

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390248

研究課題名(和文)生活習慣病創薬としての新規選択的アンドロゲン受容体修飾剤 S42 に関する研究

研究課題名(英文) Research on a novel selective androgen receptor modulator, S42 for the development of life-related drug.

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) 14,800,000 円、(間接経費) 4,440,000 円

研究成果の概要(和文)：我々自身が見出したアンドロゲン受容体の選択的修飾剤である S42 の抗肥満、抗糖尿病効果の有無を DHT という男性ホルモンの効果を対照として、高脂肪食負荷のオスマウスを用いて検証した。除睾(精巣摘出)下での高脂肪食負荷マウスにおいて、DHT 投与は肥満や耐糖能の悪化、内臓脂肪の増加、脂肪肝等の増悪をもたらしたが、S42 にはこのような増悪作用を認めなかった。非除睾マウスにおける高脂肪食負荷の系においても、S42 自体に体脂肪減少効果など有益な作用を認めた。S42 は生活習慣病における創薬候補となり得る。

研究成果の概要(英文)：We examined whether a SARM (selective androgen receptor modulator) compound, S42 which we had identified, could have some beneficial effect on obesity and glucose tolerance using male mouse model fed high fat diet (HFD). In castrated male mice fed HFD, DHT administration aggravated the HFD-induced visceral obesity, glucose intolerance and fatty liver. However, such aggravation was not observed with S42 administration. In non-castrated male mice fed HFD, S42 itself could manifest beneficial effects including the decrease of the body fat etc. S42 could be a good candidate chemical for developing innovative drugs for life-related diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：生活習慣病 アンドロゲン SARM high fat diet obesity androgen receptor

1. 研究開始当初の背景

アンドロゲンは男性化作用だけでなく、生活習慣病における性差の背景や発症要因として重要であるが、エストロゲンに比べて研究が遅れている現状があった。そこで、我々は既に生活習慣病におけるアンドロゲンの意義を解明する研究に取り組み、以下のような研究成果をあげていた。(1) ARKO マウスではオス特異的に晩発性肥満を呈し、その機序としてエネルギー消費の低下が関与すること (Diabetes 54, 1000, 2005) (2) FOXO-1 を介したインスリン/IGF-1 シグナルと AR のクロストークが存在すること (JBC282, 7329, 2007) (3) AR は視床下部弓状核を中心とするレプチンシグナル系を増強することでエネルギー産生亢進に関わる可能性があること (Endocrinology 49, 6028, 2008)、さらに、(4) アンドロゲンによる動脈硬化抑制機序の一端として、野兎動脈硬化モデル系において、酸化 LDL 受容体である Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) の発現を dihydrotestosterone (DHT)-AR 系が抑制し macrophage の泡沫化を抑制する機序を見出していた (Endocrinology 151:3307, 2010)。

以上の成果を踏まえ、アンドロゲンの抗メタボ作用を保持しつつ、副作用である前立腺刺激作用を認めない新規の生活習慣病創薬を目指して、選択的アンドロゲン受容体修飾剤 (SARM) の開発に着手した。前立腺癌細胞 LNCaP において PSA 発現増強効果を示さず、熱産生蛋白の UCP-1 の刺激活性を有する化合物の探索を 119 種類のテストステロン、DHEA 誘導体を対象に行い、抗アンドロゲン剤の flutamide と同程度の AR 結合活性を示す新規 SARM, S42 の同定に成功した。S42 を除鞏 SD ラットに 3 週間投与したところ、前立腺重量の増加効果を示さず、血中中性脂肪の顕著な減少効果を有する化合物であることが判明した (Endocrinology 150:5606, 2009)。

2. 研究の目的

(1) 新規 SARM, S42 の抗メタボ作用、抗糖尿病作用の有無とその機序の詳細な解明を主目的とした。

(2) 我々は進行期動脈硬化薬においては、血管内皮下のマクロファージの集積巣に LOX-1 の発現を認め、DHT が LOX-1 を介した泡沫化機序を抑制することを報告したが、同モデルでは血管内皮には LOX-1 発現を認めなかった。今回、初期動脈硬化形成における血管内皮 LOX-1 発現の有無と DHT の作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規 SARM・S42 の抗メタボ作用・抗糖尿病作用に関する研究

高脂肪食負荷マウスにおける検討
除鞏あるいは非除鞏 B6 マウスにおいて高脂肪食 (High fat diet, HFD) 下で惹起した肥満、インスリン抵抗性に対する S42 及び DHT の 16 週投与の効果を検証した。DHT 及び S42 の投与量は我々自身の先行研究のラット実験 (Endocrinology 150:5606-16, 2009) における濃度試験から有効性が証明された 10mg/Kg 重量を標準投与量とした。S42 および DHT は 5% DMSO、95% oil に溶解し、一日おきに、皮下注射にて投与した (control vehicle である oil による実験も用意)。体重変化を毎週毎に経時的に追い、12 週にて腹腔内投与による糖負荷試験 (2g D-glucose/kgBW)、インスリン感受性試験 (iPGTT) (0.7U regular insulin/kgBW) により耐糖能、インスリン感受性の評価を行った。最終 16 週で、酸素消費量評価を行い、また動物用 CT にて内蔵脂肪面積の定量評価を行い、最終的に安楽死させた。組織採取にて脂肪蓄積量の評価、肝臓、脂肪、骨格筋等の脂肪代謝、糖代謝関連酵素の定量的評価を real-time PCR 法にて行い、一部の蛋白は免疫組織学的評価を行った。

定量 PCR の対象となる分子は肝臓、脂肪では脂肪合成系の転写因子 SREBP-1C (sterol regulatory element-binding protein 1C)、脂肪合成系酵素 fatty acid synthase (FAS)、脂肪酸の β -酸化関連蛋白 carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1)、脂肪組織の脂肪代謝亢進や骨格筋の糖取り込み亢進に関与する PGC-1 α (PPAR γ coactivator-1)、PGC-1 α と相互作用し糖新生及び糖放出増加作用のある長寿遺伝子 sir2、インスリン感受性伝達蛋白 insulin receptor substrate (IRS) などである。また採取組織の一部は、ホルマリン固定し、切片作成後、HE 染色、免疫染色などで、組織学的解析を行った。

肥満モデルマウスの ob/ob マウスにおける検討

ob/ob マウスと age-matched の同ヘテロマウス (ob/+) (対照) を用いて、除鞏あるいは非除鞏下で以下の実験を行った。普通食下で S42 を 8 週間投与した場合の S42 の抗糖尿病作用の有無について検討を行った。評価項目のプロトコールについては、上記の B6 マウスへの高脂肪食負荷時の実験を踏襲した。

(2) アンドロゲンの抗動脈硬化作用機序に関する研究

睾丸摘出オス野兎(New Zealand white rabbit)に高コレステロール食を負荷した動脈硬化モデルにおいて、DHTの皮下植え込み型徐放ペレットとプラセボペレットを投与した。初期動脈硬化の時期〔コレステロール負荷2週後〕に、LOX-1の発現に及ぼすDHTの影響を免疫組織化学、real-time PCRによる定量等の方法を用いて検討した。*in vitro*の細胞実験系ではhuman aortic endothelial cells (HAECs)の細胞培養系を用いて、TNF- α によって発現誘導されたLOX-1に及ぼすDHTの効果とその機序を検討した。LOX-1の発現抑制に関しては、real-time PCR, human LOX-1 promoter-luciferase constructを用い解析した。シグナルについてはNF- κ Bを中心に、レポーター実験、NF- κ B inhibitorを用いた実験、ChIP (chromatin immunoprecipitation) assay等を組み合わせで解析した。

4. 研究成果

(1)新規 SARM・S42の抗メタボ作用・抗糖尿病作用に関する研究

除睾下の条件におけるHFD投与時のDHTとS42の相対比較をontrol vehicle (oil)投与群を対照として行った。oil投与に比して、DHT投与は体重を有意に増加させたが、S42には増加作用を認めなかった。DHTと対比すると、S42は有意の体重減少効果を認めた。食餌摂取量はoil投与に比して、DHT、S42ともに若干の低下を認めたが、体重変動との関連は認めなかった。DHT投与は内臓脂肪を増加させたのに対して、S42にはそのような効果を認めなかった。この際、DHTによる肝臓におけるCPT1の発現抑制を認め、脂肪酸酸化の低下が示唆されたが、S42ではこのような効果を認めなかった。また、興味深いことに、除睾下におけるHFD条件下では、DHT投与は、oil投与に比して、脂肪肝の増悪をきたしたが、S42にはこのような増悪効果を認めなかった。またiPGTTでは、DHT投与はoil投与に比して、耐糖能を悪化させ、HOMA-IRの増加、すなわちインスリン抵抗性の増悪をきたしたが、S42ではそのような効果は認めなかった。脂質面では、S42はDHTに比して血中中性脂肪の減少効果を認めた。DHT投与では、内臓脂肪細胞の大型化を認めたが、S42投与では、相対的に小型化していた。

以上のことから、SARMであるS42は除睾条件下のHFD投与では、DHTと異なり、脂肪・

糖代謝面では悪影響を發揮しない化合物であることが明らかとなった。次にS42そのものの代謝面での効果を検証するために、非除睾、HFD投与下で同様の検討を行った。S42投与により、軽度の食欲抑制効果を伴う軽度の体重減少効果を認めた。CTによる体脂肪評価では、非除睾下でのHFDは通常食に比して、有意の内臓脂肪及び皮下脂肪の増加効果を認めたが、それぞれの増加をS42は有意に減少させた。この条件下において、S42はHFDで増加した肝臓におけるSREBP1cやFASのmRNAの発現を有意に減少させた。またS42により肝でのsir2やPGC-1 α のmRNAの増加を認めた。少なくとも肝臓においては、S42は脂肪合成系を抑制し、エネルギー産生系を亢進させている可能性が示唆された。しかしながら、S42自体の脂肪肝改善効果は、認めるものの、顕著ではなかった。皮下脂肪、内臓脂肪におけるこれら遺伝子群の発現変動パターンは、肝臓と必ずしも同一ではなかった。S42投与により、HFD投与下での内臓脂肪細胞の大型化はS42により抑制され、相対的な小型化を認めた。また、S42は血糖値やインスリン値の基礎値を有意に改善し、HOMA-IRの改善も認めた。以上のことからS42は、性腺系が正常のモデル系においても、HFDによる代謝悪化に対し、改善効果を持つ化合物であることが示された。

次に、非去勢ob/obマウスにS42を投与して、oil投与群あるいはDHTと比較したところ、体重や血糖、インスリン値、中性脂肪値には3群間で差異を認めなかった。以前、我々は、マウス視床下部におけるAR発現部位がレプチン受容体発現パターンと似ていることや、両者が弓状核の同一ニューロンに共存することを示し、STAT3依存性レプチンシグナルでARが増強的に働くことを報告した(Endocrinology 49, 6028, 2008)。そのことより、今回の結果に関しては、レプチンシグナルが欠如しているob/obマウスではARの作用発現が乏しく、S42が効果を示さなかった可能性もしくは、代謝面での重症度に応じたS42の作用限界の可能性が考えられた。

なお、齧歯類の除睾系モデル等では、除睾による体重減少、アンドロゲン投与による体重増加等、一見、ヒトにおける内因性アンドロゲンの作用とは逆の現象が報告されているが、本研究における検討でも同様であった。一方で、AR欠損マウスでは、我々の報告も含め、肥満を呈することから、齧歯類においても内因性ARの代謝面での有益性が示唆されている。齧歯類においても、内在性アンドロ

ゲン-AR系の有益性が存在するとしても、除糞モデルでは精巣性アンドロゲンに由来する内因性のエストロゲン欠乏の影響が、ヒトの系と異なり、より大きく作用していると考えられた。複雑ではあるが、少なくともマウスの除糞、HFD負荷系では、DHTはHFD惹起化の代謝増悪を助長する因子と考えられた。

今回、検討したS42はDHTと同様に、AR結合活性を有しながら、代謝面では前立腺、代謝面に増悪作用を認めず、むしろ抗肥満、糖代謝改善など、組織選択的な有益作用が期待される結果であった。現在、世界中の企業でSARMの開発が行われているが、市場に出ているものは皆無である。現在、各企業において開発中のものは、ほとんど骨や筋肉を標的とし、代謝面での効能を期待して開発中のものはほとんどなく、その意味で、本研究は、独創性が高い。今後、S42の骨格筋、骨、前立腺に対する作用等も詳細に検討していく予定である(以上のデータは論文投稿準備中である)。

(2) アンドロゲンの抗動脈硬化作用機序に関する研究

睾丸摘出野兔に2週間高コレステロール食を負荷した初期動脈硬化モデルにおいて、DHTの皮下植え込み型徐放ペレットとプラセボペレットを投与し、プラセボ投与群における血管内皮細胞におけるLOX-1の発現とDHT徐放ペレット投与によるそれとを比較検討した。蛍光免疫染色により、血管内皮マーカーであるCD31の発現と一致する場所にLOX-1の発現を認め、初期動脈硬化巣においては、血管内皮細胞において酸化LDL受容体のLOX-1の発現を認めることを確認した。その血管内皮細胞におけるLOX-1の発現は、DHT徐放ペレット投与により抑制された。次にHAEC培養系を用いて、TNF- α 誘導下のLOX-1発現に対してDHTが抑制的に作用することをmRNAレベルまた蛋白レベルで抑制することを見出した。そこで、ヒトLOX-1遺伝子上流プロモーター約2.4kbの欠失変異解析により、同効果の責任部位を探索したところ、NF- κ BとAP-1のシグナル作用に関連したサイトであることが判明した。DHTは血管内皮細胞におけるNF- κ BシグナルとAP-1シグナルの抑制を介して、LOX-1発現を抑制することで初期動脈硬化形成に抑制的に作用することが示唆された(Endocrinology 153:3405-15, 2012 掲載済み)。ヒトでは、壮年期以降の男性ホルモンの相対的低値は、心血管病のリスクとなり、死亡率の増加と関連することが知られている。本研究成果により

、アンドロゲンの抗動脈硬化作用機構の一端が明らかとなった。

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 19 件)

(英文)

Akehi Y, Kawate H, Murase K, Nagaishi R, Nomiyama T, Nomura M, Takayanagi R, Yanase T: Proposed diagnostic criteria for subclinical Cushing's syndrome associated with adrenal incidentaloma. Endocrine J 60(7):903-912, 2013 (査読あり)

Murase K, Nagaishi R, Takenoshita H, Nomiyama T, Akehi Y, Yanase T: Prevalence and clinical characteristics of primary aldosteronism in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension. Endocr J.60(8):967-76, 2013 (査読あり)

Zhou T, Cong S, Sun S, Sun H, Zou R, Wang S, Wang C, Jiao J, Goto K, Nawata H, Yanase T, Zhao Y: Identification of endocrine disrupting chemicals activating SXR-mediated transactivation of CYP3A and CYP7A1. Mol Cell Endocrinol.365 (1): 36-43, 2013 (査読あり)

Qiu Y., Tanaka T., Nawata H., Yanase T.: Dihydrotestosterone inhibits lectin-like oxidized-LDL receptor-1 expression in aortic endothelial cells via a NF- κ B/AP-1-mediated mechanism. Endocrinology 153:3405-15, 2012 (査読あり)

Kuramoto K, Okamura T, Yamaguchi T, Nakamura TY, Wakabayashi S, Morinaga H, Nomura M, Otsu K, Usuda N, Matsumura S, Inoue K, Fushiki T, Kojima Y, Hashimoto T, Sakai F, Hirose Yanase T F, Osumi T. Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects the heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation. J Biol Chem. 287(28):23852-63, 2012 (査読あり)

Gao R, Zhao L, Liu X, Rowan B, Wabitsch M, Edwards DP, Nishi Y, Yanase T, Yu Q, Dong Y. Methylseleninic Acid is a Novel Suppressor of Aromatase Expression. J Endocrinol 212(2):199-205, 2012 (査読あり)

Bao B., Jiang J., Yanase T., Nishi Y., Morgan J. R.: Connexon-mediated cell

adhesion drives microtissue self-assembly.
FASEB J 25:255-64, 2011 (査読あり)

(和文)

柳瀬敏彦 選択的アンドロゲン受容体修飾薬の抗メタボリックシンドローム作用に関する研究. Therapeutic Research 34(7):917-921, 2013 (査読なし)

柳瀬敏彦 高齢者とアンドロゲン: 選択的アンドロゲン受容体修飾剤(SARM)開発の現状. Clinical Calcium 23:1171-1177, 2013 (査読なし)

柳瀬敏彦, 村瀬邦崇, 野見山 崇 性腺機能低下症とその治療: 男性の性腺機能低下症 男性更年期(LOH)と生活習慣病. 内分泌・糖尿病・代謝内科 36:422-428, 2013 (査読なし)

柳瀬敏彦, 明比祐子 内分泌環境の中でのテストステロンの位置づけ. 臨床泌尿器科 66(5):309-314, 2012 (査読なし)

柳瀬敏彦, 永石綾子, 明比祐子, 野見山 崇 高齢者の男性医学: テストステロンと脂質、糖代謝、肥満、動脈硬化. Geriatric Medicine 50: 449-454, 2012 (査読なし)

柳瀬敏彦, 村瀬邦崇, 明比祐子, 野見山 崇 ステロイドホルモンと脂質代謝: テストステロンと脂質代謝-late-onset hypogonadism (LOH)を含めて. The Lipid 23:54-59, 2012 (査読なし)

柳瀬敏彦, 野見山 崇 前立腺癌と糖代謝: アンドロゲンとインスリンの観点から. 内分泌・糖尿病・代謝内科 35 (3) :270-274, 2012 (査読なし)

柳瀬敏彦, 竹之下博正, 明比祐子 内科診療に役立つメンズヘルス: 男子性腺機能低下症の鑑別診断と治療. Medicina 48:1938-1941, 2011 (査読なし)

野見山 崇, 村瀬邦崇, 田中智子, 柳瀬敏彦 特集「サルコペニアの診かた」アンドロゲンとサルコペニア. Modern Medicine 31:1370-1373, 2011 (査読なし)

柳瀬敏彦 ホルモンとアンチエイジング. CLINICIAN 594 (vol.158) :25-30, 2011 (査読なし)

柳瀬敏彦 性ステロイドホルモン製剤の使い分け. SARM Hormone Frontire in Gynecology 18:197-204, 2011 (査読なし)

柳瀬敏彦, 村瀬邦崇, 田中智子, 野見山 崇, 明比祐子 男性更年期障害: 診療の現状と基盤的臨床・基礎研究の進展. Medical Science Digest 37: 102-105, 2011 (査読なし)

[学会発表](計 12 件)

(国際)

Yanase T : Symposium 12: Hormonal replacement therapy, DM and metabolic syndrome. Androgen and metabolic syndrome. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer. 11.15-17, 2012 (Kanazawa, Japan)

Yanase T : Symposium 6, Subclinical adrenal diseases:Diagnosis and treatment of subclinical Cushing syndrome (SCS). International Congress of Endocrinology 2012 5.5-9, 2012 (Florence, Italy)

Yanase T : Plenary lecture 6, Androgen and Metabolic syndrome. The 10h Annual Congress of Endocrinology 2011.8.18-20(SuZhou, China)

Yanase T: Symposium 6, Action of Testosterone, Keynote Lectures: Actions of androgen and selective androgen receptor modulator in metabolic syndrome Japan-Asean Conference on Men 's Health & Aging 2011.6.30-7.3 (Kamakura, Japan)

(国内)

柳瀬敏彦 教育講演; アンドロゲンから見た生活習慣病治療戦略 第24回日本性機能学会(山口)2014年1月18日

柳瀬敏彦 教育講演「SARMとSERM」: Selective androgen receptor modulator (SARM)開発の現況 第20回日本ステロイドホルモン学会学術集会(金沢)2012.11.18

柳瀬敏彦 教育講演3: 体質とホルモン: 特にアンドロゲンと生活習慣病体質の観点から 第63回日本体質学会総会(久留米)2013年10月5日

柳瀬敏彦 シンポジウム4 内分泌代謝疾患の現状と今後の展望: 抗肥満・抗メタボ作用を有する selective androgen receptor modulator (SARM)開発の試み

日本薬学会薬理系薬学部会: 生体機能と創薬シンポジウム(神戸)2012, 2012.8.31

柳瀬敏彦: クリニカルアワー9: 性ステロイドとメタボリックシンドローム アンドロゲンの抗肥満作用の基盤研究と生活習慣病創薬 第85回日本内分泌学会学術総会(名古屋)2012.4.19-21

柳瀬敏彦: シンポジウム6S-11 男性医学の進歩と展望 内科学の立場から: 特にアンチメタボ、骨代謝の面から 第28回医学会総会講演データインターネット公開 2011.6.22-9.22

柳瀬敏彦: シンポジウム 18 「メタボを防ぐホルモン力」アンドロゲンの抗メタボ作用の基盤研究 第 11 回日本抗加齢医学会総会(京都) 2011.5.29

柳瀬敏彦: 教育講演 17 「グルココルチコイドの作用と副作用: ステロイド性糖尿病を中心に」 第 84 回日本内分泌学会学術総会 (神戸) 2011.4.21-23

〔図書〕(計 1 件)

柳瀬敏彦、田邊真紀人:
Chapter 1 SARM と SGRM の展開
ファーマナビゲーター (SERM 編) 大田博明、
杉本利嗣、田中 栄編集 (メディカルレビュー社): 46-57, 2013

〔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.med.fukuoka-u.ac.jp/interna5/>

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: 30239818

(2) 研究分担者 なし

(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: 10532559

田中 智子 (TANAKA, Tomoko)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号 10380528

村瀬 邦崇 (MURASE, Kunitaka)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号: 30712517
(平成 24 年度より連携研究者)