

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659440

研究課題名(和文)横紋筋融解症の原因としてのスタチンと筋肉内コレステロール欠乏の違い

研究課題名(英文)What are the differences between statin and the shortage of cellular cholesterol content in the pathology of rhabdomyolysis?

研究代表者

中川 嘉(Nakagawa, Yoshimi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80361351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：高コレステロール血症の治療薬であるスタチンはコレステロール合成系律速酵素であるHMGCRの阻害剤である。そのスタチンは副作用として横紋筋融解症を発症させる。このメカニズムを明らかにするため、スタチンの標的遺伝子であるHMGCRを骨格筋特異的にノックアウトしたマウスを作製した。このマウスの筋肉では横紋筋融解症でみられる組織的变化が生じていた。この原因の一つとして、機能異常ミトコンドリアをオートファジーで消去できないことにあるデータを得た。今後はコレステロール合成不全が、なぜ、ミトコンドリア異常、オートファジー異常が生じたかを明らかにしていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Statin is an inhibitor for HMGCR, which is a rate-limiting enzyme for cholesterol synthesis. Although statin is an effective drug for hypercholesterolemia, statin develops rhabdomyolysis as a side effect. To understand the mechanism of the pathogenesis of rhabdomyolysis by statin, we generated the skeletal muscle-specific HMGCR knockout mice. These mice showed the same phenotypes as rhabdomyolysis. We found that the removal of the insufficient mitochondria by autophagy was dysregulated in skeletal muscle of these mice. Next, we will determine the mechanism that mitochondria function and autophagy are dysfunctional in skeletal muscle of HMGCR knockout mice.

研究分野：代謝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：コレステロール代謝 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

日本で開発された高コレステロール血症治療薬であるスタチンは有効な薬であり、世界中で使用されている。スタチンはコレステロール合成の律速酵素である HMG CoA 還元酵素を阻害する薬剤である。しかしながら、その効果は絶大であるのに対し、副作用報告の多い治療薬としても知られている。その副作用の一つとして横紋筋融解症がある。横紋筋融解症は骨格筋の融解、壊死により筋肉中のミオグロビンが血中に漏出し腎臓で沈着し腎機能障害を引き起こす。重症化すると死亡する例もある。しかし、このスタチンの副作用の分子メカニズムは今だ明らかとなっていない。

細胞では細胞活動に必要なコレステロールは細胞内での合成と LDL 受容体を介し細胞外から取り込みにより供給される。しかし、骨格筋では他の臓器と異なり LDL 受容体の発現が著しく低い。そのため、細胞内で必要とするコレステロールを細胞外から取り込めない。スタチンが直接、骨格筋で作用した際にはコ捨てロール合成が抑制される。この場合、骨格筋ではコレステロール合成が抑制されるとともに、コレステロールの吸収能が低いため、骨格筋細胞内ではコレステロールが不足することが想定される。コレステロールは細胞膜の構成成分であり、コレステロールが欠乏した際には細胞膜安定性が維持できずに細胞が死ぬことが予想される。また、コレステロールはステロイドホルモンの材料でもあることから、ホルモン異常により細胞死を引き起こすことも考えられる。それら効果が、結果的に横紋筋融解症を発症すると考えられる。

しかし、このメカニズムが実際にスタチンによる横紋筋融解症の発症のメカニズムであるかを個体(マウス)を用いて実際に証明した研究は行われていない。

2. 研究の目的

コレステロール合成系律速酵素 HMG CoA 還元酵素の阻害薬スタチンは、高コレステロール血症治療薬として中心的役割を担っている。しかし、骨格筋に対する副作用(ミオパシー、横紋筋融解症)が重大な問題となっている。その原因を解析するモデル系が存在した。マウスにスタチンを投与しても、横紋筋融解症を発症させることは現在までにできていない。そこで、我々は筋肉でのコレステロールの不足が横紋筋融解症を発症させるのかを実際にマウスを用い検討するため、コレステロール合成の律速酵素である HMG CoA 還元酵素を骨格筋特異的に欠損したマウスを作成し、骨格筋でコレステロールが欠乏させたマウスを作製し、その分子メカニ-

ズムの解明を目指した。

この骨格筋特異的に HMG CoA 還元酵素をノックアウトしたマウスは実際、横紋筋融解症を発症するか?、また、発症するのであればスタチンが引き起こす横紋筋融解症と違いがあるか?を明らかにする。このマウスを使い、コレステロール代謝と横紋筋融解症の関係を明らかにすることができる。

さらに、本研究からスタチンによるコレステロール合成抑制が引き越す全身と筋肉への作用の違いを明確化することでスタチンの安全な使用法や、横紋筋融解症に対する治療薬の開発についての提案できるような成果を上げること目的とし、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋特異的 HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスの作製

HMG CoA 還元酵素 flox マウスを共同研究先(自治医科大・代謝内科)より供与されており、さらに骨格筋特異的発現 Cre マウスを Jackson Laboratory より購入済みである。2つのマウスを交配し、骨格筋特異的 HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスの作製を行った。

(2) 骨格筋におけるコレステロール代謝遺伝子の発現解析

骨格筋におけるコレステロールをはじめとするエネルギーを調節する遺伝子の発現変動を正常(WT)マウスと骨格筋特異的 HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスで検討した。

(3) 骨格筋特異的 HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスの病理解析

骨格筋特異的 HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスでは筋肉の病理像を評価した。

(4) 骨格筋特異的 HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスでの細胞死の種類の解析

細胞死の種類、アポトーシスであるかネクローシスであるか、病理的な評価とともに、それぞれの指標となるタンパク、遺伝子発現の変化を検討した。また、その原因となる分子メカニズムを組織の免疫染色、遺伝子発現、タンパク量の変化などで評価した。

4. 研究成果

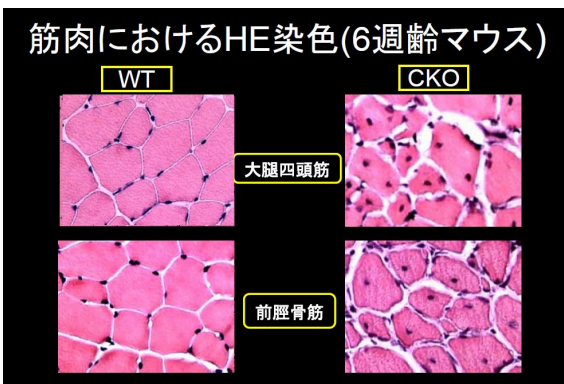
(1) 骨格筋特異的 HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスの作製

骨格筋特異的 Cre トランスジェニック (Acta1-Cre Tg)マウスと HMG CoA 還元酵素 flox/flox マウスを交配し、骨格筋特異的 HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスを作製した。遺伝子発現レベルで 50%の低下、

HMGCR 酵素活性においても 50%の低下を確認した。骨格筋以外の他の組織では HMG CoA 還元酵素の発現の低下は確認されなかった。したがって、骨格筋特異的 HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスが作成されたことを確認した。

(2) 骨格筋特異的な HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスの病理所見

作成した骨格筋特異的 HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウス(CKO)では左図のように骨格筋細胞で核が中央に見える異常所見が見られる。この所見は細胞死と再生が同時に起こっている状態である。横紋筋融解症ではこの所見である。まさに、この所見は、生後しばらくは見られず、週令を重ねると見られてくる。コレステロールの重要性は週令によって変化していくことを示唆していると考えられる(下図)。



(3) 骨格筋特異的な HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスの血液パラメーター

骨格筋特異的な HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスでは組織で炎症が生じると上昇する血中 ALT、AST とともに横紋筋融解症に特異的に上昇する CK も異常高値を示した。その他の血糖値、血中脂質などに主だった変化は見られなかった。

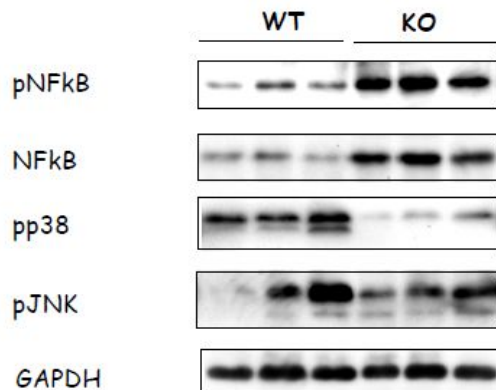
(4) 骨格筋特異的な HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスの遺伝子発現、タンパク発現解析

骨格筋特異的な HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスでの筋萎縮の分子メカニズムを明らかにするため、遺伝子発現、タンパク質解析を行った。

遺伝子発現では血中 CK 濃度の増加を反映し、筋肉での遺伝子発現では炎症系シグナル分子の発現が誘導されていた。また、タンパクレベルでの解析からも炎症系、NF B の活性上昇が確認された。筋肉の炎症時に発現が上昇される Fibroblast growth factor 21 (FGF21)の発現も著しく増加した。

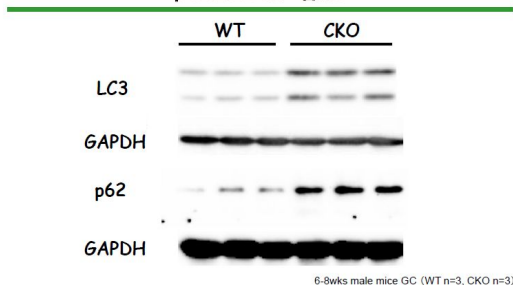
(5)細胞死の種類を検討

Western Blot



細胞死の形態を検証するため、アポトーシス、ネクローシスのどちらのであるかを検討した。細胞の形態観察では生体の筋肉であるためか、どちらであるかは特定できなかった。また、アポトーシスのマーカーである Caspase 3 の活性には違いはなかった。骨格筋特異的な HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスではオートファジーのマーカーである LC3BII のタンパク量が増加した(下図)。

骨格筋特異的HMGCR KOマウスでは p62とLC3が増加



→ オートファジーに異常

このことは HMGCR の欠損、コレステロール合成低下が引き起こしたと考えられる。骨格筋特異的な HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスの筋肉ではミトコンドリア量の減少、ミトコンドリアでの ATP 産生の低下が見られており、ミトコンドリアの機能が低下していた。異常機能を持つミトコンドリアは通常、オートファジーにより除去され、新生ミトコンドリアが合成される。この骨格筋特異的な HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスの筋肉ではミトコンドリアのターンオーバーに異常を来したため、細胞の機能が維持できず、細胞死を引き起こしたと推察している。

現在、コレステロール合成がなぜオートファジーの異常を引き越したのか、オートファジーのどの段階に異常を来しているかを検

討する予定である。

骨格筋特異的な HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスは筋肉におけるコレステロールの重要性を明らかにするのに適したモデルであるとともに、スタチンによる横紋筋融解症発症の分子メカニズムを明らかにすることにおいても有用なモデルとなりえる。本研究では高脂血症の治療薬評価系の構築とともに、生活習慣病の治療に新たな道筋を構築する。現在までスタチンの副作用による骨格筋傷害の分子メカニズムは明らかになっていない。このメカニズムを明らかにすることで、本研究から副作用のない高脂血症の新たな治療薬開発の足がかりを作ることが可能になると考えている。

さらに、骨格筋でのコレステロール代謝異常でなぜ突然死を引き起こしてしまいますのか、それがなぜオスだけなのかを明らかにすることで、コレステロールの生体の恒常維持への重要性を示す新たな研究である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Naka A, Iida KT, Nakagawa Y, Iwasaki H, Takeuchi Y, Satoh A, Matsuzaka T, Ishii KA, Kobayashi K, Yatoh S, Shimada M, Yahagi N, Suzuki H, Sone H, Yamada N, Shimano H. TFE3 inhibits myoblast differentiation in C2C12 cells via down-regulating gene expression of myogenin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;430(2):664-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.094. 査読有

〔その他〕

ホームページ等

筑波大学 医学医療系 内分泌代謝・糖尿病内科

<http://www.u-tsukuba-endocrinology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 嘉 (NAKAGAWA, YOSHIMI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80361351

(2) 研究分担者

松坂 賢 (MATSUZAKA, TAKASHI)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70400679