

機関番号：31201  
 研究種目：研究活動スタート支援  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21890238  
 研究課題名（和文）スタチンによる細胞種特異的なオートファジー、細胞死誘導機構の解明  
 研究課題名（英文） Analysis of statin-induced autophagy and cell death in cell-type-specific manner  
 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

研究成果の概要（和文）：本研究は、高コレステロール血症治療薬であるスタチン系薬剤の副作用、横紋筋融解症の原因を解明することを目的に行った。この研究期間内では、スタチン依存的に横紋筋肉腫由来細胞が死滅することを明らかにした。また、スタチン依存的な細胞死を抑制する可能性のある遺伝子として、細胞周期に関わる遺伝子を同定した。現在はこの遺伝子が、スタチン依存的な細胞死に対してどのように影響するのか解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：Purpose of this study is to address a molecular mechanism of side effects of statins that are used for hypercholesterolemia. It is well known that statins induce rhabdomyolysis in a low frequency in patients. During this research period, we found that cell-death of rhabdomyosarcoma A204 cells is induced by statins. We also identified a potential gene that affects the cell-death caused by statins. This gene has an essential role for cell cycle progression. We are now currently examining how gene functions in the process of statin-induced cell death of A204 cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	950,000	285,000	1,235,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：薬学、生化学、分子生物学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：薬学、蛋白質、

## 1. 研究開始当初の背景

血中脂質の異常が見られる高脂血症などの疾患には、トリグリセリドやLDL-コレステロールを低下させるためにスタチンやフィ

ブレート系の薬剤が広く使用されている。その一方でこれらの薬剤は、低頻度ながら筋肉の融解などを起こす横紋筋融解症を発症することが報告され問題となってきた。スタチ

ンが引き起こす横紋筋融解症については、これまでに多くの研究が行われてきて、(1)薬物動態に注目したトランスポーターなどの解析、(2)培養細胞などを用いた筋細胞の細胞障害機構の解析、に大別される。

(1)では大規模 SNP 解析がなされ、スタチンの輸送に関与する SLC01B1 の SNP により、取り込まれるスタチン量の変動し、それが横紋筋融解症の発症に関連すると報告された。しかし、これらの研究は詳細な発症機構解明にはつながっていない。

(2)では培養細胞などを用い、主にアポトーシスによる細胞死に注目した研究がなされている。アポトーシス誘導機構には、主要な低分子量 G タンパク質の関与が報告されたが、詳細な分子機構や個体での影響は不明である。これらの研究の多くは、培養細胞にスタチンを多量に暴露しており、生理的現象を解析しているとは言い難い。

我々は、スタチンやフィブラート系の薬剤がエネルギー代謝の鍵酵素 PDK4 を誘導することを明らかにしていた。PDK4 は細胞のエネルギー源を糖質から脂質やアミノ酸に変換する酵素である。この知見から、両薬剤は細胞を見かけ上の飢餓状態にして、飢餓時に誘導される非選択的な蛋白質分解機構のオートファジーを誘導し、筋肉の蛋白質を分解しているという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

スタチンは重篤な副作用である横紋筋融解症を起こすが、その発症機構は明らかにされていない。この発症機構を解明するために、横紋筋肉腫由来の培養細胞を用いてオートファジーと細胞死の誘導機構の解明を目指した。スタチン依存的なオートファジーと細胞死の誘導は、病態で見られるタンパク質分解の亢進と細胞死の誘導という点と類似しているために着目した。この分子機構を明らかにするために、ランダムな遺伝子破壊法を用いて、スタチン耐性細胞をクローニングし関連遺伝子の同定を試みる。さらに関連遺伝子について個体での解析に発展させて、スタチン依存的な横紋筋融解症の発症機構の解明を目的としている。

## 3. 研究の方法

(A204 細胞のスタチンによるオートファジー、細胞死誘導条件の検討)

本研究で用いるヒト横紋筋肉腫由来 A204 細胞に対しては、疎水性スタチンであるセリバスタチンによるオートファジー、細胞死誘導条件について、これまでに基礎的な検討を行っている。また、遺伝子破壊株のセレクションを行う G418 の濃度に関してもすでに検討済みで、その条件を用いる。スタチン耐性株のセレクションの為の条件検討は、先行研

究での結果を元にセリバスタチンの濃度を数点取り、経時的に観察して数日で死滅する濃度を決定する。

(レトロウイルスの作製と感染)

Retroviral gene trap insertional mutagenesis 法でのランダムな遺伝子破壊を行うためのレトロウイルスの作製を行う。用いるレトロウイルスベクターは pDisrup で、GFP 遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子を染色体に組み込み、破壊遺伝子の一部とネオマイシン耐性遺伝子融合タンパク質を恒常的に発現する系である。この pDisrup ベクターをリポフェクションで、パッケージング用の AmphiPack-293 細胞に形質導入する。形質導入 48h 後に培養上清をウイルス液として回収する。この作製したウイルス液をポリブレン法で A204 細胞に感染させる。その後、導入細胞を抗生物質 G418 でセレクションして、成育した細胞群を遺伝子破壊細胞のライブラリーとする。

(スタチン耐性細胞のセレクション)

作製した遺伝子破壊 A204 細胞のライブラリーから、スタチン耐性細胞のセレクションを行う。この時、スタチンによる細胞死誘導の強弱により、得られてくる耐性細胞が異なることが予想される。そのため、スタチンの濃度について複数のセレクションを行い、細胞死誘導の強弱による破壊遺伝子の違いについても検討する。ここで複数の条件でセレクションを行うことは、後の候補遺伝子の機能解析を行う時に、候補遺伝子を絞り込む上で役立つと考えられる。

(破壊遺伝子の同定)

スタチン耐性細胞株のセレクション後に、原因となる破壊遺伝子の同定を行う。破壊された遺伝子は、その一部がネオマイシン耐性遺伝子との融合タンパク質として発現する。そこで、スタチン耐性細胞株の総 RNA から cDNA を合成し、pDisrup ベクターの配列を標的として 3' -RACE 法で破壊遺伝子の同定を行う。その過程で ssDNA から PCR 法で dsDNA を合成するが、破壊遺伝子が細胞あたり複数存在することも予想されることから、dsDNA は複数種類合成される可能性がある。そこで、得られたものについては全て同定する。また複数の耐性細胞株について解析し、単一の遺伝子産物か、その組み合わせが重要なのかについて検討を行う。

(同定された遺伝子発現の検討)

スタチン耐性の鍵として同定された遺伝子についてその発現や局在について検討する。スタチン耐性株から同定された遺伝子は、スタチンの添加によって発現など何らかの

変化が生じていることが予想される。タンパク質の発現についてはウェスタンブロット法を用いて検討を行う。しかし、酵素などの活性の変化は発現量だけでなく、翻訳後修飾の変化によることも多くあるので、修飾による分子量の変化などについても検討を行う。これらについては、同定した因子のアミノ酸配列や既知の文献情報などを十分に踏まえて検討する。

#### 4. 研究成果

##### ①スタチンによる横紋筋肉腫由来細胞の細胞死誘導

これまでの研究で、セリバスタチンは横紋筋肉腫由来 A204 細胞において、オートファジーを誘導し、さらに細胞死を起こすことを明らかにしてきた。本研究では、この詳細な分子機構を明らかとするために、ジーントラップ法を用いてランダムな遺伝子破壊を起こし、スタチン耐性細胞のクローニングを試みた。まず、セリバスタチン耐性細胞を得るための条件検討を行った。セリバスタチンを 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0  $\mu\text{M}$  で添加して 7 日間培養してコロニー形成率を検討した (Fig. 1)。その結果、2.0  $\mu\text{M}$  以上の濃度でコロニーの形成が見られなくなった。また、1.0  $\mu\text{M}$  は、小さなコロニーが若干形成されたが、クローニング可能な大きさにまでは増殖しなかった。コレステロール合成を抑制して長時間培養することは細胞にとって大きなストレスとなるため、ほぼ全てが死滅した 2.0  $\mu\text{M}$  以外に 0.5、1.0  $\mu\text{M}$  でもセレクションを行った。

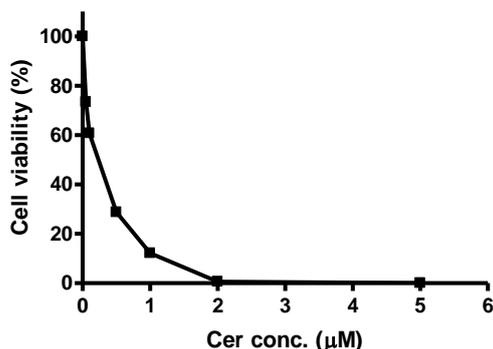


Fig. 1 スタチンによる細胞死誘導の検討

##### ②メバロン酸経路代謝産物による細胞死抑制の検討

細胞死の分子機構を明らかにする上で、これまでに解析してきたオートファジー誘導との関連性について検討した。セリバスタチンによるオートファジーの誘導は、メバロン酸合成経路の中間代謝物、特にメバロン酸やゲラニルゲラニルニリン酸によって抑制さ

れた。そこで、細胞死の誘導についてもこれら中間代謝物の影響を検討した。その結果、スタチン依存的な細胞死の誘導は、オートファジーの誘導と同じように、メバロン酸、ゲラニルゲラニルニリン酸で顕著に抑制され、ファルネシルニリン酸ではわずかに抑制された。スタチン依存的なオートファジー誘導と細胞死誘導は相関が見られることから、誘導されるオートファジーと細胞死の誘導には関連性があることが示唆された。

##### ③セリバスタチン耐性細胞のクローニング

作成した A204 細胞遺伝子破壊株ライブラリーを用いて、セリバスタチン耐性細胞のクローニングを行った。条件検討より、薬剤選択はセリバスタチン 0.5、1.0、2.0  $\mu\text{M}$  で 1 週間処理を行った。一段階目の選択でコロニーを形成したものを採取して、その細胞株について薬剤耐性能を検討してセリバスタチン耐性細胞を選択した。その結果、二種類の遺伝子破壊 A204 細胞ライブラリーから、5 株の耐性細胞を得ることが出来た。Fig. 2 には、代表的な例として CR-4 株の結果を示した。

これらの細胞は、1.0  $\mu\text{M}$  などでは野生型と比較して耐性を優位に示しているが、2.0  $\mu\text{M}$  では野生型とほぼ同等まで生存率が低下した。ヒト培養細胞は 2 倍体であり、相同染色体まで完全に KO することは難しく、表現系に与える影響が少ないことが影響していると予想される。

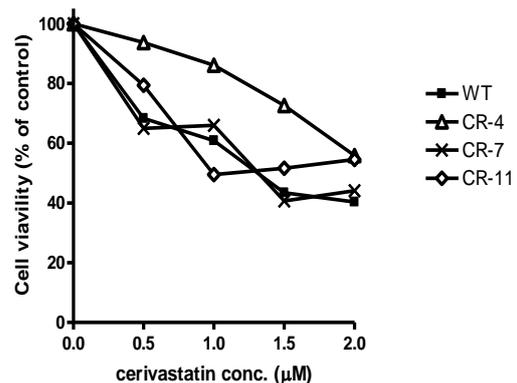


Fig. 2 クローニングした細胞の耐性能の検討

##### ④セリバスタチン耐性細胞の破壊遺伝子の同定

クローニングしたセリバスタチン耐性細胞の破壊されている遺伝子を同定するために、ネオマイシン耐性遺伝子を標的に 3' -RACE 法、nested-PCR を行い解析した。その結果、細胞周期を調節する cyclin の一種と糖代謝を調節する酵素の遺伝子配列が同定された。特に cyclin は N 末領域部分で trap されており機能は阻害されていることが予想される。この他にも配列が得られたが、ゲ

ノム領域の配列であるなど、発現を破壊する形では挿入されていなかった。この後の解析は、cyclin が破壊されている細胞を中心に行うこととした。

次に破壊遺伝子のタンパク質発現量についてウェスタンブロット法を行い検討した。野生型 A204 細胞とセリバスタチン耐性細胞に 1.0  $\mu$ M セリバスタチンを 24 時間処理して、サンプルバッファーで溶解してサンプルとした。ウェスタンブロットの結果、セリバスタチン耐性細胞の同定した cyclin の発現量は、野生株に対して 50%程度まで低下していた。また、セリバスタチン処理によって、野生株では 50%程度低下したが、耐性細胞では未処理群と変化が見られなかった。

以上の結果から、耐性細胞では同定した cyclin のタンパクレベルでの発現量が低下していることが明らかとなった。また、cyclin の発現量はセリバスタチンによって直接か二次的に調節されることが明らかとなった。

#### ⑤セリバスタチン耐性細胞のオートファジー誘導の解析

セリバスタチンによる細胞死の誘導と、オートファジーの誘導の関連性について解析する目的で、細胞死の抑制されたクローンについてオートファジーの誘導を調べた。それぞれの細胞に 1.0  $\mu$ M セリバスタチンを 24 時間処理して、前項と同様の方法で LC3 についてウェスタンブロットを行った。その結果、耐性細胞におけるセリバスタチン依存的なオートファジーの誘導は、野生型と同じように観察された。コントロールの LC3 の発現量も同程度であり、cyclin の発現抑制は、スタチン依存的なオートファジーの誘導には影響しないことが明らかとなった。

本研究では、横紋筋肉腫由来細胞でセリバスタチン依存的にオートファジーと細胞死が誘導されること、メバロン酸経路の中間代謝物がその誘導に重要であることを明らかにした。さらに、詳細な分子機構を明らかにするために、レトロウイルスを用いた gene trap 法を行い、セリバスタチン耐性細胞をクローニングし解析した。その結果、セリバスタチン耐性細胞の破壊遺伝子として、cyclin の一つが同定された。この細胞は、細胞死は抑制したもののオートファジーの誘導には影響を与えなかった。以上の結果から、同定した cyclin は、スタチン依存的なオートファジー誘導の経路には関与せず、その下流で、細胞死を調節する因子として関わっていると予想している。今後は、さらにスタチン耐性細胞のクローニングを進めて、オートファジー誘導に関連した因子の同定を目指す。また、細胞周期の調節に関与する遺伝子につい

てもスタチン依存的な細胞死誘導を抑制する分子機構を明らかにする。

これまでは、スタチン依存的な細胞死に対して、合成が阻害されている中間代謝物を補充することで細胞死誘導から回復することを目指してきた。本研究では、細胞死を抑制する可能性のある遺伝子を同定することに成功した。この成果によって、スタチンの主作用であるコレステロール低下作用を維持しながら、遺伝子の発現を調節して細胞死を抑制する、新たな方法の確立が期待される。

#### 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 1 件)

①荒木信、本島清人、エネルギー代謝調節鍵酵素 PDK4 の正常時および病態時の発現制御における PGC-1 の意義、内分泌・糖尿病科、第 29 巻、2 号 (2009)

〔学会発表〕(計 4 件)

①荒木信、スタチン誘導性の細胞死に対する耐性細胞の解析、BMB2010、2010 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド

②荒木信、スタチンによる細胞種特異的な細胞障害因子の探索、第 82 回 日本生化学会大会、2009 年 10 月 23 日、神戸ポートアイランド

③荒木信、高コレステロール血症治療薬スタチンによるオートファジー誘導に関する解析、日本薬学会東北支部 第 8 回 生物化学若手研究者セミナー、2009 年 9 月 12 日、東北薬科大学 (招待講演)

④荒木信、Role of isoprenoid metabolism in autophagy induced by statins、JBS Biofrontier Symposium on Biochemistry of pH Homeostasis and Proton Circuit、2009 年 7 月 24 日、岩手医科大学 (国際学会)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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

なし

(3) 連携研究者

なし