

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19522

研究課題名(和文) 男性におけるテストステロン低下による非アルコール性脂肪肝炎発症機構の解明

研究課題名(英文) Identification of the mechanism of the development of nonalcoholic fatty liver disease in testosterone deficiency in men

研究代表者

千丸 貴史 (Senmaru, Takafumi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：20637889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：精巣摘出マウスに炎症を惹起させ、高脂肪食を投与することにより、ヒトの非アルコール性脂肪肝炎(NASH)病態に近似した新規モデルマウスを作製した。新規NASHモデルマウスは、テストステロン低下、内臓脂肪増加、インスリン抵抗性増大、血清炎症マーカーの上昇、肝臓における炎症性細胞浸潤・線維化を認めた。これらの障害はテストステロン補充により改善を認めた。テストステロン低下および高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性増大を基盤に発症した脂肪肝に、炎症性サイトカイン産生亢進による慢性炎症が加わることによりNASHを発症すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Orchiectomized mice fed high-fat diet showed decreased serum testosterone level, increased visceral fat, increased insulin resistance, increased serum inflammatory marker level, and hepatic fibrogenesis. These perturbations in the model mice were normalized to the levels of control mice by testosterone supplementation. Our results suggested that NASH is initiated by addition of chronic inflammation to fatty liver caused by testosterone deficiency and insulin resistance.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：テストステロン低下 非アルコール性脂肪肝炎 モデルマウス インスリン抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) の現状

NASH は有病率が人口の数%から10%と高く、肝硬変・肝細胞癌の成因や心血管病変の危険因子となりうる重要な疾患であるため(日本消化器病学会編 NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2014)、NASH に対する取組みは国民の健康維持・増進や医療経済を考える上で重要な課題となっている。NASH は非アルコール性脂肪肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) における進行型の病態と考えられているが、詳細な発症機構解明や予防・治療法確立はなされていない。

### (2) 男性におけるテストステロン低下と NASH 発症の関連

NAFLD の病態には性差・年齢が密接に関連している (Yatsuji S, et al. Hepatol Res. 2007)。女性 NAFLD は閉経後高齢者に多くエストロゲン低下の関与が指摘されている。一方、NAFLD 有病男性において血清テストステロンが低値であることが報告されており (Kim S, et al. BMC Gastroenterol. 2012)、NAFLD の新規危険因子として加齢などに伴うテストステロン低下が注目されている。研究代表者らは、高脂肪食 (HFD) を投与した精巣摘出マウスが脂肪肝を発症し、テストステロン補充にて発症が抑制される機序を明らかにした (Senmaru T, et al. Metabolsim. 2013、図 1)。しかしながら NASH にまでは進行しておらず、テストステロン低下による NASH 発症機構の解明には至っていない。

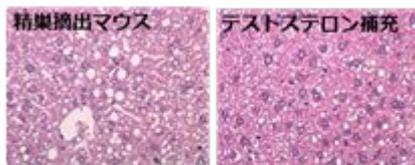


図1. HFDを投与した精巣摘出マウスの肝脂肪着とテストステロン補充による改善

### (3) ヒト NASH 病態に近似した新規 NASH モデルマウスの開発

NASH 発症機構の解明が進まない原因として、モデル動物の NASH がヒト NASH 病態と相違していることが挙げられる。研究代表者らは NASH 発症機構の解明を目指し、かねてよりヒト NASH 病態に近似したモデル動物の開発を進めている。このほど、レプチン抵抗性を基盤として肝組織に脂肪沈着を伴った炎症性細胞浸潤や線維化を呈するヒト NASH 病態に近似したモデルマウスを作製し解析することにより、高レプチン血症が制御性 T 細胞機能を抑制し、ヘルパー T 細胞 (Th) やクッパー細胞を活性化させ、脂肪肝に慢性炎症を惹起させる NASH の新規発症機構を明らかにした (論文投稿中)。この知見を応用し、免疫不全マウスである

Recombination-activating gene-2 ノックアウトマウス (Rag2 KO) に野生型マウスの脾臓から採取した Th を移入し HFD を投与すると、肝組織に脂肪沈着を伴わない炎症性細胞浸潤と線維化を認めた (予備実験、図 2)。



図2. Thを移入し、HFDを投与したRag2 KOマウスの肝臓における炎症性細胞浸潤と線維化

### (4) ヒト NASH 病態に近似したテストステロン低下 NASH モデルマウスの開発

以上の研究成果を踏まえ、精巣摘出を実施した Rag2 KO に Th を移入し HFD を投与することによりテストステロン低下 NASH モデルマウスを作製する着想に至った。

## 2. 研究の目的

新規 NASH モデルマウスを詳細に解析することにより、男性におけるテストステロン低下による NASH 発症機構を明らかにすること、および NASH の新たな予防法・治療法確立の礎とすること。

(1) テストステロン低下 NASH モデルマウスにおける Th 活性化を介した炎症惹起因子および既知の NASH 誘発因子 (酸化ストレス、小胞体ストレス、腸内細菌など) の動態を解析し、テストステロン低下による NASH 発症機構を明らかにする。

(2) テストステロン低下 NASH モデルマウスに対するテストステロン、あるいはジヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHEA) 補充による NASH 重症度改善効果を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) テストステロン低下 NASH モデルマウスの作製

精巣摘出を実施した Rag2 KO に Th を移入し HFD を投与することによりテストステロン低下 NASH モデルマウスを作製した。



### (2) テストステロン低下による NASH 発症機構の解明

作製したテストステロン低下 NASH モデルマウスの血液生化学的分析、細胞生物学的分析、分子生物学的分析などを実施した。肝浸潤炎

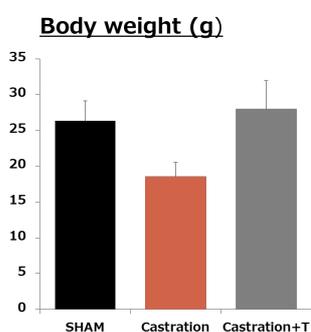
症性細胞活性化は、免疫組織化学染色、フローサイトメーター (FACS Cantoll) による免疫蛍光染色、およびセルソーター (SONY Cell Sorter SH800) により細胞集団ごとに抽出した RNA の定量的分析にて評価した。

### (3) テストステロン、DHEA 補充による NASH 重症度改善効果の検証

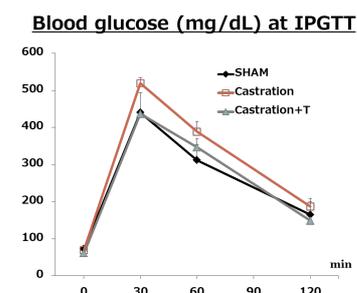
テストステロン低下 NASH モデルマウスに徐放性ペレットによりテストステロンあるいは DHEA を補充し NASH 重症度改善効果を検証した。

## 4. 研究成果

### (1) テストステロン低下 NASH モデルマウスの体重増加は抑制された。

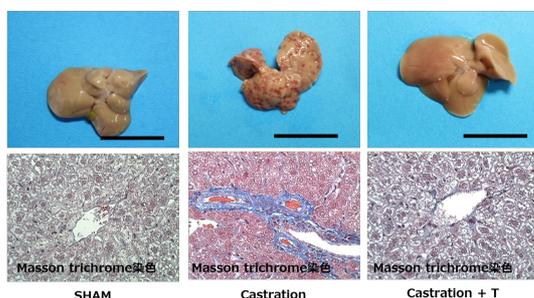


### (2) テストステロン低下 NASH モデルマウスの耐糖能は悪化した。



### (3) テストステロン低下 NASH モデルマウスの肝臓にて炎症細胞浸潤・線維化を認めた。

#### Morphology and histology



これらの障害はテストステロン補充にて改善を認めた。

従来、NASH 研究分野では病態に適したモデル動物作製が困難なことが課題であった。本研究において研究代表者は、ヒトの病態に近似したテストステロン低下 NASH モデルマウスを開発し病態解明を試みた。テストステロン低下および高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性増大を基盤に発症した脂肪肝に、炎症性サイトカイン産生亢進による慢性炎症が加わることにより NASH を発症すると考えられた。また研究代表者らが開発したマウスの肝臓に炎症・線維化を惹起させる手法は、他の NASH モデルマウス開発に幅広く応用できるため、研究が当初計画通り進まなかった場合も NASH 研究の発展に貢献できると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Amano A, Kondo Y, Noda Y, Ohta M, Kawanishi N, Machida S, Mitsuhashi K, Senmaru T, Fukui M, Takaoka O, Mori T, Kitawaki J, Ono M, Saibara T, Obayashi H, Ishigami A. Abnormal lipid/lipoprotein metabolism and high plasma testosterone levels in male but not female aromatase-knockout mice. Arch Biochem Biophys. 15; 622: 47-58. 2017. 査読あり

Mitsuhashi K, Senmaru T, Fukuda T, Yamazaki M, Shinomiya K, Ueno M, Kinoshita S, Kitawaki J, Katsuyama M, Tsujikawa M, Obayashi H, Nakamura N, Fukui M. Testosterone stimulates glucose uptake and GLUT4 translocation through LKB1/AMPK signaling in 3T3-L1 adipocytes. Endocrine. 51 (1): 174-184. 2016. 査読有り

### 〔学会発表〕(計 3 件)

三橋一輝、千丸貴史、他. Testosterone は 3T3-L1 細胞において GLUT4 を介した細胞内糖取込みを促進する. 第 15 回日本抗加齢医学総会. 2015 年 5 月 29 日. 福岡国際会議場 (福岡県・博多市).

三橋一輝、千丸貴史、他. Testosterone は 3T3-L1 細胞において GLUT4 を介した細胞内糖取込みを促進する. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2015 年 5 月 23 日. 下関市民会館 (山口県・下関市).

千丸貴史、他. テストステロン低下と慢性炎症により惹起されるサルコペニアを伴った非アルコール性脂肪肝炎の病態解明. 第 2 回肝臓と糖尿病・代謝研究会. 2015 年 5 月 23 日. シーモールパレス (山口県・下関市).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

千丸 貴史 (Senmaru Takafumi)

京都府立医科大学・医学研究科・客員講師

研究者番号：20637889