

one, AIS patients show various phenotypic abnormalities of male sexual development. AIS is subdivided into three phenotypes: complete androgen insensitivity syndrome (CAIS), partial androgen insensitivity syndrome (PAIS), and mild androgen insensitivity syndrome. AR mutations that severely impair the function of the AR cause CAIS. The main phenotypic characteristics of individuals with CAIS are female external genitalia with a short, blind-ending vagina, absent Müllerian duct, and absence of pubic and axillary hair. The gender identity is that of a normal female, but testes are commonly located in either the abdomen or the inguinal area and the uterus is absent. Laboratory findings show the 46, XY karyotype, normal or increased synthesis of testosterone by the testes, and a normal or increased level of LH. PAIS patients also show female-like external genitalia, except for clitoromegaly and/or posterior labial fusion (3, 9). Although mutations responsible for AIS are spread throughout the AR gene, there are hot spots, especially at exon 5, which encodes part of the LBD (Androgen Receptor Gene Mutation Database: www.mcgill.ca/androgendb).

We previously reported two unrelated AIS patients (one CAIS and one PAIS) carrying amino acid substitutions in the first zinc finger motif of the AR-DBD (11). In the CAIS patient (subject 1), cysteine residue 579, which coordinates a zinc ion, was substituted with phenylalanine, and the mutant AR showed almost no ligand-induced transcriptional activation. On the other hand, the AR-F582Y mutant found in the PAIS patient (subject 2) showed much less transactivation than the wild-type AR. Here, to visualize any dynamic changes of the intracellular localizations of these mutant ARs, the wild-type and mutant ARs were fused with green fluorescent protein (GFP) and their intracellular movements were analyzed using a laser confocal microscope. After treatment with the ligand, the wild-type AR was translocated from the cytoplasm into the nucleus in which it formed fine subnuclear foci. In contrast, the AR-DBD mutants initially formed large cytoplasmic dots, many of which were located close to mitochondria after the addition of dihydrotestosterone (DHT), and a proportion of the proteins subsequently moved into the nucleus to become located in subnuclear bodies. The subnuclear foci of the mutant ARs were characterized by their larger size, much smaller number, and lower mobility, compared with the wild-type AR. These results indicate that the pathogenesis of AIS in these two patients may be caused by the mislocation and lower mobility of their mutant ARs.

Subjects and Methods

Subjects

Subjects 1 and 2 were diagnosed with CAIS and PAIS, respectively, and had missense mutations of Cys⁵⁷⁹ to Phe and Phe⁵⁸² to Tyr, respectively. The clinical history and data of the AIS patients characterized in the present study were previously reported (11).

Cells

COS-7 monkey kidney cells were obtained from the Riken Cell Bank (Tokyo, Japan) and maintained in DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing antibiotics and 10% fetal bovine serum (FBS; Cansera International Inc., Etobicoke, Canada).

Plasmids

The firefly luciferase reporter plasmids, pGL3-MMTV (5) and pGL3-PSA (12), and the expression vectors for AR (pCMV-AR) were prepared as previously described (13, 14). The plasmid vectors pAR-GFP (5) and pAR-CFP (6) for expression of the AR-GFP and AR-CFP fusion proteins were constructed as described previously. Expression plasmids of the mutant ARs for mammalian cells, designated pCMV-AR-C579F (from subject 1) and pCMV-AR-F582Y (from subject 2), were constructed as previously reported (11). To construct a GFP fusion protein of the mutant AR for subject 1, a *KpnI-ScaI* fragment of pCMV-AR-C579F, which contained the mutated site, was replaced with that of pAR-GFP to generate pAR-C579F-GFP. Similarly, for subject 2, a *HindIII-ScaI* fragment of pAR-GFP was replaced with that of pCMV-AR-F582Y to construct pAR-F582Y-GFP. The validity of the structure of each construct was confirmed by DNA sequencing using an ABI PRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Immunoblotting

COS-7 cells were seeded in 100-mm plates and incubated for 24 h in 5% CO₂ at 37 C. Five micrograms of plasmid DNA carrying the wild-type or a mutant AR was transfected into the cells using 20 μ l Superfect transfection reagent (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Twenty-four hours after the transfection, the cells were washed twice with PBS and then 400 μ l of Nonidet P-40 lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, and 1% Nonidet P-40] was added to each dish, followed by rocking for 30 min at 4 C. Lysates were collected by centrifugation and the protein concentrations were measured using a BCA protein assay kit (Pierce, Rockford IL). Next, 40 μ g of each lysate in 1 \times SDS-PAGE sample buffer [2% sodium dodecyl sulfate, 100 mM dithiothreitol, 60 mM Tris-HCl (pH 6.8), and 0.01% bromophenol blue] was loaded onto a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (10% separating gel) and electrophoresed at 20 mA for 4 h. Proteins were transferred onto nitrocellulose membrane (Hybond P; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) using a Trans-Blot SD Semi-Dry transfer cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) at 250 V for 1 h at 25 C. After blocking the membrane in 1 \times Block-Ace (Dainippon Pharmaceutical Co., Osaka, Japan), an anti-AR polyclonal antibody (sc-816; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) was reacted with the membrane in 0.1 \times Block-Ace for 1 h at 25 C. After a brief wash with Tris-buffered saline-Tween 20 (10 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, and 0.05% Tween 20), horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit Ig antibodies (Amersham Biosciences) were added in 0.1 \times Block-Ace as the secondary antibody, and the membrane was incubated for 45 min at 25 C with gentle shaking. After washing with Tris-buffered saline-Tween 20, the membrane was reacted with Western blotting detection reagents (Amersham Biosciences) for 1 min in a dark room. The labeled protein bands were visualized and analyzed using a VersaDoc imaging system 5000 (Bio-Rad).

Functional reporter assays

COS-7 cells (1 \times 10⁵ cells/well) were seeded in 12-well plates at 20 h before transfection. Cells were cotransfected with 0.5 μ g/well of pGL3-MMTV as a reporter plasmid, 2 ng/well of pRL-CMV (Promega Corp., Madison, WI) as an internal control, and 0.1 μ g/well of a wild-type or mutant AR expression plasmid with 1.7 μ l/well of Superfect. In all transfection experiments, the total amount of plasmid DNA was fixed by adding empty vector to the transfection mixture. At 3 h after transfection, 0.5 ml of DMEM containing 10% charcoal-treated FBS was added with or without steroid hormone (10⁻⁸ M DHT). After incubation for 24 h, the cells were rinsed with PBS and lysed in the lysis buffer contained in a luciferase assay kit (Promega). The luciferase activity was assayed using the dual-luciferase assay system (Promega) and a Lumat LB 9507 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Each value was determined as the average of three independent experiments. Data were presented as the means \pm SD. One-way ANOVA followed by Scheffé's test was used for multigroup comparisons. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Confocal laser-scanning microscopy

For living cell microscopy, COS-7 cells (2 \times 10⁵ cells/well) were seeded in 35-mm glass-bottom dishes (Asahi Techno Glass Corp., Tokyo,

Japan) and transfected with 0.5 μ g of plasmid DNA carrying the wild-type or a mutant AR fused with GFP or yellow fluorescent protein (YFP) using 5 μ l/well Superfect. The cells were maintained in DMEM supplemented with 10% charcoal-treated FBS for 20 h, and then various steroid hormones were added to the medium. The cells were observed with an Axiovert 200M inverted microscope equipped with an LSM510META scan head (Carl Zeiss, Jena, Germany) using a \times 100, 1.4 numerical aperture oil immersion objective. Images were collected at a 12-bit depth resolution of intensities over 1024 \times 1024 pixels. For excitation of GFP and YFP, a 488-nm argon laser was used and a series of images was obtained. The GFP and YFP signals were separated using the emission fingerprinting technique established by Carl Zeiss. Separation of the individual emission signals was based on recording a spectral signature and applying a linear unmixing algorithm using the reference spectra of each fluorescent protein (15).

To construct three-dimensional (3D) images, a series of 30–50 two-dimensional tomographic images were collected for each cell using the confocal microscope. These images were exported as TIF files and the TRI graphic program (Ratoc System Engineering, Tokyo, Japan) was used to reconstruct 3D images (6). Both the spatial distribution and calculation of the fluorescent proteins as distinct volumes were made possible by removing scattering background fluorescence and lens spherical aberrations and then separating each particle (6). The numbers of subnuclear foci determined for the wild-type and mutant ARs were representative of at least 20 cells.

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis

Cells were transfected with the wild-type AR and a mutant AR and incubated for 24 h at 37 C. After a further 5-h incubation with DHT, FRAP analysis was performed. After collection of the initial image using a Carl Zeiss LSM510META microscope, a selected area of a fixed size in the nucleus was photobleached by setting the laser wavelength to 488 nm and using the maximum power for 50 iterations. After the bleaching, images within the bleached region were taken every second at a resolution of 512 \times 512 pixels to follow the recovery of the fluorescence intensity. The intensity of the fluorescence was calculated using the LSM510 software and the half-recovery time ($t_{1/2}$) was determined as the time when the fluorescence intensity reached half the maximal recovery using the Microsoft Excel software. Each $t_{1/2}$ was the average of six to 10 FRAP experiments.

Organelle detection

COS-7 cells were transfected with pAR-C579F-GFP. Twenty-four hours after the transfection, the cells were treated with DHT and then LysoTracker Red or MitoTracker Orange CMTMRos (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) was added in the medium at a final concentration of 100 nM to visualize the lysosomes or mitochondria, respectively. The cells were incubated for 30 min at 37 C and then rinsed with PBS. Images were collected using the fluorescence microscope.

Immunoelectron microscopy

Twenty-four hours before transfection, COS-7 cells were seeded in a 60-mm dish. The cells were transfected with 2 μ g of pAR-C579F-GFP using 3 μ l of Superfect. After incubation for 20 h, the cells were treated with 10⁻⁸ M DHT for 1 h. After a brief wash with PBS, the cells were fixed in 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 30 min at 25 C. The fixed cells were scraped off the dish, centrifuged at 5000 \times g for 10 min at 4 C and resuspended in 0.1 M phosphate buffer. After dehydration in a graded series of ethanol, the cell pellet was embedded in LR White resin and ultrathin sections were cut (16). After blocking in 0.1 M phosphate buffer containing 3% BSA, the sections were incubated with rabbit polyclonal antibodies against GFP (BD Biosciences Clontech, Mountain View, CA) at 1:1000 dilution in 0.1 M phosphate buffer at 4 C overnight, followed by incubation with colloidal gold (\varnothing = 15 nm)-conjugated goat antirabbit IgG (Amersham Biosciences) at 1:100 dilution. After washing with distilled water, the sections were stained with 2% uranyl acetate and lead citrate, and observed with a Hitachi H-7000 electron microscope (Hitachinaka, Japan).

Results

Previously we found two different amino acid substitutions in the DBD of ARs derived from AIS patients (11). One

mutation from a CAIS patient (subject 1) occurred at Cys579 which coordinates a zinc ion in the first zinc finger motif of the AR (Fig. 1A). This residue also forms a P-box that is important for the recognition of an androgen-responsive element in target genes. The other mutation from a PAIS patient (subject 2) was found at Phe582 next to the P-box (Fig. 1A). To compare the functions of these two mutant ARs with the wild-type AR, recombinant AR proteins were expressed in COS-7 cells. Immunoblot analysis showed that the expression levels of the wild-type and mutant ARs in transfected cells were almost the same (Fig. 1B). To examine AR-mediated transcriptional activation, luciferase assays were performed using the MMTV promoter containing several hormone-responsive elements (17). For the wild-type AR,

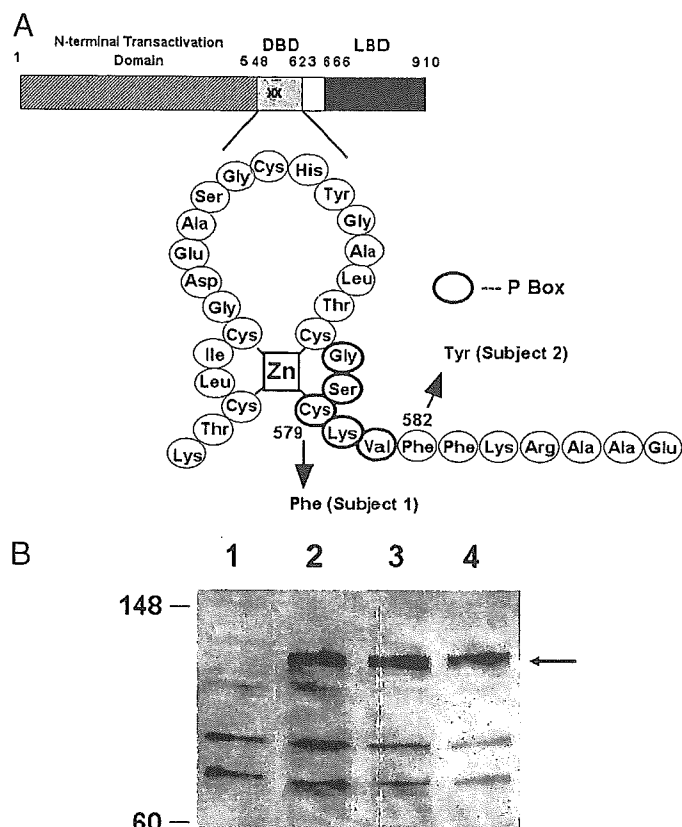


FIG. 1. The amino acid substitutions in the two AIS patients are located in the DBD of the AR. A, Schematic representation of the AR and the sites of the amino acid substitutions detected in the AIS patients. The upper scheme shows the domain structure of the AR: the N-terminal domain, the DBD, and the C-terminal LBD. Two different amino acid substitutions (x) were identified in the DBD of the ARs from these two AIS patients. The first zinc finger motif of the AR-DBD is magnified in the lower scheme. The five amino acids circled in bold indicate the P-box. The arrows indicate the amino acid substitutions in the two AIS patients. In subject 1, the cysteine at position 579 involved in the P-box is substituted by phenylalanine (C579F). In subject 2, phenylalanine 582 is changed for tyrosine (F582Y). B, Immunoblot analysis of wild-type and mutant ARs in COS-7 cells. Cells were transfected with a wild-type or mutant AR expression vector using Superfect. Twenty-four hours after the transfection, the cells were lysed and subjected to immunoblotting analysis as described in *Subjects and Methods*. Anti-AR antibodies were used for detection. The arrow shows the AR bands. Lane 1, Vector only; lane 2, wild-type AR; lane 3, AR-F582Y; lane 4, AR-C579F. The numbers on the left of the gel show the positions of protein size markers.

remarkable transcriptional activation was observed after addition of the ligand DHT. On the other hand, AR-F582Y showed less than 10% of the transcriptional activation of the wild-type AR, whereas AR-C579F showed no ligand-dependent transactivation at all (Fig. 2).

To visualize the subcellular localizations of the wild-type and mutant ARs, GFP-fusion proteins were generated and observed under a confocal laser-scanning microscope. As we previously reported, the wild-type AR was diffusely localized in the cytoplasm in the absence of the ligand (Fig. 3A) (5). Upon treatment with the ligand, the wild-type AR was almost completely translocated from the cytoplasm into the nucleus in which it formed subnuclear fine foci (Fig. 3D). The AR-DBD mutants were also diffusely present in the cytoplasm before addition of the ligand (Fig. 3, B and C). However, in contrast to the wild-type AR, the two mutant ARs formed cytoplasmic dots after the addition of DHT (Fig. 3, E and F). Time-course experiments revealed that most of the fluorescent signals for the wild-type AR were observed in the nucleus within 30 min after the addition of DHT (Fig. 4B), whereas cells expressing the AR-C579F mutant showed two patterns (Fig. 4, E–H or I–L). Approximately 80% of cells formed the cytoplasmic dots and a limited number of nuclear foci 30 min after the addition of DHT (Fig. 4F), and the nuclear dots became clear at 3 h after the ligand addition (Fig. 4H). In the other type of AR-C579F-expressing cells (20%), cytoplasmic dots were not so striking (Fig. 4J), but delayed nuclear translocation with dot formation of mutant AR was observed (Fig. 4L). In both types of the mutant-expressing cells, a smaller number of larger-sized intranuclear dots for

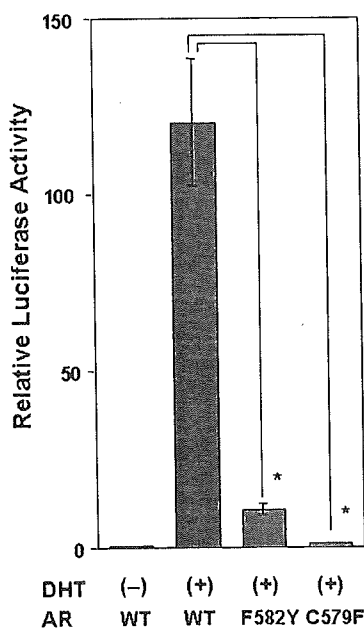


FIG. 2. Effects of the two different amino acid substitutions in the AR-DBD on transcriptional activation. COS-7 cells were transiently transfected with plasmid DNA expressing the wild-type (WT) or a mutant (C579F or F582Y) AR, pGL3-MMTV as a reporter plasmid, and pRL-CMV as an internal control. After treatment with or without 10^{-8} M DHT for 24 h, the luciferase activity was measured. The bars show the luciferase activities of the transfected cells relative to the value of the wild-type AR without DHT. The means \pm SD of three independent experiments are shown. *, $P < 0.05$.

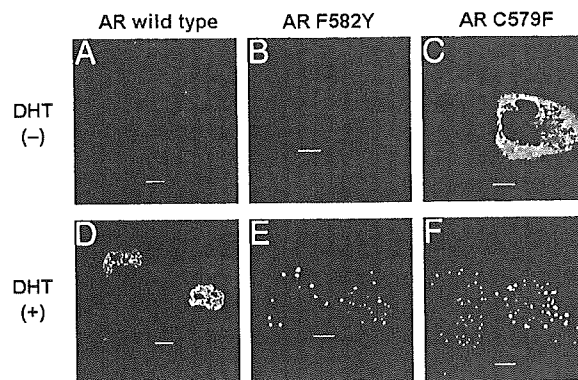


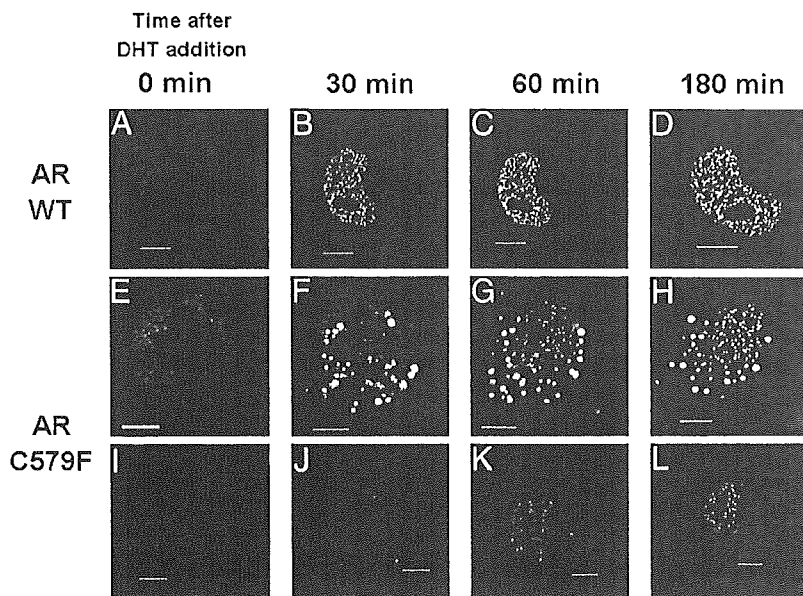
FIG. 3. Ligand-dependent translocation of the wild-type and mutant ARs. COS-7 cells were transfected with 0.5 μ g of each plasmid DNA expressing GFP-fused wild-type AR (A and D), AR-F582Y (B and E), or AR-C579F (C and F). Fluorescent signals were observed at 24 h after the transfection under a laser confocal microscope (A–C). Subsequently 10^{-8} M DHT was added and incubated at 37 C for 1 h and the ligand-bound receptor proteins were observed (D–F). Scale bar, 10 μ m.

AR-C579F were observed, compared with those for the wild-type AR (Fig. 4, D, H, and L). Even after a 3-h treatment with the ligand, a significant amount of the mutant AR still remained in the cytoplasm (Fig. 4, H and L), whereas almost all the signals for the wild-type AR were detected in the nucleus (Fig. 4D). These data indicate that the nuclear translocation and subnuclear localization are impaired in AR-DBD mutants.

To quantitatively analyze the subnuclear foci, 3D images were constructed from the tomographic images collected using the confocal microscope. As shown in Fig. 5, both the C579F and F582Y AR mutants had a much lower number of foci in the nucleus than the wild-type AR. The average number of nuclear foci for the wild-type AR was 300 ± 8 , whereas the numbers for F582Y and C579F were 106 ± 18 and 127 ± 23 , respectively.

To examine whether the mutant ARs inhibit the nuclear translocation of the wild-type AR, we cotransfected the wild-type AR fused to GFP (AR-WT-GFP) and AR-C579F-CMV (without GFP) and observed the cells under the confocal microscope. Cotransfection of AR-WT-GFP with AR-C579F-CMV showed cytoplasmic dots in addition to fine nuclear foci after treatment with DHT (Fig. 6Ab). Opposite experiments using AR-C579F-GFP and AR-WT-CMV led to similar results, revealing that both nuclear and cytoplasmic dots appeared after incubation with DHT (Fig. 6Ad). To confirm the colocalization of the wild-type and mutant ARs, AR-WT-CFP and AR-C579F-GFP were coexpressed, and each fluorescent signal was collected under the laser confocal microscope. As shown in Fig. 6B, wild-type and mutant ARs were colocalized in both the nuclear and cytoplasmic dots in the presence of 10 nM DHT (Fig. 6B, d–f). The magnitude of the transcriptional activation in the cells transfected with both AR-WT and AR-C579F was less than half that induced by AR-WT (Fig. 6C). In addition to this experiment using 10 nM DHT, we measured the transcriptional activation of the wild-type AR in the presence of 5 nM DHT. The reporter luciferase activity of the wild-type at 5 nM DHT was significantly higher than that by combination of the wild-type and

FIG. 4. Time-lapse translocation of wild-type (WT) and mutant ARs after the addition of DHT. COS-7 cells expressing wild-type AR (A–D) or the AR-C579F mutant (E–H and I–L) were treated with 10^{-8} M DHT. Images were collected using a laser confocal microscope before the DHT treatment (A, E, and I) and at 30 (B, F, and J), 60 (C, G, and K), and 180 min (D, H, and L) after the treatment. Scale bar, 10 μ m.



AR-C579F at 10 nM. Even in a high dose of DHT (100 nM), which can fill all the wild-type LBD, coexpression of AR-C579F inhibited the transcriptional activation mediated by the wild-type AR (Fig. 6C). These results indicated that simple stealing of ligand by AR-C579F is not able to explain the suppression effect of AR-C579F and strongly suggested that AR-C579F is able to form heterodimers with AR-WT in the cells and inhibit the translocation of AR-WT, thereby reducing the transactivation.

As shown in Figs. 4 and 5, the numbers of nuclear foci for the mutant ARs were much lower than that for the wild-type AR. To evaluate whether there are any differences in dynamics between the nuclear foci of the wild-type and mutant ARs, the mobilities of the wild-type and mutant ARs in the nucleus were measured quantitatively by FRAP analysis. After a short period of photobleaching at the maximal power of the laser, continuous images were taken at 1-sec intervals. As shown in Fig. 7A, the recovery of the fluorescence intensity for AR-C579F foci was slower than that for AR-WT. The fluorescence recovery was evaluated by plotting the intensity of the bleached area against time (Fig. 7B). Compared with the wild-type AR, the slope of the fluorescence recovery of AR-C579F was relatively gentle. The $t_{1/2}$ for AR-C579F was 10.5 ± 1.6 sec ($n = 12$), which was significantly slower than

that for the wild-type AR [8.0 ± 1.1 sec ($n = 10$)]. In another experiment, AR-F582Y also showed reduced mobility, compared with the wild type [$t_{1/2} = 8.4 \pm 1.1$ sec ($n = 6$)], and the $t_{1/2}$ for AR-F582Y [9.9 ± 1.2 sec ($n = 6$)] was almost the same as that for AR-C579F [10.2 ± 1.1 sec ($n = 6$)]. These results indicate that the DBD amino acid substitution in the mutant AR caused decreased mobility of the AR in the nucleus.

As shown in Fig. 3, AR-DBD mutants showed ligand-dependent formation of large cytoplasmic dots. We investigated the localizations of the mutant ARs in the cytoplasm after the ligand treatment. The mutant ARs were not localized in the lysosomes, as shown by an experiment using Lyso-Tracker, a specific marker for lysosomes (data not shown). Next, the mitochondrial localization was examined using Mito-Tracker, a highly specific probe for mitochondria. Many, but not all, of the cytoplasmic dots of the mutant ARs were located close to mitochondria (Fig. 8A). Because signals for the mutant ARs were not observed in the mitochondria, the mutant ARs do not seem to cross the mitochondrial membrane. To further examine the relationship between the mutant ARs and the mitochondria, immunoelectron microscopy was performed using an anti-GFP antibody. Many gold labels were present around the mitochondria, but none were found inside the mitochondria (Fig. 8Ba). Some clusters were present in the cytoplasm, and these would correspond to the cytoplasmic dots observed by the laser-scanning microscopy (Fig. 8Bb).

Discussion

Using fluorescent proteins and laser-scanning microscopy, we have demonstrated that mutations in the DBD of ARs from AIS patients impair the ligand-dependent nuclear translocation, subnuclear foci formation, and intranuclear mobility of the receptor. In our previous studies, we clearly showed that intranuclear foci formation of AR-GFP was parallel to ligand-dependent transcriptional activation of AR (5, 6). Many studies using GFP-fused steroid hormone receptors have been reported, and linkage of the foci formation of

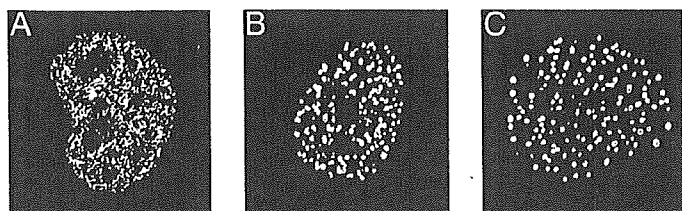


FIG. 5. Three-dimensional image analyses of the intranuclear foci of the wild-type and mutant ARs. COS-7 cells were transfected with 0.5 μ g of pAR-GFP (A), pAR-F582Y-GFP (B), or pAR-C579F-GFP (C). Twenty-four hours after the transfection, the cells were treated with DHT and two-dimensional tomographic images collected using the confocal microscope were used to reconstruct 3D images as described in *Subjects and Methods*.

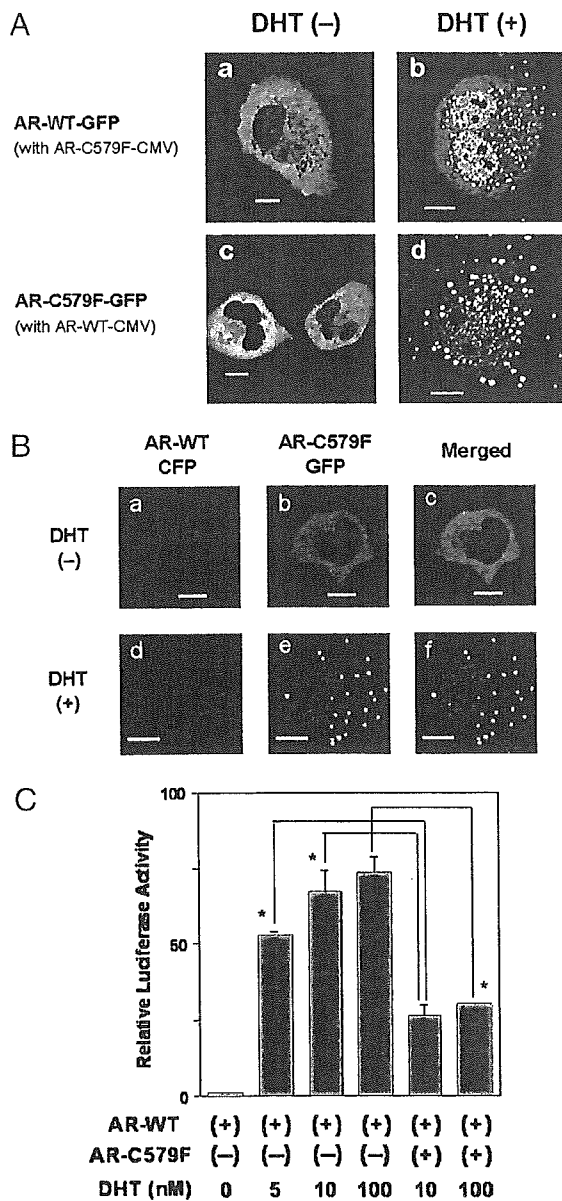


FIG. 6. Coexpression of wild-type and mutant ARs. **A**, **a** and **b**, Equal amounts of AR-WT-GFP and AR-C579F-CMV (without GFP) were co-transfected into COS-7 cells and images were collected before (**a**) and after (**b**) the addition of DHT. **c** and **d**, COS-7 cells expressing both AR-C579F-GFP and AR-CMV (without GFP) were observed before (**c**) and after (**d**) treatment with DHT. If AR WT and mutant proteins have equal chances to form a dimer and formed heterodimer show WT and mutant pattern of signals at an equal rate, the ratio of the intact AR signal *vs.* the abnormal one is expected to be 7:4 (**b**) and 4:7 (**d**). Signal patterns of WT and mutant in **b** and **d** were consistent with the expected ratios. *Scale bar*, 10 μ m. **B**, Colocalization of wild-type and mutant ARs. AR-WT-CFP and AR-C579F-GFP were coexpressed in COS-7 cells in the absence or presence of DHT. Fluorescent signals were collected using the confocal microscope in the absence (**a–c**) or presence (**d–f**) of 10 nM DHT. Signals for AR-WT-CFP (**d**, red) and AR-C579F-GFP (**e**, green) were colocalized (**f**, merged signals). *Scale bar*, 10 μ m. **C**, AR-C579F inhibited the transactivation mediated by the wild-type AR. COS-7 cells were cotransfected with pGL3-PSA reporter, pRL-CMV, and pAR-CMV with or without pAR-C579F-CMV. After the treatment with or without various concentrations of DHT, the cells were subjected to the luciferase assay. The bars show the luciferase activity relative to that of the wild-type AR without DHT. The means \pm SD of three independent experiments are shown. *, $P < 0.05$.

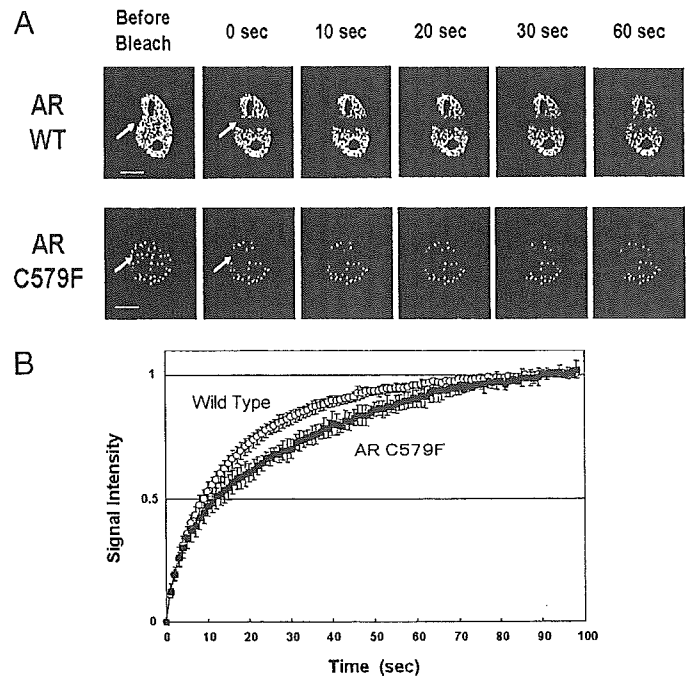


FIG. 7. Comparison of the intranuclear mobilities of the wild-type (WT) and mutant ARs by FRAP analysis. **A**, FRAP analysis of the intranuclear foci of the wild-type and mutant ARs. COS-7 cells were transfected with a wild-type or mutant AR expression vector. Twenty-four hours after the transfection, the cells were treated with DHT. Five hours after the addition of DHT, a region of interest in the nucleus was photobleached, and images were then taken at the indicated time points using a laser confocal microscope. *Scale bar*, 10 μ m. **B**, Quantification of the fluorescence recovery in the FRAP analysis. The relative fluorescence intensities in the bleached areas of the wild-type and mutant AR foci were plotted. *Open circles*, intensity of the wild-type AR; *closed squares*, intensity of AR-C579F. The means \pm SD of 10 cells are shown.

steroid hormone receptors with their transactivation function has been widely accepted (18–20).

There is a significant bias in the distribution of mutations of the AR gene in AIS patients, although the mutations are spread throughout the whole gene (9). Although exon 1 of the AR gene encodes more than half of the AR protein, including the transcription activation domain of the amino terminus, the number of mutations found in this exon is only about 10% of the total number of mutations, and most of the exon 1 mutations are nonsense or frameshift mutations. The mutation hot spots in AIS patients are part of the LBD constituting the pocket for androgen binding. In the DBD, 32 different mutations have been reported and 15 of these were detected in the first zinc finger motif. Most of the mutations in the DBD or LBD are single-base substitutions (3, 9). Some AIS patients do not carry any AR mutations. In such cases, there must be some abnormality in the signal transduction between the AR and the basic transcription machinery, and an impediment in a cofactor interacting with the N-terminal transcription activation domain of the AR has been suggested (14).

The amino acid substitution in the CAIS patient (subject 1) occurred at the cysteine residue contained in the first zinc finger motif of the AR. This AR-C579F mutant would not be able to coordinate the zinc ion, resulting in complete loss of the ligand-dependent DNA-binding ability. In the PAIS patient,

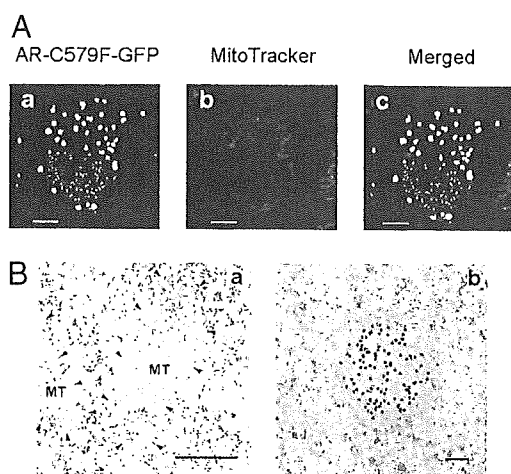


FIG. 8. Mitochondrial localization of cytoplasmic AR-C579F. **A**, COS-7 cells were transfected with 0.5 μ g of AR-C579F-GFP. Twenty-four hours after the transfection, the cells were treated with 10^{-8} M DHT. After a 1-h incubation with DHT, 200 nM MitoTracker-Orange was added to the medium, and the cells were incubated for 30 min. After washing with PBS, the cells were observed under a laser confocal microscope. *Green signals*, AR-C579F-GFP; *red signals*, mitochondria. *Scale bar*, 10 μ m. **B**, Immunoelectron microscopy of the AR-C579F mutant. After treatment with DHT, COS-7 cells expressing AR-C579F-GFP were fixed, embedded, and incubated with an anti-GFP antibody at 4 C overnight, followed by incubation with colloidal gold-conjugated goat antirabbit IgG. Sections were stained and observed with an electron microscope as described in *Subjects and Methods*. **a**, Low resolution (*bar*, 1 μ m); **b**, high resolution (*bar*, 0.1 μ m). MT, Mitochondria. The *arrowheads* show the edges of the mitochondria.

the amino acid substitution (F582Y) occurred next to the P-box and may cause a conformational change of the zinc finger motif. The impaired DNA-binding of these mutant ARs was confirmed by gel mobility shift assays, as we previously reported (11). Before the present imaging analysis, it was anticipated that these mutants would be able to enter the nucleus after ligand treatment but be unable to form foci like the wild-type AR due to the loss of the DNA-binding capacity. However, these mutant ARs initially formed cytoplasmic dots instead of the nuclear foci and nuclear dots subsequently appeared. Because there were no differences among the localizations of the wild-type and mutant ARs in the absence of the ligand, the conformations of the ligand-bound mutant ARs are considered to differ from that of the wild-type AR.

In the present study, ligand-induced formation of cytoplasmic dots of the mutant ARs was observed close to the mitochondria. However, the mutant AR signals were not detected inside the mitochondria by immunoelectron microscopy. Similar findings of an association between cytoplasmic protein aggregates and mitochondria have been observed for other mutant proteins, including the polyQ AR mutants (21–24). The mechanism for such aggregation close to mitochondria has been speculated to be that the ubiquitin-proteasome system tries to degrade a large amount of aggregated proteins and therefore requires an increased amount of ATP around the protein inclusions. The mechanism of localization close to mitochondria for the polyQ AR mutant might also occur for our AR-DBD mutants, although pathophysiology is quite different between our AIS and

polyQ diseases. However, further study is necessary for elucidation of abnormal dot formation of our AR mutants.

The C579F mutation in the AR-DBD showed lower mobility than the wild-type AR. FRAP analysis has recently been used to examine the intranuclear dynamics of nuclear receptors (25–27). In the presence of ligands, the mobility of the nuclear receptors was reduced. It has been reported that ligand-induced intranuclear foci formation of steroid hormone receptors is associated with the nuclear matrix in which coactivators are also recruited (28). This nuclear matrix binding induced by ligand treatment is suggested to cause the decreased mobility of the receptors. A glucocorticoid receptor (GR) mutant carrying a deletion of the N-terminal region showed a much lower mobility (26). This mutant was deprived of all the putative phosphorylation sites of the GR. In ATP-deprived cells, GRs are dephosphorylated and tightly bound to the nuclear matrix (29, 30). Therefore, it has been speculated that appropriate reduction of the mobility of steroid hormone receptors, namely nuclear matrix binding with coactivators (6, 31–33), is an essential process for the normal transactivation functions of steroid hormone receptors. Lower or much increased mobility of ligand-bound steroid hormone receptors, as shown for the present AR C579F mutant, may indicate an impaired transactivation process.

The present reanalysis of our mutant ARs unexpectedly revealed two kinds of functional defects, *i.e.* lack of DNA-binding ability reported previously (11) and impairment of translocation from the cytoplasm to the nucleus. The finding that mutations in DNA-binding domain of AR impair nuclear translocation is novel and suggests the existence of an important intramolecular domain for nuclear translocation except for the hinge region. This finding is expected to contribute to the study of translocation mechanism. A mutant AR, K632A/K633A, which has mutations in the hinge region, has an intact DNA-binding domain, but its nuclear translocation is impaired (34). The pattern of the translocation impairment of this AR-K632A/K633A mutant was quite similar to that of our AR mutants, namely the AR-K632A/K633A mutant formed cytoplasmic aggregates (large dots) and its transactivation function examined by a reporter luciferase assay was markedly low (34, 35).

These reported results clearly indicate that impairment of nuclear translocation such as cytoplasmic dot formation can be responsible for the suppression of transactivation function of AR. As is well known, for transactivation function of AR, AR first must be translocated into the nucleus, secondly form a complex with coactivators, and then bind to target genes. Therefore, it would be reasonable that impairment of nuclear translocation in AR-C579F and AR-F582Y is largely responsible for AIS. Abnormal dot formation and decreased mobility of liganded AR-DBD mutants in the nucleus might be due to lack of DNA-binding ability, and thus, a defect in DNA-binding also would be responsible for AIS to some extent. Recent studies have revealed dynamic movement of nuclear receptors during a transactivation process within the nucleus (25, 36, 37). Liganded steroid hormone receptors including AR are transferred to subnuclear compartments (foci) and form a complex with coactivators. These receptor-coactivator complexes are mobilized to the target genes. The

steroid hormone receptors and coactivators show multiphasic on and off for binding to promoter elements of genes. The receptor-coactivator complexes also undergo a rapid exchange between target genes and the compartments. The present AR-DBD mutants are not able to access target genes. This may disturb the dynamic movement (mobility), resulting in prolonged stay at nuclear matrix and abnormal dot formation. This speculation may be supported by the reported observation that the AR-K632A/K633A mutant did not show abnormal intranuclear dot formation, although the authors did not touch on it.

In conclusion, the AR-DBD mutations, C579F and F582Y, found in our AIS patients showed abnormalities in ligand-dependent nuclear translocation, nuclear matrix targeting, and intranuclear mobility of the receptor, which may cause AIS in these patients.

Acknowledgments

We thank Mitoshi Toki for his excellent technical assistance in performing the three-dimensional imaging analyses.

Received January 27, 2005. Accepted August 15, 2005.

Address all correspondence and requests for reprints to: Ryoichi Takayanagi, Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan. E-mail: takayana@geriat.med.kyushu-u.ac.jp.

This work was supported in part by grants-in-aid for Scientific Research and Exploratory Research and a grant for the 21st Century Center of Excellence Program (Kyushu University) from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology.

References

- Gobinet J, Poujol N, Sultan Ch 2002 Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol* 198:15–24
- Aranda A, Pascual A 2001 Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81:1269–1304
- Brinkmann AO 2001 Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol* 179:105–109
- Roy AK, Tyagi RK, Song CS, Lavrovsky Y, Ahn SC, Oh TS, Chatterjee B 2001 Androgen receptor: structural domains and functional dynamics after ligand-receptor interaction. *Ann NY Acad Sci* 949:44–57
- Tomura A, Goto K, Morinaga H, Nomura M, Okabe T, Yanase T, Takayanagi R, Nawata H 2001 The subnuclear three-dimensional image analysis of androgen receptor fused to green fluorescence protein. *J Biol Chem* 276:28395–28401
- Saitoh M, Takayanagi R, Goto K, Fukamizu A, Tomura A, Yanase T, Nawata H 2002 The presence of both the amino- and carboxyl-terminal domains in the AR is essential for the completion of a transcriptionally active form with coactivators and intranuclear compartmentalization common to the steroid hormone receptors: a three-dimensional imaging study. *Mol Endocrinol* 16:694–706
- Gelmann EP 2002 Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* 20:3001–3015
- Balducci R, Ghirri P, Brown TR, Bradford S, Boldrini A, Boscherini B, Sciarra F, Toscano V 1996 A clinician looks at androgen resistance. *Steroids* 61:205–211
- Gottlieb B, Pinsky L, Beitel LK, Trifiro M 1999 Androgen insensitivity. *Am J Med Genet* 89:210–217
- McPhaul MJ 2002 Androgen receptor mutations and androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol* 198:61–67
- Imasaki K, Okabe T, Murakami H, Tanaka Y, Haji M, Takayanagi R, Nawata H 1996 Androgen insensitivity syndrome due to new mutations in the DNA-binding domain of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 120:15–24
- Ishizuka M, Kawate H, Takayanagi R, Ohshima H, Tao RH, Hagiwara H 2005 A zinc finger protein TZF is a novel corepressor of androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 331:1025–1031
- Nakao R, Haji M, Yanase T, Ogo A, Takayanagi R, Katsube T, Fukumaki Y, Nawata H 1992 A single amino acid substitution (Met786–Val) in the steroid-binding domain of human androgen receptor leads to complete androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 74:1152–1157
- Adachi M, Takayanagi R, Tomura A, Imasaki K, Kato S, Goto K, Yanase T, Ikuyama S, Nawata H 2000 Androgen-insensitivity syndrome as a possible coactivator disease. *N Engl J Med* 343:856–862
- Kawate H, Wu Y, Ohnaka K, Nawata H, Takayanagi R 2005 Tob proteins suppress steroid hormone receptor-mediated transcriptional activation. *Mol Cell Endocrinol* 230:77–86
- Luby-Phelps K, Ning G, Fogerty J, Besharse JC 2003 Visualization of identified GFP-expressing cells by light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 51:271–274
- Ham J, Thomson A, Needham M, Webb P, Parker M 1988 Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumour virus. *Nucleic Acids Res* 16:5263–5276
- Kawata M 2001 Subcellular steroid/nuclear receptor dynamics. *Arch Histol Cytol* 64:353–368
- DeFranco DB 2002 Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment. *Mol Endocrinol* 16:1449–1455
- Hager GL, Nagaich AK, Johnson TA, Walker DA, John S 2004 Dynamics of nuclear receptor movement and transcription. *Biochim Biophys Acta* 1677:46–51
- Stenoien DL, Cummings CJ, Adams HP, Mancini MG, Patel K, DeMartino GN, Marcelli M, Weigel NL, Mancini MA 1999 Polyglutamine-expanded androgen receptors from aggregates that sequester heat shock proteins, proteasome components and SRC-1, and are suppressed by the HDJ-2 chaperone. *Hum Mol Genet* 8:731–741
- Waelter S, Boeddrich A, Lurz R, Scherzinger E, Lueder G, Lehrach H, Wanker EE 2001 Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol Biol Cell* 12:1393–1407
- Milewski MI, Mickle JE, Forrest JK, Stanton BA, Cutting GR 2002 Aggregation of misfolded proteins can be a selective process dependent upon peptide composition. *J Biol Chem* 277:34462–34470
- Piccioni F, Pinton P, Simeoni S, Pozzi P, Fascio U, Vismara G, Martini L, Rizzuto R, Poletti A 2002 Androgen receptor with elongated polyglutamine tract forms aggregates that alter axonal trafficking and mitochondrial distribution in motoneuronal processes. *FASEB J* 16:1418–1420
- Stenoien DL, Patel K, Mancini MG, Dutertre M, Smith CL, O'Malley BW, Mancini MA 2001 FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor- α is ligand- and proteasome-dependent. *Nat Cell Biol* 3:15–23
- Schaaf MJ, Cidlowski JA 2003 Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity. *Mol Cell Biol* 23:1922–1934
- Maruvada P, Baumann CT, Hager GL, Yen PM 2003 Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J Biol Chem* 278:12425–12432
- Stenoien DL, Mancini MG, Patel K, Allegretto EA, Smith CL, Mancini MA 2000 Subnuclear trafficking of estrogen receptor- α and steroid receptor coactivator-1. *Mol Endocrinol* 14:518–534
- Hu LM, Bodwell J, Hu JM, Orti E, Munck A 1994 Glucocorticoid receptors in ATP-depleted cells. Dephosphorylation, loss of hormone binding, HSP90 dissociation, and ATP-dependent cycling. *J Biol Chem* 269:6571–6577
- Tang Y, DeFranco DB 1996 ATP-dependent release of glucocorticoid receptors from the nuclear matrix. *Mol Cell Biol* 16:1989–2001
- Georget V, Térouanne B, Lumbroso S, Nicolas J-C, Sultan C 1998 Trafficking of androgen receptor mutants fused to green fluorescent protein: a new investigation of partial androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3597–3603
- Nazareth LV, Stenoien DL, Bingman III WE, James AJ, Wu C, Zhang Y, Edwards DP, Mancini M, Marcelli M, Lamb DJ, Weigel NL 1999 A C619Y mutation in the human androgen receptor causes inactivation and mislocalization of the receptor with concomitant sequestration of SRC-1 (steroid receptor coactivator 1). *Mol Endocrinol* 13:2065–2075
- Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ 2002 Pure antiandrogens disrupt the recruitment of coactivator GRIP1 to colocalize with androgen receptor in nuclei. *FEBS Lett* 523:43–47
- Thomas M, Dadgar N, Aphale A, Harrell JM, Kunkel R, Pratt WB, Lieberman AP 2004 Androgen receptor acetylation site mutations cause trafficking defects, misfolding, and aggregation similar to expanded glutamine tracts. *J Biol Chem* 279:8389–8395
- Fu M, Wang C, Reutens AT, Wang J, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Ogrzyzko V, Avantiaggiati ML, Pestell RG 2000 p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *J Biol Chem* 275:20853–20860
- Métivier R, Penot G, Hübner MR, Reid G, Brand H, Koš M, Gannon F 2003 Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115:751–763
- McNally JG, Muller WG, Walker D, Wolford R, Hager GL 2000 The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science* 287:1262–1265

長寿とホルモン補充療法

柳瀬敏彦*



更年期から老年期にかけて低下するホルモンにはエストロゲン、テストステロン、DHEA、GHがあり、いずれもその低下は、加齢に伴い増加する生活習慣病の発症や進展との関連が示唆されている。現在、ホルモン補充療法（HRT）はエストロゲン補充療法が主に行われているが、近年の無作為比較対照試験における冠動脈硬化疾患の増加の成績から、投与方法や他の補充療法の検討も含めた見直しが行われている現状である。

一方、テストステロン、DHEA、GH 補充療法に関しては、いまだ小規模の臨床研究の段階ながら、種々、有益な効果が報告されつつある。今後、抗加齢や生活習慣病克服の観点から、これらの補充療法のさらなる臨床研究の進展が望まれる。

はじめに

女性では50歳前後を境に閉経を迎え、卵巣性エストロゲン欠乏に伴い急性の更年期症状の発現や以後の老年期の身体変化を認める。一方、男性では中高年以降、加齢に伴い男性ホルモンのテストステロンは漸減し、健康観の障害などの不定愁訴や性欲減退、インポテンツなどをしばしば認めることから、この時期や病態を menopause に対比させた言葉として andropause あるいは male climacteric (男性更年期) などの名称で呼んでいる。

しかしながら、男性のテストステロン値は比較的個人差が大きく、また女性の閉経に相当する明確な生物学的事象も欠くために、男性更年期という概念はいまだ明確に確立されたものとはいえない。最近では、andropause の代わりに PADAM (partial androgen deficiency in aging) という呼称も提唱され、一部では男子更年期の意味合いで使われている。

副腎性アンドロゲンの dehydroepiandroste-

rone (DHEA) や DHEA-sulfate (DHEA-S) も加齢とともに漸減し、老化指標としての有用性のみならず、その種々の有益な生理作用から老化制御の観点からも注目されている。ちなみに DHEA の加齢に伴う低下は adrenopause と呼ばれている。また、成長ホルモン (GH)/IGF-1 系も加齢とともに低下し、老化プロセスにおける身体的変化の一因として近年、特に注目されるようになり somatopause という概念が生み出されている。

本稿では、加齢に伴う menopause, PADAM, adrenopause, somatopause (図1)¹⁾のそれぞれの観点からのホルモン補充療法の現状と問題点について解説する。

エストロゲン補充療法

閉経 (menopause) に伴う卵巣性エストロゲンの低下は、心身両面において女性に種々の変化をもたらす。更年期という言葉で明確に位置付けられている。女性では、エストロゲンの低下に伴い、いわゆる hot flush に代表される種々の更年期症状の初来とともに、この時期を境に脂質代謝異常、

*YANASE Toshihiko 九州大学大学院医学研究院病態制御内科学 (第3内科) (〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1)

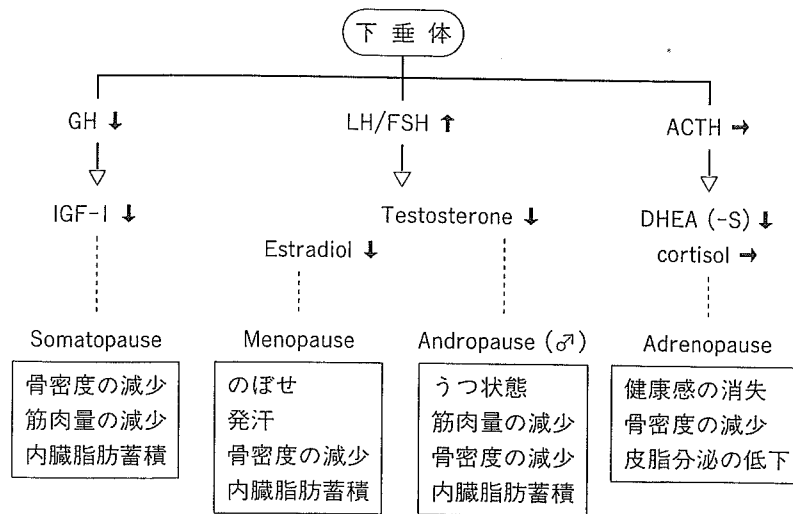


図1 更年期・老年期における主要な内分泌変動系

動脈硬化性疾患，骨粗鬆症などの罹病率が飛躍的に増加することから，更年期症状の緩和と同時に上記疾患予防を目的としたエストロゲンによるホルモン補充療法 (hormone replacement therapy; HRT) が考案され，欧米を中心に積極的に試みられてきた。多くの場合，エストロゲン製剤による乳癌と子宮内膜癌の発症予防を目的としてプロゲスチン製剤を併用するやり方が一般的である。

複数の観察研究において，エストロゲン補充療法単独またはプロゲスチンとの併用療法を行った閉経後女性は，無治療閉経後女性に比べて冠動脈疾患のリスクが約 30~50%低いとされてきた^{2,3)}。一方，冠動脈疾患を有する閉経後女性における冠動脈硬化の進行または心血管疾患のリスクに対する有用性を無作為比較対照試験で検討した Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS)⁴⁾および Women's Health Initiative (WHI)⁵⁾の成績が公表されたが，いずれの試験でも予想に反して HRT 群の女性で急性冠疾患のリスクが早期に上昇し，しかも副作用としての静脈血栓症や乳癌などの増加が報告された。

一方では，大腿頸部骨折減少と大腸癌の減少といった，従来から指摘されているエストロゲンの望ましい効果も認めている。この心血管イベントの増加という HRT の予期せぬ結果について，結合型エストロゲンといっしょに併用されたプロゲスチン製剤 (酢酸メドロキシプロゲステロン) に

原因を求める説がある。

一方，脂質代謝の面からは，エストロゲン製剤は血中の LDL を低下させ HDL を上昇させる点においては好ましいが，同時に増加する VLDL-TG に由来する極めて atherogenic な small dense LDL の増加が原因とする説もある。現在，これらの問題を克服するために，経皮的エストロゲン製剤の見直しや結合型エストロゲン製剤の投薬量の減量などが提唱されている。

また，選択的エストロゲン受容体モジュレーター (selective estrogen receptor modulator; SERM) であるラロキシフェンは，子宮内膜癌や乳癌のリスクを増加させることなく，骨粗鬆症に対する椎体骨折および乳癌のリスクを減少させることが報告されている。このため，冠動脈疾患に対しても結合型エストロゲン製剤に代わる HRT 治療薬としての期待が持たれている。4年間のラロキシフェン投与は心血管疾患の発症リスクに有意の影響を及ぼさなかったが，心血管疾患リスクの高い女性において，心血管疾患の発症リスクを有意に減少させることが報告されている⁶⁾。しかしながら，インスリン抵抗性に関しては増悪させるとの報告もあり⁷⁾，SERM の薬効の総合的評価は今後の検討課題である。なお，hot flush などのいわゆる更年期症状に対するラロキシフェンの緩和効果は，従来の抱合型エストロゲン製剤に比べて弱い。

今後の HRT に関しては，従来法の投薬レジメ

の見直しと同時に、更年期症状の程度や時期に応じて従来法と SERM を使い分ける方法が、現実的かつ標準的な治療法となる可能性がある。

テストステロン補充療法

血中フリーテストステロンは、20歳代から90歳代まで直線的な漸減を示すが、同一個体年齢の各個体において著明な個体差が存在する。最近、1143人を対象として日本人成人男子の血中総テストステロン値と遊離テストステロン値の基準値が設定されたが、加齢に伴う漸減は遊離テストステロンにおいて明らかである⁹⁾。

男子更年期の初期にはしばしば身体所見よりも、むしろうつ状態、燃え尽き感、疲労感、健康観の消失、集中力低下、不安、焦躁といった種々の精神症状が前面に認められ、テストステロン補充はこれらの精神症状やうつスコアを速やかに回復させるが、詳細な機序は不明である。一方、テストステロン補充は、インポテンツの改善には議論が分かれる。おそらく、インポテンツの成因としては、ストレス、動脈硬化、喫煙、パートナーとの精神的関係といった他の要因も重要と考えられる。

男性の加齢に伴う骨塩量の減少にも、テストステロンの低下の関与が示唆されている。また、テストステロンの低下は筋肉量の減少、筋力の低下、耐動性の低下をもたらすが、テストステロンの補充によりこれらは回復する。実際、高齢者男子における骨塩量の低下はテストステロン投与により増加する。

高齢男子へのテストステロン補充は体脂肪、レプチン、食事摂取量を減少させ、基礎代謝を亢進させる¹⁾。われわれが最近、解析したアンドロゲン受容体ノックアウトマウスにおいても著明な内臓脂肪の増加が認められており、このことを支持する⁹⁾。

また、動脈効果との関連では、テストステロンは主に血中 HDL の低下作用から一般には催動脈硬化性ホルモンのイメージで受け取られがちであるが、疫学的検討はこのイメージを必ずしも支持しない。すなわち、5~10年という長期の追跡によ

る健常男性の prospective study の結果によれば、血中テストステロンレベルと冠動脈疾患の発症には何らの関連性が認められていない。一方、コントロール群と冠動脈疾患群を断面的に比較検討した成績では、コントロール群に比べて冠動脈疾患を有する男性患者群において血中テストステロン値が有意に低下しているとの報告が多い。こういう断面的研究では、その血中テストステロン値の低下が動脈硬化の原因か結果かを帰結することは困難であるが、疫学的にはテストステロンは男性の冠動脈疾患と関連を認めないか、むしろ抗動脈硬化性に作用している可能性が示唆されている¹⁰⁾。

テストステロン補充療法に関しては、既存の経口アンドロゲン剤は吸収の不確実性と肝障害の問題があり、経口内服剤による補充療法は本邦ではほとんど行われていない現状である。本邦におけるテストステロン補充療法は、長時間作用型としてデポ製剤による筋肉注射が主流であり、具体的にはテストピロンデポ (250 mg) を2週もしくは1カ月に一度、筋肉注射で投与方法が一般的に行われている。血中テストステロン濃度の至適レベルは個人差があるといわれ、精神症状の改善の度合いなどに応じて、1回投与量や頻度は調節されてよい。

当然のことながら、中高年者ではアンドロゲン依存性癌である前立腺癌の存在には十分な注意を払うべきであり、投与開始前の PSA 測定によるスクリーニングや事前の泌尿器科的検査は必ず施行すべきであり、前立腺癌もしくはその可能性を否定できない患者ではテストステロン補充療法は禁忌である。また、投与中には睡眠時無呼吸症候群、多血症などの副作用にも留意する必要がある。

なお、テストステロンの脂肪酸エステル型の新しい経口薬が開発され、体内で有効濃度のテストステロンや DHT に転換し、男子性腺機能低下症や PADAM における性欲低下やインポテンツの改善に有用との報告が欧州を中心になされているが、本邦ではまだその使用は認可されていない。その他、欧州を中心に経皮的投与 (ゲル製剤による塗擦、パッチ製剤の貼付) による加療の試みがなされている。

DHEA 補充療法

同じ副腎ステロイドの血中コルチゾールが一生を通じて変動を認めないのに対し、血中 DHEA-S は 6~7 歳頃から増加し始め、12~13 歳頃にピークに達し、13~25 歳頃までその高値を持続し以後加齢とともに直線的に減少する。大変興味深いことに、米国ボルチモアの住人数百人を対象に調査した研究では、DHEA-S は長生きグループで明らかに高いという結果が得られており¹¹⁾、DHEA は単なる老化指標としてだけではなく、長生き指標としても有用であることが示された。

副腎アンドロゲンである DHEA には、肥満、糖尿病、発癌、動脈硬化、骨粗鬆症、記憶維持などに対してさまざまな有益作用があることが主に動物実験レベルで報告されている^{1,12)}。ヒトでは血中 DHEA-S 値が低いほど、肥満の指標値である BMI が高いこと、心血管障害の発生率が高いこと、また自験成績を含め、Alzheimer 病や脳血管性痴呆患者などの痴呆性疾患では血中 DHEA-S 値が同一年齢層の老年者に比べ低下していること、などが報告されている。

また、生理学的投与量ではないが、ヒトに 1600 mg/日の DHEA を 28 日間投与すると実際、体脂肪や血中 LDL 値が低下することも報告されている。最近、50~60 歳代の男女を対象にした二重盲検試験において、50 mg/日の DHEA 補充がわずかではあるが内臓脂肪を減少させ、インスリン感受性を増加させることが報告された¹³⁾。

DHEA はまた、間接的にわれわれの骨密度の維持に関与している可能性がある。骨密度は年齢とともに低下し、女性では閉経まではエストロゲンによってその骨量が維持されるが、われわれの検討では女性の骨量は閉経後には卵巣性エストロゲンの血中エストラジオール濃度よりもむしろ血中 DHEA-S との相関が強くなる¹⁴⁾。このことは、老齢期においては DHEA が末梢組織においてエストロゲンに転換することで、われわれの骨密度を維持する機構が働いていると想定される。われわれは実際にヒトの骨芽細胞においてアロマターゼと呼ばれるエストロゲン合成酵素活性が存在し、

DHEA から局所的にエストロゲン合成を行う、いわゆるイントラクライン機構が存在することを証明した¹⁵⁾。

これらの臨床データは、各種動物実験における報告を支持し、DHEA による生活習慣病予防、老化制御の可能性を示唆し大変興味深い。DHEA は前述のように、男女を問わず加齢とともに減少することから、事実老化予防を目的としてその補充療法の試みがなされている。老年者で低下した DHEA、DHEA-S 値を若年成人レベルまで回復させる補充量 (50 mg/日) の DHEA を連日経口投与することにより有意な sense of well being の改善が認められている¹⁶⁾。

しかしながら、この sense of well being の改善効果は、必ずしもすべての報告で一致しているわけではない。Labrie らは更年期女性に DHEA クリームを塗布し、1 年間血中 DHEA レベルを若年成年レベルに維持すると、大腿の骨塩量と骨形成マーカーの血中 osteocalcin が有意に上昇することを報告している¹⁷⁾。また、Baulieu らは 280 人の健常男女に DHEA 50 mg/日を内服させ、特に 70 歳以上の女性において骨塩量の増加、皮脂分泌や色素沈着の改善を認めている¹⁸⁾。

DHEA は神経疾患への治療応用の可能性が検討されつつある。myotonic dystrophy 患者への DHEA-S の経静脈投与が患者の神経症状の改善に極めて有用であったとの報告もあるが¹⁹⁾、小規模の Alzheimer 患者への DHEA 投薬試験においては、痴呆症状の改善は認められなかったとする報告もある²⁰⁾。

DHEA の作用機構について図 2 にまとめた。

GH 補充療法

GH の分泌は、視床下部からの GH 分泌促進因子の GRH (growth hormone releasing hormone) と分泌抑制因子のソマトスタチンによる二重支配を受けている。GH は標的組織の GH 受容体に結合した後、インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor ; IGF)-1 の産生、分泌を促し、IGF-1 を介して GH の作用が発現される。GH の 24 時間総分泌量は思春期に最高となり、そ

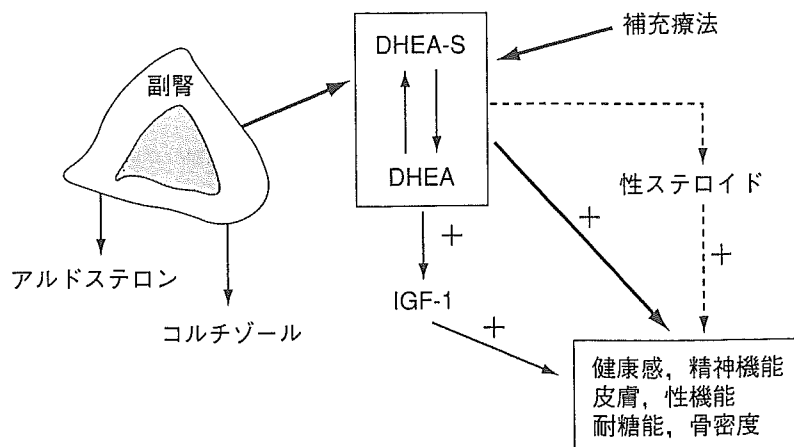


図2 DHEAの作用機構

DHEAはそれ自身で作用する機序、性ステロイドへの転換を介して作用する機序、ならびにIGF-1の増加作用があることから、IGF-1を介した作用機序が想定される。

の後は加齢とともに低下する。それに伴い、IGF-1も同様な加齢変動を示す。

加齢に伴うGH-IGF-1系の低下が骨密度の減少、筋肉量の減少、体幹、特に内臓脂肪の蓄積に関与している可能性が示唆されている。

内臓脂肪の蓄積はインスリン抵抗性、糖尿病、高脂血症などの病態と密接に関連し、冠動脈疾患の高い有病率につながる事が知られ(内臓脂肪症候群)、成人病の発症基盤として近年、特に重要視されている。GHの分泌低下は、脂肪分解の低下を引き起こし体脂肪の貯留を促進する。一方、体脂肪の増加はGH分泌量の減少、ならびにGRHに対するGHの反応性を低下させる。すなわち、GH分泌低下と脂肪蓄積には悪循環が存在する。

また、GHには筋肉の蛋白合成を促進し、筋線維を肥厚させる作用があり、加齢とともに認められる筋力や運動能力の低下の一部をGH分泌不全が説明する可能性がある。また、健常成人では骨塩量とIGF-1値には正の相関がみられ、かつ骨粗鬆症では血中IGF-1値の有意の低下が報告されている。したがって、老年期における骨量の減少や骨粗鬆症にも、GH-IGF-1系の低下が関与している可能性がある。

これら加齢に伴う変化は、成人GH分泌不全症にみられる臨床症状、すなわち体脂肪増加、骨量や筋肉量の減少、運動に対する耐用性の低下、細胞外液量の減少など、多くの類似点をもっている。

事実、成人GH分泌不全症患者にGH補充療法を行うと体脂肪の減少、筋肉や骨量、体液量の増加がみられ、さらに脂質代謝改善効果を通じて心血管障害による死亡リスクも減じることが報告された。

これらの成績に加え、健常高齢者におけるsomatopauseにおいても、GH補充療法を行うとIGF-1レベルを上昇させ、体脂肪の減少、lean body massの増加、またわずかながら骨密度が増加、などをもたらすとの報告がなされた^{1,2)}。しかしながらその一方で、成人GH分泌不全症患者への補充療法の成績と異なり、健常老人への補充療法ではGHによる筋力増強作用を認めなかったこと、GH補充により浮腫、関節痛、耐糖能障害などの副作用も比較的高頻度であったことなど、期待に反した側面も認められている。

健常高齢者におけるGH補充療法が、実際に高齢者のquality of lifeの改善につながるのか否かについては明確な結論は得られていない。一般的には、健常高齢者におけるGH分泌不全の程度はGH分泌不全症患者に匹敵するほど高度ではないため、その補充効果はGH分泌不全症患者で認められるほど顕著なものではないと考えられている¹⁾。

おわりに

現在, 保険診療の範囲内では, 女性の更年期障害に対する HRT は認められているが, PADAM, adrenopause, somatopause におけるそれぞれテストステロン, DHEA, GH の HRT は認められておらず, いまだ臨床研究の段階である。これらの薬剤ではエストロゲン製剤と異なり, 大規模臨床研究に基づくエビデンスが少ないことがネックとなっている。超高齢化社会を迎えるにあたり, この分野のさらなる研究の進展を望みたい。

..... 文 献

- 1) 柳瀬敏彦: 男性更年期と生活習慣病. 医学のあゆみ **205**: 396-398, 2003
- 2) Grodstein F, Stampfer MJ: The epidemiology of coronary heart disease and estrogen replacement in postmenopausal women. *Prog Cardiovasc Dis* **88**: 199-210, 1995
- 3) Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, et al: Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* **335**: 453-461, 1996
- 4) Grandy D, Herrington D, Bittner V, et al: Cardiovascular disease outcome during 6.8 years hormone therapy. *JAMA* **288**: 49-57, 2002
- 5) Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators: Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA* **288**: 321-333, 2002
- 6) Barrett-Connor E, Grady D, Sashegyi A, et al: Raloxifene and cardiovascular events in osteoporotic postmenopausal women: four-year results from the MORE (Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation) randomized trial. *JAMA* **287**: 847-857, 2002
- 7) Lasco A, Gaudio A, Morabito N, et al: Effects of a long-term treatment with raloxifene on insulin sensitivity in postmenopausal women. *Diabetologia* **47**: 571-574, 2004
- 8) 岩本晃明, 柳瀬敏彦, 高 栄哲, 他: 日本人成人男子の総テストステロン, 遊離テストステロンの基準値の設定. *日泌尿会誌* **95**: 751-760, 2004
- 9) Fan W, Yanase T, Nomura M, et al: Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity due to decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. *Diabetes*: 2005 (in press)
- 10) 柳瀬敏彦, 名和田新: ステロイドホルモンの動脈硬化促進作用. *内分泌・糖尿病科* **4**: 545-552, 1997
- 11) Roth GS, Lane MA, Ingram DK, et al: Biomarkers of caloric restriction may predict longevity in humans. *Science* **297**: 811, 2002
- 12) Yanase T: Physiological significance of replacement therapy of dehydroepiandrosterone. *Int Med* **43**: 156-158, 2004
- 13) Villareal DT, Holloszy JO: Effect of DHEA on abdominal fat and insulin action in elderly women and men. *JAMA* **292**: 2243-2248, 2004
- 14) Yanase T, Suzuki S, Goto K, et al: Aromatase in bone: Roles of vitamin D3 and androgens. *J Steroid Biochem Molec* **86**: 391-397, 2003
- 15) Tanaka S, Haji M, Takayanagi R, et al: 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances the enzymatic activity and expression of the messenger ribonucleic acid for the aromatase cytochrome P450 synergistically with dexamethasone depending on the vitamin D receptor level in cultured human osteoblasts. *Endocrinology* **137**: 1860-1869, 1996
- 16) Morales AJ, Nolan JJ, Nelson JC, et al: Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J Clin Endocrinol Metab* **78**: 1360, 1994
- 17) Labrie F, Diamond P, Cusan L, et al: Effect of 12-month dehydroepiandrosterone replacement therapy on bone, vagina, and endometrium in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 3498-3505, 1997
- 18) Baulieu E-E, Thomas G, Legrain S, et al: Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4279-4284, 2000
- 19) Sugino M, Ohsawa N, Ito T, et al: A pilot study of dehydroepiandrosterone sulfate in myotonic dystrophy. *Neurology* **51**: 586-589, 1998
- 20) Wolkowitz OM, Kramer JH, Reus VI, et al: DHEA treatment of Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Neurology* **60**: 1071-1076, 2003
- 21) Rudman D, Feller AG, Nagraje HS, et al: Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med* **323**: 1-6, 1990

DHEA補充療法の現状と展望

柳瀬 敏彦

要 旨

副腎ステロイドのDHEAは加齢とともに直線的低下を認め、老化指標、長生き指標としての有用性が報告されている。またDHEAには抗糖尿病、抗肥満、抗動脈硬化、抗骨粗鬆症などの有益な作用が報告されており、抗加齢療法としてのDHEA補充療法が試みられている。健康感、性欲、骨代謝、糖質代謝、体脂肪、血管内皮機能といった指標にある程度の有用性は認められているが、わが国独自のデータの集積が乏しく、今後の課題である。〔日内会誌 94：2195～2199, 2005〕

Key words : DHEA, 老化, 生活習慣病, ホルモン補充療法

はじめに

更年期から老年期にかけて低下するホルモンにはエストロゲン、テストステロン、DHEA、GH-IGF-1 (growth hormone-insulin-like growth factor-1) があり、いずれもその低下は、加齢に伴い増加する生活習慣病の発症や進展や老化現象との関連が示唆されている。現在、ホルモン補充療法 (HRT) はエストロゲン補充療法が主に行われているが、近年の無作為比較対照試験における冠動脈硬化疾患や乳癌の増加の成績から投与方法や他の補充療法の検討も含めた見直しが行われている現状である。一方、テストステロン、DHEA、GH補充療法に関してはいまだ小規模の臨床研究の段階ながら、種々、有益な効果が報告されつつある。高齢化社会を迎えるにあたり、今後、抗加齢や生活習慣病克服の観点から、これらの補充療法の臨床研究の進展が望まれる。本稿ではDHEA補充療法をとりあげ、その現状と展望について紹介する。

1. DHEAとは？

副腎性アンドロゲンのdehydroepiandrosteroneの略であり、生体内では硫酸化体のDHEA-sulfate (DHEA-S) としても存在し、相互変換しうる。主に副腎と性腺で産生分泌されるが、一部末梢組織でも産生される。DHEA-Sは生体内でもっとも高濃度に存在するステロイドホルモンである。同じ副腎ステロイドの血中コルチゾールが一生を通じて変動を認めないのに対し、血中DHEA-Sは男女共に6～7歳頃から増加し始め、12～13歳頃にピークに達し、13～25歳頃までその高値を持続し以後加齢とともに直線的に減少する (図1)。大変、興味深いことに米国ボルチモアの住人数百人を対象にした調査研究では、DHEA-Sは長生きグループで明らかに高いという結果が得られており (図2)¹⁾、DHEAは単なる老化指標としてだけではなく、長生き指標としても有用である。

2. DHEAの生理作用

副腎アンドロゲンであるDHEAには、肥満、

やなせ としひこ：九州大学大学院医学系研究院病態制御内科 (第三内科)

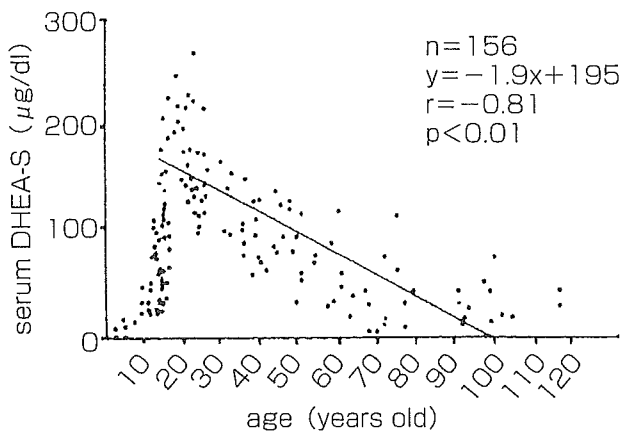


図1. 健康男性における血中DHEA-S濃度の加齢変動（自験成績）

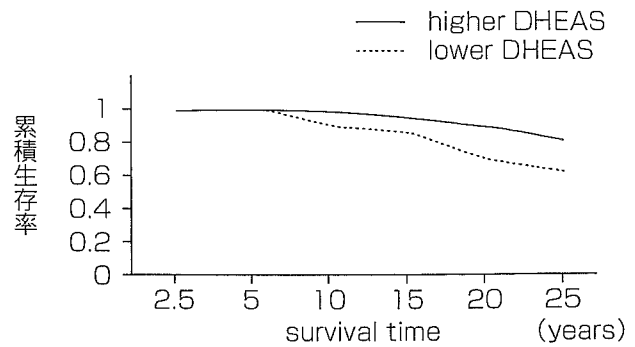


図2. Baltimore Longitudinal Study of Aging Male Humans（文献1より引用）
192人のボルチモア（米国）住民の血中DHEA-Sレベルの差異による累積生存率を示す。

糖尿病，発癌，動脈硬化，骨粗鬆症，記憶維持等に対して様々な有益作用があることが主に動物実験レベルで報告されている²⁾。ヒトでは血中DHEA-S値が低い程，肥満の指標値であるBMI (body mass index)が高いこと，心血管障害の発生率が高いことが報告されている。最近，不全心でアルドステロンの局所分泌の亢進が認められるのとは対照的に，健康心臓でDHEAが合成分泌心臓保護的作用を発揮することが報告されている³⁾。DHEAは脳内でも独自に産生されるが，動物実験では神経保護作用や記憶保持作用を認める。Alzheimer病や脳血管性痴呆患者等の痴呆性疾患では血中DHEA-S値が同一年齢層の老年者に比べ低下しているとの成績があるが，否定的な報告もある²⁾。

肥満糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスに0.4%DHEA混餌食を投与すると，体重に変化を認めないものの血糖値の有意の低下とインスリン感受性の改善が認められる。同様の成績はその他の種々の肥満，糖尿病モデルマウスでも認められている。db/dbにおけるDHEAの効果は肝臓の糖新生系酵素の抑制や膵β細胞からのインスリン分泌の亢進によることが示されている⁴⁾。肥満モデルマウスの脂肪細胞ではDHEAにより糖の取込みが亢進し，その機序としてインスリン受容体の下流に存在するPI3(phosphatidylinosi-

tol 3) kinase, PKC (protein kinase C) の活性化がDHEAによって促進されることが報告されている⁵⁾。

DHEAはまた，間接的に我々の骨密度の維持に関与している可能性がある。骨密度は年齢とともに低下し，女性では閉経まではエストロゲンによってその骨量が維持されるが，我々の検討では女性の骨量は閉経後には卵巣性エストロゲンの血中エストラジオール濃度よりもむしろ血中DHEA-Sとの相関が強くなる。このことは老齢期においてはDHEAが末梢組織においてエストロゲンに転換することで私たちの骨密度を維持する機構が働いていると想定される。我々は実際にヒトの骨芽細胞においてアロマターゼと呼ばれるエストロゲン合成酵素活性が存在し，DHEAから局所的にエストロゲン合成を行う，いわゆるイントラクライン機構が存在することを証明した⁶⁾。

3. DHEAの作用機序

DHEAは性ステロイドのエストロゲンやテストステロンの前駆体ステロイドであり，(1) これらステロイドへの転換を介した間接作用と(2) DHEA固有の直接作用があると考えられる。(2)の機序に関しては受容体分子が同定されていないこともあり詳細は不明である。少なくとも核

内転写調節因子として他の各種のステロイド受容体と同種の形の受容体はいまだ同定されていない。現在までのところ、我々の報告も含め高親和性のDHEA結合活性はTリンパ球⁷⁾、肝臓、血管内皮細胞、副腎髄質細胞などに認められているが、その多くは現在では膜受容体と考えられており、特に血管内皮細胞ではGαi2, 3とリンクした膜受容体であることが報告されている⁸⁾。我々は、DHEAの標的遺伝子の一つとして活性化Tリンパ系白血病細胞のPEERよりDHEAで誘導される新規遺伝子DHEA-induced dual specificity protein phosphatase (DDSP)を同定した⁹⁾。DDSPは興味深いことに全身の広い組織で発現を認め、燐酸化チロシンおよび燐酸化セリン・スレオニンに対してホスファターゼ活性を認め、p38との特異的結合を認めた。MAP (mitogen-activated protein) kinase情報伝達系は細胞増殖、癌化、アポトーシス、免疫応答等に深く関与するが、DHEAはこのDDSPを介してp38 MAP kinase系を抑制的に制御する事により種々の生理活性を発揮している可能性が考えられる。

4. DHEA補充療法の現状

DHEAは前述の様に、男女を問わず加齢と共に減少することから、老化予防を目的としてその補充療法の試みがなされている。老年者で低下したDHEA、DHEA-S値を若年成人レベルまで回復させる補充量(50mg/日)のDHEAを連日経口投与することにより有意なsense of well beingの改善が認められている¹⁰⁾。しかしながらこのsense of well beingの改善効果は、必ずしも全ての報告で一致している訳ではない。副腎不全症患者を対象にした25mg DHEA補充療法のクロスオーバー試験の2報告では健康感の改善が得られているが、ランダム化プラセボ対照試験では健康感、性欲ともに不変で、むしろ副作用として発汗臭や頭皮の搔痒感を認めている。Labrieらは更年期女性にDHEAクリームを塗布し1年

間血中DHEAレベルを若年成人レベルに維持すると大腿の骨塩量と骨形成マーカーの血中osteocalcinが有意に上昇することを報告している¹¹⁾。またBaulieuらは280人の健常男女子にDHEA 50mg/日を内服させ、特に70歳以上の女性において骨塩量の増加、皮脂分泌や色素沈着の改善を認めている¹²⁾。DHEAは神経疾患への治療応用の可能性が検討されつつある。myotonic dystrophy患者へのDHEA-Sの経静脈投与が患者の神経症状の改善に極めて有用であったとの報告もあるが、小規模のAlzheimer患者へのDHEA投薬試験においては、痴呆症状の改善は認められていない¹³⁾。

DHEAのヒトにおける抗肥満作用については明確でなかったが、最近、65~78歳の56例(男性28例、女性28例)を対象にしたランダム化二重盲検プラセボ対照試験の結果、DHEA補充療法を受けた群では男女ともに内臓脂肪と皮下脂肪が有意に減少し、6カ月後のインスリンの曲線下面積(AUC)は対照群に較べて有意に減少していることが報告された¹⁴⁾。長期のDHEA補充療法は腹部脂肪の減少とインスリン感受性の改善効果を介して、腹部肥満に起因するメタボリックシンドロームの予防と治療に有用かもしれない。本試験ではDHEA投与により、男女ともに血中のIGF-1 (insulin-like growth factor) とestradiolの上昇を認めており、これらの上昇を介した効果の可能性も考えられる。一方、DHEAはPPARα (peroxisome proliferator activated receptor α)のアゴニストであることから、PPARαの活性化により細胞内への脂肪酸の取込みを亢進させる脂肪酸輸送蛋白質と脂肪酸のβ-酸化系酵素の誘導による機序も考えられる。DHEAはまた肝臓や脂肪細胞の11β-HSD1 (11β-hydroxysteroid dehydrogenase 1)の発現を抑制することが報告されている¹⁵⁾。脂肪組織における11β-HSD1の発現亢進は、脂肪局所のコルチゾール産生を増加させ、メタボリック症候群類似の病態を引き起こす可能性が提示されている。

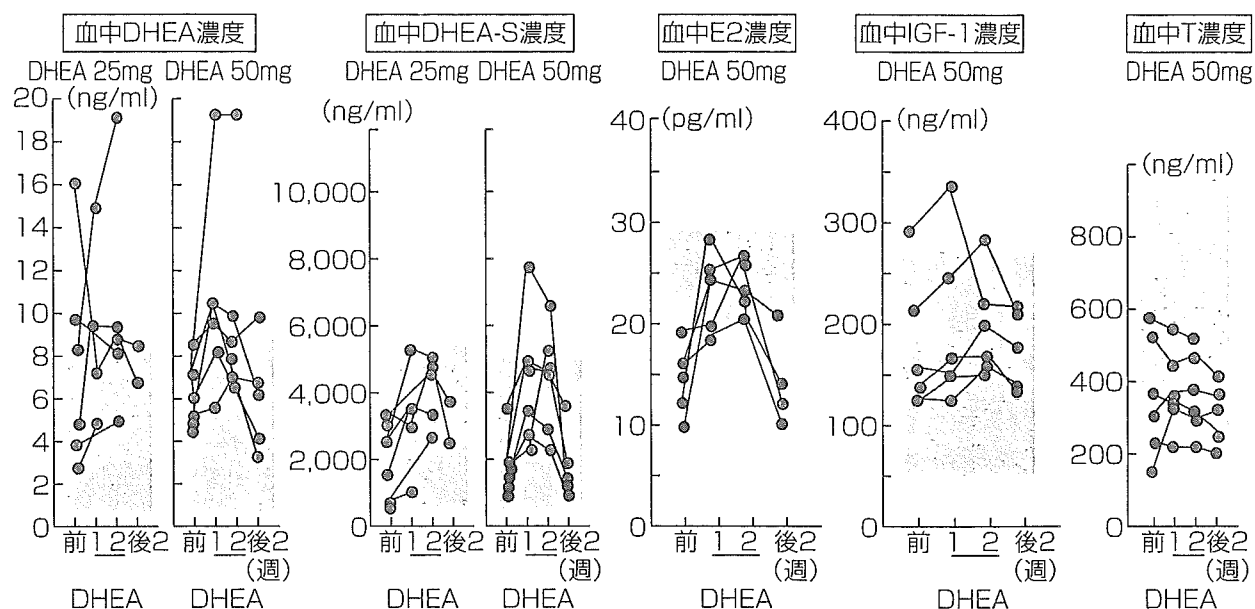


図3. DHEA短期用量試験の抜粋データ
E2: エストラジオール, T: テストステロン
は正常範囲

DHEAがメタボリック症候群の治療に有用であるとするならば、作用点の一つである可能性がある。一方、Kawanoらは男性高脂血症患者24名を対象に一日25mgの低容量のDHEA投与を行い、血管内皮細胞機能の改善とインスリン抵抗性の改善、PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) の低下を報告した¹⁶⁾。

我々もわが国におけるDHEA補充療法の有用性を検討する目的で多施設共同研究(九大, 東邦大, 横浜市大, 岐阜大)として40歳以上の正常男性ボランティアを対象にDHEAの経口投与試験を試みている。用量設定のための2週間の短期投与試験の結果の抜粋を図3に示す。DHEA 25mgを7名(平均年齢 50.6 ± 7.6 歳), 50mgを15名(平均年齢 46.3 ± 6.4 歳)に投与し血中ステロイドホルモン濃度の推移を観察したところ、DHEA製剤25mg, 50mg投与の両群ともに投与1週間後, 2週間後のいずれにおいても血中DHEA, DHEA-S, $\Delta 4$ -androstenedione濃度の数倍の上昇を認めたが、血中テストステロン濃度は変動を認めなかった。また両群投与間で血中濃度に有意の差は認められなかった。今後、高齢者にお

いては50mgの服用を必要とする可能性は残るが、中高年においては25mg服用で十分と考えられる。これらのステロイド濃度は服用中止後2週間にはもとの基礎既値に復し、また自他覚的に有意の副作用は認められなかった。50mgDHEA服用にて血中IGF-1値の上昇が認められており、GH-IGF-1系との相互関連が示唆される。なお、DHEA 25mg投与前後における血中DHEA濃度とインスリン抵抗性指標のHOMA-Rの間には負の相関関係が認められ、本研究でもDHEAのインスリン抵抗性改善作用が示唆されている。

5. DHEA補充療法の問題点と展望

DHEAの加齢に伴う低下は、種々ホルモンの中では低下がもっとも明瞭で血中濃度推移の把握が容易であり、経口投与も可能なことから、補充療法としては比較的、理想的なホルモンと言える。しかしながら、DHEAは現在、わが国では医薬品としては認可されていない。DHEA経口補充療法に関して報告されている臨床研究は長くて1年の観察期間に過ぎず、また千人以

上を対象とするような真の意味での二重盲検プラセボ大規模臨床試験の成績は皆無である。健康感、性欲、骨代謝、糖質代謝、体脂肪、血管内皮機能といった指標にある程度の有用性は認められるが、その効果はそれほど顕著なものではない。作用が広範囲かつマイルドである点が特徴といえるが、効能の特異性に欠ける点が医薬品開発と言う観点からは不利とも言える。幸い重篤な副作用は認められていないが、性ステロイドの前駆体ステロイドであるので、乳癌や前立腺癌などのホルモン依存性癌での投薬は避けるべきである。しかしながら種々の生理作用の中でもDHEAのインスリン感受性改善作用に関しては数多くの研究者が*in vitro*でも、また*in vivo*でも良好な再現性をもって実証している。高齢者ではインスリン抵抗性が基盤としてあり、医薬品として考えた場合、糖尿病の予防あるいは治療薬としての位置づけは将来、有望かもしれない。

DHEA補充療法には、不老長寿やQOL (quality of life) の改善といった効果が期待されている。長寿に関して補充療法による実証がなされれば画期的なことであるが、現状ではその証明は困難である。米国では、いわゆる若さの維持や老化ほけ防止等の効果効能で、健康食品(栄養補助食品)として店頭販売されており、人気商品となっている。わが国でも保健機能食品としての承認をめざす道はあるが、効果、安全性に関するわが国独自のデータの蓄積が必要で、ハードルは高い。

おわりに

抗加齢療法としてのDHEAの効能、補充療法に関する臨床研究の現状、問題点、展望を述べた。老化防止薬としての関心と期待が大きい反面、わが国ではしっかりした臨床エビデンスが乏しいため、実用化にはいまだ道遠しの感がある。効果と安全性に関する自主的臨床研究の積

み重ねによるこの分野の進展を期待したい。

文 献

- 1) Roth GS, et al: Biomarkers of caloric restriction may predict longevity in humans. *Science* 297: 811, 2002.
- 2) Yanase T: Physiological significance of replacement therapy of dehydroepiandrosterone. *Internal Medicine* 43: 156-158, 2004.
- 3) Nakamura S, et al: A possible association of heart failure status with synthetic balance between aldosterone and dehydroepiandrosterone in heart. *Circulation* 110: 1787-1793, 2004.
- 4) Aoki K, et al: Dehydroepiandrosterone suppresses elevated hepatic glucose 6-phosphatase and fructose 1, 6-bisphosphatase activities in C57BL/Ksj-db/db mice; comparison with troglitazone. *Diabetes* 48: 1579-1585, 1999.
- 5) Ishizuka T, et al: DHEA improves glucose uptake via activation of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol* 276: E196-204, 1999.
- 6) Tanaka S, et al: 1, 25-dihydroxyvitamin D3 enhances the enzymatic activity and expression of the messenger ribonucleic acid for the aromatase cytochrome P450 synergistically with dexamethasone depending on the vitamin D receptor level in cultured human osteoblasts. *Endocrinology* 137: 1860-1869, 1996.
- 7) Okabe T, 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.
- 8) Liu D, et al: Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Gαi2, 3. *J Biol Chem* 277: 21379-21388, 2002.
- 9) Ashida K, et al: Dehydroepiandrosterone negatively regulates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by a novel PTPN7 locus-derived transcript. *Biochem Biophys Acta* 54: 1000-1008, 2005.
- 10) Morales AJ, et al: Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 1360-1367, 1994.
- 11) Labrie F, et al: Effect of 12-month dehydroepiandrosterone replacement therapy on bone, vagina, and endometrium in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3498-3505, 1997.
- 12) Baulieu E-E, et al: Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4279-4284, 2000.
- 13) Wolkowitz OM, et al: DHEA treatment of Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Neurology* 60: 1071-1076, 2003.
- 14) Villareal DT, et al: Effect of DHEA on abdominal fat and insulin action in elderly women and men. *JAMA* 292: 2243-2248, 2004.
- 15) Apostolova G, et al: Dehydroepiandrosterone inhibits amplification of glucocorticoid action in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004 in press.
- 16) Kawano H, et al: Dehydroepiandrosterone supplementation improves endothelial function and insulin sensitivity in men. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3190-3195, 2003.

アンドロゲン受容体ノックアウトマウスの肥満機序の解明

柳瀬敏彦¹⁾ 范 吳強¹⁾ 加藤茂明²⁾ 名和田 新¹⁾

はじめに

男性においては加齢とともにV/S比が増加することが知られているが、男子性腺機能低下症患者を対象にした検討では、テストステロン補充により体脂肪が減少することが明らかになっている。男性健常者にGnRHを投与してテストステロンを低下させると、脂肪量は増加し、脂質酸化は低下し、resting energy expenditureも低下を認めることから、男性ホルモンが抗肥満に働くものと考えられている。近年、テストステロンはドーピングの問題でも社会的関心を集めている。しかしながら、このようなテストステロンの抗肥満作用機序については、いまだ明らかでない。今回、われわれはノックアウトマウスを用いて男性ホルモンの肥満に及ぼす影響について検討したので報告する。

アンドロゲン受容体ノックアウトマウスの肥満

雄のアンドロゲン受容体ノックアウトマウス(ARKO)は野生型との比較で晩発性の肥満を起こすことが明らかになっている。この肥満は雄特異的なもので、内臓脂肪、皮下脂肪ともに増加して過形成をきたす。ARKOは著明な睪丸萎縮のためテストステロンが非常に低値という特徴があり、エストロゲン合成酵素のアロマターゼノックアウトマウスでは肥満を呈することから、ARKOの肥満がエストロゲンの低下による

可能性が推論される。しかしながら、肥満の有無にかかわらずARKOのエストロゲンレベルは正常であったことから、ARKOの肥満はアンドロゲンシグナルの障害に伴うARKO特異的な所見と考えられる。ARKOではまた、褐色脂肪が白色脂肪化してレプチンを分泌していることも特異的な所見である。これはβアドレナリン受容体ノックアウトマウスでも同様の報告があり、褐色脂肪組織の機能不全を示唆する所見と推察される(図1)。ARKOは総蛋白、BUN、TG、コレステロール、遊離脂肪酸(FFA)は野生型と変わらず、肥満があるにもかかわらず脂肪肝をきたさないことも興味深い特徴である。

アンドロゲン受容体ノックアウトマウスのプロフィール

晩発性の肥満をきたすARKOでは、食餌摂取量は変化していないが、走行距離や立ち上がり回数といった指標でみた運動量の低下が認められる。酸素消費についても野生型より30%ほど低下しており、エネルギー消費が悪化していることがわかる(図2)。さらにARKOが肥満をきたす前の8週時のデータでもこれらの指標は野生型との比較で低下していることから、肥満によって運動量が低下したわけではないと考えられる。

肥満発症時における末梢脂肪組織が脂肪分解

¹⁾九州大学大学院医学研究院病態制御内科

²⁾東京大学分子細胞生物学研究所核内情報研究分野

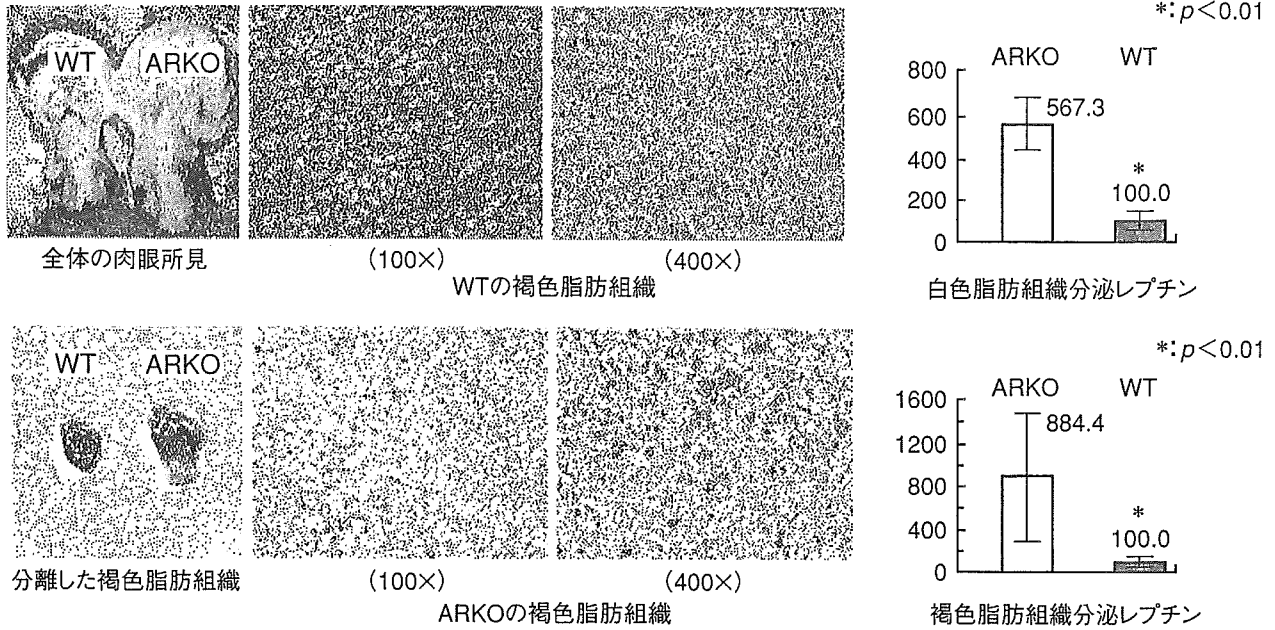


図1 45週齢の雄アンドロゲン受容体ノックアウトマウスの褐色脂肪細胞所見

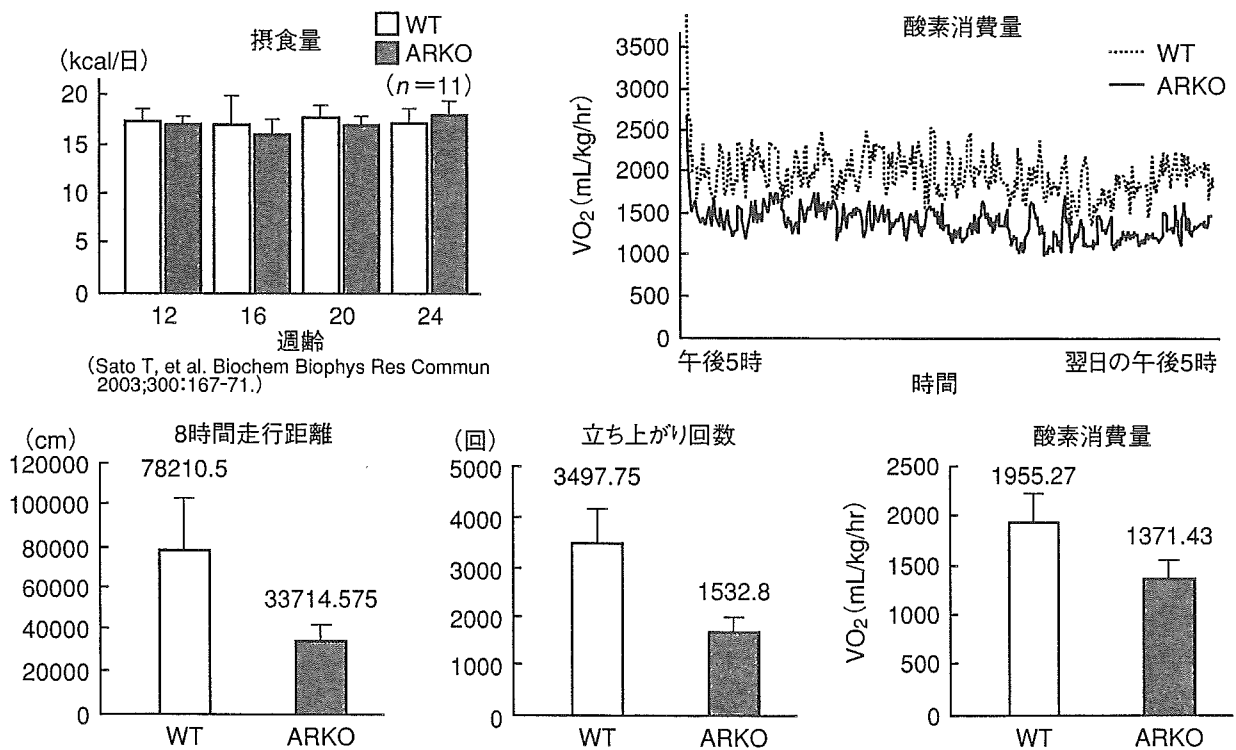


図2 雄アンドロゲン受容体ノックアウトマウスのエネルギー摂取とエネルギー消費

と脂肪生成のどちらに働いているかという観点からみると、まずARKOマウスではホルモン感受性リパーゼが著明に低下しており、一方でFFAのβ酸化に関する酵素には変動は認めら

れなかったことから、脂肪分解の低下に伴って肥満が起こっていることがわかった(図3)。これはアロマターゼノックアウトマウスの場合の肥満が、むしろ脂肪合成の亢進によるものであ