

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

骨格筋における
3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
reductase (HMGCoA 還元酵素)の
機能解析

2 0 1 5

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

大 崎 芳 典

目次

骨格筋における 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCoA 還元酵素)の機能解析

第 1 章 緒言・目的	…p2
第 2 章 方法	…p5
第 3 章 結果	…p19
第 4 章 考察	…p31
謝辞	…p38
引用文献	…p39
図表	…p43

第1章 緒言・目的

高コレステロール血症の治療薬であるスタチンは世界中で最も多く使用されている薬剤の一つであり，脳梗塞や心筋梗塞などの動脈硬化性疾患の原因となる高コレステロール血症の治療薬として非常に有効である[1]．スタチンはコレステロール合成を行うメバロン酸経路の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR) の阻害剤であり，その主要な発現臓器は肝臓であって[2]，骨格筋は主要な発現臓器でないにも関わらず副作用として横紋筋融解症をはじめとする骨格筋障害を発症する例が報告されている[3]．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，重症例では腎臓に沈着したミオグロビンにより腎機能障害等を引き起こし，死にいたる場合もある[4]．高コレステロール血症治療薬のスタチンは特に使用される頻度が高く，骨格筋障害の副作用の頻度は多くないものの，最も注意すべき副作用であると言える．

HMGCR 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が報告されている[5]．スタチンの筋毒性については以前より研究が行われており，培養細胞系にて筋細胞にスタチンを加えてその影響をみた報告では，アポトーシスの亢進[6]，オートファジーの亢進[7]，筋萎縮を来たすユビキチンリガーゼの一種である atrogin1/MAFbx の発現亢進[8]等が挙げられている．他方，ラットやウサギなどにスタチンを投与した動物レベルの報告では，その筋肉は筋線維の空胞化やネクロシスを呈してお

り[9,10,11], 細胞レベルと動物レベルではスタチンによる筋障害の様式が異なることが知られている。この原因もいまだに明らかとなっていない。また, 細胞レベルではスタチンによる筋細胞障害性は示されてきているものの, マウスにおけるスタチンの全身投与では骨格筋障害が容易に惹起できないことが報告されており[12,13], HMGCR の骨格筋における機能不全がマウス個体レベルでの横紋筋融解症の発症原因であるかどうかは未だに明らかになっていない。

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 受容体を介した細胞外からの取り込みにより供給されているが, 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, スタチンによる HMGCR の機能阻害に伴い細胞内でのコレステロール産生が低下すると, LDL 受容体を介して細胞外から必要とするコレステロールを充分に取り込めないことが予想され, これも筋障害の一つのメカニズムと考えられてきた。

このようにスタチンによる骨格筋毒性・横紋筋融解症の発症の詳しいメカニズムは未だに明らかとなっていない。スタチン投与による重篤な横紋筋融解症の発症頻度は約 0.1%程度[4]と言われているが, 投薬対象となる母集団が大きいため, 横紋筋融解症の重篤な副作用が問題となることが少なくなく, その発症メカニズムを明らかにすることでスタチンの副作用予防・安全な使用法, およびより副作用の少ない新規高コレステロール血症治療薬の開発への足掛かりを掴むことができると考えられる。

本研究ではマウス個体レベルにおいて, 骨格筋でのコレステロール不足や HMGCR の活

性低下が実際に骨格筋障害・横紋筋融解症を発症させるのかを検討するために、骨格筋特異的に HMGCR をノックアウトしたマウスを作成し、その解析を行う。骨格筋における HMG-CoA 還元酵素の役割、横紋筋融解症発症の分子メカニズム、を明らかにするとともにより副作用の少ないスタチンの使用法や横紋筋融解症の発症抑制薬・新規高コレステロール血症治療薬の開発につながる知見を発見する事が本研究の目的である。

第2章 方法

1) 実験動物

実験に使用したマウスは全て C57BL/6J マウスをバックグラウンドとした雄マウスであり、特段の記載のない限り 7-8 週齢のマウスを全ての実験に使用した。HMGCR の Exon2 から 4 を loxP 配列で挟んだ floxed マウス [14](自治医科大学石橋俊先生からの供与)と α -actin 遺伝子プロモーターのコントロール下に Cre リコンビナーゼを発現 (HSA-Cre) するトランスジェニックマウス [15](Jackson Laboratory より購入)を掛け合わせることで骨格筋特異的 HMGCR ノックアウト (mKO) マウスを作成した。以降, HSA-Cre^{+/+}; HMGCR^{flox/flox} マウスを mKO マウス, 比較対照としてコントロール群に用いる HMGCR^{flox/flox}マウスを Ctrl マウスと呼称する。

また, オートファジーを可視化して評価するために GFP-LC3 トランスジェニックマウス [16](RIKEN BioResource Center より購入)を上記の Ctrl マウスと mKO マウスに掛け合わせて使用した。

マウスは 14 時間の明期 (5:00~19:00), 10 時間の暗期 (19:00~5:00) のサイクルの下で飼育し, 普通食 (Chow,オリエンタル酵母) と水は自由摂取とした。本論文中において, 「Fasting」は絶食開始後 24 時間後の状態, 「Fed」は暗期に入って 4 時間後の状態, 「Basal」は明期に入って 4 時間後の状態, と各々定義した。検体採取は特段の記載のある場合を除

き、「Basal」の摂餌状態にてすべて行った。すべての動物は筑波大学実験動物取扱規定に合致した方法で管理・処理された。

2) 摂餌量の測定

6-7 週齢のマウスを 1 匹ずつ飼育ケージに入れ、72 時間の総摂餌量を体重および日数で割り算出した。

3) トレッドミルによる持久力テスト

マウス用電動トレッドミル装置 MK-680(室町機械株式会社)を用いて、Ctrl マウス・mKO マウスともに 5 匹ずつ測定を行った。測定プロトコールは既報 [17]の方法に従った。

4) RNA 抽出と遺伝子発現解析, disrupted allele の検出

マウスの腓腹筋(Gc)より、Sepasol-RNA I Super G(Nacalai Tesque)を用いて total RNA を抽出した。

・ Real-time PCR

Total RNA を High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写を行った。合成した cDNA を SYBR Green (SYBR® Premix Ex Taq™ II, Takara)を用いた Real-time PCR 法(Thermal Cycler Dice® Real Time System Single,

Takara)により各種遺伝子発現を検討した．使用したプライマー配列を表 1 に示す．標的遺伝子の発現量は，GAPDH の値を内部標準として補正し， $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて相対値として算出した．

・ disrupted allele の検出

mKO マウスの各組織から上述と同様の方法で total RNA の抽出と逆転写を行った．合成した cDNA 産物に対し，forward primer, 5'-GCTTGGCCTCCATTGAGAT-3' と reverse primer, 5'-CTTTGCTAATGCACTCGCTCT-3'を用いて PCR を施行し，HMGCR 遺伝子の Exon2-4 が欠損した disrupted allele を検出した．

5) HMGCR 酵素活性の測定

マウスの腓腹筋から抽出したミクロソーム分画を用いて HMGCR 酵素活性の測定を行った．ミクロソームの抽出法および酵素活性の測定方法は既報 [14]の方法に従った．

6) 血中代謝パラメータの測定

後眼窩採血により得られた血清を用いて，クレアチンキナーゼ(CK)(CKPⅡ-テストワコー，和光純薬工業)，トリグリセライド(トリグリセライド E-テストワコー，和光純薬工業)，総コレステロール(コレステロール E-テストワコー，和光純薬工業)を測定した．

7) 骨格筋含有脂質量の測定

マウスの腓腹筋 200mg に対し、6ml の抽出バッファー(クロロホルム：メタノール=2：1 で混合したもの)を加え、ガラスバイアルに密封して 3 日間静置した後に、この抽出バッファー300ul をガラスチューブにとり、50℃で 1 日間乾燥させた。バッファーが蒸発しガラスチューブに抽出された脂質が析出するのでこれを試料として、遊離コレステロールとエステル型コレステロールを Total Cholesterol and Cholesteryl Ester Colorimetric/Fluorometric Assay Kit(BioVision)を用いて、トリグリセライドをトリグリセライド E-テストワコー(和光純薬工業)を用いて、各々測定を行った。測定方法は各測定キット付属のマニュアルに従った。

8) 骨格筋の組織学的検討

マウスをイソフルランにて麻酔した後に頸椎脱臼にて屠殺。その後に前脛骨筋を摘出し、コルク栓の上に盛ったトラガカントゴムに長軸方向を垂直にたて、液体窒素で冷却したイソペンタンの中に浸け、急速凍結した。この凍結筋検体をミクロトームで 10 μ m 厚に切片を作成し、スライドガラスの上で風乾させ、各種組織学的検討に供した。

・組織化学的染色

Hematoxylin-eosin(HE), modified Gomori trichrome, periodic acid Schiff(PAS), NADH-tetrazolium reductase (NADH-TR), Oil Red O, 非特異的エステラーゼ(NSE)染色

を行った。明視野の顕微鏡写真は Olympus DP72 デジタルカメラと Olympus IX71 顕微鏡 (Olympus Optical Corp)を用いて撮影した。

- ・ 蛍光免疫染色

凍結切片を 4%パラホルムアルデヒドにて 15 分間固定し, 5%BSA(MP Biomedicals)含有 1×PBS(Phosphate Buffered Saline)にて室温で 1 時間ブロッキングを行った。各種一次抗体は免疫染色用抗体希釈バッファー(1%BSA, 0.1%Triton-X 含有 PBS)にていずれも 100 倍～500 倍に希釈(抗体最終濃度 2～10 μ g/ml)して切片に添加し, 4℃にて overnight で反応させた。使用した一次抗体を表 2 に示す。次に蛍光標識された各種二次抗体を免疫染色用抗体希釈バッファーで 1000 倍に希釈して切片に添加し, 遮光下で室温, 1 時間反応させた。その後に必要な応じて DAPI Nucleic Acid Stain(Lonza)にて核染色を行い, FluorSave™ Reagent(Calbiochem)にてマウントし, 同日中に蛍光観察を行った。蛍光観察はすべて共焦点レーザー顕微鏡 Olympus FV10i(Olympus Life Science)を用いて 60 倍の対物レンズにて観察した。

- ・ Filipin 染色

凍結切片を 4%パラホルムアルデヒドにて 10 分間固定し, 50 μ g/ml ジギトニン(和光純薬工業)含有 PBS にて 5 分間透過処理を行った。その後, 50 μ g/ml Filipin(FOCUS BIOMOLECULES), 0.5%BSA 含有 PBS を切片に添加し, 遮光下で室温, 90 分間反応させた。FluorSave™ Reagent にてマウントし, 褪色が早いいため直ちに上述と同様の方法で

蛍光観察を行った。遊離コレステロールが青色の蛍光で検出される。

9) Evans Blue dye uptake test

Evans Blue Dye(Sigma-Aldrich)を PBS にて 10mg/ml の濃度で溶解し、 $0.2\ \mu\text{m}$ のフィルターを通して不純物を除去する。これをマウス尾静脈より、 $10\ \mu\text{l/g} \cdot \text{BW}$ にて静注し、24 時間後に上述のとおり前脛骨筋を採取し切片を作成した。作成した切片は上述の手順で DAPI 染色を行い、励起波長 559nm、検出波長 570-620nm にて蛍光観察を行った。筋細胞膜の損傷や壊死を伴う筋線維が赤色蛍光にて検出される[18]。

10) in vivo エレクトロポレーション(EP)によるマウス前脛骨筋への遺伝子導入

本実験手技については、首都大学東京運動分子生物学研究室の藤井宣晴先生よりご教示を頂いた。マウス in vivo EP 用の 2 針筋肉刺激電極付きプログラム電気刺激発生装置は内田電子株式会社より購入した。6-7 週齢のマウスに対し、ペントバルビタールによる腹腔内麻酔を行い、生理食塩水にて $2\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ に希釈したプラスミドをインスリンシリンジにて $20\text{--}30\ \mu\text{l}$ 前脛骨筋内に筋注した。直ちに 2 針ステンレス電極針を前脛骨筋内に挿入し、プログラム電気刺激発生装置を用いて電気パルス($200\text{V}/\text{cm} \times 20\text{ms}$)を 1Hz 周期にて計 8 パルス通電した。12-14 日後に EP を施行した前脛骨筋を回収し、上述の方法で切片を作成した。その他 EP の実施手技の詳細は既報[19]の方法に従った。

11) Rheb-WT-GFP プラスミドを用いた、プレニル化機能の評価

HMGCR がその律速段階酵素であるメバロン酸経路において、メバロン酸(MVA)下流の代謝産物であるファルネシル二リン酸(FPP)やゲラニルゲラニル二リン酸(GGPP)が各種低分子量 G タンパク質のプレニル化に必要なことが知られており、このうち低分子量 G タンパク質 Rheb は FPP がそのプレニル化に必要なことが報告されている[20]。Rheb に GFP を融合させた蛋白を発現するプラスミドを用いて、Rheb-GFP を細胞内で発現させることにより、この Rheb-GFP が FPP を用いたプレニル化を受けると膜構造物にアンカーできるようになり凝集して緑色の蛍光ドットを生じ、他方 FPP の不足等によりプレニル化ができないと細胞質内に分散して蛍光ドットを形成しない性質を利用して、プレニル化の有無を検出する方法が報告されている[21]。

本研究では、既報[21]にて使用されている Rheb-WT-GFP(Addgene plasmid # 13831) プラスミドと不活性型変異を導入しプレニル化ができない Rheb-SSVM-GFP(Addgene plasmid # 13832)プラスミド(ネガティブコントロールとして使用)を上述の方法で *in vivo* EP にてマウス前脛骨筋で発現させ、EP 後 14 日目に上述の方法で筋検体を回収・観察し、Rheb-WT-GFP の緑色の蛍光ドットの形成の有無にて、骨格筋内でのプレニル化の有無を評価した。蛍光ドットの形成が少ない場合は、Rheb のプレニル化が上手くいっておらず、MVA 下流の代謝産物である FPP が不足していることを示している。

12) MVA 投与による mKO マウス骨格筋障害の救済実験

メバロン酸経路において，HMGCR 直下の代謝産物である MVA を投与し，HMGCR の欠損そのものが筋障害の原因となるのか，もしくは HMGCR の欠損による下流の代謝産物の不足が筋障害の原因であるのか，を検討した．5 週齢のマウスに対して，生食もしくは生食に溶解した MVA(Sigma-Aldrich)200mg/kg・BW/日を経口にて 1 日 1 回，合計 4 週間投与した．投与開始から 29 日目に血清および筋検体を回収し，上述のとおり筋障害の程度を血清 CK と HE 染色にて評価した．

13) 透過型電子顕微鏡(TEM)によるマウス骨格筋の形態観察

マウス前脛骨筋を採取し，2%グルタルアルデヒド(和光純薬工業)にて overnight で前固定，1%四酸化オスミウムにて後固定を施行後，エポキシ樹脂に埋包した．その後ウルトラミクロトーム(ULTRACUT E, Leica)で厚さ約 90nm に超薄切し，透過型電子顕微鏡 JEM-1400(日本電子株式会社)にて観察・写真撮影を行った．

ミトコンドリア最大径およびミトコンドリア数は，TEM にて 5000 倍で観察した 1 視野 ($200\mu\text{m}^2$)につき，その 1 視野に含まれるミトコンドリアの最大径の平均値とミトコンドリア数を測定し，ランダムに抽出した 6 視野(n=6)の平均値をもって算出した．

14) タンパク質抽出およびウエスタンブロット法

採取したマウス腓腹筋に, lysis buffer (40mM HEPES pH7.5, 120mM NaCl, 1% Triton-X, 100mM NaF, 0.5% Sodium Pyrophosphate, 1mM Na₃VO₄, 10% Glycerol, Protease inhibitors(Roche)) を加え, ポリトロンホモジェナイザー(PT10-35, KINEMATICA)にて破砕して氷上で 15 分間静置した. その後, 4°C, 14000rpm にて 15 分間遠心分離し, 上清をサンプルとして用いた. 抽出したタンパク質は BCA Protein Assays(Thermo Fisher Scientific)にて蛋白量を定量後, 6×sample loading buffer(300mM Tris-HCl pH6.8, 30% glycerol, 12% SDS, 30% β-mercaptoethanol, 0.06% bromophenol blue)を加え, 95°C で 5 分間加熱した. これを 6-12.5% SDS-PAGE にてタンパク質を分離した. 分離したタンパク質は, Immobilon-P(Millipore)に Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) にてゲル面積×3mA, 15-20V, 60 分間にてトランスファーを行った. トランスファーしたメンブレンは 5% skim milk(BD Biosciences)含有の 1×TBS-T(Tris Buffered Saline with 0.05% Tween 20) で 1 時間ブロッキングを行った後, 各種一次抗体を上記のブロッキング液にて 200-1000 倍に希釈(各一次抗体の最終濃度は全て 1 μg/ml とするように調整)したものをメンブレンに加え, 4°C, overnight で攪拌した. ウエスタンブロットにて使用した一次抗体を表 3 に示す. その後, メンブレンを TBS-T で 5 分間×3 回洗浄後, HRP 標識二次抗体を 2500-5000 倍にブロッキング液で希釈したものを加え, 室温で 1 時間攪拌し, 再び TBS-T で 5 分間×3 回洗浄後に検出を行った. ウエスタンブロット

の検出は Clarity™ Western ECL (Bio-Rad)を用いて化学発光させ, ChemiDoc™ XRS(Bio-Rad)を用いて検出した.

15) Real-time PCR を用いたミトコンドリア DNA 量の相対定量

既報[22]の方法にて, 腓腹筋中のミトコンドリア DNA の検出のために, forward primer, 5'-CCTATC ACCCTTGCCATCAT-3' と reverse primer, 5'-GAGGCTGTTGCTTGTGTGAC-3'を, 核 DNA の検出のために, forward primer, 5'-ATGGAAAGCCTGCCATCATG-3' と reverse primer, 5'-TCCTTGTTGTTTCAGCATCAC-3'を用いて Real-time PCR を施行し, ミトコンドリア DNA 量は核 DNA の値を内部標準として補正し, $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて相対値として算出した.

16) 骨格筋中の ATP 量の測定

マウス腓腹筋中の ATP 量の測定には, Fluorometric & Colorimetric ATP Quantitation Kit(PromoKine)を使用し, 測定キット付属のマニュアルに準じて測定した.

17) in vivo におけるプロテアソーム機能評価

既報[23]の方法にのっとり, 骨格筋でのプロテアソーム機能の評価を行った. まず, マウス前脛骨筋に Histone2B-mCherry(Addgene plasmid # 20972)と UB-G76V-GFP(Addgene

plasmid # 11941)プラスミドを同時に EP で導入. EP にてプラスミドが導入された筋線維は Histone2B-mCherry により核が赤色の蛍光を発する. UB-G76V-GFP プラスミドにより発現される GFP タグ付き蛋白はプロテアソーム系で分解されることにより直ちに GFP が消光する. このため, プロテアソーム系の活性が阻害されると GFP による緑色の蛍光が筋線維から観察できるようになる. EP 後 14 日目に前脛骨筋を上述の方法に従い回収し, 観察した. ポジティブコントロールとして, 既報[23]に従い EP を行った Ctrl マウスに検体回収の 4 日前から, プロテアソーム阻害剤 MG262(APEx BIO)を $5\mu\text{mol/kg} \cdot \text{BW}$ 量にて 1 日 1 回腹腔内投与を行い, その前脛骨筋を回収した.

18) colchicine を用いた LC3 turnover assay による autophagy flux の評価

既報[24]にて, マウスに colchicine を投与することで, 骨格筋におけるオートファゴソーム(AG)からオートライソゾーム(AL)への変化と AL 内部の酸性化が障害されることが報告されている. このため colchicine 投与下においては, オートファジーが正常もしくは亢進している場合は LC3-II の蛋白量が増加, オートファジーが上流で抑制もしくは下流での AG とライソゾーム(Lys)の融合による AL への変化や AL 内部の酸性化などの抑制がある場合は LC3-II の蛋白量が増加しない, ということを用いて autophagy flux を評価することができる[24].

マウスに colchicine $0.4\text{mg/kg} \cdot \text{BW/日}$ を 1 日 1 回腹腔内投与×2 日間にて行い, 最終投

与から 12 時間後に腓腹筋を採取して、上述のとおりウエスタンブロット法にて、colchicine 投与前後で LC3-II が増加(=オートファジーは正常もしくは亢進していることを示唆)するかどうかを検討した。

19) GFP-LC3 Cleavage Assay による autophagy flux の評価

GFP-LC3 トランスジーンを持つマウスにおいては、オートファジーが亢進すると、GFP-LC3 が Lys 中にて分解され、cleavage により LC3 と分離された GFP が検出されることが報告されている[25]。このことを利用して、cleaved GFP の増加により autophagy flux の亢進を評価することができる[25]。

Ctrl マウスおよび mKO マウスに GFP-LC3 Tg マウスを掛け合わせ、GFP-LC3 トランスジーンをヘテロにて持つようにした。これらのマウスの腓腹筋を採取して、上述のとおりウエスタンブロット法にて GFP 抗体で cleaved GFP を検出し、cleaved GFP が Ctrl マウスに比して増加(=オートファジーが Ctrl マウスに比して亢進していることを示唆)しているかどうかを検討した。

20) RFP-GFP-LC3(tfLC3)レポータープラスミドを用いた autophagy flux の評価

木村らの開発した RFP-GFP-LC3 レポータープラスミドは、酸性環境下にて pH 依存性に GFP が消光し RFP のみの発光となることで、蛍光顕微鏡で画像的に AG (RFP+, GFP+)

や AL (RFP+, GFP-)を識別することができる[26]. このため, AG と Lys の融合に障害がある場合, Lys の機能異常や AL の内部酸性化障害が存在する場合には, RFP+, GFP+ の LC3 ドットが増加する. 他方, オートファジーが亢進すると, 内部が酸性化した AL が増加するため, LC3 ドット全体に占める RFP+, GFP- の LC3 ドットが増加する.

マウス前脛骨筋に対して, RFP-GFP-LC3 レポータープラスミド(Addgene plasmid # 21074)を上述の方法にて EP を行った. EP 後 12 日目に前脛骨筋を採取し切片を作成, 上述の方法にて蛍光観察を行った. ランダムに抽出した 10 視野の画像から, 前脛骨筋単位面積当たりの LC3 ドット(=AG+AL 数)を Image J(NIH software)を用いてカウントし, 「LC3 total puncta」として測定した. また, 同様に AG と AL の数全体に占める AL の割合を同様の方法で測定し, autophagy flux の亢進(=AL の割合が高い)があるかどうかを評価した.

21) in vivo におけるライソゾーム(Lys)機能の評価

• Cathepsin L maturation ratio

上述の方法に従い, cathepsin L 抗体を用いてウェスタンブロットを行った. Pro cathepsin L に対する mature cathepsin L の比を Image J(NIH software)を用いて測定し, cathepsin L の成熟化障害があるかどうかを検討した.

• 骨格筋中の cathepsin D 活性の測定

マウス腓腹筋をサンプルとして, Cathepsin D Activity Fluorometric Assay

Kit(BioVision)を用いて、測定キット付属のマニュアルに準じて、マウス骨格筋重量あたりの cathepsin D 活性を測定した。Cathepsin D の活性は蛍光強度の強さに比例するため、Ctrl マウスと mKO マウス間で相対的な cathepsin D 活性を測定した。蛍光の測定には Varioskan® Flash(Thermo Fisher Scientific)を使用した。

- ・骨格筋からの Lys の単離

マウス腓腹筋からの Lys の単離は、ライソゾーム単離キット(LYSIS01, Sigma-Ardrich)を用いて、測定キット付属のマニュアルに準じた方法で行った、なお、本実験では密度勾配超遠心法による単離ではなく、塩化カルシウム沈殿法による Lys の単離を行った。

- ・単離 Lys 中の cathepsin D 活性の測定

Lys そのものの酵素活性を測定するために、Lys を単離して cathepsin D の活性測定を行った。単離 Lys は BCA Protein Assays(Thermo Fisher Scientific)にて蛋白量を定量後、20ug の Lys 蛋白をサンプルとして、上述の Cathepsin D Activity Fluorometric Assay Kit(BioVision)を用いて同様に cathepsin D 活性の測定を行った。

22) 統計解析

データは平均値±標準誤差(means ± SE)で示し、統計処理は2群間の比較は Student's t-test によって行った。P<0.05 以下を有意とした。

第3章 結果

1) mKO マウスでは骨格筋量の減少と運動耐容能の低下を認めた.

マウスの全体写真(Fig.1A)および腓腹筋(Fig.1B)の写真を示す. いずれも Ctrl マウスに比して mKO マウスで大きさは全体的に小さく, 腓腹筋も肉眼的に mKO で減少していることが示された. 3 週齢から 8 週齢までの体重推移(Fig.1C)においても, mKO マウスは Ctrl マウスに比して軽く, 骨格筋量の減少を反映していると考えられた. 同時に摂餌量(Fig.1D)を計測したが mKO マウスで逆に摂餌量は増加しており, 餌の摂取不足による骨格筋や体重の減少でないことが確認できた. トレッドミルによる運動耐容能試験(Fig.1E)では, mKO マウスで運動耐容能が半分程度に減少しており, これも筋肉量の低下に合致していた.

未だに正確な原因は掴みきれていないが, 雄の mKO マウスのみ 8 週齢頃より衰弱して 2-3 日の経過で死亡する現象が観察された(Fig.1F). この現象は雌の mKO マウスでは同様に骨格筋量が低下するものの観察されず, その原因は不明である.

2) mKO マウスにおいて, 骨格筋での HMGCR ノックアウトが確認された.

mKO マウスの各臓器から採取した mRNA を元に逆転写を行い取得した cDNA において, 骨格筋(腓腹筋)のみで disrupted allele が検出された(Fig.1G). Normal allele も残存しているが, これは HSA-Cre 自体が, 筋細胞が融合し筋線維となった段階で Cre リコンビナ

一ゼを発現するため、筋衛星細胞や筋線維内に侵入した炎症細胞など、Cre リコンビナーゼによる HMGCR の欠損が起きなかった細胞に含まれる normal allele を見ているものと考えられた。Ctrl マウスに比して、mKO マウスでは骨格筋における HMGCR 遺伝子発現は低下(Fig.1H)し、骨格筋において測定した HMGCR 酵素活性そのものも約 1/3 程度に減少していた(Fig.1I)。これは既報[14]の肝臓特異的 HMGCR ノックアウトマウスでの酵素活性の低下度合いとほぼ同様であった。

3) mKO マウスにおいて、血清 CK の上昇を認め、骨格筋障害が示唆された。

Ctrl マウスに比して、mKO マウスの骨格筋では LDL 受容体(LDLR)と SREBP2 の遺伝子発現が増加していた(Fig.2A)。既報[27]にて小胞体におけるコレステロール不足に反応して、LDLR と SREBP2 の遺伝子発現が亢進することが報告されており、骨格筋における HMGCR のノックアウトの結果に反応した現象と考えられた。

mKO マウスでは血清 CK の上昇(Fig.2B)を認め、骨格筋障害を反映した結果と考えられた。他方、骨格筋の HMGCR ノックアウトのみでは、血清総コレステロールとトリグリセライドの値に変化はなかった(Fig.2C,D)。

mKO マウスにおいて、骨格筋中のトリグリセライドとエステル型コレステロールには変化がなかったものの、驚くべきことに遊離コレステロールは Ctrl マウスに比して予想と反して mKO マウスの骨格筋で約 2 倍に増加していた(Fig.2E,F,G)。

4) mKO マウスの骨格筋において、ネクロシスを伴うミオパチーを認めた.

mKO マウスの組織染色では、HE 染色にて筋線維の空胞化、炎症細胞の浸潤や中心核を伴う再生線維を認め、ミオパチーの発生が確認できた(Fig.3A). また、PAS 染色にてグリコーゲンの蓄積、NADH-TR にてミトコンドリア機能の低下が示唆された(Fig.3A).

NSE 染色では空胞化線維および正常に見える筋線維いずれにも NSE 染色陽性のドットを認め、ライソゾーム機能の異常が示唆された(Fig.3A).

また、前述の骨格筋抽出の脂質データ(Fig.2E)と同様に、Filipin 染色では mKO マウスの筋線維で蛍光強度が強く(Fig.3B)、組織染色画像でも遊離コレステロールの増加が認められた. ジストロフィン染色(Fig.3C)では本来細胞骨格に局在するジストロフィンが筋線維内に認められ、局在に異常があることが示唆された.

Evans Blue dye uptake 試験では、mKO マウスにのみ Evans Blue の取り込みによる赤色蛍光がみられ(Fig.3D)、mKO マウスの筋線維では膜損傷やネクロシスが発生していることが確認できた.

Rheb-WT-GFP プラスミドの EP による in vivo での発現実験(Fig.3E)では、mKO マウスの筋線維では Ctrl マウスに比して、明らかに GFP ドットの形成が少なく、通常のスチンの薬理作用と同様に、MVA 下流の代謝産物の一種である FPP の不足により低分子量 G タンパク質のプレニル化障害があることが確認できた.

5) mKO マウスの骨格筋障害は、MVA の経口投与にて消失した。

mKO マウスにおいて、MVA の経口投与により、4 週後の血清 CK は Ctrl マウスと同程度まで低下し(Fig.4A)、さらに HE 染色でも壊死線維や炎症細胞の浸潤を認めず(Fig.4B)、ミオパチーは完全に消失していることが確認できた。これにより、mKO マウスのミオパチーの原因は、HMGCR の欠損そのものではなく、欠損に起因して MVA 下流の代謝産物が不足することが原因であることが確認できた。

6) mKO マウスの骨格筋ではアポトーシスの発生はみられなかった。

スタチンによる筋毒性のメカニズムとして、培養細胞実験系においてはアポトーシスを原因とする報告[5]がある一方、動物実験系[9,10,11]ではネクローシスによる筋障害の報告が多い。このため、mKO マウスにおいて、アポトーシスが発生しているかを確認した。アポトーシスの実行因子である cleaved caspase 3 染色(Fig.5A)では、mKO マウスで陽性核を認めず、また TEM による電子顕微鏡写真(Fig.5B)でもアポトーシスに特徴的とされる核の断片化は認めず、ネクローシスで見られるとされる核の膨化を認めた。ウェスタンブロットにおいても、cleaved caspase 3 とその標的蛋白である cleaved PARP は Ctrl マウスと同様に mKO マウスにおいても認めなかった。以上のデータから、mKO マウスに

においてアポトーシスの発生を示唆する結果はなく、前述の結果(Fig.3D)とあわせて、ネクローシスが発生していると考えられた。

7) mKO マウスの骨格筋ではミトコンドリア障害が認められた。

NADH-TR 組織染色(Fig.3A)において mKO マウスでのミトコンドリア機能の低下が示唆されたため、ミトコンドリアの評価を実施した。mKO マウスの骨格筋において、ミトコンドリア DNA 量は低下(Fig.6A)し、ミトコンドリア膜蛋白 Tom20 のウェスタンブロット(Fig.6B)においても蛋白量の低下を認め、Ctrl マウスに比してミトコンドリア量が低下していることが確認できた。また、ミトコンドリアの機能を反映する ATP 量(Fig.6C)も mKO マウスで低下しており、ミトコンドリアの機能障害が確認された。TEM によるミトコンドリア数と最大径はいずれも mKO マウスで減少していた(Fig.6D,E)。

8) TEM により、mKO マウス骨格筋でのミトコンドリア異常と AG の増加を認めた。

TEM による観察では、mKO マウスの骨格筋において、ミトコンドリアの形態異常が認められた(Fig.7A)。また、空胞化した筋線維周囲に AG の増加を認め(Fig.7B)、オートファジーと筋障害の関連を疑わせる結果であった。その他にも膨化した低密度の構造物や逆に高密度の構造物が mKO マウスにおいて多数確認(Fig.7B)されたが、これが何であるかはいずれも同定ができなかった。

9) mKO マウスの骨格筋ではオートファジーの異常が認められた.

オートファジー関連蛋白の抗体を用いたウェスタンブロット(Fig.8A)では, Lamp2, LC3, p62 の増加を認め, mKO マウスの骨格筋ではオートファジーの異常が存在することが示された. また, S6, リン酸化 S6 とともに mKO マウスで増加を認め(Fig.8A), オートファジー上流での調節因子である, mTORC1 の機能は活性化していることが確認できた. 他方, Atg5, Atg7 も mKO マウスで増加(Fig.8A)しており, この点は mTORC1 の活性化によるオートファジー上流での抑制とは相反する結果であった. ユビキチン化蛋白は mKO マウスで明確に増加を認め(Fig.8B), これは p62 の増加やユビキチン-プロテアソーム分解系の異常に矛盾しない結果であった. 同様に蛍光免疫染色でも, mKO マウスにおいて p62(Fig.8C), ユビキチン(fig.8C)の増加を認めた.

以上の結果から, mKO マウスの骨格筋ではなんらかのオートファジーの異常が存在することが示唆された.

10) mKO マウスの骨格筋では, Foxo3 およびプロテアソーム系の活性化を認めた.

既報[28]にて p62 の増加はオートファジーの異常の他に, プロテアソーム系の阻害によっても起きることが報告されている. また, 上述したとおりプロテアソーム系の活性化がスタチンによる筋障害の原因だとする報告もある[8]. プロテアソーム系は Forkhead box

O3(Foxo3)によって調節されており、同時に Foxo3 は Ulk1 や mTORC1 と同様に、骨格筋におけるオートファジーの主要な上流の調節因子であることが知られている[29].

mKO マウスの骨格筋では、ULK1 のリン酸化は Ctrl マウスと比して変化がない一方、リン酸化 AMPK、活性型である非リン酸化 Foxo3 およびそのエフェクターである Bnip3 は増加しており(Fig.9A)、リン酸化 AMPK による Foxo3 の活性化が起きていると考えられた。Foxo3 の活性化は mTORC1 の活性化と異なり、オートファジーを亢進させるように働く[29]。プロテアソーム系の遺伝子発現も mKO マウスで増加しており[Fig.9B]、この点から mKO マウスではプロテアソーム系の活性化が確認できた。プロテアソーム系によりすみやかに分解される GFP を発現する Ub-G76V-GFP プラスミドの EP により、プロテアソーム系の分解活性をマウス前脛骨筋で検討したところ、mKO マウスでは Ctrl マウスと同様に GFP が消光(Fig.9C)しており、プロテアソーム系の分解障害はないことが確認できた。このことより前述の p62 の増加(Fig.8A)はプロテアソーム系の異常によるものではないことが確認でき、オートファジーの異常に起因するものであることが示唆された。

11) mKO マウスでは、AG, Lys, p62 が増加し、いずれも融合障害を認めなかった。

オートファジーの状態を確認するために、GFP-LC3 トランスジェンを発現するようにした Ctrl マウスと mKO マウスを比較検討したところ、mKO マウスにて AG のマーカーである GFP-LC3 ドットの増加を認めた(Fig.10A)。また、mKO マウスで増加していた

p62 は GFP-LC3 ドットの示す AG と共局在(Fig.10B)しており, p62 は AG 内に正常に取り込まれていることが確認された. GFP-LC3 ドットの示す AG や p62 と, Lamp2 の示す Lys は Ctrl マウス同様に, mKO マウスでも共局在(Fig.10C,D)しており, AG と Lys の融合障害は明らかではなかった.

12) mKO マウスの骨格筋ではオートファジー(autophagy flux)が亢進していた.

mKO マウス骨格筋における, autophagy flux を評価するために各種検討を行った. 既報[24]に従い, colchicine による LC3 turnover assay を施行したところ, Ctrl マウス同様に mKO マウスでも colchicine 投与で LC3-II が増加(Fig.11A)し, オートファジー下流での分解障害はなく, autophagy flux は正常もしくは亢進状態であることが示唆された. また, GFP-LC3 トランスジーンを発現させて行った, LC3 cleavage assay においても, mKO マウスにて cleaved GFP の増加(Fig.11B)を認め, この実験からはオートファジーの亢進が示唆された. マウス骨格筋に EP にて RFP-GFP-LC3(tfLC3)レポータープラスミドを発現させ autophagy flux を評価したところ, mKO マウスでは AL を示す RFP+,GFP- の LC3 ドットが増加(Fig.11C)しており, 画像所見を定量化したものでも, AG+AL の総数の増加(Fig.11D)ならびに, AL の割合の増加(Fig.11E)を認め, autophagy flux の亢進が示唆された.

これらのデータにより、mKO マウスの骨格筋においてはオートファジーが亢進していると考えられた。

13) mKO マウスの骨格筋では Lys の活性が亢進していた。

Cell Metabolism 誌の既報[30]において、スタチンは PKD のリン酸化の低下を介して、PI3Kc3(Vps34)及び Beclin1 の低下を来たし、これにより autophagy flux を低下させるとの報告があったため、mKO マウスの骨格筋においても同様に検討を行った。結果としては、Ctrl マウスに比して mKO マウスでは、リン酸化 PKD は逆に増加しており、Vps34 及び Beclin1 も増加を来たしていた(Fig.12A)。このことは mKO マウスにおいて、autophagy flux が亢進していることと合致していた。

前述の結果(Fig.11C,E)のとおり、Ctrl マウスに比して mKO マウスで AL の割合が増加していたが、既報[31]において Lys 中の酵素活性の低下により AL の割合が増加し、一見 autophagy flux が亢進しているように見える場合があるとの報告があったため、Lys の酵素活性・機能を検討した。mKO マウスでは mature 型の cathepsin L の割合が増加(Fig.12B,C)し、同様に骨格筋中の蛋白量あたりの cathepsin D 酵素活性も増加していた(Fig.12D)。また、Lys を単離抽出することにより、Lys の蛋白量あたりの cathepsin D 酵素活性を測定したが、やはり同量の Lys にて比較しても mKO マウスの Lys にて cathepsin D 酵素活性が上昇していた(Fig.12E)。

以上の結果より、mKO マウスでの Lys 中の酵素活性は Ctrl マウスに比して増加しており、mKO マウスにおいて autophagy flux が亢進していることと合致する結果が得られた。

14) mKO マウス骨格筋での p62 の増加は産生亢進に由来することが示唆された。

これまでの実験データより、mKO マウスにおいてオートファジー(autophagy flux)は亢進していることが確認されたが、一般的には p62 の増加はオートファジーの上流での抑制もしくは下流での分解障害を示唆すると言われている[32]。最近になり、オートファジー亢進が長期間持続すると、オートファジーで分解されたアミノ酸を介して RagC が増加し、これが p62 の産生増加を来たすことが報告された[33]。このため、mKO マウスの骨格筋でも上記を検討したところ、mKO マウスにおいてオートファジー由来のアミノ酸の増加によると思われる RagC 蛋白の増加(Fig.12F)および p62 の遺伝子発現の増加(Fig.12G)を認めた。

これらの結果により、mKO マウスでの p62 蛋白量の増加はオートファジーでの分解障害による蓄積ではなく産生亢進による増加と考えられ、autophagy flux の亢進と矛盾しない結果であると考えられた。

15) mKO マウスの骨格筋において, Foxo3 の不活性化によりオートファジー(autophagy flux)の亢進を抑制できたが, 筋障害の改善には至らなかった.

mKO マウスの骨格筋ではオートファジーの亢進が確認できたため, オートファジーの異常が筋障害の一因となっているか, またこれを正常化することにより骨格筋障害が改善するかを検討した. これまでのデータより, mKO マウスにおいてオートファジーを亢進させる因子として, Foxo3 の活性化が同定されている. このため, ドミナントネガティブ型の Foxo3(Foxo3-DN, Addgene plasmid # 1797), 持続活性化型の Foxo3(Foxo3-CA, Addgene plasmid # 1788)を骨格筋に tfLC3 プラスミドとともに EP し, オートファジーへの影響および骨格筋の障害が改善するかを検討した.

mKO マウスの骨格筋において, Foxo3-DN の EP を用いた Foxo3 の不活化により, AG は減少し, autophagy flux は Ctrl マウスと同程度まで低下した(Fig.13A,B,C). 他方, mKO マウスにおいては, Ctrl マウスと異なり Foxo3-CA は明らかなオートファジーへの影響を示さなかった(Fig.13A,B,C). 上記データより, mKO マウスにおいては, やはり Foxo3 の活性化がオートファジー亢進の原因となっていることが示され, また Foxo3 の不活化により mKO マウスのオートファジー亢進状態を正常化できることが確認できた.

一方で, 骨格筋の障害程度を反映する中心核を持つ筋線維の数は, Foxo3-DN の EP を行っても mKO マウスにおいて明らかな減少を示さず(Fig.13D), HMGCR ノックアウト

に起因する骨格筋障害は、亢進しているオートファジーの正常化によって軽減することができなかった。

第4章 考察

本研究において作成した mKO マウスは、他の動物種におけるスタチン投与によるミオパチーモデルの報告[9,10,11]と同様に、アポトーシスを示唆する所見を呈さず、ネクローシスを支持する所見を呈しており、やはり HMGCR の機能低下による骨格筋障害は in vivo モデルと in vitro モデルにおいてその細胞死の様式が明確に異なると考えられた。また、既報の肝臓特異的 HMGCR ノックアウトマウス[14]では、アポトーシスにて肝細胞死が起きている事が報告されており、HMGCR の機能低下が発生する臓器によってもその細胞死の様式が異なっていることがわかっている。このように、実験系および臓器種別によって、HMGCR が果たす役割は異なると考えられるが、今回初めてマウスでのスタチンミオパチーモデルと言える、mKO マウスが作成できた。mKO マウスはスタチンの全身投与と異なり、血清脂質の低下がないことから、骨格筋のみの HMGCR の機能低下が筋障害において果たす役割を探求するのに有用なツールと考えられる。

mKO マウスにおいては、雄のマウスのみが 8 週齢以降死亡し、生存率が大幅に低下することが判明しているが、死亡直前の血清生化学・電解質・血糖データおよび心筋組織所見に異常はなく(未発表データ)、突然死というより衰弱死に近い数日間の死亡であることから、横隔膜の障害によるものを推定している。横隔膜は遅筋の一種であるが、実際には

雌雄ともに横隔膜の筋障害は発生しており、やはり雄のみが8週齢以降死亡する理由は不明であり、今後の検討課題の一つと考えられた。

mKO マウスの骨格筋においては、遊離コレステロール含有量が Ctrl マウスに比して予想と反して約2倍に増加していた。骨格筋細胞でのコレステロールの生合成は HMGCR のノックアウトにより遮断されていることから、mKO マウスで遺伝子発現が亢進している LDLR を介した、外部からのコレステロールの取り込み増加がその一因と推測された。しかし、外部からのコレステロール供給増加だけでは、Ctrl マウスと同程度の含有量にこそなりはすれど、逆に増加することは考えにくく、mKO マウスの骨格筋細胞内ではコレステロールの輸送・利用障害が存在することが推測された。mKO マウスでは MVA 下流の代謝産物(イソプレノイド)が不足していることが示唆された(Fig.3E)が、これにより影響を受けると推測される約60種類ある Rab 低分子量 G タンパク質の一群はトリグリセライドやコレステロールの輸送に深く関わることで知られている[34]。遊離コレステロール自体に細胞毒正があることが既に判明しているため[35]、mKO マウスでの遊離コレステロールの増加が骨格筋障害の一因となっていることも否定できず、mKO マウスの骨格筋における Rab 低分子量 G タンパク質の挙動および遊離コレステロールの輸送・利用メカニズムの探求は今後実施する必要があると考えられた。

mKO マウスの骨格筋障害は MVA の経口投与にて救済されたが、このことは MVA 下流の代謝産物の不足が、スタチン等 HMGCR の機能低下に伴う骨格筋障害の原因であるこ

とを *in vivo* でも証明する結果であった。今後 MVA の投与開始後、どの程度で筋障害の発生が停止するかを探ることにより、スタチンによる重症の横紋筋融解症症例において MVA の補充による治療が可能かどうかの手がかりを得られるものと考えられる。

以前よりスタチンによる筋障害とミトコンドリアの関連は報告されており、既報[36]にてヒトでのスタチンミオパチー症例で、骨格筋中のミトコンドリア DNA 量が減少していることが報告されている。このため、mKO マウスでミトコンドリア障害の有無について検討したが、ミトコンドリアの量および機能の低下、TEM 観察での形態異常を認め、明確に mKO マウスでミトコンドリア障害が存在することが示された。しかし、現在までにスタチンによるミトコンドリア障害のメカニズムはほとんど明らかになっていなかった[37]が、つい最近 *Cell Metabolism* 誌にて *in vitro* の実験系ではあるものの、ミトコンドリア呼吸鎖複合体Ⅲの機能阻害がスタチンミオパチーの一因であることが報告された[38]。本研究ではまずオートファジーに焦点を当てて解析を進めたが、今後 mKO マウス骨格筋にてミトコンドリア障害を来たすメカニズムの解析も実施する予定である。

mKO マウスでは TEM による観察にて空胞化線維の周囲に AG の増加を認め、またウエスタンブロットによる検討でもオートファジー関連蛋白である LC3 と p62 の増加を認めた。

ヒトにおけるスタチンミオパチーの臨床像については、アポトーシスではなくネクローシスによる筋障害、筋萎縮の存在、組織染色におけるミトコンドリア機能障害、筋線維内

の多数の空胞化を伴う点、血清 CK の上昇、等が報告されている[39]。これらは本研究で作成した mKO マウス骨格筋の組織染色・TEM 所見と酷似しており、この点からも mKO マウスはスタチンミオパチーのモデルマウスとして有用であると考えられた。他方、ヒトでのスタチンミオパチーにおけるオートファジーの評価についてはほとんど報告が見当たらなかった。

近年、オートファジー異常にてマウスの骨格筋障害を来たすとの報告が出てきており、オートファジーの亢進・オートファジーの上流での抑制・オートファジーの下流での分解障害のいずれにおいても骨格筋障害を来たすことがわかっている[40,41,42]。またスタチンとオートファジーの関連の報告が乏しいことから、オートファジーに焦点を当てて本研究では解析を進めた。

当初、mKO マウスにて p62 の増加を認めたため、Lys と AG の融合障害や AL の内部酸化障害などオートファジー下流での分解障害を想定していたが、蛍光画像により AG, Lys, p62 は正常に共局在し融合障害を認めず、colchicine を用いた LC3 turnover assay, GFP-LC3 cleavage assay, EP を用いて施行した tfLC3 レポーターassay のいずれの結果もオートファジーの亢進を示唆する所見であり、また Lys そのものの機能障害も mKO マウスにて認められなかったことから、最終的に mKO マウスではオートファジー (autophagy flux) は亢進しているとの結論に至った。ただし、既報[28]にあったような AL の turnover 延長による AL 増加の可能性については、mKO マウスの Lys 酵素活性が増加

していることから可能性は低いものの、現時点で直接 AL の turnover を評価できていないという問題が残っている。この点については、今後時間経過とともに蛍光特性が変化する Timer 蛍光蛋白[43]を Lys や AL に発現させて in vivo での turnover を直接評価する予定である。

mKO マウスでのオートファジー(autophagy flux)の亢進は、既報においては mTORC1 の機能抑制に伴うオートファジー亢進と報告[7,44]されているが、本研究により mKO マウスでは mTORC1 が活性化しオートファジーの抑制方向に働いており、Foxo3 がオートファジー亢進の主因子であることが明らかになった。mKO マウスではリン酸化 AMPK の増加も伴っていることから、ミトコンドリアの機能障害に伴う AMPK の活性化が Foxo3 の活性化を促し、オートファジーが亢進していることが示唆された。

また、既報[30]において in vitro の実験系でのスタチン投与により、リン酸化 PKD の低下を介した Beclin1-Vps34 複合体の機能低下が起き、AG と Lys の融合障害が発生し autophagy flux が障害されることが報告されているが、mKO マウスではいずれも蛋白レベルで Ctrl マウスに比して増加(Fig.12A)しており、この点も in vitro でのスタチン投与モデルと in vivo の mKO マウスでは autophagy に与える影響に違いがあることが示唆された。mKO マウスでの p62 の増加は、mKO マウスにおいて Lys の機能亢進、autophagy flux の亢進を伴っており、プロテアソーム系の分解障害もなかったことから、

やはり autophagy flux の障害ではなく、前述のとおり産生亢進によるものと考えられた [33].

Foxo3-DN の EP による過剰発現にて mKO マウスでのオートファジー亢進を Ctrl マウスと同程度のレベルにまで正常化することができたが、残念ながら最終的に筋障害の軽快をもたらすことはできなかった。この理由としては、mKO マウスにおける Foxo3 の活性化によるオートファジー亢進が骨格筋障害の主原因ではなく、別の現象に伴う結果を見ているものである可能性が考えられた。

スタチンによる骨格筋障害の原因やメカニズムとして、最近のレビューにおいてもやはり MVA 経路下流の代謝産物、特に FPP を含むその下流の代謝産物の不足がその原因であることが言われている [37,39]。FPP を含むその下流の代謝産物の不足によって、低分子量 G タンパク質のプレニル化が正常に行われなかったことによる細胞内のシグナル伝達および小胞輸送の障害・アポトーシスの惹起・蛋白合成障害、ミトコンドリア機能障害、細胞内コレステロールの低下による膜障害、等が骨格筋障害のメカニズムとして考えられている [37]。In vitro での阻害剤を用いたプレニル化の障害実験において、低分子量 G タンパク質のうち特に Rab の一群のみにおいて、他の低分子量 G タンパク質と異なりミトコンドリア障害によると思われる細胞内 ATP の低下を来すことから、Rab 低分子量 G タンパク質のプレニル化障害がスタチンによる筋毒性において重要な役割を果たしているのではと推測されている [45]。

これまでに報告されている *in vitro* 及び *in vivo* での研究結果と、本研究の実験結果をあわせて考察すると、mKO マウスの骨格筋においてはミトコンドリアの障害が第一に発生し、これによる ATP 産生低下、AMPK の活性化を通じて Foxo3 が活性化し、オートファジーが亢進しているという機序が考えられた。残念ながらオートファジーの正常化による、HMGCR 機能低下に伴う骨格筋障害の改善、というめざましい成果は得られなかったものの、*in vivo* における骨格筋での HMGCR 機能低下がオートファジーに与える影響ならびにオートファジーそのものが mKO マウスの骨格筋障害の原因と成りうるかどうかを明らかにすることができ、この点は本研究の成果であったと考える。

今後は mKO マウスの骨格筋における、Rab をはじめとする低分子量 G タンパク質の挙動を解析し、遊離コレステロールが増加しているメカニズムとこれが筋障害に与える影響を検討する。このために、現在 HMGCR と LDLR のダブルノックアウトマウスを作成中である。また、Cell Metabolism 誌の既報[38]においても、ミトコンドリア障害がスタチンとそれに伴う HMGCR 活性低下による筋毒性の主原因であることが示唆されており、mKO マウスにおいてもミトコンドリア障害が認められていることから、より詳細なミトコンドリアの機能評価とミトコンドリア障害のメカニズムの探求を行っていく予定である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり，御指導，御助言を賜りました筑波大学医学医療系内分泌代謝・糖尿病内科教授 島野仁 先生に深謝いたします。

筑波大学医学医療系内分泌代謝・糖尿病内科准教授 中川嘉 先生には実験操作から論文作成にわたり終始多大なるご指導・御協力を賜りました。心より御礼申し上げます。

筑波大学医学医療系神経内科講師 石井亜紀子 先生には，骨格筋の組織染色，筋病理の解析などの実験操作を含め，多大なるご指導・ご協力を賜りました。心より御礼申し上げます。

首都大学東京運動分子生物学研究室教授 藤井宣晴 先生にはエレクトロポレーションの実験手法につきまして，多大なるご指導を賜りました。心より御礼申し上げます。

また，日頃の実験において多大なる御協力，御支援を頂いた筑波大学医学医療系内分泌代謝・糖尿病内科研究室の方々に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり，尊い命を捧げてくださいました実験動物達の冥福を心よりお祈りいたします。

最後になりましたが，私生活ならびに研究室外活動を支えていただいた親族，先輩，友人，後輩の方々に心より御礼申し上げます。

引用文献

- [1] Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S), *Lancet*, 344 (1994) 1383-1389.
- [2] J.L. Goldstein, M.S. Brown, Regulation of the mevalonate pathway, *Nature*, 343 (1990) 425-430.
- [3] P.D. Thompson, P. Clarkson, R.H. Karas, Statin-associated myopathy, *JAMA*, 289 (2003) 1681-1690.
- [4] E. Bruckert, G. Hayem, S. Dejager, C. Yau, B. Begaud, Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients--the PRIMO study, *Cardiovasc Drugs Ther*, 19 (2005) 403-414.
- [5] K. Ohashi, J. Osuga, R. Tozawa, T. Kitamine, H. Yagyu, M. Sekiya, S. Tomita, H. Okazaki, Y. Tamura, N. Yahagi, Y. Iizuka, K. Harada, T. Gotoda, H. Shimano, N. Yamada, S. Ishibashi, Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase gene, *J Biol Chem*, 278 (2003) 42936-42941.
- [6] T.E. Johnson, X. Zhang, K.B. Bleicher, G. Dysart, A.F. Loughlin, W.H. Schaefer, D.R. Umbenhauer, Statins induce apoptosis in rat and human myotube cultures by inhibiting protein geranylgeranylation but not ubiquinone, *Toxicol Appl Pharmacol*, 200 (2004) 237-250.
- [7] M. Araki, M. Maeda, K. Motojima, Hydrophobic statins induce autophagy and cell death in human rhabdomyosarcoma cells by depleting geranylgeranyl diphosphate, *Eur J Pharmacol*, 674 (2012) 95-103.
- [8] P. Cao, J. Hanai, P. Tanksale, S. Imamura, V.P. Sukhatme, S.H. Lecker, Statin-induced muscle damage and atrogen-1 induction is the result of a geranylgeranylation defect, *FASEB J*, 23 (2009) 2844-2854.
- [9] K. Nakahara, M. Kuriyama, Y. Sonoda, H. Yoshidome, H. Nakagawa, J. Fujiyama, I. Higuchi, M. Osame, Myopathy induced by HMG-CoA reductase inhibitors in rabbits: a pathological, electrophysiological, and biochemical study, *Toxicol Appl Pharmacol*, 152 (1998) 99-106.
- [10] F.R. Westwood, A. Bigley, K. Randall, A.M. Marsden, R.C. Scott, Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution, development, and fibre selectivity, *Toxicol Pathol*, 33 (2005) 246-257.
- [11] A. Chucrallah, U. De Girolami, R. Freeman, M. Federman, Lovastatin/gemfibrozil myopathy: a clinical, histochemical, and ultrastructural study, *Eur Neurol*, 32 (1992) 293-296.
- [12] B.M. Meador, K.A. Huey, Statin-associated changes in skeletal muscle function and

- stress response after novel or accustomed exercise, *Muscle Nerve*, 44 (2011) 882-889.
- [13] A. Muraki, K. Miyashita, M. Mitsuishi, M. Tamaki, K. Tanaka, H. Itoh, Coenzyme Q10 reverses mitochondrial dysfunction in atorvastatin-treated mice and increases exercise endurance, *J Appl Physiol* (1985), 113 (2012) 479-486.
 - [14] S. Nagashima, H. Yagyu, K. Ohashi, F. Tazoe, M. Takahashi, T. Ohshiro, T. Bayasgalan, K. Okada, M. Sekiya, J. Osuga, S. Ishibashi, Liver-specific deletion of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase causes hepatic steatosis and death, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32 (2012) 1824-1831.
 - [15] P. Miniou, D. Tiziano, T. Frugier, N. Roblot, M. Le Meur, J. Melki, Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage, *Nucleic Acids Res*, 27 (1999) e27.
 - [16] N. Mizushima, A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori, Y. Ohsumi, In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker, *Mol Biol Cell*, 15 (2004) 1101-1111.
 - [17] Z. Arany, N. Lebrasseur, C. Morris, E. Smith, W. Yang, Y. Ma, S. Chin, B.M. Spiegelman, The transcriptional coactivator PGC-1 β drives the formation of oxidative type IIX fibers in skeletal muscle, *Cell Metab*, 5 (2007) 35-46.
 - [18] V. Brussee, F. Tardif, J.P. Tremblay, Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice, *Neuromuscul Disord*, 7 (1997) 487-492.
 - [19] H. Aihara, J. Miyazaki, Gene transfer into muscle by electroporation in vivo, *Nat Biotechnol*, 16 (1998) 867-870.
 - [20] G.A. Finlay, A.J. Malhowski, Y. Liu, B.L. Fanburg, D.J. Kwiatkowski, D. Toksoz, Selective inhibition of growth of tuberous sclerosis complex 2 null cells by atorvastatin is associated with impaired Rheb and Rho GTPase function and reduced mTOR/S6 kinase activity, *Cancer Res*, 67 (2007) 9878-9886.
 - [21] K. Takahashi, M. Nakagawa, S.G. Young, S. Yamanaka, Differential membrane localization of ERas and Rheb, two Ras-related proteins involved in the phosphatidylinositol 3-kinase/mTOR pathway, *J Biol Chem*, 280 (2005) 32768-32774.
 - [22] S. Lokireddy, I.W. Wijesoma, S. Teng, S. Bonala, P.D. Gluckman, C. McFarlane, M. Sharma, R. Kambadur, The ubiquitin ligase Mub1 induces mitophagy in skeletal muscle in response to muscle-wasting stimuli, *Cell Metab*, 16 (2012) 613-624.
 - [23] C. Mammucari, G. Milan, V. Romanello, E. Masiero, R. Rudolf, P. Del Piccolo, S.J. Burden, R. Di Lisi, C. Sandri, J. Zhao, A.L. Goldberg, S. Schiaffino, M. Sandri, FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo, *Cell Metab*, 6 (2007) 458-471.
 - [24] J.S. Ju, A.S. Varadhachary, S.E. Miller, C.C. Weihl, Quantitation of "autophagic flux" in mature skeletal muscle, *Autophagy*, 6 (2010) 929-935.
 - [25] H.M. Ni, A. Bockus, A.L. Wozniak, K. Jones, S. Weinman, X.M. Yin, W.X. Ding,

- Dissecting the dynamic turnover of GFP-LC3 in the autolysosome, *Autophagy*, 7 (2011) 188-204.
- [26] S. Kimura, T. Noda, T. Yoshimori, Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3, *Autophagy*, 3 (2007) 452-460.
- [27] M.S. Brown, J.L. Goldstein, The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor, *Cell*, 89 (1997) 331-340.
- [28] P. Low, A. Varga, K. Piracs, P. Nagy, Z. Szatmari, M. Sass, G. Juhasz, Impaired proteasomal degradation enhances autophagy via hypoxia signaling in *Drosophila*, *BMC Cell Biol*, 14 (2013) 29.
- [29] B.A. Neel, Y. Lin, J.E. Pessin, Skeletal muscle autophagy: a new metabolic regulator, *Trends Endocrinol Metab*, 24 (2013) 635-643.
- [30] P. Zhang, M.A. Verity, K. Reue, Lipin-1 regulates autophagy clearance and intersects with statin drug effects in skeletal muscle, *Cell Metab*, 20 (2014) 267-279.
- [31] M.J. Elrick, T. Yu, C. Chung, A.P. Lieberman, Impaired proteolysis underlies autophagic dysfunction in Niemann-Pick type C disease, *Hum Mol Genet*, 21 (2012) 4876-4887.
- [32] N. Mizushima, T. Yoshimori, B. Levine, *Methods in mammalian autophagy research*, *Cell*, 140 (2010) 313-326.
- [33] M.H. Sahani, E. Itakura, N. Mizushima, Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids, *Autophagy*, 10 (2014) 431-441.
- [34] R.S. Kiss, T. Nilsson, Rab proteins implicated in lipid storage and mobilization, *J Biomed Res*, 28 (2014) 169-177.
- [35] G.J. Warner, G. Stoudt, M. Bamberger, W.J. Johnson, G.H. Rothblat, Cell toxicity induced by inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase and accumulation of unesterified cholesterol, *J Biol Chem*, 270 (1995) 5772-5778.
- [36] H.A. Stringer, G.K. Sohi, J.A. Maguire, H.C. Cote, Decreased skeletal muscle mitochondrial DNA in patients with statin-induced myopathy, *J Neurol Sci*, 325 (2013) 142-147.
- [37] E.S. Stroes, P.D. Thompson, A. Corsini, G.D. Vladutiu, F.J. Raal, K.K. Ray, M. Roden, E. Stein, L. Tokgozoglu, B.G. Nordestgaard, E. Bruckert, G. De Backer, R.M. Krauss, U. Laufs, R.D. Santos, R.A. Hegele, G.K. Hovingh, L.A. Leiter, F. Mach, W. Marz, C.B. Newman, O. Wiklund, T.A. Jacobson, A.L. Catapano, M.J. Chapman, H.N. Ginsberg, P. European Atherosclerosis Society Consensus, Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management, *Eur Heart J*, 36 (2015) 1012-1022.

- [38] T.J.J. Schirris, G.H. Renkema, T. Ritschel, N.C. Voermans, A. Bilos, B.G.M.v. Engelen, U. Brandt, W.J.H. Koopman, J.D. Beyrath, R.J. Rodenburg, P.H.G.M. Willems, J.A.M. Smeitink, F.G.M. Russel, Statin-Induced Myopathy Is Associated with Mitochondrial Complex III Inhibition, *Cell Metab*, 22 (2015) 399-407.
- [39] D.A. Taha, C.H. De Moor, D.A. Barrett, P. Gershkovich, Translational insight into statin-induced muscle toxicity: from cell culture to clinical studies, *Transl Res*, 164 (2014) 85-109.
- [40] C.F. Bentzinger, K. Romanino, D. Cloetta, S. Lin, J.B. Mascarenhas, F. Oliveri, J. Xia, E. Casanova, C.F. Costa, M. Brink, F. Zorzato, M.N. Hall, M.A. Ruegg, Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy, *Cell Metab*, 8 (2008) 411-424.
- [41] P. Castets, S. Lin, N. Rion, S. Di Fulvio, K. Romanino, M. Guridi, S. Frank, L.A. Tintignac, M. Sinnreich, M.A. Ruegg, Sustained activation of mTORC1 in skeletal muscle inhibits constitutive and starvation-induced autophagy and causes a severe, late-onset myopathy, *Cell Metab*, 17 (2013) 731-744.
- [42] I. Nemazanyy, B. Blaauw, C. Paolini, C. Caillaud, F. Protasi, A. Mueller, T. Proikas-Cezanne, R.C. Russell, K.L. Guan, I. Nishino, M. Sandri, M. Pende, G. Panasyuk, Defects of Vps15 in skeletal muscles lead to autophagic vacuolar myopathy and lysosomal disease, *EMBO Mol Med*, 5 (2013) 870-890.
- [43] R.C. Laker, P. Xu, K.A. Ryall, A. Sujkowski, B.M. Kenwood, K.H. Chain, M. Zhang, M.A. Royal, K.L. Hoehn, M. Driscoll, P.N. Adler, R.J. Wessells, J.J. Saucerman, Z. Yan, A novel MitoTimer reporter gene for mitochondrial content, structure, stress, and damage in vivo, *J Biol Chem*, 289 (2014) 12005-12015.
- [44] Y.M. Wei, X. Li, M. Xu, J.M. Abais, Y. Chen, C.R. Riebling, K.M. Boini, P.L. Li, Y. Zhang, Enhancement of autophagy by simvastatin through inhibition of Rac1-mTOR signaling pathway in coronary arterial myocytes, *Cell Physiol Biochem*, 31 (2013) 925-937.
- [45] K. Sakamoto, J. Kimura, Mechanism of statin-induced rhabdomyolysis, *J Pharmacol Sci*, 123 (2013) 289-294.

図表

表 1 Real-time PCR Primer 一覧

<i>gene</i>	Primer (forward)	Primer (reverse)
<i>HMGCR</i>	CGTCATTCATTTCTCGACAAA	AGCAGAAAAAAGGGCAAAGCT
<i>LDLR</i>	TGGAGGATGAGAACCGGCT	GCACTGAAAATGGCTTCGTTTA
<i>HMGCS</i>	AACTGGTGCAGAAATCTCTAGC	GGTTGAATAGCTCAGAACTAGCC
<i>SREBP-1a</i>	AGGCGGCTCTGGAACAGA	TCAAAACCGCTGTGTCCAGTT
<i>SREBP-1c</i>	CGGCGCGGAAGCTGT	TGCAATCCATGGCTCCGT
<i>SREBP-2</i>	CTGCAGCCTCAAGTGCAAAG	CAGTGTGCCATTGGCTGTCT
<i>Atrogin1</i>	CTCTGTACCATGCCGTTCTT	GGCTGCTGAACAGATTCTCC
<i>Murf</i>	ACCTGCTGGTGGAACATC	AGGAGCAAGTAGGCACCTCA
<i>Map1lc3b</i>	CACTGCTCTGTCTTGTGTAGGTTG	TCGTTGTGCCTTTATTAGTGCATC
<i>p62</i>	GCTCAGGAGGAGACGATGAC	AGAAACCCATGGACAGCATC

表 2 蛍光免疫染色で使用した一次抗体 一覧

Cat.No.	製造会社	抗体名
NCL-DYS2	Leica	Mouse Monoclonal Antibody Dystrophin(C-terminus)
#9661	CST	Cleaved Caspase3 (Asp175) Antibody
PM045	MBL	Anti-p62/SQSTM1
#3936	CST	Ubiquitin (P4D1) Mouse mAb
Ab13524	Abcam	Anti-LAMP2 antibody [GL2A7]

表 3 ウェスタンブロットにて使用した一次抗体 一覧

Cat.No.	製造会社	抗体名
#9542	CST	PARP antibody
sc-7148	Santa Cruz	Caspase-3 (H-277)
#9661	CST	Cleaved Caspase3 (Asp175) Antibody
sc-47724	Santa Cruz	GAPDH (0411)
sc-11415	Santa Cruz	Tom20(FL-145)
#5536	CST	Phospho-mTOR(Ser2448)(D9C2) XP Rabbit mAb
#2983	CST	mTOR(7C10) Rabbit mAb
#8540	CST	Atg5(D1G9) Rabbit mAb
#8558	CST	Atg7(D12B11) Rabbit mAb
#9205	CST	Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) Antibody
#4858	CST	Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E) XP Rabbit mAb
#2217	CST	S6 Ribosomal Protein(5G10) Rabbit mAb
ABL-93	DSHB	LAMP-2 Rat Antibody
#2775	CST	LC3B Antibody
GP62-C	PROGEN	Pab to p62 Protein, C-terminal specific
#04-263	MILLIPORE	Anti-Ubiquitinated proteins, clone FK2
#9464	CST	Phospho-FoxO1(Thr24)/Foxo3a(Thr32) Antibody
#2497	CST	Foxo3a(75D8) Rabbit mAb
B7931	Sigma	Monoclonal Anti-BNIP3 antibody produced in mouse
#2535	CST	Phospho-AMPK α (Thr172)(40H9) Rabbit mAb
#2532	CST	AMPK α Antibody
#6887	CST	Phospho-ULK1(Ser317) Antibody
#2956	CST	GFP(D5.1) XP Rabbit mAb
#2054	CST	Phospho-PKD/PKC μ (Ser744/748) Antibody
#3358	CST	PI3 Kinase Class III(D4E2) Rabbit mAb
#3495	CST	Beclin-1(D40C5) Rabbit mAb
AF1515	R&D Systems	Mouse Cathepsin L Antibody
#5466	CST	RagC(D31G9) XP Rabbit mAb

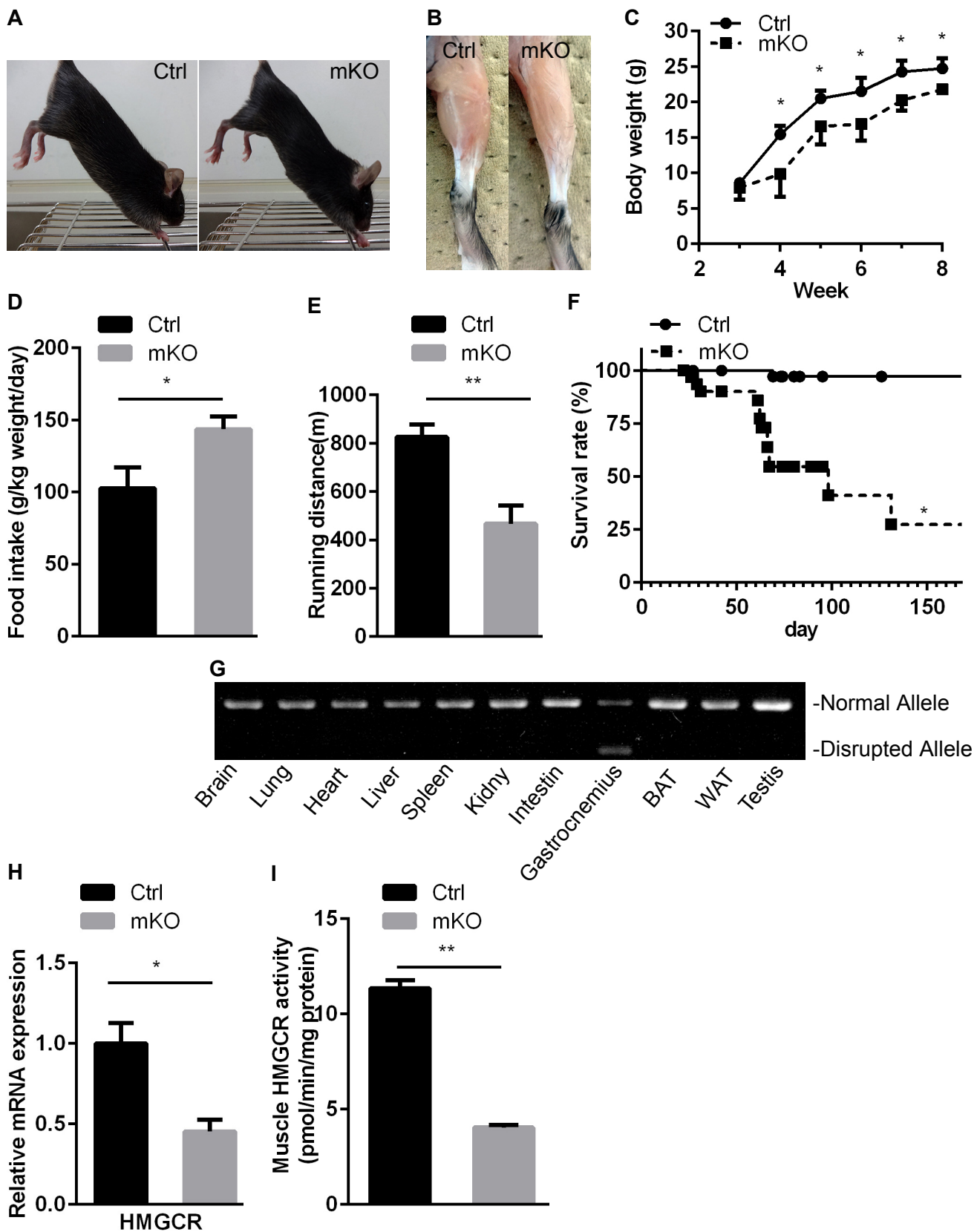


図1 骨格筋特異的 HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR) ノックアウト (mKO) マウスの作成と表現型
 (A) マウスの全身像 (B) マウスの腓腹筋像 (C) 3-8 週齢にかけてのマウスの体重推移 (n=6)
 (D) マウスの摂餌量 (n=6) (E) マウスのトレッドミルによる持久力テスト (n=5)
 (F) マウスの生存曲線 (n;Ctrl=48,mKO=36) (G)mKO マウスの各臓器における PCR での HMGCR mRNA
 disrupted allele の検出 (H) 骨格筋における HMGCR の遺伝子発現. mRNA は腓腹筋から抽出した (n=4)
 (I) マウス腓腹筋から抽出したミクロソームにおける HMGCR の酵素活性 (n=5)
 データは平均値 ± 標準誤差で示した. *P<0.05; **P<0.01; ns, nonsignificant.

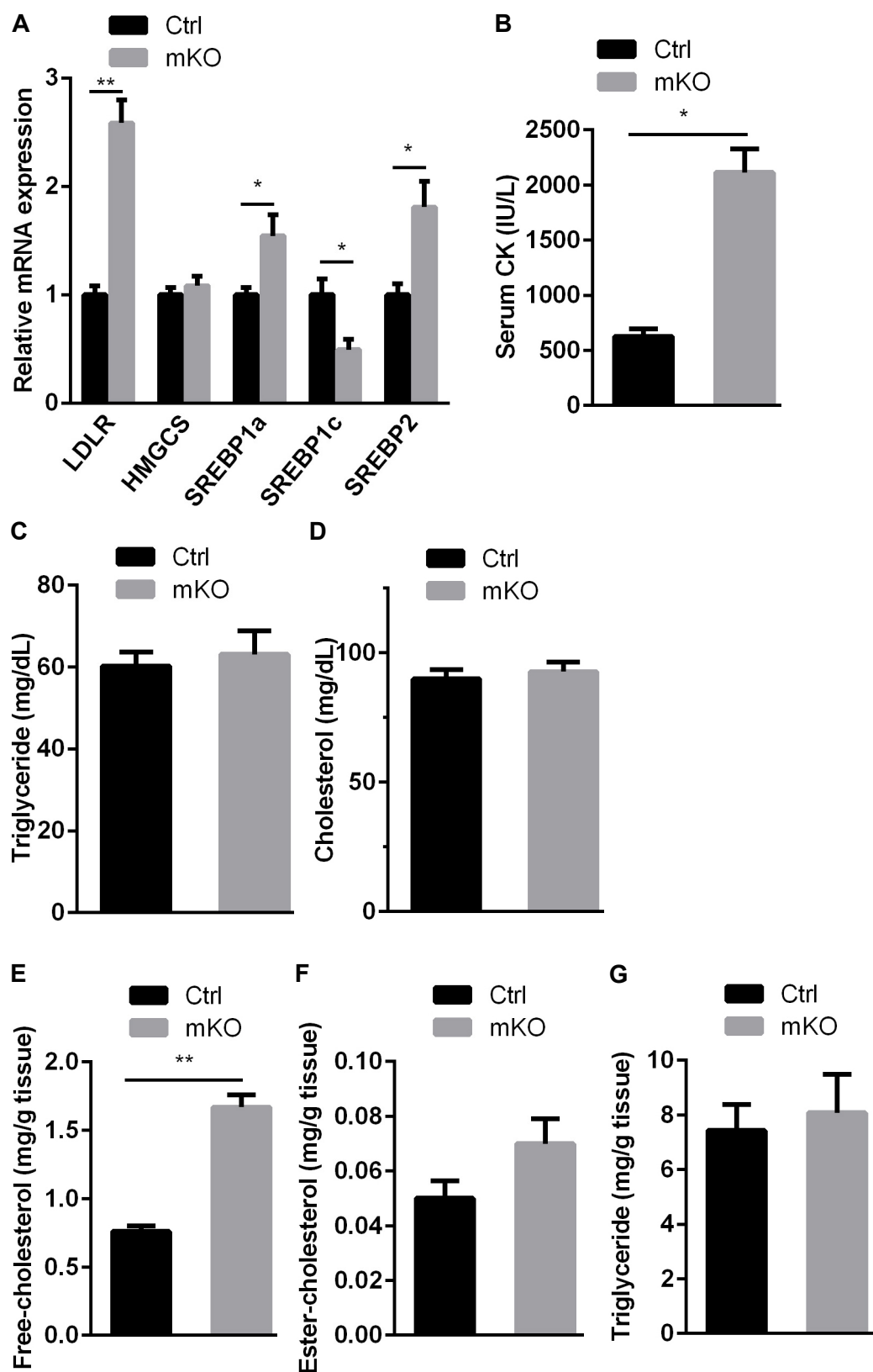


図2 骨格筋における HMGCR のノックアウトが脂質代謝に及ぼす影響

(A) 脂質代謝関連遺伝子の発現. mRNA は腓腹筋から抽出した (n=4)

(B) 血清クレアチンキナーゼ (CK) 濃度 (n=4)

(C) (D) 血清中のトリグリセライド及びコレステロール濃度 (n=4)

(E) (F) (G) 骨格筋中の遊離型コレステロール, エステル型コレステロール, トリグリセライド含有量.

脂質はいずれも腓腹筋組織から抽出した (n=4)

データは平均値 ± 標準誤差で示した. *P<0.05; **P<0.01; ns, nonsignificant.

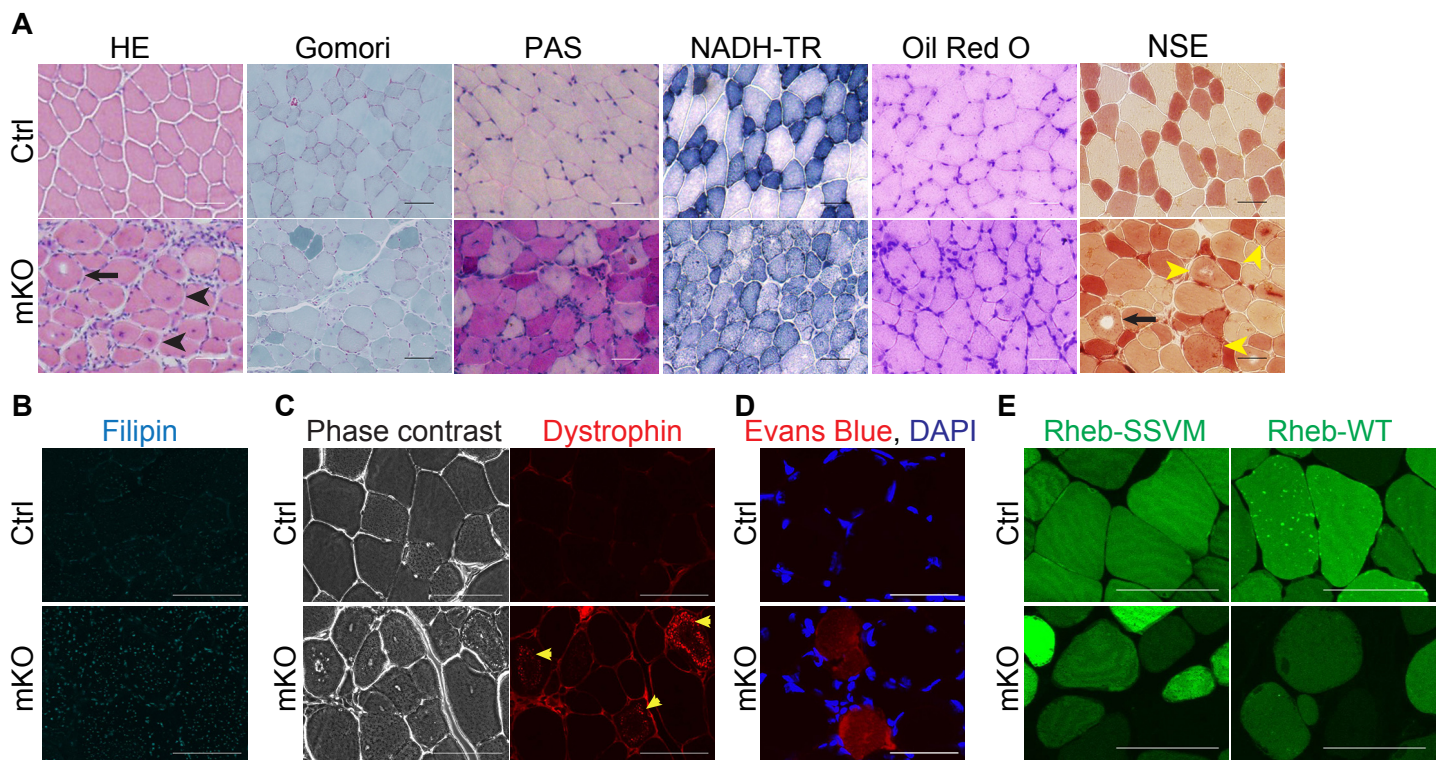


図3 骨格筋における HMGCR のノックアウトにより，空胞化や壊死を伴うミオパチー，ミトコンドリア機能の低下，ライソゾームの異常，筋中遊離コレステロールの増加を認める

(A) 前脛骨筋の組織染色．HE, Gomori, PAS, NADH-TR, Oil Red O, NSE 染色を実施．mKO マウスで空胞化筋線維（黒矢印），中心核を伴う再生線維（黒矢頭），PAS でのグリコーゲン蓄積，NADH-TR でのミトコンドリア機能低下，ライソゾーム酵素の増加（黄矢頭）を認める．Scale Bar=50 μ m (B) Filipin 染色により，mKO マウスで筋中遊離コレステロールの増加を認める．Scale Bar=50 μ m (C) ジストロフィン染色にて mKO マウスでジストロフィンの細胞質内蓄積（黄矢頭）を認める．Scale Bar=50 μ m (D) Evans Blue dye 摂取試験にて，細胞膜損傷や壊死を示す筋線維の赤色染色を認める．Scale Bar=50 μ m (E) Rheb-WT-GFP の前脛骨筋へのエレクトロポレーション (EP) によるプレニル化の評価．Rheb-SSVM-GFP はプレニル化が不可能な変異 Rheb であり陰性コントロールとして使用．Rheb-WT-GFP において，Ctrl では Rheb のプレニル化を示す GFP 蛍光のドットがみられるが，mKO では減少しておりプレニル化の低下が示唆される．プラスミドを EP 後 12 日目に評価．Scale Bar=50 μ m

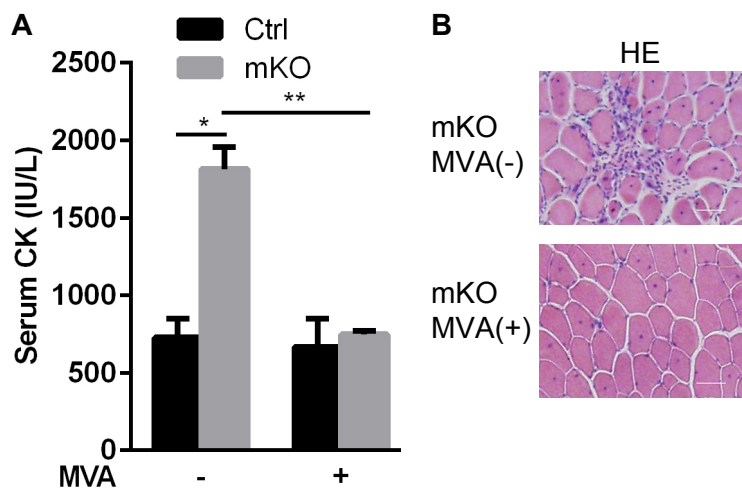


図4 メバロン酸 (MVA) を用いた、骨格筋特異的 HMGCR のノックアウトにより生じる筋障害の救済実験
 (A) 生理食塩水 (MVA-) もしくは MVA 200mg/kg/ 日 (MVA+) を4週間連日投与した後の血清 CK 濃度 (n=4)
 (B) (A) と同条件にて採取した9週齢のマウスの前脛骨筋の HE 染色. Scale Bar=50 μ m
 データは平均値 \pm 標準誤差で示した. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns, nonsignificant.

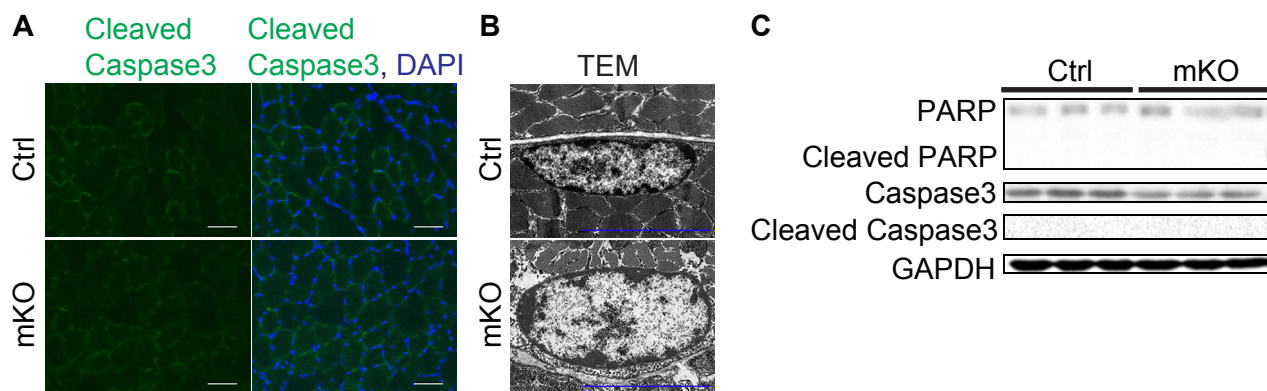


図 5 骨格筋特異的 HMGR ノックアウト (mKO) マウスの骨格筋ではアポトーシスを認めず

(A) cleaved caspase 3 抗体を用いた前脛骨筋の蛍光免疫染色. mKO マウスにて陽性筋線維は認めず.

Scale Bar=50 μ m

(B) 電子顕微鏡 (TEM) による前脛骨筋線維核の評価. mKO マウスにて核の断片化は認めず. Scale Bar=5 μ m

(C) ウェスタンブロットによる, アポトーシス実行因子 cleaved caspase3 とその標的である PARP の cleavage 評価. Ctrl, mKO とともに caspase3 と PARP の活性化は認めず. 蛋白は腓腹筋から抽出した

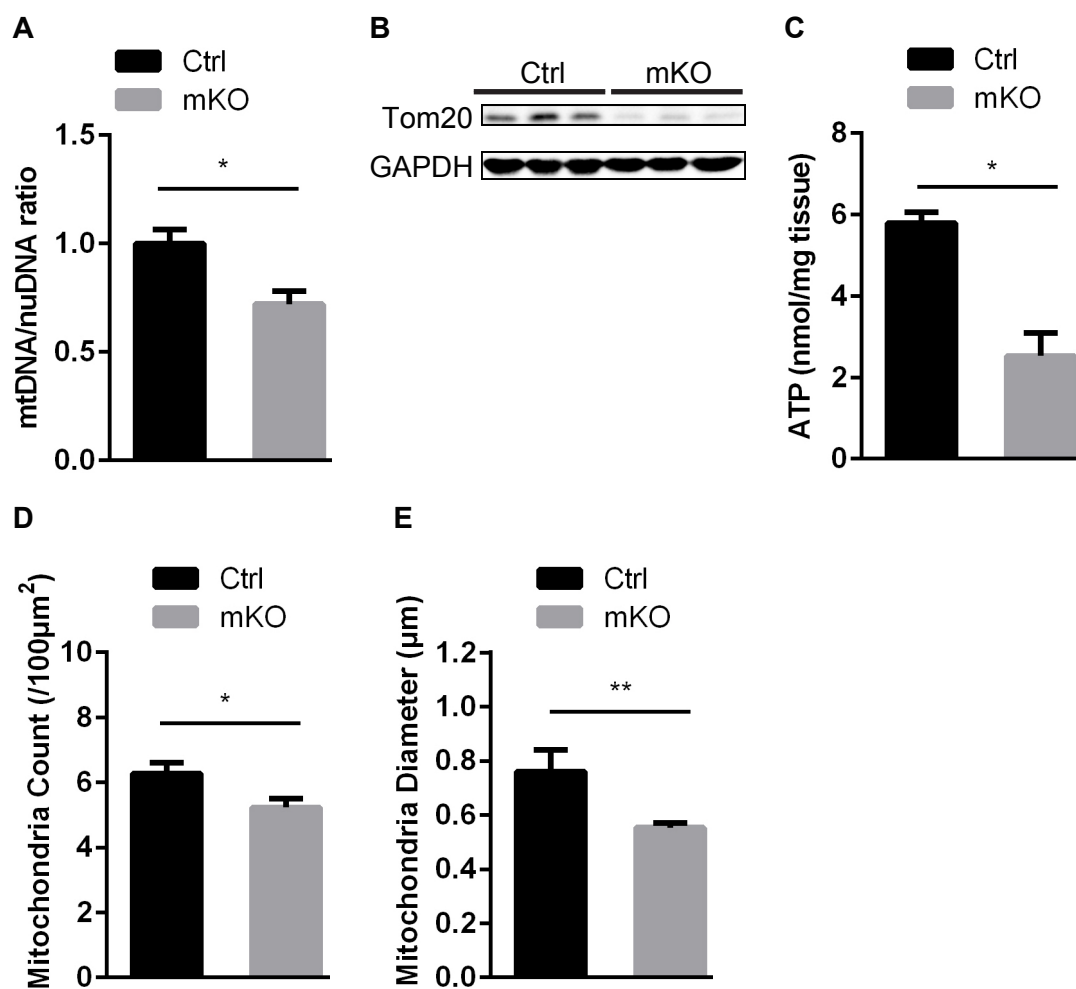


図6 骨格筋特異的 HMGR ノックアウト (mKO) マウスではミトコンドリア機能の低下を認める

(A)PCR による腓腹筋中のミトコンドリア DNA 量の評価 (n=4) (B) ミトコンドリア膜蛋白 Tom20 抗体を用いたウェスタンブロットによる、ミトコンドリア量の評価. 蛋白は腓腹筋から抽出した (C) マウス腓腹筋中の ATP 量の評価 (n=4) (D) 電子顕微鏡によるミトコンドリア数およびミトコンドリア最大径の評価 (n=6) データは平均値 \pm 標準誤差で示した. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns, nonsignificant.

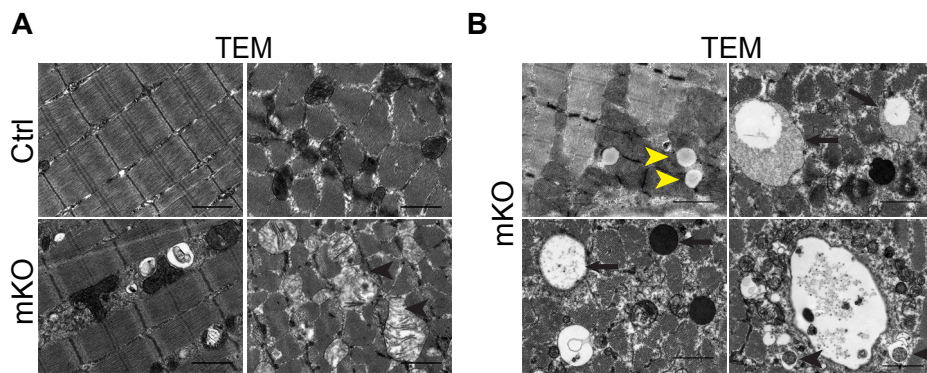


図7 骨格筋特異的 HMGCR ノックアウト (mKO) マウスでは電子顕微鏡 (TEM) にて脂質蓄積, ミトコンドリア異常, 筋線維の空胞化とオートファゴソーム (AG) の増加を認める

(A) TEM によるマウス前脛骨筋の縦断面 (左側), 横断面 (右側) 図. ミトコンドリアの形態異常 (黒矢頭) を認める. Scale Bar=1μm

(B) TEM による mKO マウス前脛骨筋の横断面図. Lipid droplets (黄矢頭), 空胞化と周囲の AG (黒矢頭) の増加を認める. 他に膨化した構造物や密度の高い構造物 (黒矢印) を認めるがいずれも同定ができていない. Scale Bar=1μm

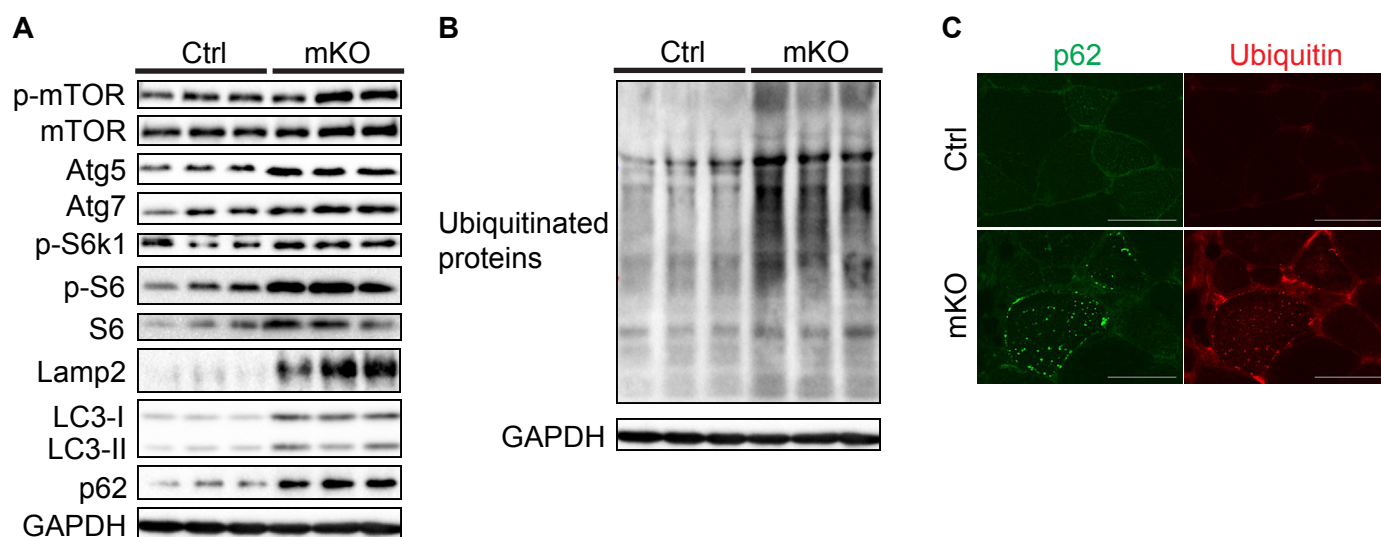


図 8 骨格筋特異的 HMGR ノックアウト (mKO) マウスの筋肉ではオートファジーの異常を認める

(A) オートファジー関連蛋白の抗体を用いたウェスタンブロット. S6, p-S6 の増加から mTORC1 の機能の活性化が示唆される. mKO マウスにおいて LC3 と p62 の増加があり, オートファジーの異常を認める.

蛋白は腓腹筋から抽出した (B) 抗ユビキチン化蛋白抗体を用いたウェスタンブロットによるユビキチン化蛋白の評価. 蛋白は腓腹筋から抽出した (C) p62 抗体と Ubiquitin 抗体を用いた, 前脛骨筋の蛍光免疫染色. mKO マウスでは筋肉中の p62 の増加を認める. Scale Bar=50μm

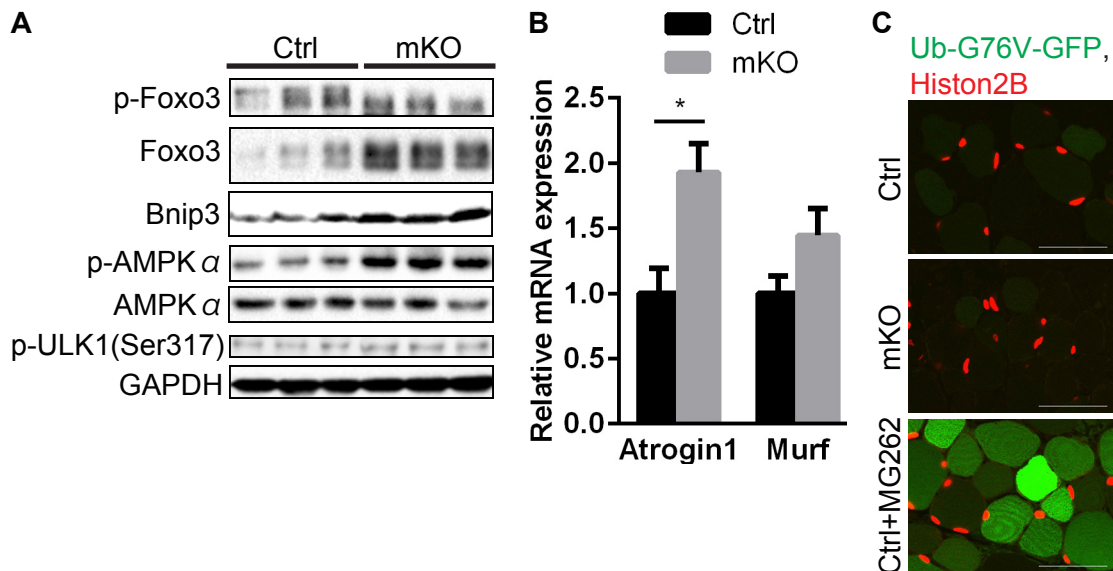


図9 骨格筋特異的 HMGCR ノックアウト (mKO) マウスでは Foxo3 とプロテアソーム系の活性化を認める

(A) オートファジーの上流制御因子である ULK1 と Foxo3 のウエスタンブロットによる評価. p-ULK1 の増加はなく, 活性化 (非リン酸化) Foxo3 の増加と下流のエフェクターである Bnip3 の増加を認める. 蛋白は腓腹筋から抽出した (B) ユビキチン-プロテアソーム系関連遺伝子の発現. mRNA は腓腹筋から抽出した (n=4)

(C) ユビキチン-プロテアソーム系による分解にて GFP が消光する「Ub-G76V-GFP」プラスミドを前脛骨筋へのエレクトロポレーション (EP) にて発現させ, ユビキチン-プロテアソーム系による分解活性を評価. Ctrl および mKO マウスにて GFP が消光しており, 分解活性の低下は認めず. 下段は MG262 投与によりユビキチン-プロテアソーム系の分解活性を阻害したポジティブコントロール. プラスミドを EP 後 14 日目に評価. Scale Bar=50 μ m

データは平均値 \pm 標準誤差で示した. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns, nonsignificant.

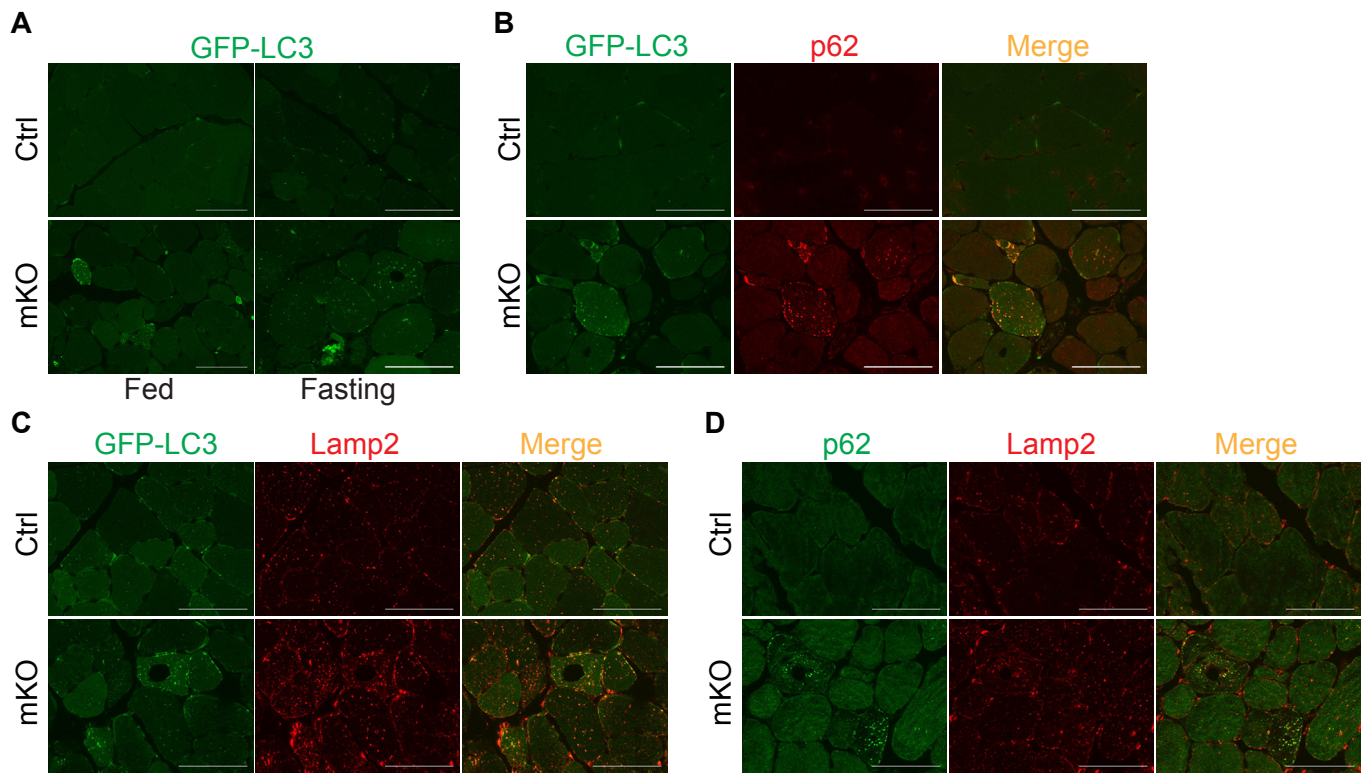


図 10 骨格筋特異的 HMGCR ノックアウト (mKO) マウスでは、オートファゴソーム (AG), ライソゾーム (Lys), p62 の増加を認め、いずれも相互に共局在している

(A) 前脛骨筋の蛍光画像. AG を示す GFP-LC3 ドットは Fed, Fasting いずれの状態においても mKO マウスで増加している. Scale Bar=50μm (B) GFP-LC3 と p62 の蛍光免疫染色による共局在の評価. mKO マウスにおいて AG と p62 は共局在できている. Scale Bar=50μm (C) GFP-LC3 と Lamp2 の蛍光免疫染色による共局在の評価. mKO マウスにおいて AG と Lamp2 の示す Lys は共局在できている. mKO マウスにて Lys の増加を認める. Scale Bar=50μm (D) p62 と Lamp2 の二重蛍光免疫染色による共局在の評価. mKO マウスにおいて p62 と Lys は共局在できている. Scale Bar=50μm

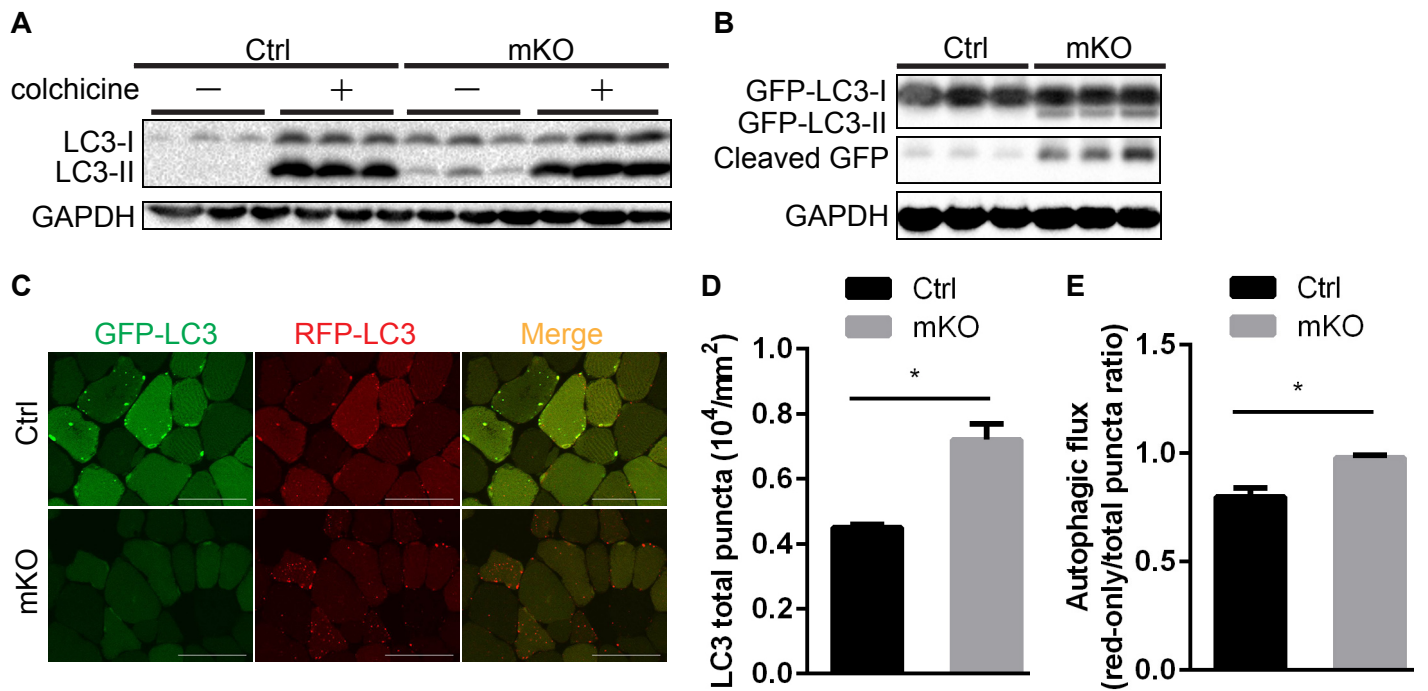


図 11 骨格筋特異的 HMGCR ノックアウト (mKO) マウスではオートファジー (autophagy flux) の亢進を認める (A) colchicine の投与による LC3 turnover assay. colchicine 投与にて Ctrl マウス同様に mKO マウスでも LC3-II の増加を認める. mKO マウスの骨格筋において、オートファジーの上流での抑制や下流での分解障害はないことが示唆される. 蛋白は腓腹筋から抽出した. 摂餌状態 ;Fed (B) GFP-LC3 トランスジーンを発現させて行った GFP-LC3 cleavage assay. mKO マウスでは GFP-LC3 の分解産物である cleaved GFP が増加しており、オートファジーの亢進を示唆する. 蛋白は腓腹筋から抽出した. 摂餌状態 ;Fed (C) (D) (E) RFP-GFP-LC3 (tfLC3) プラスミドを前脛骨筋へエレクトロポレーション (EP) にて発現させ、蛍光観察. Ctrl では GFP(+), RFP(+) のオートファゴソーム (AG) を多く認めるが, mKO では GFP(-), RFP(+) のオートライソゾーム (AL) を多く認める. mKO における AG とライソゾームの融合および AL の内部酸性化の亢進を示唆する. プラスミドを EP 後 14 日目に評価. Scale Bar=50 μm (D) (E) は (C) での蛍光画像を定量化したもの (n=10) データは平均値 \pm 標準誤差で示した. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; ns, nonsignificant.

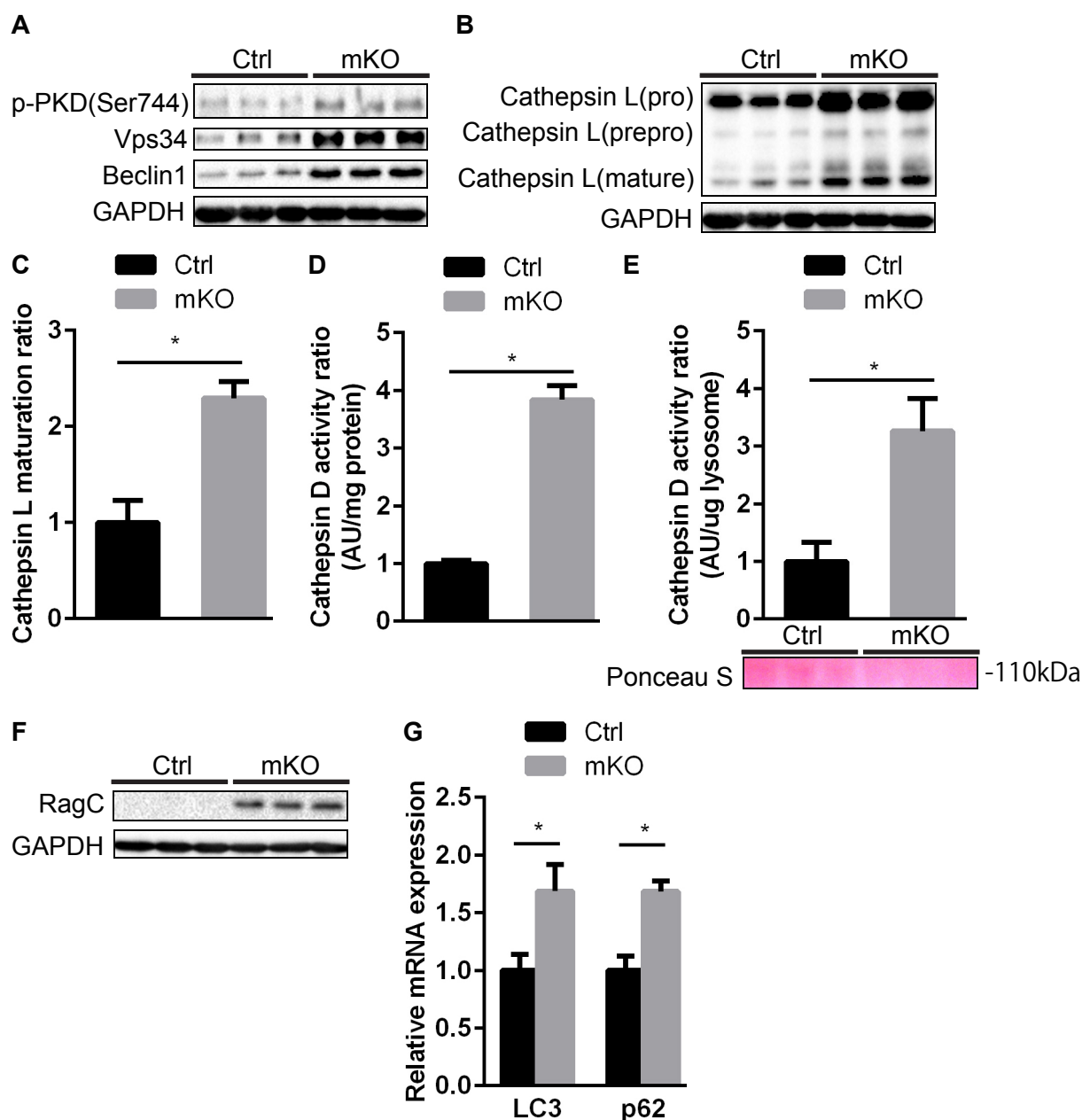


図 12 骨格筋特異的 HMGCR ノックアウト (mKO) マウスではライソゾーム (Lys) の機能亢進を認める (A) ウェスタンブロットによる, Beclin1-PI3Kc3 (Vps34) 複合体の機能評価. 蛋白は腓腹筋から抽出した (B) (C) ウェスタンブロットによる, Lys 酵素 cathepsin L の評価. mKO にて matured 型の cathepsin L の増加を認め, Lys の機能亢進を示唆する. 蛋白は腓腹筋から抽出した (n=3) (D) 骨格筋中の cathepsin D 活性の評価. 蛋白は腓腹筋から抽出し, 抽出蛋白中の cathepsin D 活性をキットで測定した (n=4) (E) キットにて単離した Lys 中の cathepsin D 活性の評価. Lys は腓腹筋より単離し, Ctrl, mKO とともに同量の単離した Lys 中の cathepsin D 活性を測定した (n=3). 下段に Lys 量の確認のため, 測定に用いた単離 Lys の Ponceau S 染色 (Lys 分子量 110kDa 付近) を示した (F) ウェスタンブロットによる, RagC 蛋白量の評価. 蛋白は腓腹筋から抽出した (G) LC3 と p62 の遺伝子発現. mRNA は腓腹筋から抽出した (n=4) データは平均値 \pm 標準誤差で示した. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns, nonsignificant.

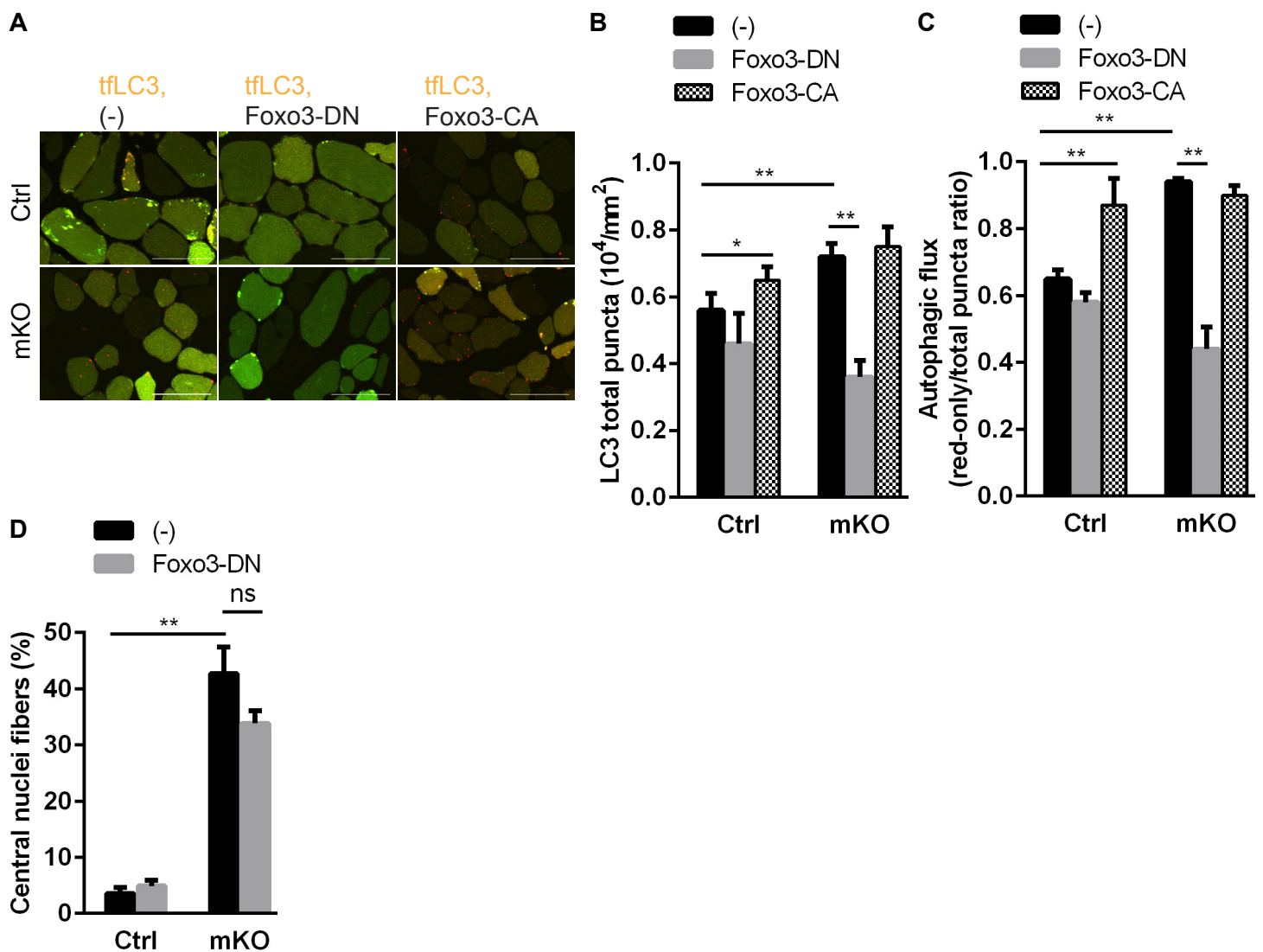


図 13 骨格筋特異的 HMGCR ノックアウト (mKO) マウスの筋障害は、Foxo3-DN を用いた EP による亢進したオートファジーの正常化では軽快を認めず

(A) (B) (C) RFP-GFP-LC3 (tflLC3), ドミナントネガティブ型 Foxo3 (Foxo3-DN), 持続活性化型 Foxo3 (Foxo3-CA) を前脛骨筋へのエレクトロポレーション (EP) にて発現させ観察. mKO マウスにおいて, Foxo3-DN の EP で GFP(+), RFP(+) のオートファゴソーム (AG) および GFP(-), RFP(+) のオートライソソーム (AL) とともに減少を認める. mKO において Foxo3-DN でオートファジーの亢進が正常化できていることを示唆する. プラスミドを EP 後 14 日目に評価. Scale Bar=50 μm (B) (C) は (A) の蛍光画像を定量化したもの (n=10) (D) (A) において使用した検体で, 筋障害の程度を示す中心核を持つ筋線維の数を定量化したもの (n=10). Foxo3-DN の EP では mKO マウスにおいて明らかな筋障害の改善を認めず

データは平均値 \pm 標準誤差で示した. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns, nonsignificant.