

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04854

研究課題名(和文)生活習慣病発症、治療基盤としてのアンドロゲン、SARMに関する包括的研究

研究課題名(英文)Comprehensive studies of androgen and SARM as a background of onset or treatment of life-related diseases

研究代表者

柳瀬 敏彦 (Yanase, Toshihiko)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：30239818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：SARM・S42の作用として、(1)高脂肪食負荷マウス組織のアレイ解析から肝臓、内臓脂肪組織のカテコラミン合成系酵素やGLUT4の発現誘導が抗肥満作用に関連する可能性、(2)培養筋管細胞や徐辜マウスの検討において筋蛋白の異化抑制と合成促進に作用する可能性、(3)in vitro, in vivoにおける去勢感受性ヒト前立腺癌細胞株の増殖抑制効果を示した。また、テストステロン(T)の臨床的意義に関して、(4)メタボ診断指標としての総T値の有用性、種々のT指標はLOH診療における問診票AMS総スコアと関連性がないこと、AMSはインスリン抵抗性を背景とする低強度炎症を反映している可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The following actions of a SARM, S42 were clarified;(1)from array analysis of mouse tissues loaded with high fat diet, the induction of catecholamine synthesis enzymes and GLUT4 expression in liver and visceral adipose tissue may be related to the anti-obesity action of S42, (2)from the investigations using cultured myotubes and orchiectomy mouse, S42 may act on catabolism suppression and synthesis promotion of muscle proteins, (3)S42 inhibits proliferation of castration-sensitive human prostate cancer cell lines in vitro and in vivo. Regarding the clinical significance of testosterone(T), the usefulness of the total T value as a diagnostic index of metabolic syndrome and no relationship between various T values and total score of questionnaire AMS in LOH (late-onset hypogonadism) examination were clarified.From the relationship between insulin resistance and AMS score, increased AMS score in LOH may reflect low grade inflammation caused by insulin resistance.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：選択的アンドロゲン受容体修飾剤 テストステロン 前立腺癌 LOH症候群 メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

報告者は生活習慣病の発症要因としてのテストステロン(T)-AR系の重要性に着目し、以下のような成果、(1)オスARKOマウスの肥満機序にエネルギー消費の低下が関与(Diabetes 54,1000,2005)(2)FOXO-1を介したインスリン/IGF-1シグナルとARのクロストーク(JBC 282,7329,2007)(3)ARがレプチン作用を増強しエネルギー産生亢進に関わる可能性(Endocrinol 49,6028,2008)、(4)野兎動脈硬化系において内因性DHT-ARの抗動脈性作用とLOX-1抑制を介する機序(Endocrinol 151,3307,2010,Endocrinol 153:3405,2012)を発表していた。さらにTの抗メタボリックシンドローム(MetS)作用を保持しつつ、前立腺刺激作用を示さない選択的アンドロゲン受容体修飾剤(SARM)として、T誘導体のS42を同定した。S42は精巣摘出ラットの前立腺重量の増加を示さず、血中中性脂肪の顕著な減少効果と骨格筋量増加作用を示した(Endocrinol 150:5606,2009)。S42は動物実験において抗肥満、抗糖尿病作用も有したが、開発コンセプトから前立腺癌予防の可能性も秘めていた。当時、報告者らは、抗糖尿病薬のGLP-1アナログが前立腺癌の増殖抑制作用を有することを見出しており(Diabetes 63, 3891-905,2014)、前立腺癌研究においても、研究手法を確立しつつあった。

加齢によるT低下に伴う諸兆候は、MetS等の生活習慣病をも包括する病態としてLate-onset hypogonadism (LOH)と呼ばれている。報告者は、総テストステロン(TT)と遊離テストステロン(FT)値の日本人男性正常値設定(日泌尿会誌 95,751-60,2004)やLOH診断のFT値の検証(Int J Urol 16,168-74,2009)、我が国のLOHの診療指針の作成(Int J Urol 15,377-88,2008)にも関与した。近年、低T血症はMetS,糖尿病,動脈硬化症の発症リスクとの報告が集積されつつあるが、これらの事象と各種T値(生物活性を反映するFTやbioavailable T値,TT値),SHBG(T結合蛋白)との関係性については明確ではなかった。

2. 研究の目的

SARM開発は高齢化社会において、サルコペニア、骨粗鬆症、糖尿病等を標的とする新たな生活習慣病創薬の観点から期待されているが、現在、市場に出ている薬剤は皆無である。本申請研究では、生活習慣病発症・治療基盤としてのTの意義をSARM・S42の多面的作用の解明も含め、基礎的、臨床的研究の展開により包括的に解明することを目的とした。

また、近年、種々の生活習慣病に対する内因性Tの防御的作用は注目を集めつつあるが、その詳細な作用機構についてはいまだ不明の点が多く、その点を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)SARM・S42の抗MetS作用・抗糖尿病作用に関する研究:

S42を高脂肪食負荷B6マウスに16週間皮下投与したところ、有意の内蔵脂肪減少効果と抗糖尿病作用を認め、機序として肝、内臓脂肪における脂肪合成系の抑制並びにエネルギー燃焼系の発現亢進を認めた。詳細な機序解明を目指し、組織のマイクロアレイ解析を行った。精巣摘出マウスを高脂肪食にて飼育し、Oil、S42またはDHT(10 mg/kgBW)を皮下投与し、16週後、肝臓、内臓脂肪よりtotal RNAを調製し、whole mouse genome oligo DNA arrayによるアレイ解析を行った。マウスを高脂肪食負荷でS42投与時の採取組織(肝、筋、脂肪)のマイクロアレイ解析により、新規標的遺伝子の探索とその機能解析を行った。

(2)S42の骨格筋への作用に関する研究:

筋芽細胞のC2C12細胞を細胞培養系で筋管細胞に分化誘導後、DHTを対照として、S42の筋蛋白の同化、異化関連分子への影響をRT-PCRによるmRNA発現量やウエスタンブロットによる蛋白発現量の変化で検討した。

精巣摘出後の低アンドロゲン状態では骨格筋が萎縮することが報告されている。S42のマウスの骨格筋に対する影響を評価するため、精巣摘出後C57BL/6マウスに投与実験を行った。機序に関しては、採取筋組織を用いて筋蛋白合成・分解系への作用を中心に解析した。手法としては定量PCRによりmRNAの発現量、Western blot法により

(3)抗前立腺癌作用に関する研究:

S42の前立腺癌細胞株の細胞増殖抑制効果並びにヌードマウスに移植した前立腺癌の腫瘍増殖抑制の効果を検討した。前立腺癌細胞株(LNCap細胞等)の細胞増殖の抑制効果をDHT刺激下あるいは非刺激下の条件で、細胞増殖アッセイキット並びにBrDU assayを用いて行うと同時にアポトーシスの有無もTUNNEL assayにて検討した。検討した。効果と機序が実証されれば、ヌードマウス(オス)に前立腺癌細胞株を播種し、S42を投与し、腫瘍サイズの変化に及ぼす効果を検討した。その際、前立腺癌細胞株にCAG-Luc遺伝子が導入された細胞を播種することで、壊死組織でない腫瘍そのものの増殖を可視化あるいは定量評価できる系を用いた。

(4)ヒトにおけるTの臨床的意義に関する研究:

40歳以上の男性健診者の種々のT指標を検討し、MetS関の機序に関する研究:インスリン抵抗性を連の種々の代謝指標との関連性を検討した。

LOHの診断には、Aging Male Symptom (AMS) scoreという問診票が世界標準として使われている。我々は、241名の男性健診者を対象に、AMSの臨床的意義について各種テストステロン値との関連や種々の代謝指標との関連から検討した。

4. 研究成果

(1) SARM・S42 の抗メタボ・抗糖尿病作用に関する研究:

エネルギー消費や抗糖尿病作用に関連する現象として、S42 は DHT に比して、肝臓、内臓脂肪組織の双方においてカテコラミン合成系酵素の顕著な誘導や糖輸送蛋白の GLUT4 の発現誘導を認めた(未発表)。S42 の抗肥満、抗糖尿病機序一端である可能性があり、現在、脂肪細胞や組織を用いてその発現変動を検討している。

(2) S42 の骨格筋への作用に関する研究:

S42 の培養筋管細胞 (C2C12) における効果: S42 は骨格筋ユビキチンリガーゼ (筋萎縮関連遺伝子) の Atrogin1 の有意な発現低下と MuRF1 の低下傾向をもたらし、骨格筋のタンパク合成促進に重要である P70S6K のリン酸化レベルを亢進させた。その作用は mTORC1 阻害剤のラパマイシンによりキャンセルされた。一方、mTORC1 の上流調節因子である Akt と pErk のリン酸化は、S42 による変化を認めなかった。以上から、invitro では、S42 は筋の蛋白異化に抑制的に、蛋白合成に促進的に作用する可能性が示唆された(未発表)。

精巣摘出後 C57BL/6 マウスへの S42 投与実験: S42 は非投与群と比較して有意な体重変化はみられなかった。一方、S42 により腓腹筋重量の有意な増加はみられなかったが、筋横断面積の増大を認め、太い繊維の数の増加がみられたことから、低アンドロゲン状態による筋力低下に対し、抑制的に働くことが示唆された。腓腹筋の骨格筋ユビキチンリガーゼ (筋萎縮関連遺伝子) である、Atrogin1 と MuRF1 の発現量を RT-PCR で評価した結果、In vitro と同様に S42 投与により Atrogin1 の有意な低下と MuRF1 の低下傾向を認めた。

(3) S42 の抗前立腺癌作用の検討:

S42 は去勢 (アンドロゲン) 感受性のヒト前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞と 22RV1 細胞の増殖を培養細胞系において抑制した。BrdU assay でも同様に S42 による細胞増殖抑制効果を認めた。しかしながら、S42 は、これらの細胞のアポトーシスは誘導しなかった。その機序として、AR の転写活性の抑制、AR、IGF-1R、IR の発現抑制及び Erk-MAPK のリン酸化の抑制機序を認め、S42 は DHT-AR のクロマチンへの結合抑制を介して作用することも明らかにした。S42 は DHT 依存性の LNCaP 細胞の細胞増殖も抑制した。さらに CAG-Luc LNCaP 細胞をヌードマウスに播種し S42 を投与すると、腫瘍形成抑制効果が観察され、同様に腫瘍細胞における Erk-MAPK のリン酸化の抑制が観察された。(Endocrinology 159, 1774-1792, 2018)。

(4) 血中総テストステロン(TT)値の臨床的意義

メタボマーカーとしての TT に関する研究: 男性健診受診者 249 名 (平均年齢 52.7 歳) を対象に種々のアンドロゲン指標のうち、TT

が最もメタボ診断との相関性が強く、バイオマーカーとなり得る可能性を報告した (EJ 62:123-32, 2015)。また、TT のメタボマーカーとしての意義をアディポネクチンと比較検討した。その結果、血中 TT 値は、血中アディポネクチン値と有意な正相関の関係にあること、メタボの単独予測因子としては、多変量解析の結果、血中 TT 値の中央値 <4ng/ml は、アディポネクチン中央値の <4.9mg/ml よりも優れた指標であることを見出した。

Late-onset hypogonadism (LOH) 診療における AMS スコア、血中 T 値の臨床的意義: 加齢に伴う T の低下は LOH という病態で知られ、中高年男性におけるうつ、性欲低下等の症状のみならず、肥満、骨粗鬆症などを包括する病態として理解されている。この LOH の診断には、AMS という問診票が世界標準として使われている。我々は、241 名の男性健診者を対象に、AMS の意義について検討したが、AMS の総スコアは、種々の T 指標とはまったく関連を認めず、インスリン抵抗性指標の HOMA-R と有意の相関性を示し、中等度以上の LOH 重症度を検出する因子として、多変量解析で HOMA-R>2.5 は検出された。AMS は CRP と関連性を示すことから、インスリン抵抗性の背景にある low grade inflammation を反映している問診票であることを明らかにした (Endocrine J 64, 521-530, 2017)。

(3) 長期観察によるメタボ発症予測値としての血中 TT のカットオフ値は現在、検討中である。また、AMS の総スコア自体は、種々の血中 T 値との関連性が乏しい (Endocrine J 64, 521-530, 2017)。そのため、AMS の各質問項目の中から真に T 値を反映する項目を選出し検討した結果、AMS10、15、16、17 の 4 項目による簡易問診票が、生物活性のある遊離 T の値をより反映し、LOH 診療により有用な簡易問診票になり得ることを明らかにした (未発表)。

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 25 件)

(英文)

- 1) Takahashi H, Nomiyama T, Terawaki Y, Kawanami T, Hamaguchi Y, Tanaka T, Tanabe M, Bruemmer D, Yanase T Glucagon-like peptide-1 receptor agonist exendin-4 attenuates neuron-derived orphan receptor 1 J Ather Thromb 2018 in press ,査読有
- 2) Ohe K, Miyajima S, Abe I, Tanaka T, Hamaguchi Y, Harada Y, Horita Y, Beppu Y, Ito F, Yamasaki T, Terai H, Mori M, Murata Y, Tanabe M, Ashida K, Kobayashi K, Enjoji M, Yanase T, Harada N, Utsumi T, Mayeda A. HMGA1a induces

- alternative splicing of estrogen receptor alpha in MCF-7 cells J steroid Biochem Mol Biol 2018 in press, 査読有
- 3) Ohe K, Miyajima S, Tanaka T, Hamaguchi Y, Harada Y, Horita Y, Beppu Y, Ito F, Yamasaki T, Terai H, Mori M, Murata Y, Abe I, Tanabe M, Ashida K, Kobayashi K, Enjoji M, Nomiyama T, Yanase T, Harada N, Utsumi T, Mayeda A. HMGA1a induces alternative splicing of the Estrogen Receptor- Ipha gene by trapping U1 snRNP to an upstream pseudo-5' splice site. *Frontiers Molecular Bioscience* 2018 in press, 査読有
 - 4) Kawanami T, Tanaka T, Hamaguchi Y, Nomiyama T, Nawata H, Yanase T Selective androgen receptor modulator S42 suppresses prostate cancer cell proliferation. *Endocrinology* 159(4):1774-1792, 2018, 査読有
 - 5) Yanase T, Yanagita I, Muta K, Nawata H. Frailty in elderly diabetes patients. *Endocr J.* 65(1):1-11, 2018, 査読有
 - 6) Yanase T, Kawanami T, Tanaka T, Tanabe M, Nomiyama T. Impact of metabolic disorders on prostate cancer growth: Androgen and insulin resistance perspectives. *Reprod Med Biol.* 16(3):252-257, 2017, 査読有
 - 7) Iwaya C, Nomiyama T, Komatsu S, Kawanami T, Tsutsumi Y, Hamaguchi Y, Horikawa T, Yoshinaga Y, Yamashita S, Tanaka T, Terawaki Y, Tanabe M, Nabeshima K, Iwasaki A, Yanase T. Exendin-4, a Glucagonlike Peptide-1 Receptor Agonist, Attenuates Breast Cancer Growth by Inhibiting NF- B Activation. *Endocrinology.* 158(12):4218-4232, 2017, 査読有
 - 8) Hamanoue N, Tanabe M, Tanaka T, Akehi Y, Murakami J, Nomiyama T, Yanase T. A higher score on the Aging Males' Symptoms scale is associated with insulin resistance in middle-aged men. *Endocr J.* 64(5):521-530, 2017, 査読有
 - 9) Fukuda T, Tanaka T, Hamaguchi Y, Kawanami T, Nomiyama T, Yanase T. Augmented Growth Hormone Secretion and Stat3 Phosphorylation in an Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein (AIP)-Disrupted Somatotroph Cell Line. *PLoS One.* 11(10):e0164131, 2016, 査読有
 - 10) Nomiyama T, Yanase T GLP-1 receptor agonist as treatment for cancer as well as diabetes: beyond blood glucose control *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 11: 357-364, 2016, 査読有
 - 11) Morooka N, Ueguri K, Yee KKL, Yanase T, Sato T. Androgen-androgen receptor system improves chronic inflammatory conditions by suppressing monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in adipocytes via transcriptional regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 477(4):895-901, 2016, 査読有
 - 12) Hirano M, Wada-Hiraike O, Fu H, Akino N, Isono W, Sakurabashi A, Fukuda T, Morita Y, Tanikawa M, Miyamoto Y, Nishi Y, Yanase T, Harada M, Oishi H, Yano T, Koga K, Oda K, Kawana K, Fujii T, Osuga Y. The Emerging Role of FOXL2 in Regulating the Transcriptional Activation Function of Estrogen Receptor : An Insight Into Ovarian Folliculogenesis. *Reprod Sci.* 2016 Jun 1. pii: 1933719116651150. , 査読有
 - 13) Dong Z, Huang M, Liu Z, Xie P, Dong Y, Wu X, Qu Z, Shen B, Huang X, Zhang T, Li J, Liu J, Yanase T, Zhou C, Xu Y. Focused screening of mitochondrial metabolism reveals a crucial role for a tumor suppressor Hbp1 in ovarian reserve. *Cell Death Differ.* 23(10):1602-14, 2016, 査読有
 - 14) Watanabe T., Ashida K., Goto K., Nawata H., Takayanagi R., Yanase T., Nomura M. Dehydroepiandrosterone-enhanced dual specificity protein phosphatase (DDSP) prevents diet-induced and genetic obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 468:196-201, 2015, 査読有
 - 15) Tsutsumi Y, Nomiyama T, Kawanami T, Hamaguchi Y, Tanaka T, Murase K, Motonaga R, Tanabe M, Yanase T Combined treatment with Exendin-4 and metoformin attenuates prostate cancer growth. *PLOS ONE* 13:154, 2015, 査読有
 - 16) Tanabe M, Akehi Y, Nomiyama T, Murakami J, Yanase T. Total testosterone is the most valuable indicator of metabolic syndrome among various testosterone values in middle-aged Japanese men. *Endocrine J* 62(2):123-32, 2015, 査読有
- (和文)
- 1) 柳瀬 敏彦 性ステロイドホルモン研究の最前線と臨床応用：選択的性ステロイドホルモン受容体修飾薬 選択的アンドロゲン受容体修飾薬(SARM). 臨床婦人科産科 71:127-132, 2017, 査読無
 - 2) 柳瀬 敏彦, 田邊 真紀人, 野見山 崇 女性にとってのテストステロン：テスト

- ステロン総論.最新女性医療 4:6-11, 2017、査読無
- 3) 柳瀬敏彦 特集:男性のアンチエイジングとテストステロン テストステロンと肥満 日本抗加齢医学雑誌 12(3): 340-347, 2016、査読無
 - 4) 柳瀬敏彦 男性骨粗鬆症における選択的アンドロゲン受容体モジュレーター (SARM)の可能性 CLINICAL CALCIUM 26(7):1023-1030, 2016、査読無
 - 5) 柳瀬敏彦 選択的アンドロゲン受容体修飾剤とサルコペニア治療 Hormone Frontier in Gynecology 23(1): 79-86, 2016、査読無
 - 6) 柳瀬敏彦、田邊真紀人、野見山 崇 性差医療の最前線 -生活習慣病を中心に-性ホルモンと代謝機能 日本臨床 73(4): 571-575, 2015、査読無
 - 7) 柳瀬敏彦、田邊真紀人 テストステロン、ジヒドロテストステロン 臨床検査ガイド 2015 改訂版 458-463, 2015、査読無
 - 8) 柳瀬敏彦 特集:ステロイドホルモンと骨-基礎から臨床まで- II.性ステロイドと骨代謝 骨・筋を標的とした選択的アンドロゲン受容体モジュレーター(SARM)の開発現況 The Bone 28(5): 457-462, 2015、査読無
 - 9) 柳瀬敏彦、村瀬邦崇、永石綾子、田邊真紀人、野見山 崇 特集:LOH 症候群診療-最近の進歩 テストステロンと骨・筋肉 臨床泌尿器科 69(1) 46-52, 2015、査読無

〔学会発表〕(計 5 件)

(国際)

1) Yanase T Symposium: Sex Hormone Action through a Human Life and Gender Difference Androgen and metabolic syndrome. The 8th Congress of the International Society for Gender Medicine, Sep 14, 2017 (Sendai)

(国内)

1) 柳瀬敏彦 教育講演 「性ホルモンと生活習慣病」第 61 回日本内科学会九州支部生涯教育講演会 2018.01.20 (福岡)

2) 柳瀬敏彦 特別講演 2 女性におけるアンドロゲンとは? 第 16 回日本 Men's Health 医学会、第 7 回テストステロン研究会 (札幌) 2016.07.08-10

3) 柳瀬敏彦 教育講演 「内分泌・代謝学の視点からみたステロイドホルモン療法: 前立腺癌治療におけるピットフォール」第 35 回日本アンドロロジー学会 2016. 6.24-25 (前橋)

4) 柳瀬敏彦、田邊真紀人 シンポジウム 1 : テストステロンの臨床的諸問題 メタボリックシンドロームにおける各種アンドロゲン指標の検討 第 34 回日本アンドロロジー学会、第 22 回精巣毒性研究会 2015.6.26-27(福岡)

〔図書〕(計 1 件)

1) 柳瀬敏彦 選択的アンドロゲン受容体モジュレーター (SARM)サルコペニア治療への応用サルコペニアとフレイル (医療職間連携による多角的アプローチ) 編集: 荒井秀典 (医薬ジャーナル社) pp104-111, 2015

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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: 2015 年 8 月
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳瀬 敏彦 (YANASE, Toshihiko)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号: 3 0 2 3 9 8 1 8

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

野見山 崇 (NOMIYAMA, Takashi)
福岡大学・医学部・准教授
研究者番号: 1 0 5 3 2 5 5 9

田邊真紀人 (TANABE, Makito)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号: 6 0 7 0 7 3 0 5

田中智子 (TANAKA, Tomoko)
福岡大学・生活習慣病制御講座講座・助教
研究者番号: 1 0 3 8 0 5 2 8

(4) 研究協力者

()