

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15344

研究課題名(和文)横紋筋融解症発症モデルマウスにおけるオートファジー異常の分子メカニズム

研究課題名(英文)Molecular mechanism of autophagic abnormality in mouse model with rhabdomyolysis

研究代表者

島野 仁 (SHIMANO, Hitoshi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20251241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000 円

研究成果の概要(和文)：高コレステロール血症治療薬であるスタチンの副作用である横紋筋融解症の発症のメカニズムを解明することを目的とした。スタチンの標的であるHMGCRを骨格筋特異的にノックアウトしたマウス(mKO)を作製した。mKOマウスの筋肉細胞では細胞死と再生が頻繁に起こっていた。オートファジーの異常について検討した。オートライソゾームの形成に関与するRab7の機能が障害されているとともに、オートライソゾームの分解も障害されていた。mKOマウスでのオートライソゾームの異常やp62タンパクの増加はオートファジーそのものの異常ではなく、ライソゾームの機能異常に由来するものではと推論した。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to elucidate the mechanism of the onset of rhabdomyolysis, which is a side effect of statin which is a treatment for hypercholesterolemia. We generated skeletal muscle specific-HMGCR, a target of statin, knockout mice. The turnover between cell death and regeneration were frequently occurred in muscle cells of mKO mice, indicating that the deficiency of HMGCR in skeletal muscle leads to myopathy. We examined the relationship between myopathy and autophagy in skeletal muscle of these mice. The function of Rab7, which is involved in the formation of autolysosomes, was impaired and the degradation of autolysosomes was he also impaired in skeletal muscle of these mice. Thus, we found that the skeletal muscle cells of mKO mice exhibited the abnormality of autolysosomes and the increase of p62 protein, due to the functional abnormality of lysosome.

研究分野：代謝学

キーワード：スタチン 横紋筋融解症 オートファジー コレステロール

## 1 . 研究開始当初の背景

高コレステロール血症治療薬であるスタチンは HMGCR の阻害剤である。非常に有効な治療薬である反面、副作用として筋委縮や横紋筋融解症がある。しかしながら、このスタチンによる横紋筋融解症の発症の詳しい発症メカニズムは未だに明らかとなっていない。

申請者の所属する研究グループでは脂質・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、Ishikawa *JLR* 2008)。また、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も報告している(Ohashi *JBC* 2003)。現在、細胞レベルではスタチンによる細胞障害性は示されてきているのに対し、マウスを用いた解析ではスタチンによる横紋筋融解症の分子メカニズムについて明確な答えは出せていない。

そこで本課題では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ため、スタチンの標的である HMGCR を骨格筋特異的にノックアウトしたマウスを作製し解析を進めている。

## 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、腎障害から死に至らしめてしまうことが問題となっている。我々が開発した骨格筋特異的 HMGCR ノックアウトマウスはコレステロール合成の抑制による細胞死、最終的に横紋筋融解症を発症させることを見出した。この病態の発症メカニズムにオートファジーが関

与するデータを現在までに得ており、本研究ではコレステロール不足がもたらすオートファジーを介した細胞死のメカニズムを明らかにすることを目的とする。オートファジーによる骨格筋の機能制御を明らかにすることで生活習慣病治療と筋肉維持を両立する治療法の確立を目指す。

## 3 . 研究の方法

【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・骨格筋特異的 Cre Tg マウス (ACTA1-rtTA,tetO-cre) は Jackson Lab. から導入し、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した。

【マウスでの横紋筋融解症におけるオートファジー動態を評価する検討システムの構築】

LC3B-GFP Tg マウスと骨格筋特異的 HMGCR ノックアウトマウスとを交配した。このマウスにより筋肉でのオートファジーをリアルタイムに検討した。さらにオートファジーの変化をモニターする RFP-GFP 融合型 LC3 タンパクを発現するアデノウイルスを作成し、筋肉に直接導入した。in vivo electroporation によっても遺伝子導入した。

【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 等を用い遺伝子発現を評価した。また、骨格筋における病理学的変化も検討した。

細胞死の形態的な変化：電子顕微鏡を用い、細胞内小器官の形状の変化を観察した。オートファジーによる細胞内小器官の消化が生じているかを観察した。

## 【コレステロール不足による細胞内シグナル伝達経路の探索】

骨格筋特異的 HMGCR ノックアウトマウスを使用し、マウスでの解析 (in vivo)、初代培養骨格筋細胞での解析 (in vitro) を行い、HMGCR 機能により制御される生理的な反応を解析し、高コレステロール血症治療薬 (スタチン) による横紋筋融解の副作用の分子メカニズムを検討した。

コレステロール代謝における代謝酵素の阻害剤、活性化剤、代謝産物をマウス、細胞へ投与し、HMGCR 欠損による細胞死の改善が見られる因子を同定し、どの部分のコレステロール代謝が細胞死と結びつくかを明らかにする。HMGCR が産生するメバロン酸は横紋筋融解症を改善する。その下流に位置する代謝産物 Farnesyl pyrophosphate、Geranylgeranyl pyrophosphate や低分子 G タンパクである Rac、Rho、Rheb などを中心に解析を行う。低分子 G タンパクについては活性型、不活性型を作製し、骨格筋に遺伝子導入し病態の改善が見られるかを観察した。

## 【初代筋肉細胞を用いたオートファジーの評価】

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。マイトファジー検出に Keima (Kogure *Nature Biotechnology* 2006) を使用し、コレステロール合成と細胞死の接点を検討した。

## 【CRISPR/Cas9 システムによる HMGCR KO 細胞の作成】

CRISPR/Cas9 システムを用い、マウス骨格筋細胞 C2C12 細胞で HMGCR を欠損した細胞を作成した。

## 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 マウスを交配して作成した、骨格筋特異的 HMGCR KO マウス (以下 mKO マウス) の解析をオートファジーとの関連に着目して行った。

mKO マウスでは HMG-CoA 還元酵素の欠損によりメバロン酸以下下流の代謝産物が減少しているが、近年、メバロン酸下流の代謝産物であるイソプレノイドを用いたプレニル化によって機能調節を受ける small G 蛋白の中でも Rab の一群がオートファジーに関わることが報告されており、特に Rab5 (Lu et al. *Autophagy*. 2014.) や Rab7 (Ganley et al. *Mol Cell*. 2011) 等が挙げられる。このため、mKO マウスにおいて蛍光タンパクを付与した Rab5・Rab7・Rab11 を in vivo エレクトロポレーションし画像評価を行ったところ、early endosome を示す Rab5、recycling endosome を示す Rab11 は対照群と差を認めなかったものの、late endosome を示しオートライソゾームの形成に関与すると報告されている Rab7 のみ、mKO マウスでの puncta の形成が著しく減少しており、プレニル化不全による Rab7 の機能障害が mKO マウスには存在すると考えられた。

オートファゴソームが GFP にて可視化できる GFP-LC3 Tg マウスと mKO マウスの交配により、mKO マウスでのオートファゴソームの評価を行ったところ、蛍光顕微鏡観察にて GFP-LC3 puncta が増加しており、オートファゴソームの産生亢進もしくは分解障害に伴う蓄積が存在すると考えられた。また、酸性環境下での GFP の消光を利用してオートライソゾームの pH を評価する RFP-GFP-LC3 plasmid をエレクトロポレーションにより mKO マウスに過剰発現させたところ、mKO マウスにて RFP 単独陽性の puncta の増加を認め、これはオートファゴソームとライソゾーム融合後のオートライソゾームの形成ならびに GFP を消光できる pH 5.0 程度までの酸

性化は達成できていることを示していた。これによりオートライソゾームにおいても産生亢進もしくは内部酸性化後の分解障害のいずれかが存在すると考えられた。

他方、オートファジーの最も強力な調節因子である mTORC1 の機能は、リン酸化 mTORC1 ならびに mTORC1 下流のエフェクターである S6 とリン酸化 S6 が増加していたことから、活性化していると考えられ、この場合は mTORC1 によるオートファジーの抑制ならびにオートファゴソームの形成が減少することが通常であり、上述のデータとあわせてオートライソゾームの分解障害が示唆された。mKO マウスでの p62 タンパクの著しい増加とも合致する結果であった。

オートファジーの調節による筋障害の改善を目的とし、mTORC1 の活性低下を通じオートファジーを亢進させるラバマイシンの投与、逆に Foxo3 の不活性変異体のエレクトロポレーションによるオートファジーの更なる抑制、の 2 通りの方法を試行したが、ラバマイシン投与においては mKO マウスのみ衰弱死を来とし、Foxo3 の不活性変異体によるエレクトロポレーションでは、対照群と同程度までのオートライソゾームの減少を認めたものの、筋障害の改善を示唆する結果は得られなかった。

また、Rab7 の GTP 活性型を産生する plasmid を mKO マウスにてエレクトロポレーションで過剰発現させたものの、Rab7 を伴う puncta の増加は認めず、筋障害の改善も得られなかった。これは GTP 活性型であってもその前段階のプレニル化による脂質修飾が行われていないため、正常に膜構造にアンカーできず機能できていないと考えられ、単に GTP 活性型の small G 蛋白を外部から過剰発現させてもその機能を回復できないことが判明した。

オートライソゾームの分解障害は示唆されているものの、上述のとおりオートファジ

ーへの干渉では筋障害に変化がなかった点、骨格筋において Atg7 の KO(Masiero et al. Cell Metab. 2009)や TSC の KO(Castets et al. Cell Metab. 2013)を用いてオートファジーを欠損もしくは強力に抑制したマウス・Raptor の KO(Bentzinger et al. Cell Metab. 2008)を用いてオートファジーを亢進させたマウスの既報では、筋障害は発生するものの筋萎縮に似た所見をとり、血清 CK の上昇やエバンスブルー染色による筋壊死の所見をとらないことから、mKO マウスでのオートライソゾームの異常や p62 タンパクの増加はオートファジーそのものの異常ではなく、ライソゾームの機能異常に由来するものではと推論した。

さらに細胞レベルでの解析が必要であるが、マウス骨格筋初代培養では HMGR KO マウスからの培養ができなかった。初代培養では筋幹細胞から培養するが、筋肉細胞に分化する過程で  $\alpha$ -actin プロモーターが活性化して、初めて HMGR が KO される。HMGR が KO されると細胞は死んでしまうため、解析が困難であった。そこで、マウス骨格筋由来の培養細胞 C2C12 細胞を用い、CRISPR/Cas9 システムを使い HMGR を KO した細胞を作成した。この細胞は当初、線維が細胞であるが、分化誘導することで筋肉細胞へと分化する。この細胞でも筋肉へ分化させると細胞は死んでいくことを確認している。培養細胞であるため、解析は初代培養細胞より簡便である。この細胞を使い今後さらに HMGR の筋肉細胞での機能を分子レベルから解析する予定である。

## 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):536-40. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.065. 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島野 仁 (SHIMANO, Hitoshi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20251241

### (2) 研究分担者

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