

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10987

研究課題名(和文)サルコペニアに関する新たな調節因子の解明

研究課題名(英文)Identifying a new mechanism of sarcopenia by autophagy

研究代表者

山田 英二郎 (Yamada, Eijiro)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60645563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：サルコペニアは生活習慣病のリスクが高いが原因は不明である。我々は非受容体型チロシンキナーゼFynがメタボリック症候群に関するのみならずSTAT3依存性にオートファジーを調節しサルコペニアにも関与する事をトランスジェニックマウスやC2C12筋管細胞、除神経マウスモデル、後肢懸垂マウスモデルを用い報告してきた。今回はさらにFynノックアウトマウスを導入し検討を行い FynKOは後肢懸垂による筋萎縮を生じなかった FynKOではWTで認めるSTAT3の発現/リン酸化の上昇やオートファジー活性低下を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果はFynがメタボリックシンドロームだけでなくサルコペニアの病因にも関与していることを示唆している。近年、肥満があるにもかかわらず、サルコペニアである状態、サルコペニア肥満が問題となってきた。こうした病態ではエネルギー管理をどの様に持つていくかが困難である。さらにサルコペニアに関しては現時点で薬物治療は限定的である。一方でFynはチロシンキナーゼであり、チロシンキナーゼの阻害薬は現時点でも多くが上市されてきている。本研究結果によりサルコペニア肥満の病因のより良い理解と治療法の開発につながる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：We focused on autophagy as a system that can regulate both sarcopenia and metabolic syndrome in skeletal muscle and revealed that non-receptor tyrosine kinase Fyn not only participates in metabolic syndrome but also regulates autophagy regulating sarcopenia through STAT3 regulation, mainly using transgenic mice (Cell metabolism 2010, Cell Rep. 2012). We proceeded with further studies and demonstrating that Fyn-dependent STAT3 phosphorylation by IL6 was observed in mouse C2C12 myotube cells. Autophagy was decreased in those cells by both IL6-dependent and Fyn-dependent mechanisms. Furthermore, in the denervated mouse model, both Fyn and IL6 gene expressions were increased while the autophagy activity was decreased. We next introduced a hind limb suspension mouse model. We found that increased IL6 and STAT3 expression/phosphorylation and decreased autophagy activity. These results strongly suggest that Fyn is involved in the pathogenesis of sarcopenia.

研究分野：メタボリック症候群

キーワード：Fyn オートファジー サルコペニア メタボリック症候群

1. 研究開始当初の背景

医学の急速な進歩等に伴い先進国を中心に世界的に高齢者人口は急増しているが、本邦は平成25年の統計で高齢化率25.1%であり世界トップである。高齢者では生活機能障害を招くサルコペニア(加齢性筋肉減弱症)が生じ、サルコペニアはフレイル(虚弱)につながるとされ注目されてきている。一方、ガンや消耗性疾患に伴うカケキシアの管理もその疾患予後を規定するとされ、こうした疾患の際に「いかに筋萎縮を起こさないようにするか」が治療のターゲットとなっている。さらに肥満にサルコペニアが合併した状態(サルコペニア肥満)も生活習慣病のリスクが高いとされ関心が向けられている。

サルコペニアの成因には以前は mTOR 系を介した細胞増殖系と FOXO 系を介したユビキチン-プロテアソームシステムによる蛋白分解の両者の経路が関与しているとされてきたが、近年オートファジー(自己貪食)調節機構も関与することが報告され、注目されてきている。そんな中、我々は最近、骨格筋において、非受容体型チロシンキナーゼの一つである Fyn が mTOR の活性調節のみならず、STAT3 のリン酸化を調節し、オートファゴソームの誘導に重要であるとされている VPS34-ATG14-Beclin1 complex を介してオートファジー機構を調節し、サルコペニア

に關与する事を報告した (Yamada E et al. Cell Rep. 2012)。

しかし、こうした検討は主に骨格筋特異的 Fyn トランスジェニックマウスによって証明されたものであり、実際にサルコペニアにおいて Fyn がどのような役割をしているかは明らかではなく、さらに Fyn の標的因子は VPA34 を含む complex のみではない可能性もある。

一方で、サルコペニアの原因遺伝子の探求が近年盛んに行われるようになった結果、新規に Native American myopathy の原因遺伝子として STAC3 が同定され (Reinholt BM et al. Nat Commun. 2013)、ノックアウトマウスの解析などにおいて筋肉の分化誘導の調節を行っていることや筋肉内のジヒドロピリジン受容体とリアノジン受容体の結合を調節する事で筋収縮に重要な役割を果たしている事が分かってきた。その調節機構や実際のサルコペニアにおける STAC3 の役割をみた検討は未だないが、最近、分子構造生物学的な手法によって STAC3 の 104 番目のバリンと 133 番目のチロシン残基がその機能に重要な役割をすることが報告された (Marta Campiglio et al. Scientific Reports. 2017)。

2. 研究の目的

申請者は近年、非受容体型チロシンキナーゼである Fyn が筋肉でオートファジーを調節し、その損耗を調節しうることを報告した。今回は、我々がリン酸化プロテオーム解析結果として新たにクローニングした Fyn の新規ターゲット蛋白 STAC3(SH3 and cysteine rich domain 3)が Fyn による 133 番目のチロシンリン酸化を介してサルコペニアの成因に關与しているか Fyn-STAC3 経路が実際にサルコペニア発症に關与しているかの検討を行う。これらが明らかになることで、新たなサルコペニア発症メカニズムと治療ターゲットを解明できることになり、その治療に大きく貢献することができると考えられる。

3. 研究の方法

Fyn をノックアウトした C2C12 筋管細胞や加齢マウスモデルもしくは廃用性筋萎縮マウスモデルを用いた検討にて Fyn のサルコペニアへの関与が示唆されているが、Fyn ノックアウトマウスを用いてさらに検討を行い、これら調節が Fyn 依存性である事を確認する。さらに、その中で STAC3 のリン酸化の関与も検討する。

- Fyn ノックアウトマウスにおいて片足の腓腹神経を切断した後、2、4、8 週間後の筋肉量の変化を比較検討する。もし Fyn がサルコペニアの成因となっているのならば、野生型マウスよりもその減少は少ないことが想定される。
- 上記マウスの筋肉において STAC3 のリン酸化、ジヒドロピリジン受容体とリアノジン受容体の局在の変化の観察を免疫沈降法もしくは免疫染色の後の共焦点レーザー顕微鏡を用いた検討を用いて行い、その関与を検討する。
- 上記マウスの筋肉において IL6 の発現、STAT3 のリン酸化、mTOR の下流である p70S6K のリン酸化、筋肉萎縮のマーカーである Atrogin1 や Murf1 の発現、さらには AMPK や ULK1 のリン酸化、オートファジーマーカーである LC₃ / LC3-β 比、p62 をウェスタンブロット法で解析する。さらにオートファジー阻害薬である塩化アンモニウムとロイペプチンを加えた系で、LC3-β をウェスタンブロット法で解析することでオートファジー flux も確認する。

4. 研究成果

マウス C2C12 筋管細胞における IL6-Fyn 依存性の STAT3 のリン酸化とそれに伴うオートファジー調節 除神経マウスモデルと後肢懸垂マウスモデルにおける Fyn-IL6-STAT3 によるオートファジー調節機構を本学会で報告してきた。しかしこれら解析は野生型マウス(WT)を用いたものであり、これら調節機構に対する Fyn の関与に關しての解析は不十分と考え Fyn のノックアウトマウス(FynKO)を用いてさらなる検討を行った。その結果、FynKO では WT で生じる後肢懸

垂による筋萎縮が生じなかった FynKO では後肢懸垂マウスの筋肉ではWT で認める STAT3 の発現 / リン酸化の上昇を認めなかった さらにコルヒチンを腹腔内投与することで検討されるオートファジー活性にても活性低下を認めなかった。STAC3 の解析に関しては *in vitro*, *in vivo* でリン酸化を確認はしたが、それ以降はマウスの検討に時間を費やしてしまったためまだ達成できない。今後の検討課題としたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田英二郎
2. 発表標題 サルコペニア肥満に関する新たな調節因子の解明
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田英二郎
2. 発表標題 オートファジー調節機構が紡ぐサルコペニアと肥満
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会年次集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田英二郎
2. 発表標題 サルコペニアに関する新たな調節因子の解明
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田英二郎
2. 発表標題 サルコペニアに関する新たな調節因子の解明
3. 学会等名 第33回日本糖尿病学会合併症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田英二郎
2. 発表標題 サルコペニアに関する新たな調節因子の解明
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田英二郎
2. 発表標題 サルコペニア肥満に関する新たな調節因子の解明
3. 学会等名 第30回分子糖尿病学シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------