

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17568

研究課題名(和文) アンドロゲンの骨格筋量維持増加作用の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of the effect of androgens on the maintenance and the hypertrophy of skeletal muscle mass.

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、間葉系前駆細胞特異的に、アンドロゲン受容体を欠損させたマウスを作出し、その表現型を解析することである。まず、間葉系前駆細胞特異的AR欠損マウス(PDGFR⁺-CreER; ARf/y)を作出した。しかしながら、定常状態における骨格筋では、重量、筋線維数・サイズともに差が見られなかった。また、骨格筋組織内で脂肪細胞を誘導するため、高脂肪食を投与した。しかしながら、体重、筋重量、内臓並びに皮下脂肪量、骨格筋内脂肪量ともに、差が見られなかった。以上の結果から、間葉系前駆細胞でのアンドロゲン受容体の機能は、定常状態ならびに脂肪誘導状態の骨格筋に対して、限定的である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、間葉系前駆細胞特異的に、アンドロゲン受容体を欠損させたマウスを作出し、その表現型を解析することで、アンドロゲンと間葉系前駆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 purpose of this study was to generate mesenchymal progenitor cell-specific, androgen receptor-deficient mice and to analyze their phenotype. First, we generated mesenchymal progenitor cell-specific AR-deficient mice (PDGFR⁺-CreER; ARf/y). However, no differences were observed in skeletal muscle at steady state, both in weight and number and size of myofibers. In addition, a high-fat diet was administered to induce adipocytes in the skeletal muscle tissue. However, no differences were observed in body weight, muscle weight, visceral and subcutaneous fat mass, or fat mass within skeletal muscle. These results suggest that androgen receptor function in mesenchymal progenitor cells is limited to skeletal muscle in the steady state and in the adipose-induced state.

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 間葉系前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

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 (Butenandt, 1935; Ruzicka, 1935)、アンドロゲンの骨格筋に対する生理作用については、膨大な研究が行われてきた。しかしながら、古くから筋力増強目的にヒトに投与されてきたにも関わらず、「アンドロゲンが、骨格筋において、どの細胞を標的として、どのような作用機序で筋量を増加し筋力増強しているのか」という、まさに核心をなす学術的「問い」には、明確な答えが未だにない。この問いに応ずるのが本研究の課題である。

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)。これまで、骨格筋の恒常性維持には、骨格筋の組織幹細胞である骨格筋幹細胞が最も重要と考えられてきた。しかし、近年の研究により、定常状態における骨格筋の維持には、骨格筋幹細胞は必須ではないことが示された (Fry, 2014)。それに対して、骨格筋の間質には、間葉系前駆細胞が存在しており (Uezumi, 2010)、この間葉系前駆細胞を特異的に欠損したマウスでは、骨格筋の萎縮が観察されたことから、間葉系前駆細胞が定常状態の骨格筋維持に必須であることが示された (Wosczyzna, 2019)。アンドロゲン受容

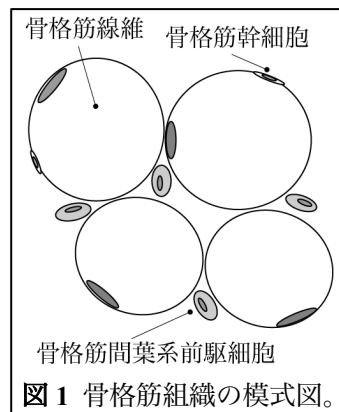


図 1 骨格筋組織の模式図。

体 (androgen receptor, AR) の各細胞での分布については、骨格筋線維、骨格筋幹細胞、間葉系前駆細胞のいずれにも発現していることを、申請者が先行研究により明らかにした (Sakai, 2020 ならびに unpublished data)。この三者の細胞のうち、骨格筋線維と骨格筋幹細胞における AR の役割に関しては、申請者の先行研究を含め、複数の報告がある。しかしながら、定常状態の骨格筋組織維持に必須である間葉系前駆細胞における AR を介する機能については、明らかにできていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、間葉系前駆細胞特異的に、アンドロゲン受容体を欠損させたマウスを作出し、その表現型を解析し、骨格筋の間葉系前駆細胞での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) 間葉系前駆細胞特異的 AR 遺伝子欠損マウスの作出ならびに定常状態の骨格筋の評価

間葉系前駆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 (*PDGFRa-CreER*, Kang, 2010) と、AR flox マウス (*AR^{f/y}*) との交配により、間葉系前駆細胞特異的 AR 欠損マウス (*PDGFRa-CreER;AR^{f/y}*) を作出する (図 2)。また、同腹のマウスからコントロール群として *PDGFRa-CreER* マウスを使用する。実験では、雄マウスのみを使用する。以下、この 2 群のマウス (*PDGFRa-CreER* マ

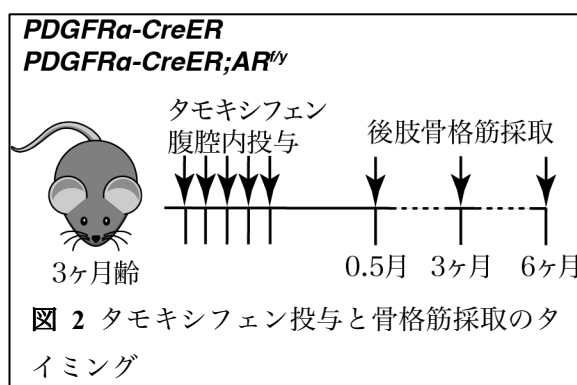


図 2 タモキシフェン投与と骨格筋採取のタイミング

ウスならびに *PDGFRα-CreER;AR^{fl/y}* マウス) を用いて実験を行う。このマウス群に対して、3 ヶ月齢時に、タモキシフェンを腹腔内投与することで、*PDGFRα* 陽性細胞特異的に、AR 遺伝子欠損を誘導する。

(2) 間葉系前駆細胞特異的 AR 遺伝子欠損マウスの定常状態の骨格筋の評価

筋力測定の後、後肢の各種骨格筋を採取し、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。その後、間葉系前駆細胞のマーカである *PDGFRα* での免疫染色を行い、骨格筋間葉系前駆細胞数を定量する。また、骨格筋線維を取り巻く細胞外基質である Laminin に対する免疫染色を行い、筋線維横断面積 (cross sectional area, CSA) を測定することで、筋線維が縮小・肥大を定量する。さらに、骨格筋幹細胞のマーカである Pax7 で染色することで、筋幹細胞数を定量する。加えて、骨格筋の線維型を、それぞれの特異的な抗体を用いて染め分け、その比率ならびにサイズを定量する。

(3) 間葉系前駆細胞特異的 AR 遺伝子欠損マウスにおける脂肪細胞誘導

間葉系前駆細胞における AR の発現が、骨格筋組織内の脂肪細胞に影響を与えるかどうかを確認するために、*PDGFRα-CreER* マウスならびに *PDGFRα-CreER;AR^{fl/y}* マウスに高脂肪食を与える。脂肪誘導後、筋重量を測定し、肉眼的変化を観察後、凍結切片を作成する。凍結切片では、脂肪細胞を取り巻く perilipin を染色することで、脂肪量を定量する。さらに、CSA を測定することで、骨格筋線維の肥大を定量する。

4. 研究成果

(1) *PDGFRα-CreER;AR^{fl/y}* マウスにおいて、間葉系前駆細胞特異的 AR 欠損が確認された。

PDGFRα-CreER マウスと *AR^{fl/+}* マウスを交配することで、*PDGFRα-CreER* マウス (対照マウス) と *PDGFRα-CreER;AR^{fl/y}* マウス (変異マウス) を作成した (図 3A)。タモキシフェン投与後に、*PDGFRα* 陽性細胞特異的な AR 遺伝子欠損を確認した (図 3B)。また対照マウスと比較して、変異マウスでは、*PDGFRα* 陽性細胞数に変化は見られなかった (図 3C)。

(2) 間葉系前駆細胞特異的 AR 欠損は、四肢の骨格筋に限定的に影響した。

変異マウスにおいて、タモキシフェン投与後 2 週間で、全身の骨格筋を評価した (図 4A)。TMX 投与 2 週間後の体重および四肢骨格筋量は、対照マウスと比較して変異マウスでは影響を受けなかった (図 4B)。

また、上腕二頭筋 (BB) と前脛骨筋 (TA) の筋線維数と最小フェレット径は、変異マウスで変化しなかった (図 4C、E)。筋肥大には、間葉系前駆細胞と筋幹細胞の間のシグナル伝達が重要であることから、筋幹細胞の数を定量した。筋幹細胞のマーカである Pax7 を染色したところ、筋幹細胞数に差はなかった (図 4D、F)。次

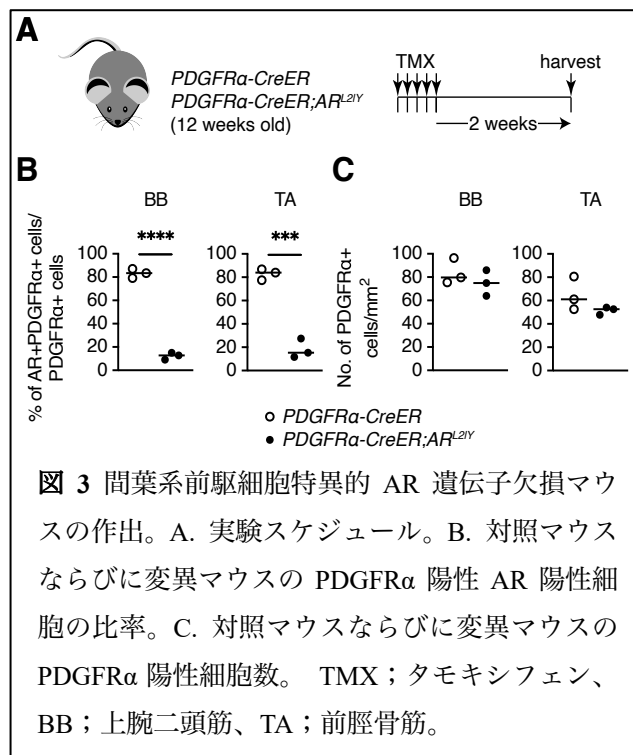


図 3 間葉系前駆細胞特異的 AR 遺伝子欠損マウスの作出。A. 実験スケジュール。B. 対照マウスならびに変異マウスの *PDGFRα* 陽性 AR 陽性細胞の比率。C. 対照マウスならびに変異マウスの *PDGFRα* 陽性細胞数。TMX; タモキシフェン、BB; 上腕二頭筋、TA; 前脛骨筋。

に、遅筋型のヒラメ筋の線維型について検討した。I 型、IIa 型、IIx/IIb 型の免疫組織染色によりヒラメ筋の線維型を解析したところ、各線維型のパラメータ(最小フェレット径とその構成比率)は、対照マウスと変異マウスでいずれも差がなかった (図 4G, H)。さらに、変異マウスの握力は、対照マウスと同等であった (図 4C)。このように、間葉系前駆細胞における AR の欠損は、四肢の筋肉に限定的に影響を及ぼすことがわかった。

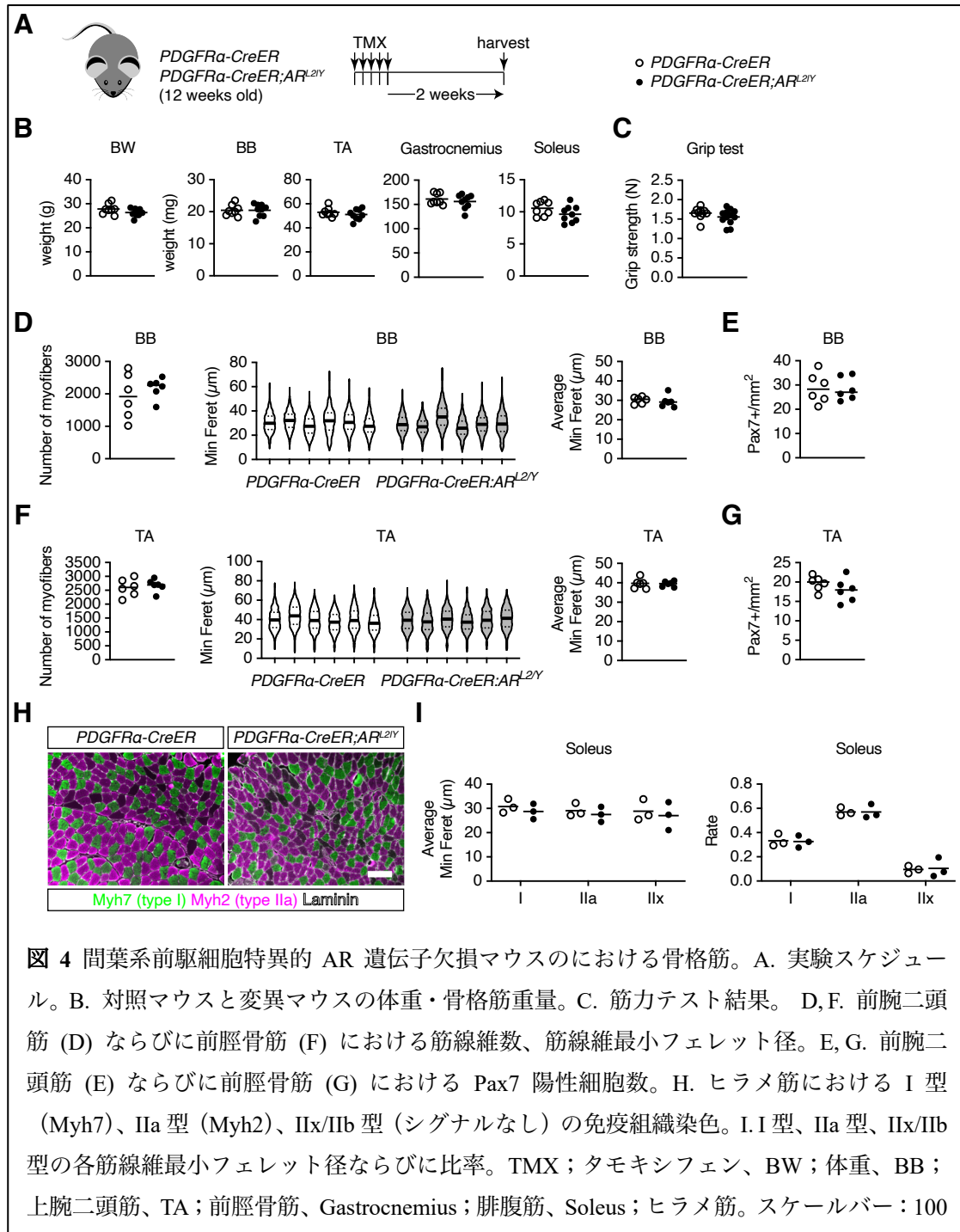


図 4 間葉系前駆細胞特異的 AR 遺伝子欠損マウスにおける骨格筋。A. 実験スケジュール。B. 対照マウスと変異マウスの体重・骨格筋重量。C. 筋力テスト結果。D, F. 前腕二頭筋 (D) ならびに前脛骨筋 (F) における筋線維数、筋線維最小フェレット径。E, G. 前腕二頭筋 (E) ならびに前脛骨筋 (G) における Pax7 陽性細胞数。H. ヒラメ筋における I 型 (Myh7)、IIa 型 (Myh2)、IIx/IIb 型 (シグナルなし) の免疫組織染色。I. I 型、IIa 型、IIx/IIb 型の各筋線維最小フェレット径ならびに比率。TMX; タモキシフェン、BW; 体重、BB; 上腕二頭筋、TA; 前脛骨筋、Gastrocnemius; 腓腹筋、Soleus; ヒラメ筋。スケールバー: 100

(3) 間葉系前駆細胞特異的 AR 遺伝子欠損マウスは、高脂肪食による脂肪誘導において影響を受けなかった。

骨格筋の間葉系前駆細胞は、骨格筋組織内の脂肪細胞の起源であることが知られている。そこで、間葉系前駆細胞が脂肪化する際の AR の影響を調べるため、対照マウスと変異マウスに高脂肪食を与えた (図 5A)。しかしながら、高脂肪食投与 8 週間後においても、体重および四肢骨格筋量は、対照マウスと比較して変異マウスで差が見られなかった (図 5B)。さらに、内臓脂肪量ならびに皮下脂肪も、両者で差が見られなかった (図 5C)。骨格筋組織内の脂肪量を perlipin 染色で比較したところ、単位面積あたりの脂肪量に差は見られなかった (図 5E, F)。加えて、筋力、筋線維の最小フェレット径も変化が見られなかった (図 5C, F)。以上のことから、間葉系前駆細胞における AR が、骨格筋間葉系前駆細胞の脂肪化において必須ではないことが示された。

以上の結果から、間葉系前駆細胞での AR の機能は、定常状態と脂肪誘導状態の骨格筋に対して、限定的である。

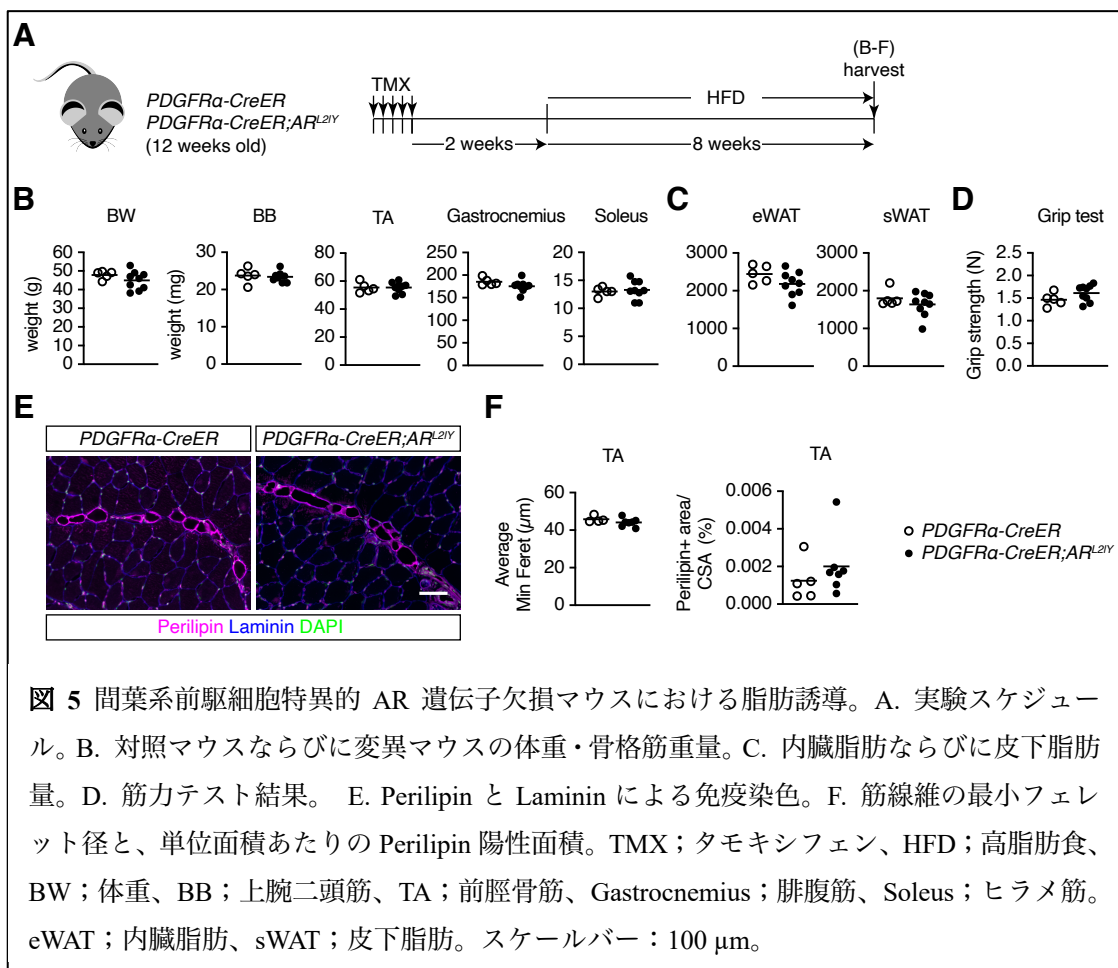


図 5 間葉系前駆細胞特異的 AR 遺伝子欠損マウスにおける脂肪誘導。A. 実験スケジュール。B. 対照マウスならびに変異マウスの体重・骨格筋重量。C. 内臓脂肪ならびに皮下脂肪量。D. 筋力テスト結果。E. Perilipin と Laminin による免疫染色。F. 筋線維の最小フェレット径と、単位面積あたりの Perilipin 陽性面積。TMX；タモキシフェン、HFD；高脂肪食、BW；体重、BB；上腕二頭筋、TA；前脛骨筋、Gastrocnemius；腓腹筋、Soleus；ヒラメ筋。eWAT；内臓脂肪、sWAT；皮下脂肪。スケールバー：100 μ m。

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 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6件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Hiroshi Sakai
2. 発表標題 Androgens and Skeletal Muscle
3. 学会等名 HIRAKU-Global International Symposium/Annual Conference FY2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroshi Sakai
2. 発表標題 Androgen action on skeletal muscle
3. 学会等名 1st Symposium on "Skeletal muscle cells in Growth and Disease" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 酒井 大史, 今井 祐記
2. 発表標題 骨格筋間葉系前駆細胞におけるアンドロゲン受容体の解析
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi Sakai, Yuuki Imai
2. 発表標題 Androgen receptor in mesenchymal progenitors of skeletal muscle.
3. 学会等名 第20回松山国際学術シンポジウム（プロテイン・アイランド・松山2022）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井大史
2. 発表標題 骨格筋間葉系前駆細胞におけるアンドロゲン受容体の解析
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 酒井 大史
2. 発表標題 Androgens and Skeletal muscles
3. 学会等名 HIRAKU-Global 年次大会2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022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
---------	---------