

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06033

研究課題名(和文) 肥満・糖尿病モデル動物を用いたインクレチンによる雄性生殖機能の調節に関する研究

研究課題名(英文) Study of regulation on the function of male reproduction by incretin using model animals of obesity and diabetes

研究代表者

浅野 淳 (Asano, Atsushi)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授

研究者番号：90312404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの精巣では、インクレチン受容体およびインクレチンの発現が認められた。TM4(セルトリ細胞株)とMA-10(ライディッヒ細胞株)では、インクレチン刺激によってサイトカイン関連遺伝子およびステロイド合成関連遺伝子の一過性の発現増強が見られた。TM4とMA-10では、インクレチン刺激後、cAMPを介したシグナル伝達経路の活性化が認められた。C57BL/6JマウスにGLP-1受容体作動薬(エキセナチド)を投与すると、TM4でみられた遺伝子発現増強が同様に観察された。以上の結果から、インクレチンは精子形成関連遺伝子の発現調節を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インクレチンは精巣内の細胞に作用して、精子形成に関連する遺伝子の発現を正に制御することが示された。また、肥満や糖尿病の病態は精巣に対するインクレチンの作用、特にGIPの作用に影響を与える可能性が示唆された。今後、引き続き肥満・糖尿病モデル動物を利用し、雄性生殖機能に対するインクレチンの作用機序を解析することによって、エネルギー代謝調節異常と生殖機能低下症との関連性の解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In the testes of mice, incretin receptors and incretin expression were observed. Incretin stimulation transiently enhanced the expression of cytokine-related genes and steroid synthesis-related genes in TM4 (Sertoli cell line) or MA-10 (Leydig cell line). Furthermore, in TM4 and MA-10, activation of cAMP-mediated signaling pathway was observed after incretin stimulation. In addition, the same induction of gene expression seen in TM4 was observed in C57BL/6J mice treated with GLP-1 receptor agonist (exenatide). These results indicate that incretins are responsible for the regulation of spermatogenesis-related gene expression.

研究分野：実験動物学

キーワード：マウス インクレチン 精子形成

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は先進国のみならず、世界中の多くの国々で蔓延している代謝異常症である。肥満は2型糖尿病を引き起こす最大の要因であり、糖尿病がもたらす合併症により死に至ることもある重大な疾病の一つである。肥満と糖尿病は様々な合併症を引き起こすが、その一つに不妊症がある。例えば、ヒトやマウス・ラットでは、精子数や精子機能が肥満により低下する。加えて、ヒトでは男性の肥満が体外授精による妊娠率を低下させるとの報告もある。ところが、現在まで肥満・糖尿病を原因とする不妊症・繁殖障害の分子基盤については十分な解析がなされておらず、その対策法についても検討が進んでいなかった。

最近我々は、インクレチン受容体がマウス精巣において他の陽性対照の組織と同程度に発現していることを見出し、さらに精巣由来の各種細胞株でも高度に発現していることを示した。インクレチンとは、経口摂取した糖やタンパク質の刺激によって腸管から分泌され、膵島細胞に作用してインスリンの分泌を亢進させるペプチド性消化管ホルモンの総称であり、胃抑制ペプチド(GIP)とグルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)の2つが確認されている。インクレチンには膵島以外への作用がいくつか報告されており、脂肪蓄積・食欲抑制等の作用は肥満や糖尿病の病態との関連性が注目されている。一方、インクレチンの生殖器への作用はほとんど報告がなく、インクレチンと肥満・糖尿病を原因とする不妊症・繁殖障害との関連性は不明なままであった。

## 2. 研究の目的

我々は、肥満・糖尿病を原因とする不妊症・繁殖障害の分子基盤の一端を解明するという目標を掲げ、本研究ではインクレチンの雄性生殖器に対する作用とその機序を明らかにするために以下の課題について検討を行う。

(1) 精巣(特にセルトリ細胞とライディッヒ細胞)の精子形成サポート関連遺伝子の発現はインクレチンによって調節されるのか。

(2) 肥満・2型糖尿病モデル動物の精子形成能・精子機能はインクレチン製剤の投与によって改善されるのか。

## 3. 研究の方法

(1) 培養細胞株・初代培養細胞を用いた、セルトリ細胞・ライディッヒ細胞・雄性生殖細胞に対するインクレチンの作用の解析

培養細胞株に対して安定型 GIP 受容体アゴニスト(D-Ala(2)GIP)あるいは安定型 GLP-1 受容体アゴニスト(エキセナチド)による刺激を行う。その後、細胞内シグナル伝達の変動、および性機能に関連する遺伝子の発現変動を解析し、インクレチンの効果を検証する。

細胞内 cAMP 濃度上昇の解析: インクレチン刺激による細胞内 cAMP 産生の有無を、CREB レポーターベクター/ルシフェラーゼアッセイを用いた解析を行い、インクレチン受容体が機能的であるかどうか検討する。

遺伝子発現の比較: リアルタイム RT-PCR 法を用いて、性ステロイド合成、サイトカイン・ケモカイン産生など、性機能に関連する下記の遺伝子の発現変動を解析する。

ライディッヒ細胞株(MA-10): テストステロン産生の律速因子(*Star*)、ステロイド代謝酵素(*Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1*)

セルトリ細胞株(TM4): 精子形成に関連するサイトカイン/ケモカイン(*Gdnf*, *Kitl*, *Pdgfa*, *Inhbb*)、レチノイン酸合成酵素(*Aldh1a1*)

雄性生殖細胞株(GC-1 spg): 精子形成に関連するサイトカインレセプター(*Kit*)、分化マーカー(*Stra8*, *Hsf2*, *Rfx2*, *Prm1*)

(2) 肥満・糖尿病モデル動物の精巣の機能に対するインクレチンの効果の検討

精巣の機能が低下している肥満・糖尿病モデルマウス(食餌性肥満マウス、ストレプトゾトシン処置マウス、KK-*A<sup>y</sup>*, あるいは *Lep<sup>ob</sup>* など)および対照となる健常マウスを用いて、前述のインクレチン受容体アゴニスト、もしくは溶媒をそれぞれ腹腔内投与する。投与後、以下の解析を行い、生体においてインクレチンが精巣の機能を改善しうるとのかどうか検討する。

精巣における遺伝子発現の解析

血中テストステロン量の測定

精巣上体から採取した精子の数・運動能・形態の比較

精巣におけるアポトーシスの検出

## 4. 研究成果

(1) 培養細胞株・初代培養細胞を用いた、セルトリ細胞・ライディッヒ細胞・雄性生殖細胞に対するインクレチンの作用の解析

マウス雄性生殖細胞由来(GC-1, GC-2)、セルトリ細胞由来(TM4)およびライディッヒ細胞由来(MA-10)細胞株について、インクレチン受容体 (GLP-1 受容体 *Glp1r*, GIP 受容体 *Gipr*) およびインクレチン (グルカゴン *Gcg* (GLP-1 前駆体)、GIP *Gip*) の mRNA 発現量を定量的リアルタイムPCR法で調べた。その結果、GLP-1 受容体発現は TM4 細胞に、GIP 受容体発現は GC-1 および MA-10 細胞において比較的高いことがわかった (図 1)。

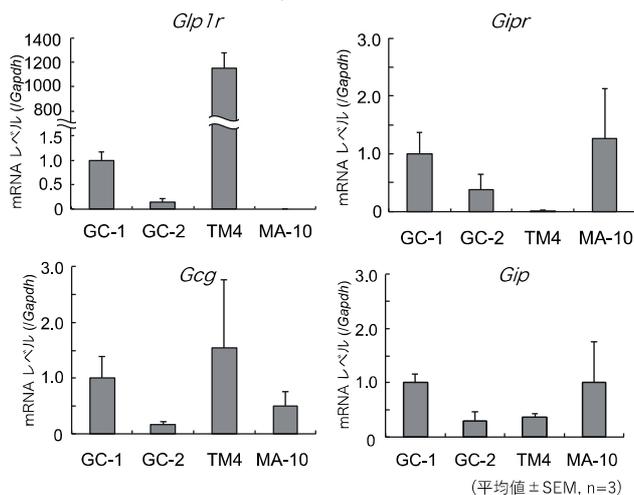


図 1 培養細胞株におけるインクレチン受容体・リガンド関連遺伝子の mRNA 発現量

また、GIP 受容体リガンド(ヒト[D-Ala<sup>2</sup>]-GIP, 100 nM)および GLP-1 受容体リガンド(エキセナチド, 10 nM)の各細胞株に対する作用を調べた。MA-10 細胞をヒト[D-Ala<sup>2</sup>]-GIP により刺激すると、テストステロン合成関連遺伝子(*Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1*)の各 mRNA 発現量はいずれも有意な一過性の増加が認められた (図 2A)。さらに、TM4 細胞をエキセナチドで刺激すると、精子形成に關与するサイトカイン(*Kitl*, *Pdgfa*)および *Glp1r* mRNA 発現量もそれぞれ有意に一過性の増加が認められた(図 2B)。以上の結果から、インクレチンは精巣内の細胞に作用して、テストステロン合成やサイトカイン産生を促すことにより、精子形成を調節する可能性が示唆された。また、精巣内でのインクレチン作用は自己分泌または傍分泌の機序によってもたらされる可能性も考えられた。

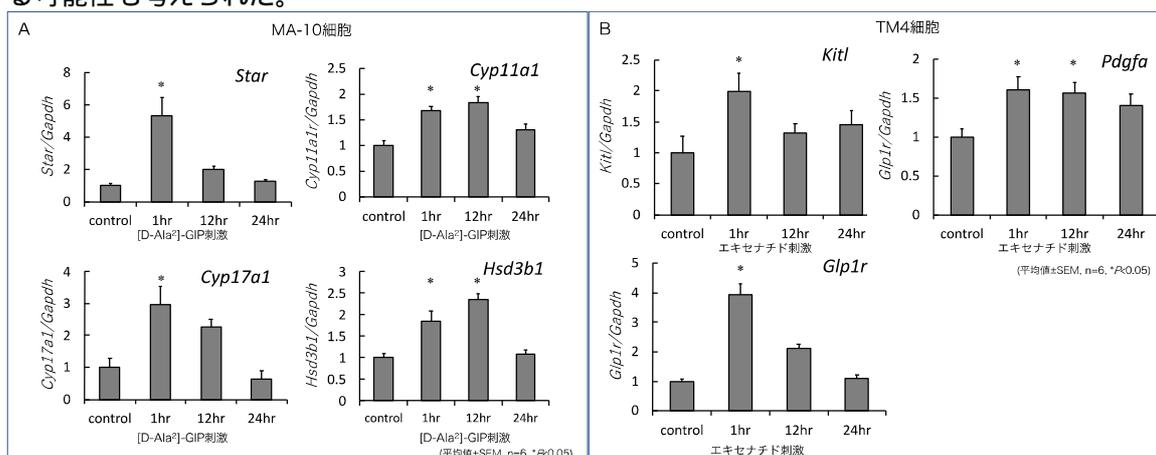


図 2 培養細胞株におけるインクレチン刺激後の各遺伝子発現量の変動

さらに、インクレチンによる刺激が細胞の機能に与える影響を調べるため、レポータージーンアッセイを用いて細胞内 cAMP 経路の活性化がおこなわれるかどうか解析した。まず両細胞株に、エンハンサーとして cAMP 応答配列を有するルシフェラーゼレポータープラスミド [pNL(NlucP/CRE/Hygro)] を細胞内に導入し、ハイグロマイシン存在下で増殖した薬剤耐性細胞を選抜した。つぎに、薬剤耐性細胞に、GIP 受容体アゴニストとしてヒト[D-Ala<sup>2</sup>]-GIP、GLP-1 受容体アゴニストとしてエキセナチドを用いて 1 時間、2 時間、ないし 4 時間の刺激を行った。陰性対照として溶媒(DMSO)刺激細胞を用いた。刺激後の細胞溶解液を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、MA-10 細胞では溶媒刺激と比較して、ヒト[D-Ala<sup>2</sup>]-GIP の 1 時間、2 時間刺激でルシフェラーゼ活性が 1.8 倍の有意な上昇がみられた。一方エキセナチド刺激では有

意な上昇はみられなかった。また、TM4 細胞では、溶媒刺激と比較するとエキセナチドの 1 時間および 4 時間刺激で 1.5-2.0 倍の有意な上昇がみられた (図 3)。一方ヒト [D-Ala<sup>2</sup>]-GIP 刺激では有意な上昇はみられなかった。これまでの成績では MA-10 細胞では GLP-1 受容体 mRNA が、TM4 細胞では GIP 受容体 mRNA がほとんど検出されなかった (図 1)。今回の実験成績は受容体 mRNA 発現レベルの解析結果を裏付けるものとなった。また、精巣に存在するインクレチン受容体発現細胞では、インクレチン刺激により cAMP 経路が活性化される可能性が示された。

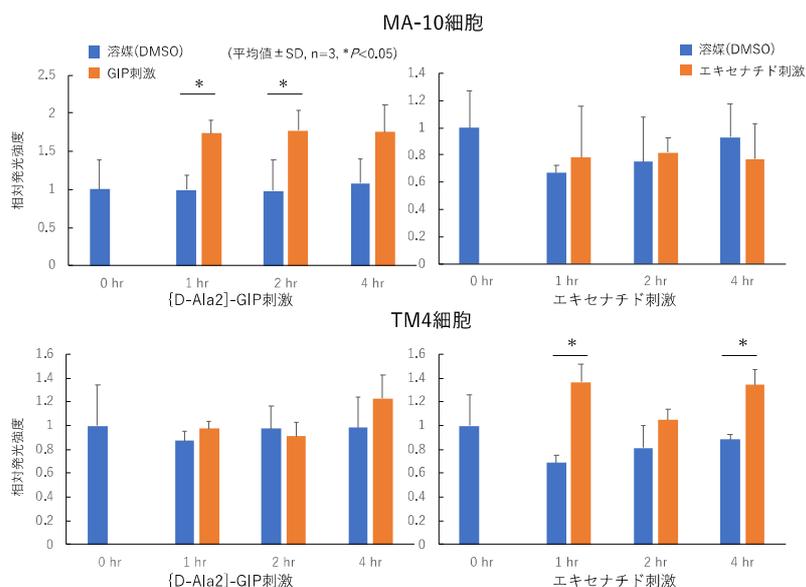


図 3 培養細胞株におけるインクレチン刺激後の細胞内 cAMP 経路の活性化

## (2) 肥満・糖尿病モデル動物の精巣の機能に対するインクレチンの効果の検討

はじめに、健常マウスに対してインクレチン受容体リガンド (エキセナチド 2.5 nmol/kg 体重、ヒト [D-Ala<sup>2</sup>]-GIP 25 nmol/kg 体重) を腹腔内投与し、1 時間後の精巣における遺伝子発現を解析した (図 4)。その結果、エキセナチド投与後 *Kitl* および *Glp1r* の mRNA レベルが有意に上昇した (図 4A)。また、ヒト [D-Ala<sup>2</sup>]-GIP 投与後に *Cyp11a1* mRNA レベルが有意に上昇した (図 4B)。以上の結果から、インクレチンは健常動物において精子形成関連遺伝子の発現調節に関与していることが示唆された。

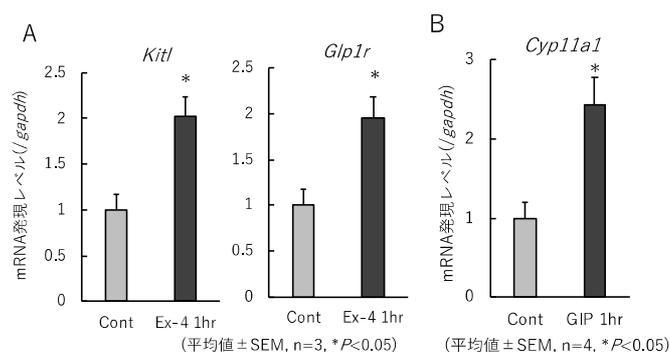


図 4 マウス精巣の遺伝子発現に対するインクレチンの効果

次に、食餌性肥満モデルマウス (C57BL/6J, 4 週齢より粗脂肪含有率 32% 飼料を 12 週間給餌) の精巣におけるインクレチンおよびインクレチン受容体遺伝子の発現を解析したところ、*Gipr* mRNA が 1.4 倍程度の有意な上昇が見られた (図 5)。*Gipr* は自然発症肥満モデルラット Zucker のランゲルハンス島では対象動物に比較して mRNA レベルが上昇していることが報告されている。従って、膵臓以外の臓器においても肥満による発現への影響が現れることが推測された。

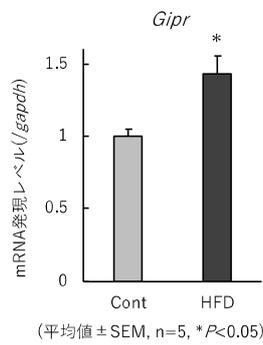


図5 食餌性肥満マウス精巣におけるGIP受容体の遺伝子発現

本研究における以上の結果より、インクレチンは精巣内の細胞に対して細胞内cAMPを介したシグナル伝達経路を活性化し、精子形成に関連する遺伝子の発現を正に制御することが示された。また、肥満や糖尿病の病態は精巣に対するインクレチンの作用、特にGIPの作用に影響を与える可能性が示唆された。今後、引き続き肥満・糖尿病モデル動物を利用し、雄性生殖機能に対するインクレチンの作用機序を解析することによって、エネルギー代謝調節異常と生殖機能低下症との関連性の解明につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>浅野淳、割田克彦                           |
| 2. 発表標題<br>精巢におけるインクレチン受容体の発現とそのリガンドの作用に関する研究 |
| 3. 学会等名<br>第66回日本実験動物学会総会                     |
| 4. 発表年<br>2019年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>浅野淳、割田克彦                         |
| 2. 発表標題<br>インクレチン受容体の精巣における発現とリガンドの作用に関する研究 |
| 3. 学会等名<br>日本獣医学会                           |
| 4. 発表年<br>2018年                             |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|