

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09441

研究課題名(和文) アンドロゲン低下によるサルコペニア惹起機構の解明

研究課題名(英文) The molecular mechanism of sarcopenia associated with male menopause

研究代表者

福井 道明 (Fukui, Michiaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30247829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病合併症としての骨格筋萎縮・サルコペニアの重要性が注目されている。男性更年期障害は糖尿病の危険因子の一つであるがアンドロゲン低下とサルコペニア発症の機序が未解明である。本研究では睾丸摘出处置を行い、アンドロゲンシグナル遮断による骨格筋萎縮を再現し、Transcriptome解析を実施した。これによりscd1およびsmoxの発現低下を認めた。また、microRNAとしてmir23b-3pの発現上昇を認めた。mir23b-3pの発現上昇はpten抑制を介して筋管細胞の筋タンパク質合成を促進させていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Sarcopenia has been thought to be a diabetic complication. Sarcopenia occurs during male menopause, and it is a risk for diabetes. However, the molecular mechanism of sarcopenia caused by reduced androgen signal has not been clarified yet. We established a murine model for male menopause sarcopenia and performed a transcriptome analysis. Scd1 and smox were identified as mRNAs at low expression level in the atrophic soleus muscle. The expression level of mir23b-3p was upregulated in the atrophic muscle. We revealed that mir23b-3p could repress pten and could upregulate muscle protein synthesis.

研究分野：糖尿病学

キーワード：Sarcopenia Muscle atrophy Diabetes Glucose metabolism Metabolic syndrome Androgen Testosterone

1. 研究開始当初の背景

1-1) 糖尿病合併症としてのサルコペニア (骨格筋萎縮) の重要性

わが国の糖尿病患者数は、生活習慣と社会環境の変化に伴って急速に増加している。糖尿病合併症の進展は患者の生活の質(QOL)を著しく低下させるのみでなく、医療経済上も大きな負担を社会に強いており、それらの進行予防は最重要課題である。近年、糖尿病に伴う代謝異常、患者 ADL、生命予後にサルコペニア (筋萎縮) が強く関与していることが明らかとなってきた。サルコペニアの病態は加齢に伴う筋肉量および筋力や身体能力の低下であり、高齢者に身体的障害や ADL の低下などをもたらす。アンドロゲン低下はサルコペニア発症・進展の危険因子であるが詳細な分子機序は明らかでない。

1-2) 糖尿病患者におけるアンドロゲン低下とインスリン抵抗性

研究代表者はかねてから男性におけるアンドロゲン低下とインスリン抵抗性・糖代謝異常に関する基礎・臨床報告を実施し、国内外に世界に先駆けた知見を報告してきた (Senmaru T, Fukui M, et al. Metabolism 2013; Fukui M, et al. Diabetes Care 2000, 2003)。また、血清アンドロゲン濃度と筋肉量および筋力は相関を認めることが知られているが (Roy TA, et al. Am J Physiol Endocrinol Metab 2002)、糖尿病患者では同年齢の健常者に比べ、血清アンドロゲン濃度が低いことが分かっている (Fukui M, et al. Endocr J 2007)。アンドロゲン低下はインスリン抵抗性を惹起し、糖・脂質代謝異常等の生活習慣病や心血管イベント発症の重要な危険因子の一つである。研究代表者はアンドロゲン低下によりインスリン標的組織においてインスリンシグナルが抑制されるメカニズムを明らかにした (Senmaru T, Fukui M, et al. Metabolism 2013)。

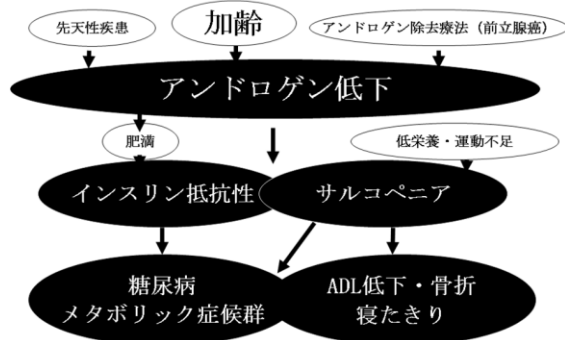


図 1: アンドロゲン低下によるサルコペニア発症と糖尿病

1-3) アンドロゲン低下とサルコペニア発症の機序が未解明

一方、糖尿病患者でアンドロゲンが低下するとどのようにサルコペニアの病態が形成されるか、その機序は明らかとなっていない。アンドロゲン低下によるサルコペニアのため

に、現在は生活習慣改善や薬物による対症療法が不可避であるがその効果は限定的と言わざるを得ない。またアンドロゲン補充療法の安全性は確立されていない。アンドロゲン低下によるサルコペニア発症において、遺伝子発現レベル、細胞レベルでの機序を明確化し、さらに Transcriptome 解析という網羅的手法を用いることで、アンドロゲン低下によるサルコペニアの予防や治療における新規ターゲットの発見や予防や治療技術の開発にイノベーションを引き起こすことができる。

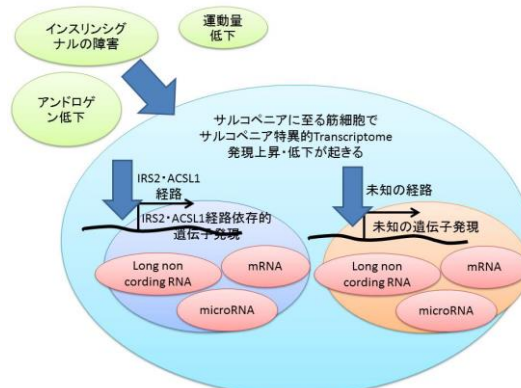


図 2: サルコペニア特異的 Transcriptome

2. 研究の目的

本研究では睾丸摘出 (Orchiectomy) 処置を行い、ヒトのアンドロゲン欠乏状態を再現し、アンドロゲンシグナル遮断によって発症した骨格筋萎縮における遺伝子発現の変化を明らかにするために Transcriptome 解析を実施した。これにより指摘されたサルコペニア特異的 mRNA, microRNA について、その分子生物学的機能を明らかにすることを目的とした。

こうすることで、いまだ明らかとなっていないアンドロゲン低下によるサルコペニア発症の分子生物学的機構を明らかにするとともに、糖代謝障害との関連を明らかにする。

また、糖尿病患者におけるアンドロゲン低下がサルコペニアを発症させ、インスリン抵抗性をきたす病態を解明するとともに、その病態に対する新規治療標的とその効果を検討する。

3. 研究の方法

3-1) 骨格筋萎縮を観察する至適飼育条件の検討

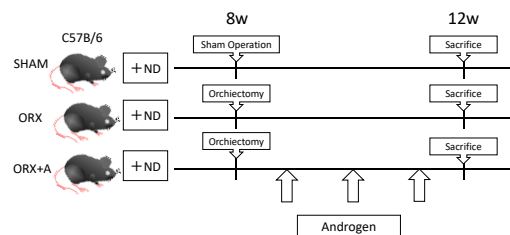


図 3: サルコペニアモデルマウスの作成

①8 週齢雄 C57BL/6J に Orchiectomized mice (去勢群)、Sham-operated mice (偽手術群) および Orchiectomy 後にアンドロゲン投与を

実施（アンドロゲン投与群）、普通食を4週間投与し、体重変化を経時的に測定した。12週齢で安静麻酔下にサクリフェイスし、ヒラメ筋を採取、重量を測定し、全RNAを抽出もしくは、病理標本を作製した。

②ヒラメ筋の最膨隆部位である筋腹の中央部よりも遠位端よりのおよそ3~5mm長で薄切横断切片を作成し、筋腹横断面積を測定した。

③糖・インスリン負荷試験を実施した。

3-2)サルコペニアを発症したヒラメ筋での Transcriptome 解析

抽出した全RNAを用いmicroRNAアレイを実施した。得られたデータについてバイオインフォマティクス解析により、サルコペニア特異的microRNAの探索を実施した。mRNAに関して、WEB上にアップロードされているGSE16486およびEMEXP2192を用い、バイオインフォマティクス解析により、サルコペニア特異的mRNAの探索を実施した。

今回の検討により明らかとなったサルコペニア特異的mRNAおよびサルコペニア特異的microRNAについて、その分子生物学的機能を*in vitro*および*in vivo*で検討した。

4. 研究成果

4-1)サルコペニアモデルマウスの作成

8週齢雄C57BL/6JにOrchiectomized mice（去勢群）、Sham-operated mice（偽手術群）およびOrchiectomy後にアンドロゲン投与を実施（アンドロゲン投与群）、普通食を4週間投与したところ、去勢群で明らかな体重、ヒラメ筋重量の減少を認め、アンドロゲン投与によりそれらの減少は偽手術と同等に抑制された。IPGTTを実施したところ、去勢群では体重減少にもかかわらず耐糖能が障害されていることが明らかとなった。

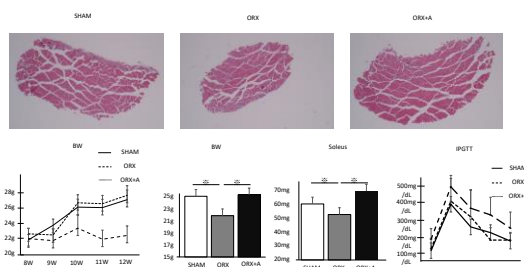


図4：サルコペニアモデルマウスの評価
上段に筋腹断面のHE染色を示した。下段左から体重経過、12週時の体重、ヒラメ筋重量、IPGTTを示した。

4-2)発現遺伝子の網羅的解析

GSE16486およびEMEXP2192を用いた網羅的解析から、サルコペニア特異的mRNAの候補を選出した。多数のmRNAがサルコペニア発症時に障害されていることが明らかとなったが、本研究ではそれらの候補の中からscd1・smoxに注目した解析を行った。

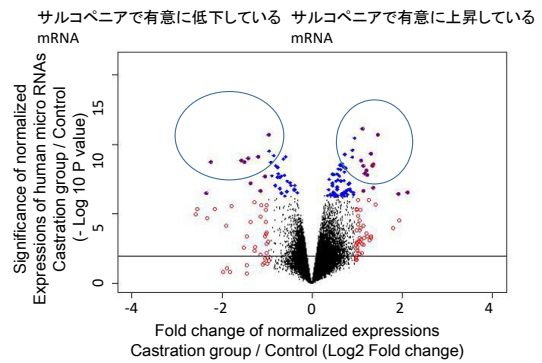


図5：サルコペニア特異的mRNA
得られたTranscriptomeデータの解析結果のVolcano Plot。X軸はサルコペニアでの発現変動、Y軸はそのP値の $-\log_{10}$ を示す。図右上の丸で囲まれた部分にサルコペニアで特異的に発現上昇がみられるmRNA、左上の丸で囲まれた部分に特異的に発現低下がみられるmRNAが図示されている。

4-3)サルコペニア特異的mRNA・scd1の機能解析

mRNAのバイオインフォマティクス解析から、去勢によるscd1の発現低下を認めた。scd1はパルミチン酸(C16:0)をパルミトレイン酸(C16:1)へ変換する酵素Stearoyl-CoA desaturase-1をコードしており、scd1の発現が低下することにより筋肉内パルミチン酸濃度が高まり、その細胞毒性で骨格筋細胞のアポトーシスが生じるとの仮説を立て、検証のため実験を実施した。

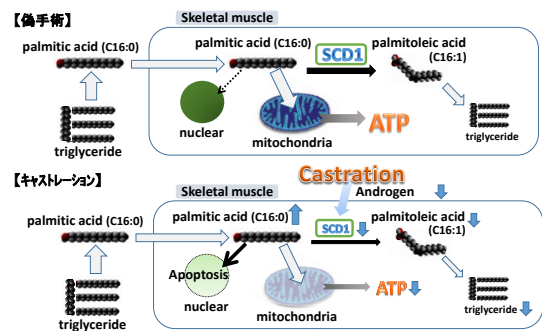


図5：アンドロゲンシグナル低下によるサルコペニアとscd1発現低下、それに伴うパルミチン酸代謝障害と細胞毒性

8週齢の雄C57BL/6Jマウスに去勢術を施行し、通常食にて8週間飼育し、対象群としてsham手術を施行した8週齢の雄C57BL/6Jマウスを同様に通常食にて8週間飼育した。

両群の飼育開始時の体重は21g前後と同等であったが、飼育8週間後には去勢術施行群平均23.8g、sham手術施行群平均27.2gであった。8週齢にてsacrificeし、ヒラメ筋を採取した。ヒラメ筋の重量は、去勢術施行群平均9.6g、sham手術施行群平均8.8gで、有意差は無かった。反応熱分解ガスクロマトグラフィー質量分析法を用いてヒラメ筋内

の遊離脂肪酸である C16:0 と C16:1 の比率 (C16:0/C16:1) を解析したが、両群に差は認められず (去勢術施行群 平均 6.7, sham 手術施行群 平均 5.7)、当初の仮説を支持する結果は得られなかった。

4-4)サルコペニアと smox 発現障害

mRNA のバイオインフォマティクス解析から、去勢による smox の発現低下を認めた。smox はポリアミンの一種であるスペルミンを代謝する spermine oxidase をコードする遺伝子である。このため、サルコペニアによる smox 発現低下は筋管細胞におけるスペルミン・スペルミンの欠乏を惹起し、筋管細胞の機能低下をきたす可能性が示唆された。

7 週齢の C57BL/6J マウスに去勢術を行い、2 群に分け片方にはポリアミンを除去した飼料、片方にはポリアミンを含有した (ポリアミン 0.05 %) 飼料を与えた。12 週齢にて麻酔安静下に組織の摘出を行った。筋組織の重量・断面積を計測、免疫染色も実施し筋萎縮を評価した。またヒラメ筋組織ポリアミン含有量を HPLC 法で測定する。Total RNA を抽出しポリアミン代謝関連 mRNA、microRNA の発現を Real time PCR で定量した。

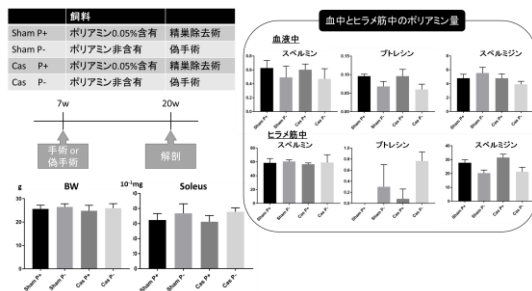


図 6：血中及びヒラメ筋中のポリアミン
去勢術及び偽手術、ポリアミン除去食及びポリアミンがんと夕食の 4 群を設定した。4 群の体重、およびヒラメ筋重量を左下段、ヒラメ筋組織ポリアミン含有量を右に示した。

去勢術によるアンドロゲン欠乏状態ではヒラメ筋内の骨格筋スペルミジン及びスペルミン量が低下することが明らかとなった。ポリアミン含有食では骨格筋スペルミジン及びスペルミン量が維持された

4-5)サルコペニア特異的 microRNA の網羅的解析

サルコペニアを発症したマウスヒラメ筋からの全 RNA 抽出を実施し、microRNA アレイを行った。得られた網羅的データのバイオインフォマティクス解析から、多数の microRNA の発現がサルコペニアにより変動することが明らかとなった。これらのうち miR-1, -133a, -133b, -206, -208, miR-499 といった既報において骨格筋特異的 microRNA がサルコペニアにおいても特異的に発現障害を受けることが明らかとなった。

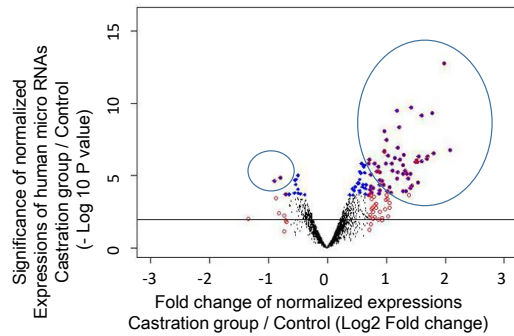


図 7：サルコペニア特異的 microRNA
得られた Transcriptome データの解析結果の Volcano Plot。X 軸はサルコペニアでの発現変動、Y 軸はその P 値の $-\log_{10}$ を示す。図右上の丸で囲まれた部分にサルコペニアで特異的に発現上昇がみられる microRNA、左上の丸で囲まれた部分に特異的に発現低下がみられる microRNA が図示されている。

4-6)サルコペニア特異的 microRNA ・ mir23-b3p の機能解析

本研究により指摘されたサルコペニア特異的 microRNA の候補のうち、今回新規に指摘した miR-23b-3p に注目し、その分子生物学的機能解析を実施した。

マウス筋芽細胞 C2C12 の培養と遺伝子導入：マウス筋芽細胞 C2C12 を 24-well plates に散布、基本培地で培養 (Day-2)、80%コンフルエントとなった時点で分化培地へ変更 (Day0)、培地変更 24 時間後に 30nM の miR-23b-3p mimic/inhibitor、スクランブル配列を X-tremeGENE siRNA トランスフェクション試薬にて遺伝子導入し (Day1)、48 時間後 (Day3)、96 時間後 (Day5) に筋管細胞形成を評価した。

評価項目

遺伝子発現：各時点で Total RNA を miRNeasy mini kit (Qiagen 社) により抽出し、RT-PCR で mir-23b-3p および U6 small nucleolar RNA を $\Delta\Delta CT$ 法により定量し評価した。同時に pte および gapdh を duplex Taqman real-time PCR assay に定量し評価した。

Pten 発現抑制：遺伝子導入時に pten 3' UTR construct (Catalog no. HmiT015535, Genecopoeia) もしくは control construct, pEZX-MT01 を microRNA と共導入し、48 時間後に dual-luciferase reporter assay system (Promega) にて測定した。

ATP 活性：Day3 に ATP アッセイを実施、ATP 活性を Berthold Detection Systems Orion L で測定した。

グルコース取り込み能：Day3 に分化培地に 3H で標識した 2-デオキシグルコース (2DG) を加え、24 時間培養に測定した。

細胞内シグナル：Day3 にインスリン (100ng/ml) 刺激を実施し、刺激前、刺激後、

0.5, 1, 2, 6, 12, 24 時間後に細胞抽出物を回収、ウエスタンブロット法により pAkt, Akt, p4EBP1, 4EBP1, pS6K, S6K 量を測定した。

マウス筋管細胞に miR-23b-3p の mimic と inhibitor を遺伝子導入し、発現を rt-PCR で確認した。miR-23b-3p を過剰発現させると PTEN の発現は抑制され、反対に miR-23b-3p を抑制すると PTEN の発現は亢進した。miR-23b-3p を抑制するとミオシン重鎖の形成が亢進することを免疫染色にて確認した。ATP 活性に両群で有意な差はなかった。

以上より miR-23b-3p は PTEN の発現を抑制することで、筋管細胞のミオシン重鎖形成を調節していると考えられた。

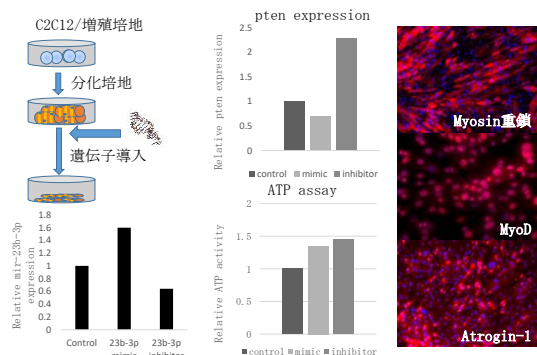


図 8:筋管細胞で mir-23b-3p 発現亢進が PTEN 発現、ミオシン重鎖形成、ATP 活性に与える影響

C2C12 を筋管細胞に分化させ、遺伝子導入を実施する概要を左上段に示した。遺伝子導入による mir23b-3p 発現変化、pten 発現変化、ATP 活性変化を示した。遺伝子導入を実施した筋管細胞の免疫染色を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 大坂貴史、濱口真英、岡村拓郎、橋本善隆、福田拓也、福井道明 骨格筋萎縮におけるアンドロゲンシグナルと microRNA 発現調整の検討 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2018 年 5 月 25 日 (東京).
- ② 岡村 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2018 年 5 月 25 日 (東京).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 道明 (Fukui Michiaki)

京都府立医科大学 医学研究科 内分泌・代謝内科学 教授

研究者番号：30247829

(2) 研究分担者

山崎 真裕 (Yamazaki Masahiro)

京都府立医科大学 医学研究科 内分泌・代謝内科学 講師

研究者番号：50309134

田中 武兵 (Tanaka Muhei)

京都府立医科大学 医学研究科 内分泌・代謝内科学 助教

研究者番号：70713717

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()