

表1 DHEA25mg服用時(N=11)の主要ホルモンの変動

		0週	4週	12週	24週
DHEA-S( $\mu$ g/dl)	平均	185.8	393.8**	378.8**	340.3**
	標準偏差	64.7	140.1	163.5	120.8
$\Delta$ 4-A (ng/ml)	平均	2.127	2.864*	3.045	2.936
	標準偏差	0.427	0.922	1.481	1.289
Testosterone (ng/dl)	平均	430.5	443.0	459.1	490.3*
	標準偏差	188.4	208.8	190.9	219.0
E2 (pg/ml)	平均	25.7	31.1*	30.3	30.5
	標準偏差	7.4	7.9	11.0	15.0
Cortisol ( $\mu$ g/dl)	平均	14.4	14.6	16.2	13.1
	標準偏差	4.7	4.4	4.0	5.2
IGF-1(ng/ml)	平均	162.2	168.6	168.4	165.9
	標準偏差	37.80	43.99	38.68	43.21

\*P<0.05, \*\*P<0.01 vs 0週

表2 DHEA 25mg服用時 (N=11) の主な代謝関連マーカーの変動

	0週	4週	12週	24週	
FBS (mg/dl)	平均	114.8	104.3	110.8	110.5
	標準偏差	25.3	31.0	31.1	25.8 <sup>a</sup>
HbA <sub>1c</sub> (%)	平均	5.38	5.30	5.30	5.29
	標準偏差	0.94	1.0	0.95	0.87
HOMA-R	平均	2.66	1.87	2.14	2.50
	標準偏差	1.71	1.38	1.46	1.57
LDL (mg/dl)	平均	134.4	135.9	136.5	137.7
	標準偏差	20.2	15.9	16.2	18.2
HDL (mg/dl)	平均	61.5	62.5	64.6	64.3
	標準偏差	11.7	11.4	13.6	11.3
遊離脂肪酸 (mEq/L)	平均	0.47	0.46	0.41	0.35
	標準偏差	0.17	0.15	0.14	0.09 <sup>b</sup>
アディポネクチン ( $\mu$ g/ml)	平均	7.9	8.4	7.6	7.9
	標準偏差	4.3	4.8	3.8	4.0

<sup>a</sup>p=0.06 vs 0 週    <sup>b</sup>p=0.07 vs 0 週

表3 相関性

パラメーター	DHEA-Sとの 相関係数	血中テストステロン との相関係数
adiponectin	R=0.140	R=0.796
	P=0.331	P<0.001
IRI	R=-0.023	R=-0.519
	P=0.872	P<0.001
CPR	R=-0.081	R=-0.620
	P=0.582	P<0.001
HOMA-R	R=-0.015	R=-0.554
	P=0.920	P<0.001
遊離脂肪酸	R=0.036	R=-0.414
	P=0.808	P=0.003

(n=49)

「高齢者骨粗鬆症に対するアンドロゲン補充療法の効果」

分担研究者 山田思鶴 老人保健施設まほろばの郷 施設長

研究要旨： 外来通院中、あるいは介護施設入所中の高齢者骨粗鬆症患者に 6 ヶ月間の DHEA 補充療法（25 mg/日内服、4 例）を実施し、非補充の対照群 15 例と比較検討した。対照群では大腿骨骨密度が  $0.656 \pm 0.149 \text{ g/cm}^2$  から  $0.643 \pm 0.15 \text{ g/cm}^2$  と有意に低下したのに対し、DHEA 投与群では大腿骨骨密度が  $0.355 \pm 0.099 \text{ g/cm}^2$  から  $0.588 \pm 0.097 \text{ g/cm}^2$  と増加傾向を示した。DHEA 補充療法により問題となる有害事象はみられなかった。

A. 研究目的

高齢男性におけるアンドロゲンの低下は、性欲低下・うつ症状といったいわゆる男性更年期障害や肥満、高脂血症、骨粗鬆症などの生活習慣病、さらに動脈硬化性疾患や認知症の発症にも関連することが指摘されるようになった。しかし、女性の閉経と異なり男性における性ホルモンの経年的低下は徐々に起きることから、アンドロゲン低下とそれに伴う異常をどのように捉えるかについて一定の見解は得られていない。また、主に性腺由来のテストステロンと副腎由来の dehydroepiandrosterone (DHEA) のどちらが重要であるのかも不明である。一方、高齢女性でもアンドロゲンは経年的に低下するが、その意義はよくわかっていない。さらに、閉経後女性に対する女性ホルモン補充療法の有効性は、心筋梗塞・脳卒中の増加、乳癌の増加など有害事象の増加を主な理由に 2002 年に発表された大規模試験 Women's Health Initiative では否定され、新たなホルモン補充療法の可能性が模索されている。

副腎由来アンドロゲンの

Dehydroepiandrosterone (DHEA) は、力価が弱く有害作用の危険が少ないため、欧米では抗老化サプリメントとして用いられる他、認知機能改善効果も報告されている。われわれは、これまでに虚弱高齢女性における血清 DHEA 濃度の低下が認知機能障害や日常生活障害と関連することを示しており、高齢女性の認知機能、ADL に対し、少量 DHEA 投与が改善効果を有する事を 6 か月間の非ランダム化オープン比較試験によって明らかにした。今年度は、DHEA 投与による認知機能以外の改善効果について検討するため、高齢者骨粗鬆症に着目し、骨密度の観点から解析した結果を報告する。

B. 研究方法

骨粗鬆症で桔梗ヶ原病院通院中、あるいは介護施設入所中の高齢者 4 名（男性 1 名、女性 3 名（78～93 歳））に対し DHEA カプセル（米国アテナクリニクス社）25 mg/日の投与を 6 か月間行った。投与前、投与 3 か月後、6 か月後に血液検査（早朝空腹時）と日常生活機能評価を実施した。血液検査では、総および遊離テストステロン、

DHEA(S)、エストラジオール、血算、一般生化学（脂質含む）、空腹時血糖、HbA1c、インスリンを測定した。日常生活機能としては、Geriatric Depression Scale、Barthel index、手段的 ADL (Lawton)、認知機能（HDS-R および Mini-mental state examination）、Vitality index を測定した。骨密度測定については、骨密度測定装置（Lunar Prodigy、GE Healthcare 社）を用いて DHEA 投与前、投与 6 ヶ月後にそれぞれ実施した。

また、対照として、介護施設入所中の DHEA 非投与の高齢者 15 名（70-93 歳、平均 80±6 歳）に同様な評価を行った。

（倫理面への配慮）研究は施設の倫理委員会による承認を得て実施し、試験への参加について本人から書面の同意を得て行った。

### C. 研究結果

大腿骨骨密度については、対照群では 6 か月間に  $0.656 \pm 0.149 \text{ g/cm}^2$  から  $0.643 \pm 0.15 \text{ g/cm}^2$  と有意に低下したのに対して、DHEA 補充療法群の骨密度は治療前 ( $0.355 \pm 0.099 \text{ g/cm}^2$ ) に比べて 6 か月後に増加傾向 ( $0.588 \pm 0.097 \text{ g/cm}^2$ ) を示した。

また試験期間中、DHEA 補充療法群に臨床検査値異常や自覚的有害事象などはみられなかった。

### D. 考察

われわれはこれまでに、虚弱高齢男性におけるテストステロン濃度の低下が日常生活機能の全般的低下、さらには生命予後の悪化つながることや、虚弱高齢男性に対するテストステロン補充療法が軽度認知機能障害を改善したことを報告した。一方、虚

弱高齢女性では、テストステロンやエストロゲンではなく DHEA 濃度が認知機能や ADL と関連することを我々は明らかにしてきており、虚弱高齢女性の生活機能増進のためのホルモン補充療法としては、DHEA 補充が適当ではないかと考えている。

今回の報告では、これまでに報告してきた DHEA 補充療法導入による認知機能、ADL に対する改善効果に加えて、主要な老年病、生活習慣病でもある高齢者骨粗鬆症に対する影響を検討するため、骨密度測定、解析を行った。その結果、介護施設入所中の DHEA 非投与群では 6 ヶ月間の間に有意な大腿骨骨密度の低下を認めたが、DHEA 補充群 4 例では骨密度の増加傾向を認めた。また本研究実施期間中に、DHEA 補充群において自覚的有害作用や肝障害など臨床検査値異常はみられなかった。

これまでに、虚弱高齢女性に対する 6 か月間の DHEA 補充療法により、認知機能、ADL が改善された結果を報告してきたが、本研究結果により骨粗鬆症を有する高齢者において、骨密度改善効果も有する可能性が示された。今後、対象者数を増やしていくことで、骨密度に対して DHEA 補充による有意な効果改善が認められるか確認していく予定である。また大腿骨、腰椎、全身などの部位別骨密度変化、骨型アルカリフォスファターゼや尿中 I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド (NTx) などの測定による骨代謝マーカーの変化についても今後解析を進めていく。

今回、無作為に補充療法と対照群とを割り付けた訳ではないので、潜在的な交絡因子が否定できない。できれば無作為比較試験により今回の結果を確認するべきであろう。また、少なくとも、開始時の背景をマッチ

させるべく、次年度以降にDHEA補充群や対照群を多く組み入れていく必要がある。

#### E. 結論

高齢者骨粗鬆症に対する少量のDHEA補充療法により、認知機能、ADLの改善効果の他に、大腿骨骨密度も改善される可能性が示唆された。今後、無作為比較試験および大規模試験の実施が望ましい。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

該当なし

##### 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1) 山田思鶴、浜 達哉、井上慎一郎、小島太朗、秋下雅弘、大内尉義、神崎恒一、鳥羽研二：介護予防基本チェックリストを用いた特定高齢者の生活機能の検討。日本老年医学会学術集会，札幌，2007.6.20

2) 浜 達哉、堰面雄一、井上慎一郎、山田思鶴、山口 潔、秋下雅弘、大内尉義、神崎恒一、鳥羽研二：特定高齢者における転倒予防プログラムの参加希望と問題点。日本老年医学会学術集会，札幌，2007.6.20

3) 林 秀生、白沢英一郎、浜 達哉、井上慎一郎、山田思鶴、神崎恒一、秋下雅弘、大内尉義、鳥羽研二：通所サービスの利用による閉じこもり予防・支援と認知機能への効果。日本老年医学会学術集会，札幌，2007.6.20

4) 小川純人、山田思鶴、浜達哉、神崎恒一、秋下雅弘、大内尉義、鳥羽研二：高齢者のボディコンポジションに対する運動療法の長期効果。日本老年医学会学術集会，札幌，2007.6.20

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

研究協力者

東京大学医学部

小川純人

老人保健施設まほろばの郷

浜 達哉

杏林大学医学部

鳥羽研二

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

「閉経後ホルモン補充療法の脂質代謝および血管内皮機能に対する効果」

分担研究者 若槻 明彦 愛知医科大学産婦人科学教室教授

研究要旨：

閉経後ホルモン補充療法を施行する際にエストロゲンに併用する合成型プロゲステンである酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)にはテストステロン作用があり、エストロゲンのHDL上昇作用や血管内皮改善作用に悪影響することを報告した。今回、MPAの有する内皮機能抑制作用の機序を解明する目的で、閉経後女性にエストロゲン単独群とエストロゲンに酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)を2.5あるいは5.0mg併用投与する3群に分別し、血管内皮機能を投与前後で測定するとともに、内因性 NOS inhibitor である asymmetrical dimethylarginine (ADMA)と NO 濃度を測定した。MPAの併用はMPAの用量依存的に血管内皮機能と NO 濃度に抑制的に作用した。一方、エストロゲン単独群で低下した ADMAはMPA併用しても同様であった。従って、MPAの血管内皮抑制作用はADMAを介さないことがあきらかになった。

A. 研究目的

閉経後のエストロゲン濃度の低下は LDL や TG の増加など脂質代謝異常を惹起するとともに血管内皮機能を低下させる作用があることが報告されている。一方、閉経後女性へのエストロゲンの投与は脂質代謝や血管内皮を改善させることも知られている。しかし、2002年の大規模臨床試験の Women's Health Initiative (WHI)によってエストロゲンとプロゲステンを併用したホルモン補充療法(HRT)は心血管疾患(CVD)リスクを増加させることが報告された。しかし、その後の研究でエストロゲン単独ではCVDへの悪影響がないことも報告された。従って、この悪影響は酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)による可能性が考えられる。我々はこれまで、MPAが用量依存的に血管内皮機能に抑制的に作用することを明らかにしてきた。今回は、MPAの血管内皮

抑制作用の作用機序を解明する目的で、内因性 NOS inhibitor である asymmetrical dimethylarginine (ADMA)と NO 濃度を測定し、エストロゲン単独の場合と比較検討した。

B. 研究方法

閉経後女性を対象とし、結合型エストロゲン(CEE)0.625mg/日を3ヶ月間、CEEにMPA 2.5mg/日、5.0mg/日を3ヶ月間併用投与する3群に分別した。投与前後で、  
① 血管内皮機能の指標である flow mediated vasodilation (FMD)を測定した。  
② 内因性 NOS inhibitor である ADMA を測定した。  
③ NO 濃度の指標として亜硝酸/硝酸イオン濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

全ての対象患者からは採血前にインフォー

ムドコンセントをとった。

### C. 研究結果

FMD は CEE 単独群で有意な上昇を示したが、MPA の併用量と用量依存的に低下し、MPA 5.0mg の群で投与前と有意差のないレベルまで低下した。亜硝酸/硝酸イオン濃度も同様に CEE 単独群で上昇したが、MPA の併用量と用量依存的に低下した。一方、ADMA はエストロゲン単独群で低下したが、MPA を併用しても変化はなかった。

### D. 考察

エストロゲンには血管内皮改善作用があることが示された。また、エストロゲンで NO 濃度が上昇することから、NOS 活性を亢進し、エストロゲン自身の抗酸化作用で NO の消費を抑制する可能性が考えられた。また、エストロゲンには内因性 NOS inhibitor の ADMA を抑制することで内皮機能に好影響を与えていることも示された。

しかし、MPA はエストロゲンの NO 上昇作用や血管内皮改善作用に相殺的に作用することが占めされたが、ADMA には影響しなかった。従って、MPA は ADMA を介さず、NO 濃度を低下させ、内皮に抑制的に作用すると考えられた。

### E. 結論

閉経後女性にテストステロン作用を有する MPA を投与すると、血管内皮機能に抑制的に作用することから、閉経後女性のテストステロンは動脈硬化に促進的である可能性が示唆された。また、MPA の内皮抑制機序として、ADMA を介さず NO 濃度を低下させることになることが明らかになった。

F. 健康危険情報  
なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- 1) 若槻明彦. 特集 女性とメタボリックシンドローム / 3. 女性と生活習慣病 4) 女性と高脂血症. 産科と婦人科. 2007;69:449-456
- 2) 若槻明彦. ホルモン補充療法と心血管疾患. 医学のあゆみ. 2007;221:1295-1299
- 3) 若槻明彦. IV. 脂質代謝異常の臨床 高脂血症 高脂血症の管理と治療 特殊療法 ホルモン補充療法. 日本臨床. 2007;65:499-503
- 4) 若槻明彦. 閉経後の高トリグリセリド血症—FIELD スタディが教えるもの—. 臨床婦人科産科. 2007;61:924-927
- 5) 若槻明彦. 心疾患に対する HRT の位置づけ. 日本更年期医学会雑誌. 2007;15:98-102
- 6) 若槻明彦. 特集 更年期の女性医学 / 閉経期の内分泌変化に伴う脂質代謝異常. 産婦人科の世界. 2007;59:797-804
- 7) 若槻明彦. 特集 脂質異常症の臨床的意義—HDL は予防・治療の標的か、指標か— / HDL 代謝の性差. Progress in Medicine. 2007;27:2817-2821

#### 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- 1) 若槻明彦. 招請講演 / 閉経後高脂血症の管理 最近のエビデンスをふまえて. 奈良県産婦人科医会 第 67 回臨床カンファレンス. 2007. 2. 8 奈良



- 2) 若槻明彦. 特別講演/閉経後高脂血症と骨粗鬆症の管理. 第3回北海道更年期研究会. 2007. 2.0 札幌
- 3) 若槻明彦. Opening Lecture/脂質代謝に対するホルモン補充療法の功罪. 東海性差医療・生活習慣病医学研究会. 2007. 4. 7 名古屋
- 4) 若槻明彦. 卒後研修プログラム/WHI報告の問題点とHRTの今後. 第59回日本産科婦人科学会. 2007. 4.14 京都
- 5) 若槻明彦. ランチョンセミナー/閉経後女性に発症する生活習慣病の対策 -骨粗鬆症と高脂血症の予防、治療について-第59回日本産科婦人科学会. 2007. 4.16 京都
- 6) 若槻明彦. 閉経後女性の脂質代謝特性とその管理. 第10回神奈川AI研究会. 2007. 4.21 横浜
- 7) 若槻明彦. 特別講演/新ガイドラインから見た閉経後脂質異常症の管理. 拡大一土会講演会. 2007. 5.17 静岡
- 8) 若槻明彦. 閉経後ホルモン補充療法と動脈硬化. Vascular Disease Forum. 2007. 5.25 名古屋
- 9) 若槻明彦. 特別講演/一般診療における妊婦・更年期女性の取り扱い. 岡崎市医師会学術講演会. 2007. 7. 6 岡崎
- 10) 若槻明彦. 新ガイドラインからみた閉経後脂質異常症の管理. 7月千種区学術講演会. 2007. 7.25 名古屋
- 11) 若槻明彦. 特別講演/これからのホルモン補充療法のあり方 -最近の大規模臨床試験の結果を踏まえて-. 福島県産婦人科医会県中地区勉強会. 2007. 9.20 福島
- 12) 若槻明彦. 特別講演/これからのホルモン補充療法のあり方 -最近の大規模臨床試験の結果を踏まえて-. 北九州産婦人科講演会 2007.10.16 福岡
- 13) 若槻明彦. 医療現場におけるHRTの実際. ウイメンズヘルスケア事業部 MR研修. 2007.10.18 大阪
- 14) 若槻明彦. 特別講演/閉経後生活習慣病の治療・予防戦略. 沼津市医師会学術講演会. 2007.10.25 静岡
- 15) 若槻明彦. 特別講演/閉経後ホルモン補充療法と心血管のリスク・ベネフィット. 道南産科婦人科医会. 2007.11. 2 北海道
- 16) 若槻明彦. 特別講演/これからのホルモン補充療法のあり方 -最近の大規模臨床試験の結果を踏まえて-. 和歌山市 伊那・伊賀郡産婦人科合同研修会. 2007.11.10 和歌山
- 17) 若槻明彦. ランチョンセミナー「日本女性のクオリティーエイジング(QA)を考える-新しい選択肢から見る婦人科ビジネスの展望-」/日本女性のクオリティーエイジング(QA)とエストロゲン. 第22回日本更年期医学会学術集会. 2007.11.17 東京
- 18) 若槻明彦. 特別講演/これからのホルモン補充療法のあり方 -最近の大規模臨床試験の結果を踏まえて-. 平成19年度第3回滋賀県産婦人科医会学術研修会. 2007.12. 9 滋賀
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者  
秋下 雅弘

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Son BK, <u>Akishita M</u> , Iijima K, Kozaki K, Maemura K, Eto M, Ouchi Y.	Adiponectin Antagonizes Stimulatory Effect of TNF{alpha} on Vascular Smooth Muscle Cell Calcification: Regulation of Gas6-Mediated Survival Pathway by AMP-Activated Protein Kinase.	Endocrinology			2008
Ota H, <u>Akishita M</u> , Eto M, Iijima K, Kaneki M, Ouchi Y.	Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells.	J Mol Cell Cardiol.	43	571-9.	2007
Teramoto S, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Hanaoka Y, Ishii M, Hibi S, Kume H, <u>Akishita M</u> , Ouchi Y.	Effects of age and sex on plasma adrenomedullin levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome.	J Am Geriatr Soc.	55	1891-2	2007
<u>Akishita M</u> , Hashimoto M, Ohike Y, Ogawa S, Iijima K, Eto M, Ouchi Y.	Association of plasma dehydroepiandrosterone-sulfate levels with endothelial function in postmenopausal women with coronary risk factors.	Hypertens Res.			in press
<u>Akishita M</u> , Hashimoto M, Ohike Y, Ogawa S, Iijima K, Eto M, Ouchi Y.	Low testosterone level is an independent determinant of endothelial dysfunction in men.	Hypertens Res.	30	1029-1034	2007

Xi H, <u>Akishita M</u> , Nagai K, Yu W, Hasegawa H, Eto M, Kozaki K, Toba K.	Potent free radical scavenger, edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis.	Atherosclerosis.	191	281-289	2007
Yu J, Eto M, <u>Akishita M</u> , Kaneko A, Ouchi Y, Okabe T.	Signaling pathway of nitric oxide production induced by ginsenoside Rb1 in human aortic endothelial cells: A possible involvement of androgen receptor.	Biochem Biophys Res Commun.	353	764-9	2007
Son BK, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Nakano T, <u>Akishita M</u> , Ouchi Y.	Gas6/Axl-PI3K/Akt pathway plays a central role in the effect of statins on inorganic phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells	Eur J Pharmacol.	556	1-8	2007
<u>秋下雅弘</u>	テストステロンとメタボリック シンドローム (シンポジウム 男性更年期とED)	泌尿器外科	20 (臨増)	473-475	2007
<u>秋下雅弘</u>	特集 合成ステロイドホルモン 性ホルモン補充療法 (HRT)	Nippon Rinsho	66	163-167	2007
<u>秋下雅弘</u>	男性ホルモン補充療法の効果3 ) 血管機能と動脈硬化に対して	Clinical Calcium	17	1385- 1391	2007

分担研究者

熊野宏昭  
著書

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
熊野宏昭	うつ病の診断と 治療	日本泌尿器科学/日 本Men's Health学会 「LOH症候群診療ガイ ドライン」検討ワー キング委員会	加齢男性性 機能低下症 候群診療の 手引き—LOH 症候群	じほう社	東京	2007	63-66
熊野宏昭	心療内科医の視 点から	奥山明彦	男性更年期 障害—LOH症 候群	南山堂	東京	2007	24-32

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
-------	---------	------	----	-----	-----

熊野宏昭	精神神経症状から見たPADAM	泌尿器科外科	19(11)	1289-1294	2006
------	-----------------	--------	--------	-----------	------

神崎恒一

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Xi H, Akishita M, Nagai K, Yu W, Hasegawa H, Eto M, <u>Kozaki K</u> , Toba K.	Potent free radical scavenger, e daravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis.	Atherosclerosis.	191	281-9	2007
Son BK, <u>Kozaki K</u> , Iijima K, Eto M, Nakano T, Akishita M, Ouchi Y	Gas6/Axl-PI3K/Akt pathway plays a central role in the effect of statins on inorganic phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells.	Eur J Pharmacol.	556	1-8	2007
Tanaka K, Yamada Y, Kobayashi Y, Sonohara K, Machida A, Nakai R, <u>Kozaki K</u> , Toba K	Improved cognitive function, mood and brain blood flow in single photon emission computed tomography following individual reminiscence therapy in an elderly patient with Alzheimer's disease	Geriatr Gerontol Int.	7	305-9	2007
平山俊一、菊地令子、井上慎一郎、塚原大輔、末光有美、小林義雄、杉山陽一、長谷川浩、 <u>神崎恒一</u> 、井上剛輔、鳥羽研二	超高齢者におけるクレアチニンクリアランス推定式の比較検討	日本老年医学会雑誌	44	91-4	2007

近藤宇史

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nonaka K, Kume N, Urata Y, Seto S, Kohno T, Honda S, Ikeda S, Muroya T, Ikeda Y, Ihara Y, <u>Kita T</u> , <u>Kondo T</u> .	Serum levels of S-glutathionylated proteins as a risk-marker for arteriosclerosis obliterans.	Circulation J.	71(1)	100-5	2007
Yoshioka S, Mukae H, Ishii H, Kakugawa T, Ishimoto H, Sakamoto N, Fujii T, Urata Y, <u>Kondo T</u> , Kubota H, Nagata K, Kohno S.	Alpha-defensin enhances expression of HSP47 and collagen-1 in human lung fibroblasts.	Life Sci.	24;80(20)	1839-45	2007

Muroi E, Manabe S, Ikezaki M, Urata Y, Sato S, <u>Kondo T</u> , Ito Y, Ihara Y	C-Mannosylated peptides derived from the thrombospondin type 1 repeat enhance lipopolysaccharide-induced signaling in macrophage-like RAW264.7 cells.	Glycobiology	17(9)	1015-28	2007
<u>近藤宇史</u>	活性酸素と老化.	日本整形外科学会雑誌 (J. Jpn. Orthop. Assoc.)	81(10)	867-871	2007

寺本信嗣

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Teramoto S.	COPD pathogenesis from the viewpoint of risk factors.	Intern Med.	46巻	77-79	2007年
Teramoto S, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Hanaoka Y, Ishii M, Hibiki S, Kume H, Akishita M, Ouchi Y.	Effects of age and sex on plasma adrenomedullin levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome.	J Am Geriatr Soc.	55巻	1891-1892	2007年
Teramoto S, Kume H, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Hanaoka Y, Ishii M, Ishii T, Ouchi Y.	Improvement of endothelial function with allopurinol may occur in selected patients with OSA: effect of age and sex.	Eur Respir J.	29巻	216-217	2007年
Teramoto S, Yamamoto H, Yamaguchi Y, Hanaoka Y, Ishii M, Hibiki S, Ouchi Y.	ACE inhibitors prevent aspiration pneumonia in Asian, but not Caucasian, elderly patients with stroke.	Eur Respir J.	29巻	217-218	2007年
Teramoto S, Ishii M.	Aging, the aging lung, and senile emphysema are different.	Am J Respir Crit Care Med.	175巻	197-198	2007年
Ishii M, Teramoto S, Yakabe M, Yamamoto H, Yamaguchi Y, Hanaoka Y, Ouchi Y.	Small intestinal intussusceptions caused by percutaneous endoscopic jejunostomy tube	J Am Geriatr Soc.	55巻	2093-2094	2007年

Teramoto S, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Han aoka Y, Ishii M, Hibi S, Ishii T, Kume H, Ouchi Y.	Cardiovascular, but metabolic effects of CPAP in patients with obstructive sleep apnea	Eur Respir J.	31卷	223-225	2008年
Teramoto S, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Han aoka Y, Ishii M, Hibi S, Kume H, Akishita M, Ouchi Y.	Increase in oxidative stress levels in elderly patients with obstructive sleep apnea syndrome: Effects of age and gender.	J Am Geriatr Soc.	56卷	569-571	2008年
Teramoto S, Yamamoto H, Yamaguchi Y, Han aoka Y, Ishii M, Hibi S, Kume H, Ouchi Y.	Age greater than 80 years predicts the outcome of LRTI better than CURB-65 does.	Eur Respir J.	31卷	477-478	2008年
Teramoto S, Fukuchi Y, Sasaki H, Sato K, Sekizawa K, Matuse T, Japanese Study Group on Aspiration Pulmonary Disease (JSA P).	High incidence of aspiration pneumonia in both community-acquired pneumonia and hospital acquired pneumonia in hospitalized patients-Multi-center, prospective study in Japan.	J Am Geriatr Soc.	56卷	577-579	2008年
Teramoto S, Yamamoto H, Yamaguchi Y, Ishii M, Hibi S, Kume H, Ouchi Y.	Antiplatelet cilostazol, an inhibitor of type III phosphodiesterase, improves swallowing function in patients with a history of stroke.	J Am Geriatr Soc.	56卷	In press	2008年
Teramoto S, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Han aoka Y, Ishii M, Hibi S, Ishii T, Kume H, Ogawa S, Akishita M, Ouchi Y.	Elevated levels of circulating soluble CD40 ligand in elderly patients with obstructive sleep apnea syndrome: Effects of continuous positive airway pressure.	J Am Geriatr Soc.	56卷	In press	2008年
Teramoto S, Ishii T, Ishii M, Yamamoto H, Yamaguchi Y, Hibi S, Ouchi Y.	Variation in the TNF gene is not associated with susceptibility to Asian COPD.	Eur Respir J.	31卷	682-683	2008年

堀江重郎

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yasuda M, Ide H, Furuya K et al.	Salivary 8-OHdG: a useful biomarker for predicting severe ED and Hypogonadism.	<i>The Journal of Sexual Medicine</i>	In press		2008
Yasuda M, Honma S, Furuya K et al.	Diagnostic significance of salivary testosterone measurement using both LC-MS and ELISA.	<i>JOURNAL of Men's Health and Gender</i>	In press		2008
Yasuda M, Furuya K, Yoshii T et al.	Low testosterone level of middle-aged Japanese men - the association between low testosterone levels and quality-of-life.	<i>J Men's Health and Gender</i>	4	149-155	2007
Yasuda M, Shigeo H, Steven M A et al.	The prevalence of depressive symptoms and other variables among frail aging men in New York City's Personal Care Services program.	<i>J Men's Health and Gender</i>	4	165-170	2007
Muto S, Yasuda M, Kamiyama Y et al.	Testosterone decreased urinary-frequency in nNOS-deficient mice.	<i>Int J Androl</i>	31	67-70	2007

柳瀬敏彦

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fan W, Yanase T, Morinaga H, Gondo S, Okabe T, Nomura M, Komatsu T, Morohashi K, Hayes TB, Takayanagi R, Nawata H	Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans.	<i>Environ Health Perspect</i>	115	720-727	2007
Miyamoto J, Matsumoto T, Shiina H, Inoue K, Takada I, Ito S, Itoh J, Minematsu T, Sato T, Yanase T, Nawata H, Osamura YR, Kato S	The pituitary function of androgen receptor constitutes a glucocorticoid production circuit.	<i>Mol Cell Biol</i>	27	4807-4814	2007

Fan W, <u>Yanase T</u> , Morinaga H, Gondo S, Okabe T, Nomura M, Hayes TB, Takayanagi R, Nawata H	Herbicide atrazine activates SF-1 by direct affinity and concomitant co-activators recruitments to induce aromatase expression via promoter II.	Biochem Biophys Res Commun	355	1012-1018	2007
Saito Y, Yamada N, Shirai K, Sasaki J, Ebihara Y, <u>Yanase T</u> , Fox JC	Effect of rosuvastatin 5-20mg on triglycerides and other lipid parameters in Japanese patients with hypertriglyceridemia.	Atherosclerosis	194	505-511	2007
Fan W, <u>Yanase T</u> , Morinaga H, Okabe T, Nomura M, Daitoku H, Fukamizu A, Kato S, Takayanagi R, Nawata H	Insulin-like growth factor 1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of Foxo1 with androgen receptor.	J Biol Chem	282	7329-7338	2007
Yamada Y, Sekihara H, Omura M, <u>Yanase T</u> , Takayanagi R, Mune T, Yasuda K, Ishizuka T, Ueshiba H, Miyachi Y, Iwasaki T, Nakajima A, Nawata H	Changes in serum sex hormone profiles after short-term low-dose administration of dehydroepiandrosterone (DHEA) to young and elderly persons.	Endocr J	54	153-162	2007
Goto Y, Nomura M, Tanaka K, Kondo A, Morinaga H, Okabe T, <u>Yanase T</u> , Nawata H, Takayanagi R, Li E	Genetic interactions between activin type IIB receptor and Smad2 genes in a symmetrical patterning of the thoracic organs and the development of pancreas islets.	Dev Dyn	236	2865-2874	2007
Tanaka T, Gondo S, Okabe T, Ohe K, Shirohzu H, Morinaga H, Nomura M, Tani K, Takayanagi R, Nawata H, <u>Yanase T</u>	Steroidogenic factor 1/adrenal 4 binding protein transforms human bone marrow mesenchymal cells into steroidogenic cells.	J Mol Endocrinol	39	343-350	2007



Woods DC, Liu HK, Nishi Y, Yanase T, Johnson AL	Inhibition of proteasome activity sensitizes human granulosa tumor cells to TRAIL-induced cell death.	Cancer Lett	260	20-27	2008
---	---	-------------	-----	-------	------

若槻明彦  
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
若槻明彦	特集 女性とメタボリック クシンドローム/3. 女 性と生活習慣病 4) 女 性と高脂血症	産科と婦人科	74	449-453	2007
若槻明彦	ホルモン補充療法と心 管疾患	医学のあゆみ	221	1295-1299	2007
若槻明彦	IV. 脂質代謝異常の臨床 高脂血症 高脂血症の 管理と治療 特殊療法. ホルモン補充療法	日本臨床	65	499-503	2007
若槻明彦	閉経後の高トリグリセリ ド血症-FIELDスタディ が教えるもの-	臨床婦人科産 科	61	924-927	2007
若槻明彦	心疾患に対するHRTの位 置づけ	日本更年期医 学会雑誌	15	98-102	2007
若槻明彦	特集 更年期の女性医学 /閉経期の内分泌変化に 伴う脂質代謝異常	産婦人科の世 界	59	797-804	2007
若槻明彦	特集 脂質異常症の臨床 的意義-HDLは予防・治 療の標的か、指標か-/ HDL代謝の性差	Progress in M edicine	27	2817-2821	2007

# Adiponectin Antagonizes Stimulatory Effect of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ on Vascular Smooth Muscle Cell Calcification: Regulation of Growth Arrest-Specific Gene 6-Mediated Survival Pathway by Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase

Bo-Kyung Son, Masahiro Akishita, Katsuya Iijima, Koichi Kozaki, Koji Maemura, Masato Eto, and Yasuyoshi Ouchi

Department of Geriatric Medicine (B.-K.S., M.A., K.I., M.E., Y.O.), the Department of Cardiovascular Medicine (K.M.), Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo 113-8655, Japan; and the Department of Geriatric Medicine (K.K.), School of Medicine, The University of Kyorin, Tokyo 181-8611, Japan

Adiponectin exhibits diverse protective effects against atherogenesis and antagonizes many effects of TNF $\alpha$ . Here, we investigated the effect of adiponectin and TNF $\alpha$  on vascular calcification, a critical event in the development and progression of vascular disease. In human aortic smooth muscle cells (HASMC), TNF $\alpha$  augmented inorganic phosphate (Pi)-induced calcification, whereas adiponectin significantly suppressed it and abolished the stimulatory effect of TNF $\alpha$  in a concentration-dependent manner. Similarly, adiponectin ameliorated the accelerating effect of TNF $\alpha$  on Pi-induced apoptosis, the essential process of HASMC calcification. Furthermore, these effects of TNF $\alpha$  and adiponectin were associated with AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent growth arrest-specific gene 6 (Gas6) expression and Akt signaling. The AMPK activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleoside (AICAR), induced phosphorylation of AMPK and significantly inhibited Pi-induced calcification in HASMC. Conversely, pharmacological inhibition of AMPK by compound C blocked both AMPK activation and the inhibitory effect of adiponectin on calcification, providing evidence that AMPK plays a regulatory role in vascular calcification. Reporter assay revealed that adiponectin restored Gas6 promoter activity decreased by TNF $\alpha$ , and the effect of adiponectin was abrogated by compound C. These results demonstrate that adiponectin antagonizes the stimulatory effect of TNF $\alpha$  on vascular calcification by restoration of the AMPK-dependent Gas6-mediated survival pathway. (*Endocrinology* 149: 0000-0000, 2008)

VASCULAR CALCIFICATION IS often encountered in advanced atherosclerotic lesions and is a common consequence of aging (1, 2). Calcification of the coronary arteries has been shown to be positively correlated with atherosclerotic plaque burden, increased risk of myocardial infarction, and plaque instability (3-5). We recently demonstrated that apoptosis plays an important role in inorganic phosphate (Pi)-induced vascular smooth muscle cell (VSMC) calcification (6). This type of calcification is dependent on down-regulation of the growth arrest-specific gene 6 (Gas6)-mediated survival pathway.

Adiponectin is an adipocyte-derived cytokine that exhibits protective properties in the heart and blood vessels (7-10). It accumulates in injured arteries from plasma and suppresses the endothelial inflammatory response (11) and VSMC proliferation (12). Furthermore, low plasma adiponectin levels are associated with progression of coronary artery calcifica-

tion in type 1 diabetic and nondiabetic subjects, independent of other cardiovascular risk factors (13). Experimental studies have shown that adiponectin reduces TNF $\alpha$  production in response to various stresses, whereas TNF $\alpha$  attenuates adiponectin production, resulting in a reduction of plasma adiponectin levels (14-16). In addition to the inverse relationship between their expression, increasing evidence supports suppressive effects on each other's function (11, 17, 18). Given the importance of the reciprocal effects of TNF $\alpha$  and adiponectin, it is not clear whether both play a regulatory role in VSMC calcification.

Most of the beneficial actions of adiponectin are accounted for by the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) (19, 20). AMPK is a serine/threonine protein kinase that plays a key role in metabolic homeostasis in all eukaryotic cell types (21). Cardioprotective effects of adiponectin, including anti-apoptotic actions, are also likely to be dependent on AMPK (19, 22, 23). However, the role of AMPK in the effect of adiponectin on VSMC calcification has not been addressed.

In the present study, we investigated whether adiponectin and TNF $\alpha$  modulate Pi-induced VSMC calcification by regulating apoptosis. We found that TNF $\alpha$  had a stimulatory effect, whereas adiponectin had an inhibitory effect on Pi-induced apoptosis and calcification in human aortic smooth muscle cells (HASMC). Furthermore, these actions were mediated by regulation of Gas6 at the transcription level via AMPK activation.

First Published Online January 3, 2008

Abbreviations: AICAR, 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside; AMPK, AMP-activated protein kinase; Gas6, growth arrest-specific gene 6; HASMC, human aortic smooth muscle cells; Pi, inorganic phosphate; PP2C, protein phosphatase 2C; siRNA, small interfering RNA; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling; VSMC, vascular smooth muscle cells.

*Endocrinology* is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

**Materials and Methods**

**Cell culture**

HASMC were purchased from Clonetics Corp. (San Diego, CA). They were cultured in DMEM supplemented with 20% FBS, 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin at 37 C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. HASMC were used up to passage 8 for the experiments.

**Induction and quantification of calcification**

For Pi-induced calcification, Pi (a mixed solution of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> whose pH was adjusted to 7.4) was added to serum-supplemented DMEM to a final concentration of 2.6 mM (calcification medium). Ca deposition was evaluated by the  $\alpha$ -cresolphthalein complexone method (C-Test; WAKO, Osaka, Japan) and von Kossa's staining, as previously described (6, 24).

**Determination of apoptosis**

To examine the effect of TNF $\alpha$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and adiponectin (R&D Systems, Minneapolis, MN) on Pi-induced apoptosis, they were added simultaneously when the medium was switched to the calcification medium. Apoptosis was detected by DNA fragmentation with a cell-death detection ELISA<sup>plus</sup> kit (Roche, Mannheim, Germany) and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay with Apop Tag Plus obtained from Chemicon International, Ltd. (Hampshire, UK), according to the manufacturer's instructions.

**Generation of promoter-reporter construct and luciferase activity assay**

The 1925-bp Gas6 promoter (–1827/+99) corresponding to the Gas6 promoter sequences was generated by PCR from human genomic DNA with the appropriate sets of primers (6). These inserts were cloned into a pGL3 basic vector (Promega, Charbonnières, France) by standard molecular biological techniques. The construct was verified by sequencing. HASMC were transiently transfected in 12-well plates with 0.8  $\mu$ g plasmid DNA and lipofectamine-2000 (Invitrogen Corp., Paisley, UK) according to the procedure recommended by the manufacturer. Cells

were treated with TNF $\alpha$ , adiponectin, and compound C at 24 h after transfection, followed by incubation for an additional 44 h. Firefly luciferase activity was determined using a luciferase assay system (Promega) and normalized by total cell protein.

**Preparation of small interfering RNA (siRNA) targeting Gas6 and transfection**

To evaluate the role of Gas6 in the inhibitory effect of adiponectin on calcification, we knocked down Gas6 using siRNA. Two kinds of siRNA were designed to target human Gas6 and nonspecific control siRNA was synthesized using standard templates (6). siRNA (100 nM) was transfected using transfection reagent (Upstate, Charlottesville, VA) when HASMC had reached 80–90% confluence and then was transfected every 2 d with TNF $\alpha$  and adiponectin up to 6 d. The efficiency of Gas6 siRNA was confirmed with immunoblotting (6).

**RNA extraction and Northern blot analysis**

Total RNA was extracted from HASMC using an RNeasy minikit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). For Northern blot analysis, harvested RNA (5  $\mu$ g) was fractionated on 1.4% formaldehyde-agarose gel and transferred to a nylon filter. The filter was hybridized at 68 C for 2 h with <sup>32</sup>P-labeled Gas6 cDNA (6) and an 18S probe in QuickHyb solution (Stratagene, La Jolla, CA) and autoradiographed.

**Immunoblotting**

The effect of TNF $\alpha$  and adiponectin on the expression of Gas6, phospho-Akt, and Akt was examined, as described previously (24). Analysis of AMPK activation was performed using an antibody specific for the phosphorylated Thr172 of AMPK (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA).

**Statistical analysis**

All results are presented as mean  $\pm$  SE. Statistical comparisons were made by ANOVA, followed by Bonferroni test. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

**FIG. 1.** Effect of adiponectin and TNF $\alpha$  on Pi-induced calcification. A and B, HASMC were cultured with the indicated concentrations of adiponectin (A) or TNF $\alpha$  (B) in calcification medium. They were added simultaneously when the medium was changed every 2 d. C, The effect of TNF $\alpha$  (20 ng/ml) and adiponectin with the indicated concentrations on Ca deposition was determined at 6 d. D, The effect of TNF $\alpha$  (20 ng/ml) and adiponectin (300 ng/ml) on Ca deposition was evaluated with von Kossa's staining at the light microscopic level. All values are presented as mean  $\pm$  SE (n = 6). \*,  $P < 0.05$  by Bonferroni test. Each experiment was performed at least in triplicate for each condition.

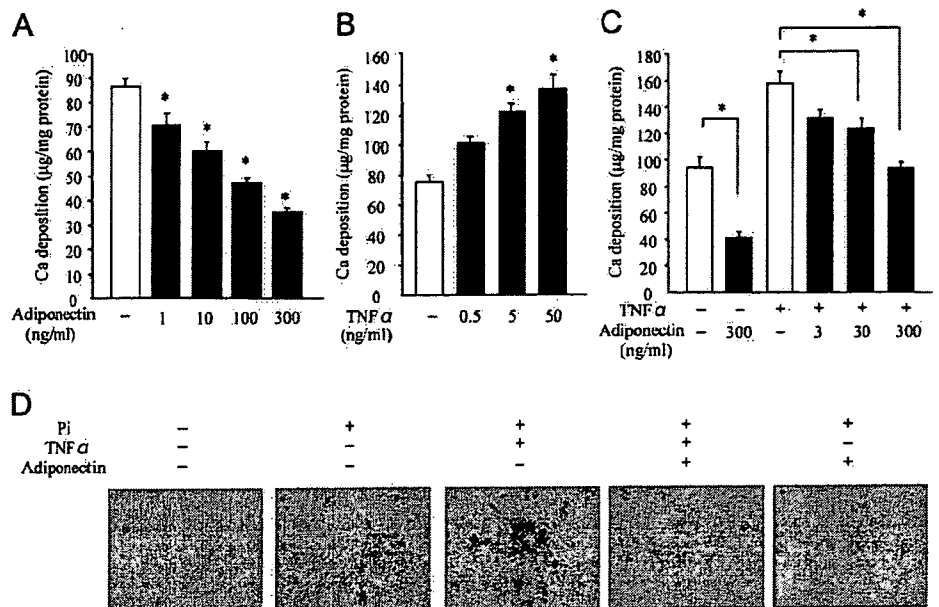


FIG. 2. Effect of adiponectin and TNF $\alpha$  on Pi-induced apoptosis. HASMC were cultured with the indicated concentrations of adiponectin for 6 d. Calcification medium was exchanged every 2 d. A, A quantitative index of apoptosis, determined by ELISA, is presented as the value relative to that without Pi treatment. B, HASMC were incubated with or without TNF $\alpha$  (20 ng/ml) in the absence or presence of 2.6 mM Pi for 6 d. C and D, On d 6, the effect of adiponectin (300 ng/ml) and TNF $\alpha$  (20 ng/ml) on apoptosis in calcification medium was determined by ELISA (C) and evaluated with TUNEL staining (D, green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). All values are presented as mean  $\pm$  SE (n = 3). \*, P < 0.05 by Bonferroni test. Each experiment was performed in triplicate for each condition.

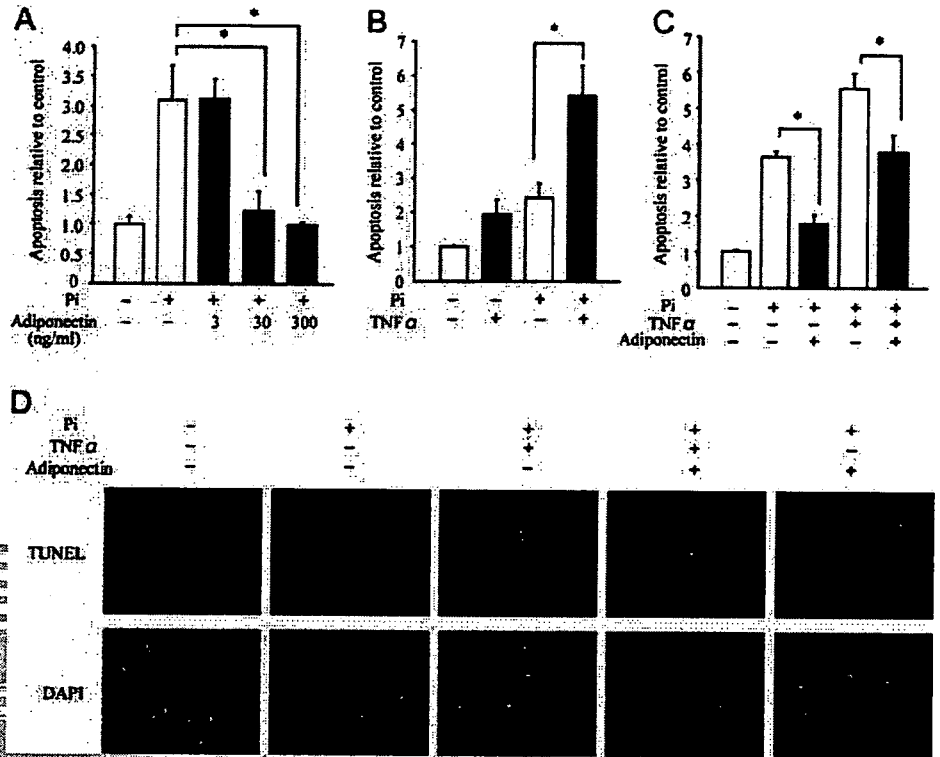


FIG. 3. Gas6 is the target of the effect of adiponectin and TNF $\alpha$  on Pi-induced calcification. HASMC were cultured with the indicated concentrations of adiponectin and TNF $\alpha$  (20 ng/ml). On d 6, cell lysates were collected and immunoblotted with antibodies that recognize Gas6, phospho-Akt (p-Akt), Akt, or  $\beta$ -tubulin. A, The untreated condition is the serum-supplemented status without Pi. B, Total RNA (5  $\mu$ g) was harvested for Northern blot analysis after HASMC were incubated with adiponectin (300 ng/ml) and TNF $\alpha$  (20 ng/ml) for 6 d. When HASMC had reached 80–90% confluence, siRNA (100 nM) was transfected and then was transfected every 2 d with adiponectin (300 ng/ml) and TNF $\alpha$  (20 ng/ml) up to 6 d. C, Ca deposition was measured and normalized by cell protein content. All values are presented as mean  $\pm$  SE (n = 3). \*, P < 0.05 by Bonferroni test. Each experiment was performed in triplicate for each condition.

