

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19705

研究課題名（和文）チロシンキナーゼFynがオートファジー活性を介してサルコペニアに与える影響の解明

研究課題名（英文）Evaluation of the impact of autophagy-mediated tyrosine kinase Fyn on sarcopenia.

研究代表者

佐々木 毅志（Sasaki, Tsuyoshi）

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50834446

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）：尾部懸垂による後肢非荷重モデルにおいて、Fynノックアウトマウスでは野生型と比較して後肢骨格筋量減少が軽度であり、オートファジー活性の低下を免れ、筋萎縮関連遺伝子の発現も上昇していない事、筋線維断面積が減少しない事を明らかにした。Fynによるオートファジー活性調節にIL-6/STAT3経路が関与している事をin vitro、in vivo双方の実験系を用いて明らかにした。これら結果よりFynがオートファジー活性を介して骨格筋量維持に負の影響を与える事およびその機序が明らかとなった。目的としていた実験が概ね完了した。結果を国際学会で発表し、英文科学誌に論文投稿を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では骨格筋培養細胞およびマウスを用いたサルコペニアモデルにより、チロシンキナーゼFynがサルコペニアを惹起する因子であるかどうかについての理解を深めた。本研究結果より、FynがIL-6/STAT3経路を介してオートファジー活性を調節し骨格筋量を制御している機構が明らかになった。サルコペニアは加齢に伴い骨格筋量が減少する原因不明の疾患であり、現時点で有効な治療薬は存在しない。本研究結果はサルコペニアの病態解明に寄与するものであり、Fyn、IL-6/STAT3経路がサルコペニア治療のための創薬のターゲットとなり得る可能性を示した。将来的にはサルコペニア治療への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In a hindlimb non-weight bearing model of tail suspension, Fyn knockout mice showed less reduction in hindlimb skeletal muscle mass, less reduction in autophagy activity, no elevated expression of skeletal muscle atrophy-related genes, and no reduction in muscle fiber cross-sectional area compared to wild-type mice. Using both in vitro and in vivo experimental systems, we demonstrated that the IL-6/STAT3 pathway is involved in the regulation of autophagy by Fyn. These results indicate that Fyn negatively influences the maintenance of skeletal muscle mass through the regulation of autophagy and that the IL-6/STAT3 pathway is involved in this pathway. The experiments were almost completed. The results were presented at an international conference and submitted for publication in an English scientific journal.

研究分野：整形外科学

キーワード：サルコペニア 骨格筋 オートファジー Fyn

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の筋量調節機構は数多く知られているが、筋量調節におけるオートファジーの機能については不明な点も多い。本研究で対象とするチロシナーゼ Fyn はオートファジー活性調節を介して筋萎縮に関与することが分かっている。しかしそのメカニズムには不明な点が多く、Fyn がどのような機序でサルコペニアを惹起するかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では *in vitro*, *in vivo* の両モデルを使用し、Fyn-STAT3 がサルコペニアを惹起する因子であるかどうかを明らかにすることを目的とする。C2C12 筋管細胞を用い、Fyn-STAT3 がオートファジーを調節する分子学的機構を検討する。さらには Fyn のノックアウトマウスを用いて Fyn-STAT3 が一次性・二次性サルコペニアを調節しうるかどうか、およびそのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* では Fyn と STAT3 の相互作用を分子学的手法により明らかにする。マウス C2C12 筋管細胞(Non-target および Fyn Knockdown(shFyn))にて炎症性サイトカイン IL6 による STAT3 のリン酸化が Fyn 依存性かどうかを確認する。また免疫沈降にて Fyn と STAT3 の相互作用を確認する。

(2) *in vivo* の系では野生型マウス、Fyn ノックアウトマウスを用いて二次性サルコペニアのモデルとして廃用性萎縮惹起モデルを作成し、筋肉量を測定してサルコペニアが起こるかどうかを検討する。廃用性萎縮惹起モデルでは後肢懸垂による非荷重モデルを用いる。マウスモデルの筋肉において Fyn、STAT3 の発現、リン酸化、IL6 発現の解析をウェスタンブロット法や定量的 PCR 法を用いて行う。さらに筋肉量を規定するとされている Atrogin1、MuRF1 の解析なども同時に行う。

上記 *in vitro* および *in vivo* の系において、オートファジー活性マーカーである LC3- / 比、オートファジーによって分解される基質 p62 の発現などを見ることでオートファジー状態の検討を行う。LC3- 量はオートファゴソームの量を表すが、その上昇は必ずしもオートファジーの活性上昇を意味しない。そのため、オートファゴソーム膜の分解阻害薬(オートファジー阻害薬)を投与した群と投与していない群の 2 群を比較し、阻害薬を投与した際に LC3- の量が変化するかどうかにより真にオートファジーフラックスが進行しているかどうかを検討を行う。

4. 研究成果

(1) *in vitro*

マウス C2C12 筋管細胞(Non-target)では IL6 投与時間および投与量依存性に STAT3 のリン酸化が増強したが、shFyn の C2C12 では IL6 投与にて STAT3 のリン酸化が認められず、IL6 による STAT3 リン酸化が Fyn 依存性であることが明らかとなった。免疫沈降では Fyn と STAT3 の結合が確認された。

オートファジーフラックスの系では、Non-target の C2C12 では IL6 投与によりオートファジー低下が認められたが、shFyn ではオートファジーの低下が認められず、IL6 によるオートファジー低下に Fyn が負の影響を与える事が明らかとなった。

(2) *in vivo*

尾部懸垂による後肢非荷重モデルにおいて、Fyn ノックアウトマウスでは野生型と比較して後肢骨格筋量減少が軽度であった。野生型マウスでは後肢非荷重により骨格筋における STAT3 のリン酸化が認められたが、ノックアウトマウスでは STAT3 のリン酸化が認められなかった。野生型マウスでは IL6 ならびに骨格筋萎縮関連遺伝子である Atrogin1 ならびに MuRF1 の mRNA 発現が上昇していたが、ノックアウトマウスでは発現は上昇していなかった。野生型マウスでは下肢骨格筋において p62 の蓄積が認められたが、ノックアウトマウスでは蓄積が軽度であった。野生型マウスでは後肢非荷重によって骨格筋のオートファジーフラックスが低下していたが、ノックアウトマウスではフラックスの低下は認められず、Fyn ノックアウトによってオートファジーが維持されていた。

in vitro と in vivo の両方の実験系を用いて、Fyn によるオートファジーの制御に IL-6/STAT3 経路が関与していることを示した。これらの結果は、Fyn がオートファジーの制御を通じて骨格筋量の維持に負の影響を与えること、そしてこの経路に IL-6/STAT3 経路が関与していることを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tsuyoshi Sasaki
2. 発表標題 Fyn Regulates the Interleukin-6/STAT-3/autophagy Axis in Sarcopenia
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2023 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------