

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860065

研究課題名(和文)新規mTORC1調節経路を介したスタチン誘発性筋細胞障害の分子機構の解明

研究課題名(英文)Mechanism of statin-induced muscle cell death via the mTORC1 regulation pathway

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：高コレステロール血症の治療薬として使用されているスタチンは、副作用として筋肉が壊死する横紋筋融解症を発症するが、詳細な発症メカニズムは明らかになっていない。本研究では、副作用発症の分子機構の解明を目指した。培養細胞を用いた実験から、スタチン依存的な細胞死の誘導にはmTORC1を介した新規の経路が関与していることを明らかにしてきた。この細胞死誘導を抑制する因子を探索した結果、細胞周期を調節することでスタチン依存的な細胞死の誘導を抑制できることが示唆された。今後、スタチンの副作用軽減への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Statins inhibit HMG-CoA reductase which is the rate-limiting enzyme in the synthesis of cholesterol. Although statins are prescribed for many patients of hypercholesterolemia, there is a risk of rhabdomyolysis. We have shown that statins induce autophagy and cell death in human rhabdomyosarcoma cells. These effects were induced by unknown mTORC1 regulation pathway. In this study, it was suggested that control of cell cycle inhibit statin-induced cell death in rhabdomyosarcoma cells. This observations are expected to be applied to a reduction in statins side effects.

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、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。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の報告は国内外に多数あるが、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、(ii)アポトーシスによる細胞死について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。

我々は、スタチン曝露によりエネルギー源を糖から脂質へと代謝変換する遺伝子が発現誘導されることを以前に報告した(1)。この代謝変換は飢餓時に見られることから、飢餓などで誘導される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注目した。横紋筋肉腫由来 A204 細胞を用いてスタチンの影響を検討した結果、スタチンは、低濃度でオートファジーを細胞種特異的に誘導し、細胞死を起こすことを見出した(2)。これまでの国内外の研究で、スタチンによる横紋筋融解症にオートファジーが関与していることを示した報告はないが、障害を受けた筋肉切片を報告した論文では、オートファゴソーム様の構造体が見られる。そこでアポトーシスによる細胞死の誘導ではなく、スタチンによるオートファジーの過剰な誘導が、筋細胞障害の原因であると考えて、その分子機構の詳細について解明を目指した。我々はこれまでに、活性化状態ではオートファジーを抑制している mammalian Target of Rapamycin (mTOR) 複合体 1 (mTORC1) を中心とした複数の機構が関与していることを明らかにした(3)。

本研究では、新規 mTOR 結合タンパク質の同定から、スタチン依存的なオートファジー・細胞死誘導機構の解明を目指した。

[参考文献]

- (1) Araki M. and Motojima K., *FEBS J.* 273, 1669-1680 (2006).
- (2) Araki M., Motojima K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 367, 462-467 (2008).
- (3) Araki M., Maeda M., Motojima K., *Eur. J. Pharmacol.*, 674, 95-103 (2012).

2. 研究の目的

スタチンは軽度な筋障害から横紋筋融解症のような重度な筋障害を引き起こすが、その詳細な分子機構については明らかになっ

ていない。我々は横紋筋由来細胞でスタチンによって顕著に誘導されるオートファジーが、筋細胞障害に関与していると考えてその分子機構の解明を目指した。

この分子機構を明らかにすることで、副作用を抑制する方法や、副作用の軽減された高コレステロール血症治療薬の開発につなげていくことを目的としている。

3. 研究の方法

< タンデムタグ付 mTOR 発現系の構築 >

mTOR に相互作用するタンパク質を同定するために Tandem affinity purification (TAP) 法を計画した。まず、mTOR の N 末端側に Flag tag と HA tag を融合して発現するプラスミドを構築した。このほかにも Flag tag だけを N 末端に融合する発現プラスミドも用意した。

これらの発現プラスミドを用いて、タンデムタグ付 mTOR を横紋筋肉腫由来 A204 細胞で発現させる条件を検討した。遺伝子導入は市販されている Lipofection 試薬を複数種検討した。また、エレクトロポレーションによる導入も試みた。遺伝子を導入した細胞は、一過的な発現で使用するほかに、恒常的発現株のクローニングも行った。mTOR の発現については、Flag tag 抗体によるウェスタンブロットティングを行って検討した。

< mTOR の免疫沈降法の条件検討 >

新規の mTOR 結合タンパク質を同定するために免疫沈降法の条件検討を行った。セリバスタチンによって結合が変化するタンパク質の結合様式は予想がつかず、一過的なことや結合が弱い場合も考えられる。そこで、架橋剤を使用した免疫沈降についても条件検討を行った。セリバスタチンを添加して、タンパク質を回収する前に架橋剤を添加、培養して架橋下での複合体の解析を試みた。

< マイクロアレイによる遺伝子発現解析 >

A204 細胞にセリバスタチンを添加したときに、オートファジー誘導と連動して発現が変化する遺伝子群について解析を行った。A204 細胞にセリバスタチンや Farnesyl pyrophosphate (FPP)、Geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP)などを添加して培養後、RNA を抽出してマイクロアレイでの解析を外部委託した。

< 細胞周期の解析 >

これまでの研究から、細胞周期を調節する遺伝子が、A204 細胞におけるセリバスタチン依存的な細胞死誘導に関与することが示唆された。そこでセリバスタチンによる細胞周期の変化について Muse Cell Analyzer を用いて解析を行った。セリバスタチン添加前に細胞周期をダブルチミジンプロック法で同調させて、細胞周期へのセリバスタチンの影響を解析した。

4. 研究成果

< タンデムタグ付 mTOR 発現条件の検討 >

GGPP の修飾を受けて mTORC1 の活性を調節している mTOR 結合タンパク質を同定するために、アフィニティタグを用いた tandem affinity purification (TAP) 法で複合体タンパク質を精製することを目指した。まず、FLAG-HA タンデムタグ付 mTOR 発現プラスミドを作製した。次にタグ付 mTOR タンパク質の発現を確認するために、横紋筋肉腫由来 A204 細胞への Lipofection による遺伝子導入を試みた。A204 細胞は遺伝子導入効率が低いため、複数の Lipofection 試薬を用いて条件検討を行った。その結果、培養期間の短い A204 細胞に対して Lipofectamin 3000 試薬を用いた時に、タグ付 mTOR の発現が検出できた。

次に恒常的に発現する細胞のクローニングを行った。発現プラスミドを導入し、選択薬剤に対して耐性を示す細胞をクローニングしたが、タグ付 mTOR の十分な発現が見られるクローンは得られなかった。そこで一過的にタグ付 mTOR を発現させた細胞で mTOR と相互作用する因子の探索を行った。

< 免疫沈降法による mTOR 相互作用因子の探索 >

Flag-HA mTOR 発現プラスミドを A204 細胞に導入した細胞溶解液をサンプルとして免疫沈降を行った。mTOR 複合体に含まれる未知のタンパク質が、どの程度の結合性を持っているか不明なため、架橋剤を用いて免疫沈降する条件を検討した。まず架橋剤の有無による既知の複合体タンパク質の結合変化を、免疫沈降後にウェスタンブロットングを行い解析した。mTORC1 に含まれる Raptor の結合量を解析した結果、架橋剤無しでも結合が確認できたが、架橋剤を添加した方がより多く結合している状態で精製できた。この条件で調製したサンプルを SDS-PAGE で電気泳動後、銀染色を行いセリバスタチン依存的に結合の変化するタンパク質の同定を試みた。しかし、セリバスタチンの有無により結合の変化するタンパク質は銀染色レベルでは同定することができなかった。今後、2D-DIGE などを行って特異的に結合が変化するタンパク質の同定を目指す。

< セリバスタチン添加時の網羅的遺伝子発現解析 >

GGPP 依存的な mTORC1 の活性調節機構を明らかにするために別のアプローチとして、セリバスタチン・GGPP の遺伝子発現への影響を DNA マイクロアレイで網羅的に解析した。その結果、セリバスタチン・GGPP 依存的にオートファジー、細胞死誘導と関連して mRNA の発現変動を起こす遺伝子群として、骨格筋の分化を制御する転写因子がオートファジー関連遺伝子の共通上流として

予想された。また、これまでに行っていたレトロウイルスを用いた Gene trap 法の研究で候補遺伝子として考えていた、細胞周期調節因子 (Cyclin family) もセリバスタチン依存的に発現が変動することが明らかとなった。細胞周期調節因子については、ウェスタンブロットングでタンパク質発現量も解析した結果、mRNA と同様にセリバスタチン添加により発現量が低下することが明らかとなった (Fig. 1)。

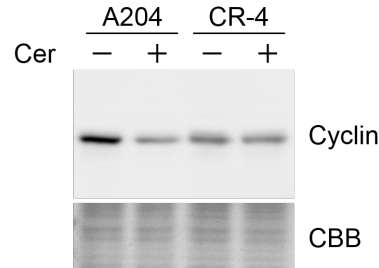


Fig. 1. セリバスタチン添加による Cyclin の発現変動

A204 細胞と Gene trap によって得られたスタチン耐性の A204 細胞 (CR-4 細胞) の Cyclin 発現量をウェスタンブロットングで解析した。

< セリバスタチン依存的な細胞死と細胞周期調節の関連性 >

DNA マイクロアレイと Gene trap 法の結果から、細胞死誘導に細胞周期調節因子の関与が示唆されており、その詳細な解析を行った。Gene trap 法でクローニングしたセリバスタチン耐性細胞 (CR-4 細胞) は、細胞周期調節因子が遺伝子破壊されていた。その cell cycle は野生株よりも遅くなっていた。また、セリバスタチン存在下では野生株に比べて CR-4 細胞が顕著に G₀/G₁ arrest を起こすことを明らかにした (Fig. 2)。以上のことより、セリバスタチン耐性 CR-4 細胞は、G₀/G₁ arrest を起こすことでセリバスタチン依存的な細胞死誘導を抑制することが示唆された。また、両細胞株のセリバスタチン依存的なオートファジー誘導を調べた結果、顕著な差は見られなかったことから、オートファジー誘導とは異なる作用機序で細胞死の抑制が起きていると考えられる。

本研究期間内に新規の mTOR 調節因子の同定には至らなかったが、細胞周期調節因子がスタチン依存的な細胞死の抑制に重要な働きを持つことを明らかにした。今後、スタチンによる副作用の抑制法開発への応用が期待される。

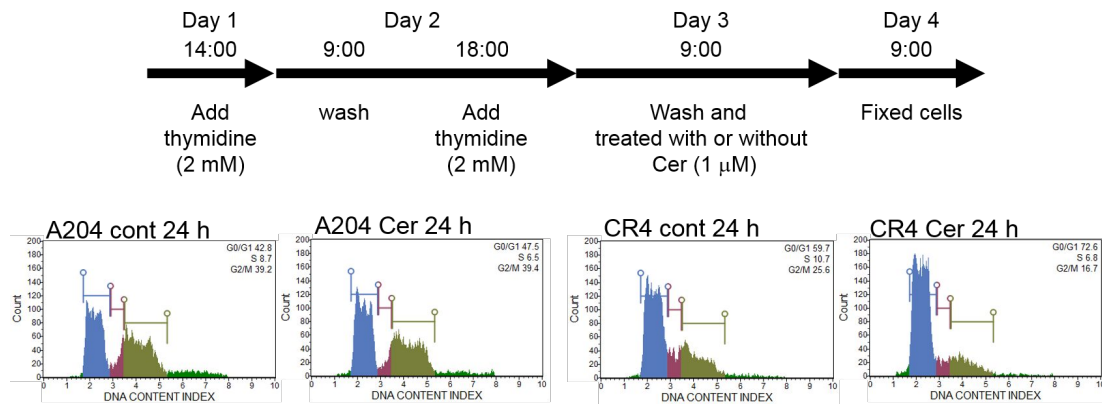


Fig. 2. セリバスタチン添加による細胞周期の変化

A204細胞とCR-4細胞の細胞周期を Muse Cell Analyzer で解析した。すべての細胞は、ダブルチミジンプロックで同調後にスタチン・DMSO 添加を行っている。
Cer: セリバスタチン 1 μM、cont: DMSO

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 2 件)

Obayashi, K., Takada, K., Ohashi, K., Ohashi-Kobayashi, A., Nakanishi-Matsui, M., Araki, M. and Maeda, M.

Increased electrophoretic mobility of long-type GATA-6 transcription factor on substitution of its PEST sequence.

Adv. Biosci. Biotechnol. **5**, 1032-1042. (2014)

Araki, M., Hoshi, K., Fujiwara, M., Sasaki, Y., Yonezawa, H., Senpuku, H., Iwamoto-Kihara, A. and Maeda, M.

Complementation of the Fo c subunit of Escherichia coli with that of Streptococcus mutans and properties of the hybrid FoF1 ATP synthase.

J. Bacteriol. **195**, 4873-4878. (2013)

〔学会発表〕(計 4 件)

荒木 信, 遠藤 寛美, 信國 好俊, 本島 清人, 前田 正知

横紋筋肉腫由来細胞におけるスタチン依存的細胞死誘導と細胞周期調節遺伝子の関連性

第 87 回日本生化学会大会(京都)2014 年 10 月 17 日

荒木信, 本島清人, 前田正知

HMG-CoA 還元酵素阻害剤依存的な細胞死誘導におけるエネルギー代謝の影響。

第 86 回 日本生化学会大会(パシフィコ横浜)2013 年 9 月 12 日

中目祐紀, 荒木信, 牛島弘雅, 前田正知

遺伝子破壊法による GATA-6 分解機構の解析。

第 52 回 日本薬学会東北支部大会(東北大学)2013 年 10 月 20 日

荒木 信, 遠藤 寛美, 信國 好俊, 本島 清人, 前田 正知

横紋筋肉腫由来細胞におけるスタチン依存的細胞死誘導と細胞周期調節遺伝子の関連性

第 87 回日本生化学会大会(京都)2014 年 10 月 17 日

〔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 URL :

http://gaia-sb.iwate-med.ac.jp/pharm/?page_id=47

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