

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450176

研究課題名(和文) 食事性肥満・糖尿病発症における男性ホルモン作用の解明

研究課題名(英文) The role of androgen in a diet-dependent development of obesity and diabetes

## 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(系)・講師

研究者番号：00529141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：男性ホルモン減少は、肥満や代謝異常のリスクを増加させる一因となる。本研究では、去勢マウスを用いて男性ホルモン低下に起因した肥満発症モデルの構築を行った。その結果、去勢マウスでは、高脂肪食依存的に肥満を発症し、摂食量あたりの体重増加量の上昇、食餌あたりの乾燥糞重量の減少が観察された。さらに、高脂肪食摂取マウスは去勢により、糞中の腸内細菌叢の変化(Firmicutes/Bacteroidetes比の上昇とLactobacillus属細菌の増加)が見られた。一方、抗生物質摂取時には、去勢による肥満が誘導されなかった。本研究により、男性ホルモン低下に起因する肥満の発症に腸内細菌の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have identified an association between a high-fat diet and hypogonadism that impacts the development of obesity and fasting blood glucose levels in a castrated mouse model. The weight gain per food intake of castrated mice increased and dried fecal weight per food intake decreased in a high-fat diet-dependent manner. Fecal Firmicutes/Bacteroidetes ratio and Lactobacillus species counts increased in a high-fat diet-fed castrated mice. Antibiotic treatment did not induce obesity and high fasting blood glucose levels in castrated mice fed a high-fat diet. These results suggest that changes in gut microbiota are involved in the development of obesity triggered by hypogonadism.

研究分野：栄養生化学

キーワード：アンドロゲン テストステロン 男性ホルモン 肥満・糖尿病 腸内細菌 脂質代謝 糖代謝 大腿筋

## 1. 研究開始当初の背景

男性の死因の約 30%を心疾患、脳血管疾患に代表される循環器系疾患が占める。前立腺がん患者に去勢などの男性ホルモン除去療法を行うと、脂肪組織の増加を伴う肥満を生じて循環器系疾患のリスクが上昇する。肥満による脂肪組織の増加はインスリン感受性の低下を招き、糖代謝異常にも関与する。特に内臓脂肪の増加は、耐糖能異常や脂質代謝異常を合併する場合があるため、皮下脂肪の蓄積よりも重視される。健常な人でも、男性ホルモンレベルはおよそ 25 歳から年間 2-3% ずつ減少するため、加齢による男性ホルモンの生理作用の低下は、肥満を発症させ、代謝異常のリスクを増加させる一因になる。さらに、男性ホルモンであるテストステロンのレベルが低いと循環器系疾患のリスクが上昇して寿命が短縮する。つまり、テストステロン欠乏は肥満、糖尿病の発症を通して循環器系疾患を誘発し、やがては男性の寿命の低下へつながると考えられる。

## 2. 研究の目的

これまでに動物実験で使用されるマウス、ラットでは、ヒトと異なり、去勢による肥満を発症することは確認されていない。そこで、本研究では食餌組成に着目し、去勢マウスを用いて男性ホルモン低下に起因した肥満を発症するモデルの構築を行った。さらに、肥満発症機構について解析を行った。

## 3. 研究の方法

性成熟後の C57BL/6J 雄マウス (8 週齢) に去勢または擬似手術を行い、標準食または高脂肪食を与えて 16 週間飼育した (実験 1)。

去勢または擬似手術を行い、高脂肪食を摂取させ、さらに抗生物質を与えてマウスを飼育した (実験 2)。

去勢または擬似手術後、高脂肪食を摂取させ、抗生物質を与える群、与えない群を設けて 13 週齢まで飼育した (実験 3)。

## 4. 研究成果

実験 1 で標準食を与えたマウスでは、摂食量は去勢群で減少し、体重も去勢群で減少した。一方、高脂肪食を与えたマウスでは、摂食量は去勢群で減少したが、体重は対照群より増加した。食餌効率 (体重増加量/摂取カロリー) は高脂肪食摂取時にのみ去勢で有意な上昇が認められた。また、乾燥糞重量を測定すると標準食群、高脂肪食群の両方で去勢により減少したが、摂食量当たりで換算すると乾燥糞重量は高脂肪食摂取時にのみ去勢で減少した。糞中のトリグリセリド濃度と糞重量から、排出された総トリグリセリドを求めたところ、高脂肪食を摂取させた時に去勢群で減少した。体温は、標準食と高脂肪食のどちらを摂取させた場合でも去勢により上昇した。24 週齢の解剖時には、高脂肪食を摂取させた去勢群で内臓脂肪 (腸間膜脂肪と腎周

囲/後腹膜脂肪)が増加し、鼠蹊部皮下脂肪は餌の種類に関わらず去勢によって増加した。また、大腿筋 (大腿四頭筋とハムストリング) が高脂肪食摂取時に去勢により減少した。

高脂肪食を摂取させた去勢マウスにおいて、摂食量当たりの糞重量が減少したことから、腸内環境に変化があると考えられた。そこで、高脂肪食摂取マウスに去勢または擬似手術を行い、さらに抗生物質を摂取させて飼育した (実験 2)。すると、去勢時に観察された体重、腸間膜脂肪の増加、食餌効率の上昇が見られなくなり、摂食量当たりの糞重量の減少、大腿筋の減少も抗生物質の投与で打ち消された。一方で、鼠蹊部皮下脂肪は抗生物質を投与しても去勢により増加した。

次に、去勢群において食餌効率の変化や体重増加が顕著に現れた 13 週齢において、体内で生じた去勢の影響を検証した (実験 3)。高脂肪食摂取時の腸内細菌の関与に着目するため、高脂肪食摂取の去勢群、対照群のそれぞれに抗生物質水を与えて飼育した。腸間膜脂肪の遺伝子発現を解析すると、脂肪細胞における脂質分解に関わる酵素 *adipose triglyceride lipase (Atgl)* と *hormone sensitive lipase (Hsl)* の発現が高脂肪食摂取の去勢マウスで減少した。脂質合成の律速酵素 *fatty acid synthase (Fasn)*、*acetyl-CoA carboxylase (Acc)* の発現は去勢による影響が見られなかった。肝臓では抗生物質水摂取の有無に関わらず、血中遊離脂肪酸のトランスポーターである *Cd36* の発現が去勢により上昇し、*Fasn*、*Acc* は上昇傾向を示した。高脂肪食摂取の去勢群では組織中トリグリセリドが増加し、組織切片を観察すると油滴が見られたことから、去勢により脂肪肝を発症していることがわかった。抗生物質投与により、去勢群で見られた腸間膜脂肪での *Atgl*、*Hsl* の遺伝子発現の減少が抗生物質の投与で打ち消された。一方で、肝臓における *Cd36*、*Fasn*、*Acc* の遺伝子発現は抗生物質投与による影響を受けなかった。

去勢が糖代謝に及ぼす影響を検討したところ、空腹時血糖値は高脂肪食摂取マウスでのみ去勢により上昇した。そこで、インスリン負荷試験を行ったが標準食、高脂肪ともに去勢群と対照群で血糖値の低下に差はなかった。抗生物質を投与すると、去勢による空腹時血糖値の上昇は見られなくなった (実験 1-3)。

糞中の細菌から抽出した DNA を用いて腸内細菌叢を調べたところ、高脂肪食摂取時にのみ、去勢により *Firmicutes/Bacteroidetes* の比が上昇した。腸内細菌叢は食餌によって変化し、高脂肪食を摂取すると門レベルで変化する。ヒトやマウスの腸内細菌の 9 割以上は *Bacteroidetes*、*Firmicutes* の 2 門で構成されるが、肥満者では *Firmicutes/Bacteroidetes* の比が高くなる。つまり、去勢によって肥満型の細菌叢となっていた。また、高脂肪摂取時にのみ、乳酸菌

である *Lactobacillus* 属の細菌が去勢マウスで増加することが判明した(実験 1、2)。

本研究より、高脂肪食摂取時に男性ホルモンが低下して肥満を発症する際に腸内細菌叢 (*Firmicutes/Bacteroidetes* 比の上昇と *Lactobacillus* 属の増加)が変化することを見出した。また、高脂肪食摂取特異的に、去勢マウスでは大腿筋の減少も見られた。昨今、大腿部周囲の短小と心疾患発症リスクの増大について、その関連性が示唆されており、大腿筋の減少がテストステロン欠乏と男性の寿命の短縮に関連することが示唆された。

#### 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 7件)

Harada N<sup>\*</sup>, Hanaoka R, Horiuchi H, Kitakaze T, Mitani T, Inui H, and Yamaji R. "Castration influences intestinal microflora and induces abdominal obesity in high-fat diet-fed mice" *Sci. Rep.*, 6, 23001, 2016. 査読有  
DOI: 10.1038/srep23001

堀内寛子、原田直樹、山地亮一. "膵細胞のインスリン分泌能におよぼすポリフェノール類の作用" *ビタミン*, 89, 341-347, 2015. 査読有  
web.kyoto-inet.or.jp/people/vsojkn/journal/archive/89/89-7-1.pdf

原田直樹、三谷壘一、山地亮一. "多機能性を持つ Moonlighting Proteins" *生化学*, 87, 279-285, 2015. 査読有  
DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870279

Harada N<sup>\*</sup>, Takagi T, Nakano Y, Yamaji R, and Inui H. "Protein arginine methyltransferase 10 is required for androgen-dependent proliferation of LNCaP prostate cancer cells" *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79, 1430-1437, 2015. 査読有  
DOI: 10.1080/09168451.2015.1025035

Harada N<sup>\*</sup>, Inui H, and Yamaji R. "Competitive and compensatory effects of androgen signaling and glucocorticoid signaling" *Receptors Clin. Investig.*, 2, e785, 2015. 査読有  
DOI: http://dx.doi.org/10.14800/rci.785

Harada N<sup>\*</sup>, Katsuki T, Takahashi Y, Masuda T, Yoshinaga M, Adachi T, Izawa T, Kuwamura M, Nakano Y, Yamaji R, and Inui H. "Androgen receptor silences thioredoxin-interacting protein and competitively inhibits glucocorticoid

receptor-mediated apoptosis in pancreatic -cells" *J. Cell. Biochem.*, 116, 998-1006, 2015. 査読有  
DOI: 10.1002/jcb.25054.

堀内寛子、原田直樹、山地亮一. "膵細胞の機能を改善するビタミンDとビオチンの抗2型糖尿病作用" *ビタミン*, 88, 530-534, 2014. 査読有  
web.kyoto-inet.or.jp/people/vsojkn/journal/88-10yamaji.pdf

[学会発表](計 29件)

原田直樹、花岡諒、中野長久、乾博、山地亮一 "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" 第70回日本栄養・食糧学会大会、神戸(武庫川女子大学) 2016年5月13~15日

花田一貴、原田直樹、花岡諒、中野長久、乾博、山地亮一 "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" 第70回日本栄養・食糧学会大会、神戸(武庫川女子大学) 2016年5月13~15日

堀内寛子、原田直樹、乾博、山地亮一 "膵細胞における S-エクオール の G s-cAMP-PKA シグナル活性化について" 第70回日本栄養・食糧学会大会、神戸(武庫川女子大学) 2016年5月13~15日

原田直樹、與田安紘、甲木孝弘、乾博、山地亮一 "胎児期と性成熟期の男性ホルモンの作用は膵細胞量を規定する" 2016年度日本農芸化学会大会、北海道(札幌コンベンションセンター) 2016年3月27~30日

堀内寛子、原田直樹、乾博、山地亮一 "膵細胞において S-エクオールは細胞膜で cAMP を産生して protein kinase A シグナルを活性化する" 2016年度日本農芸化学会大会、北海道(札幌コンベンションセンター) 2016年3月27~30日

與田安紘、甲木孝弘、原田直樹、乾博、山地亮一 "膵細胞量におよぼす胎児期および性成熟期の男性ホルモンの影響" 第492回日本農芸化学会関西支部例会、神戸(神戸大学) 2015年12月5日

原田直樹、中野長久、乾博、山地亮一 "アンドロゲン受容体とグルココルチコイドの受容体の拮抗による膵細胞の TXNIP の発現とアポトーシス制御" BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会合同大会) 神戸(神戸国際会議場) 2015年12月1~4日

Horiuchi H, Usami A, Harada N, Ikushiro S, Sakaki T, Nakano Y, Inui H, Yamaji

R "Effects of S-equol and related compounds on the proliferation of INS-1 pancreatic  $\beta$ -cells" The 6th International Congress on Food Factors (IcoFF2015), Seoul (Korea), 2015年11月22~25日

宇佐美敦子、堀内寛子、原田直樹、生城真一、榊利之、中野長久、乾博、山地亮一 "S-Equol とその関連化合物が膵細胞の増殖に及ぼす作用について" 第54回日本栄養・食糧学会 近畿支部大会、神戸(神戸大学)、2015年10月10日

花岡諒、原田直樹、乾博、山地亮一 "マウスの体重増加に及ぼす去勢と高脂肪食摂取のクロストーク" 2015年度日本農芸化学会中部・関西支部合同大会(中部支部第174回例会)(関西支部第491回講演会)、富山(富山県立大学)、2015年9月19~20日

橋本未来、原田直樹、乾博、山地亮一 "唾液タンパク質の性差とテストステロンの影響について" 2015年度日本農芸化学会中部・関西支部合同大会(中部支部第174回例会)(関西支部第491回講演会)、富山(富山県立大学)、2015年9月19~20日

堀内寛子、原田直樹、中野長久、乾博、山地亮一 "S-エクオールによる膵細胞の維持・増加作用とそのメカニズムの解明" 第490回日本農芸化学会関西支部例会、大阪(大阪府立大学)、2015年7月4日

原田直樹、堀内寛子、中野長久、乾博、山地亮一 "膵細胞におけるS-エクオールのcAMP/protein kinase Aシグナル活性化機構について" 日本ビタミン学会第67回大会、奈良(奈良県新公会堂)、2015年6月5~6日

Horiuchi H, Harada N, Nakano Y, Inui H, Yamaji R "S-Equol increases the production of cyclic AMP at the plasma membrane of INS-1 pancreatic  $\beta$ -cells" 12th Asian Congress of Nutrition, 横浜(パシフィコ横浜)、2015年5月14~18日

原田直樹、中野長久、乾博、山地亮一 "グルココルチコイドとアンドロゲンの拮抗作用による膵細胞のアポトーシス制御" 2015年度日本農芸化学会大会、岡山(岡山大学)、2015年3月26~29日

甲木孝弘、原田直樹、中野長久、乾博、山地亮一 "膵細胞形成に及ぼす胎児期の男性ホルモンの影響" 2015年度日本農芸化学会大会、岡山(岡山大学)、2015年3月26~29日

堀内寛子、原田直樹、中野長久、乾博、

山地亮一 "膵細胞におけるS-エクオールのエナンチオ選択的なインスリン分泌増強作用について" 2015年度日本農芸化学会大会、岡山(岡山大学)、2015年3月26~29日

花岡諒、原田直樹、中野長久、乾博、山地亮一 "去勢マウスの体重増加に与える高脂肪食の影響について" 2014年度日本農芸化学会関西支部大会、奈良(奈良先端技術大学院大学)、2014年9月19~20日

甲木孝弘、原田直樹、中野長久、乾博、山地亮一 "胎児期の膵細胞の形成に及ぼす男性ホルモンの影響" 2014年度日本農芸化学会関西支部大会、奈良(奈良先端技術大学院大学)、2014年9月19~20日

白井理絵、堀内寛子、原田直樹、中野長久、乾博、山地亮一 "S-Equolのインスリン分泌促進作用について" 第485回日本農芸化学会関西支部例会、大阪(大阪府立大学)、2014年7月12日

⑲ 堀内寛子、原田直樹、中野長久、乾博、山地亮一 "アロキサンによる膵細胞死に対するS-エクオールの保護作用" 日本ビタミン学会第66回大会、兵庫(姫路商工会議所)、2014年6月13~14日

⑳ 原田直樹、甲木孝弘、中野長久、乾博、山地亮一 "胎児期のテストステロンサージが膵細胞の発達に及ぼす影響について" 第68回日本栄養・食糧学会大会、北海道(酪農学園大学)、2014年5月30日~6月1日

㉑ 原田直樹、中野長久、乾博、山地亮一 "膵細胞におけるグルココルチコイド誘導性アポトーシスに対するアンドロゲンの抑制メカニズム" 2014年度日本農芸化学会大会、東京(明治大学)、2014年3月27~30日

㉒ 原田直樹、中野長久、乾博、山地亮一 "グルココルチコイドによる膵細胞のアポトーシスに対するアンドロゲンの保護作用" 第36回日本分子生物学会年会、神戸(神戸国際会議場)、2013年12月3~6日

㉓ 堀内寛子、原田直樹、中野長久、乾博、山地亮一 "S-エクオールの膵細胞増殖促進作用におけるcAMP-PKA-CREB経路の関与" 第52回日本栄養・食糧学会 近畿支部大会、滋賀(滋賀県立大学)、2013年10月26日

㉔ Harada N, Horiuchi H, Nakano Y, Yamaji R, and Inui H "S-equol enhances the proliferation of pancreatic  $\beta$ -cells" 20th international congress of nutrition (ICN2013), Granada (Spain), 2013

年 9 月 15 ~ 20 日

⑳ 甲木孝弘、原田直樹、中野長久、乾博、  
山地亮一 “ 男性ホルモンは膵 細胞の分化  
と増殖を促進する ” 第 480 回 日本農芸化学  
会関西支部例会、大阪（大阪府立大学）2013  
年 7 月 6 日

㉑ 堀内寛子、原田直樹、中野長久、乾博、  
山地亮一 “ S-エクオールは膵 細胞の増殖  
と生存を亢進する ” 第 67 回 日本栄養・食  
糧学会大会、名古屋（名古屋大学）、2013 年  
5 月 24 ~ 26 日

㉒ 原田直樹、堀内寛子、中野長久、山地亮  
一、乾博 “ 膵 細胞量に及ぼす S-エクオー  
ルの影響について ” 日本ビタミン学会第 65  
回大会、東京（一橋大学）、2013 年 5 月 17 ~  
8 日

〔その他〕

ホームページ等

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

## 5 . 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・講師

研究者番号：00529141