

様式3

令和2年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

令和3年2月5日

国立大学法人愛媛大学
プロテオサイエンスセンター長 殿

研究代表者

所属機関：徳島大学

部局・職名：大学院医歯薬学研究部・特任助教

氏名：榊原 伊織

1. 研究課題

アンドロゲンによる骨格筋増強における MYLK4の生理機能の解明

2. 研究組織

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 榊原伊織	徳島大学・大学院 医歯薬学研究部	特任助教	Androgen receptor 欠損マウスの解析
研究分担者 今井祐記 澤崎達也 高橋宏隆	愛媛大学・プロテオ サイエンスセンター	教授 教授 講師	Mylk4 ノックアウトマウスの解析 MYLK4 の基質の探索 MYLK4 の基質の探索

3. 研究成果

別紙のとおり

<研究課題名>

アンドロゲンによる骨格筋増強における MYLK 4 の生理機能の解明

<研究者所属・職・氏名>

徳島大学・特任助教・榊原伊織

<研究目的>

現代、すでに高齢社会になっており、増加する高齢者のロコモティブシンドロームは社会の関心事である。ロコモティブシンドロームの原因の一つとして、骨格筋の機能低下（サルコペニア）があり、骨格筋の維持が重要である。アンドロゲンは骨格筋の増強作用があるが、そのメカニズムが不明であるため、メカニズムを解明することができれば、創薬の標的となる可能性がある。本研究の目的は、アンドロゲンによる筋増強のメカニズムを解明することである。

<研究内容>

すでに今井教授が所有する骨格筋特異的アンドロゲン受容体欠損マウスを用いた解析から、アンドロゲン受容体依存的に Mylk4 が誘導され、Mylk4 が筋力を制御する可能性が示唆されている。本年度は、これまでの研究結果を論文報告することを目的とした。

<研究成果>

これまでの研究内容を論文報告するため、iScience 誌に投稿し、論文の revision を行うことになり、追加実験を行った。

- (1) これまでに骨格筋における AR タンパク質の発現を免疫染色法により解析し、骨格筋特異的 Ar KO マウス (cARKO) では筋繊維中の AR が低下することを示したが(図 1 左)、AR 陽性細胞数の定量が必要となり、AR 陽性の細胞数の計測を行なった (図 1 右)。野生型マウスではジハイドロテストステロン (DHT) の投与により、AR 陽性細胞が大きく増加したが、野生型マウスと比べると cARKO マウスでは DHT による AR 陽性細胞数が減少することを定量的に示すことができた。

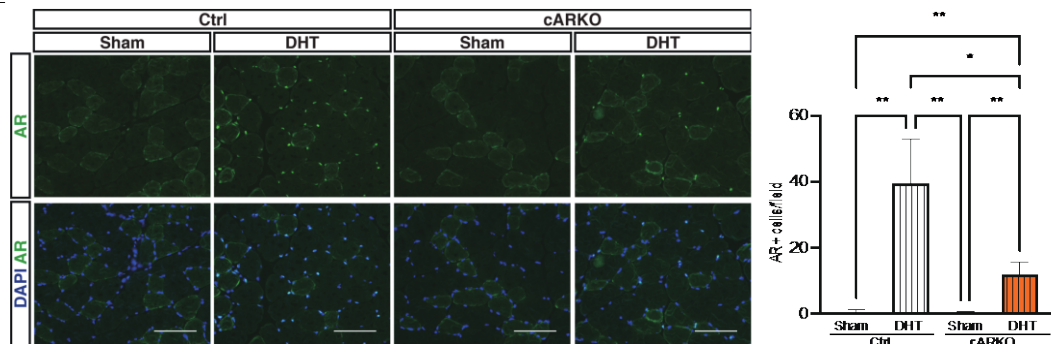


図1 cARKO マウスの前脛骨筋のARの免疫染色、および、AR陽性細胞数の定量を行った。 $*P<0.05$ $**P<0.01$ 。

(2)本研究ではDHTの徐放性タブレットをメスマウスに埋め込むことで4週間アンドロゲンを継続的にメス個体に作用させることで、骨格筋におけるARを介したアンドロゲン作用を解析した。DHTの徐放性タブレットは、血液を介して全身にDHTを作用させるため、血中にDHTが検出されるかどうか確認するために、血清中のDHT濃度の測定を行った(図2)。DHTは野生型、cARKOのどちらのマウスでも血中DHT濃度が1000pg/ml程度に上昇することが確認できた。

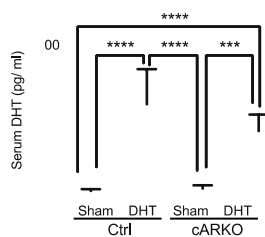


図2 血清中のDHT濃度

$***P<0.001$ $****P<0.0001$ 。

(3) cARKO マウスにおいてMylk4、Amd1、Odc1、Smoxなどの遺伝子発現が低下していたために、これらの遺伝子発現には野生型マウスにおいても雌雄差があると予想された。野生型のオス、メスマウスのヒラメ筋、腓腹筋、前脛骨筋におけるこれらの遺伝子発現を比較した(図3)。Mylk4、Amd1、Odc1、Smoxの遺伝子発現は、腓腹筋、前脛骨筋においてオスの方が高い値を示したが、ヒラメ筋では変化が見られなかった。

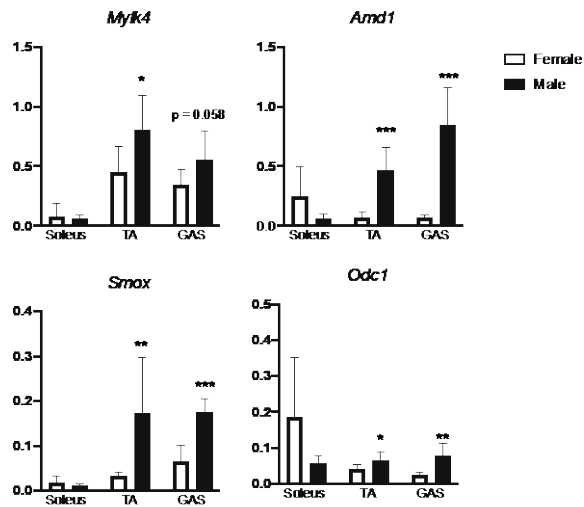


図3 野生型のオスマウス、および、メスマウスのヒラメ筋、腓腹筋、前脛骨筋の *Mylk4*, *Amd1*, *Odc1*, *Smox* の遺伝子発現量。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

(4) 腓腹筋などの速筋では、野生型マウスへの DHT 投与により DHT 依存的な筋重量の増加と *Mylk4*, *Amd1*, *Odc1*, *Smox* などの遺伝子発現の DHT、AR 依存的な増加が知られている。しかしながら、遅筋におけるアンドロゲンの作用が不明であったため、*cARKO* マウスのヒラメ筋の解析を行った。ヒラメ筋重量は DHT 依存的な重量の増加を示さなかった (図 4)。また、*Mylk4*, *Amd1*, *Odc1*, *Smox* などの遺伝子発現制御についても、DHT、AR 依存的な増加を示さなかった (図 4)。これらのことから、アンドロゲンの作用は速筋と遅筋では異なると考えられた。

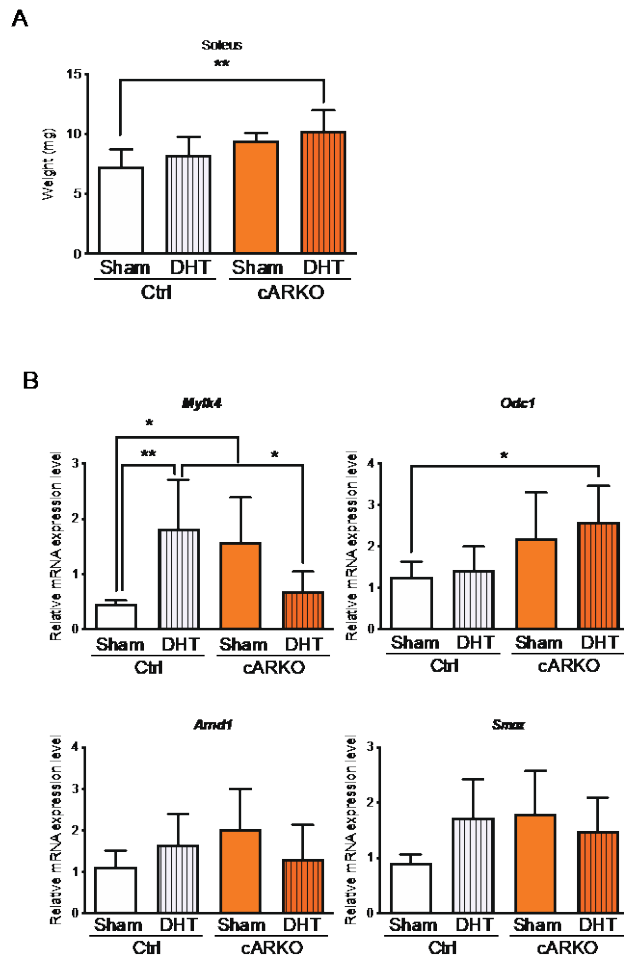


図4 (A) cARKO マウスのヒラメ筋重量。(B) cARKO マウスのヒラメ筋の遺伝子発現。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

<成果発表>

(1)

アンドロゲン受容体による骨格筋制御

榊原伊織、酒井大史、今井祐記

第43回日本分子生物学会年会，2020，12月2～4日，オンライン学会

(2)

Myofiber androgen receptor increases muscle strength mediated by a skeletal muscle splicing variant of *Mylk4*

Iori Sakakibara, Yuta Yanagihara, Koichi Himori, Takashi Yamada, Hiroshi Sakai, Yuichiro Sawada, Hirotaka Takahashi, Noritaka Saeki, Hiroyuki Hirakawa, Atsushi Yokoyama, So-ichiro Fukada, Tatsuya Sawasaki and Yuuki Imai
iScience (in revision)

〈今後の課題〉

本年度の研究から、アンドロゲンの作用が遅筋と速筋で異なることが示唆されたが、遅筋でアンドロゲンがどのように作用するかは不明なままである。遅筋は加齢への抵抗性が高く、近年問題になっているサルコペニアにおいても重要である。遅筋におけるアンドロゲンの作用を解明するためには、ヒラメ筋を用いた筋収縮力の測定やRNA-sequencingによる網羅的なアンドロゲン標的遺伝子の解析が必要となる。