

表2 Aging Males Symptoms Rating Scale

	なし	軽度	中等度	重度	極めて重度
1 肉体的・精神的健康状態の低下を感じる 自覚症状がある	1	2	3	4	5
2 関節痛や筋肉痛がある 腰痛, 関節痛, 手足の痛み, 背中全体の痛みなど	1	2	3	4	5
3 汗をよくかく 思いがけない/突然発汗する, 緊張していないのに, のぼせたりする	1	2	3	4	5
4 睡眠障害がある 寝付けない, しばしば目が醒める, 早く目がさめ, 疲れを感じる, 睡眠不足, 眠れない	1	2	3	4	5
5 睡眠の欲求が強く, しばしば疲労感がある	1	2	3	4	5
6 怒りっぽく, イライラする 小さなことですぐカッとなる, 不機嫌になる	1	2	3	4	5
7 神経過敏である 緊張感がある, 落ち着かない, そわそわする	1	2	3	4	5
8 不安・心配しやすい パニックになりやすい	1	2	3	4	5
9 身体的疲労感・活力不足である 能力全般の低下, 活動の低下, 余暇活動への興味の低下, 無気力, 達成感がない, 何かをするのに, ムリに奮い立たせないといけない	1	2	3	4	5
10 筋力が低下してきた 弱くなってきたと感じる	1	2	3	4	5
11 憂うつ気味である 落ち込む, 物悲しい, 泣きそうな感じ, 意欲減退, 気分の浮き沈み, 無力感	1	2	3	4	5
12 自分のピークは過ぎたと感じる	1	2	3	4	5
13 燃え尽きたと感じる, どん底状態にあると感じる	1	2	3	4	5
14 あごひげの伸びが遅くなってきた	1	2	3	4	5
15 性的活動, 頻度が低下した	1	2	3	4	5
16 朝だちの回数が減少した	1	2	3	4	5
17 性欲や性的衝動が減少した セックスの喜びの低下, セックスの欲求の低下	1	2	3	4	5

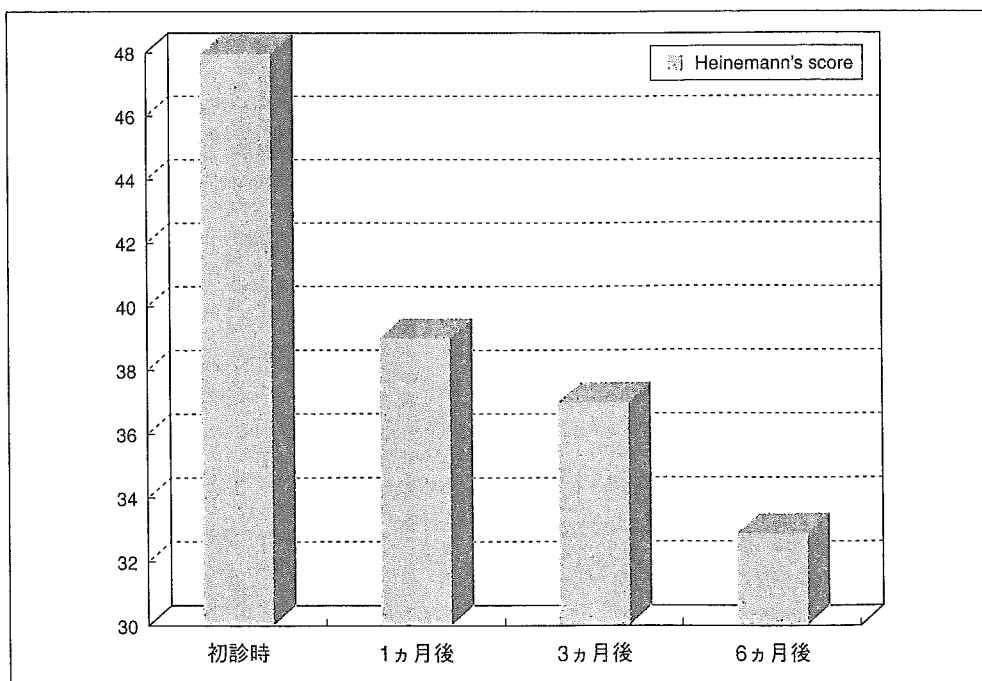


図1 テストステロン補充療法後のAMS scoreの推移

表3 熊本式症状調査票

	ほとんどない	ややある	かなりある	特につらい
1 体調がすぐれず、気難しくなりがち	1	2	3	4
2 不眠になやんでいる	1	2	3	4
3 不安感・さびしさを感じる	1	2	3	4
4 くよくよしやすく、気分が沈みがち	1	2	3	4
5 ほてり、のぼせ、多汗がある	1	2	3	4
6 動機、息切れ、息苦しいことがある	1	2	3	4
7 めまい、吐き気がある	1	2	3	4
8 疲れやすい	1	2	3	4
9 腰痛、手足の関節の痛み	1	2	3	4
10 頭痛、頭が重い、肩こりがある	1	2	3	4
11 手足がこわばる	1	2	3	4
12 手足がしびれたり、ピリピリする	1	2	3	4
13 尿が出にくい、出終わるまでに時間がかかる	1	2	3	4
14 たびたびに夜中にトイレにおきる	1	2	3	4
15 尿意を我慢できなくなり、漏らしたりする	1	2	3	4
16 性欲が減退したと感じる	1	2	3	4
17 勃起力が減退したと感じる	1	2	3	4
18 セックスの頻度	2週間に1~2回以上	月に1~2回	月1回未満	全くない

表4 患者背景

	Median	min.-max.
年齢	49	36 ~ 71
AMS	46	22 ~ 73
身体的症状	20	7 ~ 30
心理的症状	32	12 ~ 53
性的症状	46	22 ~ 71
熊本式 (1-17)	35	18 ~ 73
テストステロン (n=60)	368.7	54.5 ~ 810.0
フリーテストステロン (n=56)	12.1	2.2 ~ 27.5

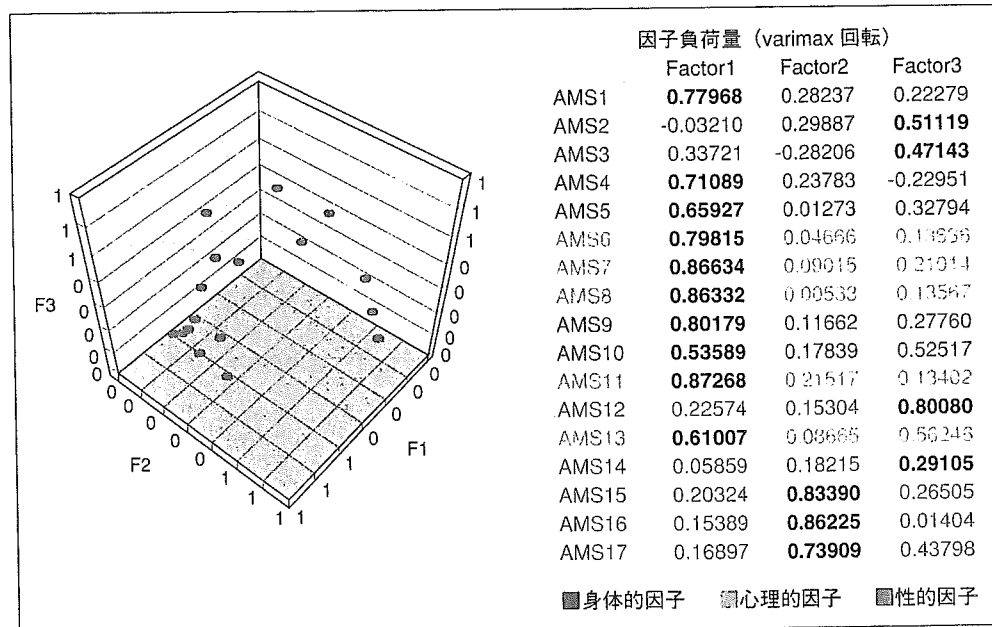


図2 AMS 因子分析

Heinemann の分類	Factor1	Factor2	Factor3
身体的因子	1,4,5,9,10		2,3
心理的因子	6,7,8,11,13		
性的因子		15,16,17	12,14

□ 17の質問項目を3つに分解することは難しい。

図3 AMS 因子分析の解釈

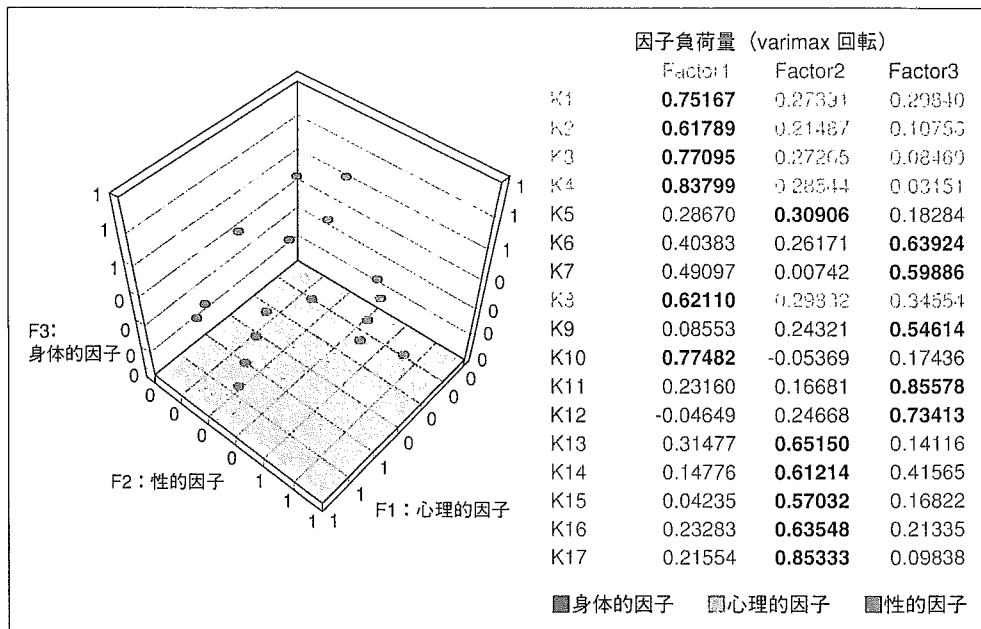


図4 熊本式因子解析

Factor1	Factor2	Factor3
10 1,2,3,4,8	5,13,14,15,16,17	6,7,9,11,12
心理的因子	性的因子	身体的因子

10番目の質問項目 (K10) 「頭痛、頭が痛い、肩こりがある」が、Factor3でなくFactor1に分類される。
 「ゆううつだといって頭を抱えるように」、日本人にとって心理面の症状を強く反映することは、よくみられる現象。
 K10のPearson相関係数は、K1-4、K8と有意な関連がある。
 臨床的意味合いから、K10は、Factor3の身体的因子に含めて考える。
 K18は、回答形式がK1-17と異なるため、別に取り扱う。

図5 熊本式

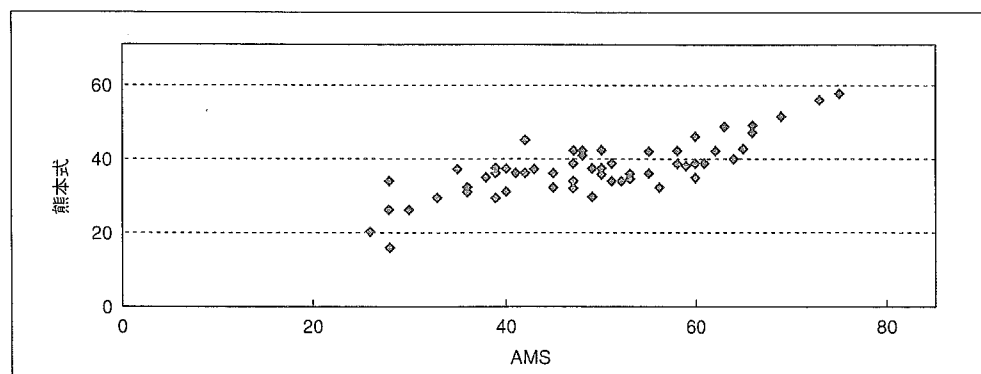


図6 AMSと熊本式症状調査票

表5 熊本式とAMSのサブグループの相関

	AMS	合計	身体	心理	性
熊本式					
合計		0.844	0.856	0.851	0.884
身体		0.635	0.673	0.641	0.635
心理		0.856	0.838	0.912	0.856
性		0.67	0.613	0.591	0.67

P<.0001

び関連病院の男性更年期外来を受診した 61 名を対象に初診時に AMS 質問紙および熊本式質問紙を用いて自覚症状の評価を行い、両質問紙の因子分析、主要素合計の相関の解析を行った（表 4）。その結果 AMS の身体的因子、心理的因子、性的因子の 3 つの因子については、性的因子の質問である 15～17 以外は、各領域の独立性が低いことが明らかになった。（図 2, 3）つまり AMS はトータルスコアでの症状評価には適切であっても領域別の解析には不適當であることがわかった。一方熊本調査票は領域別の独立性が保たれていることから、領域別の解析に優れていることが明らかになった（図 4, 5）。興味深いのは身体的因子である 10 番目の質問項目（K10）「頭痛、頭が痛い、肩こりがある」が、Pearson 相関係数は、K1-4, K8 と有意な関連があり、Factor 3 でなく Factor 1 に分類されることであり、これは「ゆううつだといって頭を抱えるように」、日本人にとって心理面の症状を強く反映することは、よくみ

られる現象を反映している可能性がある。また AMS と熊本式は、トータルスコアおよび、領域別のスコアについて男性更年期外来受診者では強い相関があることがわかった（図 6, 表 5）。

まとめ

AMS では、精神・心理、身体、性機能の各領域に質問を分類することが難しい。

したがって AMS は合計点は治療効果を見るマーカーとしては優れているものの、鑑別診断や症状の分類には適していない。一方熊本式は質問を 3 群に分類することが可能であり、症状の解析がしやすいと考えられる。

文 献

- 1) Heinemann L A, Zimmermann T, Vermeulen A, et al: A new ' Aging Males' Symptoms' (AMS) rating scale. *Aging Male*, 2, 105-114, 1999.

男性更年期障害診療の 展望

帝京大学泌尿器科学教室 丸山 修, 堀江 重郎

KEY WORDS

- PADAM
- うつ病
- テストステロン

I. テストステロン

男性更年期障害は, partial androgen deficiency in aging male (PADAM), あるいは late onset androgen deficiency of aging male と呼ばれ, テストステロン補充により治療可能な1つの疾患概念として認識されてきている。米国では, テストステロン製剤の処方箋の数は1999年の90万件から, 2003年には200万件以上へと急増しており, 過去10年間では500%増となっている¹⁾²⁾。その原因はhypogonadismについての理解が進んだことがあげられるが, 実際には400~500万人いるとされるhypogonadismに対して, 約5%の患者が治療を受けているにすぎないため, 今後さら増加していくものと考えられる。しかし, 加齢男性でのテストステロン補充は小規模な臨床研究しかないために, その効果は若年者の性腺機能低下症に比べて知見に乏しいといわざるを得ない。したがってエビデンスが少ない状況で, 多くの患者に処方さ

れていることに対しては, テストステロン製剤の潜在的な副作用も含めて, 警鐘が鳴らされている³⁾。本稿では男性更年期障害診療の問題点と展望について検討する。

II. 男性更年期障害

人口の高齢化に伴い, 高齢者のQOLが重要視されている。高齢者は, 精神的, 肉体的に健康で, それまでの人生の経験を社会で生かしていけることが, 日常でよいwell-beingをもつための大きな要件であることはいうまでもない。加齢に伴ってテストステロン値が低下することからQOL, ADLが低下することが知られているが, これをPADAMあるいはlate onset androgen deficiency of aging maleと呼ぶ⁴⁾⁵⁾。最近では, symptomatic late-onset hypogonadism (SLOH)と呼ばれることもある⁶⁾。米国でのコホート研究であるRancho Bernardo Studyでは, 60歳以上の健康な男性の半数において血液中のテスト

Current status and the future prospects of the treatment of partial androgen deficiency in aging male

Osamu Maruyama
Shigeo Horie (教授)

ステロンレベルが性腺機能低下症の基準値である350ng/dLよりかなり低い288ng/dL以下であったと報告している⁷⁾。加齢に伴って変化を生じるホルモンにはテストステロンだけではなく、成長ホルモン(GH)やデヒドロエピアンドロステロン(DHEA)などもあり、女性更年期であるmenopauseのanalogyからテストステロン減少をandropause, GH減少をsomatopause, DHEA減少をadrenopauseと呼ぶこともある。これらのホルモンの加齢による減少は加齢の必然的なものと考えられることも可能であるが、ホルモン減少によって生じる症候が、ホルモン補充により安全に改善できるのであれば、治療対象となる疾患であると考えられる。これらのホルモンレベルが低値である、先天的疾患での若年者へのホルモン補充は劇的な効果をもたらすが、同じ基準で判断した加齢者で同様な効果がみられるのか、検証する必要がある⁸⁾。GH投与は、薬剤の希少性と、またGHが癌を促進する可能性から、臨床では一般的には用いられていない⁹⁾。逆に、副腎で産生されるアンドロゲンであるDHEAは合成が容易であることから、米国では臨床エビデンスなくサプリメントとしてドラッグストアで入手することができ、また、その有効性も報告されている¹⁰⁾。

本邦においても、加齢の自覚、職位の変化や職場環境の変化などから心身の変調をきたしやすい40~60歳代の「男性更年期」世代で、精神・心理、身体、性機能についての多彩な愁訴を訴えて男性更年期外来を受診する患者が急増している。これらの愁訴が男性ホルモン補充で軽快することがあること、またこれらの患者の多くはテストステ

ロンレベルが基準値以下であることから、テストステロン治療がここ数年盛んになっている。この「男性更年期」患者ではQOLが著しく損なわれていることを特徴とするが、ADLは低下していない。一方、高齢者でのテストステロン低下者では一般に本人からの訴えは少なく、QOLの低下は小さいが認知機能の低下や筋力の低下、骨粗鬆症などのためにADLが低下していく。

Ⅲ. テストステロンの生理と薬理の新しい知見

テストステロンの生理作用については、アンドロゲンレセプターのノックアウトマウス、あるいは若年男性の低テストステロン血症における検討から、テストステロンは筋肉、骨、血管、脂質代謝、性機能など、広範な臓器の機能に関係することがすでに知られている。また近年テストステロンの中枢への作用が注目されている。ストレス応答の一環として視床下部で産生される副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)は、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LH-RH)の産生を抑えることから黄体形成ホルモン(LH)が減少し、テストステロンが低下する¹¹⁾。「男性更年期外来」での患者の多くは、LHの上昇をみないテストステロン低下症であるため、おそらくCRH優位なのではないかと考えられる。またテストステロンは副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)産生を抑えて、コルチゾルレベルの上昇を抑制することから、テストステロンにはストレス耐性の作用があると考えられる。脳内にはaromataseおよび5 α -reductase(5 α 還元酵素)活性があり、テストステロンはエストロゲンや

ジヒドロテストステロン(DHT)へ代謝されて作用していると考えられている¹²⁾¹³⁾。またテストステロンはニューロンでも一酸化窒素(NO)産生を促すことにより、神経末端でのモノアミン代謝に関与していることが知られてきている¹⁴⁾。asymmetric dimethylarginine(ADMA)はNO産生を抑制するが、hypogonadismにおいては正常人に比べて血中ADMA値が増加し、NOが減少している¹⁵⁾¹⁶⁾。

Ⅳ. 「男性更年期外来」とPADAMの診断

現在、疲労、健康感の減少、抑うつ、いらつき、記憶力の低下、認知機能低下、性欲低下、性機能低下、筋肉痛、筋力低下、骨密度の低下、ほてり、発汗過多などの多彩な愁訴をもつ患者がQOLの低下を訴えて「男性更年期外来」を受診している。われわれの男性更年期外来では、身体所見に加えテストステロン、フリーテストステロン値に加え、ゴナドトロピン、プロラクチン、コルチゾルなどの内分泌プロフィールと症状調査票により重症度を判定している。しかし鑑別診断は重要で、われわれも最近、疲労、倦怠感を訴えた患者で、フリーテストステロン値が低下していることから長期間テストステロン補充療法を受けていたが、実はACTH単独欠損症であった症例を経験した。したがってPADAMの診断には、絶えず鑑別診断を念頭に置く必要がある。症状調査票については現在Aging Males Symptoms(AMS) rating scale(以下AMS)が世界的に汎用されている¹⁷⁾。内容は、精神・心理、身体、性機能についての17項目についてのself-asses-

表1. 熊本症状調査票

	ほとんどない	ややある	かなりある	特につらい
1 体調がすぐれず、気難しくなりがち	1	2	3	4
2 不眠になやんでいる	1	2	3	4
3 不安感・さびしさを感じる	1	2	3	4
4 くよくよしやすく、気分が沈みがち	1	2	3	4
5 ほてり、のぼせ、多汗がある	1	2	3	4
6 動機、息切れ、息苦しいことがある	1	2	3	4
7 めまい、吐き気がある	1	2	3	4
8 疲れやすい	1	2	3	4
9 腰痛、手足の関節の痛み	1	2	3	4
10 頭痛、頭が重い、肩こりがある	1	2	3	4
11 手足がこわばる	1	2	3	4
12 手足がしびれたり、ピリピリする	1	2	3	4
13 尿が出にくい、出終わるまでに時間がかかる	1	2	3	4
14 たびたびに夜中にトイレにおきる	1	2	3	4
15 尿意を我慢できなくなり、漏らしたりする	1	2	3	4
16 性欲が減退したと感じる	1	2	3	4
17 勃起力が減退したと感じる	1	2	3	4
18 セックスの頻度	2週間に1~2回以上	月に1~2回	月1回未満	全くない

ment型の症状スコアである。一方、熊本は以前より健常者を対象に「健康調査票」での大規模なQOL研究を行ってきたが、そこから得られた結果を元にPADAMについての症状調査票を作成した(表1)。こちらでも精神・心理、身体、性機能についての質問から構成されている。この両者については、トータルのスコアおよび、領域別のスコアは男性更年期外来受診者では強い相関があることがわかった(表2)¹⁸⁾。因子分析を行ってみるとAMSについては、各領域の独立性が低く、トータルのスコアでの症状評価には適切であっても領域別の解析には不相当であることがわかった。一方、熊本調査票は領域別の独立性が保たれていることから、領域別の解析に優れている(図1)。われわれの検討ではAMSは治療効果をみるsurrogate markerとしてすぐれていることがわかった(図2)。

表2. 熊本症状調査票とAMSとの相関¹⁸⁾

熊本症状調査票	AMS	合計	身体	心理	性
合計		0.844	0.856	0.851	0.884
身体		0.635	0.673	0.641	0.635
心理		0.856	0.838	0.912	0.856
性		0.670	0.613	0.591	0.670

p<0.0001

V. PADAMとうつ

男性更年期外来受診者の約半数は、うつ病で精神科や心療内科で薬物を投与されていることが、わが国の大きな特徴である。加齢男性におけるアンドロゲン濃度とうつ症状の関係を調べたRancho Bernardo Studyでは、Beckのうつ病評価尺度(Beck depression inventory; BDI)によるうつ症状は、男性ホルモンの低下によりスコアが高くなることが報告されている¹⁹⁾。最近男性のうつ病にテストステロン補充が有効であることが注目されている²⁰⁾。

PADAMでは、筋肉痛、自律神経反応など体の疲労を訴える他に、抑うつ症状を呈することが多いが、PADAMとうつ病をどう鑑別するか、またうつ病患者のうちどういうタイプの患者がPADAM症状を訴えるかは明らかではない。そこでわれわれは米国精神医学会の「診断・統計マニュアル(Diagnostic and Stastical Manual)第IV版」を用い、「大うつ病エピソード」と「気分変調症」を鑑別して、テストステロン補充療法を行う前向き研究を行った。その結果「大うつ病エピソード」に該当する患者は、気分変調症よりもテストス

A Rotated Factor Pattern			
質問	Factor 1	Factor 2	Factor 3
1	0.77968	0.28237	0.22279
2	-0.03210	0.29887	0.51119
3	0.33721	-0.28206	0.47143
4	0.71089	0.23783	-0.22951
5	0.65927	0.01273	0.32794
6	0.79815	0.04666	0.13636
7	0.86634	0.09015	0.21014
8	0.86332	0.00533	0.13567
9	0.80179	0.11662	0.27760
10	0.53589	0.17839	0.52517
11	0.87268	0.21517	0.13402
12	0.22574	0.15304	0.80080
13	0.61007	0.08665	0.56246
14	0.05859	0.18215	0.29105
15	0.20324	0.83390	0.26505
16	0.15389	0.86225	0.01404
17	0.16897	0.73909	0.43798

B Rotated Factor Pattern			
質問	Factor 1	Factor 2	Factor 3
1	0.75167	0.27391	0.29840
2	0.61789	0.21487	0.10756
3	0.77095	0.27265	0.08469
4	0.83799	0.28544	-0.03151
5	0.28670	0.30906	0.18284
6	0.40383	0.26171	0.63924
7	0.49097	0.00742	0.59886
8	0.62110	0.29832	0.34554
9	0.08553	0.24321	0.54614
10	0.77482	-0.05369	0.17436
11	0.23160	0.16681	0.85578
12	-0.04649	0.24668	0.73413
13	0.31477	0.65150	0.14116
14	0.14776	0.61214	0.41565
15	0.04235	0.57032	0.16822
16	0.23283	0.63548	0.21335
17	0.21554	0.85333	0.09838

図1. AMS(A), 熊本調査票(B)の因子分析結果

下線なし：身体的因子 下線：心理的因子 二重下線：性的因子
 AMSについては、各領域の独立性が低く、トータルスコアでの症状評価には適切であっても領域別の解析には不適當であることがわかった。一方、熊本調査票は領域別の独立性が保たれていることから、質問項目を身体的因子・心理的因子・性的因子の3つの要素に分類することが可能で、領域別の解析に優れている。熊本調査票の質問18は、回答形式が他の質問と異なるため別に扱った。

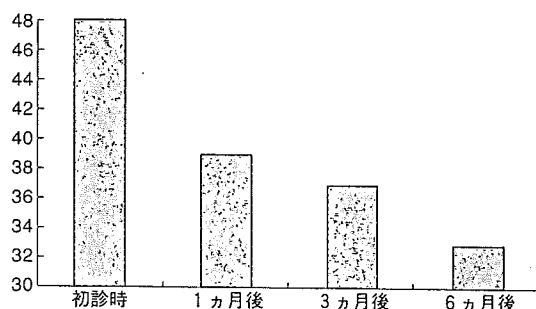


図2. テストステロン補充療法後のAMS scoreの推移
 AMSはsurrogate markerとして優れている。

テロン補充療法により、症状スコアの改善傾向がみられた²¹⁾。したがって、「大うつ病エピソード」の患者はテストステロンに対する感受性が高いか、あるいは、内因性うつ病とされる患者のなかに性腺機能低下症による外因性のうつ病が含まれている可能性が示唆される。内分泌環境とうつ病についての

臨床研究はまだ多くないが、われわれは「大うつ病エピソード」の患者に対しては性腺機能を調べる必要があると考えている。

VI. ホルモン補充療法の効果

若年性の性腺機能低下症に対しては、

ホルモン補充療法が効果を有することは広く知られている¹³⁾。一方で、加齢男性でのテストステロン減少症であるPADAMでは、ホルモン補充療法の効果についてはまだ報告が少ないか、あるいは意見の一致をみていない²²⁾。加齢男性では、体脂肪の減少、筋肉量・筋力の増加が認められたという報告があるものの、その効果は若年男性の性腺機能低下症と比較して小さい²²⁾²³⁾。米国のInstitute of Medicineでは、テストステロン補充の処方量の増加を危惧し、大規模臨床試験が必要としているが、実際に数千人程度の試験が可能かは疑問視されている。むしろproof of principleを示すことができるよい臨床研究を積み重ねていくことが実際的なステップであろう。前立腺癌患者の増加から、テストステロンから代謝されるDHTが、前立腺癌を誘発させないかが現在大きな関心となっている。DHTの影響を少なくする方法としてフィナステリドとの併用療法が報告されており、注目されている。フィナステリドはテストステロンからDHTに変換する5 α 還元酵素のType 1の機能を阻害することによってDHTの産生を抑制する。フィナステリド併用療法は、テストステロン単独と比べると前立腺の重量増加、PSA増加の効果が少なく、かつテストステロン単独療法と同等に、骨密度を増加させる効果があり、体脂肪を減少させる²⁴⁾。Type 1とtype 2の5 α 還元酵素をともに阻害するデュタステリドの併用はより効果的であると考えられる。また5 α 還元を受けない合成テストステロンの開発が期待される。しかし脳内にも5 α 還元酵素が存在することから、中枢への作用を期待する場合は5 α 還元酵素阻害

薬の併用が適切か、議論が分かれるであろう。

われわれの経験ではPADAMに対してホルモン補充療法を行うと、70~80%の患者で症状スコアが改善し、その効果は治療前の血中テストステロン値によらない。また、うつ病の一部にも効果がある。また、多くの患者ではテストステロン値自体は不変であっても1年以内にホルモン補充療法を離脱できることを経験する。このことはPADAMの原因がテストステロン減少だけではないことを示唆する。ただし、男性更年期障害を訴えて受診する患者の約半数はうつ病の既往をもち、必ずしもテストステロン減少に起因する症候だけを訴えるわけではないことも考慮しなければならない。

VII. 今後の展望

高齢者のQOLは今世紀の大きな課題であり、それを解く鍵の1つに性ホルモンがあると考えられる。男性更年期障害の研究は始まったばかりであるが、主症状である心理的症状とうつ病との鑑別が困難なため、受診者のなかには多くのうつ病患者が含まれている。うつ病は精神科または心療内科で治療を開始されることが大概であるが、うつ病の診断のため実施する内分泌学的な検査のなかにテストステロンの測定が含まれていないことがほとんどである。このため性腺機能低下症によるうつ症状の診断を困難にしていると考えられる。また、加齢に伴う性腺機能低下症では、認知機能、筋力、骨密度、性機能、代謝などADLやQOLに関わる多くの生体機能の低下が生じうるにもかかわらず、これらを主症状として訴えて

くる患者はまだ比較的少ない。60歳以上の男性の約20%で性腺機能の低下があるとの報告²⁵⁾もあるが、このことから性腺機能の低下を生じている多くの患者は無症状で、受診する機会をもたないでいると考え、asymptomatic late-onset hypogonadismと呼ぶことができる。これらの患者はホルモン補充療法を実施することでADLの向上が期待できる可能性があり、今後の男性更年期障害診療の重要な課題である。

文 献

- 1) Pearson H : Hormone therapy : a dangerous elixir? *Nature* 431 : 500 - 501, 2004
- 2) Tan RS, Salazar JA : Risks of testosterone replacement therapy in ageing men. *Expert Opin Drug Saf* 3 : 599 - 606, 2004
- 3) Rhoden EL, Morgentaler A : Risks of testosterone-replacement therapy and recommendations for monitoring. *N Engl J Med* 350 : 482-492, 2004
- 4) Gray A, et al : Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men : results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab* 73 : 1016 - 1025, 1991
- 5) Morales A, Lunenfeld B : Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. Official recommendations of ISSAM. International Society for the Study of the Aging Male. *Aging Male* 5 : 74 - 86, 2002
- 6) Morales A : Testosterone treatment for the aging man : the controversy. *Curr Urol Rep* 5 : 472-477, 2004
- 7) Barrett-Connor E, et al : Low levels of estradiol are associated with vertebral fractures in older men, but not women : the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab* 85 : 219-223, 2000
- 8) Jones RD, Jones TH, Channer KS : Replacement therapy, not recreational tonic. *Nature* 432 : 439, 2004
- 9) Vance ML : Can growth hormone prevent aging? *N Engl J Med* 348 : 779 - 780, 2003
- 10) Genazzani AR, et al : Long-term low-dose dehydroepiandrosterone replacement therapy in aging males with partial androgen deficiency. *Aging Male* 7 : 133-143, 2004
- 11) Rivier C, Vale W : Effect of the long-term administration of corticotropin-releasing factor on the pituitary-adrenal and pituitary-gonadal axis in the male rat. *J Clin Invest* 75 : 689-694, 1985
- 12) Viau V : Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes. *J Neuroendocrinol* 14 : 506-513, 2002
- 13) Snyder PJ, et al : Effects of testosterone replacement in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 85 : 2670 - 2677, 2000
- 14) Seftel AD : The positive trophic effects of testosterone on neuronal nitric oxide synthase (nNOS) expression. *J Androl* 18 : 745, 1997
- 15) Cooke JP, Asymmetrical dimethylarginine : the Uber marker? *Circulation* 109 : 1813-1818, 2004
- 16) Cakir E, et al : Elevated plasma concentration of asymmetric dimethylarginine that is reduced by single dose testosterone administration in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism patients. *J Clin Endocrinol Metab* 90 : 1651-1654, 2005
- 17) Heinemann LA, Zimmermann T, Vermeulen A, et al : A new 'Aging Males' Symptoms' (AMS) rating scale. *Aging Male* 2 : 105-114, 1999
- 18) 堀江重郎 : 男性更年期外来の治療と症状スコア. 第4回日本Aging Male研究会(東京), 2004
- 19) Barrett-Connor E, Von Muhlen DG, Kritz-Silverstein D : Bioavailable testosterone and depressed mood in older men : the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab* 84 : 573-577, 1999
- 20) Orengo CA, Fullerton G, Tan R : Male depression : a review of gender

- concerns and testosterone therapy. *Geriatrics* 59(10) : 24–30, 2004
- 21) Maruyama O, et al : *J Urol*, 2005 (in press)
- 22) Snyder PJ, et al : Effect of testosterone treatment on body composition and muscle strength in men over 65 years of age. *J Clin Endocrinol Metab* 84 : 2647–2653, 1999
- 23) Tenover JS : Effects of testosterone supplementation in the aging male. *J Clin Endocrinol Metab* 75 : 1092 – 1098, 1992
- 24) Page ST, et al : Exogenous testosterone (T) alone or with finasteride increases physical performance, grip strength, and lean body mass in older men with low serum T. *J Clin Endocrinol Metab* 90 : 1502–1510, 2004
- 25) Vermeulen A, Kaufman JM : Ageing of the hypothalamo-pituitary-testicular axis in men. *Horm Res* 43(1-3) : 25–28, 1995

男 の 更 年 期 障 害

丸 山 修 堀 江 重 郎

I. テ ス ト ス テ ロ ン

男性更年期障害は、partial androgen deficiency in aging male (PADAM) あるいは late onset hypogonadism と呼ばれ、テストステロン補充により治療可能なひとつの疾患概念として認識されてきている。アンドロゲン作用の変化は緩やかであり、その症候はあまり重要視されてこなかった。また、症候を自覚したとしても「歳だから」と考えられ、治療の対象とされてこなかった。しかし、テストステロン補充により男性更年期障害の症状が軽減されることが社会に広く知られるようになり、受診者が急増してきている。米国ではテストステロン製剤の処方箋の数は1999年の90万件から2003年には200万件以上へと急増しており、過去10年間では500%増となっている¹⁾²⁾。その原因はhypogonadism についての理解が進んだことが挙げられるが、実際には400から500万人いるとされるhypogonadism に対して、約5%の患者が治療を受けているにすぎないため、今後も更に増加していくものと考えられる。しかし、加齢男性でのテストステロン補充は小規模な臨床研究しかないために、その効果は若年者の性腺機能低下症に比べて知見に乏しいといわざるをえない。したがってエビデンスが少ない状況で、多くの患者に処方がされていることに対しては、テストステロン製剤の潜在的な副作用も含めて、警鐘が鳴らされている³⁾。本稿では男性更年期障害の問題点と展望について検討する。

II. 男 性 更 年 期 障 害

人口の高齢化にともない、高齢者のQOLが重要視されている。高齢者は、精神的、肉体的に健康で、それまでの人生の経験を社会で生かしていることが、日常よいwell-beingを持つための

帝京大学医学部泌尿器科学教室

大きな要件であることはいうまでもない。加齢に伴ってテストステロン値が低下することからQOL, ADLが低下することが知られているが、これをpartial androgen deficiency in aging male (PADAM), あるいはlate onset hypogonadism (LOH) と呼ぶ⁴⁾⁵⁾。症状を伴ったsymptomatic late onset hypogonadism (SLOH) と、症状を伴わずに偶発的にみつかったasymptomatic late onset hypogonadism (ASLOH) とを区別することは診療上重要である⁶⁾。現在は、前者は治療すべきとされ、後者は治療の必要はないと考えられている。しかし、後に述べるがASLOHも今後重要な課題となると考えられる。米国でのコホート研究であるRancho Bernardo Studyでは60歳以上の健康な男性の半数において血液中のテストステロンレベルが、性腺機能低下症の基準値である350ng/dlよりかなり低い288ng/dl以下であったと報告している⁷⁾。Massachusetts Male Aging Studyでは米国の40歳から69歳では240万人がLOHとされている。1,000人あたり毎年12.3人が新たにLOHとなり、全体では毎年48.1万人がLOHとなる計算である。わが国における頻度は明らかでない。

精巢のLeydig細胞の数は加齢とともに減少する。テストステロン分泌は減少し、LHに対する反応も低下する。一方で、加齢に伴う視床下部-下垂体の変化もある。性腺放出刺激ホルモンに対する下垂体の反応の低下は、よく知られている。健康な加齢男性ではLHパルスの振幅の減少、頻度の減少が生じ、LH刺激が不規則になる。

加齢にともなって変化を生じるホルモンにはテストステロンだけではなく、成長ホルモン(GH)やDHEAなどもあり、女性更年期であるmenopauseのanalogyからテストステロン減少をandropause, GH減少をsomatopause, DHEA減少をadrenopauseと呼ぶこともある。

これらのホルモンの加齢による減少は加齢の必然的なものと考えられることも可能であるが、ホルモン減少によって生じる症候が、ホルモン補充により安全に改善できるのであれば、治療対象となる疾患であると考えられる。これらのホルモンレベルが低値である、先天的疾患での若年者へのホルモン補充は劇的な効果をもたらすが、同じ基準で判断した加齢者で同様な効果がみられるのか、検証する必要がある⁸⁾。GH投与は、薬剤の希少性とまたGHが癌を促進する可能性から臨床では一般的には用いられていない⁹⁾。逆に副腎で産生されるアンドロゲンであるDHEAは合成が容易であることから米国では、臨床エビデンスなくサプリメントとしてドラッグストアで入手することができ、また、その有効性も報告されている¹⁰⁾。

本邦においても、加齢の自覚、職位の変化や職場環境の変化などから心身の変調をきたしやすい40～60歳代の「男性更年期」世代で、精神・心理、身体、性機能についての多彩な愁訴を訴える男性更年期外来を受診する患者が急増している。これらの愁訴が男性ホルモン補充で軽快することがあること、またこれらの患者の多くはテストステロンレベルが基準値以下であることから、テストステロン治療がここ数年盛んになっている。この「男性更年期」患者ではQOLが著しく損なわれていることを特徴とするがADLは低下していない。一方高齢者でのテストステロン低下者では一般に本人からの訴えは少なくQOLの低下は小さいが認知機能の低下や筋力の低下、骨粗しょう症などのためにADLが低下していく。

Ⅲ. テストステロンの生理と薬理の新しい知見

テストステロンは精巣にあるLeydig細胞でpregnenoloneから産生される。その量は1日5gで、不規則に血液中に放出される。日内変動があり、早朝にピークがあり、夜は減少する。アンドロゲン標的細胞の中で、テストステロンは5 α 還元酵素によりジヒドロテストステロン(dihydrotestosterone, DHT)に変換される。テストステロンやDHTは、アンドロゲン受容体に結合して、核内で特異的なDNA結合部位に結合し、生物学的な作用を生じる。テストステロンはアロマトラーゼによってエストロゲンに変換される。

正常な男性ではテストステロン2%が非結合型でフリーテストステロンとして存在する。30%は

性ホルモン結合グロブリン(sex-hormone-binding globulin)に結合しており、残りはアルブミンや他のタンパク質に結合して存在している。フリーテストステロンとアルブミン結合型テストステロンはbioavailable testosteroneと呼ばれ、生理活性をもつ。

テストステロンの生理作用については、アンドロゲンレセプターのノックアウトマウスあるいは若年男性の低テストステロン血症における検討から、テストステロンは筋肉、骨、血管、脂質代謝、性機能など、広範な臓器の機能に関係することがすでに知られている。性分化、性腺の発達にも重要である。男性の性機能だけでなく、女性の性機能にも影響している。テストステロンは、正常な性欲、射精、勃起に不可欠であるが、個体差があり、性機能の障害には個別の閾値があると考えられている。また近年テストステロンの中枢への作用が注目されている。ストレス応答の一環として視床下部で産生されるCRHはLH-RHの産生を抑えることからLHが減少し、テストステロンが低下する¹¹⁾。「男性更年期外来」での患者の多くは、LHの上昇を見ないテストステロン低下症であるため、おそらくCRH優位なのではないかと考えられる。またテストステロンはACTH産生を抑えて、cortisolレベルの上昇を抑制することからテストステロンにはストレス耐性の作用があると考えられる。脳内にはaromataseおよび5 α -reductase活性があり、テストステロンはエストロゲンやDHTへ代謝されて作用していると考えられている¹²⁾¹³⁾。またテストステロンはニューロンでもNO産生を促すことにより、神経末端でのモノアミン代謝に関与していることが知られてきている¹⁴⁾。asymmetric dimethylarginine (ADMA)はNO産生を抑制する¹⁵⁾。

副腎からはDHEA、DHEASとアンドロステンジオンが産生される。それらは末梢でテストステロンやDHTに変換される。女性においては、この経路がテストステロンの濃度を規定する。男性では1日当たり、副腎でDHEAが3～4mg、DHEASが7～14mg、アンドロステンジオンが1～1.5mg産生される。これらの性ステロイドは血液中ではほとんどがタンパクと結合している。DHEA、DHEAS、アンドロステンジオンの90%はアルブミンと結合しており、3%はSHBGと結合している。副腎から産生されるDHEASは循

表 1 熊 本 症 状 調 査 票

	ほとんどない	ややある	かなりある	特につらい
1 体調がすぐれず、気難しくなりがち	1	2	3	4
2 不眠になやんでいる	1	2	3	4
3 不安感・さびしさを感じる	1	2	3	4
4 くよくよしやすく、気分が沈みがち	1	2	3	4
5 ほてり、のぼせ、多汗がある	1	2	3	4
6 動悸、息切れ、息苦しいことがある	1	2	3	4
7 めまい、吐き気がある	1	2	3	4
8 疲れやすい	1	2	3	4
9 腰痛、手足の関節の痛み	1	2	3	4
10 頭痛、頭が重い、肩こりがある	1	2	3	4
11 手足がこわばる	1	2	3	4
12 手足がしびれたり、ピリピリする	1	2	3	4
13 尿が出にくい、出終わるまでに時間がかかる	1	2	3	4
14 たびたびに夜中にトイレにおきる	1	2	3	4
15 尿意を我慢できなくなり、漏らしたりする	1	2	3	4
16 性欲が減退したとを感じる	1	2	3	4
17 勃起力が減退したとを感じる	1	2	3	4
18 セックスの頻度	2週間に1~2回以上 月に1~2回 月1回未満			全くない

環中で最も多い副腎由来の性ステロイドであるが、その濃度は年齢に依存している。男女とも20~30歳代で最も多いとされている。70代ではピーク時の五分の一である。

DHEASの特異的なはたらきは、まだ明らかではない。牛の血管内皮細胞にはDHEA特異的なレセプターが存在しているとされるため、特に陰茎など血管系ではDHEAのはたらきを見直す必要がある。

IV. 「男性更年期外来」と PADAM の 診断

現在疲労、健康感の減少、抑うつ、いらつき、記憶力の低下、認知機能低下、性欲低下、性機能低下、筋肉痛、筋力低下、骨密度の低下、ほてり、発汗過多などの多彩な愁訴を持つ患者がQOLの低下を訴えて「男性更年期外来」を受診している。午前9時から11時程度までの間に採血を行い、総テストステロンが200ng/ml以下の場合には低テストステロン血症と判断してよい。それより若干高値であった場合には、フリーテストステロンや他の内分泌プロファイルを考慮する必要がある。このため、われわれの男性更年期外来では、身体所見に加えテストステロン、フリーテストステロン値に加え、ゴナドトロピン、プロラクチン、コーチゾールなどの内分泌プロファイルと症状調査票により診断と重症度判定を行っている。他の内分泌疾患との鑑別は重要である。われわれは

表 2 熊本症状調査票と AMS との相関

熊本症状調査票	AMS	合計	身体	心理	性
	合計		.844	.856	.851
身体		.635	.673	.641	.635
心理		.856	.838	.912	.856
性		.670	.613	.591	.670

P<.0001

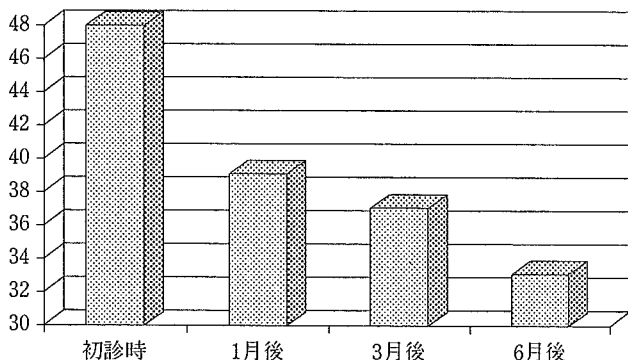
最近、疲労、倦怠感を訴えた患者でフリーテストステロン値が低下していることから長期間テストステロン補充療法を受けていた患者が、実はACTH単独欠損症であった症例を経験した。したがってPADAMの診断には絶えず鑑別診断を念頭に置く必要がある。症状調査票については現在aging male symptom scoreが世界的に汎用されている¹⁶⁾。内容は精神・心理、身体、性機能についての17項目についてのself-assessment型の症状スコアである。一方熊本は以前より健常者を対象に「健康調査票」での大規模なQOL研究を行ってきたが、そこから得られた結果を元にPADAMについての症状調査票を作成した(表1)。こちら精神・心理、身体、性機能についての質問から構成されている。この両者については、トータルのスコアおよび、領域別のスコアは男性更年期外来受診者では強い相関があることがわかった(表2)¹⁷⁾。因子分析を行ってみるとAMSについては、各領域の独立性が低く、トータルの

(a) Rotated Factor Pattern				(b) Rotated Factor Pattern			
質問	Factor1	Factor2	Factor3	質問	Factor1	Factor2	Factor3
1	<u>0.77968</u>	0.28237	0.22279	1	<u>0.75167</u>	0.27391	0.29840
2	-0.03210	0.29887	<u>0.51119</u>	2	<u>0.61789</u>	0.21487	0.10756
3	0.33721	-0.28206	<u>0.47143</u>	3	<u>0.77095</u>	0.27265	0.08469
4	<u>0.71089</u>	0.23783	-0.22951	4	<u>0.83799</u>	0.28544	-0.03151
5	<u>0.65927</u>	0.01273	0.32794	5	<u>0.28670</u>	<u>0.30906</u>	<u>0.18284</u>
6	<u>0.79815</u>	0.04666	0.13636	6	0.40383	0.26171	<u>0.63924</u>
7	<u>0.86634</u>	0.09015	0.21014	7	0.49097	0.00742	<u>0.59886</u>
8	<u>0.86332</u>	0.00533	0.13567	8	<u>0.62110</u>	0.29832	0.34554
9	<u>0.80179</u>	0.11662	0.27760	9	0.08553	0.24321	<u>0.54614</u>
10	<u>0.53589</u>	0.17839	0.52517	10	<u>0.77482</u>	-0.05369	0.17436
11	<u>0.87268</u>	0.21517	0.13402	11	0.23160	0.16681	<u>0.85578</u>
12	<u>0.22574</u>	<u>0.15304</u>	<u>0.80080</u>	12	-0.04649	0.24668	<u>0.73413</u>
13	<u>0.61007</u>	0.08665	0.56246	13	<u>0.31477</u>	<u>0.65150</u>	<u>0.14116</u>
14	<u>0.05859</u>	<u>0.18215</u>	<u>0.29105</u>	14	<u>0.14776</u>	<u>0.61214</u>	<u>0.41565</u>
15	<u>0.20324</u>	<u>0.83390</u>	<u>0.26505</u>	15	<u>0.04235</u>	<u>0.57032</u>	<u>0.16822</u>
16	<u>0.15389</u>	<u>0.86225</u>	<u>0.01404</u>	16	<u>0.23283</u>	<u>0.63548</u>	<u>0.21335</u>
17	<u>0.16897</u>	<u>0.73909</u>	<u>0.43798</u>	17	<u>0.21554</u>	<u>0.85333</u>	<u>0.09838</u>

身体的因子(ゴチック体) 心理的因子(明朝体) 性的因子(イタリック体)

AMSについては、各領域の独立性が低く、トータルスコアでの症状評価には適切であっても領域別の解析には不適當であることがわかった。一方熊本調査票は領域別の独立性が保たれていることから、質問項目を身体的因子・心理的因子・性的因子の3つの要素に分類することが可能で、領域別の解析に優れている。熊本調査票の質問18は、回答形式が他の質問とことなるため別に扱った。

図 1 Aging males symptoms rating scale (a), 熊本調査票(b) の因子分析結果



AMSは surrogate marker としてすぐれている。

図 2 テストステロン補充療法後の AMS score の推移

スコアでの症状評価には適切であっても領域別の解析には不適當であることがわかった。一方熊本調査票は領域別の独立性が保たれていることから、領域別の解析に優れている(図1)。われわれの検討ではAMSは治療効果を見る surrogate marker としてすぐれていることがわかった(図2)。

V. PADAM と う つ

男性更年期外来受診者の約半数はうつ病で精神

科や心療内科で薬物を投与されていることがわが国の大きな特徴である。加齢男性におけるアンドロゲン濃度とうつ症状の関係を調べた Rancho Bernardo Study では、Beck のうつ病評価尺度(Beck Depression Inventory, BDI)によるうつ症状は男性ホルモンの低下によりスコアが高くなることが報告されている¹⁸⁾。最近男性のうつ病にテストステロン補充が有効であることが注目されている¹⁹⁾。

PADAMでは、筋肉痛、自律神経反応など体の疲労を訴えるほかに、抑うつ症状を呈することが多いが、PADAMとうつ病をどう鑑別するか、またうつ病患者のうつのうちどういうタイプの患者がPADAM症状を訴えるかは明らかではない。そこでわれわれは米国精神医学会の「診断・統計マニュアル(Diagnostic and Stastical Manual) 第IV版」を用い、「大うつ病エピソード」と「気分変調症」を鑑別して、テストステロン補充療法を行う前向き研究を行った。その結果「大うつ病エピソード」に該当する患者は、気分変調症よりもテストステロン補充療法により、症状スコアの改善傾向がみられた²⁰⁾。したがって、「大うつ病エピソード」の患者はテストステロンに対する感

受性が高いか、あるいは、内因性うつ病とされる患者の中に性腺機能低下症による外因性のうつ病が含まれている可能性が示唆される。内分泌環境とうつ病についての臨床研究はまだ多くないが、われわれは「大うつ病エピソード」の患者に対しては性腺機能を調べる必要があると考えている。

VI. ホルモン補充療法の効果

若年性の性腺機能低下症に対しては、ホルモン補充療法が効果を有することは広く知られている¹³⁾。一方で、加齢男性でのテストステロン減少症である PADAM ではホルモン補充療法の効果については、まだ報告が少ないか、あるいは意見の一致をみていない²¹⁾。加齢男性では、体脂肪の減少、筋肉量・筋力の増加が認められたという報告があるものの、その効果は若年男性の性腺機能低下症と比較して小さい²¹⁾²²⁾。

米国の Institute of Medicine では、テストステロン補充の処方量の増加を危惧し、大規模臨床試験が必要としているが実際に数千人程度の試験が可能かは疑問視されている。むしろ proof of principle を示すことができるよい臨床研究を積み重ねていくことが実際的なステップであろう。前立腺癌患者の増加から、テストステロンから代謝されるジヒドロテストステロン (dehydrotestosterone, DHT) が、前立腺癌を誘発させないかが現在大きな関心となっている。DHT の影響を少なくする方法として finasteride との併用療法が報告されており、注目されている。finasteride はテストステロンから DHT に変換する 5 α 還元酵素の Type 1 の機能を阻害することによって DHT の産生を抑制する。finasteride 併用療法は、テストステロン単独と比べると前立腺の重量増加、PSA 増加の効果が少なく、かつテストステロン単独療法と同等に、骨密度を増加させる効果があり、体脂肪を減少させる²³⁾。Type 1 と type 2 の 5 α 還元酵素をとともに阻害する dutasteride の併用はより効果的であると考えられる。また 5 α 還元を受けない合成テストステロンの開発が期待される。しかし脳内にも 5 α 還元酵素が存在することから中枢への作用を期待する場合は 5 α 還元酵素阻害薬の併用が適切か、議論が分かれるであろう。

われわれの経験では PADAM に対してホルモン補充療法を行うと 70~80% の患者で症状スコアが改善し、その効果は治療前の血中テストステロ

ン値によらない。また、うつ病の一部にも効果がある。また、多くの患者ではテストステロン値自体は不変であっても 1 年以内にホルモン補充療法を離脱できることを経験する。このことは PADAM の原因がテストステロン減少だけではないことを示唆する。但し、男性更年期障害を訴えて受診する患者の約半数はうつ病の既往をもち、必ずしもテストステロン減少に起因する症候だけを訴えるわけではないことも考慮しなければならない。

VII. 今後の展望

高齢者の QOL は今世紀の大きな課題であり、それを解く鍵のひとつに性ホルモンがあると考えられる。男性更年期障害の研究は始まったばかりであるが、主症状である心理的症状とうつ病との鑑別が困難なため、受診者の中には多くのうつ病患者が含まれている。うつ病は精神科または心療内科で治療を開始されることが大概であるが、うつ病の診断のため実施する内分泌学的な検査の中にテストステロンの測定が含まれていないことがほとんどである。このため性腺機能低下症によるうつ症状の診断を困難にしていると考えられる。また、加齢にともなう性腺機能低下症では、認知機能、筋力、骨密度、性機能、代謝など ADL や QOL に関わる多くの生体機能の低下が生じうるにもかかわらず、これらを主症状として訴えてくる患者はまだ比較的少ない。60 歳以上の男性の約 20% で性腺機能の低下があるとの報告もあるが²⁴⁾、このことから性腺機能の低下を生じている多くの患者は無症状で、受診する機会をもたないでいると考え、asymptomatic late-onset hypogonadism と呼ぶことができる。これらの患者はホルモン補充療法を実施することで ADL の向上が期待できる可能性があり、今後の男性更年期障害診療の重要な課題である。

文 献

- 1) Pearson, H.: *Hormone therapy: a dangerous elixir?* Nature, 431(7008): p500-501, 2004.
- 2) Tan, R. S. and Salazar, J. A.: *Risks of testosterone replacement therapy in ageing men.* Expert Opin Drug Saf, 3(6): p. 599-606, 2004.
- 3) Rhoden, E. L. and Morgentaler, A.: *Risks of testosterone-replacement therapy and recommendations for monitoring.* N Engl J Med, 350(5): p. 482-492, 2004.
- 4) Gray, A. et al.: *Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts Male Aging Study.* J Clin Endocrinol Metab,

- 73(5): p.1016-1025, 1991.
- 5) Morales, A. and Lunenfeld, B.: *Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. Official recommendations of ISSAM. International Society for the Study of the Aging Male.* Aging Male, 5(2): p.74-86, 2002.
 - 6) Morales, A.: *Testosterone treatment for the aging man: the controversy.* Curr Urol Rep, 5(6): p.472-477, 2004.
 - 7) Barrett-Connor, E. et al.: *Low levels of estradiol are associated with vertebral fractures in older men, but not women: the Rancho Bernardo Study.* J Clin Endocrinol Metab, 85(1): p.219-223, 2000.
 - 8) Jones, R. D., Jones, T. H. and Channer, K. S.: *Replacement therapy, not recreational tonic.* Nature, 432(7016): p.439, 2004.
 - 9) Vance, M. L.: *Can growth hormone prevent aging?* N Engl J Med, 348(9): p.779-780, 2003.
 - 10) Genazzani, A. R. et al.: *Long-term low-dose dehydroepiandrosterone replacement therapy in aging males with partial androgen deficiency.* Aging Male, 7(2): p.133-143, 2004.
 - 11) Rivier, C. and Vale, W.: *Effect of the long-term administration of corticotropin-releasing factor on the pituitary-adrenal and pituitary-gonadal axis in the male rat.* J Clin Invest, 75(2): p.689-694, 1985.
 - 12) Viau, V.: *Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes.* J Neuroendocrinol, 14(6): p.506-513, 2002.
 - 13) Snyder, P. J. et al.: *Effects of testosterone replacement in hypogonadal men.* J Clin Endocrinol Metab, 85(8): p.2670-2677, 2000.
 - 14) Seftel, A. D.: *The positive trophic effects of testosterone on neuronal nitric oxide synthase (nNOS) expression.* J Androl, 18(6): p.745, 1997.
 - 15) Cooke, J. P.: *Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker?* Circulation, 109(15): p.1813-1818, 2004.
 - 16) Heinemann, L. A., Zimmermann, T., Vermeulen, A., Thiel, C.: *A new 'Aging Males' Symptoms' (AMS) rating scale.* Aging Male, 2: p.105-114, 1999.
 - 17) 堀江重郎: *男性更年期外来の治療と症状スコア.* 第4回日本 Aging Male 研究会, 東京, 2004.
 - 18) Barrett-Connor, E., Von Muhlen, D. G. and Kritz-Silverstein, D.: *Bioavailable testosterone and depressed mood in older men: the Rancho Bernardo Study.* J Clin Endocrinol Metab, 84(2): p.573-577, 1999.
 - 19) Orengo, C. A., Fullerton, G. and Tan, R.: *Male depression: a review of gender concerns and testosterone therapy.* Geriatrics, 59(10): p.24-30, 2004.
 - 20) Maruyama, O. et al.: *J Urol*, 2005. in press.
 - 21) Snyder, P. J. et al.: *Effect of testosterone treatment on body composition and muscle strength in men over 65 years of age.* J Clin Endocrinol Metab, 84(8): p.2647-2653, 1999.
 - 22) Tenover, J. S.: *Effects of testosterone supplementation in the aging male.* J Clin Endocrinol Metab, 75(4): p.1092-1098, 1992.
 - 23) Page, S. T. et al.: *Exogenous Testosterone (T) Alone or with Finasteride Increases Physical Performance, Grip Strength, and Lean Body Mass in Older Men with Low Serum T.* J Clin Endocrinol Metab, 2004.
 - 24) Vermeulen, A. and Kaufman, J. M.: *Ageing of the hypothalamo-pituitary-testicular axis in men.* Horm Res, 43(1-3): p.25-28, 1995.

Effect of Smad7 Expression on Metastasis of Mouse Mammary Carcinoma JygMC(A) Cells

Haruhito Azuma, Shogo Ehata, Hideyo Miyazaki, Tetsuro Watabe, Osamu Maruyama, Takeshi Imamura, Takeshi Sakamoto, Satoshi Kiyama, Yuko Kiyama, Takanobu Ubai, Teruo Inamoto, Shiro Takahara, Yuko Itoh, Yoshinori Otsuki, Yoji Katsuoka, Kohei Miyazono, Shigeo Horie

Background: Transforming growth factor β (TGF- β) facilitates metastasis during the advanced stages of cancer. Smad6, Smad7, and c-Ski block signaling by the TGF- β superfamily proteins through different modes of action. We used adenovirus-mediated gene transfer of these natural inhibitors in a mouse model of breast cancer to examine the roles of TGF- β superfamily signaling in tumor growth and metastasis. **Methods:** We systemically administered, by intravenous injection, adenoviruses (AdCMV) containing the mouse cDNAs for Smad7, Smad6, c-Ski, the c-Ski mutant c-Ski (ARPG), or LacZ (control) to nude mice (>19 mice/group) bearing tumors derived from mouse mammary carcinoma JygMC(A) cells, which spontaneously metastasize to lung and liver, and examined their effects on survival and metastasis. High-throughput western blotting analysis was used to examine the expression levels for 47 signal transduction proteins in JygMC(A) cells and primary tumors. We also investigated the proliferation, migration, and invasion of JygMC(A) cells that stably overexpressed Smad6 or Smad7. Nonparametric comparisons were done by Kruskal-Wallis H statistic and Wilcoxon's rank sum tests. Parametric comparisons were done by one-way analysis of variance or two-sided unpaired Student's *t* tests. All statistical tests were two-sided. **Results:** Control mice bearing tumors derived from JygMC(A) cells showed many metastases to the lung and liver; all animals died by 50 days after cell inoculation. By contrast, mice treated with AdCMV-Smad7 or AdCMV-c-Ski demonstrated a dramatic decrease in metastasis and statistically significantly longer survival than control mice (Smad7 versus LacZ: medium survival = 55 days versus 41 days, difference = 14 days [95% confidence interval {CI} = 6 days to 22 days], $P < .001$), whereas mice treated with AdCMV-Smad6 or AdCMV-c-Ski (ARPG) did not. Expression of Smad7 in JygMC(A) cells was associated with increased expression of major components of adherens and tight junctions, including E-cadherin, decreased expression of N-cadherin, and decreases in the migratory and invasive abilities of the JygMC(A) cells. **Conclusion:** Smad7 inhibits metastasis, possibly by regulating cell-cell adhesion. Systemic expression of Smad7 may be a novel strategy for the prevention of metastasis of advanced cancers. [J Natl Cancer Inst 2005;97:1734-46]

Transforming growth factor β (TGF- β) signaling has two distinct and opposite roles in tumor progression and metastasis (1-3). During the early stages of carcinogenesis, TGF- β signaling suppresses tumor cell growth. For example, some gastrointestinal tumors have mutations in genes encoding components of the

TGF- β signaling pathway, and those mutations are associated with the aberrant growth of cancer cells (4,5). However, as carcinogenesis proceeds and tumor cells begin to escape from TGF- β -induced growth arrest, TGF- β accelerates tumor progression and metastasis (6-9). In fact, increased expression of TGF- β has been found in many human cancers relative to nontransformed cells, and the level of TGF- β is statistically correlated with enhanced invasion and metastasis of tumors [reviewed in Derynck et al. (8)].

Members of the TGF- β superfamily, which include TGF- β , activin, and bone morphogenetic proteins (BMPs), transmit their signals through Smad proteins (4,10). Signals from TGF- β and activin are transduced through two receptor-regulated Smad proteins (R-Smads), Smad2 and Smad3, whereas signals from BMPs are transduced through other R-Smads (i.e., Smad1, Smad5, and Smad8). Smad4 is a common-partner Smad (Co-Smad) that forms complexes with activated R-Smads. The R-Smad and Co-Smad complexes translocate into the nucleus, where they regulate transcription of target genes (e.g., plasminogen activator inhibitor 1 [PAI-1]). By contrast, Smad6 and Smad7 inhibit intracellular signaling by the TGF- β superfamily proteins, mainly by interacting with activated type I receptors for the TGF- β superfamily proteins. Smad6 predominantly inhibits BMP signaling, whereas Smad7 inhibits both TGF- β and BMP signaling.

Positive and negative regulation of target gene transcription by TGF- β is mediated by the binding of Smads to transcriptional coactivators and corepressors, respectively (11). The proto-oncogene protein c-Ski is a transcriptional corepressor that interacts

Affiliations of authors: Department of Urology (HA, TS, SK, Y. Kiyama, TU, T. Inamoto, Y. Katsuoka) and Department of Anatomy and Biology (YI, YO), Osaka Medical College, Takatsuki, Osaka, Japan; Department of Molecular Pathology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan (SE, HM, TW, KM); Department of Urology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan (SE); Department of Urology, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan (OM, SH); Department of Biochemistry, The Cancer Institute of the Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan (SE, T. Imamura, KM); Department of Urology, Osaka University, School of Medicine, Osaka, Japan (ST).

Correspondence to: Kohei Miyazono, MD, Department of Molecular Pathology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan (e-mail: miyazono-ind@umin.ac.jp).

See "Notes" following "References."

DOI: 10.1093/jnci/dji399

© The Author 2005. Published by Oxford University Press. All rights reserved. The online version of this article has been published under an Open Access model. Users are entitled to use, reproduce, disseminate, or display the Open Access version of this article for non-commercial purposes provided that: the original authorship is properly and fully attributed; the Journal and Oxford University Press are attributed as the original place of publication with the correct citation details given; if an article is subsequently reproduced or disseminated not in its entirety but only in part or as a derivative work this must be clearly indicated. For commercial re-use, please contact: journals.permissions@oxfordjournals.org.

strongly with Smad2, Smad3, and Smad4 but only weakly with Smad1 and Smad5 (12–14). c-Ski suppresses signaling of both TGF- β and BMPs through its binding to Smad proteins and recruitment of histone deacetylases by means of N-CoR and mSin3A (15–17). A mutant form of c-Ski, c-Ski (ARPG), which has an insertion of four amino acids (Ala–Arg–Pro–Gly), inhibits signaling by TGF- β but not by BMPs because of its lack of binding to Smad4 (17,18).

In this study, we used adenovirus-mediated gene transfer to modulate TGF- β signaling in an established mouse model of breast cancer to elucidate the roles of TGF- β superfamily signals in cancer growth and metastasis (19).

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Reagents

JygMC(A) cells, which spontaneously metastasize to lung and liver when inoculated subcutaneously into nude mice, were originally isolated from a mammary carcinoma that arose in a Chinese wild mouse (*Mus musculus* Sub-Jyg) (19). The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (Sigma, St. Louis, MO) containing 10% fetal calf serum (FCS) and 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (GIBCO, Grand Island, NY). We established JygMC(A) cells that stably overexpressed mouse Smad6, Smad7, or neither by transfecting the cells with expression plasmids pCAG-IP-Smad6, pCAG-IP-Smad7, or pCAG-IP-empty (20), respectively, using FuGENE6 reagent according to the manufacturer's instructions (Roche, Indianapolis, IL). Transfected cells were cultured for 3 weeks in medium containing 5 μ g/mL puromycin (Sigma), and the puromycin-resistant JygMC(A) cells that remained in culture were then subcloned and maintained in medium containing 5 μ g/mL puromycin. Recombinant human TGF- β 3 and BMP-4 were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN).

Adenoviruses

Recombinant E1-deleted adenoviral vectors carrying mouse cDNAs encoding Smad6 (AdCMV–Smad6), Smad7 (AdCMV–Smad7), c-Ski (AdCMV–cSki), c-Ski (ARPG) (AdCMV–c-Ski[ARPG]), or the β -galactosidase (LacZ) reporter gene (AdCMV–LacZ) under control of cytomegalovirus (CMV) promoters were generated and purified as previously described (17,21,22). We used AdCMV–LacZ as control (LacZ), and we also used virus buffer only as another control group (Control).

Adenovirus-Mediated Gene Transfer Into Cells In Vitro and Into Tissues In Vivo

For in vitro experiments, JygMC(A) cells (10^6) were plated and incubated with each adenovirus at various concentrations (1, 10, or 100 multiplicity of infection) for 2 hours with gentle agitation. The cells were incubated for 12 hours after the addition of fresh medium containing 1% FCS. Cells incubated with virus buffer served as controls. For in vivo gene transfer, intravenous administration of each virus was performed through the penile vein. We detected expression of β -galactosidase by incubating adenovirus-infected tissues or cells in 0.2% glutaraldehyde for 10 minutes followed by incubation at 37 °C for at least 4 hours in 1 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-

beta-D-galactopyranoside (X-Gal; Sigma) and observation with a phase-contrast microscope.

In Vivo Experiment With Adenovirus-Mediated Smad6 or Smad7 Expression

JygMC(A) cells (10^7 cells, unless otherwise specified) were inoculated subcutaneously into the flanks of 5-week-old male BALB/c nu/nu mice (Nihon Slc, Shizuoka, Japan). Ten days after the inoculation of the cells, when the primary tumors were approximately 10 mm \times 10 mm, mice were randomly assigned to six groups; mice in each group received an intravenous administration of a virus or virus buffer once weekly (10^9 plaque-forming units/week) until the animals died (30 mice per group for the Smad6, Smad7, LacZ, and Control groups, and 20 mice per group for the c-Ski and c-Ski[ARPG] groups). On days 7, 21, 28, 36, and 42 after adenovirus administration was initiated, we randomly selected mice from each group (total $n > 9$ per group), killed them by administering xylazine (20 mg/kg of body weight) and ketamine (120 mg/kg) in one intraperitoneal injection, and harvested their lungs, livers, and primary tumors for histologic and molecular analyses. The remaining mice from each group (at least 10 mice per group) were used to evaluate survival, which was defined as the time from inoculation of JygMC(A) cells to the time of death. None of the mice had to be killed because of criteria specified in the experimental protocols. All experimental protocols were conducted in accordance with the policies of the Animal Ethics Committee at the Osaka Medical College.

In Vivo Experiment Using JygMC(A) Cells that Stably Express Smad6 or Smad7

To investigate tumor growth and metastasis in mice bearing tumors derived from JygMC(A) cells that stably express Smad6 or Smad7 (Jyg-Smad6 cells and Jyg-Smad7 cells, respectively), we injected 10^7 Jyg-Smad6 cells (Jyg-Smad6 group), Jyg-Smad7 cells (Jyg-Smad7 group), Jyg-Empty cells (Jyg-Empty group), or parental JygMC(A) cells into the flanks of male 5-week-old BALB/c nu/nu mice ($n > 40$ mice/group). In vivo tumor growth, metastasis, and survival times of animals were examined in a same way as they were in the adenoviral experiment.

Analyses of Tumor Growth and Metastasis

Tumors were measured every 3 days in two dimensions: the longest axis (a) and the shortest perpendicular axis (b). We calculated tumor volume (TV) using the formula $0.4 ab^2$ and transformed the resulting absolute values for tumor volume into relative values (v) using the formula V_x/V_0 , where V_0 was the tumor volume on the day adenovirus administration was initiated and V_x was the tumor volume on day x thereafter (23). We evaluated tumor metastasis by counting the number of metastatic colonies in one histologic section of the midportion of each sample of liver and lung from each mouse, by measuring lung and liver weights, and by determining the ratio of the metastatic area to the total area in histologic sections from the midportion of each organ harvested on day 36 after the initiation of the virus administration ($n > 9$ /group). The ratio of metastatic area to total area in the histologic section was calculated by using a public-domain image analysis program (NIH Image; written by Wayne Rasband at National Institutes of Health and

available at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/download.html>). The result was expressed as a percentage.

Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction Analysis

Total RNAs isolated from JygMC(A) cells and from mouse tissues by using an RNeasy Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) were used for first-strand synthesis of cDNAs by using an Omniscript RT kit (QIAGEN). We used a Lightcycler system (Roche Diagnostics), as previously described (24), to perform quantitative real-time reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR) analyses of RNA levels for the mouse genes encoding Smad6 and Smad7, and of target genes of TGF- β superfamily signals, including PAI-1 and inhibitor of differentiation/inhibitor of DNA binding 1 (Id-1), and various cell adhesion molecules, including E-cadherin (Cdh-1), N-cadherin (Cdh-2), α -catenin (Catn- α), β -catenin (Catn- β), nexillin (Nexn), profilin 1 (Pfn-1), gelsolin (Gsn), Occludin (Ocln), and zonula occludens 2 (ZO-2). The primer sequences and PCR conditions are described in Supplemental Table 1 (available at: <http://jncicancerspectrum.oxfordjournals.org/jnci/content/vol97/issue23>).

Western Blot Analysis

JygMC(A) cell pellets or mouse tissues were homogenized and sonicated three times for 3 seconds each on ice in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer. The lysates were centrifuged (at 12 000g for 15 minutes), and their protein concentrations were determined using a bicinchoninic acid (BCA) assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Proteins (equal amounts of lysate loaded per lane) were resolved by sodium dodecyl sulfate (SDS)–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred onto the polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad, Hercules, CA). All gels were stained with Coomassie blue to confirm equal protein loads and homogenous protein transfer. Membranes were incubated with blocking solution (20 mM Tris–HCl [pH 7.5], 100 mM NaCl, 0.1% Triton-X-100, and 3% bovine serum albumin) overnight at 4 °C. The filters were then incubated overnight with the following primary antibodies: rabbit anti–mouse phospho-Smad1/5 antibody, which recognizes the phosphorylated forms of Smad1 and Smad5, (1 : 200 dilution; Cell Signaling Technology, Beverly, MA); rabbit anti–mouse Smad1/5 antibody, which recognizes the phosphorylated and unphosphorylated forms of Smad1 and Smad5, (1 : 200 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); rabbit anti–mouse phospho-Smad2 antibody, which recognizes the phosphorylated form of Smad2, (1 : 200 dilution; United Bio-medical, Hauppauge, MA), and rabbit anti–mouse Smad2/3 antibody, which recognizes the phosphorylated and unphosphorylated forms of Smad2 and Smad3 (1 : 200 dilution; Transduction Laboratories, Lexington, KY). The filters were washed extensively with Tris-buffered saline–0.1% Triton-X (TBST), and immunoreactive bands were visualized by using an enhanced chemiluminescence (ECL) blotting system (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

PowerBlot Western Array Analysis

Total cell extracts from JygMC(A) cells and from the primary tumors from mice in each group harvested on the day 36 after

initiation of the virus injection were processed by the PowerBlot facility (Becton Dickinson Biosciences, Bedford, MA), which determined the expression levels of 47 different signal transduction proteins using a combination of SDS–PAGE (5%–15% gradient acrylamide gels); immunoblotting with specific monoclonal antibodies as revealed by a horseradish peroxidase–conjugated goat anti–mouse secondary antibody; capture of chemiluminescence data by a charge-coupled device camera; and computerized processing of densitometric data (for details about the methodology, see <http://www.clontech.co.jp/custom/powerblot>). Data were normalized by dividing the signal obtained for each protein by the sum of signals obtained for all 47 proteins for one given sample. Proteins whose expression levels in two initial PowerBlot analyses varied by at least 20% were subjected to a third independent analysis to verify their expression levels.

Cell Growth, Migration, and Invasion Assays

For cell growth assays, we plated JygMC(A) cells, Jyg–Smad6 cells, or Jyg–Smad7 cells in six-well plates in fresh medium (10^4 cells/well), incubated the cells at 37 °C for 72 hours, and then determined the number of cells per well. For migration assays, we prepared 80% confluent monolayers of each cell line and infected cells with each adenovirus. A wound was incised in cultured cells of each dish for 24 hours after infection with each virus, and the edge of the wound was marked on the bottom of each well, as previously described (25). After another 24 hours, photographs were taken while viewing the cells by phase-contrast microscopy. We counted only the cells that had migrated into the midportion of each trisected wound area to exclude the influence of cell growth at the edge of wounded area. In vitro invasion assays were performed using BioCoat Matrigel Invasion Chambers (Becton-Dickinson Bioscience) according to the manufacturer's instructions. In brief, JygMC(A) cells were cultured for 24 hours in medium containing 1% FCS and then seeded into the transwell insert chamber with a filter coated with Matrigel, and the inserts were placed in the lower chambers, which were filled with medium containing 5% FCS. The cells were incubated for 12 hours, after which we counted the cells that had invaded the lower side of the filter in at least 10 fields of view of a phase-contrast microscope. All assays (i.e., the cell growth, migration, and invasion assays) were done in triplicate, and two independent experiments were performed.

Statistical Analysis

We used the Kruskal–Wallis H statistic to compare tumor metastasis data from multiple groups of mice, including organ weight, number of metastatic colonies, and the ratio of metastatic area to total area, as well as in vitro data from JygMC(A) cells infected with each adenovirus tested in the cell growth, migration, and invasion assays. When the *P* values for the overall comparisons were less than .05, we performed posthoc pairwise comparisons by using Wilcoxon's rank sum test. Unpaired Student's *t* tests were performed for parametric comparisons between two groups (assumptions of the test were verified). Parametric comparisons among more than two groups were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) without replication. When the ANOVA result was statistically significant, posthoc pairwise comparisons were performed by

using the Scheffe test (26). Mouse survival was evaluated by Kaplan–Meier analysis and the log rank test. *P* values less than .05 were considered statistically significant. All statistical tests were two-sided.

RESULTS

Effect of Systemic Smad7, Smad6, c-Ski, and c-Ski (ARPG) Expression on Metastasis of JygMC(A) Cells

Mice bearing tumors derived from injection of JygMC(A) cells were treated with intravenous administration of AdCMV–Smad7 (Smad7 group, *n* = 30), AdCMV–Smad6 (Smad6 group, *n* = 30), AdCMV–c-Ski (c-Ski group, *n* = 20), AdCMV–c-Ski (ARPG) (c-Ski [ARPG] group, *n* = 20), AdCMV–LacZ (LacZ group, *n* = 30), or virus buffer (Control group, *n* = 30). More than half of the mice in the Control and LacZ groups developed metastatic lesions in lung and liver by 3 weeks after virus or virus buffer administration. In these two groups of control mice, metastatic lesions progressed aggressively and diffusely thereafter, and almost all mice developed metastases in these organs by 5 weeks (Fig. 1, A and B).

By contrast, we observed only a few metastatic colonies in the lungs and livers of mice treated with systemic gene transfer of Smad7 or c-Ski 5 weeks after adenovirus administration (Lung: Smad7 versus Control, median number of colonies = 13 versus 128, difference = 115 [95% confidence interval {CI} = 104 to 130], *P* < .001; Smad7 versus LacZ, median number of colonies = 13 versus 124, difference = 111 [95% CI = 92 to 147], *P* < .001; c-Ski versus Control, median number of colonies = 12 versus 128, difference = 116 [95% CI = 100 to 138], *P* = .0022; c-Ski versus LacZ, median number of colonies = 12 versus 124, difference = 112 [95% CI = 92 to 154], *P* = .0026; Liver: Smad7 versus Control, median number of colonies = 2.2 versus 15, difference = 12.8 [95% CI = 6.0 to 19], *P* < .001; Smad7 versus LacZ, median number of colonies = 2.2 versus 19.8, difference = 17.6 [95% CI = 6.0 to 22], *P* = .001; c-Ski versus Control, median number of colonies = 3.5 versus 15, difference = 11.5 [95% CI = 4.0 to 20], *P* = .0073; c-Ski versus LacZ, median number of colonies = 3.5 versus 19.8, difference = 16.3 [95% CI = 4.0 to 23], *P* = .0084) (Fig. 1, A and B). The lungs and livers of mice in the Smad7 and c-Ski groups weighed statistically significantly less than the respective organs of mice in the Control and LacZ groups (Lung: Smad7 versus Control, median weight = 0.184 g versus 1.026 g, difference = 0.842 g [95% CI = 0.646 g to 0.913 g], *P* < .001; Smad7 versus LacZ, median weight = 0.184 g versus 1.007 g, difference = 0.823 g [95% CI = 0.646 g to 0.982g], *P* < .001; c-Ski versus Control, median weight = 0.213 g versus 1.026 g, difference = 0.813 g [95% CI = 0.478 g to 0.886 g], *P* < .001; c-Ski versus LacZ, median weight = 0.213 g versus 1.007 g, difference = 0.794 g [95% CI = 0.444 g to 0.957 g], *P* = .0013; Liver: Smad7 versus Control, median weight = 1.411 g versus 2.297 g, difference = 0.886 g [95% CI = 0.679 g to 1.007 g], *P* < .001; Smad7 versus LacZ, median weight = 1.411 g versus 2.223 g, difference = 0.812 g [95% CI = 0.657 g to 1.069 g], *P* < .001; c-Ski versus Control, median weight = 1.567 g versus 2.297 g, difference = 0.73 g [95% CI = 0.598 g to 1.039 g], *P* < .001; c-Ski versus LacZ, median weight = 1.567 g versus 2.223 g, difference = 0.656 g [95% CI = 0.573 g to 1.015 g], *P* < .001) (Fig. 1, C). A quantitative evaluation of the extent of metastasis, which we performed by calculating the ratio of

metastatic area to total area in histologic sections of lung and liver, confirmed this apparent decrease in metastasis (Lung: Smad7 versus Control, median ratio = 6.41% versus 48.3%, difference = 41.9% [95% CI = 23.7% to 46.0%], *P* < .001; Smad7 versus LacZ, median ratio = 6.41% versus 46.7%, difference = 40.3% [95% CI = 24.0% to 51.5%], *P* < .001; c-Ski versus Control, median ratio = 8.91% versus 48.3%, difference = 39.4% [95% CI = 20.5% to 44.7%], *P* < .001; c-Ski versus LacZ, median ratio = 8.91% versus 46.7%, difference = 37.8% [95% CI = 23.8% to 51.2%], *P* < .001; Liver: Smad7 versus Control, median ratio = 2.15% versus 15.0%, difference = 12.9% [95% CI = 9.77% to 19.3%], *P* < .001; Smad7 versus LacZ, median ratio = 2.15% versus 19.8%, difference = 17.7% [95% CI = 13.4% to 22.8%], *P* < .001; c-Ski versus Control, median ratio = 3.48% versus 15.0%, difference = 11.5% [95% CI = 6.76% to 22.0%], *P* < .001; c-Ski versus LacZ, median ratio = 3.48% versus 19.8%, difference = 16.3% [95% CI = 8.16% to 21.9%], *P* = .001) (Fig. 1, D). By contrast, mice treated with systemic gene transfer of Smad6 or c-Ski (ARPG) had many metastases in lung and liver (Fig. 1, A). In fact, there were no statistically significant differences in metastatic colony number, organ weight, or metastatic area in the lung and liver among Smad6-treated, c-Ski (ARPG)-treated, and control mice (Fig. 1, B–D).

Representative macroscopic and microscopic images of hematoxylin–eosin-stained sections of lung and liver from mice that were killed after 5 weeks of treatment with AdCMV–Smad7 or AdCMV–Smad6 and from Control (virus buffer) mice are shown in Fig. 1, E. In control mice, we observed more than 100 metastatic lesions (i.e., hematoxylin–eosin-stained areas) in a lung section, and more than 20 metastatic lesions in a liver section from each mouse (*n* = 10 or more sections/group). Microscopic observation revealed aggressive cancer growth, with structural deformity in each organ (Fig. 1, E, left panels). By contrast, in the mice treated with AdCMV–Smad7, only minute metastatic lesions were observed macroscopically, and only a few cancer cells were observed at higher resolution, both in lung and liver (Fig. 1, E, middle panels). However, mice treated with AdCMV–Smad6 showed many metastases (Fig. 1, E, right panels), similar to what we observed in the control mice. There were no statistically significant differences in primary tumor growth among all groups of mice examined, and in all mice, subcutaneously inoculated tumor cells became bulky masses by 35 days after inoculation (Fig. 1, F).

Effect of Systemic Gene Transfer of Smad7 or c-Ski on Mouse Survival

We evaluated the survival of mice that received the various systemic treatments from the time of JygMC(A) cell inoculation to the time of death due to the lung and liver metastasis (*n* > 10 mice per group). Among the control mice (LacZ and Control), more than 50% of the mice in each group (LacZ: 13 of 15 mice; Control: 10 of 15 mice) died within 43 days of JygMC(A) cell inoculation with marked body weight loss and cachexia; no mice survived beyond 50 days (Fig. 1, G). There was no difference in median survival between mice treated with AdCMV–LacZ and Control mice (i.e., mice treated with virus buffer; *P* = .37). By contrast, mice systemically treated with AdCMV–Smad7 or AdCMV–c-Ski lived statistically significantly longer than mice in each of the control groups (Smad7 versus LacZ: median survival = 55 days versus 41 days,