

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 9 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780141

研究課題名（和文） インスリン分泌における男性ホルモンと食品因子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analyses of androgen and food factor in insulin secretion

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・助教

研究者番号：00529141

研究成果の概要（和文）：東洋人型の 2 型糖尿病では、膵β細胞の減少を伴ったインスリン分泌不全が頻繁に観察される。本研究では、男性ホルモンであるテストステロンがアンドロゲン受容体（AR）を介して、β細胞の増殖を促進する作用を持つことを明らかにした。さらに、高グルコース環境下では AR が減少することでテストステロンによる膵β細胞増殖促進作用が失われることが判明した。また、β細胞の増殖を促進する食品因子として大豆イソフラボンであるダイゼインの代謝物である S-エクオールを見出した。

研究成果の概要（英文）： Defects in insulin secretion by decreasing pancreatic β-cell mass are frequently observed in patients with type 2 diabetes in eastern country. We have demonstrated that male sexual hormone (testosterone) enhanced the proliferation of β-cell through androgen receptor (AR). The growth stimulating effects of testosterone was diminished under high glucose conditions, which decreased AR protein. We also found that S-equol, which is produced from the soy isoflavone daidzein, enhanced β-cell growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：アンドロゲン受容体、2 型糖尿病、膵β細胞、S-エクオール、大豆イソフラボン、インスリン

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は世界に蔓延する生活習慣病である。西洋人では、2 型糖尿病の発症に肥満を伴う場合が多いのに対して、日本人を含む東洋人の 2 型糖尿病患者では、肥満者の割合が低いことから、2 型糖尿病を発症するメカニズムが異なると考えられている。つまり、筋肉、肝臓、脂肪組織におけるインスリン感受性の低下が主因となる西洋人と比較して、日本人を含む東洋人ではインスリンの分泌不全が発症に関与する割合が大きい。膵β細胞からのインスリン分泌能の指標となる HOMA-β 値では、健常時においても東洋人では西洋人の約 50%と低値であり、日本人 2

型糖尿病患者のうち約 70%でインスリン分泌不足が観察される。血糖低下作用を持つ唯一のホルモンであるインスリンを産生するβ細胞は、血糖の恒常性維持に重要な役割を果たすことは論を待たないが、近年明らかになった糖尿病発症に関わる遺伝子の多くがβ細胞機能に関するものであったことは、β細胞機能は代償が効かないものであることを裏付ける結果となった。このような背景から、東洋人における糖尿病予防、つまりβ細胞の生存と機能を維持・充進を目的とした基礎的研究が必要とされる。

日常的に摂取する食に由来する因子としてβ細胞に有益な効果を持つものは、東洋人型 2 型糖尿病の予防に有用であると考えられ

る。しかし、現状としては末梢組織におけるインスリン感受性の作用に関する知見と比較して、 β 細胞に対する食品因子に関する知見は少ない。

2. 研究の目的

近年、疫学調査により西洋人では、男性ホルモンである血中テストステロン値が低いこと、また前立腺がんの治療としてアンドロゲン除去療法を行うと2型糖尿病の発症リスクが高まることが報告された。さらに、日本人の2型糖尿病患者においても、テストステロン値が低いことが明らかになっている。そこで、本研究では東洋人型の2型糖尿病発症におけるテストステロンの役割を明らかにするために、 β 細胞におけるテストステロンの作用について評価することを主たる目的とした。また、 β 細胞の生存に有益な物質を食品因子の中からスクリーニングによって同定することを目的とした。

3. 研究の方法

β 細胞の増殖に及ぼすテストステロンあるいは食品因子の影響について、培養細胞 (INS-1細胞およびAR高発現株であるINS-1 #6細胞) と動物 (ラット) の個体を用いて、生理学・生化学・分子生物学・栄養学的手法により検討を行った。

4. 研究成果

(1) ラット β 細胞に及ぼすテストステロンの作用

Wistar系雄性ラット(8週令)の膵臓組織切片を作製してアンドロゲン受容体(AR)の発現について検討した結果、ARは膵外分泌細胞よりも β 細胞の核内に多く局在することを明らかにした。さらに、 β 細胞の核内におけるARの発現レベルは2歳令のラットでは減少していたことから加齢にともなって減少することが示唆された。 β 細胞の増殖に及ぼすテストステロンの影響を調べるために、ラットを去勢して1週間後から10日間プロピオン酸テストステロン(PT)を皮下注射した。ポジティブコントロールとして測定した前立腺重量は、擬似手術群と比較して去勢によって顕著に減少し、PTの投与によって回復が観察された。 β 細胞の増殖能に関しては、切片を作製して、増殖の指標となるproliferating cell nuclear antigenの発現レベルを免疫組織染色にて測定した。その結果、前立腺重量と同様にproliferating cell nuclear antigenの発現レベルは去勢によって減少し、PTによって回復することが明らかになった。これらの結果から、*in vivo*にお

いて、テストステロンが β 細胞の増殖を制御する作用を持つことが明らかになった。

(2) テストステロンの細胞増殖促進機構

ラット β 細胞株であるINS-1細胞からARを高発現するINS-1 #6株を単離して細胞増殖におけるテストステロンの作用機構について解析を行った。INS-1 #6では、テストステロンに依存したARの核内蓄積が観察された。INS-1 #6細胞を用いて、細胞増殖におけるテストステロンとジヒドロテストステロンの影響をアラマーブルーアッセイにより評価した結果、ともに濃度に依存して細胞増殖を促進させることが判明した。テストステロンによる細胞増加はアンドロゲンアンタゴニストであるbicalutamideによって抑制されたが、エストロゲンアンタゴニストであるICI 182,780では抑制されなかった。また、ARをノックダウンした細胞では、テストステロンによる増殖促進作用は認められなかった。これらの結果から、テストステロンは、ARを介して β 細胞の増殖を促進することが明らかになった。

(3) 高グルコースによるARの減少

AR機能と血糖値の関係について調べるために、グルコース濃度を変えて(5.5–22.2 mM、これは血糖値で100–400 mg/dLに相当する)INS-1細胞の培養を行った。その結果、高グルコース環境では、ARタンパク質が減少することを見出した。ピルビン酸の添加でもARタンパク質の減少が誘導されたことから、グルコースが代謝されることが重要であることが明らかになった。ARの発現減少は、mRNAレベルでは観察されず、プロテアソーム阻害剤存在下では認められなかったことから、翻訳後レベルでユビキチン-プロテアソームシステムによる分解亢進が関与することが示唆された。細胞内カルシウムキレート剤であるBAPTA-AM存在下では、高グルコースによるARの減少が観察されなかった。さらに、カルシウムイオノフォアによってARが減少し、このARの減少も、プロテアソーム阻害剤存在下では起こらなかった。これらの結果から、グルコース濃度の増加に伴う細胞内カルシウムシグナルの増加によって、ARが減少することが示された。また、高グルコースによって分泌されたインスリンは、ARの分解促進には関与しなかった。

(4) 高グルコース下でのテストステロンの作用

テストステロンによる β 細胞増殖促進における高グルコースの影響について検討した結果、低グルコース濃度環境(5.5 mM)で促進された β 細胞増殖は高グルコース濃度(22.2 mM)下では見られなかった。この

結果から、 β 細胞の増殖能が低下する糖毒性に、テストステロンシグナルの関与が考えられた。

(5) β 細胞の増殖を促進する食品因子

INS-1細胞の増殖能を指標として β 細胞に有益な作用を与える食品因子のスクリーニングを行った。その結果、大豆イソフラボンであるダイゼインから腸内細菌によって産生される S -エクオールにINS-1細胞増殖促進作用が見られた。この作用はエナンチオマーである R -エクオール、前駆体であるダイゼインには認められなかった。これらの結果は、 S -エクオール産生能を持つ(S -エクオールを産生する腸内細菌を持つ)ヒトでは、大豆の摂取が β 細胞を標的とした抗糖尿病作用を持つことが示唆された。

また、 S -エクオールはテストステロンの作用と競合せず、協調的にINS-1細胞の増殖を促進することが判明した。

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2件)

1. Naoki Harada, Kaoru Inoue, Ryoichi Yamaji, Yoshihisa Nakano, and Hiroshi Inui. “Androgen deprivation causes truncation of the C-terminal region of androgen receptor in human prostate cancer LNCaP cells” *Cancer Sci.*, 103 (6), 1022-1027, 2012.
査読有り

2. 原田直樹、山地亮一、中野長久、乾博.
“レスベラトロールによるアンドロゲン受容体の転写活性阻害機構について”
ビタミン, 86 (1), 21-23, 2012.
査読有り

[学会発表] (計12件)

1. 原田直樹ら “ β 細胞における男性ホルモンシグナルの役割について”
2013年度 日本農芸化学会大会
2013年3月24~28日
宮城 (東北大学)

2. 原田直樹ら “ β 細胞のアンドロゲンシグナリングの役割と高グルコースの影響”
第85回 日本生化学会大会
2012年12月14~16日
福岡 (福岡国際会議場・マリンメッセ福岡)

3. 原田直樹ら “ β 細胞におけるアンドロゲン受容体を介したテストステロンの作用について”

第51回 日本栄養・食糧学会近畿支部大会
2012年10月20日
兵庫 (甲子園大学)

4. 高木俊樹ら “前立腺におけるアンドロゲン受容体とタンパク質アルギニンメチル基転移酵素10の相互作用について”
2012年度 日本農芸化学会関西支部大会
2012年9月29日
京都 (京都学園大学)

5. 原田直樹ら “ β 細胞における男性ホルモンシグナルに及ぼす高グルコースの影響”
第66回 日本栄養・食糧学会大会
2012年5月18~20日
宮城 (東北大学)

6. 原田直樹ら “前立腺がん細胞における断片化アンドロゲン受容体の産生について”
2012年度 日本農芸化学会大会
2012年3月22~26日
京都 (京都女子大学)

7. 増田達哉ら “ β 細胞におけるアンドロゲン受容体の役割と高グルコース下での分解について”
2012年度 日本農芸化学会大会
2012年3月22~26日
京都 (京都女子大学)

8. Naoki Harada et al. “Resveratrol decreases ligand-dependent acetylation of androgen receptor”
2011 International Conference on Food Factors
2011年11月20~23日
Taiwan (Thaipei International Convention Center)

9. 増田達哉ら “ β 細胞のアンドロゲン受容体の発現に及ぼす高グルコースの影響”
第50回 日本栄養・食糧学会近畿支部大会
2011年10月15日
奈良 (近畿大学)

10. 原田直樹ら “ β 細胞株の増殖に及ぼす男性ホルモンの作用”
第84回 日本生化学会大会
2011年9月21~24日
京都 (国立京都国際会館)

11. 原田直樹ら “アンドロゲン受容体を標的としたレスベラトロールの前立腺がん細胞増殖抑制作用”
日本ビタミン学会第63回大会
2011年6月4~5日
広島 (安田女子大学)

12. 原田直樹ら “前立腺がん進行における短鎖型アンドロゲン受容体の機能とレスベラトロールの作用について”
第 65 回日本栄養・食糧学会大会
2011 年 5 月 13~15 日
東京（お茶の水女子大学）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 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・助教

研究者番号：00529141

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：