

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19947

研究課題名(和文)統合的解析を駆使したアンドロゲンによる骨格筋制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of androgen regulation of skeletal muscle using integrative analysis

研究代表者

酒井 大史(Sakai, Hiroshi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教

研究者番号：00820804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者における生活の質が著しく低下する主な原因の一つは、加齢による骨格筋量の低下である。男性ホルモン(アンドロゲン)の投与によって、骨格筋が肥大することは良く知られているが、その分子生物学的作用機序は、ほとんど解明されていない。そこで、本研究では、骨格筋の再生機能に必須である骨格筋幹細胞において、アンドロゲン受容体(androgen receptor, AR)を欠損させたマウス作出した。その結果、骨格筋幹細胞でのARの発現は、筋再生には関与しないことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではアンドロゲン受容体遺伝子欠損マウスを用いたin vivoモデルによりアンドロゲンと骨格筋再生ならびに骨格筋幹細胞の関係を詳細に解明した。この作用機序を解明することは、アンドロゲン補充治療の副作用を解明し、サルコペニアの予防・治療の発展と、ひいては超高齢社会における健康寿命問題を克服する一つの起点となる。

研究成果の概要(英文)：The anabolic effects of androgen on skeletal muscles are thought to be mediated by androgen receptor (AR). Although multiple studies concerning the effects of AR in males have been performed, the molecular mechanisms of AR in skeletal muscles remain unclear. Here we first confirmed that satellite cells from mouse hindlimb muscles express AR. We then generated satellite cell-specific AR knockout mice using Pax7CreERT2 and ARL2/Y mice to test whether AR in satellite cells is necessary for muscle regeneration. We found that muscle regeneration was compromised in both Pax7CreERT2(Fan)/+ control mice and Pax7CreERT2(Fan)/+;ARL2/Y mice compared to ARL2/Y mice. However, Pax7CreERT2(Gaka)/+;ARL2/Y mice showed no significant differences between control and mutant muscle regeneration. These findings indicate that AR in satellite cells is not essential for muscle regeneration.

研究分野：スポーツ科学

キーワード：アンドロゲン 男性ホルモン アンドロゲン受容体 骨格筋 筋再生 骨格筋幹細胞 サテライト細胞

## 1. 研究開始当初の背景

男性ホルモン(アンドロゲン)の骨格筋へのアナボリック効果は、古くから知られていた。アンドロゲンの一つであるテストステロンの発見・単離と、その化学合成が成功して以降、アンドロゲンの生理作用については、膨大な研究が行われてきた。主に、アンドロゲン補充治療を中心とした医療応用としての研究と、いわゆるアナボリックステロイドと呼ばれるドーピング薬物としての研究である。このように、アンドロゲンは実際にヒトに投与されている化学物質であるにも関わらず、意外にも「アンドロゲンが、骨格筋において、どの細胞を標的として、どのように作用しているのか」という、まさに核心をなす学術的「問い」には、明確な答えが与えられていない。

骨格筋は、多数の骨格筋線維が束ねられた組織である(図1)。骨格筋は、優れた再生能をもち、その機能は、骨格筋幹細胞に依存する。アンドロゲン受容体( androgen receptor, AR )は、骨格筋線維と骨格筋幹細胞のどちらにも発現している。全身で AR を欠損させたマウスでは骨格筋量の減少が見られるが、骨格筋線維特異的に AR を欠損させたマウスでは、下肢骨格筋量に差がないことが示されている。残る可能性の一つとして、骨格筋幹細胞での AR の関与が考えられるが、AR が骨格筋幹細胞の機能にどのように関与しているのかは、ほとんど知られていない。

また、アンドロゲンは、AR と結合することで、そのほとんどの機能を発揮する。アンドロゲンが結合した AR は、細胞質から核内へと移行し、特定の DNA 配列と結合することで遺伝子転写の調整を行なっている。しかし、骨格筋線維あるいは骨格筋幹細胞における AR の標的遺伝子は、その大部分が不明である。

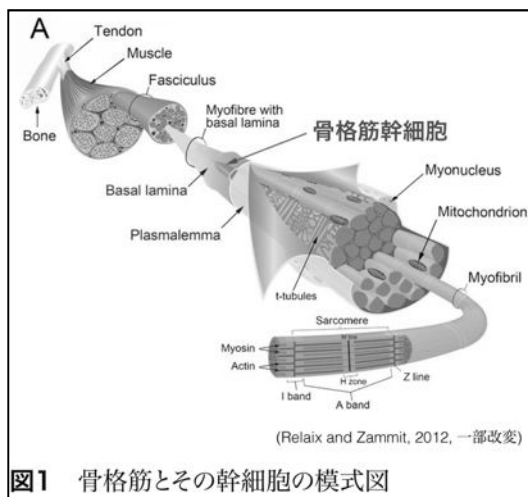


図1 骨格筋とその幹細胞の模式図

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、骨格筋幹細胞特異的に、アンドロゲン受容体を欠損させたマウスを作成し、その表現形を解析することで、骨格筋線維ならびに骨格筋幹細胞におけるアンドロゲン作用の分子メカニズムを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨格筋幹細胞特異的 AR 遺伝子欠損マウスの作出ならびに静止期の骨格筋の評価

骨格筋幹細胞特異的にタモキシフェン誘導型の Cre を発現するマウス ( $Pax7^{CreERT2(Fan)/+}$  ならびに  $Pax7^{CreERT2(Gaka)/+}$ ) と、AR flox マウス ( $AR^{L2/Y}$ ) との交配により、骨格筋幹細胞特異的 AR 欠損マウス ( $Pax7^{CreERT2}; AR^{L2/Y}$ ) を作出する。また、同腹のマウスからコントロール群として  $Pax7^{CreERT2}$  マウスを使用する。実験では、性差による実験結果の差を考慮し、雄マウスのみを使用する。以下、この 2 群のマウス ( $Pax7^{CreERT2}$  マウスならびに  $Pax7^{CreERT2}; AR^{L2/Y}$  マウス) を用いて実験を行う。

このマウス群に対して、8 週齢時に、タモキシフェンを腹腔内投与 (200  $\mu$ l/mouse、20 mg/ml、5 日連続) することで、 $Pax7$  を発現する骨格筋幹細胞特異的に、AR 遺伝子欠損を誘導する。

後肢の前脛骨筋 (Tibialis anterior, TA) を採取し、筋重量を測定後、凍結サンプルならびに凍結切片を作成する。HE 染色による基本的な組織学的検査と合わせて、骨格筋幹細胞の静止期のマーカーである  $Pax7$  での免疫染色を行い、骨格筋幹細胞数の変化を定量する。

### (2) $Pax7^{CreERT2}; AR^{L2/Y}$ マウスにおける筋損傷ならびに再生期の骨格筋の評価

上記のマウス群に対して、ヘビ毒素ファミリーの一つで PKC 特異的阻害作用を有する Cardiotoxin (CTX) をもちいて、前脛骨筋 (Tibialis anterior, TA) に筋損傷を誘導し、骨格筋の再生能を評価する。まず、急性期の再生を検討するため、損傷後、5 日後に TA を回収し、筋重量の測定ならびに肉眼的変化を観察後、凍結切片を作成する。凍結切片では、骨格筋再生の指標となる中心核を持つ筋細胞数の定量ならびに筋線維横断面積 (cross sectional area, CSA) の定量を行う。加えて、再生中の骨格筋線維に特異的に発現する Myosin heavy chain 3 (Myh3)  $Pax7$  に対する免疫染色を行い、急性期の筋再生を評価する。また、骨格筋再生途中の損傷後 14 日の TA も回収し、上記と同様の解析を行い、再生期の骨格筋における AR の役割を解明する。

#### 4. 研究成果

(1)  $Pax7^{CreERT2(Fan)/+}$  マウスは、筋再生時に Pax7<sup>+</sup>細胞の数が大幅に減少する。

損傷を受けていないコントロールの TA 筋では、ほぼすべての細胞が Pax7 抗体と AR 抗体で陽性に染色され、サテライト細胞による AR の発現を示した (図 2A)。AR を欠失させた  $Pax7^{CreERT2(Fan)/+};AR^{L2/Y}$  マウスでは、FACS で分離したサテライト細胞の AR mRNA レベルがコントロール ( $Pax7^{+/+};AR^{L2/Y}$ ) マウスに比べて低下していた (図 2B)。驚くべきことに、筋損傷時には、損傷 5 日後において  $Pax7^{CreERT2(Fan)/+}$  コントロールマウスと  $Pax7^{CreERT2(Fan)/+};AR^{L2/Y}$  マウスでは、Pax7<sup>+</sup>細胞の数は同程度に減少し (図 2C-E)、 $Pax7^{CreERT2(Fan)/+}$  コントロールマウスでは、損傷 14 日後において筋再生がわずかに遅れた (図 2F-H)。

以上の点から、 $Pax7^{CreERT2(Fan)/+}$  コントロールマウスは、筋肉再生に悪影響を及ぼし、軽度の再生不良を示すため、骨格筋再生実験にコントロールとして含めることを提案する。

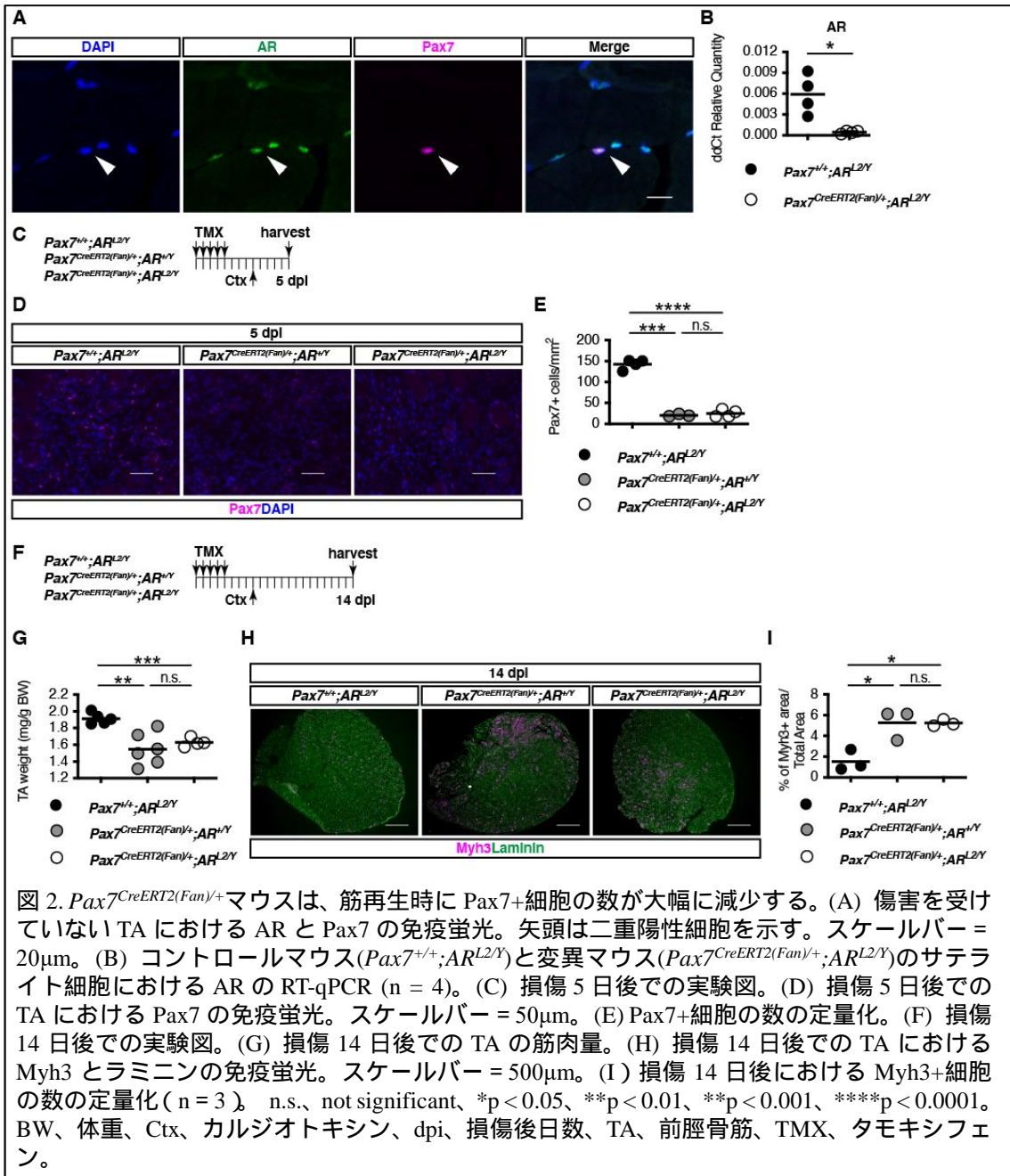


図 2.  $Pax7^{CreERT2(Fan)/+}$  マウスは、筋再生時に Pax7<sup>+</sup>細胞の数が大幅に減少する。(A) 傷害を受けていない TA における AR と Pax7 の免疫蛍光。矢頭は二重陽性細胞を示す。スケールバー = 20 $\mu$ m。(B) コントロールマウス ( $Pax7^{+/+};AR^{L2/Y}$ ) と変異マウス ( $Pax7^{CreERT2(Fan)/+};AR^{L2/Y}$ ) のサテライト細胞における AR の RT-qPCR (n = 4)。(C) 損傷 5 日後での実験図。(D) 損傷 5 日後での TA における Pax7 の免疫蛍光。スケールバー = 50 $\mu$ m。(E) Pax7<sup>+</sup>細胞の数の定量化。(F) 損傷 14 日後での実験図。(G) 損傷 14 日後での TA の筋肉量。(H) 損傷 14 日後での TA における Myh3 とラミニンの免疫蛍光。スケールバー = 500 $\mu$ m。(I) 損傷 14 日後における Myh3<sup>+</sup>細胞の数の定量化 (n = 3)。n.s., not significant, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001。BW、体重、Ctx、カルジオトキシン、dpi、損傷後日数、TA、前脛骨筋、TMX、タモキシフェン。

(2) アンドロゲン受容体はサテライト細胞が筋肉を再生するのに必要ではない。

サテライト細胞において、上記とは異なる機構で Cre を発現する  $Pax7^{CreERT2(Gaka)^+}; AR^{L2/Y}; R26^{tdTomato/+}$  マウス (図 3A) は、損傷 5 日後でコントロールと同様の  $Pax7^+$  のサテライト細胞の数を示した (図 3B-D)。Myh3+細胞数でみた筋再生は、損傷 14 日後でコントロールマウスと変異マウスで同等であった (図 3E-G)。

これらの結果から、サテライト細胞が発現する AR は、筋再生には関与していないことが示唆された。以上の結果を、① Sakai.et al 2020 として発表した。

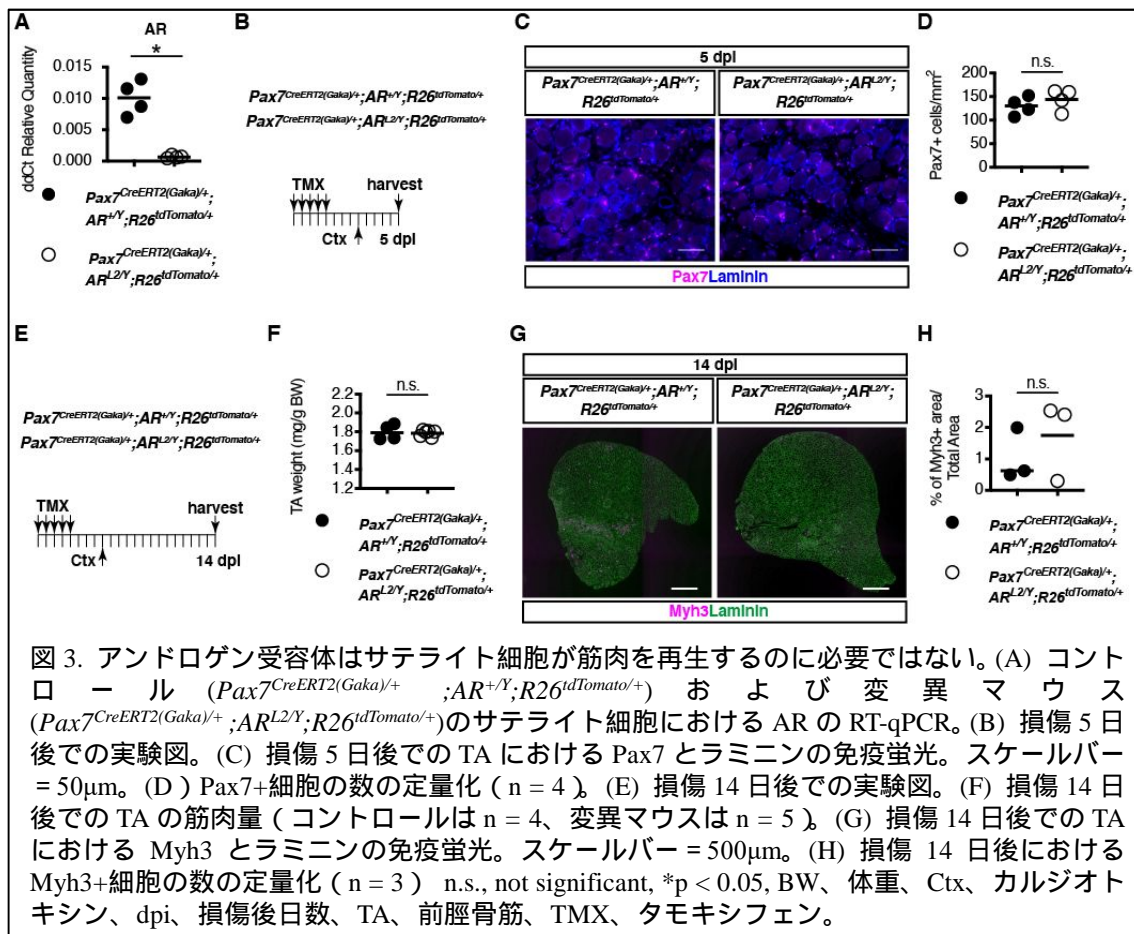


図 3. アンドロゲン受容体はサテライト細胞が筋肉を再生するのに必要ではない。(A) コントロール ( $Pax7^{CreERT2(Gaka)^+}; AR^{+/Y}; R26^{tdTomato/+}$ ) および変異マウス ( $Pax7^{CreERT2(Gaka)^+}; AR^{L2/Y}; R26^{tdTomato/+}$ ) のサテライト細胞における AR の RT-qPCR。(B) 損傷 5 日後での実験図。(C) 損傷 5 日後での TA における Pax7 とラミニンの免疫蛍光。スケールバー = 50 $\mu$ m。(D) Pax7+細胞の数の定量化 (n = 4)。(E) 損傷 14 日後での実験図。(F) 損傷 14 日後での TA の筋肉量 (コントロールは n = 4、変異マウスは n = 5)。(G) 損傷 14 日後での TA における Myh3 とラミニンの免疫蛍光。スケールバー = 500 $\mu$ m。(H) 損傷 14 日後における Myh3+細胞の数の定量化 (n = 3) n.s., not significant, \*p < 0.05, BW、体重、Ctx、カルジオトキシン、dpi、損傷後日数、TA、前脛骨筋、TMX、タモキシフェン。

#### < 引用文献 >

Sakai, H., Sato, T., Kanagawa, M., Fukada, S. & Imai, Y. Androgen receptor in satellite cells is not essential for muscle regenerations. *Exp Results* 1, (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakai H, Sato T, Kanagawa M, Fukada S-i, Imai Y	4. 巻 e
2. 論文標題 Androgen receptor in satellite cells is not essential for muscle regenerations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Results	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/exp.2020.14	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 酒井 大史、今井 祐記
2. 発表標題 Muscle regeneration in a muscle stem cell-specific androgen receptor-knockout mice
3. 学会等名 日本筋学会第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Sakai, Yuuki Imai
2. 発表標題 Muscle regeneration in a muscle stem cell-specific androgen receptor-knockout mice
3. 学会等名 Protein Island Matsuyama 2019 (PIM2019) International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井 大史
2. 発表標題 Muscle regeneration in a muscle stem cell-specific androgen receptor-knockout mice
3. 学会等名 新学術領域研究「性スペクトラム 連続する表現型としての雌雄」第3回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Sakai, Takahiko Sato, Yuuki Imai
2. 発表標題 Muscle regeneration in a muscle stem cell-specific androgen receptor-knockout mice
3. 学会等名 第7回若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Sakai
2. 発表標題 Muscle regeneration in a muscle stem cell-specific androgen receptor-knockout mice
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
4. 発表年 2019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
---------	---------