

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32634

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24680070

研究課題名(和文)筋局所アンドロゲン産生機構の新たな筋萎縮予防メカニズム

研究課題名(英文)Mechanism of androgen production in skeletal muscle and muscle atrophy suppression

研究代表者

相澤 勝治(Aizawa, katsuji)

専修大学・文学部・准教授

研究者番号：80375477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、身体運動に应答する骨格筋局所の活性型アンドロゲン産生が筋萎縮抵抗性に及ぼす影響について検討した。性ホルモン合成酵素の5 α -reductase (srd5a1)を介した活性型アンドロゲン(DHT)は、骨格筋のタンパク合成と分解抑制の両面に関与していた。また、身体運動应答性を示すsrd5a1の転写活性因子としてEgr2を同定した。筋局所の活性型アンドロゲンは、運動による骨格筋代謝に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is believed that dihydrotestosterone (DHT) is the most powerful androgen converted by testosterone through 5 α -reductase (srd5a1). However, it remains to be elucidated whether muscular DHT production through srd5a1 is locally involved in skeletal muscular plasticity. Here we found that local DHT production in skeletal muscle induced muscular hypertrophy with acceleration of the protein synthesis and inhibited muscular atrophy through the suppression of atrophy-related gene expression. Transcriptional regulation of srd5a1 is controlled by early growth response2 (egr2). These observations indicate that bioactive androgen production through srd5a1 locally play an important role in skeletal muscle metabolism.

研究分野：体力科学

キーワード：アンドロゲン サルコペニア 骨格筋 自己分泌

1. 研究開始当初の背景

骨格筋機能の維持・向上にアンドロゲン(男性ホルモン)が重要であることはよく知られている。アンドロゲンやエストロゲンなどの性ホルモンは、卵巣、精巣、副腎などの内分泌腺から分泌されると古くから考えられてきた。しかし、近年の報告によって、性腺以外に、骨や肝臓などの末梢組織においても性ホルモンが産生・分泌されることが明らかとなってきた(Van Der Eerden et al, *Endocrinology*, 2002)。研究代表者らは、これまでに骨格筋組織においても性ホルモンが産生される可能性を報告してきた(Aizawa et al, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007)。

一方、アンドロゲン受容体との親和性がテストステロンに比べ高いことから、活性型アンドロゲンと呼ばれるジヒドロテストステロン(DHT)は、性ホルモン合成酵素である5 α -reductase(srd5a1)の修飾によってテストステロンから生成される。研究代表者らは、srd5a1が運動刺激に鋭敏に反応して、その発現が骨格筋において増大することを示した(Aizawa et al, *Steroids*, 2010)。これらのことから、身体運動によるsrd5a1を介した筋局所の活性型アンドロゲン産生機構は、骨格筋機能の維持・改善に役割を果たしている可能性が推察される。

加齢に伴い身体機能は低下することから、低下する身体機能を運動・スポーツにより維持・向上させることは、生活の質を高める上で重要である。骨格筋においては、血中アンドロゲンレベルの低下が骨格筋萎縮を主病態とする加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)の発症と関連していることが指摘されている(Mauras et al, *J Clin Endocrinol Metab*, 1998)。骨格筋の萎縮には筋特異的ユビキチンリガーゼであるMAFbx/atrogen-1やMuRF1が深く関与しており、筋萎縮を対象とした多くの研究でそれらの発現が増大することが示されている(Ian et al, *Cell*, 2004)。一方、筋萎縮ラットへのテストステロン投与によって、骨格筋におけるMAFbx/atrogen-1やMuRF1の発現が抑制され(Marcelo et al, *J Appl Physiol*, 2010)、また副腎アンドロゲンであるDHEA投与と筋力トレーニングの併用は、高齢者の筋機能を向上させることが示されている(Dennis et al, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006)。これらのことから、アンドロゲンが筋のタンパク合成・異化バランスに影響し、筋機能の維持に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

これまでに研究代表者らは、アンドロゲンが筋局所において産生されることを明らかにし、とくに運動トレーニングによる筋肥大

に活性型アンドロゲンのDHTが深く関与していることを示してきた(Aizawa et al, *Med Sci Sports Exerc*, 2011)。しかしながら、筋局所の活性型アンドロゲン産生が加齢や不活動に伴う筋萎縮へ関与するか否かについては全く明らかにされていない。筋萎縮の予防策として外因的に性ホルモンを投与するホルモン補充療法が行われているが、骨格筋内における活性型アンドロゲン産生が筋萎縮抵抗性に関与することを明らかに出来れば、新たなサルコペニア予防メカニズムを提示できると考えられる。また、サルコペニア発症リスクが高まる高齢者に対して、筋局所アンドロゲン産生機構に着目した新たな運動処方確立出来れば、筋機能改善に伴う高齢者の転倒防止や生活習慣病予防としての応用が可能である。

2. 研究の目的

本研究は、身体運動にตอบสนองした局所アンドロゲン産生が、筋萎縮抵抗性に及ぼす影響とそのメカニズムを明らかにすることを目的とし、「(1)筋局所アンドロゲン産生機構が筋タンパク合成・分解系に及ぼす影響」、「(2)身体運動応答性srd5a1の転写調節メカニズムとその生理的役割について」を検討する。主にsrd5a1発現ベクターを用いた筋タンパク合成・異化作用と筋萎縮抵抗性への関与を培養筋細胞およびマウス個体において検討する。さらに、srd5a1のプロモーターのレポーターを用いて、身体運動応答性の筋局所アンドロゲン産生の転写メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究の課題を明らかにするために、以下の実験を行った。

実験1ではsrd5a1が筋タンパク合成に及ぼす影響について検討した。Srd5a1遺伝子を培養筋細胞に導入し、srd5a1を介した筋局所活性型アンドロゲン産生が筋タンパク合成系に及ぼす影響について検討した。

実験2では、srd5a1遺伝子を導入した培養筋細胞に対して、デキサメタゾン添加により筋萎縮を誘導し、筋管の形態的变化と骨格筋特異的ユビキチンリガーゼMAFbx/atrogen-1やMuRF1の発現が筋局所アンドロゲンによって抑制される否かについて検討した。

実験3では、骨格筋局所アンドロゲン産生の筋萎縮へ与える影響を検討するため、srd5a1強制発現ベクターをマウス骨格筋(前脛骨筋)へエレクトロポレーション法により導入した。その後マウス下肢に対してギプス固定(7日間)による筋萎縮を誘導した。ギプス固定7日後、骨格筋(前脛骨筋)を摘出し、筋重量、筋横断面積、筋萎縮関連遺伝子

MAFbx/atrogin-1およびMuRF1の遺伝子発現を評価した。

実験4では、運動誘発性srd5a1の転写調節機序を明らかにするために、srd5a1プロモーター領域を挿入したレポーターベクターを作製し、ヒト上皮細胞株 (HeLa細胞) およびマウス骨格筋芽細胞株 (C2C12細胞) に遺伝子を導入後、srd5a1の転写活性をルシフェラーゼアッセイにて評価した。

実験5では、srd5a1 転写調節因子の身体運動との関連性を明らかにするために、マウスを用いて、急性運動負荷に対する Egr2 の運動時応答性について検討した。若年マウスを対象に一過性トレッドミル走 (20m/min, 60min) を実施した。

4. 研究成果

実験1では、srd5a1 を骨格筋培養細胞へ導入した結果、タンパク合成開始因子である p70S6K のリン酸化レベルの増大が認められた (図1)。

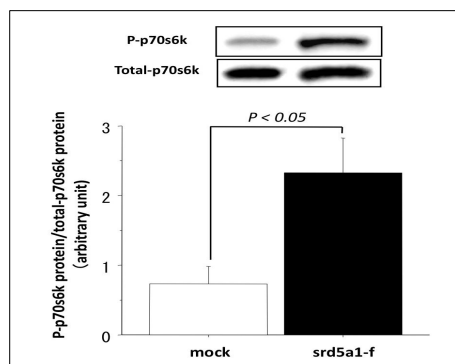


図1. Srd5a1 発現ベクター導入によるタンパク合成開始因子 p70S6K のリン酸化レベルの変化

また、培養骨格筋で産生された筋組織中の DHT 濃度が明らかに増大した。このことは、srd5a1 を介した活性型アンドロゲン産生機構は、筋タンパク合成に働いている可能性が示唆された。

実験2では、srd5a1を介した筋局所活性型アンドロゲン産生と筋萎縮抑制の関連性を明らかにすることを目的とした。その結果、デキサメタゾン誘導性による筋萎縮はsrd5a1導入によりMAFbx/atrogin-1の遺伝子発現を抑制することが示された。これらの結果より、骨格筋局所におけるsrd5a1を介した活性型アンドロゲン産生機構は、骨格筋のタンパク合成と分解抑制の両面に関与し、骨格筋適応に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

実験3では、骨格筋局所における srd5a1 を介した活性型アンドロゲン産生が筋萎縮に及ぼす影響についてマウスを用いて検討した。その結果、ギプス固定による筋萎縮誘導により筋重量及び筋横断面積がみられた

が、srd5a1 導入脚では、ギプス固定に伴う筋重量及び筋横断面積の減少がコントロール脚と比べ抑制された (図2)。

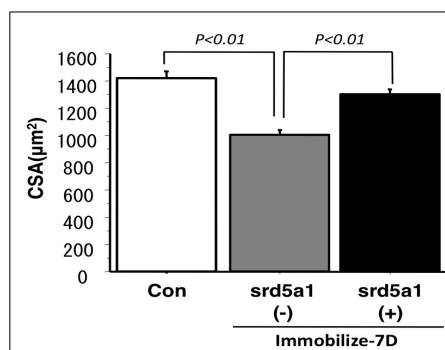


図2. Srd5a1 を介した活性型アンドロゲン産生が筋萎縮抵抗性に及ぼす影響

また、srd5a1 導入脚では MAFbx/atrogin-1 および MuRF1 遺伝子発現もコントロール脚に比べ抑制された。骨格筋局所における srd5a1 を介した活性型アンドロゲン産生は、筋萎縮の抑制に関与していることが明らかとなった。

実験4では、srd5a1 の転写活性因子として最初期遺伝子 Egr2 を同定した。骨格筋培養細胞への Egr2 導入により srd5a1 遺伝子発現が増大することが示された。

実験5では、運動前後の Egr2 遺伝子・タンパク質発現応答について測定した。その結果、運動後に骨格筋における Egr2 遺伝子・タンパク質発現量は明らかに増大した (図3)。このことは、srd5a1 の転写調節因子である Egr2 は、運動時応答性を示す可能性が示された。

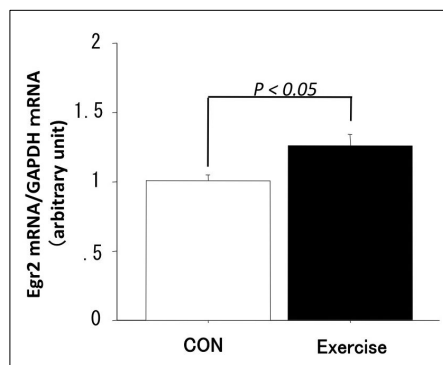


図3. 急性運動負荷による Egr2 の遺伝子発現応答

以上のことより、身体運動応答性を示す srd5a1 を介した局所活性型アンドロゲン産生は Egr2 による転写制御を受け、運動による骨格筋代謝に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Wada S, Kato Y, Sawada S, Aizawa K, J.H. Park, A.P. Russell, Ushida T, Akimoto T. MicroRNA-23a has minimal effect on endurance exercise-induced adaptation of mouse skeletal muscle. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 467, 389-398, 2015, 査読有. doi:10.1007/S00424-014-1517z.

J.H. Park, Aizawa K, Akimoto T, Iemitsu M, Agata U, Maeda S, K Lim, Omi N. Dehydroepiandrosterone administration increased trabecular mass and dihydrotestosterone levels in the cancellous region of the tibia in young female rats. *Horm Metab Res*. 46(9), 651-655, 2014, 査読有. doi: 10.1055/s-0034-1374630.

相澤勝治. 身体運動の価値を分子レベルから解明する: 骨格筋が性ホルモンを産生する意味とは. 月刊スポーツメディスン 9・10月合併号, 25巻8号, 20-24, 2013, 査読無.

Akimoto T, Okuhira K, Aizawa K, Wada S, Honda H, Fukubayashi T, Ushida T. Skeletal muscle adaptation in response to mechanical stress in p130Cas^{-/-} mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 304(6), C541-547, 2013, 査読有. doi: 10.1152/ajpcell.00243.2012.

相澤勝治, 目崎 登. 運動とは何か: 性ホルモンと運動. 公衆衛生. 76巻, 448-451, 2012, 査読無.

URL: <http://www.igaku-shoin.co.jp/journalPortal.do?journalPortalId=401>.

相澤勝治. 女性アスリートの医科学的サポートを考える. 女性アスリートの筋力増強. 臨床スポーツ医学. 30巻, 167-171, 2012, 査読無.

URL: <http://www.rinspo.jp>.

Sato K, Iemitsu M, Aizawa K, Mesaki N, Ajisaka R, Fujita S. DHEA administration and exercise training improves insulin resistance in obese rats. *Nutrition & Metabolism*. 30, 47, 2012, 査読有.

doi: 10.1186/1743-7075-9-47.

[学会発表](計7件)

相澤勝治. 性ホルモン分泌器官としての骨格筋の可能性. 第22回日本運動生理学会大会. 2014年7月19日, 岡山県倉敷市.
相澤勝治, 家光素行, 佐藤幸治, 目崎 登. 筋局所アンドロゲン産生を介した高齢期の筋機能改善メカニズム. 日本体

育学会第65回大会. 2014年8月28日, 岩手県盛岡市.

相澤勝治, 目崎 登, 牛田多加志, 秋本崇之. メカニカルストレスを介した活性型アンドロゲンによる筋萎縮抵抗性. 第69回日本体力医学会大会, 2014年9月20日, 長崎県長崎市.

秋本崇之, 和田正吾, 加藤義雄, 沢田秀司, 相澤勝治, 朴 鍾薫, 牛田多加志. MicroRNA-23aは持久性運動による筋適応に関与しない. 第69回日本体力医学会大会, 2014年9月20日, 長崎県長崎市.

相澤勝治, 和田正吾, 目崎 登, 牛田多加志, 秋本崇之. 筋萎縮抵抗性における筋局所活性型アンドロゲンの役割. 第68回日本体力医学会. 2013年9月22日, 東京都千代田区.

K. Aizawa, S. Wada, T. Ushida, T. Akimoto. The effect of local bioactive androgen production on skeletal muscular hypertrophy. 18th annual congress of the european college of sports science, 2013, 7. Barcelona. Spain.

相澤勝治. 身体運動によるヘルスベネフィットのメカニズムを探る. 身体運動による筋局所アンドロゲン産生を介した骨格筋肥大のメカニズム. 第67回日本体力医学会. 2012年9月15日, 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市).

[図書](計3件)

ニュー運動生理学. 宮村実晴編集. 真興交易医書出版部, 第14章: 運動と内分泌; 性ホルモンと骨格筋適応. 相澤勝治. 2015年1月20日発行, 291-298.

運動と栄養: 健康づくりのための実践指導. 上田伸男, 岸恭一, 塚原丘美. 講談社, 第6章: 運動と内分泌系. 相澤勝治. 2013年12月10日発行, 106-112.

Katsuji Aizawa. NOVA Publishers. Basic Biology and Current Understanding of Skeletal Muscle. Chapter 10. Skeletal Muscle Adaptation and Local Steroidogenesis. 2013, 289-302.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相澤 勝治 (AIZAWA, Katsuji)

専修大学・文学部・准教授

研究者番号: 80375477