

論文の内容の要旨

論文題目 体組成の性差構築における骨格筋性ステロイド受容体の意義に関する研究

氏名 小田 彩

【背景・目的】

関節リウマチや痛風など有病率に性差を認める疾患は結構多く、その性差メカニズムの解明は個別化医療の発展に必須である。性差は多くの因子によって多段階的かつ複雑に形成されることが明らかになりつつあり、とりわけ性ステロイドホルモンとその受容体制御系の性差構築に果たす役割は大きいと考えられている。

体組成は、脂肪、筋、骨、水分などからなり、筋量や骨量は男性に多く、女性は皮下脂肪、男性は内臓脂肪がそれぞれ多いといった顕著な性差がある。さらに、脂肪増加や筋量減少を背景とした肥満、糖尿病、脂質異常は男性に多く、女性でも閉経後に増加する。

骨格筋は、ヒトにおいて最大の臓器であり、エネルギーの産生、消費、貯蔵の場として重要である。筋量、筋力のほか筋線維タイプにも性差が知られ、それによりエネルギーの供給源も異なる。しかし、他の主要代謝臓器である肝臓、脂肪に比して、骨格筋における性差の意義に関する知見は乏しい。

近年我々は、生体恒常性維持に必須のホルモンであるグルココルチコイド (GC) とその受容体であるグルココルチコイド受容体 (GR) が、骨格筋において、筋-肝-脂肪代謝連関および体組成を調節する鍵分子であることを、骨格筋特異的 GR ノックアウトマウス (GRmKO) の解析より明らかにした。また、性ステロイドホルモンであるエストロゲン-ER 制御系およびアンドロゲン-AR 制御系が GC-GR 制御系と相互作用して、様々な生体調節機構を調節している証左も蓄積しつつある。

そこで本研究では、特に骨格筋における性ステロイド受容体制御系と GC-GR 制御系のはたらきに着目して、体組成の性差構築機構を明らかにし、体組成異常を要因とした疾患発症メカニズムやその性差メカニズムを解明する基盤を構築することを目的とした。

【方法】

- 1) 細胞：マウス骨格筋線維芽細胞由来の細胞株 C2C12 細胞を用いた。
- 2) マウス：本研究は、東京大学動物実験実施規則、東京大学動物実験実施マニュアルを遵守して行われ、東京大学第二種使用等拡散防止措置の機関承認（承認番号 K13-19, K18-15）、東京大学医科学研究所動物実験センターでの実験許可（承認番号 PH14-34, PH15-16, PH15-24, PH16-11, PH16-13, PH16-26, PA18-26）を取得して行われた。骨格筋特異的 GR ノックアウトマウス (GRmKO)、ER ノックアウトマウス (ERmKO)、AR ノックアウトマウス (ARmKO) を各受容体 flox マウスと ACTA1-cre トランスジェニックマウス

スを交配して作出した。さらにこれらのマウスを交配させ、骨格筋 ERGR ダブルノックアウトマウス (ERGRmKO)、骨格筋 ARGR ダブルノックアウトマウス (ARGRmKO) を作出した。

4) 性ホルモン除去モデル：エストロゲン除去モデルとして卵巣摘除モデル (OVX) を、アンドロゲン除去モデルとして精巣摘除モデル (ORX) を既報に基づいて作製した。

5) 定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR) 解析：mRNA 発現量の定量的解析は、回収した細胞もしくは凍結破碎組織を用いて抽出した全 RNA を鋳型に cDNA を合成し、定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR) によって行った。

6) ルシフェラーゼアッセイ (レポーターアッセイ)：C2C12 細胞におけるルシフェラーゼアッセイは、リポフェクション法による一過性遺伝子導入を用いて行った。

7) ウェスタンブロット法：回収した細胞もしくは凍結破碎組織を RIPA buffer で溶解して、全細胞抽出液を調整し、SDS-PAGE 後 PVDF 膜へ転写し、各種抗体を用いて ECL 法で発光させ解析した。

8) DNA マイクロアレイ解析：DNA マイクロアレイ解析は 3D-GENE (TORAY) を利用した受託解析 (TORAY) により行った。

9) 統計学的解析；データはすべて、Student t 検定により解析した。P 値が 0.05 未満の場合、統計学的に有意とした。同一実験内の有意差検定が 2 回以上の場合、Bonferroni 法 (検定総数が N の場合、それぞれの検定の有意水準を α から α/N に変更する) により補正した。

【結果】

1, 性ステロイドホルモンが骨格筋 GR に与える影響および GC が骨格筋 ER、AR に与える影響—培養筋芽細胞における解析

筋芽細胞において、GR、ER、AR の細胞内局在は受容体特異的リガンド以外の影響を受けなかった。エストロゲン、アンドロゲンは GRE 依存性転写活性に対する直接の活性化作用を有さないものの、GC 依存性転写活性化作用には、何らかの影響を与える可能性が示され、GC-GR 制御系とエストロゲン-ER 制御系、アンドロゲン-AR 制御系との相互作用が骨格筋において存在する可能性が示唆された。

2, 骨格筋 GR 発現量低下および性ステロイドホルモン低下による体組成の変容に与える性ステロイドホルモンおよび骨格筋 GR の影響の解析

1) エストロゲンによる骨格筋・脂肪量/体組成調節作用には骨格筋 GR が関与し、骨格筋 GR による骨格筋・脂肪量/体組成調節作用にもエストロゲンが関与している可能性が示唆された。

2) 骨格筋 GR 標的遺伝子の一部の発現が循環エストロゲン濃度による影響を受ける可能性がマウス骨格筋においても示された。

3) アンドロゲンによる骨格筋・脂肪量/体組成調節作用には骨格筋 GR が関与し、GR に

よる骨格筋・脂肪量/体組成調節作用にもアンドロゲンが関与している可能性が示唆された。

3, 骨格筋遺伝子発現に与える性の影響および、骨格筋 GR 発現量低下による骨格筋遺伝子発現の変容に与える性の影響の解析

骨格筋遺伝子発現が飢餓ストレスや骨格筋 GR 発現量の影響を受けることが示された。これらの遺伝子発現パターンには雌雄差を認めるものもあるが、多くは雌雄共通の発現パターンを示した。

骨格筋の遺伝子発現においては、通常飼育では、大多数の遺伝子発現が雌雄で同程度の発現量を示した。一方で、オス優位の遺伝子群、メス優位の遺伝子群が存在し、それらの遺伝子群は骨格筋における GR の発現量によって変容することが明らかとなった。

骨格筋において発現に雌雄差を有する未知の GR 標的遺伝子の存在を想定し、絶食によって発現が一定以上増加した遺伝子を GR 標的遺伝子候補として抽出、定義した。結果、GR 標的遺伝子は雌雄共通のものが多い一方、オスメス各々に特異的な遺伝子も存在し、その数はメスの方が多いことが示された。また、既知の骨格筋における GR 標的遺伝子の発現にも性差がある可能性が示唆された。さらに、これら GR 標的遺伝子を遺伝子オンロジー解析 (GO 解析) に付し、雌雄に特徴的な機能的遺伝子群を同定した。

4, 体組成の変容に与える骨格筋 GR および性ステロイドホルモン受容体の影響とその相互作用の解析

GRmKO、ERmKO、ARmKO、ERGRmKO、ARGRmKO の体重変化、臓器重量を比較し以下の結果が得られた。1) これまで、GRmKO オスでは筋量が増加し脂肪重量が低下することが知られていたが、何れもメスでは顕著ではないこと、2) ERmKO における筋量変化の報告はなかったが、骨格筋部位によって影響が異なる可能性があること、3) GRmKO、ERmKO ともに白色脂肪重量は低下傾向を示すが、ERGRmKO では逆に増加する可能性があること、4) ARmKO ではオスにおいて脂肪量が増加することが知られていたが、メスでは減少し、さらに ARGRmKO では雌雄ともに減少する可能性があること、5) ARGRmKO のオスは GRmKO に近い表現型を示すが、肛門挙筋・球海綿体筋の筋量は低下していること。したがって、体組成の変容に、骨格筋 GR、ER、AR は各々関与すること、また、それらの作用には性差が存在すること、骨格筋 ER-GR、骨格筋 AR-GR 間に相互作用が存在すること、が示された。

【考察】

本研究は、体組成の性差構築機構解明の基盤を築くため、体組成変容を来すモデルである GRmKO マウスにおける性腺摘除モデル、および骨格筋における GR と ER もしくは GR と AR のダブルノックアウトマウスを用いて解析した点が特徴である。本研究により、骨格筋 GR、ER、AR それぞれの体組成変容に対する作用には性差があること、骨格筋 ER-GR 間、骨格筋 AR-GR 間には相互作用があることが示唆された。既に他臓器ではこ

れら受容体の間において、エピジェネティックな調節、他のホルモンを介した作用など様々な相互作用機構の存在が示されており、全身の代謝を踏まえた骨格筋 ER-GR 間、骨格筋 AR-GR 間相互作用の詳細を解析することが課題である。

性ステロイドホルモン制御系は生殖腺の分化や生殖機能の獲得、繁殖行動、妊娠、出産、生殖機能の喪失などのタイミングでダイナミックに変動する特徴を有する。GC-GR 制御系は生命維持に必須の役割を有し、一生涯に渡り厳格に調整されている。したがって、様々なライフステージにおいて変動する性ステロイドホルモン制御系によるダイナミックな生体制御を GC-GR 系が精緻に制御しつつ、一方で、生態系として必要な性差を維持している可能性が考えられた。これらの制御系のバランスの異常は、疾患の発症あるいは疾患の性差に関係すると考えられ、本研究により得られた成果は、体組成の性差構築機構解明の端緒となるとともに、代謝疾患の病態理解と治療法開発に寄与する可能性が示された。