

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09373

研究課題名(和文) アンドロゲン減少による骨格筋外組織からの骨格筋量の制御メカニズムの基盤的研究

研究課題名(英文) fundamental study for indirect regulations of skeletal muscle mass by androgen-like action outside of skeletal muscle fibers

研究代表者

雑賀 隆史 (Saika, Takashi)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10314676

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)：骨格筋量に関しては骨格筋線維以外でのandrogen作用により間接的に制御している可能性が示唆される。今回、血中androgen濃度を变化させたマウスを用い、骨格筋量へ影響を及ぼすタンパク質を同定し、その中でも上皮成長因子受容体(EGFR)は、血中androgenレベルと正の相関を示した。マウス筋芽細胞株であるC2C12にEGFRのリコンビナント蛋白を添加すると、Aktのリン酸化が亢進し、さらに蛋白合成が進む傾向にあることを見出した。そこで、EGFRリコンビナント蛋白をメスマウスに投与したところ、腓腹筋量が増大した。このことからアンドロゲンがEGFRを介して骨格筋を間接的に制御ものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化で健康寿命伸延が社会的課題となっているなか、フレイルへと進行するサルコペニアの原因、メカニズムの解明は喫緊の課題である。男性におけるアンドロゲンの低下が骨格筋量の低下を来すことでサルコペニアの一因となることは、前立腺癌治療におけるアンドロゲン除去療法の副作用として二次性サルコペニアを来すことから注目される。ところがアンドロゲンが骨格筋量を制御する詳細なメカニズムは未だ不明である。今回我々は、血中アンドロゲン濃度を变化させたマウスを用いることで、骨格筋量へ影響を及ぼすタンパク質を同定した。これは、今後骨格筋の維持に対する新たな治療法の確立に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Previous studies on skeletal muscle regulation by androgens suggest that skeletal muscle mass may be indirectly regulated by androgen action outside of skeletal muscle fibers. In this study, we identified proteins that affect skeletal muscle mass using mice with varying blood androgen levels, among which epidermal growth factor receptor (EGFR) was positively correlated with blood androgen levels. We found that the administration of EGFR recombinant protein to C2C12, a mouse myoblast cell line, tended to enhance Akt phosphorylation and further promote protein synthesis. Thus, administration of EGFR recombinant protein to female mice increased the gastrocnemius muscle mass. This suggests that androgens indirectly regulate skeletal muscle via EGFR.

研究分野：Urology andrology

キーワード：androgen androgen receptor 上皮成長因子受容体 骨格筋 Akt C2C12

1. 研究開始当初の背景

骨格筋萎縮は特に高齢者において転倒のリスクを増加させるなど ADL 低下を招くことで二次性サルコペニアの原因となる。さらにフレイルへと進行することで健康寿命を損なう。骨格筋萎縮を来すメカニズムは不明な点が多いが、男性においてはアンドロゲンの急激で持続的な低下や欠乏が強く関連することが考えられている。これまでのアンドロゲンによる骨格筋の制御に関する研究から、全身性アンドロゲン受容体 (AR) 欠損マウスでは骨格筋の筋力および筋量低下を認めるが、骨格筋特異的に AR をノックアウトしても、筋力は低下するものの筋量は低下しないことが明らかになっている。我々の独自の研究においても、骨格筋線維および筋幹細胞において AR をノックアウトしたマウスでは、骨格筋量の低下を認めないことを確認している。一方で、アンドロゲンを投与したマウスでは、著明な骨格筋量の増強を認めている。このことから、アンドロゲンが骨格筋以外の他の組織に作用した結果、血中の液性因子を介した作用により、間接的に骨格筋量の増強に寄与していると考えられた。

2. 研究の目的

骨格筋以外に存在する AR を介した、アンドロゲンによる間接的な骨格筋量の制御メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

生体内での血清中アンドロゲン濃度の変化に応じて、血清中で変化し骨格筋量の調節に関与すると考えられる血液液性因子に注目した。偽手術、精巣摘出術 (ORX) によるアンドロゲン遮断、および ORX 後のアンドロゲン補充を行った 3 群のマウスから得た血清を、質量分析によって網羅的に解析した。

4. 研究成果

血清中アンドロゲン濃度を変化させたマウスの血清を質量分析で解析し、アンドロゲン濃度と正の相関を示す蛋白を同定した (表 1)。その中でも上皮成長因子受容体 (EGFR) は、アンドロゲン濃度と最も強い相関を示した。

Gene name	Description	(ORX + Veh)/(sham + Veh)	(ORX + DHT)/(ORX + Veh)	Unique Peptide
Egfr	epidermal growth factor receptor	0.519	1.685	31
Tln1	taln 1	0.826	1.645	3
Hbb-b1	hemoglobin, beta adult major chain	0.743	1.603	11
Hba	hemoglobin alpha chain complex	0.792	1.473	9
Mb	myoglobin	0.794	1.453	4
Cap1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	0.746	1.403	2
Ces2e	carboxylesterase 2E	0.729	1.401	6
Ttr	transthyretin	0.653	1.335	8
Cycs	cytochrome c, somatic	0.723	1.241	2
Btbrb	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	0.772	1.238	4

表1 質量分析により同定した、アンドロゲン変化と正の相関を示す蛋白群

アンドロゲンを変化させた3群のマウスの各組織における *Egfr* の発現を qPCR で解析した結果、マウスの内臓脂肪として知られる精巣上体白色脂肪組織 (eWAT) において、*Egfr* の発現はアンドロゲン変化と正の相関を示した。このことから、eWAT が EGFR を血中への供給している組織として考えられた。過去の ChIP-seq のデータベースから、いくつかの細胞で EGFR の転写開始領域に AR のピークがあることが確認されている。そこで、3T3-L1 細胞株を脂肪細胞へ分化させ、活性型のアンドロゲンである DHT で処理し、AR に対する ChIP-qPCR を行った。その結果、DHT で処理した場合、有意に AR の結合が上昇していることが分かった (図1)。これは、少なくとも特定の細胞においては、アンドロゲンにより *Egfr* の発現調整がなされている可能性が示唆された。

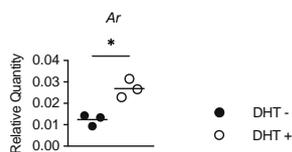


図1 EGFR の転写開始領域における AR に対する ChIP-qPCR

EGFR が骨格筋量を変化させる際、どのようなシグナルが関与しているかを調べるため、マウスの筋芽細胞株である C2C12 を用いて検証した。C2C12 を筋管へ分化させた後、EGFR のリコンビナント蛋白 (sEGFR) を添加し、一般的に蛋白合成を促進することで知られる Akt シグナルについてウェスタンブロットを用いて解析を行った。その結果、Akt のリン酸化、さらにその下流にある S6k のリン酸化が亢進することを見出した (図2)。これにより蛋白合成が促進することで骨格筋量を変化させる可能性が示唆された。

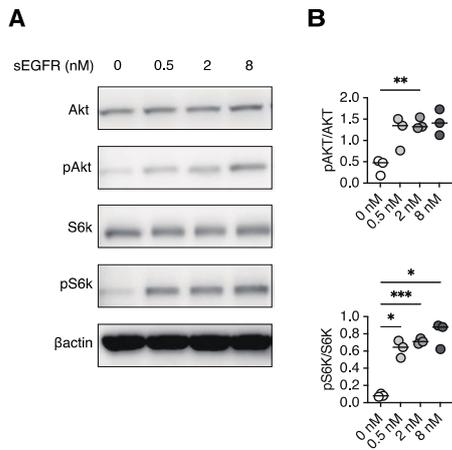


図2 ウェスタンブロットによる Akt 及び S6k のリン酸化 (A) と定量評価 (B)

そこで、sEGFR の骨格筋への作用を検証するため、メスのマウスに投与し、骨格筋の変化を解析した。その結果、下肢の骨格筋である腓腹筋において、わずかではあるが有意差をもって sEGFR が筋量を増大させることを見出した。

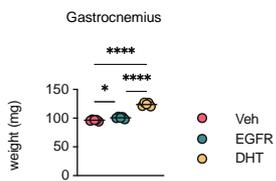


図3 EGFR に投与による腓腹筋の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Kato H, Saeki N, Imai M, Onji H, Yano A, Yoshida Y, Sakaue T, Fujioka T, Sugiyama T, Imai Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 LIM1 contributes to the malignant potential of endometrial cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2023.1082441	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 Nishimura K, Konishi T, Ochi T, Watanabe R, Noda T, Fukumoto T, Miura N, Miyauchi Y, Kikugawa T, Takenaka K, Saika T.	4. 巻 12
2. 論文標題 CD2110 B Cells Could Be a Potential Predictor of Immune-Related Adverse Events in Renal Cell Carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Pers Med.	6. 最初と最後の頁 888-894
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jpm12060888	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 Sakai H, Sawada Y, Tokunaga N, Tanaka K, Nakagawa S, Sakakibara I, Ono Y, Fukada S, Ohkawa Y, Kikugawa T, Saika T, Imai Y.	4. 巻 25
2. 論文標題 Uhrf1 governs the proliferation and differentiation of muscle satellite cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.103928	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 Kohara Yukihiro, Kitazawa Riko, Haraguchi Ryuma, Imai Yuuki, Kitazawa Sohei	4. 巻 154
2. 論文標題 Macrophages are requisite for angiogenesis of type H vessels during bone regeneration in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116200 ~ 116200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2021.116200	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 Xia Y, Ikedo A, Lee JW, Imura T, Inoue K, Imai Y.	4. 巻 590
2. 論文標題 Histone H3K27 demethylase, Utx, regulates osteoblast-to-osteocyte differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 132-138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.102.	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 Ikedo Aoi, Imai Yuuki	4. 巻 559
2. 論文標題 Estrogen receptor in mature osteoblasts regulates the late stage of bone regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 238 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.04.112	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大西智也
2. 発表標題 アンドロゲンによる骨格筋外組織からの間接的な骨格筋量の制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第8回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大西智也
2. 発表標題 アンドロゲンによる間接的な骨格筋量制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第27回日本病態プロテアーゼ学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大西智也
2. 発表標題 Mechanism of indirect regulation of skeletal muscle mass by androgene
3. 学会等名 第20回松山国際学術シンポジウム、PRIME共同研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大西智也
2. 発表標題 アンドロゲンによる骨格筋量の制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第32回泌尿器科分子細胞研究会
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
研究分担者	酒井 大史 (Sakai hiroshi) (00820804)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教 (16301)	
研究分担者	今井 祐記 (Imai yuki) (10423873)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授 (16301)	
研究分担者	菊川 忠彦 (Kikugawa Tadahiko) (70444734)	愛媛大学・医学部附属病院・准教授 (16301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	三浦 徳宣 (Miura Noriyoshi) (80554427)	愛媛大学・医学部附属病院・講師 (16301)	

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