

平成 31 年 4 月 9 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07743

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた男性ホルモンと食餌性肥満・糖尿病のクロストークの解明

研究課題名(英文) Interactions between androgen action and diet-induced metabolic disorders

研究代表者

原田 直樹 (Harada, Naoki)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号：00529141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、男性ホルモン作用低下とエネルギー代謝異常の関係における食餌の影響について検討を行った。

(1) 男性ホルモン作用低下モデルであるアンドロゲン受容体ノックアウトマウスでは、雄特異的に高脂肪食摂取時に肥満・耐糖能異常を生じ、寿命も短縮することが判明した。この代謝異常には、腸内細菌叢の変化が関与することが示唆された。

(2) 胎児期の男性ホルモン作用を抑制すると膵臓細胞の発達に影響し、生後高脂肪食を摂取させるとインスリン分泌が低下して耐糖能異常が生じることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢や肥満によって男性ホルモン(テストステロン)が減少するが、男性ホルモン作用の低下は脂質を多く含む食事の摂取と組み合わせることで、腸内細菌叢を変化させて、メタボリックシンドローム発症を加速させることが判明した。

テストステロンは胎児期に男性への性分化を引き起こすが、胎児期の作用を抑制すると雄特異的に膵臓細胞の発達が抑制され、生後の高脂肪食摂取と組み合わせられるとインスリンが不足して耐糖能異常が生じることが判明した。この結果は、生活習慣病胎児期発症起源説に男性ホルモンの関与を示唆するものとなった。

研究成果の概要(英文)：The effects of dietary composition on metabolic disorders induced by androgen action deficiencies were studied using rodent models.

(1) Male androgen receptor knockout mice exhibited obesity, glucose intolerance, and a reduced lifespan when fed a high-fat diet. The observed metabolic disorders were attributed to gut microbiota.

(2) Inhibition of fetal androgen action suppressed pancreatic β -cell development in male rats. The rats exhibited insulin defects and glucose intolerance when fed high-fat diets.

研究分野：栄養生化学

キーワード：高脂肪食 男性ホルモン テストステロン DoHAD 肥満・糖尿病 腸内細菌 膵細胞 寿命

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

疫学調査により男性ホルモンであるテストステロンレベルが減少すると糖・脂質代謝が悪化して、肥満、脂肪肝、2型糖尿病や心疾患を発症するリスクを上昇させる。しかし、どのようなメカニズムで糖・脂質代謝異常が生じるかについては不明であった。一方、高脂肪食が内蔵型肥満を基調としたメタボリックシンドロームの発症に関係することは自明であるが、その発症に腸内細菌叢が関与することが明らかになってきた。腸内細菌叢には性差が存在し、性差で発症頻度が異なる疾患の一因となるが、腸内細菌叢におよぼすテストステロンの影響については、明らかになっていなかった。

生活習慣病胎児期発症説 (Baker / DOHaD 説) は、将来の肥満や2型糖尿病、動脈硬化症を含む生活習慣病発症には胎児期環境が重要であること説いたものであるが、胎児期におけるリスクには性差がある (雄への影響が大きい)。一方で、膵β細胞の発達は胎児期の環境に大きく影響を受け、母獣のエネルギー状態の影響を強く受けることが知られていた。日本人を含むアジア人では、遺伝的に膵β細胞からのインスリン分泌が西洋人の半分程度と低く、2型糖尿病患者の約70%でインスリン分泌の不足が観察されている。つまり、アジア人男性は2型糖尿病発症について胎児期の状態の感受性を受けやすいことが考えられる。母獣のアルコールやニコチンの摂取は、胎児の生活習慣病のリスクを上昇させることに加えて、胎児期のテストステロン濃度を減少させる事が別々に報告されていた。しかし、DOHaD 説における胎児期の男性ホルモンの作用については不明であった。

2. 研究の目的

男性ホルモン作用の低下がどのように肥満や2型糖尿病を引き起こすのか? その疑問を解明するために、動物個体レベルでの糖代謝・脂質代謝とアンドロゲンシグナルの関係について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、以下の2つの実験系により、男性ホルモンと食餌性肥満・糖尿病のクロストークについて検討を行った。

(1) Cre-loxP システムを用いて、全身で作用する CAG プロモーターの制御下で全身性 ARKO (オス: CAG-Cre^{+/-}; AR^{ly}/y、メス: CAG-Cre^{+/-}; AR^{ly}/y) マウス、およびその同腹仔の Control (オス: CAG-Cre^{+/-}; AR^{flox/y}/y、メス: CAG-Cre^{+/-}; AR^{flox/y}/y) マウスを作製した。離乳後、オスに標準食または高脂肪食を、メスに高脂肪食を与えて20週齢まで飼育した。

(2) 胎児期のテストステロンサージの影響について検討するために、アンドロゲン受容体アンタゴニストである Flutamide を妊娠ラットに投与して、標準食または高脂肪食を摂取させて12週齢まで飼育した。

4. 研究成果

(1) AR-KO マウスを用いた検討

標準食を与えたオスでは、摂食量は Control 群に比べて ARKO 群で減少し、体重も Control 群に比べて ARKO 群で軽くなり、累積の食餌効率率は20週齢時でのみ ARKO 群で高値を示した。高脂肪食を与えたオスでは、摂食量は2群間に差は見られず、体重は Control 群に比べて ARKO 群で有意に重くなり、累積の食餌効率率は11週齢以降 ARKO 群で有意に高値を示した。高脂肪食を与えたメスでは、摂食量、体重および累積の食餌効率に ARKO による影響はみられなかった。高脂肪食摂取時に Control マウスと比較して ARKO オスマウスでは寿命が短縮することが判明した。

マウスを解剖後、脂肪組織重量を比体重量として求めた。その結果、内臓脂肪 (腸間膜脂肪、腎周囲/後腹膜脂肪) は、食餌に関わらずオスでは、Control 群に比べて ARKO 群で有意に増加した。一方、高脂肪食を与えたメスでは、ARKO による影響はみられなかった。ARKO による内臓脂肪の増加は、高脂肪食摂取時の方が影響は大きかった。腸間膜脂肪細胞の面積を測定したところ、標準食を与えたオスと高脂肪食を与えたメスでは群間に差は見られなかったが、高脂肪食を与えたオスでは Control 群に比べて ARKO 群で有意に増加した。皮下脂肪 (鼠蹊部皮下脂肪) は食餌や雌雄に関わらず、Control 群に比べて ARKO 群で有意に増加した。

ARKO が糖代謝に及ぼす影響を検討するため、17週齢時に腹腔内糖負荷試験 (IPGTT) を行った。その結果、標準食を与えたオスと高脂肪食を与えたメスは、ARKO による影響がみられなかった。一方、高脂肪食を与えたオスは、血糖値を測定した全ての時点において、Control 群に比べて ARKO 群で血糖値が有意に上昇した。18週齢時にインスリン負荷試験 (ITT) を行ったところ、高脂肪食を与えたオスでのみ、インスリン投与後60分の時点において、ARKO 群で血糖値が有意に上昇した。

糖代謝に影響を及ぼす骨格筋と肝臓の重量を比体重量として求めた。骨格筋は太ももの前側の大腿四頭筋と後ろ側のハムストリングを検討したところ、共に高脂肪食を与えたオスでのみ、ARKO 群で有意に減少した。肝臓も高脂肪食を与えたオスでのみ、ARKO 群で有意に増加した。また、肝臓中トリグリセリド量を測定したところ、高脂肪食を与えたオスでのみ、ARKO 群で有意に上昇した。さらに、肝臓切片をヘマトキシリン-エオシン染色により染色し観察したところ、小滴性脂肪肝が見られた。

食餌量あたりの乾燥糞重量は、高脂肪食を与えたオスでのみ、ARKO 群で有意に減少した。また、解剖時に測定した盲腸内容物の比体重量も高脂肪食を与えたオスでのみ、ARKO 群で有意に減少した。そこで、高脂肪食を与えたオスにおいて、次世代シーケンサーを用いて腸内細菌叢を解析したところ、ARKO 群で *Turicibacter* spp. と *Lactobacillus reuteri* の顕著な増加がみられた。次に、標準食を与えたオスと高脂肪食を与えたメスにおいても、この2種の細菌について、Real-time PCR で検討を行った。*Turicibacter* spp. は、高脂肪食を与えたオスでのみ ARKO 群で増加した。*L. reuteri* は食餌に関わらずオスで増加し、高脂肪食を与えたメスは ARKO による影響はみられなかった。これらの細菌は乳酸酸性菌であるために、*in vitro* において乳酸の脂肪細胞分化に及ぼす影響について検討した結果、乳酸には脂肪細胞分化促進作用があり、その作用は、D-乳酸がL-乳酸よりも強いことを見出した。

高脂肪食摂取マウスに抗生物質（アンピシリン＋ネオマイシン）を飲水摂取させた結果、AR-KO で生じた体重増加、食餌効率の上昇、耐糖能低下、大腿筋重量低下が消失した。AR-KO による内臓脂肪重量増加や脂肪細胞肥大も抑制された。以上の結果から、男性ホルモン欠乏によるエネルギー代謝異常は、AR を介したオス特異的な現象であり、高脂肪食摂取時において顕著に影響が現れ、これには腸内細菌叢が関与することが考えられた。

(2) 胎児期のテストステロンサージの影響

胎児期の Flutamide 暴露による β 細胞量の減少が耐糖能に及ぼす影響を調べるために、母ラットに抗アンドロゲン剤（AR アンタゴニスト）である Flutamide (50 mg/kg) を妊娠 16.5 日目から出生まで毎日経口投与し、出生した雄仔ラットを Control 群の母獣に飼育させて3週齢で離乳後、標準食または高脂肪食を摂取させて6週齢および12週齢まで飼育した。12週齢時に IPGTT と ITT を行った結果、標準食摂取時では Flutamide 投与群で耐糖能が上昇する傾向を示したが、血中インスリン量については Control 群と Flutamide 投与群に明確な差はなかった。高脂肪食摂取時には、Flutamide 群で耐糖能が悪化し、血中インスリン量についても減少した。一方で、インスリン感受性については標準食・高脂肪食いずれにおいても影響がなかった。

Flutamide を投与すると、出生時において雄特異的に β 細胞量が減少することを見出した。標準食時には、生育後の12週齢時でも β 細胞量が減少したままであるが、高脂肪食摂取時には、 β 細胞量が回復することが判明した。糖負荷試験の結果と合わせると、胎児期の Flutamide 暴露によって出生時の β 細胞量は減少し、標準食摂取時には β 細胞量は減少したままであるが β 細胞あたりの機能は向上すること、高脂肪食摂取時には β 細胞量は回復するが β 細胞機能が低下して耐糖能不全が生じることが示唆された。これらの結果は、胎児期のテストステロンサージが、生後の食餌との関係で DOHaD に関与することが判明した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

1. ホルモンによる膵島機能制御
稲垣暢也、出崎克也、原田直樹、原田範雄。
Islet Equality, 8, 5-14, 2019.
http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0077_0801
2. Role of androgens in energy metabolism affecting on body composition, metabolic syndrome, type 2 diabetes, cardiovascular disease, and longevity: Lessons from a meta-analysis and rodent studies.
Harada N.
Biosci. Biotechnol. Biochem., 82, 1667-1682, 2018.
DOI: 10.1080/09168451.2018.1490172
3. Androgen signaling expands β -cell mass in male rats and β -cell androgen receptor is degraded under high-glucose conditions.
Harada N., Yoda Y, Yotsumoto Y, Masuda T, Takahashi Y, Katsuki K, Kai K, Shiraki N, Inui H, and Yamaji R.
Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 314, E274-E286, 2018.
DOI: 10.1152/ajpendo.00211.2017
4. 性ホルモンが操る腸内細菌叢が代謝疾患を制御する～腸内細菌叢を標的としたアンドロゲンの作用～。
原田直樹、山地亮一。
化学と生物, 56, 2-4, 2018.
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.56.2
5. Stereoselective effects of lactate enantiomers on the enhancement of 3T3-L1 adipocyte differentiation.

Harada N, Hirano I, Inui H, Yamaji R.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 498, 105-110, 2018.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.198

6. Hypogonadism alters cecal and fecal microbiota in male mice.
Harada N, Hanaoka R, Hanada K, Izawa T, Inui H, and Yamaji R.
Gut Microbes, 7, 533-539, 2016.
DOI: 10.1080/19490976.2016.1239680

〔学会発表〕(計 28 件)

1. 男性ホルモン低下による代謝疾患の発症と腸内細菌
原田直樹 .
第 12 回日本性差医学・医療学会学術集会、2019 年 .
2. ストレプトゾトシンは REDD2 の発現増加を介して膵 β 細胞死を誘導する
田宮央登、原田直樹、乾博、山地亮一 .
2019 年度 日本農芸化学会大会、2019 年 .
3. G protein-coupled receptor を介した curcumin のシグナル伝達機構について
奥山真衣、寺岡佳晃、原田直樹、五島直樹、乾隆、乾博、山地亮一 .
2019 年度 日本農芸化学会大会、2019 年 .
4. 食餌形状と異性化糖の飲水摂取がマウス血糖値に及ぼす影響について
野村雅之、原田直樹、乾博、山地亮一 .
第 57 回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会、2018 年 .
5. アンドロゲン受容体ノックアウトマウスの代謝疾患に対する抗生物質摂取の影響
南友香梨、花田一貴、原田直樹、乾博、山地亮一 .
第 91 回日本生化学会大会、2018 年 .
6. 胎児期の抗アンドロゲン剤暴露による膵臓 β 細胞の発達と血糖値への影響
四元優佑、甲木孝弘、與田安紘、乾博、原田直樹、山地亮一 .
2018 年度日本農芸化学会関西支部大会 (第 505 会講演会)、2018 年 .
7. 生体制御におけるアンドロゲンシグナリングと食の相互作用に関する研究
原田直樹 .
第 504 回 日本農芸化学会関西支部例会、2018 年 .
8. 食品成分による膵 β 細胞機能制御
原田直樹 .
第 61 回 日本糖尿病学会年次学術集会、2018 年 .
9. エネルギー代謝におけるアンドロゲンシグナリングと食餌のクロストーク
原田直樹 .
第 72 回 日本栄養・食糧学会大会、2018 年 .
10. 生体制御におけるアンドロゲンシグナリングと食の相互作用に関する研究
原田直樹 .
2018 年度 日本農芸化学会大会、2018 年 .
11. 唾液腺と唾液の性差形成に及ぼすアンドロゲンシグナリングの影響
原田直樹、竹中重雄、乾博、山地亮一 .
2018 年度 日本農芸化学会大会、2018 年 .
12. アンドロゲン受容体ノックアウトマウスの肥満発症と腸内細菌の特徴
花田一貴、原田直樹、乾博、山地亮一 .
2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年 .
13. アンドロゲン受容体ノックアウトマウスの肥満・糖尿病発症における食餌と性差の影響
花田一貴、原田直樹、乾博、山地亮一 .
第 56 回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会、2017 年 .
14. D-乳酸は L-乳酸に比して脂肪細胞分化を強く促進する

- 平野以都、原田直樹、乾博、山地亮一。
日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部合同大会、2017年。
15. 血糖調節に及ぼす性成熟期の男性ホルモンの影響
四元優佑、原田直樹、乾博、山地亮一。
日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部合同大会、2017年。
 16. GPCR とそのシグナル伝達を促進する食品因子の組合せの探索
奥山真衣、原田直樹、五島直樹、乾博、山地亮一。
日本ビタミン学会第 69 回大会、2017年。
 17. 膵β細胞制御による糖代謝調節に関する食品機能学的研究
原田直樹。
第 71 回 日本栄養・食糧学会大会、2017年。
 18. 膵β細胞における S-エクオール の cAMP 産生作用には GPCR が関与する
堀内寛子、原田直樹、乾博、山地亮一。
2017 年度 日本農芸化学会大会、2017年。
 19. 膵β細胞増殖におよぼすアンドロゲンの作用と高グルコースによる影響について
原田直樹、乾博、山地亮一。
2017 年度 日本農芸化学会大会、2017年。
 20. 男性ホルモン欠乏による腸内細菌叢の変化とメタボリックシンドロームの発症
原田直樹、花岡諒、乾博、山地亮一。
第 39 回 日本分子生物学会年会、2016年。
 21. アンドロゲン受容体ノックアウトマウスの肥満発症における高脂肪食の影響 *花田一貴 1、
原田直樹、乾博、山地亮一。
第 55 回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会、2016年。
 22. S-Equol はストレプトゾトシンによる糖尿病発症を緩和する
宇佐美敦子、堀内寛子、原田直樹、乾博、山地亮一。
第 55 回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会、2016年。
 23. 顎下腺の発達と唾液糖タンパク質におよぼす男性ホルモンの影響について
橋本未来、原田直樹、乾博、山地亮一。
2016 年度日本農芸化学会関西支部合同大会（第 496 回講演会）、2016年。
 24. 膵β細胞機能応答を介した S-エクオール の作用
原田直樹。
第 495 回 日本農芸化学会関西支部例会、2016年。
 25. S-エクオール による膵β細胞の PKA シグナル活性化には細胞膜画分が関与する
原田直樹、堀内寛子、乾博、山地亮一。
日本ビタミン学会第 68 回大会、2016年。
 26. 膵β細胞における S-エクオール の Gαs-cAMP-PKA シグナル活性化について
堀内寛子、原田直樹、乾博、山地亮一。
第 70 回 日本栄養・食糧学会大会、2016年。
 27. 男性ホルモン機能低下に起因した肥満発症における食餌組成の影響
原田直樹、花岡諒、中野長久、乾博、山地亮一。
第 70 回 日本栄養・食糧学会大会、2016年。
 28. 男性ホルモン機能低下に起因した肥満発症における腸内細菌の影響
花田一貴、原田直樹、花岡諒、中野長久、乾博、山地亮一。
第 70 回 日本栄養・食糧学会大会、2016年。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/NC/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。