

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：32684

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18877

研究課題名(和文)オートファジーを介したスタチン依存的な横紋筋細胞障害の抑制法の開発

研究課題名(英文) Approaches for suppression of statins-induced rhabdomyolysis

研究代表者

荒木 信 (Araki, Makoto)

明治薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20552904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、コレステロールが高値となる脂質代謝異常症の治療薬スタチンによる、筋細胞障害を伴う副作用の発症機構の解明と抑制法の確立を目的としている。これまでに培養細胞を用いた実験で、スタチンは細胞種依存的な機構でオートファジーを誘導し、細胞死を起こすことを見出した。そこで、スタチン依存的なオートファジー誘導を抑制する化合物を探索することで、副作用の抑制法の確立を目指した。本研究期間においては有力な化合物の同定に至らなかったが、その過程でスタチン依存的なオートファジー誘導機構に低分子量Gタンパク質の関与を示唆する結果を得た。今後、さらなる分子機構の解明により副作用抑制法への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Statins, inhibitor of the rate-limiting enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase for synthesis of cholesterol, are used for the therapy for hypercholesterolemia. On the other hand, statins cause rhabdomyolysis of side effects. We aim to elucidate the mechanism of side effect and establish inhibitory method for statin-induced rhabdomyolysis. In this study, a series of compounds was screened to identify inhibitor for statin-induced autophagy. Unfortunately, we were not able to identify the specific compounds, but achieve positive results suggested that small G proteins are involved in statin-induced autophagy. We expect that elucidation of the molecular mechanisms of statin-induced autophagy is available for suppression for side effect of statins.

研究分野：薬学

キーワード：スタチン 横紋筋融解症 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

高コレステロール血症治療薬のスタチンは、コレステロールを合成するメバロン酸経路の律速酵素 HMG-CoA 還元酵素を阻害する薬で、臨床で広く使用されている。その一方でスタチンは、ミオパシーなどの軽度な筋障害や、重度な場合には筋肉が壊死してしまう横紋筋融解症を引き起こす (Fig. 1)。これらの副作用は筋肉のタンパク質分解が亢進したために起こることが知られている。スタチンによる筋障害に関する研究報告は多数あるが、詳細な発症機構解明には至っていない。これまでに、(i)スタチンの組織内への取り込みに関与するトランスポーターについて<sup>(1)</sup>、(ii)アポトーシスによる細胞死について<sup>(2)</sup>注目した研究が報告されている。(i)は、スタチンの取り込みと血中濃度が重要という結論だが、発症機構については明らかになっていない。また(ii)の研究の多くは、培養細胞にスタチンを多量に曝露しており、生理的現象を反映しているとは言い難い。

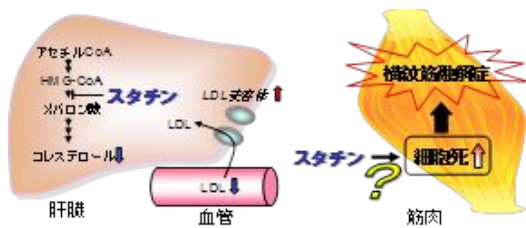


Fig. 1 スタチンの作用点とその効果

申請者は、スタチン依存的な筋障害がアポトーシス以外の現象によって引き起こされている可能性を考え、非選択的なタンパク質分解機構であるオートファジーに着目した。その結果、スタチン (疎水性) は、ヒト横紋筋肉腫由来 A204 細胞においてオートファジーを誘導し、細胞死を起こすことを明らかにした<sup>(3,4)</sup>。この応答は、スタチンによるアポトーシス誘導よりも低濃度、短時間で起こることから、スタチン依存的な細胞死の引き金になると考えている。

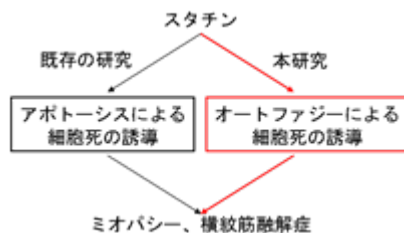


Fig. 2 スタチン依存的な副作用発症における本研究の仮説

この分子機構を解明するためにランダムな遺伝子破壊法である Gene trap 法を行った。レトロウイルスによってランダムに遺伝子を破壊することで、スタチン依存的な細胞死を起こさない細胞をクローニングし、細胞周期を調節する Cyclin D3 遺伝子を同定した。しかし、このスタチン耐性株は細胞死を完全には抑制せず、部分的な効果しか見られなかった。また、細胞死の引き金と考えられるスタチン依存的なオートファジー誘導は抑制されなかった。これはクローニングの指標を“細胞死”としたために、生き永らえるための対症療法的な遺伝子が同定された結果と考えられる。この方法では根本的な解決は見込めないと考えた。

そこで本申請では、“オートファジーの誘導”を指標に関連遺伝子の同定を試みる。スタチン依存的なオートファジー誘導は 8~24 時間で観察され、細胞死よりも 2 次的な影響を抑えてクローニングすることが出来るため、スタチンの副作用に直接的に関与する遺伝子が同定できると予想される。

【参考文献】

- (1) SEARCH Collaborative Group, Link E., et al., N. Engl. J. Med., 359, 789-799 (2008).
- (2) Wong W. W., et al., Cancer Res., 7, 2067-2075 (2001).
- (3) Araki M., Motojima K., Biochem. Biophys. Res. Commun., 367, 462-467 (2008).
- (4) Araki M., Maeda M., Motojima K., Eur. J. Pharmacol., 674, 95-103 (2012).

2. 研究の目的

本研究は、高コレステロール血症治療薬であるスタチンが引き起こす、横紋筋融解症などの筋細胞障害の抑制・改善方法の確立を目的としている。その中でも特に、筋細胞障害の原因と考えているスタチン依存的なオートファジー誘導の分子機構を解明していく。これまでに疎水性のスタチンが細胞種選択的にオートファジーを誘導することを明らかにしてきた。本計画では化合物ライブラリーを用いた解析を行い、スタチン依存的なオートファジー誘導の関連遺伝子やシグナル経路を同定し、その役割を明らかにする。本研究による分子機構の解明から、副作用の起こらない新規の薬剤開発や副作用に対する対応策の確立につながる事が期待される。また、副作用発症機構の鍵となる因子が明らかになることで、副作用発症の個人差の要因となる SNP 解析にも役立つと考えている。

3. 研究の方法

<In Cell Analyzer、蛍光顕微鏡によるオートファジー誘導の解析>  
スタチン依存的なオートファジー誘導に対

する各種薬剤の影響を解析するために In Cell Analyzer と蛍光顕微鏡を用いて、既に作製済みの GFP-LC3 を発現するヒト横紋筋肉腫由来 A204 細胞でアッセイを行った。GFP-LC3 はオートファジーマーカータンパク質である LC3 に GFP を融合したタンパク質で、オートファジーが誘導されると GFP-LC3 の輝点の形成が促進される。これまでの研究では、セリバスタチンを 0.1  $\mu\text{M}$  以上の濃度で 12 ~ 24 時間程度添加すると、A204 細胞でオートファジーが誘導された。本研究では、セリバスタチン 0.1 ~ 1  $\mu\text{M}$  でオートファジーを誘導し、各種薬剤のスタチン依存的なオートファジー誘導への影響を検討した。オートファジー誘導の評価は、In Cell Analyzer と蛍光顕微鏡で GFP-LC3 の蛍光像を撮影し、各画像から細胞当たりのオートファゴソーム形成量を定量して解析した。

#### < mTORC1 活性の評価 >

mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) は、オートファジーに対して抑制的に働いている複合体で、細胞のエネルギー状態や外部からの刺激に応じて、タンパク質合成や細胞周期の調節などを担っている。これまでの結果から、スタチン依存的なオートファジー誘導は、mTORC1 の不活性化が関与することが示唆されており、mTORC1 の活性化状態を評価することは重要である。mTORC1 はオートファジーの開始複体に作用するだけでなく、タンパク質合成に関与する S6K のリン酸化を引き起こし、S6 がリン酸化される。mTORC1 の活性化状態は S6K、S6 のリン酸化状態をウェスタンブロットを行い解析した。

#### < 免疫染色による細胞内局在の解析 >

mTORC1 はリソソーム膜上に局在化して活性化することなどから、各タンパク質の細胞内局在を解析することは、調節機構を解明する上で重要となる。mTOR の細胞内局在を解析するために A204 細胞を cover glass 上に培養してパラホルムアルデヒドで固定して免疫染色を行った。mTOR の局在を解析するときは、スタチンを 12、24 hr 添加して培養後、固定して染色した。細胞内局在の解析は共焦点顕微鏡を使用した。

## 4 . 研究成果

#### < オートファジー誘導のアッセイ系の構築 >

スタチン依存的なオートファジー誘導を抑制する因子の探索を行うために、ヒト横紋筋肉腫由来細胞に GFP-LC3 を発現させた A204 細胞を使用することとした。これまでに、オートファジーの誘導をモニターできることは確認しているため、In Cell Analyzer、蛍光顕微鏡を使用して多検体のアッセイを行うために、アッセイ系のバリデーションを行っ

た。本アッセイでは、撮影した画像から、核と GFP-LC3 の輝点(オートファゴソーム)を抽出し、視野に含まれるオートファゴソームの数を核の数で除し、細胞辺りのオートファゴソームの数とした。セリバスタチンの濃度は 1  $\mu\text{M}$  で、24 hr 後の影響を解析することとした。本実験方法でセリバスタチンによって誘導されたオートファジーを抑制する化合物を探索した。

#### < スタチン誘導性オートファジーを抑制する化合物の探索 >

シグマより購入した既知化合物のライブラリーを使用して、スタチン誘導性オートファジーを抑制する化合物を探索した。その結果、オートファジーによる分解を阻害する化合物(オートファジー阻害剤)は見出されるものの、セリバスタチン依存的な機構を阻害するものや、細胞種依存的な機構に作用するものは同定されなかった。本研究期間では、有力な化合物を同定できなかったが、指標とする LC3 融合タンパク質の再評価などアッセイ系の再構築も含めて、今後も新たな化合物ライブラリーを使用するなどして、候補化合物の同定を目指していく。

#### < mTORC1 の活性調節とオートファジー誘導のタイムコースの解析 >

これまでの解析から、スタチンによって mTORC1 の不活性化が起こること、オートファジーが誘導されることは明らかとなっていた。しかし、前後関係が明らかとなっていなかったため、スタチン添加からそれぞれの現象が起こるまでのタイムコースを解析した。各時間スタチンを添加してウェスタンブロットで検討した結果、mTORC1 の不活性化は 8 時間程度で起きているのに対して、オートファジーの誘導は 12 ~ 24 時間で起きていた。また、mTORC1 の早期の抑制も、オートファジーと同様に細胞種によって異なることが明らかとなった。これらの結果は、これまで考えていた誘導機構を支持するデータであり、GGPP による mTORC1 の調節機構がオートファジーの誘導に重要であることを示唆している。

#### < mTOR の細胞内局在の解析 >

mTORC1 が活性化するためにはリソソーム上に局在化することが必要である。また、アミノ酸飢餓の状態で、mTORC1 が不活性化する時にはリソソームから離れることが報告されている。そこで、スタチンによって不活性化状態の mTORC1 の局在について解析した。その結果、スタチン添加後 12 時間で mTORC1 が不活性化状態であるにもかかわらず、mTOR はリソソーム上に存在することが明らかとなった。

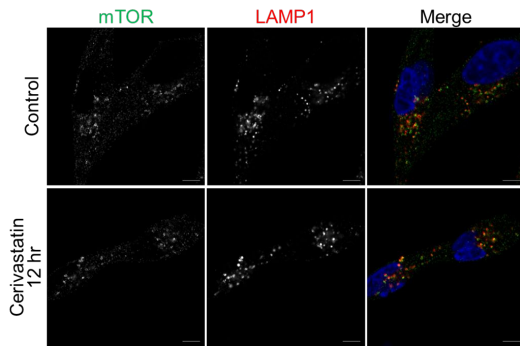


Fig. 3 スタチンによる mTOR の細胞内局在への影響

この結果は、インスリンシグナルによる mTORC1 の調節と類似性があることから、スタチンによる mTORC1 の不活性化は、インスリンシグナルによる、mTORC1 の調節機構とオーバーラップしている部分があることが予想される。この経路は低分子量 G タンパク質の Rheb の寄与が大きいことから、これまでの GGPP による調節が重要であるという本研究の仮説とは相容れない点があるが、非常に興味深い結果が得られた。今後、GGPP による調節と Rheb の活性化状態との関係性について詳細に解析し、スタチン依存的で細胞種依存的な mTORC1、オートファジーの調節機構の解明が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

荒木 信, 小沢 淳, 金山 麻梨奈, 橘高 智哉, 本島 清人, 紺谷 圈二  
脂質代謝異常症治療薬スタチン依存的な mTORC1 調節機構は GGPP を介し細胞種特異的である  
第 89 回日本生化学会大会(仙台)2016 年 9 月 26 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[https://www.my-pharm.ac.jp/education/kdb/kyoin/kyoin\\_138.html](https://www.my-pharm.ac.jp/education/kdb/kyoin/kyoin_138.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

荒木 信 (ARAKI MAKOTO)  
岩手医科大学・薬学部・助教  
研究者番号：20552904

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )