

論文の内容の要旨

論文題目 **Male mice with fast-twitch muscle-specific knockout of the androgen receptor have a sarcopenia phenotype and impaired muscle function**
(速筋特異的アンドロゲン受容体ノックアウトマウスの構築と分子機序の解明)

氏名 細井 達矢

「背景」

高齢者が自立した生活を送るためには筋骨格系の維持が重要であるが、その中で大きな問題となるのがフレイル・サルコペニアである。サルコペニアは筋肉 (**sarx**) と喪失 (**penia**) が組み合わされた造語であり、「高齢期にみられる骨格筋量の低下と筋力もしくは身体機能 (歩行速度など) の低下」と定義される。サルコペニアでの筋量低下は速筋・遅筋ともに生じるが、特に速筋優位に筋委縮が進行することで速筋割合が低下し、筋量低下に先行して筋力低下が生じるという特徴がある。すなわちサルコペニアは一般的な筋委縮とは異なる新しい疾患概念であり、その予防と治療のための病態メカニズム解明は喫緊の課題である。

サルコペニアの原因は多岐に渡るが、その主因としてアンドロゲン-アンドロゲン受容体 (**AR**) 系の変化が指摘されてきた。特に高齢者において血中遊離テストステロン濃度と骨格筋量、筋力に正の関連があることは多く報告され、**late onset hypogonadism** (加齢性腺機能低下症) に代表される低テストステロン状態は筋量・筋力低下に直結し、アンドロゲン補充療法により一部骨格筋での蛋白異化・同化のバランスの乱れ、サルコペニアが改善することが報告されている。しかし、その分子生物学的機序は未だ明らかでない。アンドロゲン-**AR** 系の作用機序は複雑であるが、主な作用はアンドロゲンが **AR** に結合することで生じる。**AR** は核内に移行してアンドロゲン応答エレメント (**AREs**) に結合し、多くの共調節因子を介して標的遺伝子の転写を制御する。通常 **AR** ノックアウト (**ARKO**) では精巣性女性化症候群に伴う不妊の影響があり、骨格筋におけるアンドロゲン-**AR** 系の機能解析には **Cre-LoxP** システムを用いた **ARKO** マウスが重要な役割を果たしてきた。筋細胞特異的 **ARKO** 雄マウスを用いた骨格筋での **AR** 機能解析も進んだが、ここでいう筋特異的とは速筋・遅筋の別なく、横隔膜や心筋といった全ての筋を含むため、骨格筋での **AR** 欠損以外の影響も否定できず、またその表現型も一貫しなかった。すなわち 2 系統ともに筋重量の変化は乏しかったという点では一致したが、筋力や運動耐容能への影響は異なった。また一方ではヒラメ (**Soleus; SOL**) 筋での速筋から遅筋への変化が認められ、骨格筋での **AR** が筋線維タイプを制御する可能性が示唆された。興味深いことに、筋サテライト細胞特異的 **ARKO** マウスにおいても **SOL** 筋で速筋から遅筋への変化を認め、

筋力も低下した。これらの先行研究は AR の骨格筋での役割に重要な知見を示した一方、その結果は一貫せず、また筋繊維タイプ特異的な役割や性差、あるいは心筋での AR 欠損の可能性など、検討すべき課題も残された。特にサルコペニアは速筋特異的な筋萎縮を特徴とすることから筋繊維タイプは重要であり、また性ホルモン作用を検討する上では性差に着目する必要があると考えられた。

「目的」

今回は Cre-loxP システムを用い、AR が速筋特異的に欠損した新規マウスモデル (fmARKO マウス) を確立した。これにより他部位に影響を与えることなく、AR の骨格筋における作用を調べることが可能になったことは本研究の最も重要な強みである。この新規モデルマウスを用い、表現型の解析、組織学的変化や代謝変化、サルコペニア関連 mRNA の網羅的解析及び遺伝子制御ネットワークの解明を企図し、サルコペニア発症における性ホルモンの働きを *in vivo* と *in vitro* の両面より明らかにすることを目的とした。また本研究では fmARKO の雄雌マウスとも作製し、性差についても検討した。本知見はサルコペニアの機序解明に資するものであり、将来的な新規創薬へと繋がる可能性がある。

「方法」

AR 遺伝子は X 染色体上に存在する。また MLC1f (the myosin light chain 1f) は速筋特異的に、胎生期より強く発現しているミオシン重鎖であり、各種研究でも Mlc1f で制御される Cre マウスと flox マウスと交配することで、胚性致死を起こすことなく組織特異的に遺伝子欠損を起こすことが可能であった。本研究では exon 1 を loxP 配列で挟んだ AR-flox/Y 雄マウスまたは AR-flox/flox 雌マウス、及び Mlc1f で制御される Cre を knock-in された Cre マウスを用い、2 系統を掛け合わせることで Cre-LoxP システムにより速筋特異的 ARKO (fmARKO) マウスを作成した。各種実験は同週齢の AR-flox/Y 及び AR-flox/flox マウスをコントロールとした。

上記マウスモデルに対し、体重・筋重量測定、握力試験やトレッドミルといった筋力測定、骨格筋の組織学的および免疫組織化学的分析を行った。また筋骨連関を調べるため、Dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) による大腿骨の骨密度計測も行った。サルコペニア関連遺伝子の網羅的解析としてマイクロアレイと遺伝子オントロジー (Gene Ontology enrichment analysis; GO) 解析を施行し、qPCR で各種関連遺伝子の mRNA 発現を比較した。また骨格筋筋芽細胞の初代培養を行い、その特性も観察した。

「結果」

fmARKO マウスの作製

fmARKO マウスにおいて骨格筋特異的に ARKO され、ヒラメ筋と腓腹筋での AR mRNA 発現比から速筋特異的な AR 欠損が確認された。同時に心筋での AR 欠損は認めなかつ

た。fmARKO マウスは雄・雌とも正常発育し、雄・雌とも妊孕性も保たれていた。

各種組織重量及び筋量・筋力の変化、筋骨連関

12-13 週齢時点の fmARKO 雄雌マウスとも、体重補正後の骨格筋重量、心臓重量差を認めなかった。これは骨格筋での AR は胎生期以降の骨格筋成長および維持には関与しないとする先行研究を支持した。筋力測定においては、fmARKO 雄マウスで握力がコントロールマウスに比して 10%有意に低下し、トレッドミル走行試験でも総走行距離が 30%有意に低下した (各 $p < 0.001$, $p = 0.03$)。また fmARKO 雄マウスの骨密度は皮質骨・海綿骨共に有意に低下しており、Osteosarcopenia を示唆する所見と考えられた (各 $p = 0.01$, $p = 0.04$)。上記の表現型は fmARKO 雌マウスでは認めなかった。

骨格筋の組織学的所見と速筋・遅筋比

2 群の SOL 筋および Gastrocnemius (GAST) 筋の組織学的所見では形態学的差異、及び断面積・短径に差を認めなかった。しかしながら Oil Red O 染色では fmARKO の筋繊維内においてのみ脂肪滴を認めた。

SOL 筋の速筋・遅筋別の免疫染色では、fmARKO 雄マウスで遅筋比率がコントロールマウスに比して 14%増加しており ($p = 0.02$)、これはサルコペニア様表現型と考えられた。上記の表現型は fmARKO 雌マウスでは認めなかった。

筋線維/筋量関連遺伝子の fmARKO マウスにおける mRNA 発現変化

MyoD は特に速筋優位に発現し、阻害により遅筋関連遺伝子が活性化される。fmARKO マウスにおいて MyoD の mRNA 発現は 1/2.9 倍に低下し ($p = 0.02$)、各種遅筋関連遺伝子の上昇を認めた。また Myostatin についても過去の ARKO マウスで発現低下が報告されており、fmARKO マウスでも同様に 1/2.4 倍に低下していた ($p < 0.01$)。

fmARKO マウスでのポリアミン関連遺伝子・初代培養系

マイクロアレイ・GO 解析の結果、fmARKO 雄マウスでポリアミン代謝やスペルミン代謝を含む、ポリアミン生合成関連遺伝子で著明な発現変化を認めた。また qPCR でもポリアミン生合成関連遺伝子で 1/8.3 – 1/19.3 倍と大幅な発現低下を認めた。一方雌マウスについては、2 群間でポリアミン生合成関連遺伝子の変化を認めなかった。

筋芽細胞の初代培養系を PolyamineRED と Hoechst33342 で共染色した結果においても、コントロールマウス由来の筋芽細胞では、ポリアミンは少ないながらも存在し、24 時間の DHT 投与によって増加した。一方 fmARKO マウス由来の細胞には DHT 投与前はポリアミンを認めず、DHT 投与後に一部認めるようになった。この結果も fmARKO 雄マウスでのポリアミン生合成の低下と DHT による回復の可能性を示し、アンドロゲン、ポリアミン生合成とサルコペニアの関連が示唆された。

「結論」

私は本研究において AR の筋繊維タイプ別の作用に注目し、速筋特異的 ARKO マウスを作成、その機能解析を行った。その結果、雄マウスにおいて速筋 AR が MyoD を介して筋線維タイプの変化に主導的役割を果たすこと、AR 欠損により筋力や持久力といった筋機能低下が生じることに加え、特にポリアミン合成がアンドロゲン-AR 系に制御され、ポリアミン代謝と筋代謝、筋機能、骨密度に多様な関連が存在することを見出した。老齡マウスや去勢マウス、骨格筋萎縮モデルマウスの骨格筋においてもポリアミン欠乏が認められるように、ポリアミン低下自体がサルコペニアや、筋骨連関を通じた骨粗鬆症の原因となる可能性がある。またポリアミン代謝と脂質代謝の相互関係も報告されており、本研究でも限定的ながら AR 欠損による Sarcopenic obesity が示唆され、更なる深耕が必要と考えられた。ポリアミンは強力な抗炎症作用を有し、日本食や地中海食といった長寿食との関連も深い。日常生活でのフレイル・サルコペニアの予防、健康寿命の延伸という観点からも、更なる老年医学的検討が求められる分野と考えられた。

これらの結果は全般に雌 fmARKO マウスでは認められず、明らかな性差を認めたが、本研究ではその機序は明らかではない。しかしながら骨格筋ではエストロゲンも筋機能維持や筋力、筋肉再生に役割を果たすことも報告され、雌マウスにおけるエストロゲン作用も筋力や筋繊維タイプに影響した可能性が考えられた。

以上、今後の各種検討課題が残されたものの、本結果は既に一定の効果が示されている SARM に筋特異性を持たせることで、更に治療効率の高い薬剤開発へと至る可能性や、男女別の治療介入が必要となる可能性を示した。また上述の通りポリアミン自体も老年症候群に対する総合的な治療薬や補助食品となる可能性がある。今後、加齢性変化や性差、遅筋特異的 ARKO マウスの解析など、更なる表現型の深耕に挑むことで、AR の筋繊維タイプ特異的な役割の解明、サルコペニアの機序解明に資するものとする。