

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11439

研究課題名（和文）骨格筋におけるアンドロゲン受容体のパイオニア因子の同定・解析

研究課題名（英文）Identification and analysis of a pioneer factor for androgen receptor in skeletal muscle

研究代表者

横山 敦（Yokoyama, Atsushi）

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20572332

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）：本研究課題では、骨格筋特異的なアンドロゲン応答能を説明するパイオニア因子を取得すべく以下の研究成果を得た。マウス筋芽細胞由来C2C12細胞よりFLAG-AR安定発現株を樹立し、アンドロゲン応答能を有する骨格筋細胞株を得ることに成功した。この細胞を筋管細胞に分化させDHT刺激を行ったサンプルを用いてRIME法による相互作用因子探索を行い、20種類のAR結合候補因子を得た。さらに、同細胞にてARのChIP-seqを行い染色体上のAR結合領域を同定し転写因子モチーフ解析を行った。以上より、目的因子の候補として5遺伝子まで絞り込むことができた。今後さらなる絞り込みを行い、目的因子の同定を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会を迎えた本邦における健康寿命の延長は社会的に喫緊の課題である。要支援の主な原因となる転倒/骨折を予防するためには筋力強化が重要である。現在のところ、筋力強化に資する代表的な分子はアナボリックステロイドであるアンドロゲンであるが、心血管イベントを中心に多様な副作用リスクを有し問題である。運動効果をより増強させる、もしくは運動なしでも筋力増強が可能となるシグナルは超高齢化社会にとって有用であると考えられることから、本研究課題にて同定するARパイオニア因子は、サルコペニアなどの筋力低下疾患に対する副作用の少ない治療法開発につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we achieved the following results in order to identify a pioneer factor that explain the androgen response capability specific to skeletal muscle. We established a stable FLAG-AR expressing line derived from mouse myoblast C2C12 cells and successfully obtained a skeletal muscle cell line capable of responding to androgens. Using samples treated with DHT after differentiating these cells into myotubes, we conducted a search for interacting factors using the RIME method and identified 20 candidate AR-binding factors. Additionally, we performed AR ChIP-seq in the same cells to identify AR binding regions on the chromosomes and conducted transcription factor motif analysis. From these results, we were able to narrow down the candidates to five genes. We will further refine our search and identify the target factors.

研究分野：分子生物学

キーワード：アンドロゲン 骨格筋 筋力増強 パイオニア因子 核内受容体

1. 研究開始当初の背景

筋力増強作用を有するシグナル分子の代表として、アナボリックステロイドホルモンであるアンドロゲンがあげられる。これまでの臨床研究の成果から、アンドロゲンは同化ホルモンとして筋量を増加させるだけでなく、筋力をも増強させる作用があることが明らかにされている。しなしながら、アナボリックステロイドとしてのアンドロゲンの常用にはきわめて多様かつ深刻な副作用が報告されている。なかでも心血管イベントの増加が代表的であるが、これらの副作用を排除してアンドロゲンシグナルによる筋力増強のみに機能する分子メカニズムを明らかにすることができれば、転倒予防などを主な目的とした治療法の開発につながると考えられる。このためには骨格筋におけるアンドロゲン作用の分子メカニズムの理解が不可欠となってくる。

アンドロゲンの筋肉組織への作用としては、筋肥大と筋力の増大がよく知られている。全身性および骨格筋特異的アンドロゲン受容体 (AR) ノックアウトマウスの解析結果から、アンドロゲンによる筋力増強作用は骨格筋における AR の機能を介していることが明らかとなっている。したがって、アンドロゲンによる筋力の調節メカニズムの理解には、骨格筋における AR の機能を理解する必要がある。しかしながら、骨格筋における AR の標的遺伝子、クロマチン構造調節の分子メカニズムの詳細はほとんど不明であった。

2. 研究の目的

ARをはじめとする核内受容体は、これまでリガンドと結合することで DNA 上の固有の結合配列に結合し標的遺伝子の発現を制御すると考えられてきた。しかしながら、近年これらの結合配列近傍には“パイオニア因子”と呼ばれる別の転写因子の結合配列が存在し、パイオニア因子の非存在下では核内受容体は標的遺伝子の転写をオンに出来ないことがわかってきた。すなわち、パイオニア因子と呼ばれる転写因子群の存在が核内受容体の組織特異的な転写制御能を規定することが明らかとなってきた (Jozwik and Carroll, Nat Rev Cancer, 2012)。

パイオニア因子は不活性なクロマチンにも直接結合することが可能であり、さらにクロマチン構造をオープンにする活性を有している。これらの機能により、核内受容体をはじめとする転写因子群がそれぞれの標的遺伝子プロモーターへアクセスすることが可能となる。例えば、乳腺や前立腺においては、核内受容体の結合配列近傍に転写因子 FOXA1 の結合配列が存在し、FOXA1 がパイオニア因子としてこの配列に結合し適切なクロマチン構造を形成して初めて核内受容体が標的遺伝子の発現をオンにすることができる。(図1上部)

これらの知見から、骨格筋においても AR は何らかのパイオニア因子によってその標的遺伝子の誘導能を規定されていると予想できるがその詳細はまったく不明である(図1下部)。この骨格筋における AR のパイオニア因子は、アンドロゲンによる筋力増強作用において非常に重要な役割を持つと考えられ、その発見は先に述べた副作用のない筋力増強法の開発のための重要な基礎的知見となることが期待される。そこで本研究では、この骨格筋における AR のパイオニア因子を同定し、骨格筋におけるアンドロゲン応答の作用メカニズムを解明することを目的とした。

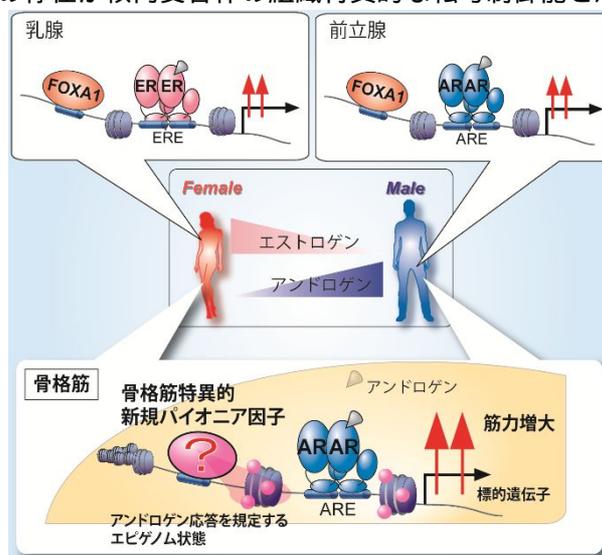


図1 骨格筋特異的新規パイオニア因子の概念図

3. 研究の方法

(1) 骨格筋における AR のパイオニア因子の同定：培養細胞 (マウス骨格筋由来 C2C12 細胞に AR を安定発現させたもの) を用いて、相互作用因子取得の手法である RIME 法により AR のパイオニア因子を質量分析で同定する。パイオニア因子の機能解析のために、培養細胞において取得因子をゲノム編集で欠損させ、アンドロゲン応答への影響を評価する。

(2) 骨格筋における AR のパイオニア因子と AR の標的遺伝子の同定：培養細胞を用いて AR の ChIP-seq 解析を行い、AR およびパイオニア因子の骨格筋における標的遺伝子を網羅的に決定する。モチーフ解析を行うことで、AR 結合部位の近傍に結合配列を有する転写因子を抽出することで AR パイオニア因子の候補を得る。

4. 研究成果

骨格筋細胞における AR パイオニア因子取得のために、材料となる細胞株として FLAG-AR を安定的に発現するマウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞を樹立した。この細胞株は、筋管細胞への分化能には変化がないが、分化後の DHT 投与により骨格筋特異的な AR の標的遺伝子を発現誘導できることを確認した。これまで、アンドロゲン応答能を持った骨格筋細胞株は存在しなかったため、有用な細胞株を樹立することができた。(図2)

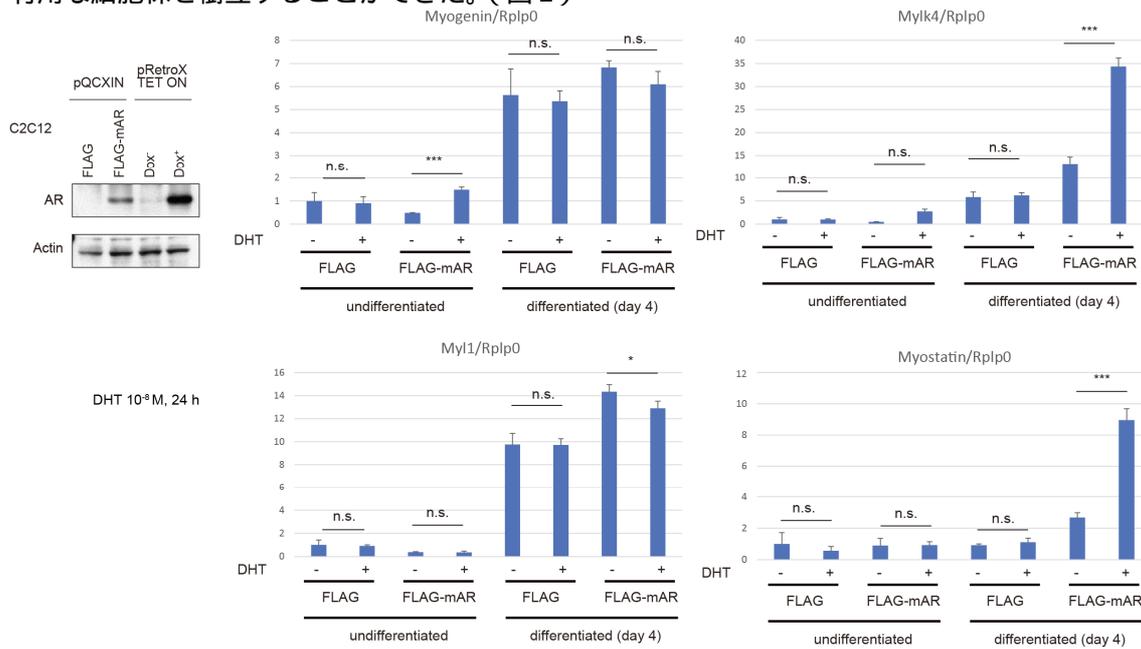


図2 アンドロゲン応答能を持った骨格筋細胞株の樹立

続いて、この C2C12-FLAG-AR 細胞を用いて AR パイオニア因子を取得すべく RIME 法による結合因子の探索を行った。分化後細胞を DHT 刺激し 6 時間後に細胞を回収し実験を行った。その結果、約 20 種類の候補因子を取得することに成功した(図3)

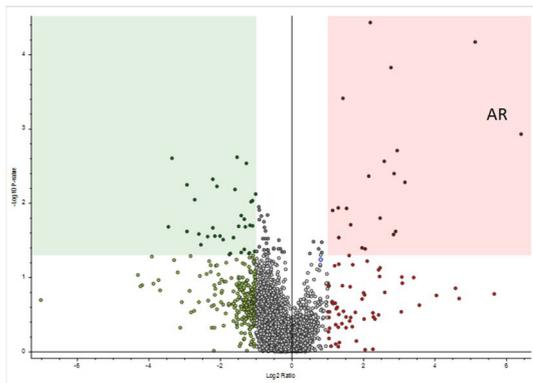


図3 RIME法によるAR相互作用因子の同定

IgG をコントロールに抗 AR 抗体により有意に濃縮されてくる因子群を右上の領域に示した(Fold Change (AR/IgG) > 2, P-value < 0.05)

さらに、この細胞株において AR の標的遺伝子を同定するために ChIP-seq を行った。その結果、既知の骨格筋特異的な AR 標的遺伝子 Mylk4 のコード領域を含む多数のピークを得ることに成功した。シーケンスデータから HOMER によるモチーフ解析を行い、AR 結合領域近傍に存在する転写因子結合配列を得ることに成功している。

上記の実験より得られた候補遺伝子群について、C2C12-FLAG-AR 細胞からゲノム編集により遺伝子欠損株を作製し、アンドロゲン応答能を評価する実験を現在行っている。この実験から、骨格筋特異的なアンドロゲン応答と規定する AR パイオニア因子が同定できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sugawara Akira, Shimada Hiroki, Otsubo Yuri, Kouketsu Takumi, Yokoyama Atsushi	4. 巻 46
2. 論文標題 Primary aldosteronism and obstructive sleep apnea: the strong ties between them	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 1712 ~ 1713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-023-01303-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Sayuri, Takada Ichiro, Hashimoto Kenichi, Yokoyama Atsushi, Nakagawa Tohru, Makishima Makoto, Kume Haruki	4. 巻 13
2. 論文標題 ESS2 controls prostate cancer progression through recruitment of chromodomain helicase DNA binding protein 1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-39626-0	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 -
1. 著者名 横山 敦、瀧澤 拓海、菅原 明	4. 巻 26
2. 論文標題 新たなアンドロゲン受容体制御因子を求めて	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本アンドロロジー学会ニュースレター	6. 最初と最後の頁 3-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 鈴木貴、山崎有人、岩淵英里奈、横山敦、高木清司、三木康宏	4. 巻 48
2. 論文標題 ステロイドホルモン研究における組織学的アプローチ	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 第48回組織細胞化学講習会 2023	6. 最初と最後の頁 197-206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama Atsushi, Suzuki Susumu, Okamoto Koji, Sugawara Akira	4. 巻 69
2. 論文標題 The physiological and pathophysiological roles of carbohydrate response element binding protein in the kidney	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 605 ~ 612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ22-0083	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kouketsu Takumi, Monma Rina, Miyairi Yuri, Sawatsubashi Shun, Shima Hiroki, Igarashi Kazuhiko, Sugawara Akira, Yokoyama Atsushi	4. 巻 615
2. 論文標題 IRF2BP2 is a novel HNF4 co-repressor: Its role in gluconeogenic gene regulation via biochemically labile interaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 81 ~ 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.04.133	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takada Ichiro, Hidano Shinya, Takahashi Sayuri, Yanaka Kaori, Ogawa Hidesato, Tsuchiya Megumi, Yokoyama Atsushi, Sato Shingo, Ochi Hiroki, Nakagawa Tohru, Kobayashi Takashi, Nakagawa Shinichi, Makishima Makoto	4. 巻 298
2. 論文標題 Transcriptional coregulator Ess2 controls survival of post-thymic CD4+ T cells through the Myc and IL-7 signaling pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102342 ~ 102342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102342	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimada Hiroki, Hata Shuko, Yamazaki Yuto, Otsubo Yuri, Sato Ikuko, Ise Kazue, Yokoyama Atsushi, Suzuki Takashi, Sasano Hironobu, Sugawara Akira, Nakamura Yasuhiro	4. 巻 23
2. 論文標題 YM750, an ACAT Inhibitor, Acts on Adrenocortical Cells to Inhibit Aldosterone Secretion Due to Depolarization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12803 ~ 12803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232112803	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama Atsushi, Kouketsu Takumi, Otsubo Yuri, Noro Erika, Sawatsubashi Shun, Shima Hiroki, Satoh Ikuro, Kawamura Sadafumi, Suzuki Takashi, Igarashi Kazuhiko, Sugawara Akira	4. 巻 5
2. 論文標題 Identification and Functional Characterization of a Novel Androgen Receptor Coregulator, EAP1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 bvab150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jendso/bvab150	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 -

1. 著者名 Sakakibara Iori, Yanagihara Yuta, Himori Koichi, Yamada Takashi, Sakai Hiroshi, Sawada Yuichiro, Takahashi Hirotaka, Saeki Noritaka, Hirakawa Hiroyuki, Yokoyama Atsushi, Fukada So-ichiro, Sawasaki Tatsuya, Imai Yuuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Myofiber androgen receptor increases muscle strength mediated by a skeletal muscle splicing variant of Mylk4	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102303 ~ 102303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102303	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12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 横山 敦、野呂 英理香、岡本 好司、松澤 拓郎、吉川 雄朗、島 弘季、五十嵐 和彦、菅原 明
2. 発表標題 炎症シグナルによるグルコース応答性転写因子ChREBPの機能制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第41回日本内分泌学会内分泌代謝学サマーセミナー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿部優香、横山 敦、小林 研太郎、菅原 明
2. 発表標題 タバコによるアンドロゲン受容体制御メカニズムの解析
3. 学会等名 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾坪 優季、島田 洋樹、横山 敦、中村 保宏、菅原 明
2. 発表標題 CYP11B2 と KCNJ5 変異体を標的とした原発性アルドステロン症の新規創薬
3. 学会等名 第45回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 氏家凌子、大内俊寛、末松 涉、瀧藤拓海、土井隆行、堤 良平、斎藤芳郎、横山 敦、菅原 明
2. 発表標題 糖新生経路を標的とした新規糖尿病創薬の試み
3. 学会等名 第45回日本内分泌学会東北地方会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横山敦、野呂英理、松澤拓郎、吉川雄朗、島弘季、五十嵐和彦、菅原明
2. 発表標題 炎症シグナルによるグルコース応答性転写因子ChREBPの機能制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第42回日本内分泌学会東北地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山敦、野呂英理、松澤拓郎、吉川雄朗、島弘季、五十嵐和彦、菅原明
2. 発表標題 炎症シグナルによるグルコース応答性転写因子ChREBPの機能制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山敦、瀧澤拓海、尾坪優李、沢津橋俊、島弘季、佐藤郁郎、川村貞文、鈴木貴、五十嵐和彦、菅原明
2. 発表標題 アンドロゲン受容体新規転写共役因子の探索
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会 第41回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山敦、瀧澤拓海、尾坪優李、沢津橋俊、島弘季、佐藤郁郎、川村貞文、鈴木貴、五十嵐和彦、菅原明
2. 発表標題 核内受容体受容体新規転写共役因子の探索
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会 第41回学術大会 シンポジウム4 次世代研究者シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Yokoyama
2. 発表標題 Functional regulation of the glucose-responsive transcription factor ChREBP by inflammatory signals.
3. 学会等名 公益法人ときわ会 先端医学研究センター 5周年記念国際シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山 敦、野呂 英理香、岡本 好司、松澤 拓郎、吉川 雄朗、島 弘季、五十嵐 和彦、菅原 明
2. 発表標題 炎症シグナルによるグルコース応答性転写因子ChREBPの機能制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横山敦、野呂英理香、岡本好司、松澤拓郎、吉川雄朗、島弘季、五十嵐和彦、菅原明
2. 発表標題 肝細胞におけるグルコース応答性転写因子ChREBPの機能制御因子の探索
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 研太郎、横山 敦、清水 恭子、菅原 明
2. 発表標題 タバコによるアンドロゲン受容体制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第25回日本臨床内分泌病理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本ビタミン学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 672
3. 書名 ビタミン・バイオフィクター総合事典	

〔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
---------	---------