

氏名	大崎 芳典		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第 7854 号		
学位授与年月	平成 28 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	骨格筋における 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCoA 還元酵素) の機能解析		
主査	筑波大学教授	博士(医学)	竹越 一博
副査	筑波大学教授	医学博士	山崎 正志
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	渡邊 雅彦
副査	筑波大学講師	博士(医学)	村越 伸行

論文の内容の要旨

(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、コレステロール合成を行うメバロン酸(MVA)経路の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR) の阻害剤である。その副作用として横紋筋融解症をはじめとするスタチンミオパチーが知られており、最も注意すべき副作用であると考えられている。スタチンの筋毒性については、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。また、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、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。本研究では骨格筋特異的に HMGCR をノックアウト(KO)したマウスを作成し解析を行う。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。

(対象と方法)

HMGCR の floxed マウスと 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を掛け合わせることで骨格筋特異的 HMGCR KO (mKO) マウスを作成した。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 マウスと以降呼称する。RI を用いた HMGCR の酵素活性測定、MVA の経口投与による骨格筋障害の救済実験を行ったほか、

審査様式 2 - 1

Real-time PCRによる遺伝子発現解析、血清代謝パラメータの測定、ウエスタンブロットによる蛋白レベルでの解析、一般組織染色・電子顕微鏡観察(TEM)、蛍光免疫染色等、を用いて解析を行った。特殊な実験としては、マウス前脛骨筋に対するエレクトロポレーション(EP)を用いて *in vivo* で、RFP-GFP-LC3(tfLC3)プラスミドによるオートファジー活性(autophagy flux)等の評価や活性化Foxo3の抑制によるオートファジー亢進の正常化、の検討を行った。

(結果)

mKO マウスでは骨格筋のみでHMGCRがKOされていることが確認できた。血清コレステロールに変化は無く、mKO マウスで筋障害による血清CKの上昇を認めた。組織染色・ウエスタンブロット・蛍光観察により mKO マウスの骨格筋において、アポトーシスの発生はみられず、ネクローシスを伴うミオパチーを認めた。この骨格筋障害はMVAの経口投与により完全に消失した。また、mKO マウスではミトコンドリア量・機能(ATP産生)ともに低下しており、TEMによる観察でも形態異常を認めた。mKO マウスの骨格筋ではp62およびLC3の増加を認め、オートファジーの異常が示唆された。同時に非リン酸化Foxo3とその標的蛋白であるBnip3の増加を認め、mKO マウスではFoxo3の活性化を認めた。EPによりtfLC3プラスミドを発現させて行ったautophagy fluxの評価実験では、mKO マウスでオートファジー(autophagy flux)の亢進を認めた。これらのデータにより、mKO マウスの骨格筋においてはFoxo3の活性化に伴うオートファジーの亢進が存在すると考えられた。mKO マウスの骨格筋において、ドミナントネガティブ型Foxo3(Foxo3-DN)プラスミドを用いたFoxo3の不活性化によりオートファジー亢進をCtrl マウスと同程度にまで抑制できたが、オートファジー亢進の正常化による筋障害の改善は認められなかった。

(考察)

本研究のmKO マウスは、既報に多数あるアポトーシスを呈さず、ネクローシスを呈しており、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。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り、スタチンによる重症の横紋筋融解症発症例において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た。mKO マウスでのオートファジー亢進は、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されているが、本研究により活性化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。活性化Foxo3の抑制によるオートファジー亢進の正常化は、残念ながら筋障害の軽快をもたらすことはできなかったが、この理由としてはmKO マウスにおけるオートファジー亢進は骨格筋障害の主原因ではなく、ミトコンドリア障害によるATP産生低下やAMPKの活性化を通じたFoxo3の活性化によるオートファジー亢進、などの別の現象に起因する結果である可能性が考えられた。*in vivo* における骨格筋でのHMGCR機能低下が骨格筋のオートファジーに与える影響を明らかにすることができ、この点が本研究の成果であったと考えられる。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は主に骨格筋におけるHMG-CoA還元酵素の役割および横紋筋融解症発症の分子メカニズムを明らかにする事を主な目的に、骨格筋特異的にHMGCRをノックアウト(KO)したマウス(mKO マウス)を作成し解析を行っている。結果として、mKO マウスは既報に多数あるアポトーシスを呈さずネクローシス

審査様式 2 - 1

を呈しており、MVA の経口投与にて救済されることが明らかとなった。さらに mKO マウスでのオートファジー亢進は、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されているが、本研究により活性化 Foxo3 がオートファジー亢進の主因子であることを証明できた。以上より、本研究で *in vivo* における骨格筋での HMGCR 機能低下が骨格筋のオートファジーに与える影響とその機序を明らかにすることができた。本研究は、学術的意義だけでなく、臨床的にも意義のある論文として高く評価された。

平成 28 年 1 月 14 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。