

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17483

研究課題名(和文)スタチンによる骨格筋障害発症機序とコレステロール代謝の骨格筋形成特有な役割の解明

研究課題名(英文) Mechanism of statin-induced skeletal muscle damage and the unique role of cholesterol metabolism in skeletal myogenesis

研究代表者

大崎 芳典(Osaki, Yoshinori)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10844821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋特異的HMGCR-KOマウスの解析より筋線維の障害に先行して骨格筋のATP量が減少することが判明した。このため、HMGCRもしくはRosa26をKOしたC2C12セルラインをCrispr-Cas9を用いて作成し、Rab small GTPaseのsiRNAによるロックダウンにおいて、特にHMGCR-KO C2C12でATP量が回復するかどうかのスクリーニングを実施した。Rab 8A・8B・10・13の一群でATP量の増加が確認されたが、筋線維の形態の改善に乏しく、HMGCRのKOに伴う横紋筋融解症の原因となる分子の断定には至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋特異的HMG-CoA還元酵素(HMGCR)-KOマウスの解析によりスタチンの筋毒性が主として生体においてもHMGCRの機能障害で起きること、ATPの減少が骨格筋細胞の障害に先行することが明らかとなった。また、Rab small GTPaseの一群が特にATP量の減少に関与していることが判明した。しかし、どの特定のRabが影響しているか未だ完全に解明できていないが、HMGCR-KO C2C12細胞などのセルラインも確立でき、骨格筋の形成・維持に必要なと思われるsmall GTPaseの候補も挙がってきており、脂質代謝が骨格筋形成において果たす役割の一部を解明できたと思われる。

研究成果の概要(英文)：Analysis of skeletal muscle-specific HMGCR-KO mice revealed that skeletal muscle ATP levels are reduced prior to myofiber damage. Therefore, C2C12 cell lines KO'd with HMGCR or Rosa26 were generated using Crispr-Cas9 and screened for restoration of ATP levels in siRNA knockdown of Rab small GTPases, particularly in HMGCR-KO C2C12. Although an increase in ATP levels was observed in a group of Rab 8A, 8B, 10, and 13, there was a lack of improvement in myofiber morphology, and we have not yet determined the molecule responsible for the rhabdomyolysis associated with KO of HMGCR.

研究分野：脂質代謝

キーワード：HMG-CoA還元酵素 HMGCR スタチン 横紋筋融解症 骨格筋

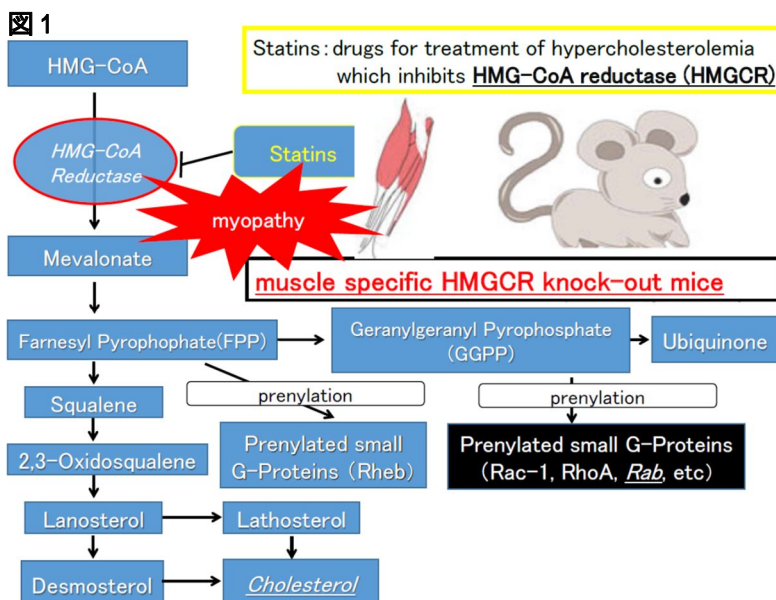
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

高コレステロール(Cho)血症の治療薬であるスタチンはCho 生合成メカニズムであるメバロン酸(MVA)経路の律速段階酵素である HMG-CoA 還元酵素(HMGCR)の阻害剤であり、世界中で最も使用されている医薬品の一つである。しかし、同時に重大な副作用として骨格筋の融解や壊死を伴う横紋筋融解症が起きることが知られている。この副作用の詳しい発症メカニズムは未だ明らかではない。また骨格筋以外の臓器ではスタチンによる重篤な臓器障害はないにも関わらず、元来 HMGCR の発現が低い骨格筋にのみスタチンが重篤な副作用を呈する分子メカニズムを明らかにすることにより、骨格筋の分化・融合・分解に深く関与する新たな重要分子の同定および Cho 代謝がどのような役割を果たすか新規の知見を得ることができると考えられ、当該研究を実施した。

2. 研究の目的

図 1 に示すように本研究では骨格筋特異的 HMGCR ノックアウトマウス(以下、HMGCRmKO マウスと表記)を作成し解析を行い、さらに各種分子生物学的手法を駆使し、スタチンによる筋障害の分子メカニズムを明らかにし、スタチン不耐に対する普遍的なメカニズムの解明や予防法を確立し、より副作用の少ない高 Cho 血症治療薬の開発に繋げることで、特異的に筋障害を来す原因となる分子を同定し筋障害の予防法や骨格筋量の増大方法を確立することで、筋力低下や廃用症候群の予防を通じて健康寿命の延伸に貢献すること、および Cho 代謝が骨格筋の分化・融合・恒常性維持に関わるメカニズムを明らかにすることを目的とする。



3. 研究の方法

HMGCRmKO マウスは MVA 経路の抑制による横紋筋融解症を発症する。この病態の発症メカニズムに small G protein の中でも約 60 種類ある「Rab」の一群が関与する可能性が先行研究より強く示唆されており、本研究では HMGCRmKO マウスの解析によりスタチンによる筋細胞死や骨格筋の分化・融合に対し Cho 合成系のどの段階の異常が関与しているか、どの Rab small G protein がどのように関与しているかを明らかにすることを目的とする。

- 時期特異的・骨格筋特異的 HMGCR ノックアウトマウス(時期特異的 HMGCRmKO マウス)の作製
- CRISPR/Cas9 system による HMGCR ノックアウト C2C12 セルラインの作成
- Rab small G protein siRNA ライブラリーを用いた標的分子のスクリーニングシステム
- 標的分子候補スクリーニングの際に指標となるマーカー分子の探索

主に上記手法を用いて探索し、in vitro にて原因候補として得られた Rab small G protein を in vivo においても siRNA の EP やノックアウトマウスの作成により操作し、Cho 代謝が予測どおりに変化するか、骨格筋障害の改善をもたらすかを評価し、スタチンによる横紋筋融解症の発症メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

ドキシサイクリン(Dox)誘導性に時期特異的・骨格筋特異的に HMGCR がノックアウトされるマウスを作製した。このマウスの解析により骨格筋線維の組織学的障害やクレアチンキナーゼ上昇に先行して、骨格筋内の ATP 量が減少することが判明した。このため、HMGCR もしくは Rosa26 をノックアウトした C2C12 セルラインを Crispr-Cas9 を用いて作成し、このセルラインに対して in vitro で、Rab small GTPase の siRNA ライブラリーを用いてノックダウン実験による ATP 量のスクリーニングを実施した。研究期間終了時点で、HMGCR ノックアウト C2C12 セルラインにて、マウス Rab 8A・8B・10・13 のサブファミリーの一群のノックダウンにおいて ATP 量の軽度増加が確認されたが、骨格筋障害の減少や筋線維の形態の改善に乏しく、HMGCR のノックアウト

に伴う横紋筋融解症の主たるメカニズムを形成する分子の断定には至っていない。

しかし、これは siRNA を用いたスクリーニング実験のため、筋細胞の生存率の改善等に繋がっていない可能性があり、今後は当該 Rab small GTPase のプレニル化不全変異体の過剰発現にて逆に ATP 量が骨格筋臍傍で減少するかどうか、in vitro にてプレニル化処理を行ったリコンビナント Rab small GTPase のエレクトロポレーションによる導入で細胞生存率が改善するかどうか、等の検索をさらに進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------