

## 論文の内容の要旨

論文題目 性ホルモン結合グロブリン (SHBG) の代謝への影響の検討

氏名 山崎広貴

肥満者数の増大が世界的な問題となっている。肥満は、耐糖能異常や高血圧症、脂質異常症など心血管リスク因子を増悪させる。近年では種々の代謝障害を伴うメタボリックシンドロームの概念が提唱されている。肥満は他にも様々な病態と関連する。肥満やメタボリックシンドロームの予防法の確立は、重要な課題である。

肥満脂肪組織においては、脂肪細胞が余分な栄養分を蓄積して肥大化しているが、慢性的な栄養過剰があると許容量を超える負荷が脂肪細胞にかかる。このとき脂肪細胞における炎症性シグナルの亢進、小胞体ストレス、活性酸素種の産生など様々な代謝異常を伴う。このような脂肪細胞における変化は、生体においては脂肪組織における慢性炎症と関わる。慢性炎症は、マクロファージなどの免疫細胞と脂肪細胞とが相互に作用することで形成される。さらに、肥満や高脂肪食に伴って腸管より流入した lipopolysaccharide (LPS) は、脂肪細胞やマクロファージに作用して炎症を増強する。肥満に伴う初期変化である脂肪細胞の肥大化および脂肪組織での慢性炎症は、脂肪組織のみならず全身の代謝異常につながるため重要である。しかし、脂肪蓄積や慢性炎症の病態について、その過程にどのような因子が関与しているか不明な点が多い。

そのような関与が想定される因子の一つに、sex hormone binding globulin (SHBG) がある。SHBG は主に肝臓で合成され、血漿中に分泌される蛋白である。性ホルモンと結合し、それらを標的臓器に運搬する担体および遊離型性ホルモンの生理活性を制御する役割を担うとされてきた。臨床的に、血中の SHBG 濃度や性ホルモン濃度は、肥満やメタボリックシンドローム、炎症の指標と関連することが報告され、SHBG については、その血中濃度と上記病態のリスクとが負に相関するとの報告が多い。肝臓における SHBG の発現には、種々のホルモンのほか多くの代謝関連因子が影響するため、代謝異常のマーカーとして SHBG の発現が変化する機序が想定されている。一方で、SHBG 自体が脂肪蓄積や慢性炎症に影響を与えるかについては不明な点が多い。血中 SHBG 濃度低値は、肥満やメタボリックシンドロームのみならず 2 型糖尿病発症リスクになることも知られており、とくに、SHBG のクリアランスに影響して血中濃度を高めることが想定される single nucleotide polymorphism (SNP) を有すると糖尿病リスクが下がることが報告されている。加えて、血中 SHBG 濃度の加齢に伴う増加の知見などからは、SHBG が代謝障害に対して抑制的に働く可能性が示唆される。さらに、SHBG 自身がある種の

細胞に対してホルモンとしての作用を発揮することを示唆する報告があり、多面的な作用が想定されている。

以上から、肥満やメタボリックシンドローム、糖尿病に対して SHBG が保護的役割を発揮する可能性があると考えられるため、本研究では、その背景となる機序について検討した。臨床知見や上記疾患に共通して関わる病態を考慮し、脂肪細胞における脂肪蓄積や肥満脂肪組織における慢性炎症に対して SHBG 蛋白が作用を有するという仮説を立て、SHBG が、脂肪細胞内の脂肪蓄積や分化に与える影響、さらに、脂肪細胞とマクロファージにおける炎症に与える影響について、*in vitro* で調べることを目的とした。

まず、SHBG が成熟脂肪細胞の脂肪量に与える影響を調べた。3T3-L1 細胞を分化させたのち、SHBG 蛋白を 0-100 nM の各濃度で培養上清に添加して作用させたところ、用量増加に伴って有意な脂肪量減少傾向を認めた。次に、分化させた 3T3-L1 細胞の *viability* に SHBG が与える影響について検討したところ、本研究で以降用いた 20 nM の濃度では、3 日間までの経過で有意な *viability* 低下を認めなかった。また、SHBG が脂肪細胞の分化に与える影響を調べるため、3T3-L1 細胞に対して分化誘導時より培地に SHBG 蛋白を添加して作用させたところ、脂肪滴の形成や脂肪蓄積量に明らかな変化は見られなかった。以上から、SHBG は成熟脂肪細胞に対しては脂肪量を減少させる変化をもたらすが、脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化には明らかな変化を与えないことが示された。

続いて、成熟脂肪細胞における脂肪量減少の作用について、付随して生じる変化を調べた。3T3-L1 細胞を分化させて SHBG を作用させたところ、培養上清中のグリセロール濃度は上昇し、脂肪分解の亢進が示唆された。そこで、SHBG が成熟脂肪細胞に対してどのような蛋白発現変化やシグナル変化をもたらすのかを、遺伝子発現変化とともに調べた。蛋白発現変化について、*adipose triglyceride lipase* (ATGL) の上昇と *CCAAT/enhancer binding protein α* (CEBPα) の低下を認めた。また、*hormone-sensitive lipase* (HSL) のリン酸化亢進を認めた。mRNA 発現変化については、ATGL の増加と、*peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPARγ)、CEBPα、*fatty acid synthetase* (FAS)、*fatty acyl-CoA synthetase* (FACS)、*phosphoenolpyruvate carboxykinase* (PEPCK) の減少を認めた。ATGL、PPARγ、CEBPα の mRNA 発現変化の傾向は性ホルモンの有無に関わらず保たれ、SHBG の性ホルモン結合部位が飽和していると想定される過剰量の性ホルモンを共添加しても同様であった。なお、脂肪細胞でのインスリンシグナルについては、インスリン刺激後 5 分までの各種の蛋白リン酸化について、SHBG 投与群は対照群と同程度であった。以上から、SHBG は、性ホルモンの有無に依存せず、成熟脂肪細胞において多彩な蛋白発現変化とシグナル変化を誘導することが確認された。これらの脂質代謝に関する蛋白および遺伝子発現変化が、SHBG による脂肪量減少作用に関与している可能性があると考えられた。脂肪細胞内の脂肪蓄積量が減少することは、脂肪細胞においては肥大の抑制および肥大に引き続く細胞ストレスなどの抑制に寄与し、代謝障害に対して保護的に働く可能性がある。また、脂肪細胞の分化に明らかな影響を与えずに脂肪分解を容易にしたことは、生体でのエネルギー代謝において有利に働く可能性があり、臓器間の相互作用や他のホルモ

ン動態に影響することで間接的に保護的作用を発揮している可能性も想定された。

さらに、SHBG が脂肪細胞およびマクロファージにおける炎症に与える影響を調べた。分化させた 3T3-L1 細胞において、lipopolysaccharide (LPS) により惹起される monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) と interleukin-6 (IL-6) の mRNA 発現が SHBG 添加で抑制された。また、性ホルモン高濃度条件下においても発現変化の傾向が保たれた。マウス腹腔マクロファージにおいても、tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、MCP-1、IL-6 の遺伝子発現が SHBG 添加で抑制された。さらに、分化後の 3T3-L1 細胞とマウス腹腔マクロファージとの共培養系において、LPS 添加により双方の細胞で炎症性サイトカインの遺伝子発現が誘導されたが、3T3-L1 細胞の MCP-1、IL-6 の発現誘導は SHBG 添加により有意に抑制され、このときマクロファージの TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-6 の発現誘導も抑制されていた。生体において、SHBG が脂肪細胞およびマクロファージに対して炎症性サイトカインの発現抑制を通して抗炎症的に作用することで、肥満脂肪組織における慢性炎症惹起が抑制され、脂肪組織ひいては全身的な代謝障害を生じにくくさせる可能性があると考えられた。

脂質代謝と炎症とは相互に関わるものであり、SHBG の作用として見られた脂肪量減少と抗炎症については、二つの作用が独立に生じている可能性と、何らかの因果関係がある可能性と、両者を考慮していく必要がある。また、作用機序としては、性ホルモン添加の有無が SHBG の作用に大きくは影響しなかったことから、性ホルモンを介さない SHBG 単独の作用が考慮される。とくに、未だ同定されていないものの存在が示唆されている SHBG 受容体を介している可能性は想定される。臨床的に、SHBG は肥満やメタボリックシンドローム、糖尿病に対する予防効果を有することが示唆されているが、その機序として、本研究で示した脂肪細胞における脂肪蓄積量減少や脂肪細胞およびマクロファージにおける抗炎症作用が長期的に作用することが関与している可能性があると考えられた。今後は、ヒト SHBG を発現するトランスジェニックマウスを用いた解析や、SHBG の詳細な作用機序の解明、さらに生体において代謝障害の形成が SHBG により抑制される条件の検索を進めていく必要がある。

本研究は、SHBG が代謝性疾患の発症に対して抑制的に働きうる機序を、分子生物学的手法を用いて示した初めての報告である。本研究より得られた知見は、肥満やメタボリックシンドローム、糖尿病などの新たな予防戦略や創薬につながりうるものと考えられた。