研究の発展により, スタチン系薬剤による臨床上的副作用である横紋筋融解症の病因解明に至ることに期待したい.

【謝 辞】

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました丸山敬教授, 遠藤實特任教授, 岐阜大学大学院医学研究科 池本隆昭博士に深く感謝申し上げます. また, 多大なご協力を賜りました名古屋市立大学 田辺光男助教授, 三共株式会社 河野圭太副主任研究員, ならびに埼玉医科大学薬理学教室の皆様にご心より感謝申し上げます. さらに, 全面的な支援を賜りました三共株式会社 関係者の皆様にご厚く御礼申し上げます.

【引用文献】

- 1) Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* 1993;361:315-25.
- 2) Endo M, Ikemoto T. Regulation of ryanodine receptor calcium release channels. In: Endo M, Kurachi Y, Mishina M, editors. *Handbook of Experimental Pharmacology 147, Pharmacology of Ionic Channel Function: Activators and Inhibitors*. Heidelberg: Springer-Verlag; 2000. p.581-601.
- 3) Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, et al. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 1989;339:439-45.
- 4) Sutko JL, Airey JA. Ryanodine receptor Ca²⁺ release channels; Dose diversity in form equal diversity in function? *Physiol Rev* 1996;76:1027-71.
- 5) Murayama T, Ogawa Y. Characterization of type 3 ryanodine receptor (RyR3) of sarcoplasmic reticulum from rabbit skeletal muscles. *J Biol Chem* 1997;272:24030-7.
- 6) Endo M, Tanaka M, Ogawa Y. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature* 1970; 228:34-6.
- 7) Thorens S, Endo M. Calcium-induced calcium release and "depolarization"-induced calcium release: Their physiological significance. *Proc Jpn Acad* 1975;51:473-8.
- 8) Ishizuka T, Endo M. Effects of adenine on skinned fibers of amphibian fast skeletal muscle. *Proc Jpn Acad* 1983;59:97-100.
- 9) Ikemoto T, Endo M. Properties of Ca²⁺ release induced by clofibric acid from the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle fibres. *Br J Pharmacol* 2001;134:719-28.
- 10) Ikemoto T, Hosoya T, Aoyama H, Kihara Y, Suzuki M, Endo M. Effects of dantrolene and its derivatives on Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle fibres. *Br J Pharmacol* 2001;134:729-36.
- 11) Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 2001;292:1160-4.
- 12) 関谷元博, 石橋俊. スタチンの多面的効果 治療学 2002;36:64-9
- 13) Swiatkowska M, Pawlowska Z, Szemraj J, Drzewoski J, Watala C, Cierniewski CS. Cerivastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor, reduces plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in endothelial cells by down-regulation of cellular signaling and the inhibition of PAI-1 promoter activity. *Jpn J Pharmacol* 2002;90:337-44.
- 14) Tobert JA. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:517-26.
- 15) Nakahara K, Yada T, Kuriyama M, Osame M. Cytosolic Ca²⁺ increase and cell damage in L6 rat myoblasts by HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;202:1579-85.
- 16) Sirvent P, Mercier J, Vassort G, Lacampagne A. Simvastatin triggers mitochondria-induced Ca²⁺ signaling alteration in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329:1067-75.
- 17) Omar MA, Wilson JP, Cox TS. Rhabdomyolysis and HMG-CoA reductase inhibitors. *Ann Pharmacother* 2001;35:1096-107.
- 18) Omar MA, Wilson JP. FDA adverse event reports on statin-associated rhabdomyolysis. *Ann Pharmacother* 2002;36:288-95.
- 19) Waclawik AJ, Lindal S, Engel AG. Experimental lovastatin myopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993;52:542-9.
- 20) Reijneveld JC, Koot RW, Bredman JJ, Joles JA, Bar PR. Differential effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors on the development of myopathy in young rats. *Pediatr Res* 1996;39: 1028-35.
- 21) Endo M, Iino M. Specific perforation of muscle cell membranes with preserved SR functions by saponin treatment. *J Muscle Res Cell Motil* 1980;1:89-100.
- 22) Iino M. Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol* 1989;94:363-83.
- 23) Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260: 3440-50.
- 24) Ikemoto T, Iino M, Endo M. Enhancing effect of calmodulin on Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle fibres. *J Physiol* 1995;487:573-82.
- 25) Raju B, Murphy E, Levy LA, Hall RD, London RE. A fluorescent indicator for measuring cytosolic free magnesium. *Am J Physiol* 1989;256:C540-8.
- 26) Endo M, Iino M. Measurement of Ca²⁺ release in skinned fibers from skeletal muscle. *Methods Enzymol* 1988;157:12-26.
- 27) Ohnishi ST. Interaction of metallochromic indicators

- with calcium sequestering organelles. *Biochim Biophys Acta* 1979;585:15-9.
- 28) Almers W, Best PM. Effects of tetracaine on displacement currents and contraction of frog skeletal muscle. *J Physiol* 1976;262:583-611.
 - 29) Oyamada H, Iino M, Endo M. Effects of ryanodine on the properties of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum in skinned skeletal muscle fibres of the frog. *J Physiol* 1993;470:335-48.
 - 30) Zorzato F, Scutari E, Tegazzin V, Clementi E, Treves S. Chlorocresol: an activator of ryanodine receptor-mediated Ca^{2+} release. *Mol Pharmacol* 1993; 44:1192-201.
 - 31) Herrmann-Frank A, Richter M, Sarkozi S, Mohr U, Lehmann-Horn F. 4-Chloro-m-cresol, a potent and specific activator of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochim Biophys Acta* 1996;1289:31-40.
 - 32) Abramson JJ, Buck E, Salama G, Casida JE, Pessah N. Mechanism of anthraquinone-induced calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1988;263:18750-8.
 - 33) Kim DH, Landry AB^{3RD}, Lee YS, Katz AM. Doxorubicin-induced calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Mol Cell Cardiol* 1989;21:433-6.
 - 34) Endo M. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev* 1977;57:71-108.
 - 35) Endo M. Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum. *Curr Top Membr Transp* 1985;25:181-230.
 - 36) Sica, DA, Gehr TW. Rhabdomyolysis and statin therapy: relevance to the elderly. *Am J Geriatr Cardiol* 2002;11:48-55.
 - 37) Duncan CJ. Role of intracellular calcium in promoting muscle damage: a strategy for controlling the dystrophic condition. *Experientia* 1978;34:1531-5.
 - 38) Borgers M, Thone F, Van Reempts J, Verheyen F. The role of calcium in cellular dysfunction. *Am J Emerg Med* 1983;1:154-61.
 - 39) Rudge MF, Duncan CJ. Comparative studies on the role of calcium in triggering subcellular damage in cardiac muscle. *Comp Biochem Physiol A* 1984;77: 459-68.
 - 40) Gissel H, Clausen T. Excitation-induced Ca^{2+} influx and skeletal muscle cell damage. *Acta Physiol Scand* 2001;171:327-34.
 - 41) Gommans IM, Vlak MH, De Haan A, Van Engelen BG. Calcium regulation and muscle disease. *J Muscle Res Cell Motil* 2002;53:59-63.
 - 42) Evans M, Rees A. The myotoxicity of statins. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:415-20.
 - 43) Hyman DJ, Henry A, Taylor A. Severe rhabdomyolysis related to cerivastatin without gemfibrozil. *Ann Intern Med* 2002;137:74.
 - 44) Bischoff H, Angerbauer R, Bender J, Bischoff H, Angerbauer R, Bender J, et al. Cerivastatin: pharmacology of a novel synthetic and highly active HMG-CoA reductase inhibitor. *Atherosclerosis* 1997;135: 119-30.
 - 45) Dansette PM, Jaoen M, Pons C. HMG-CoA reductase activity in human liver microsomes: comparative inhibition by statins. *Exp Toxicol Pathol* 2000;52:145-8.
 - 46) Kantola T, Kivisto KT, Neuvonen PJ. Erythromycin and verapamil considerably increase serum simvastatin and simvastatin acid concentrations. *Clin Pharmacol Ther* 1998;64:177-82.
 - 47) Backman JT, Kyrklund C, Neuvonen M, Neuvonen PJ. Gemfibrozil greatly increases plasma concentrations of cerivastatin. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:685-91.
 - 48) Shitara Y, Itoh T, Sato H, Li AP, Sugiyama Y. Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:610-6.
 - 49) Nagasawa K, Nagai K, Ishimoto A, Fujimoto S. Transport mechanism for lovastatin acid in bovine kidney NBL-1 cells: Kinetic evidences imply involvement of monocarboxylate transporter 4. *Int J Pharm* 2003;262:63-73.
 - 50) Hubouchaud H, Butterfield GE, Wolfel EE, Bergman BC, Brooks GA. Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. *Am. J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278:E571-9.