

**長寿科学研究費補助金研究報告書**  
**平成10年度総括および分担研究報告書**

**老化防止のためのホルモン療法に関する研究**

**研究組織**

- 主任研究者** 名和田 新（九州大学第三内科教授）  
**分担研究者** 大澤仲昭（大阪医科大学第一内科教授）  
**分担研究者** 宮地幸隆（東邦大学第一内科教授）  
**分担研究者** 関原久彦（横浜市立大学第三内科教授）  
**分担研究者** 安田圭吾（岐阜大学第三内科教授）  
**分担研究者** 高柳涼一（九州大学第三内科講師）

# 老化防止のためのホルモン療法に関する研究

名和田 新 (九州大学医学部第三内科教授)

DHEA には抗糖尿病、抗動脈硬化作用等の種々の有益な生理作用が報告されており、その生理学的意義並びにその作用機構の解明を試みた。糖尿病患者並びに糖尿病モデル動物においてDHEA(-S) 分泌異常を示した。また高齢者糖尿病患者のインスリン感受性の改善にDHEA-S投与が有効であることを示した。DHEA の抗糖尿病作用機序の一端として、脂肪細胞でのGLUT4の増加による糖輸送活性化と肝臓での糖新生の抑制を介した系並びにDG-PKC signaling および IRS-1-PI3-kinase signaling の増強を介した系による機序を示した。

## 【研究組織】

- 名和田 新 (九州大学第三内科教授)
- 大澤伸昭 (大阪医科大学第一内科教授)
- 宮地幸隆 (東邦大学第一内科教授)
- 関原久彦 (横浜市立大学第三内科教授)
- 安田圭吾 (岐阜大学第三内科教授)
- 高柳涼一 (九州大学第三内科講師)

## A. 研究目的

副腎アンドロゲンのひとつである dehydroepiandrosterone (DHEA) とその硫酸塩であるDHEA-S の血中レベルは 20 歳代でピークとなり以後、加齢とともに直線的に著減する。近年、主に動物実験において、DHEA には抗自己免疫、抗糖尿、抗動脈硬化、抗肥満、抗腫瘍効果及び抗自己免疫などの種々の有益な生理作用が報告されており、老化制御並びに老化予防の治療戦略の観点から、DHEA のヒトにおける生理学的意義並びにその作用機構を解明することは、極めて重要な課題と言える。本研究班では、DHEA の抗糖尿病作用の観点から1) 糖尿病患者および糖尿病モデル動物における糖代謝異常並びに治療経過が血中DHEAレベルに及ぼす影響並びに 2) DHEAS経静脈投与による補充療法がインスリン感受性に及ぼす影響を検

討し、また、耐糖能異常例におけるインスリン感受性と血中DHEASとその他の因子の関連を多変量解析にて検討した。3) DHEAの抗糖尿病作用機序ををin vitroの系で検討した。一方、筋緊張性ジストロフィーはミオトニアや筋萎縮などの骨格筋の障害のほか、脱毛、白内障、耐糖能異常、性腺萎縮などの内分泌異常、心伝導障害などを呈する常染色体優性遺伝の多臓器疾患である。DHEA-Sの投与によりミオトニアや筋力低下をはじめとするDMの諸症状が改善する可能性があるが、その作用機序は明らかでない。DHEA (-S)の男性ホルモン作用による効果である可能性は、DMに対するtestosterone療法が無効であったことから否定的であり、これまでDHEA-Sの膜作用が報告されていることを考えあわせ、昨年度、骨格筋にDHEA-S特異的結合部位・受容体が存在する可能性を指摘した。今回の研究では(1)DHEA-Sにより骨格筋細胞に誘導される遺伝子の検索、(2)骨格筋細胞にありDHEA-Sと直接結合蛋白(受容体・エフェクター候補)の探索、(3)DM遺伝子変異がDHEA(-S)代謝に与える影響、の3つの方向で研究を行った。

## B. 研究方法

1. (1) 臨床的検討では血糖コントロール不良 (HbA1c10%以上) のNIDDM患者男性96人、女性75人を対象として、糖尿病治療により血糖が改善すると、血中DHEA及びDHEA-Sがどのように変動するか検討を行った。同時に血中インスリン値 (IRI) も測定した。治療は食事療法単独又はSU剤で行った。対象患者の年齢は30-70歳代で、10歳ごとの年代に分けて、それぞれに正常コントロール群を設定した。(2) 基礎的検討では雄性モルモット (体重400-600g) 5匹にストレプトゾトシン(STZ)200mg/kgを腹腔内注射し、高血糖状態を作り、その後DHEA-S(200mg/kg)を週3回腹腔内注射し、経時的に血糖、血中DHEA及びDHEA-Sを測定し、それらの変動をコントロール群と比較した。

2. (1) DHEAS補充療法：平均年齢63.3歳の糖尿病症例18男性例にて200mgDHEAS経静脈投与連続7日間の前後でインスリン感受性を評価した。(2)多変量解析：インスリン感受性を評価した耐糖能異常男性例42例にて血中DHEASとインスリン感受性指数Siの関連を偏相関、多重回帰分析により解析した。インスリン感受性は経静脈ブドウ糖負荷試験のMinemal Model解析により評価した。

3. インスリン抵抗性を示す糖尿病マウスdb/dbにおけるDHEA, androstenedione(A), troglitazone の作用を糖代謝酵素活性変化より検討した。16週雄マウスの肝と筋の解糖系酵素hexokinase+glucokinase (HK+GK), phosphofructokinase(PFK), pyruvate kinase(PK)と糖新生系酵素glucose6-phosphatase(G6Pase), fructose-1, 6-bisphosphatase(FBPase), phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK)活性を既報の如く測定した。

4. 生後16週のOLETFラットに0.4%DHEAを2週間経口摂取させ、体重、血糖、レプチン濃度、傍睪丸脂肪重量を検討。又、in vitroでPI3-kinase阻害剤、wortmannin(WM), PLC阻害剤LY379196(LY), RO32-0432(RO)を使用してDHEAによる $[^3H]$ 2-deoxyglucose uptake(GU)への効果を検討した。

5. マウス骨格筋由来の細胞株C2C12は筋芽細胞 (Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM with 20% fetal bovine serumで培養) および筋管細胞 (DMEM with 5% horse serumで分化誘導) を用い differential display 法により、DHEA-Sにより誘導される複数の遺伝子 (未知の遺伝子を含む) を検索した。また、これまで報告されているDHEA(-S)の作用等からエフェクター候補遺伝子を選び、RT-PCRにてDHEA-Sによる発現誘導の有無を調べた。(2) 筋緊張性ジストロフィー(DM)患者由来の19染色体のhemizygoteであるsomatic cell hybridを用いてCTGリピートが隣接遺伝子のDHEA sulfotransferase遺伝子の発現に影響を与えるかをRT-PCRで調べた

### C. 研究結果

1. 1) 臨床的検討ではNIDDM男女とも各年代で、血糖コントロール不良時 (HbA1c10%以上) には血中DHEA及びDHEA-Sは正常群と比べて有意に低値を示した。治療により血糖値が改善するとともに血中DHEA及びDHEA-Sも上昇がみられた。血中IRIは経過とともに低下傾向がみられたが、有意な変動ではなかった。2)基礎的検討ではSTZモルモット群で、血糖値は2ヶ月で平均189mg/dlと有意に上昇がみられ、血中DHEA及びDHEA-Sは3ヶ月過ぎより低下傾向がみられた。DHEA-S腹腔内投与により12週後に

は血糖値平均162mg/dlと低下傾向がみられた。

2. (1)DHEAS補充療法：DHEAS投与により血中DHEASとともに、ほぼ20~30歳代のレベルに回復し、インスリン感受性指数(Si)は $1.72\text{min}^{-1}\times\mu\text{U/ml}^{-1}$ から2.28に改善した( $P<0.05$ )。また、DHEAS投与により血中IGF-Iの上昇( $P<0.05$ )が観察され、DHEASの効果の一部はIGF-Iが関与している可能性が示唆された。

(2)多変量解析：インスリン感受性指数Siを従属変数とした場合、単相関分析でSiはBMI, Insulin, leptin, Cortisol, 中性脂肪と有意の相関を示したが、DHEASとの関連は有意ではなかった。また、偏相関、多重回帰分析でもDHEASはSiの有意の独立した決定因子ではなく、年齢の影響が強いことが示された。

3. 非糖尿病マウスdb/+mと比べ、db/dbは高インスリン血症を示すにも関わらず、肝G6Pase, FBPase活性の上昇がみられた。DHEAとtroglitazone投与により肝G6Pase, FBPase活性は低下し、高血糖は改善された。一方、A投与では同様の所見はみられなかった。

4. db/dbにおいてDHEAにより増加し、インスリン刺激によるGLUT4のtranslocationの検討では刺激後の細胞膜分画GLUT4が増加した。しかしながら、db/+においては単離脂肪細胞においてDHEAによるこれらの効果は認められなかった。

3.DHEA経口投与により、体重は変化せず、血糖、血清レプチン濃度は低下した。測定し得た傍辜丸脂肪重量は減少していた。又、脂肪細胞でのインスリンによりGUは改善されたが、ヒラメ筋でのGUは改善されなかった。一方、脂肪細胞でのDHEAによるGUはWM, ROにより完全に

抑制されたが、LYでは抑制されなかった。

4. (1)differential display法により、DHEA-Sにより誘導される複数の遺伝子(未知の遺伝子を含む)を同定した。この中には細胞内情報伝達に関する分子、細胞骨格に関する分子などが含まれていた。また、これまで報告されているDHEA(-S)の作用等からエフェクター候補遺伝子を選び、RT-PCRにてDHEA-Sによる発現誘導の有無を調べたが、insulin-like growth factor-Iおよびcarnitine palmytoiltransferase-1に関しては発現量の変化を見いだせなかった。(2)マウスC2C12筋芽細胞/筋管細胞およびヒト骨格筋にはKd=5~9および35から40 $\mu\text{m}$ の2種類の結合部位を認めた。結合阻害実験から $3\beta$ -sulfateで、 $5\alpha$ -または $\Delta 5$ 構造を持つステロイドに対する結合蛋白であることが示された。(3)筋緊張性ジストロフィー(DM)遺伝子変異である染色体19q13.3のCTGリピートの延長により、変異をもつ遺伝子(DM protein kinase)だけでなく、隣接する遺伝子(群)の遺伝子も存在し、DM遺伝子変異が指摘されている。同部位にはDHEA sulfotransferase遺伝子も存在し、DM遺伝子変異がDHEA(-S)代謝に直接影響している可能性がある。DM患者由来の19染色体のhemizygoteであるsomatic cell hybridを用いてCTGリピートが隣接遺伝子発現に影響を与えるかをRT-PCRで調べたところ、CTGリピートの延長によりDHEA sulfotransferase遺伝子の軽度の発現が抑制されていた。

#### D. 考案

血糖とDHEAおよびDHEA-Sの間には、負の相関があると考えられ、高血糖状態が一定期間持続すると、DHEAが低下を示し、血糖が正常化してくると逆にDHEAは上昇すると考えられた。これらの変化は急性の変化よりも、月単位

の慢性的な変化であることが示唆された。

一方、高齢糖尿病症例のインスリン感受性の改善にDHEA-S補充は有効であったが、多変量解析から血中DHEA/Sは耐糖能異常例でのインスリン感受性を決定する主要な因子ではないことが示唆された。

我々は糖尿病モデルの動物の検討からDHEA投与によりdb/db糖尿病マウスにおいて耐糖能とインスリン抵抗性の改善が認められ、加齢肥満ラットにおいてもインスリン抵抗性の進展が阻止されること、これらの機序の一部として、脂肪細胞におけるインスリン刺激情報伝達系に関わる分子、IRS-1レベルでのリン酸化改善と細胞内糖輸送担体GLUT4の増加による糖輸送活性の亢進に伴い末梢組織での糖利用が亢進していること、また糖新生の抑制による肝糖放出の抑制に寄与していることを過去2年度の報告で明らかにした。本年度はDHEAの血糖改善機序について肝糖代謝関連酵素に及ぼす影響を検討したが、糖尿病マウスdb/dbにおいてDHEAとインスリン抵抗性改善薬のtroglitazoneは、上昇した肝G6Pase, FBPase活性を抑制することにより高血糖改善をすることが示された。DHEAは新しいタイプの血糖降下剤であると考えられる。

また、我々は過去2年の研究成果として糖尿病モデル動物OLETFラットにおいてもDHEA投与により血糖改善作用を認めること、その機序として脂肪細胞のDG-PKC signaling およびIRS-1-PI3-kinase signaling の増強によることを報告した。さらにPKC $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ の発現の増加とインスリンによる細胞膜への移行の増加もあわせて報告した。今回、OLETFラットへのDHEA投与による改善は筋肉細胞にも認められるか否か、またインスリン感受性改善効果はPI3-kinase-PKC $\zeta$  signal か diacylglycerol (DG)-PKC signalのいずれの改善によるのかを

さらに検討したが、骨格筋に対する影響はほとんど認められず、DHEAは脂肪組織の増殖を抑制し、脂肪重量を減少させ、PI3-kinase-PKC $\zeta$  signalを改善し、インスリン感受性を改善すると推察された。

副腎性男性ホルモン (DHEA-S) の投与により筋緊張性ジストロフィー (DM) の諸症状が改善する可能性があるが、そのメカニズムは不明である。DMは早老症のモデルのひとつであり、また、精神発達地帯や性格変化などの中枢神経症状を伴うため、DMに対するDHEA-Sの作用機序の解明は老人性痴呆に対する副腎性男性ホルモン療法を考える上で重要なヒントになりうると考えられた。

#### E. 結論

1. 糖尿病患者並びに糖尿病モデル動物におけるDHEA(-S) 分泌異常を示した。またDHEAの抗糖尿病作用機序の一端として、新たに肝G6Pase, FBPase 活性の抑制による機序を示した。
2. 高齢者糖尿病の症例のインスリン感受性の改善にDHEA-Sの投与が有効であった。
3. differential display法によりDHEA-Sにより誘導される複数の遺伝子の同定を試みた。現在、その解析中である。

# 糖代謝異常と DHEA ならびに DHEA-S

上芝 元、廣井直樹、宮地幸隆  
東邦大学第一内科

## 研究要旨

DHEA と糖尿病との関連について検討した。血糖値と血中 DHEA 及び DHEA-S の間には負の関係があり、高血糖状態が持続すると DHEA が低下すると考えられた。

## A. 研究目的

DHEA には抗動脈硬化作用、抗糖尿病作用、抗腫瘍作用、抗肥満作用、免疫能増強作用、神経ステロイドとしての作用など種々の生理作用があると考えられるが、糖代謝異常との関連に注目して臨床的並びに基礎的検討を行った。

## B. 研究方法

臨床的検討では血糖コントロール不良 ( $HbA_{1c}$  10%以上) の NIDDM 患者男性 96 人、女性 75 人を対象として、糖尿病治療により血糖が改善すると、血中 DHEA 及び DHEA-S がどのように変動するか検討を行った。同時に血中インスリン値 (IRI) も測定した。治療は食事療法単独又は SU 剤併用で行った。対象患者の年齢は 30-70 歳代で、10 歳ごとの年代に分けて、それぞれに正常コントロール群を設定した。

基礎的検討では雄性モルモット (体重 400-600g) 5 匹にストレプトゾトシン (STZ) 200 mg/kg を腹腔内注射し、高血糖状態を作り、その後 DHEA-S (20mg/kg) を週 3 回腹腔内注射し、経時的に血糖、血中 DHEA 及び DHEA-S を測定し、それらの変動をコントロール群と比較した。

## C. 研究結果

臨床的検討では NIDDM 男女とも各年代で、血糖コントロール不良時 ( $HbA_{1c}$  10%以上) には血中 DHEA 及び DHEA-S は正常群と比べて有意に低値を示した。治療により血糖値が改

善するとともに血中 DHEA 及び DHEA-S も上昇がみられた。血中 IRI は経過とともに低下傾向がみられたが、有意な変動ではなかった。

基礎的検討では STZ モルモット群で、血糖値は 2 ヶ月で平均 189mg/dl と有意に上昇がみられ、血中 DHEA 及び DHEA-S は 3 ヶ月過ぎより低下傾向がみられた。DHEA-S 腹腔内投与により 12 週後には血糖値平均 162mg/dl と低下傾向がみられた。

## D. 考察

血糖値と血中 DHEA 及び DHEA-S の間には負の関係があると考えられ、高血糖状態が持続すると DHEA が低下を示し、血糖値が改善してくると DHEA は上昇すると考えられた。これらの変化は急性の変化よりも、月単位の慢性的変化であると推定された。

## E. 結論

血糖値と血中 DHEA 及び DHEA-S の間には負の関係があり、高血糖状態が持続すると DHEA が低下すると考えられた。

# 厚生省研究費補助金 研究報告書

糖尿病マウスdb/dbにおけるdehydroepiandrosterone (DHEA), androstenedione, トログリタゾンの血糖降下作用に関する研究

青木一孝 斎藤達也 関原久彦 横浜市大第3内科

**研究要旨** インスリン抵抗性を示す糖尿病マウスdb/dbに副腎アンドロジェンであるDHEAを投与すると高血糖が改善することが知られている。また、トログリタゾンはインスリン抵抗性改善薬として臨床的に使用されている。そこで、DHEA, トログリタゾンの作用を糖代謝酵素活性変化より検討した。db/dbマウスにおいて、DHEAはトログリタゾンと同様に、上昇した肝G6PaseとFBPase活性を抑制することにより高血糖改善をする可能性が示された。

## A. 研究目的

インスリン抵抗性を示す糖尿病マウスdb/dbに副腎アンドロジェンであるDHEAを投与すると高血糖が改善することが知られている。また、トログリタゾンはインスリン抵抗性改善薬として臨床的に使用されている。そこで、DHEA, androstenedione, トログリタゾンの作用を糖代謝酵素活性変化より検討した。

## B. 研究方法

5週雄マウスの肝と筋の解糖系酵素 hexokinase+glucokinase(HK+GK), phosphofructokinase(PFK), pyruvate kinase(PK)と糖新生系酵素 glucose 6-phosphatase (G6Pase), fructose-1,6-bisphosphatase(FBPase), phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK)活性を測定した。

## C. 研究結果

非糖尿病マウスdb/+mと比べdb/dbは高インスリン血症を示すにも関わらず、肝G6Pase, FBPase活性の上昇がみられた。db/dbマウスにおいてDHEAとtroglitazone投与により高血糖は改善され、肝G6Pase, FBPase活性は低下した。また、血糖値と肝G6Pase, FBPase活性の間には、強い相関が認められた。一方、androstenedione投与では同様の所見はみられなかった。

## D. 考察

DHEAの高血糖改善作用はDHEAの代謝物である androstenedione以下によるものではなく、DHEA固有のものである。

さらに、DHEAとtroglitazoneは、上昇した肝G6Pase, FBPase活性を抑制することにより高血糖改善をする可能性が示された。

## E. 結論

インスリン抵抗性を示す糖尿病マウスdb/dbにおいて、肝G6Pase, FBPase活性が高血糖の発症に重要な役割を持っている。さらに、この実験より、DHEAは新しいタイプの血糖降下剤であると考えられる。

## F. 研究発表

### 2.学会発表

- (1)第80回米国内分泌学会(Abstract No. P1-458)
- (2)Xth International Congress on Hormonal Steroids(Abstract No. 127 E)
- (3)第71回日本内分泌学会学術総会
- (4)第6回日本内分泌学会ステロイドホルモン分科会
- (5)第8回性差医学研究会(Abstract No. 4)
- (6)第96回日本内科学会(Abstract No. 409)

## 老人性痴呆に対する副腎性男性ホルモン療法の有用性に関する研究

大澤仲昭  
(大阪医科大学第一内科 教授)

筋緊張性ジストロフィー (DM) は様々な早老症様症状を伴う遺伝性筋疾患であり、DM患者では血中DHEA, DHEA-S濃度が低い。DM患者に dehydrospirosterone sulfate (DHEA-S)を投与すると、ミオトニアをはじめとするDM症状が改善する可能性が示唆されているがそのメカニズムは不明である。この作用機序を解明するため、我々は(1) DHEA-Sにより骨格筋細胞に誘導される遺伝子の検索、(2)骨格筋細胞にありDHEA-Sと直接結合蛋白(受容体・エフェクター候補)の探索、(3) DM遺伝子変異がDHEA(-S)代謝に与える影響、の3つの方向で研究を行った。結果:(1) differential display法により、DHEA-Sにより誘導される複数の遺伝子(未知の遺伝子を含む)を同定した。この中には細胞内情報伝達に関する分子、細胞骨格に関する分子などが含まれていた。また、これまで報告されているDHEA(-S)の作用等からエフェクター候補遺伝子を選び、RT-PCRにてDHEA-Sによる発現誘導の有無を調べたが、insulin-like growth factor-I (IGF-I)およびcarnitine palmytoiltransferase-I (CPT-I)に関しては発現量の変化を見いだせなかった。(2) マウスC2C12筋芽細胞/筋管細胞およびヒト骨格筋には $K_d=5\sim 9$ および $35\sim 40\ \mu\text{M}$ の2種類の結合部位を認めた。結合阻害実験から $3\beta$ -sulfateで、 $5\alpha$ -またはD5構造を持つステロイドに対する結合蛋白であることが示された。(3) DM遺伝子変異である染色体19q13.3のCTGリピートの延長により、変異をもつ遺伝子(DM protein kinase)だけでなく、隣接する遺伝子(群)の遺伝子発現に影響を受ける可能性が指摘されている。同部位にはDHEA sulfotransferase遺伝子も存在し、DM遺伝子変異がDHEA(-S)代謝に直接影響している可能性がある。患者由来の19染色体のhemizygoteであるsomatic cell hybridを用いてこのリピートが隣接遺伝子発現に影響を与えるかをRT-PCRで調べたところ、CTGリピートの延長によりDHEA sulfotransferase遺伝子の軽度の発現が抑制されていた。本研究で骨格筋細胞におけるDHEA-S結合蛋白の存在、DM遺伝子異常がDHEA代謝に影響を与える可能性が示された。



## A. 研究目的

筋緊張性ジストロフィー (DM) はミオトニアや筋萎縮などの骨格筋の障害のほか、中枢神経症状、脱毛、白内障、耐糖能異常、性腺萎縮などの内分泌異常、心伝導障害など、一種の早老症様症状を呈する常染色体優性遺伝の多臓器疾患である。DMPKと呼ばれる一種の蛋白リン酸化酵素の3'-非翻訳領域に存在するCTGリピートの増幅が原因遺伝子変異として判明しているが、ノックアウトおよびトランスジェニックマウスの研究からこのDMPKの機能異常だけではDMの臨床症状を説明することはできず、このような非翻訳領域の変異がどのようにしてDM病態につながるのか判っていない。一方、Dehydroepiandrosterone (DHEA) とその sulfate (DHEA-S) はヒト血中にもっとも豊富に存在するステロイドであり、加齢とともにその血中濃度が低下することが知られている。DMは一種の早老症状を呈する疾患であるが、DM患者の血中DHEA、DHEA-S濃度はage-matched controlと比べて低い。そして、DM患者にDHEA-S製剤を投与することによりミオトニアをはじめとする種々の症状が改善する可能性が示されているが、その作用機序は明らかでない。そこでこの作用機序を解明するため、(1) 骨格筋細胞にありDHEA-Sと直接結合蛋白(受容体・エフェクター候補)の探索、(2) DHEA-Sにより骨格筋細胞に誘導される遺伝子の検索、(3) DM遺伝子変異がDHEA(S)代謝に与える影響、の3つの研究を行った。昨年度、(1)に関して報告した。本年度は(2)と(3)についての研究を行った。DMは一種の早老症モデルであり、また、精神発達遅滞や性格変化などの中枢神経症状も伴うため、DMに対する

DHEA-Sの作用機序の解明は、老化および老人性痴呆に対する副腎性男性ホルモン療法を進める上で重要な情報をもたらすものと期待される。

## B. 研究方法

(1) これまで報告されているDHEA(-S)の作用からエフェクター候補としてinsulin-like growth factor-I (IGF-I)およびcarnitine palmytoiltransferase-I (CPT-I)を選び、骨格筋細胞株C2C12におけるDHEA-Sによる発現誘導の有無をRT-PCRにて調べた。また、Differential display法により発現量の変化する遺伝子をスクリーニングした。

(2) DM患者由来の線維芽細胞とCHO細胞とのsomatic hybrid cell lineを用い、第19染色体上のDMPK隣接遺伝子の転写をcompetitive RT-PCR法で定量、患者由来の変異第19染色体だけを持つhemizygote細胞と、逆に患者由来の正常第19染色体だけを持つhemizygote細胞の転写産物を比べることにより、CTGリピートの延長がその染色体上の遺伝子転写に与える影響を評価した。internal controlとしては親株CHOに由来するhamster beta-actinを用いた。

## C. 研究結果

(1) 血中IGF-I濃度はDHEA-S濃度と相関するという報告があるが、IGF-Iは最も有名なmyotrophic factorの一つである。また、carnitine palmytoiltransferaseは脂肪酸のエネルギ代謝に重要な酵素であり、その欠損症はヒトでミオパチーを呈することが知られており、最近、このCPT-Iの転写がPPAR $\alpha$ によって制御されていることが示された。DHEA-Sの作用の少なくとも一部はPPAR $\alpha$ を必要とするということ

がPPAR $\alpha$ ノックアウトマウスを用いた研究から示されていることから、DHEA-S作用がPPAR $\alpha$ を介し、CPT-Iをエフェクターとしている可能性がある。そこで培養骨格筋細胞株C2C12においてDHEA-SがIGF-IあるいはCPT-Iの発現を誘導するか否かをRT-PCRで半定量したが、DHEA-SによるIGF-IあるいはCPT-Iの発現誘導は確認されなかった。またこのような候補遺伝子をしばってその変化を見る以外に、Differential displayを使ってDHEAあるいはDHEA-Sにより発現量の変化する遺伝子のスクリーニングも試み、未知の遺伝子を含み複数の誘導をうける遺伝子が認められ、解析中である。

(2) somatic cell hybridでのCTGリピート延長による第19染色体上の遺伝子転写量の変化を比較することにより、DMPKおよびDHEA sulfotransferase遺伝子産物がCTGリピートの延長により減少することが示された。

#### D. 考案

血清DHEA, DHEA-S濃度は加齢とともに減少するが、DM患者ではage-, sex-matched controlと比べて血清DHEA, DHEA-S濃度が低い事が知られている。われわれはこれまで、DMに対してDHEA-S投与を行い、ミオトニア、筋力低下をはじめとするDM諸症状が軽減する可能性を示してきた。DHEA-SのDMに対する作用およびそのメカニズムの解明はDMそのものだけでなく、老化や痴呆をはじめとする老化に関連した諸変化の解明につながってゆく可能性があると考えられる。

今回の研究で骨格筋細胞にDHEA-Sが直接作用し、遺伝子転写産物の変化を介して細胞機能に影響を与える可能性が示された。

また、DM遺伝子変異によりDHEA sulfotransferaseの転写が抑制され、その結果DM患者血中のDHEA-S濃度が低下する可能性が示唆された。すなわち、DM患者血中ではDHEA-S濃度が低く、それがDM遺伝子変異による可能性があり、DHEA-Sの投与(補充)によりDMの諸症状が軽減する可能性があるということで、DHEA / DHEA-S代謝がDM病態の本質に関わっている可能性が示唆されると思われた。DMに対するDHEA(-S)からのアプローチは、DMのみならず種々の老化関連病態の解明に寄与するものと考えられる。

#### E. 結論

本研究から、DHEA / DHEA-S代謝がDM病態に深く関わっており、DHEA-Sの投与により骨格筋をはじめとする臓器に直接作用する可能性が示唆される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) K. Tsuji, et al. Specific binding and effects of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) on skeletal muscle cells: possible implication for DHEA-S replacement therapy in patients with myotonic dystrophy. Life Sciences (in press), 1999
- 2) M. Sugino et al. A pilot study of dehydroepiandrosterone sulfate in myotonic dystrophy. Neurology. 51: 586-9, 1998
- 3) 古玉大介ほか、血管平滑筋に対するdehydroepiandrosterone sulfateの作用とその特異的結合部位の探索. ホルモンと臨床 ('98臨時増刊号ステロイドホルモン研究の進歩1998) 46:

129-133, 1998

2. 学会発表

1) 古玉大介ほか, DM protein kinase (DMPK)  
3'-非翻訳領域CTGリピート増幅と遺伝子転写. 日  
本内分泌学会, 1998

2) 古玉大介ほか, 骨格筋細胞において  
dehydroepiandrosterone (-sulfate)によって発現誘導さ  
れる遺伝子の探索. 日本内分泌学会ステロイドホ  
ルモン分科会, 1998

3) 辻久仁子ほか, 日本神経学会総会, 1998

## DHEAによるインスリン感受性改善効果の分子機構 —OLETF ラットでの検討—

安田圭吾 (岐阜大学第3内科 教授)

石塚達夫、三浦 淳、石澤正剛、加納克徳、梶田和男、諏訪哲也、宗 友厚、森田浩之

Dehydroepiandrosterone (DHEA)の OLETF ラットへの投与は、傍寧丸脂肪重量を低下させ、血清レプチンの濃度を低下させた。一方、DHEA 投与は脂肪細胞でのインスリンによる糖輸送活性を改善したが、ヒラメ筋でのインスリンによる糖輸送活性は改善しなかった。又、DHEA は脂肪細胞での PKC $\epsilon$ ,  $\zeta$  のインスリンによる細胞膜へのトランスロケーションや phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase)の活性化を更に、促進した。以上より、DHEA は脂肪細胞に作用し、増殖を抑制させ、インスリン作用機構を改善することが示された。

キーワード : DHEA, OLETF ラット、インスリン作用、PKC, PI3-kinase

### A. 研究目的

1982年に Coleman らが糖尿病モデル動物 db/db mice に dehydroepiandrosterone (DHEA)を投与し、糖尿病の進展抑制効果を報告(1)しているがその作用機構は明らかではない。最近のインスリン情報伝達機構は複雑である。インスリン受容体に結合したインスリンは $\beta$ サブユニットに内在するチロシンキナーゼを活性化する。これにより、インスリン受容体基質 (IRS-1)のチロシン磷酸化が促進され、磷酸化モチーフを認識して SH 2 ドメインを有する phosphatidylinositol (PI) 3-kinase を結合活性化する(2-3)。この PI 3-kinase により産生された PIP<sub>3</sub> をはじめとする polyphosphoinositides が protein kinase C (PKC) となどの atypical PKC や PKB (Akt) を活性化することが報告されている。これら

はグルコーストランスポーター (GLUT4) の膜へのトランスロケーションを促進する可能性が報告されている。一方、受容体に関連した G タンパクを介して活性化されたホスホリパーゼ C により産生された diacylglycerol (DG) は PKC を活性化し、やはり、GLUT4 のトランスロケーションを介して、glucose uptake を促進する(4)。また、細胞膜の機能性磷脂質である phosphatidylcholine も phospholipase D の活性化により DG を産生し、PKC を活性化する。また、IRS-1-PI3-kinase の経路と DG—PKC の経路はお互いに関連していることが推察されている。即ち、PKC を活性化するホルボールエステルにより、PI3-kinase が活性化されることや PI 3-kinase の活性化により産生された PIP<sub>3</sub> が PKC $\zeta$  を活性化する(5)

ことが報告されている。今回、我々は、糖尿病モデル動物である Goto-Kakizaki (GK) ラット、Otsuka Long Evans Tokushima Fatty Starain (OLETF) ラットに DHEA 投与時のインスリン作用およびインスリン情報伝達機構への効果を検討した。

## B. 研究方式

GK ラット (6, 7) (体重 150–200 g)、16 週の OLETF ラット (体重 353–437 g) に 0.4% DHEA を 2 週間投与し、傍辜丸組織の脂肪組織より脂肪細胞を単離し、遊離脂肪細胞を作成した(8)。10 nM インスリン、1  $\mu$ M tetradecanoyl 13-phorbol ester (TPA) で 30 分刺激後 [ $^3$ H]2-DOG uptake を既報の如く測定した(9)。PKC の活性化は PKC の分子種の各抗体を使用してウェスタンブロット法で測定した(10–11)。PI 3-kinase の酵素活性、及び p85 subunit の免疫活性はホスホチロシン抗体により免疫沈降後の活性を測定した(12–13)。

## C. 研究結果

### 1. DHEA によるインスリン作用機構への効果

DHEA による糖輸送活性促進作用が PI 3-kinase-PKC とシグナルを介しているのか、DG-PKC シグナルを介しているのかを明らかにする為に、PI 3-kinase 阻害剤 100 nM wortmannin, PKC $\beta$  を抑制する 10 nM LY379196, そして PKC  $\alpha$  も強く抑制する 100  $\mu$ M RO32-0432 を使用して DHEA による glucose uptake に対する効果を検討した。wortmannin, RO で強い抑制効果がみられ、PI 3-kinase -PKC とのシグナルを介している可能性が示唆された。

### 2. DHEA 経口投与による体重、血糖、インスリン濃度への効果

生後 8 週の GK ラットまた、生後 16 週の

OLETF ラットに 0.4% の DHEA を 2 週間投与した。GK ラット、OLETF ラットに DHEA を投与しても、体重には有為な変化はなかったが、OLETF ラットでは有意な血糖の低下が見られた。一方、DHEA の濃度は 0.4% DHEA 経口 2 週間投与で十分血中濃度の上昇がみられた。また、インスリンの濃度は LETO, OLETF 共に DHEA 投与により低下傾向はあるが、有意な差は見られなかった。しかし、血糖、インスリンの比で見ると、明らかなインスリン感受性の改善が見られた。

### 3. 糖尿病モデル動物 GK ラット、OLETF ラットに DHEA 経口投与した時の脂肪細胞、ヒラメ筋 (soleus muscle) での glucose uptake

インスリン、TPA による glucose uptake は in vivo DHEA 投与群で明らかに高く、コントロールのウイスター、LETO ラットの glucose uptake まで回復していることが示された。しかし、DHEA による glucose uptake には有意な差はみられなかった。一方、OLETF ラットに DHEA を経口投与した時のラット soleus muscle でのインスリン、TPA による glucose uptake にたいする効果を検討した。糖尿病モデル動物 OLETF ではインスリン、TPA による glucose uptake は低下しているが、2 週間の DHEA 投与によっては、脂肪細胞と異なり、改善がみられなかった。

### 4. DHEA 経口投与による傍辜丸脂肪重量、血清 leptin 濃度にたいする影響

DHEA 経口投与前後で傍辜丸脂肪重量を測定した。2 週間の経口投与により、OLETF 傍辜丸脂肪重量は有意に減少した。更に、DHEA 投与により、明らかに血清 leptin 濃度の低下がみられた。以上より、腹くう内の脂肪重量も低下している可能性が推察された。

## 5. DHEA 経口投与によるインスリンシグナルに対する効果。

ホスホチロシン抗体で免疫沈降後に PI を基質にして PI 3-P の生成を薄層クロマトグラフィで分離し、PI3-kinase の活性とした。DHEA 投与により、PI3-kinase の活性上昇がみられた。また、PKC $\epsilon$  にたいする DHEA の効果を脂肪細胞を使用して検討した。OLETF ラットでは PKC $\epsilon$  の発現がわるいが、DHEA の *in vivo* 投与により PKC $\epsilon$  の発現が control の LETO ラットと同様にまでみられ、インスリン刺激による PKC $\epsilon$  の活性化が DHEA 投与によりみられた。同様に PKC $\zeta$  の活性化を検討すると、OLETF ラット脂肪細胞での PKC $\zeta$  の発現はコントロールの LETO ラットに比して低下していたが、DHEA の *in vivo* 投与により、LETO,OLETF 共に PKC $\zeta$  の発現が増強し、また、インスリンによる PKC $\zeta$  の細胞膜へのトランスロケーションも増強された。

## D. 考案

今回の検討では DHEA は単独で DG-PKC や PI3-kinase の経路を介し、glucose uptake を促進した。今日まで、インスリンによる糖輸送能促進作用には IRS-1-PI 3-kinase の経路 (2)や DG-PKC の経路 (10) が関与することが報告されている。最近、PI3-kinase の阻害剤である wortmannin がラット脂肪細胞でインスリンによる糖輸送能促進作用を阻害することが報告され(3)、PI 3-kinase がインスリン作用では中心的な役割を果たしていることが推察される。一方、インスリンやホルボールエステルは細胞膜の phospholipase C や D の活性化により、膜での DG の増加反応を促進することも報告されている(14)。しかしながら、インスリン作用に正に働くのか負に働くのかは議論の多いところである。更に、DG-insensitive な atypical PKC とも又

PI 3-kinase の下流に存在することも明らかにされている(15)。この PI 3-kinase-PKC $\zeta$  の経路もインスリンによる糖輸送能促進作用に重要な働きを担っている可能性が示されている(5)。これらの報告を基にして、我々は DHEA が脂肪細胞で phospholipase C や D により DG を増加させることを見いだした。このことは、DHEA が特異的な受容体に結合する可能性を示唆している。また、DHEA は PKC $\beta$  や  $\zeta$  に結合し、phospholipase D を活性化する可能性をも示唆している。前者については、すでに、Tリンパ球で cytosol や核に特異的な結合部位が見出されている(16-17)。また、DHEA による DG 産生のタイムコースは後者の可能性を示している。即ち、最初に DHEA は PKC に結合し、conventional PKCs や PKC $\zeta$  を活性化すると考えられた。更に、DG-sensitive な PKC は既に報告されている様に phospholipase D を活性化する(18-19)ことが考えられる。一方、DHEA は PI3-kinase をチロシン燻酸化タンパクを介して活性化する。これは PKC  $\zeta$  をはじめとする下流の蛋白質燻酸化酵素を介して糖輸送能を促進する。DHEA の *in vivo* 投与は糖尿病モデル動物である GK ラットの脂肪細胞でインスリンによる糖輸送能促進作用を改善したが、この時の DHEA の血中濃度は  $10^{-8}$ ~ $10^{-7}$ M であり、*in vitro* の成績と一致した。さらに、DHEA は糖尿病モデル動物の OLETF ラットの血糖、インスリン抵抗性を改善した。これは傍辜丸脂肪重量の減少や、血清 leptin 濃度を低下させた。この効果は 2 週間の投与で既に見られたが、筋肉でのインスリンによる糖輸送能は改善されなかった。これは、恐らく投与期間の問題があるにしても、DHEA は脂肪細胞の増殖機転にたいして、負に働き、インスリン抵抗性を改善している可能性が示唆される。

## E. 結論

糖尿病モデル動物 GK, OLETF ラットを使用して 0.4%DHEA を 2 週間投与し、以下の結果をえた。

1. DHEA は単独で glucose uptake を促進した。2. DHEA 前処置はインスリンによる glucose uptake をさらに促進した。3. 糖尿病モデル動物 GK, OLETF ラット脂肪細胞では、DHEA の経口投与により、PI3K, PKC $\zeta$  を活性化し、インスリンによる glucose uptake をさらに促進した。4. DHEA は主として脂肪細胞に作用しインスリン作用を増強すると同時に脂肪細胞の増殖を抑制する可能性が示唆された。

## F. 引用文献

- 1) D.L. Coleman et al: Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetic mice. *Diabetes* 31:830-833, 1982
- 2) N.B. Ruderman et al: Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1411-1415, 1990
- 3) T. Okada T et al: Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 269:3568-3573, 1994
- 4) R.V. Farese et al: Insulin rapidly increases diacylglycerol by activating de novo phosphatidic acid synthesis. *Science* 236:596-589, 1990
- 5) M.L. Standaert et al: Protein kinase C- $\zeta$  as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J. Biol. Chem.* 272: 30075-30082, 1997
- 6) Y Goto et al: Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc. Jpn. Acad.* 51:80-85, 1975
- 7) Y. Goto and M. Kakizaki. The spontaneous-diabetic rat: a model of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Proc. Jpn. Acad.* 57: 381-384, 1981
- 8) K. Kawano et al: Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima fatty strain. *Diabetes* 41: 1422-1428, 1992
- 9) T. Ishizuka et al: Alterations in insulin-induced postreceptor signaling in adipocytes of the Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat strain. *J. Endocrinol.* 156: 1-13, 1998
- 10) T. Ishizuka et al: Effect of insulin on diacylglycerol-protein kinase C signaling in rat diaphragm and soleus muscles and relationship to glucose transport. *Diabetes* 39: 181-190, 1990
- 11) T. Ishizuka et al: Insulin stimulates the translocation of protein kinase C in rat adipocytes. *FEBS Lett* 257:337-340, 1989
- 12) H. Hayashi H et al: Insulin treatment stimulates the tyrosine phosphorylation of the  $\alpha$  type 85-kDa subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in vivo. *J. Biol. Chem.* 267:22575-22580, 1992
- 13) K. Kanai F et al: Insulin-stimulated GLUT4 translocation is relevant to the phosphorylation of IRS-1 and the activity of PI3-kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195:762-768, 1993

- 14) M.L. Standaert et al: 1996 The phosphatidylinositol 3-kinase inhibits insulin-induced activation of phosphatidylcholine hydrolysis and associated protein kinase C translocation in rat adipocytes. *Biochem. J.* 313:1039-1046, 1996
- 15) H. Nakanishi et al: Activation of the  $\zeta$  isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 268: 13-16, 1993.
- 16) A.W. Meikle et al: The presence of a dehydroepiandrosterone-specific receptor binding complex in mutant T cells. *J. steroid. Biochem. Mol. Biol.* 42: 293-304, 1992
- 17) T. Okabe et al: Up-regulation of high-affinity dehydroepiandrosterone binding activity by dehydroepiandrosterone in activated human T lymphocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 2993-2996, 1995
- 18) C. Huang and M.C. Cabot : Phorbol diesters stimulate the accumulation of phosphatidate, phosphatidylethanol, and diacylglycerol in three cell types - Evidence for the indirect formation of phosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 265:14858-14863, 1990
- 19) M.L. Standaert et al: Insulin stimulates phospholipase D-dependent phosphatidylcholine hydrolysis, Rho translocation, de novo phospholipid synthesis, and diacylglycerol/protein kinase C signaling in L6 myotubes. *Endocrinology* 137:3014-3020, 1996

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) H. Daidoh, H. Morita, J. Hanafusa, T. Mune, H. Murase, M. Sato, T. Shibata, T. Suwa, T. Ishizuka, K. Yasuda: In vitro and in vivo effects of AVP and V1a receptor antagonist on Cushing's syndrome due to ACTH-independent bilateral macronodular adrenocortical hyperplasia. *Clin Endocrinology* Vol. 48, 403-409, 1998
- 2) H. Wada, T. Ishizuka, S. Itaya, K. Yamada, K. Kajita, M. Kimura, A. Miura, T. Shibata, Y. Kanoh, M. Ishizawa, K. Yasuda: Inhibitory effect of glyburide on thrombin-induced platelet aggregation and phosphoinositide metabolism in normal human platelets. *Platelets* 10, 45-51, 1999
- 3) T. Ishizuka, S. Itaya, M. Kimura, K. Kajita, A. Miura, M. Ishizawa, K. Kanoh, N. Muto, K. Yasuda: Differential effect of antidiabetic thiazolidinediones, troglitazone and pioglitazone on human platelet aggregation mechanism. *Diabetes* Vol. 47, 1494-1500, 1998
- 4) A. Miura, T. Ishizuka, S. Itaya, M. Ishizawa, Y. Kanoh, M. Kimura, K. Kajita, K. Yasuda: Glucose- and phorbol ester-induced insulin secretion in human insulinoma cells - Association with protein kinase C activation- *Biochemistry and Molecular Biology International* Vol.46, 739-745, 1998



- 5) T. Ishizuka, K. Kajita, A. Miura, M. Ishizawa, Y. Kanoh, S. Itaya, M. Kimura, N. Muto, T. Mune, H. Monita, K. Yasuda: Dehydroepiandrosterone improves glucose uptake via activations of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase. *American J Physiology: Endocrinology and Metabolism* 276, E196-E204, 1999
- 6) A. Miura, T. Ishizuka, Y. Kanoh, M. Ishizawa, S. Itaya, M. Kimura, K. Kajita, K. Yasuda: Effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) on insulin signal transduction in rat adipocytes: Relation to PKC $\beta$  and  $\zeta$  translocation. *Biochimica et Biophysica Acta* in press, 1999
2. 学会発表
  - 1) T. Ishizuka, S. Itaya, H. Wada, M. Ishizawa, M. Kimura, K. Kajita, N. Muto, Y. Kanoh, A. Miura, K. Yamada, K. Yasuda: Effects of troglitazone, pioglitazone and vitamin E on human platelet aggregation mechanism in vitro. 58th American Diabetes Association, Chicago, 6/13-16, 1998
  - 2) M. Kimura, T. Ishizuka, S. Itaya, K. Kajita, M. Ishizawa, Y. Kanoh, A. Miura, K. Yamada, K. Yasuda: Platelet protein kinase C (PKC) isoform activity in NIDDM patients complicated with retinopathy and nephropathy. 58th American Diabetes Association, Chicago, 6/13-16, 1998
  - 3) M. Ishizawa, K. Kajita, Y. Kanoh, A. Miura, S. Itaya, M. Kimura, N. Muto, T. Ishizuka: Effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on glucose uptake mechanism in rat adipocytes. 58th American Diabetes Association, Chicago, 6/13-16, 1998
  - 4) Y. Kanoh, T. Ishizuka, M. Ishizawa, K. Kajita, A. Miura, S. Itaya, M. Kimura, N. Muto, T. Suzuki, K. Yasuda: Effect of genistein and H7 on insulin-induced in rat adipocytes. 80th Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans, 6/24-27, 1998
  - 5) A. Miura, T. Ishizuka, Y. Kanoh, M. Ishizawa, S. Itaya, M. Kimura, T. Suzuki, N. Muto, Y. Huang, K. Kajita, K. Yasuda: Inhibition of insulin signal transduction by TNF- $\alpha$  and ceramide. 80th Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans, 6/24-27, 1998

## 糖尿病における血清 DHEA、DHEA-sulfate とインスリン感受性について

分担研究者 高柳涼一、久富昭孝

### A.研究目的

ヒト血液中に高濃度に存在し、加齢に関連した特有の経年変化を示す副腎ステロイドでありながら DHEA、DHEAS はその生理作用に不明の点が多い<sup>1)</sup>。インスリン感受性改善作用もヒトでは齧歯類ほど明らかではない<sup>2)~4)</sup>。既に、欧米での DHEA 経口投与による臨床成績が知られているが<sup>5)~11)</sup>、DHEAS の経静脈投与投与が可能なのは本邦のみである。そこで、血中 DHEA、DHEAS 濃度が著減する中高年糖尿病症例において DHEAS 経静脈投与による補充療法がインスリン感受性に及ぼす影響を検討し、また、耐糖能異常例におけるインスリン感受性と血中 DHEA、DHEAS とその他の因子の関連を多変量解析にて検討した。

### B.研究方法

①DHEAS 補充療法：糖尿病男性 18 例 (平均年齢 63.3 歳、最高 80 歳、最低 43 歳、BMI 21.6 kg/m<sup>2</sup>、HbA1c 7.4 %)にて 200mg DHEAS 経静脈投与連続 7 日間の前後でインスリン感受性(Si)、ブドウ糖感受性(Glucose Effectiveness、Sg)、血糖消失定数(Kg)、血清 IGF-1、血清 IGFBP-3 を測定し、DHEAS 補充療法がインスリン感受性、血清 IGF-1 値に及ぼす効果を検討した。②多変量解析：インスリン感受性を評価した耐糖能異常男性例 42 例 (糖尿病 33

例、IGT 9 例、平均年齢 55.4 歳、BMI 23.2 kg/m<sup>2</sup>、HbA1c 7.0 %)にて血清 DHEA、血清 DHEAS とインスリン感受性指数 S<sub>1</sub> の関連を単相関、偏相関、ステップワイズ多重回帰分析により解析した。

インスリン感受性は経静脈ブドウ糖負荷試験の頻回採血による静脈血漿ブドウ糖値と血清インスリン値の Minimal Model 解析 (R.N.Bergman ら)により評価した<sup>12)</sup>。すなわち、早朝空腹時、前採血後にブドウ糖静注 (300 mg/kg 体重)し、静注開始より 2、3、4、5、6、8、10、12、14、16、19、22、24、25、27、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180 分後に採血し血糖値、血清インスリン値を測定した。なお、ブドウ糖静注後 20 分に速効性インスリン(0.05 単位/kg 体重)を Bolus 注入した。得られた血糖値、血清インスリン値から Minimal Model 解析ソフト (MINMOD) を用いて、インスリン感受性(Si)、ブドウ糖感受性 (Glucose Effectiveness、Sg)を計算した。

血糖値は Glucose oxidase 法に基づく自動分析機 (Glucoroder-FR)により、血清インスリン値はインスリン・ダイナパックキットを用いた自動分析機 (IMx アナライザー)により測定した。

血清 DHEA 値、血清 DHEAS 値はそれぞれの固相法 RIA キット(日本 DPC 社)に

で測定した。血清 IGF - I はソマトメジン CII キット(カイロン社)にて、血清 IGF BP - 3 は IGF BP - 3 コスミックキット(Bioclone 社)にて測定した。

対応のある二群間の平均値の有意差検定には Wilcoxon 検定を用いた。

### C. 研究結果

①DHEAS 補充療法 : DHEAS 投与により血清 DHEA は前値 5.9nM から投与後 9.4nM ( $P < 0.005$ ) に、血清 DHEAS は前値 2.4 $\mu$ M から投与後 9.3  $\mu$ M ( $P < 0.001$ ) に増加し、ともに、ほぼ 20~30 歳代のレベルに回復した。静注に伴う被験者の自覚症状に変化は認められなかった。BMI は前値 21.6 %から 21.4 %に減少( $P < 0.01$ )し、空腹時血清インスリン基礎値に変化は認められなかったが空腹時血糖値は前値 7.2 mM から投与後 6.6 mM に減少( $P < 0.05$ )し、インスリン感受性の改善を示唆する所見であった。事実、インスリン感受性指数は投与前  $1.72 \text{ min}^{-1} \times \mu \text{ U/ml}^{-1}$  から投与後  $2.28 \text{ min}^{-1} \times \mu \text{ U/ml}^{-1}$  に改善した( $P < 0.05$ )。同様に、Kg は投与前  $0.0074 \text{ min}^{-1}$  から投与後  $0.0094 \text{ min}^{-1}$  に、Sg は投与前  $0.011 \text{ min}^{-1}$  から投与後  $0.013 \text{ min}^{-1}$  にも有意の改善( $P < 0.05$ )が見られた。また、DHEAS 投与により血清 IGF BP - 3 値は変化なく、血中 IGF - I の上昇(投与前 144ng/ml、投与後 157ng/ml、 $P < 0.05$ )が観察され、DHEAS の効果の一部は IGF - I が関与している可能性が示唆された。②多変量解析 : インスリン感受性指数 Si を従属変数とした場合、単相関分析で Si は BMI( $r = -0.337$ 、 $p = 0.028$ )、Insulin( $r = -0.537$ 、 $p = 0.0002$ )、Leptin( $r = -0.493$ 、 $p = 0.0008$ )、

Cortisol( $r = -0.318$ 、 $p = 0.040$ )、中性脂肪( $r = -0.33$ 、 $p = 0.0349$ )と有意の相関を示したが、DHEA または DHEAS との相関は有意ではなかった。偏相関分析では血清インスリン値を補正すると DHEA と DHEAS は Si と有意の正の相関を示し Cortisol は有意の負の相関を示した。しかしながら、年齢を補正すると DHEA、DHEAS、Cortisol と Si の同様の相関は認められなくなった。また、Si を従属変数としたステップワイズ多重回帰分析では Insulin、Cortisol、DHEA の 3 個の有意の独立変数で決定定数 0.456 のモデルが得られたが、同じモデルにさらに年齢を独立変数として加えるとさらに高い決定定数( $R^2 = 0.496$ )のモデルが得られたにもかかわらず DHEA と Cortisol は有意の独立変数として選ばれなかった。したがって、偏相関分析と多重回帰分析の結果より DHEA は Si の有意の独立した決定因子ではなく、年齢の影響が強いことが示された。

### D. 考察

齧歯類の肥満または糖尿病モデル動物を用いた DHEA の抗肥満作用、抗糖尿病作用に関する先駆的な研究<sup>2)~4)</sup>に続いて、1986 年に中高年男性の心臓血管死と血漿 DHEAS 値が逆相関する事実が報告され<sup>13)</sup>、1988 から 1995 にかけてヒトで DHEA 投与がインスリン感受性に及ぼす効果が検討された<sup>5)~11)</sup>。Nestler らは、健常男性を対象とした高用量 DHEA の 28 日間投与において体脂肪率の減少と LDL 低下作用を認めたが、クランプ法にて評価したインスリン感受性は不変であった<sup>5)</sup>。同じグループは肥満男性に対象を変更して同様の DHEA

の高用量補充を行ったが、体脂肪、血中脂質、インスリン感受性のいずれも不変であった<sup>6)</sup>。特に、インスリン感受性は今回の検討で用いたのと同じ評価法である Bergman のミニマルモデル解析を用いており、DHEA 経口投与では高用量であってもインスリン感受性指数、Glucose Effectiveness Sg は改善しないことが確かめられた。その後の DHEA を用いたヒトでの検討でも、Morales らの中高年を対象とした DHEA 低用量補充療法では、IGF - I の増加は認められたものの体脂肪、血中脂質、インスリン感受性には効果が見られなかった<sup>7)</sup>。このように、現在までの検討ではヒトでの DHEA 経口投与によるインスリン感受性改善作用は認められていない。

今回の検討では、今までに検討されておらず、また、世界的にも本邦においてのみ臨床応用可能な DHEAS 製剤の経静脈投与のインスリン感受性に及ぼす効果を中高年糖尿病症例を対象に検討したところ、従来の DHEA を用いた検討と異なり、明らかなインスリン感受性の改善が認められた。DHEAS と DHEA は、Steroid sulfate sulfatase による DHEAS の水解と、Steroid sulfotransferase による DHEA の硫酸抱合化により相互変換可能であり、事実、今回の検討でも DHEAS 補充により、血中 DHEA、DHEAS 値はともに若年成人のレベルに増加した。したがって、今回のインスリン感受性改善効果は DHEAS そのものの効果のみならず、DHEAS 水解の結果増加した DHEA から生成される他の性ステロイド、とくに、Estrogen の効果の可能性も考えられる。また、従来の DHEA 補

充の成績と同様に、IGF - I の増加も認められており、インスリン感受性改善効果の少なくとも一部は、IGF - I の増加によるものと考ええる。

また、DHEAS 経静脈投与の結果、Sg の改善が認められたことが注目される。Sg はインスリンに依存しないブドウ糖取り込みの指標であるが<sup>12)</sup>、今までには、運動<sup>14)</sup>、腸管由来のインスリン分泌刺激ホルモン GLP - 1 投与<sup>15)</sup>、亜鉛投与<sup>16)</sup>以外に Sg を増加させる因子は知られていない。Sg の低下は、インスリン感受性の低下とともに、糖尿病発症要因の一つと考えられており、Sg の増加は糖尿病発症予防に有効である可能性がある。Sg は、その 54% が筋肉でのインスリン非依存性糖取り込みの寄与、また、残る 46% はブドウ糖による肝臓からのブドウ糖放出抑制の寄与と考えられており<sup>17)</sup>、今回の検討では、DHEAS 補充の効果がいずれの分画に対する効果であるかは不明である。

一般に、成長ホルモン—インスリン様成長ホルモン系(GH—IGF - I Axis)も加齢とともに機能低下することが知られており<sup>18)</sup>、高齢者への DHEAS 補充により二次的に IGF I の増加が起こることは加齢現象に拮抗して筋力維持などの効果をもたらすが、糖尿病とくに既に血管合併症を併発した症例への応用には注意を要すると考えられる。急速な血糖コントロール後の糖尿病性網膜症の急性増悪は IGF - I の急増の結果と考えられており<sup>19)</sup>、長期間高血糖を放置した症例に DHEAS 補充療法を行うことは、網膜症に対する安全性が確認されるまでは避けるべきであると考ええる。