

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560391

研究課題名(和文) 骨格筋におけるコレステロール不足がなぜ横紋筋融解症と突然死を引き起こしたのか？

研究課題名(英文) Why did lack of cholesterol in the skeletal muscle cause rhabdomyolysis and sudden death?

研究代表者

中川 嘉 (Nakagawa, Yoshimi)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授

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

研究成果の概要(和文)：脂質異常症治療薬スタチンが副作用として横紋筋融解症を発症する分子メカニズムを明らかにするため、標的遺伝子HMGCRを骨格筋で欠損するマウスを作成した。このマウスはコレステロール合成ができず横紋筋融解症を発症した。この際、なぜか細胞内コレステロールの増加が認められた。しかし、KOマウスで、逆に骨格筋中のコレステロールが増加していることは想定外であった。内因性のコレステロール合成および外因性のコレステロール取り込みが阻害されるLDLR/HMGCR KOマウスを作成したが、細胞内コレステロールは下がらなかった。現在までに知られていないコレステロール代謝があり、障害があることを示唆する結果であった。

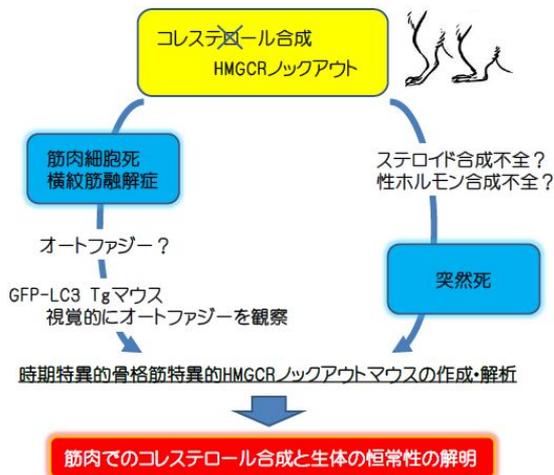
研究成果の概要(英文)： To identify the molecular mechanism that statin, a therapeutic agent for dyslipidemia, causes rhabdomyolysis, we generated skeletal muscle specific HMGCR KO (mKO) mice. These mice exhibited deficient of cholesterol synthesis leading to rhabdomyolysis. However, these mice had higher cholesterol contents in skeletal muscle than WT mice. Next, we generated LDLR KO/ mKO mice, which could not synthesize cholesterol de novo and import cholesterol from extracellular system. LDLR KO/ mKO mice had same phenotypes as mKO mice, thereby proposing that there is an unknown mechanism for cholesterol metabolism.

研究分野：代謝学

キーワード：コレステロール代謝 横紋筋融解症 スタチン

1. 研究開始当初の背景

【研究背景】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るが、最も副作用報告の多い治療薬として知られている。スタチンはコレステロール合成の律速酵素である HMG CoA 還元酵素の阻害剤である。その副作用として横紋筋融解症が発症する例が多く報告されている。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。重症化すると腎不全などの臓器機能不全を発症し、死に至る場合がある。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。



我々は脂質・コレステロール代謝と生活習慣病の関連を研究してきており、コレステロール代謝異常が生活習慣病を発症させるメカニズムを明らかにしてきた(Nakagawa Nat Med. 2006, Kato Cell Metab. 2006, Ide Nat. Cell Biol. 2004, Matsuzaka Nat Med. 2007)。コレステロール合成系遺伝子の発現を上昇させる SREBP2 が膵臓でコレステロール合成を促進させ lipotoxicity を膵臓で引き起こし糖尿病を発症させることを新しく発見した (Ishikawa JLR 2008)。また、HMG CoA 還元酵素の全身ノックアウトマウスは胎生致死でありコレステロール合成が生体維持に必須であることを明らかにした(Ohashi JBC 2003)。これらの経験から骨格筋、横紋筋におけるコレステロール代謝の重要性を示す上で、スタチンが与える筋肉への影響の機序を明確化する。

スタチンの標的遺伝子である HMG CoA 還元酵素を骨格筋特異的にノックアウトしたマウスを作製したところ横紋筋融解症を発症し突然死した。スタチンをマウスに投与すると筋肉での細胞死を誘導するが、死ぬことはない。そのため、本課題で使用するマウスは人のスタチンによる横紋筋融解症を解析するモデルとして最適なものである。このマウスを使用し横紋筋融解症の分子メカニズムを明らかにする。本研究は横紋筋融解症の

治療薬、将来の骨格筋に対し副作用のない新たなコレステロール低下薬の開発を進めるうえで本研究は非常に重要な研究である。また、骨格筋特異的 HMG CoA 還元酵素ノックアウトマウスは横紋筋融解症をターゲットとする治療薬開発の評価系としての意義も大きい。

2. 研究の目的

高コレステロール血症治療薬であるスタチンはコレステロール合成の律速酵素 HMGCR の阻害剤である。この薬剤は血中コレステロールを効果的に低下させる。一方、副作用として筋肉で横紋筋融解症を発症し、悪化すると腎機能不全により死に至らしめることが問題となっている。我々が作成した骨格筋特異的 HMGCR ノックアウトマウスはヒトでのスタチンの副作用を完全に模倣する世界初のモデルである。このマウスを用いることでスタチンによる横紋筋融解症とそれに伴う死のメカニズムを明らかにすることが可能である。骨格筋特異的 HMGCR ノックアウトマウスが新たな高コレステロール血症および横紋筋融解症の治療薬開発の評価系となりえるかも検討し、それら病態に対する治療薬開発を目指す。

3. 研究の方法

【骨格筋特異的 HMGCR ノックアウトマウスの表現系解析】

アレイ解析・リアルタイム PCR・in situ hybridization 等を用いて遺伝子発現制御機構を解明し、筋肉から分泌されるホルモン、性ホルモンなどの挙動を生化学的に評価する。あわせて骨格筋における病理学的変化についても検索する。

HMGCR はコレステロール合成の律速酵素であり、メバロン酸を合成する。そのため、HMGCR の欠損はメバロン酸合成以降の代謝を Stop させてしまう。この代謝経路で産生されるどの分子の欠乏が横紋筋融解症を発症させるかを様々な代謝産物をマウスへ投与し、病態の改善を観察する。また、代謝産物のみならず代謝に関連する遺伝子の過剰発現、ノックダウンなどにより律速となる分子を同定する。メバロン酸の投与で病態は改善する結果を得ており、コレステロール代謝経路のどこかの部分に関わっていることは間違いない。

病態の理解には病理学的な解析が重要である。そのため、筋肉組織を電子顕微鏡で観察し細胞内小器官に異常がないか、特に筋肉の機能維持に重要なミトコンドリアに着目する。さらに、Gomori Trichrome、NADH-TR、SDH、ATP 染色でもミトコンドリア機能の評価、細胞死に関して Evans Blue、TUNEL 染色、マクロファージによる貪食に F4/80、CD11b 染色などで評価する。

心筋、横隔膜など他の横紋筋以外の筋肉組

織における影響が突然死を誘発したか病理所見を検討する。また、心臓機能に異常がないか心エコー、血圧などで評価する。心臓機能に関しては筑波大学循環器内科などと連携し解析を進める。

【骨格筋特異的 HMGCR ノックアウトマウスにおける代謝産物の変化】

コレステロールをはじめとしたエネルギー代謝産物の質・量の変化をノックアウトマウスと正常マウスを比較し網羅的に解析する。脂肪酸の質の変化、コレステロール代謝産物の変化、エネルギー代謝産物の変化を網羅的に解析する。

【時期特異的・骨格筋特異的 HMGCR ノックアウトマウスの作成、解析】

我々が作成した骨格筋特異的 HMGCR ノックアウトマウスは胎児期にすでに HMGCR が欠損しており成長の段階で筋肉細胞に異常が生じていることが否定できない。そこで、時期特異的かつ骨格筋特異的に HMGCR をノックアウトするマウスを作製する。

成長した時点から HMGCR をノックアウトしその表現型を観察し、コレステロール合成と細胞死の関連を詳細に解析しメカニズムを明らかにする。

【イメージングによる細胞死メカニズム解析】

骨格筋特異的 HMGCR ノックアウトマウス・GFP-LC3 トランスジェニックマウスを用い in vivo でのイメージングにより解析を行う。細胞死の一つのメカニズムであるオートファジーの活性化が筋肉での細胞死のメカニズムであるかを解析するため、オートファジーをモニターするマーカー LC3 タンパクに GFP を融合した蛋白を発現するトランスジェニックマウス(GFP-LC3)と骨格筋特異的 HMGCR ノックアウトマウスを交配する。作成されたマウスの筋肉組織での LC3 の局在を視覚的に評価する。

また、RFP-GFP の 2 種類の蛍光タンパクと LC3 を結合させたタンパクをアデノウイルスに組み込み骨格筋で発現させる系を構築する。正常状態であれば RFP(赤)、GFP(緑)の両方が発色するが、オートファジーが起きている場所(Autophagosome)では pH の変化が生じており GFP タンパクが分解され RFP のみの赤色で発色する。RFP-GFP-LC3 と LC3-GFP マウスを用い、コレステロールによる細胞死がオートファジーに起因しているかを確認する。

【初代筋肉細胞を用いたオートファジーの評価】

マウスでの知見をさらに細胞レベルで検証し、さらなるメカニズムの解明を行う。細胞では GFP-LC3 だけでなく、RFP-GFP-LC3 を用い、発色の違いからさらにオートファジーが起きる細胞内小器官、また、LC3 陽性小胞の追跡も行う。

#### 4. 研究成果

Human alpha skeletal actin(Acta1)をプロモータとして Cre リコンビナーゼ遺伝子を発現する Acta1-Cre Tg マウスと HMG-CoA 還元酵素 floxed マウスを交配し骨格筋特異的 HMG-CoA 還元酵素(HMGCR) ノックアウトマウス(mKO マウス)を作成した。

EGFR に GFP を融合させた蛋白を発現するプラスミドを in vivo にてエレクトロポレーションでマウス骨格筋で過剰発現させ、ライソゾームによる分解能を評価した。しかしながら、対照群と mKO 群で差を認めなかった。また、ライソゾーム酵素の一種であるカテプシン D・L のウエスタンブロットによる成熟度合いの評価ならびにカテプシン D の酵素活性の測定を行った。これは対照群と比して mKO 群で上昇していた。対照群のマウスと mKO マウスの骨格筋から、ライソゾームを単離し、カテプシン酵素活性の測定を行ったが、これも mKO 群で上昇していた。また、生成後の時間経過に応じて色調の変化する「Timer」蛋白をライソゾームマーカー「Lamp2」と融合させ、in vivo において発現させ、ライソゾームの turn over をマウス前脛骨筋で評価したが、これは特に差を認めなかった。以上より、mKO マウスにおけるライソゾームの機能はむしろ低下ではなく、亢進しており、前年度の報告で認められた。

mKO マウスでのオートライソゾームの増加ならびに p62 の増加は、オートファジー亢進ならびにアミノ酸の増加による Rag を介した p62 の産生亢進によるものと考えられた。ライソゾームの機能亢進が mKO マウスの病態のリカバリーのために起きている可能性を考え、ライソゾームのマスタレギュレーターである、TFEB の野生型ならびに持続活性型を in vivo でエレクトロポレーションにより過剰発現させ、ライソゾームの発現量の増加を行ったところ、mKO マウスで逆に筋障害の増悪を認め、TFEB の過剰発現による病態の改善は認められなかった。

Doxycycline(Dox) inducible Acta1-Cre Tg マウスとの交配で作成した mKO マウス(以降 dKO マウスと呼称)を用いて、骨格筋特異的 HMGCR KO マウスにおける筋障害のタイムコースの評価を行ったところ、Dox による HMGCR 遺伝子の KO 後 18-21 日目にて全てのマウスで筋障害の発生が確認できた。そして、筋障害の発生する直前の検体を解析したところ、通常の mKO マウスと同様に dKO マウスにおいても、骨格筋でのオートファジー異常と free-Cho の増加が同様に認められた。このため、これらの変化は筋障害に先行して既に起きていることが明らかになった。

遊離コレステロールの増加は細胞毒性を来たすことが既に報告されていた点、コレステロール生合成系の律速段階である HMGCR の KO により逆に骨格筋中の遊離コレステロールが増加していた。この増加した遊離コレステロールを除去することにより、骨格筋障害の軽減できるかを検討した。当初、NPC1

遺伝子異常により endo-lysosome 系の異常ならびに遊離コレステロールの蓄積を来たすニーマンピック病1型のマウスモデルにおいて、神経細胞障害の軽減効果が認められている HP-β-cyclodextrin を投与することにより、骨格筋での遊離コレステロールの減少を試みた。しかし、既報にある肝臓や脳でのコレステロール引き抜き減少効果は骨格筋においては認められなかった。投与量や経路投与を検討したが cyclodextrin では mKO マウスの骨格筋の遊離コレステロールの減少効果を認めなかった。このため、次に LDL 受容体(LDLR)の全身 KO マウスと dKO マウスをかけあわせ、LDLR および HMGCR のダブル KO マウスを作成した。しかし、驚くべきことにこのダブル KO マウスにおいても通常の mKO マウスや dKO マウスと同様に骨格筋中の遊離コレステロールの減少を認めず、このダブル KO マウスでは内因性の HMGCR によるコレステロール合成および LDLR を介した外因性のコレステロール取り込みが阻害されているにもかかわらず、対象群と比して逆に KO 群で遊離コレステロールが上昇していることは、コレステロールの LDLR 以外を介した外因性の取り込みや細胞内部での輸送・消費経路に障害があることが推測された。各細胞内小器官を密度勾配超遠心法により濃縮単離し、それぞれの画分に含まれる遊離コレステロールを測定したところ、エンドソームならびにライソソーム画分のみにおいて、mKO 群で遊離コレステロールの増加を認め、エンドライソソーム系へのコレステロールの蓄積が認められた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Osaki Y, Nakagawa Y, Miyahara S, Iwasaki H, Ishii A, Matsuzaka T, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Yahagi N, Suzuki H, Sone H, Ohashi K, Ishibashi S, Yamada N, Shimano H. Skeletal muscle-specific HMG-CoA reductase knockout mice exhibit rhabdomyolysis: A model for statin-induced myopathy. **Biochem Biophys Res Commun.** 2015 Oct 23;466(3):p536-540.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.u-tokyo.ac.jp/~endocrinology/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 嘉 (Yoshimi Nakagawa)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・  
准教授

研究者番号： 80361351