

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月8日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590828

研究課題名（和文） アンドロジェン受容体トランスジェニックマウスによる非アルコール性  
脂肪肝の病態解明研究課題名（英文） Analysis of nonalcoholic fatty liver using androgen receptor  
transgenic mouse

研究代表者

今関 文夫（IMAZEKI FUMIO）

千葉大学・大学院医学研究院腫瘍内科学・准教授

研究者番号：40223325

研究成果の概要（和文）：

アンドロジェン受容体（AR）を肝特異的に発現するトランスジェニックマウス（Tg-AR）を作製した後、ARの肝における脂質代謝、糖質代謝との関わりを明らかにする予定であったが、1回目に作製したTg-ARは子供を増やすことができず、さらに3回作製を行ったが、計139匹のマウスでAR遺伝子が確認できなかった。そこで、肝癌培養細胞のHepG2とHuh7にAR発現ベクターを導入し脂質代謝に関連する84遺伝子の発現変化を検討したところ、両者で共通して低下していた遺伝子はAcyl-CoA dehydrogenaseとCarnitine palmitoyltransferase 1Aのみで、これら遺伝子は、脂質酸化に働くことから予測された結果とは逆であった。

研究成果の概要（英文）：

We had planned to examine the relationship between androgen receptor and lipid or carbohydrate metabolism using androgen receptor transgenic mouse, but the transgenic mouse could not be produced for examination. Two female transgenic mice produced in the first experiment did not raise their children. A total of 139 mice produced in the next 3 consecutive experiments did not have the transgenic genes. Therefore we transfected androgen receptor expression vector into HepG2 and Huh7, and analyzed the change of m-RNA expression in the 84 genes related to lipid metabolism. Among these genes, the only genes down regulated both in the two cells were Acyl-CoA dehydrogenase and Carnitine palmitoyltransferase 1A, both of which are involved in fatty acid oxidation and the result was contrary to our expectation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000円	450,000円	1,950,000
2010年度	1,100,000円	330,000円	1,430,000
2011年度	900,000円	270,000円	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：アンドロジェン受容体トランスジェニックマウス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦における肝臓病はC型またはB型肝炎ウイルス感染症が主要な原因となっている。しかし、輸血後ウイルス肝炎の激減と、B型ではキャリアからの出生児にたいする予防処置により若年者の感染率は低下し、今後本邦における感染者は減少していくと考えられる。一方、生活習慣の欧米化により肥満者が増加し、高血圧、糖尿病、高脂血症などの生活習慣病を基盤とするメタボリック症候群が大きな社会問題となり、肝臓における表現型と考えられる非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) を有する人が増えている。

(2) NAFLD は従来非進行性と考えられていたが、近年、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) から肝硬変、肝細胞癌に至る症例が報告され、今後本邦でも増加することが予想される。脂肪肝は種々の原因により肝細胞に中性脂肪が蓄積した単純性脂肪肝の状態 (1st hit) から、さらに炎症細胞浸潤、肝細胞の変性壊死、線維化が生じ (2nd hit) NASH に進行すると考えられている (Day CP, et al. Gastroenterology 1998; 114: 842)。2nd hit には、肝内に増加した脂肪酸を酸化する関連酵素の活性化により、増大した酸化ストレスが肝臓に蓄積されることが重要であると考えられているが、その詳しい病態は不明である。

(3) 2型糖尿病は女性より男性に多く見られる疾患であり、肥満の割合は男性では30歳代から高いのに対し女性では閉経後に高くなる特徴がある。糖尿病、肥満と密接な関係のあるNAFLDにおいても男性に多い傾向があり、性ホルモンの影響が考えられる。内臓脂肪から産生されるアディポサイトカインの中で、インスリン感受性を高める働きのあるアディポネクチンは男性ホルモンにより負に制御されており、男性でインスリン抵抗性を生じやすい原因の一つと考えられている。

(4) 男性ホルモン、アンドロジェンは、主に核内受容体であるアンドロジェン受容体を介して、男性生殖器を含めた種々の組織における遺伝子発現の調節を行い、組織の発生、分化、機能に重要な働きをしている。また、一方で、アンドロジェン受容体は成長因子 (epidermal growth factor など) やサイトカイン (IL-6 など) シグナル伝達系によりアンドロジェンとは別に活性化されることが分かっている。

(5) 近年、アンドロジェン受容体 (AR) を全身性にノックアウトした雄のマウスでは高齢になると肥満と脂肪肝を生じることが報

告され (Fan W, et al. Diabetes 2005; 54: 1000)、また、AR を肝特異的にノックアウトした雄のマウスに高脂肪食を与えるとインスリン抵抗性を背景に肥満と肝脂肪化が生じると報告されている (Lin HY, et al. Hepatology 2008; 47: 1924)。すなわち、男性ホルモン、AR には抗肥満、抗肝脂肪化の作用があると推測される。

(6) NASHの動物モデルとして汎用されているメチオニンコリン欠乏食投与マウスでは肥満、インスリン抵抗性なしに脂肪肝、肝炎、線維化を生じ、肝腫瘍の発生も報告されている。また高脂肪食投与マウスでは肥満、糖尿病、脂肪肝を生じ、長期投与により肝炎、線維化を生じると報告されている (Ito M, et al. Hepatol Res 2007; 37: 50)。そこで、NASHの発生に抵抗性の表現型を呈すると考えられる AR 肝特異的発現トランスジェニックマウスを作製し、さらにメチオニンコリン欠乏食と高脂肪食を投与することにより NASH モデルの作成を試み、AR の NASH 進展に及ぼす影響を調べ、最終的には肝腫瘍の発生に関する性差についても AR の関与を検討する。

## 2. 研究の目的

アンドロジェン受容体を肝特異的に発現するトランスジェニックマウス (Tg-AR) を作製した後、メチオニンコリン欠乏食と高脂肪食の投与により非アルコール性脂肪性肝炎モデルを作成し、脂質代謝と糖質代謝に関連する遺伝子群の発現量、シグナル伝達系にかかわる蛋白のリン酸化を調べ、アンドロジェン受容体の肝における脂質代謝、糖質代謝と種々のシグナル伝達系との関わりを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) アンドロジェン受容体トランスジェニック (Tg-HAR) マウスの作成後、Tg-HAR マウス (♂, ♀) と野生型マウス (♂, ♀) 4週齢に普通食を投与し、24週まで飼育し、体重、表現型の差異を調べるとともに、各組織における AR の mRNA と蛋白の発現量を real time PCR 法、および Western blot 法で確認する。肝組織標本はホルマリン固定後パラフィン包埋、切片を切り出し、HE 染色にて Tg-HAR マウスにおける変化の有無を検討する。また、Tg-HAR マウス (♂, ♀) 10~12 週齢にメチオニンコリン欠乏の高脂肪食 (脂質全カロリーの 58%) を4週間投与し、肝線維化を伴う脂肪性肝炎モデル (A 群: 各5匹) を作成する。また、野生型マウスに同様の処置を行い、脂肪性肝炎モデルを作成する (B 群: 各5匹)。対照として、Tg-HAR マウスと野生型マウスに普通食を投与 (C 群, D 群: 各5匹) して作

成する。

(2) 上記マウスを各々の飼料で飼育後に屠殺し、肝臓を取り出し、一部は凍結して $-80^{\circ}\text{C}$ で保存する。ホルマリン固定した標本はパラフィン包埋後、切片を切り出し、HE染色、Azan染色により組織学的に診断する。

(3) マウス屠殺時に採取した血液を用いて、肝機能検査 (AST, ALT, G-GTP), 脂質検査 (総コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸)、糖検査 (空腹時血糖、インスリン)、各種サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、レプチン、アディポネクチンなど) の測定を行う。

(4) 各群のマウス肝臓から total RNA を抽出し、脂肪酸合成系遺伝子、脂肪酸酸化系遺伝子、活性酸素除去系遺伝子の発現量を real time PCR 法で解析し、比較検討する。また、AR の shRNA を作製し、Tg-HAR マウスの AR 遺伝子発現をノックダウンすることにより、これら遺伝子発現の変化を検討する。

(5) 各群のマウス肝臓から蛋白を抽出し、インスリンシグナル (IRS2, PTP1B など)、細胞増殖 (MAPK, AKT など)、炎症 (TNF- $\alpha$  など)、線維化 (TGF- $\beta$  など)、レニンアンジオテンシンシグナル、サイトカインシグナルに関連した蛋白のリン酸化についてウエスタンブロットを用いて検討する。

#### 4. 研究成果

(1) アンドロジェン受容体 (AR) を肝特異的に発現するトランスジェニックマウス (Tg-AR) を作製するため、ヒト由来の androgen receptor cDNA (2757bp) を apoE promoter の下流に挿入した発現プラスミドを作成し、全長の塩基配列を確認した後、326 個の受精卵に注入、合計 257 個の受精卵移植を行った。遺伝子陽性の Tg-AR のメスが 2 匹生まれ、4 回妊娠出産したが、子供はすべて死亡または捕食されていた。この Tg-AR は先天的に子育てができないのか、生まれた子供に問題があるのか不明である。再度 Tg-AR の作製を 3 度行ったが、tail 確認にて 1 回目 0/65 匹、2 回目 0/37 匹、3 回目 0/37 匹と AR 遺伝子が確認されなかった。Tg-AR 作製がうまくいかない理由は不明である。

(2) そこで、肝癌培養細胞の HepG2 と Huh7 に AR 発現ベクターを導入し、Fatty Acid Metabolism PCR array (QIAGEN) を用いて脂肪代謝に関連する 84 遺伝子の発現変化をコントロールと比較した。図 1 に示すようにアンドロジェン受容体 (AR) の発現は蛋白レベルで確認されている。HepG2 と Huh7 で有意に上昇していた遺伝子は各々 6 個、0 個、有意に低下し

ていた遺伝子は各々 35 個、10 個で、Acetyl-CoA acyltransferase、Acyl-CoA dehydrogenase、Acyl-CoA oxidase、Acyl-CoA synthetase、Carnitine palmitoyltransferase などの脂肪酸酸化に促進的に働く遺伝子の多くは発現低下し、脂肪酸合成に働く Acyl-CoA

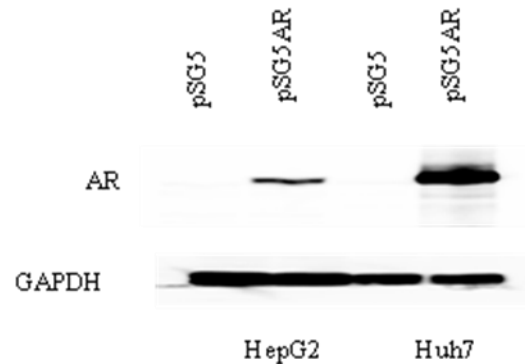


図 1 HepG2、Huh7 に pSG5AR 遺伝子を導入し、発現を Western blotting で確認した。

thioesterase の遺伝子発現には一定の傾向はみられなかった。HepG2 と Huh7 の両方で共通して低下していた遺伝子は Acyl-CoA dehydrogenase と Carnitine palmitoyltransferase 1A の 2 個のみで、脂肪酸酸化に促進的に働くこれら遺伝子の発現低下は、細胞質に脂肪酸の蓄積を生じると推測された。AR の肝特異的ノックアウトマウスでは、脂肪酸合成亢進、脂肪酸酸化抑制により脂肪肝を生じることから、予想された結果とは逆であった。

#### 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)

- (1) Okitsu K, Kanda T, Imazeki F, Yonemitsu Y, Ray RB, Chang C, Yokosuka O. Involvement of interleukin-6 and androgen receptor signaling in pancreatic cancer. 査読あり、Genes Cancer、1 巻、2010、pp859-867、PMID:21779469

[学会発表] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

今関 文夫 (IMAZEKI FUMIO)

千葉大学・大学院医学研究院腫瘍内科学・  
准教授  
研究者番号：40223325

(2) 研究分担者 ( )  
研究者番号：

(3) 連携研究者  
新井 誠人 (ARAI MAKOTO)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：30396684