

博 士 論 文

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

性ホルモン結合グロブリン (SHBG) の
代謝への影響の検討

目次

	頁
目次	1
要旨	2
略語一覧	3
序文	4
方法	12
結果	20
考察	36
引用文献	45
謝辞	64

要旨

SHBG (sex hormone binding globulin) は、主に肝臓で合成され血中に分泌される蛋白であり、性ホルモンの輸送の他にも多面的作用が想定されている。SHBG 濃度高値は、肥満やメタボリックシンドロームなどのリスク低減と関連するが、機序は不明である。本研究では、3T3-L1 細胞を分化させた成熟脂肪細胞において、SHBG 添加により脂肪量の減少を認めた。また、脂肪細胞やマクロファージおよびそれらの共培養系において、SHBG により抗炎症作用が見られた。以上の知見は、様々な代謝障害に対して SHBG が保護的に作用する機序に関わる可能性があり、その予防戦略に寄与することが期待される。

略語一覽

Abs	absorbance
AKT/PKB	protein kinase B
ATGL	adipose triglyceride lipase
CEBP α	CCAAT/enhancer binding protein α
DAG	diacylglycerol
DCS	donor calf serum
E ₂	estradiol
FA	fatty acid
FACS	fatty acyl-CoA synthetase
FAS	fatty acid synthetase
FCS	fetal calf serum
HSL	hormone-sensitive lipase
IR	insulin receptor
LPS	lipopolysaccharide
MAG	monoacylglycerol
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
m.c.	media change
n.s.	not significant
O/N	overnight
PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
ROS	reactive oxygen species
SHBG	sex hormone binding globulin
S.D.	standard deviation
T	testosterone
TG	triacylglycerol

序文

肥満者数の増大が世界的な問題となっている。2014年時点で、18歳以上の39%はBMI 25 kg/m²以上の過体重であり、13%はBMI 30 kg/m²以上の肥満であったとされ、肥満者数は1980年と比較して2倍に増えている[1]。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ため重要であり、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[2]。ほかにも、肥満は癌や不妊など様々な病態との関連が指摘されている[3, 4]。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。

肥満においては、エネルギーの過剰摂取や運動不足などにより生じた余分な栄養分が脂肪細胞に蓄積され、脂肪細胞が肥大化している。脂肪細胞は脂肪前駆細胞より分化誘導され、様々な転写因子が発現しながら脂肪細胞としての形質を獲得し成熟していく (Figure 1A) [5]。成熟脂肪細胞は中性脂肪などの形で栄養分を蓄積するが、adipose triglyceride lipase (ATGL) などが関わる分解系と、fatty acid synthetase (FAS) や fatty acyl-CoA synthetase (FACS) などが関わる合成系とがバランスし、細胞内の脂肪滴が形成されている (Figure 1B) [6, 7]。脂肪細胞が正常な代謝状態を維持し、適切に脂肪が蓄積、分解されることで、他臓器における異所性脂肪蓄積や脂肪毒性が避けられ、適時全身へエネルギーが供給される。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とになるが、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 (ROS) の産生など様々な代謝障害を伴うとされる[8, 9]。

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り、その形成にはマクロファージなどの免疫細胞と脂肪細胞との相互作用が寄与する。肥大した脂肪細胞からのアディポカイン産生および脂肪細胞のネクロシスは組織マクロファージの活性化をきたすとともに、脂肪組織への単球の遊走促進を生じることによって、炎症惹起性の性質を高める[10, 11]。活性化されたマクロファージからの炎症性サイトカインは脂肪細胞に作用して炎症惹起性に働き、脂肪細胞からの悪玉のアディポカイン産生を亢進させる悪循環が形成される[12, 13]。さらに、肥満や高脂肪食に伴って腸管より流入した lipopolysaccharide (LPS) が、脂肪細胞やマクロファージに作用して炎症を増強する[14-16]。

このように、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、全身的な炎症性サイトカインの増加や高インスリン血症などをもたらし、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 (Figure 2) [17]。しかし、脂肪蓄積や慢性炎症の病態について解明が進められてきてはいるものの、その過程にどのような因子が関与しているかについては未だ不明な点が多い。

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中に放出される大きさ 45 kDa 程度の糖蛋白である (Figure 3)。ヒト血中では、性ホルモンを輸送する担体としての役

割を有する。SHBG 1 分子に対しては 1 分子までの様々な性ホルモンが結合可能であるが、性ホルモンによって親和性は異なり、例えばテストステロンの方がエストラジオールよりも強く結合する[18]。血中 SHBG は、男性では 56%程度、非妊娠の女性では 18%程度が性ホルモンと結合しており[19]、血中の性ホルモンは、約 50%が SHBG と、約 50%がアルブミンと結合し、残りの数%が遊離型で存在し、一般的には遊離型が生理活性を有するとされる。SHBG と性ホルモンとの結合は強く、SHBG 濃度が高くなると遊離型性ホルモンの濃度は低下するとされる一方で、性腺などで産生された性ホルモンが全身の標的臓器に輸送されるために SHBG の存在は重要である。SHBG 濃度の変化は、性ホルモンの分布や標的細胞への作用に複雑に影響する[20]。肝臓における SHBG の発現制御には HNF4A などいくつかの転写因子が関わりとされるが、発現促進因子としては、絶食や体重減少、運動、エストロゲンや甲状腺ホルモンなどが、抑制因子としては肥満や脂肪肝、アンドロゲン、炎症などが報告されている[21-23]。血中に放出された SHBG は、半減期数時間程度で血管外へ分布し、その後は半減期数日程度で分解、消失するとされる[24]。

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。たとえば、男性において、SHBG 低値や総テストステロン低値は、肥満やメタボリックシンドロームのリスク上昇と関連する[25, 26]。女性においては、SHBG 低値やアンドロゲン高値が肥満と関連する[27, 28]。また、男性における SHBG 低値と炎症マーカー高値との相関や[29]、閉経後女性における SHBG 低値やエストラ

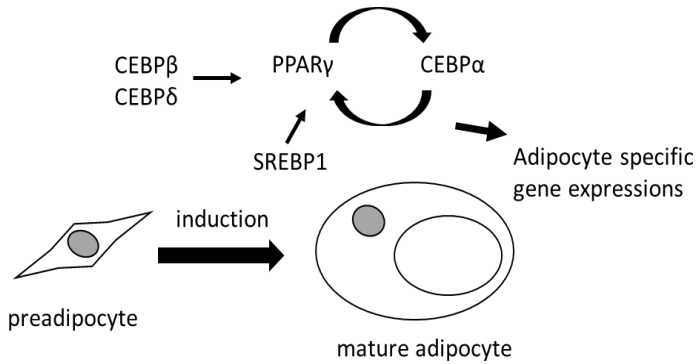
ジオール高値と炎症マーカー高値との相関などが報告されている[30]。肥満や炎症自体が SHBG や性ホルモンの生成過程に影響する一方で[20, 31]、SHBG や性ホルモンが脂肪蓄積や炎症に影響する可能性があり、とくに性ホルモンに関してはいくつか報告がされてきた[32-35]。しかし SHBG については、その濃度変化が性ホルモン動態の変化を介して脂肪蓄積や慢性炎症に影響を与える機序は想定されるものの十分証明されてきたとは言えず[36]、さらに、SHBG 単体が脂肪蓄積や慢性炎症に対して作用を有するかについては全く未解明である。

肥満やメタボリックシンドロームは 2 型糖尿病の背景となることが多いが、SHBG 低値は 2 型糖尿病発症リスクになることも報告されている[37]。とくに近年、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たことから[38]、これまで代謝異常のマーカーとして位置づけられることが多かった SHBG について、その濃度が高いことが代謝性疾患に保護的に働く可能性について一層注目されている。血中 SHBG 濃度は加齢に伴い概ね増加傾向を示すことが知られており[39-41]、SHBG が加齢に伴う代謝異常のリスクに対して保護的に働いている可能性がある。さらに、SHBG 自身がホルモンとして働きうることが報告されており、たとえば、胎盤由来細胞における hCG 産生増加や、前立腺や乳腺由来細胞における cAMP 上昇などが報告されている[42-44]。また、SHBG と性ホルモンをエンドサイトーシ

スするような受容体も報告されている[45]。SHBGには、性ホルモンの制御にとどまらない多面的な作用がある可能性が示唆されている。

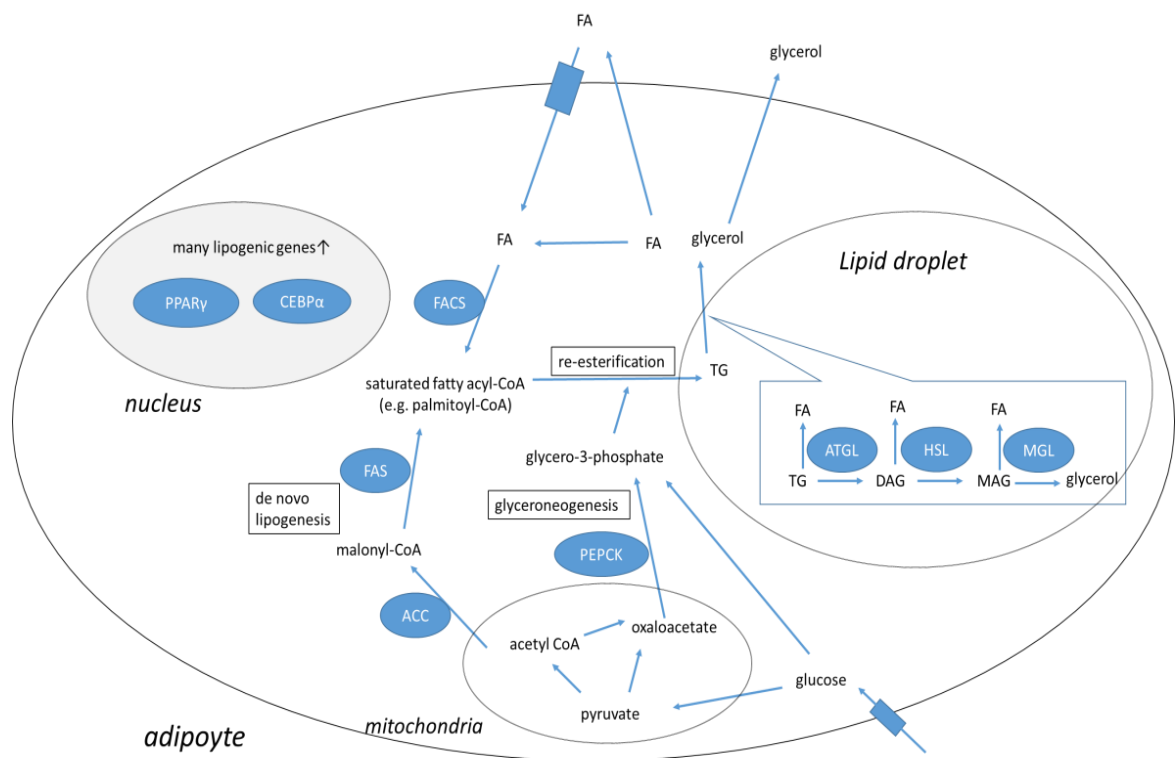
このように、肥満やメタボリックシンドローム、2型糖尿病とSHBGとの関連が臨床的に示され、また、SHBGが多彩な作用を有することが示されており、SHBGが肥満や代謝性疾患の病態に抑制的に働いている可能性があるが、未だその機序は明らかにされていない。肥満やメタボリックシンドローム、2型糖尿病の発症には多因子が関わっており複雑であるが、共通して関わる機序の発見を目指すことは、それらの疾患の発症抑制を目指す上で重要である。そこで本研究では、肥満やメタボリックシンドローム、糖尿病の基礎的病態を考慮し、脂肪細胞における脂肪蓄積や、肥満脂肪組織における慢性炎症に対して、SHBG蛋白が作用を有するという仮説を立て、分子生物学的手法を用いて検証することとした。SHBGが、1) 脂肪細胞内の脂肪蓄積や分化に与える影響、2) 脂肪細胞とマクロファージにおける炎症に与える影響を *in vitro* で調べることを本研究の目的とした。

(A)



(引用文献[5]を参考に作成)

(B)



(引用文献[6, 7]を参考に作成)

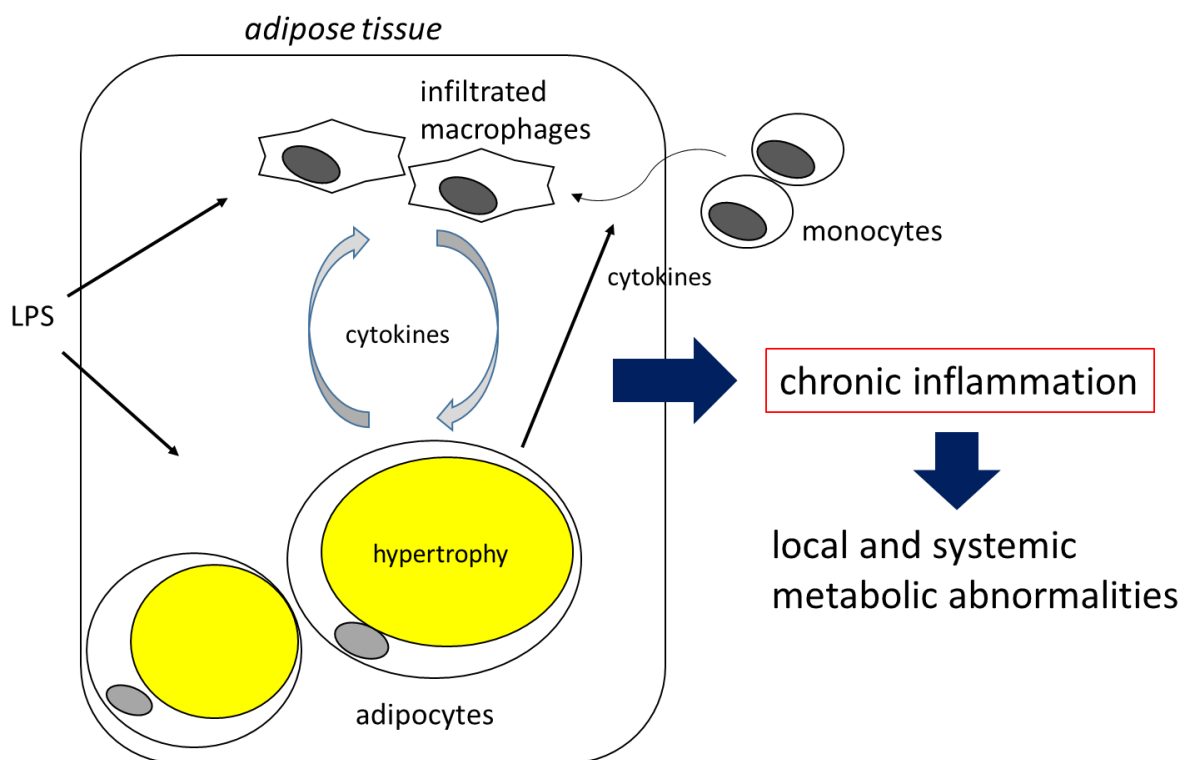
Figure 1. 脂肪細胞の分化と、脂肪細胞内での脂質代謝

(A) 脂肪細胞の分化

脂肪前駆細胞は、ホルモンなどの分化誘導因子により脂肪細胞への分化を開始する。必要な転写因子が順次誘導され、とくに PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) と CEBP α (CCAAT/enhancer binding protein α) のポジティブフィードバックにより脂肪細胞に特徴的な遺伝子発現が誘導されることで、脂肪細胞としての特徴を獲得していく。

(B) 脂肪細胞内の脂質代謝

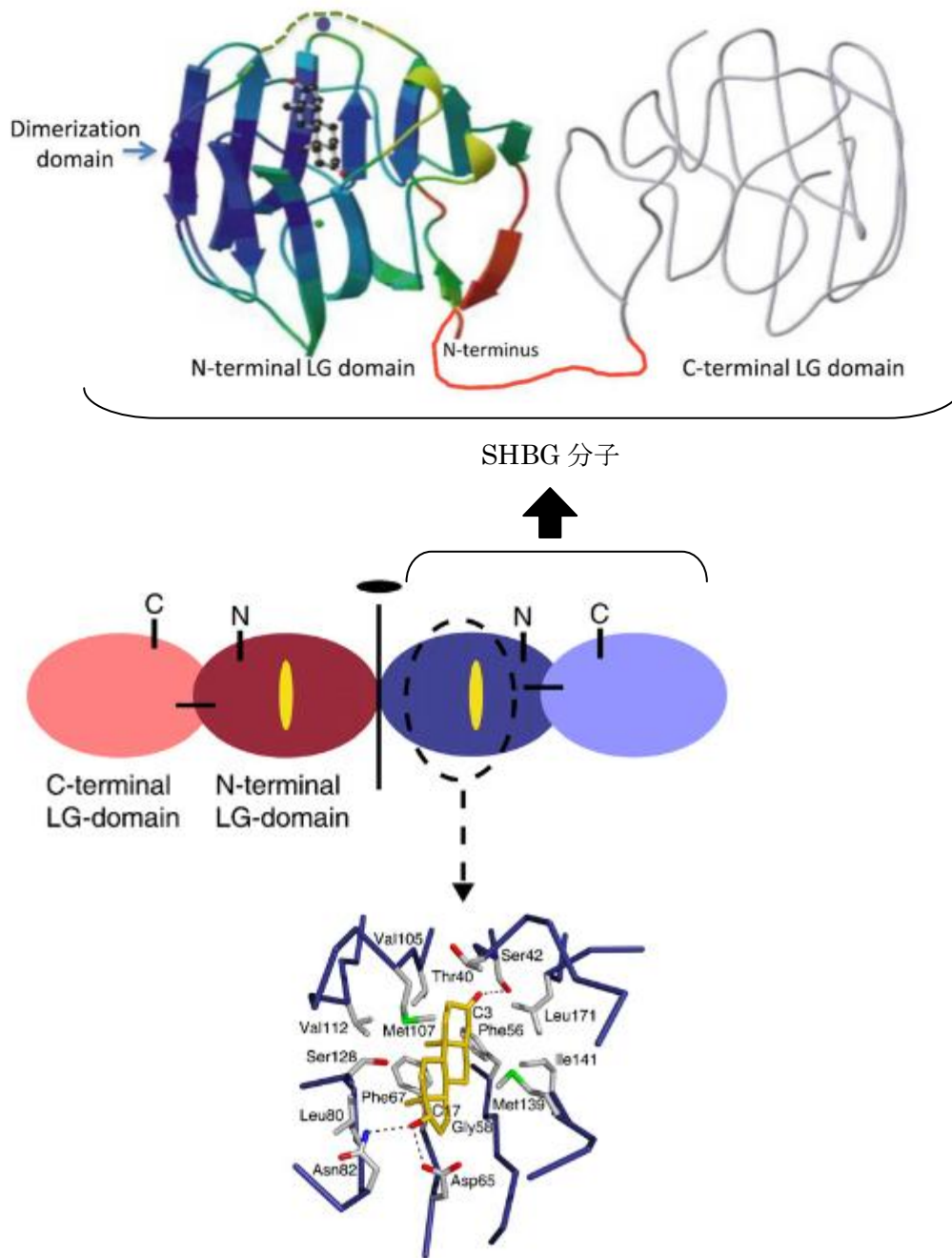
脂肪滴 (lipid droplet) において中性脂肪 (TG : triacylglycerol) は種々のリパーゼにより加水分解を受け、DAG (diacylglycerol), MAG (monoacylglycerol) を経て脂肪酸 (FA : fatty acid) と glycerol にまで分解される。glycerol は細胞外に放出される。脂肪酸やグリセロールは他臓器のエネルギー代謝における基質としても重要である。一方、脂肪細胞内において、脂肪酸や glucose からの代謝物などをもとに、種々の脂質合成系酵素の働きで中性脂肪をはじめとする脂質が合成され、脂肪滴に蓄積する。



(引用文献[11]を参考に作成)

Figure 2. 脂肪組織での慢性炎症

肥満脂肪組織において、肥大化した脂肪細胞は組織マクロファージとの間でサイトカインによる相互作用により炎症を惹起する。脂肪細胞からのサイトカインは、血中の単球を脂肪組織へ遊走する作用も持つ。腸管から流入した lipopolysaccharide (LPS) は炎症惹起性の作用を有する。このように形成された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。



(引用文献[20, 46]を参考に作成)

Figure 3. SHBG 分子の構造、dimer の形成および性ホルモンとの結合

SHBG は、2つの球状ドメイン (N-terminal LG domain と C-terminal LG domain) からなる 45kDa 程度の糖蛋白である。血中では2つの SHBG 分子が疎水結合で会合し、dimer を形成している。N-terminal LG domain に性ホルモンが結合する部位がある。1分子の SHBG に対して1分子の性ホルモンが結合可能である。

方法

試薬

LPS (from *Escherichia coli* 0111:B4) 、ヒトインスリンは Sigma より購入した。

抗 AKT Ser 473 リン酸化抗体、抗 AKT Thr 308 リン酸化抗体、抗 p70S6K Thr 389 リン酸化抗体、抗 GAPDH 抗体、抗 ATGL 抗体、抗 HSL Ser 563 リン酸化抗体、抗 HSL Ser 660 リン酸化抗体、抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) は、Cell Signaling Technology より購入した。抗 CEBP α 抗体、抗 Actin 抗体、horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ヤギ IgG 抗体は santa cruz biotechnology より購入した。HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体、HRP 標識抗マウス IgG 抗体は GE healthcare より購入した。

SHBG 蛋白、性ホルモン

ヒト SHBG 精製蛋白は abcam より購入した。とくに断りのない限り、SHBG 蛋白は overnight (12~22時間)で反応させた。17 β -エストラジオール (E₂) は Sigma より、テストステロン (T) は和光純薬工業より購入した。性ホルモン添加実験においては、試薬をエタノールに溶解して、記載の作用濃度となるよう希釈して使用した。対照群には同量のエタノールを添加し、最終エタノール濃度は 0.5%未満とした。SHBG 蛋白と性ホルモンは、直接細胞上清に添加した。

3T3-L1 細胞の培養

マウス脂肪前駆細胞である 3T3-L1 細胞は 10% Donor calf serum (DCS, Invitrogen) を添加した DMEM High Glucose 培地 (和光純薬工業) で 37 °C、10% CO₂ インキュベータ内で培養した。分化させる際には collagen type I コート plate (Iwaki) に播種後、翌日あるいは 2 日後コンフルエントになった後に、10% Fetal calf serum (FCS, Biowest)、0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma)、4 µg/ml dexamethasone (Sigma) を含む DMEM High Glucose 培地に交換し、2 日間分化誘導をかけた。その後細胞は 1 日おきに 10% FCS を含む DMEM High Glucose 培地に交換した。すべての培地に 0.5% Penicillin-Streptomycin (Invitrogen) を添加した。

分化後の 3T3-L1 細胞への SHBG 添加実験

分化誘導後 10~18 日目の 3T3-L1 細胞を用いた。SHBG 蛋白を上清へ添加する際は、直前に serum-free とした。serum-free 培地に置換する際はまず DMEM High Glucose 培地で 2 回洗浄をおこない、その後、特に断りのない限り 0.2%の脂肪酸不含 BSA (和光純薬工業) を含む DMEM High Glucose 培地へ換えて培養を続けた。SHBG を作用させる際の DMEM 培地は、フェノールレッドの持つエストロゲン様作用の影響を除外するため、フェノールレッド不含培地を用いた[47]。

3T3-L1 細胞の分化過程への SHBG 添加実験

3T3-L1 細胞は、分化誘導後 3 日程度で成熟脂肪細胞の表現型に必要な脂肪合成・分解酵素などの蛋白発現が始まり、その後脂肪滴が増大、最終的に分化誘導後 5-7 日までは分化した脂肪細胞が形成される[48]。そこで、分化誘導時より 6 日目まで培地交換ごとに SHBG 20nM の添加を続け、分化の様子と脂肪滴の形成を観察した。分化誘導後 6 日目で Oil Red O 染色を施行し、蓄積された脂肪量を評価した。分化誘導後の培養はフェノールレッド不含 DMEM High Glucose 培地中で施行した。

Oil Red O 染色

Oil Red O 染色では中性脂肪を主とする疎水性脂肪が染色され、その吸光度はそれらの脂肪量を反映する[49, 50]。Oil Red O 粉末は Sigma より購入し、0.3 g を 99% イソプロパノール液 100 ml に溶解して保存液を作成した。実験当日に保存液と蒸留水とを 3:2 の比率で混合し、30 分後に 0.45 μm のフィルターでろ過したものを染色に使用した。

分化させた 3T3-L1 細胞は培地を除いて PBS で 2 回洗浄したのち 10%ホルマリン(和光純薬工業)で 10 分間固定し、PBS で 2 回洗浄したのち、Oil Red O 染色液を加えた。10 分後に PBS で数回洗浄して余分な染色液を除き、490 nm での吸光度を、ARVO MX-fla (PerkinElmer) を用いて測定した。background の吸光度を差し引いたのち、その相対値を統計量として算出した。

Cell viability assay

Cell counting kit-8 (同仁化学) では、試薬として添加する WST-8 が細胞質の脱水素酵素により還元され水溶性のホルマザンを生成する。このホルマザンの 450 nm の吸光度を測定することで、細胞の viability の指標とできる[51]。

分化させた 3T3-L1 細胞に SHBG 蛋白を作用させたのち、Cell Counting Kit-8 試薬を添加し、450 nm での吸光度を ARVO MX-fla を用いて測定した。background の吸光度を差し引いたのち、その相対値を統計量として算出した。

グリセロール濃度測定

分化させた 3T3-L1 細胞に serum-free 下で SHBG 蛋白 20 nM を作用させ、19 時間後と 35 時間後に培養上清を回収した。液体窒素で凍結ののち測定まで $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存した。Glycerol Assay Kit は Sigma より購入し、製造者のプロトコルに従った。570 nm での吸光度を、ARVO MX-fla を用いて測定し、標準液の検量線からその濃度を算出した。

ウエスタンブロット

細胞は、100 mM DTT を加えた Laemmli サンプルバッファーで回収して lysate とし、 $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 分間ボイルしてサンプルとした。その後、SDS-PAGE にて分離し、PVDF メンブレンの Immobilon (Millipore) に転写、1% BSA (Intergen) にてブロッ

キングした後に、1次抗体と反応させ、続いて HRP 標識 2 次抗体と反応させた。ECL (GE healthcare) にて化学発光させ、ImageQuant LAS 4000 mini (富士フィルム) を用いて検出した。

インスリン刺激

分化させた 3T3-L1 細胞を serum-free 培地に交換して、SHBG 20 nM を overnight で作用させ、インスリン 100 nM で 5 分間の刺激を行い、cold PBS で 2 回洗浄したのち、ウエスタンブロット用のサンプルを回収した。

定量 RT-PCR

細胞からの総 RNA は、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて製造者のプロトコルに従って抽出した。逆転写は Transcriptor Universal cDNA Master (Roche) を用いて行い、続いて定量 RT-PCR を LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) を用いて施行した。転写産物量の相対値は検量線法で算出した。内部標準として 36B4 遺伝子の発現を使用し、各遺伝子発現の相対値を統計量として算出した。すべての PCR 産物について、融解曲線解析で単一ピークであることを確認した。各遺伝子について増幅のために用いたプライマーは表 1 のとおりである。

表 1. 定量 RT-PCR プライマー

<i>gene</i>	Forward	Reverse	参考文献
<i>36B4</i>	5'- GCTCCAAGCAGATGCAGCA-3'	5'- CCGGATGTGAGGCAGCAG-3'	[52]
<i>Cebpa</i>	5'- TGAGCCGTGAACTGGACACG-3'	5'- CAGCCTAGAGATCCAGCGAC-3'	[53]
<i>Pparg</i>	5'-TCTTCCATCACGGAGAGGTC-3'	5'- GATGCACTGCCTATGAGCAC-3'	[54]
<i>Fas</i>	5'-ATCCTGGAACGAGAACACGATCT-3'	5'-AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT-3'	[55]
<i>Facs</i>	5'-GACGACCTCAAGGTGCTTCA-3'	5'-ACCCAGGCTCGACTGTATCT-3'	-
<i>Pepck</i>	5'-CTAACTTGGCCATGATGAACC-3'	5'-CTTCACTGAGGTGCCAGGAG-3'	[56]
<i>Atgl</i>	5'- AACACCAGCATCCAGTTCAA-3'	5'- GGTTCACTAGGCCATTCCTC-3'	[57]
<i>Mcp-1</i>	5'- AGGTCCCTGTCATGCTTCTG-3'	5'- TCTGGACCCATTCCTTCTTG-3'	[58]
<i>Il-6</i>	5'- TCGTGGAAATGAGAAAAGAGTTG-3'	5'- AGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'	[59]
<i>Tnf-a</i>	5'- GAACTGGCAGAAGAGGCACT-3'	5'- AGGGTCTGGCCATAGAACT-3'	[58]

マウス腹腔マクロファージ

マウスは三協ラボサービスより購入した 8-9 週齢の C57BL/6N マウスを使用し、一般的な環境下で通常食を与えて飼育した。本研究の動物実験は、東京大学の動物実験指針に沿って行った。

腹腔マクロファージは、必要な匹数のマウスより採取した。培地として、フェノールレッド不含 RPMI 1640 培地 (Gibco) を使用し、37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。ジエチルエーテル麻酔下で、10% FCS を含む RPMI 1640 培地 5 ml を腹腔内に注入し、腹腔マクロファージを採取して遠心まで氷上静置とした。室温で 1500 rpm、2 分間遠心ののち、上清を除き、溶血バッファー (BD PharmLyse) を加えることで混入した赤血球を除去した。2 分後に室温で 1500 rpm、2 分間遠心したのち、上清を除き、10% FCS を含む RPMI 1640 培地にて 12 well plate に 1.5 x 10⁶ cells/well の密度で播種した。2 時間後、RPMI 1640 培地で 2 回静かに洗浄して非接

着細胞を除いたのち、0.2%の脂肪酸不含 BSA を含む RPMI 1640 培地に交換して実験に使用した。すべての培地には 0.5% Penicillin-Streptomycin を添加した。

3T3-L1 細胞とマウス腹腔マクロファージとの共培養

PET membrane transwell-clear inserts (pore size 0.4 μm) は Corning より購入した。マウス腹腔マクロファージを採取し、insert に 1.5×10^6 cells/well の密度で播種した。一方、3T3-L1 細胞を 12 well plate で分化させた。マクロファージ、3T3-L1 細胞ともに、RPMI 1640 培地で洗浄して 0.2%の脂肪酸不含 BSA を含む RPMI 1640 培地に交換したのち、共培養を開始した。

LPS 刺激

LPS は生体内ではシャトル蛋白と共在することで作用が増強し、また、用いる LPS の種類にも影響されるとされ、既報では慢性炎症モデルにおいて LPS を用いる場合、その刺激濃度や時間については種々の反応条件が用いられている[60, 61]。今回は、既報とは大きく逸脱しない限りで、比較的低濃度かつ炎症性サイトカインの mRNA 発現上昇が得られるように LPS の反応条件を設定した。3T3-L1 細胞およびマクロファージ単独への LPS 刺激濃度は 1 ng/ml とし、共培養系においては両細胞からのサイトカインの相互作用を考慮してさらに低い 100 pg/ml とした。作用時間は 8~12 時間とした。

統計

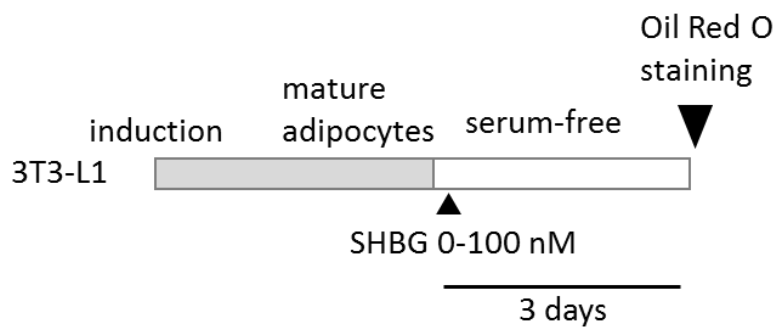
本論文中の数値およびグラフの誤差範囲は、平均値±標準偏差で表記した。脂肪量に関する傾向性の検定は Jonckheere 検定を行い、各群について、対照群との比較を Welch の検定（片側）にて施行し nominal p 値を算出した。また、SHBG あるいは性ホルモンを単独投与した結果について三群以上のデータ比較をおこなう際は、対照群との差を Dunnett の検定で行った。そのほか、二群のデータ比較においては、Student の t 検定（両側）を行った。p<0.05 を統計学的有意差ありと判定した。統計の計算には Excel あるいは R を使用した。

結果

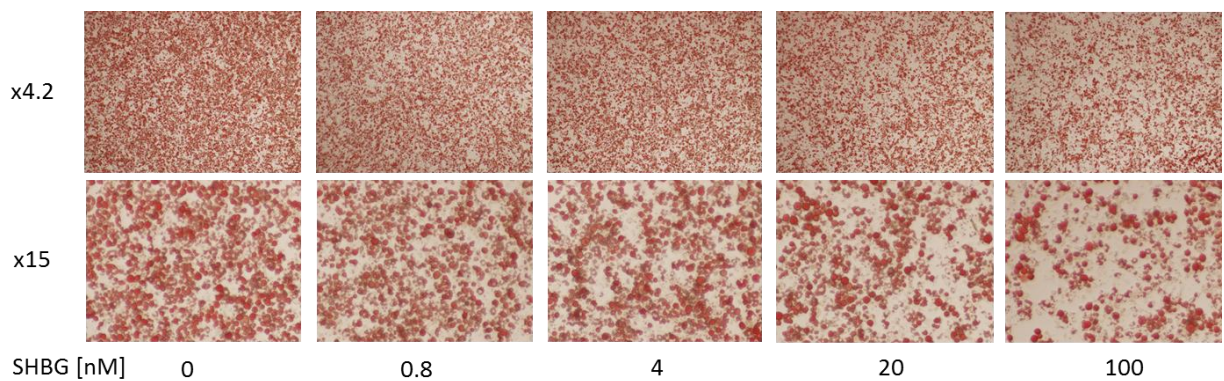
SHBG は、用量依存性に成熟脂肪細胞の脂肪量を減少させる

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 (Figure 4)。

(A)



(B)



(C)

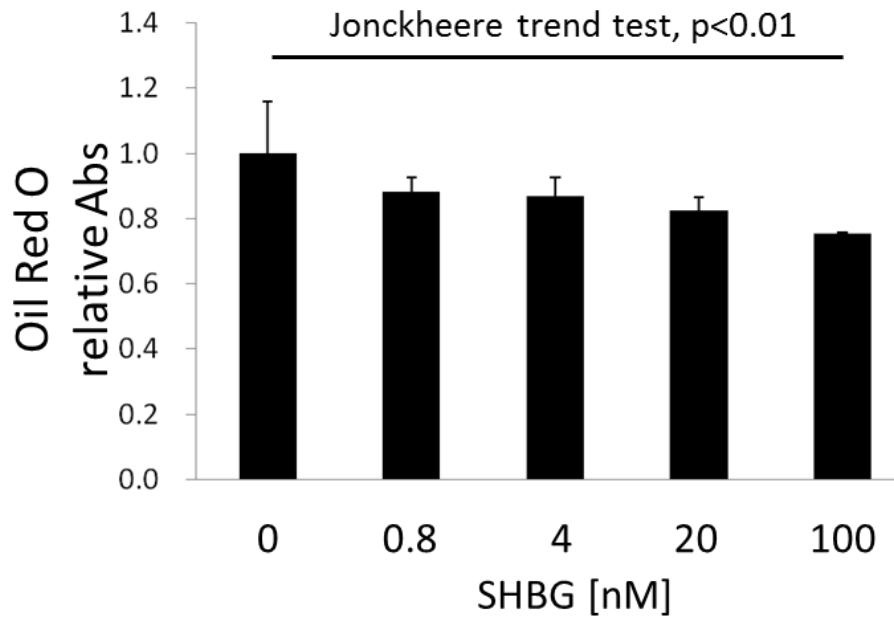


Figure 4. 分化後の 3T3-L1 細胞に SHBG を添加すると、用量依存性に脂肪量が減少する。

(A) 実験概略図。3T3-L1 細胞を分化させたのち、serum-free 下で SHBG を各種濃度で上清に添加した。3 日後に Oil Red O 染色をおこなった。

(B) Oil Red O 染色後の顕微鏡像。

(C) 490 nm での吸光度を測定し、相対値を算出した ($n=5$, mean \pm S.D)。SHBG 用量の増加に伴う変化の傾向について Jonckheere 検定を施行した。なお、各群について、SHBG 無添加 (0 nM) との比較を Welch の検定 (片側) にて施行した際の nominal p 値は、0.8 nM : $p=0.09$, 4 nM : $p=0.07$, 20 nM : $p=0.04$, 100 nM : $p=0.01$ であった。

SHBG 20 nM を成熟脂肪細胞に作用させた際、3 日間までの経過で viability の大きな低下はない

次に、SHBG が成熟脂肪細胞の viability へ与える影響を調べた。ヒトでは成人の血中には、男性で 10-57 nM、非妊婦の女性で 18-144 nM 程度の濃度で存在することを踏まえ[24]、その範囲内である 20 nM あるいは 40 nM で作用させたところ、40 nM, overnight の作用で有意な viability の低下を認めたが、20 nM では 3 日間までの経過で viability の有意な低下は認めなかった (Figure 5)。

以上から、viability に大きな変化を与えない限りでなるべく高濃度である 20 nM を、SHBG の刺激濃度として設定し、以降の実験をおこなった。

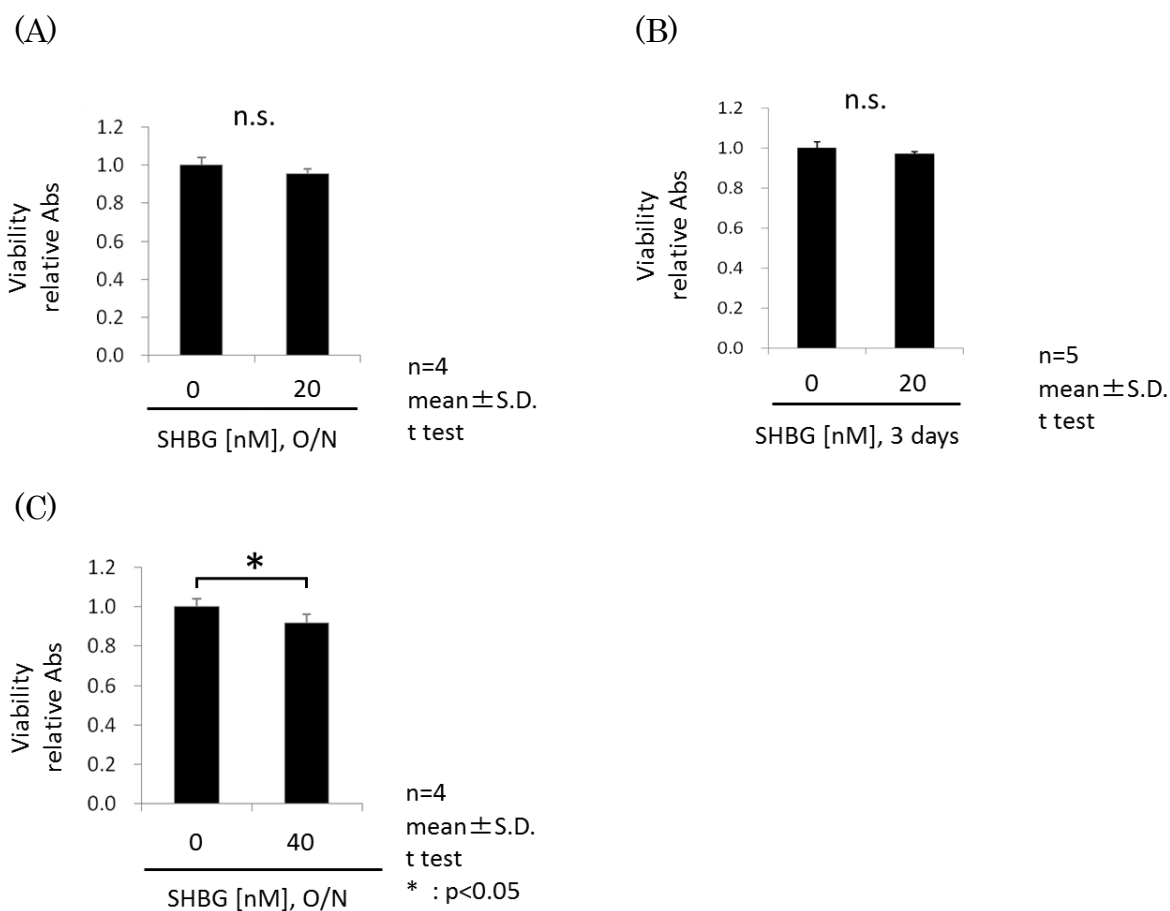


Figure 5. 分化後の 3T3-L1 細胞に SHBG を添加した際の viability は、20 nM では 3 日間までの経過で明らかな低下はないが、40 nM では overnight の経過で有意に低下する。

3T3-L1 細胞を分化させたのち、serum-free 下で SHBG を 20 nM あるいは 40 nM で上清に添加して作用させた。overnight で、あるいは 3 日間作用させた後に cell counting kit-8 を添加して吸光度から viability を測定し、相対値を算出した。

SHBG は、脂肪前駆細胞の分化には明らかな影響を与えない

分化させた 3T3-L1 細胞において SHBG による脂肪量減少作用が見られたが、分化過程においても作用があるかを調べた。

3T3-L1 細胞の分化誘導時 (day 0) より培地に SHBG 蛋白を添加し、培地交換のたびに SHBG を添加して day 6 まで観察を行った (Figure 6)。分化する細胞の割合および脂肪滴の様子は、顕微鏡観察下において SHBG による明らかな変化を認めず、day 6 に施行した Oil Red O 染色による脂肪量の評価でも有意差を認めなかった (Figure 6B, 6C)。

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、脂肪前駆細胞の分化には明らかな変化を与えないことが確認された。

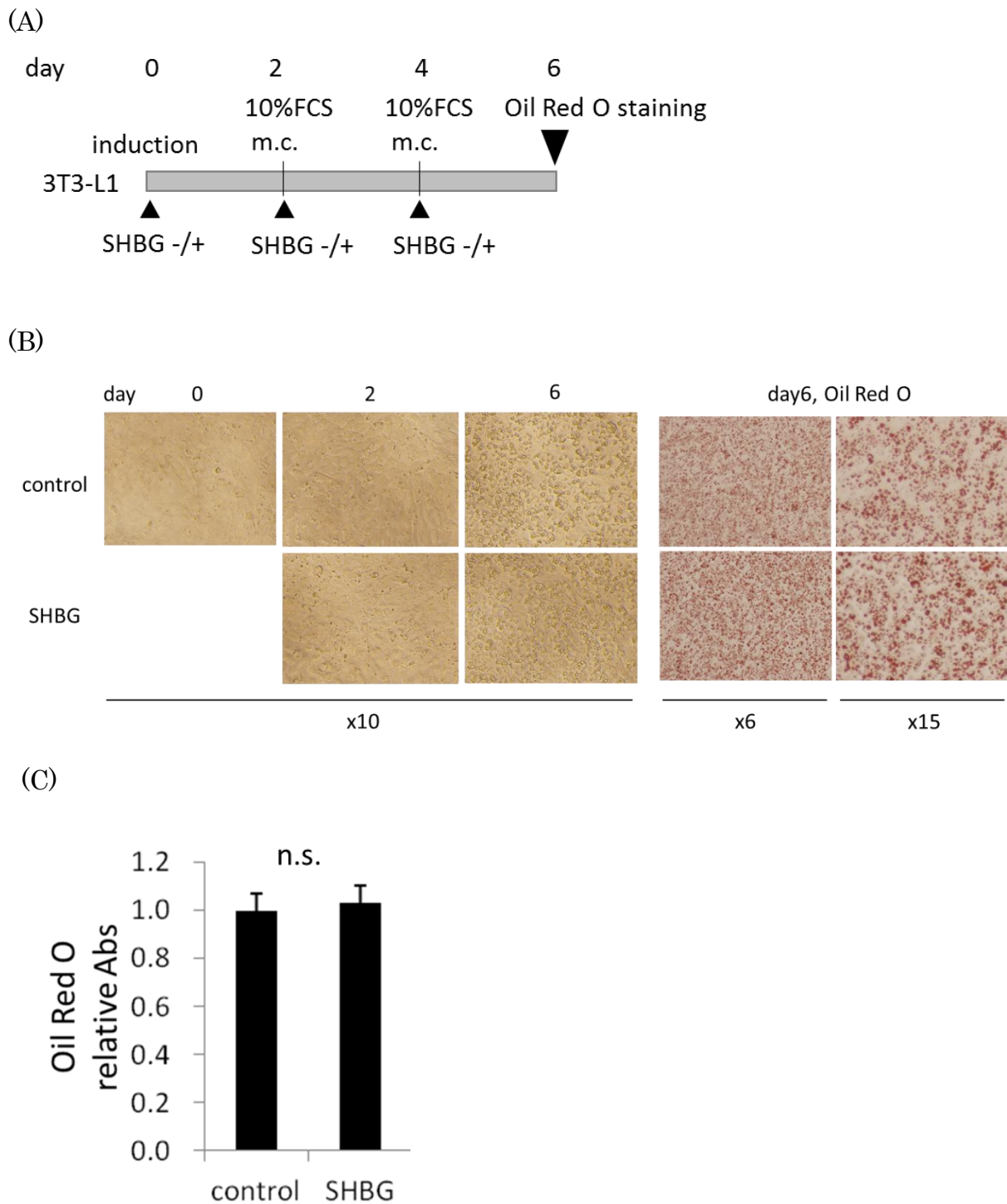


Figure 6. 3T3-L1 細胞の分化誘導に関して、SHBG は形態学的には明らかな影響を及ぼさない。

(A) 実験概略図。3T3-L1 細胞の分化誘導 (day 0) の時点より、SHBG 20 nM を培養上清へ添加し、培地交換ごとに SHBG 20 nM の添加を続けた。

(B) day 0, 2, 6 での顕微鏡像と、day 6 での Oil Red O 染色後の顕微鏡像。

(C) Oil Red O 染色後、490 nm での吸光度を測定し、相対値を算出した (n=6, mean \pm S.D.)。

SHBG を分化後の 3T3-L1 細胞に添加すると、培養上清中のグリセロールが増加し、また、細胞において脂質代謝に関わる種々の蛋白発現変化とシグナル変化を生じる

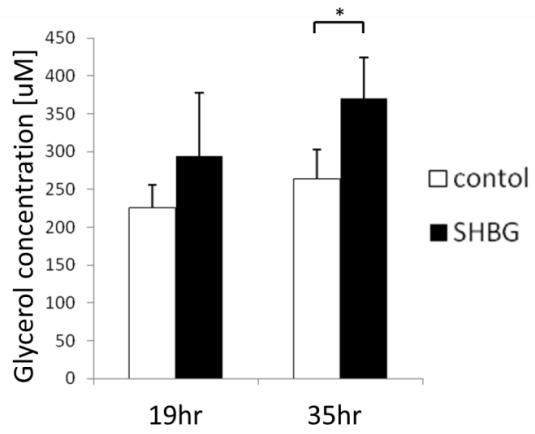
分化させた 3T3-L1 細胞に対する SHBG 添加により脂肪量減少の知見が得られたことから、付随して生じる変化を調べた。培養上清中のグリセロールの培養上清中の濃度を調べたところ、SHBG 添加により有意な上昇が認められた (Figure 7A)。グリセロールは、中性脂肪などの分解により細胞外へ放出されることから、SHBG により脂肪分解が亢進していることが示唆された。

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。まず、中性脂肪の加水分解過程の律速酵素である ATGL[62-64]が変化する可能性を考え、分化させた 3T3-L1 細胞での蛋白発現量を調べたところ、SHBG による発現亢進が見られた。また、脂肪細胞の特徴維持に重要な CEBP α [5]の関与についても検討したところ、SHBG による蛋白発現量の低下が確認された (Figure 7B)。そのほか、脂肪細胞における脂肪分解では HSL のリン酸化、とくに Ser 563 および Ser 660 のリン酸化亢進が分解を促進するとされている[65]ため検討したところ、SHBG 添加群ではリン酸化が亢進する傾向が見られ、LPS 刺激下においてそれは顕在化した (Figure 7C)。さらに脂質代謝に関わる種々の遺伝子について mRNA 発現量を調べたところ、ATGL の上昇、PPAR γ 、CEBP α 、FAS、FACS、PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) の減少を認めた (Figure 7D)。

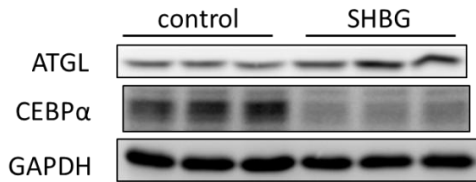
また、性ホルモンの存在により SHBG の作用が影響されるかについて調べるため、性ホルモンを SHBG と共に添加して遺伝子発現変化を調べた。SHBG 20 nM と性ホルモン 20 nM とを共添加した場合も、SHBG 単独投与による ATGL、PPAR γ 、CEBP α の mRNA 発現変化の傾向は概ね保たれた (Figure 7E)。さらに、SHBG を高濃度の性ホルモン 20000 nM (20 μ M) と共添加した場合も、その傾向は概ね保たれた (Figure 7F)。後者の高濃度条件下においては、SHBG と性ホルモンとの結合定数 (テストステロンで $K=1.6 \times 10^9 M^{-1}$ 、エストラジオールで $K=0.68 \times 10^9 M^{-1}$ [18]) を考慮すると、SHBG の性ホルモン結合部位はほぼ飽和されていると推定される。なお、インスリン 100 nM、5min 刺激により誘導されるシグナル伝達分子について、IR β のチロシンリン酸化、AKT や p70S6K のリン酸化の程度は、SHBG による明らかな変化を認めなかった (Figure 7G)。

以上から、SHBG は成熟脂肪細胞に対して脂肪分解促進的に働き、また、性ホルモンの有無に依存せず種々の蛋白発現変化とシグナル変化をもたらすことが確認された。

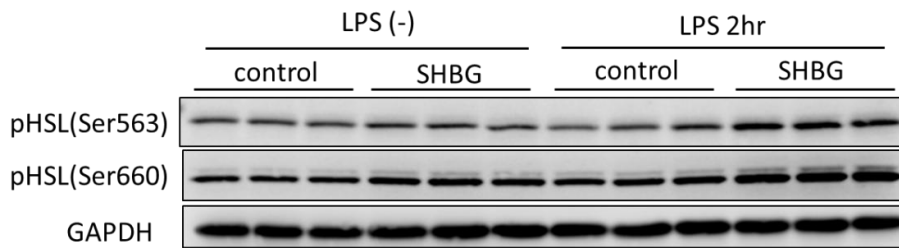
(A)



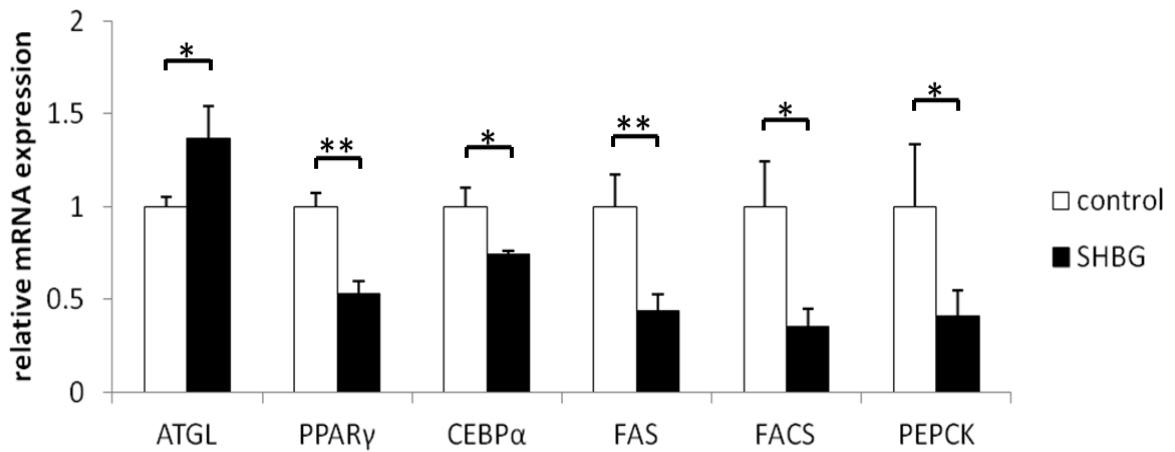
(B)



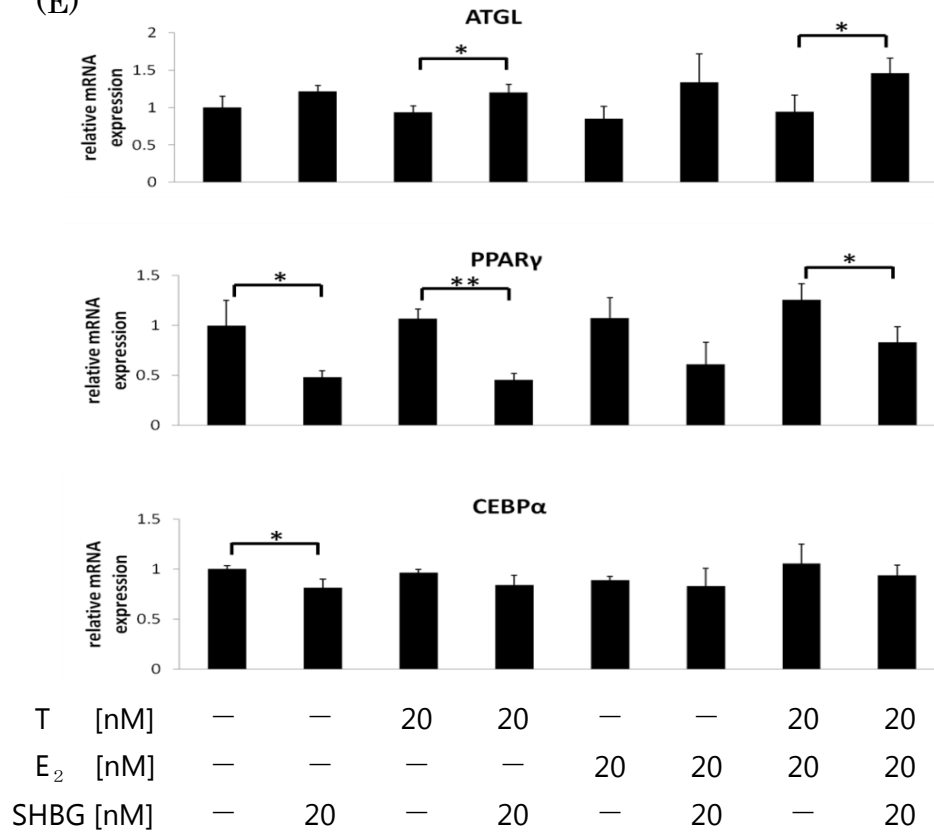
(C)



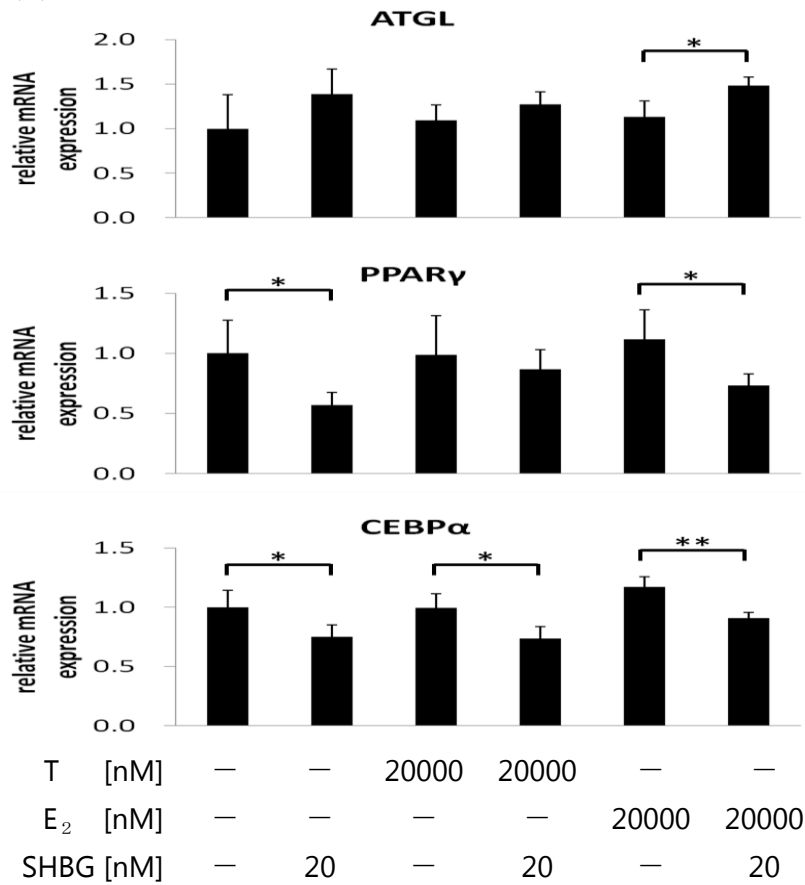
(D)



(E)



(F)



(G)

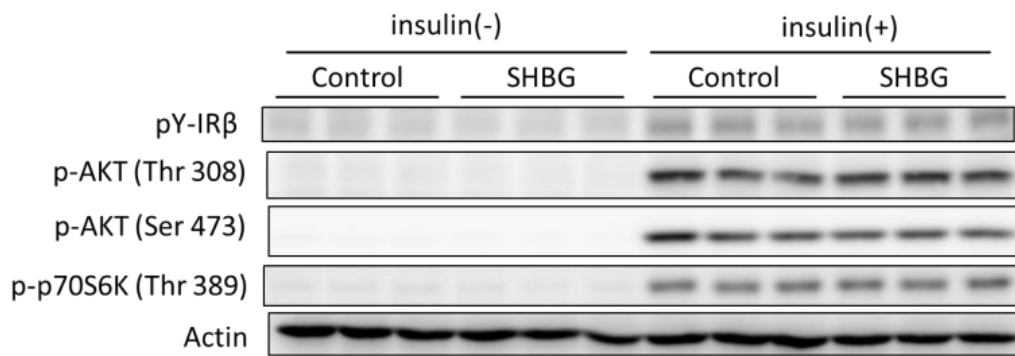


Figure 7. 分化後の 3T3-L1 細胞において、SHBG は種々の蛋白発現変化とシグナル変化をもたらす

分化させた 3T3-L1 細胞に対して、serum-free のもとで、各種条件で SHBG を作用させた。

(A) SHBG 20 nM を 19 時間あるいは 35 時間作用させたのちに培養上清を回収し、glycerol の濃度を調べた (n=3, *: p<0.05, mean ± S.D.)。

(B) SHBG 20 nM を overnight で作用させたのちに細胞を回収し、蛋白発現量を Western blot 法で調べた。

(C) SHBG 20 nM を overnight で作用させたのちに、LPS 1 ng/ml で 2 時間刺激あるいは刺激せずに細胞を回収し、蛋白発現およびリン酸化を Western blot 法で調べた。

(D) SHBG 20 nM を overnight で作用させたのちに細胞を回収し、mRNA 発現量を定量 RT-PCR 法で調べた (n=3, *: p<0.05, **: p<0.01, mean ± S.D.)。

(E) SHBG 20 nM、テストステロン (T) 20 nM、エストラジオール (E₂) 20 nM を組み合わせて overnight で作用させたのちに細胞を回収し、mRNA 発現量を定量 RT-PCR 法で調べた (n=3, *: p<0.05, **: p<0.01, mean ± S.D.)。

(F) SHBG 20 nM、テストステロン (T) 20000 nM (20 μM)、エストラジオール (E₂) 20000 nM (20 μM) を組み合わせて overnight で作用させたのちに細胞を回収し、mRNA 発現量を定量 RT-PCR 法で調べた (n=3, *: p<0.05, **: p<0.01, mean ± S.D.)。

(G) SHBG 20 nM を overnight で作用させたのちに、最終刺激濃度 100 nM でのインスリン刺激を行った。5 分後に上清を除き、cold PBS で 2 回洗浄したのちサンプルバッファーで回収し、シグナルの変化を Western blot 法で調べた。

分化後の 3T3-L1 細胞において、LPS 刺激下での脂肪細胞の炎症性サイトカインの遺伝子発現は、SHBG により抑制される

SHBG の脂肪組織における慢性炎症への関与を検討するために、SHBG が脂肪細胞の炎症性サイトカイン発現に与える影響について検証した。

分化させた 3T3-L1 細胞を LPS 刺激した際に SHBG の存在によって炎症性サイトカイン発現が変化するかを調べたところ、SHBG 添加群では MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) および IL-6 の mRNA 発現の低下を認め、SHBG による抗炎症作用が示唆された。この変化は性ホルモンの存在の有無に関わらず見られ (Figure 8)、とくに、SHBG 20 nM と性ホルモン 1000 nM との共添加では、その結合定数を考慮すると SHBG のほぼすべてが性ホルモンと結合していることが推定される濃度であり、SHBG への性ホルモンの結合は SHBG の抗炎症作用に影響しない可能性が示唆された。

マウス腹腔マクロファージの炎症性サイトカインの発現は、SHBG により抑制される

さらに、SHBG がマクロファージの炎症性サイトカイン発現に与える影響を調べた。LPS 刺激の有無に関わらず、SHBG 添加群では、マクロファージにおける TNF- α 、MCP-1、IL-6 の mRNA 発現量が減少した (Figure 9)。

以上から、SHBG が脂肪細胞とマクロファージのそれぞれに直接作用し、炎症性サイトカイン発現を抑制することが確認された。

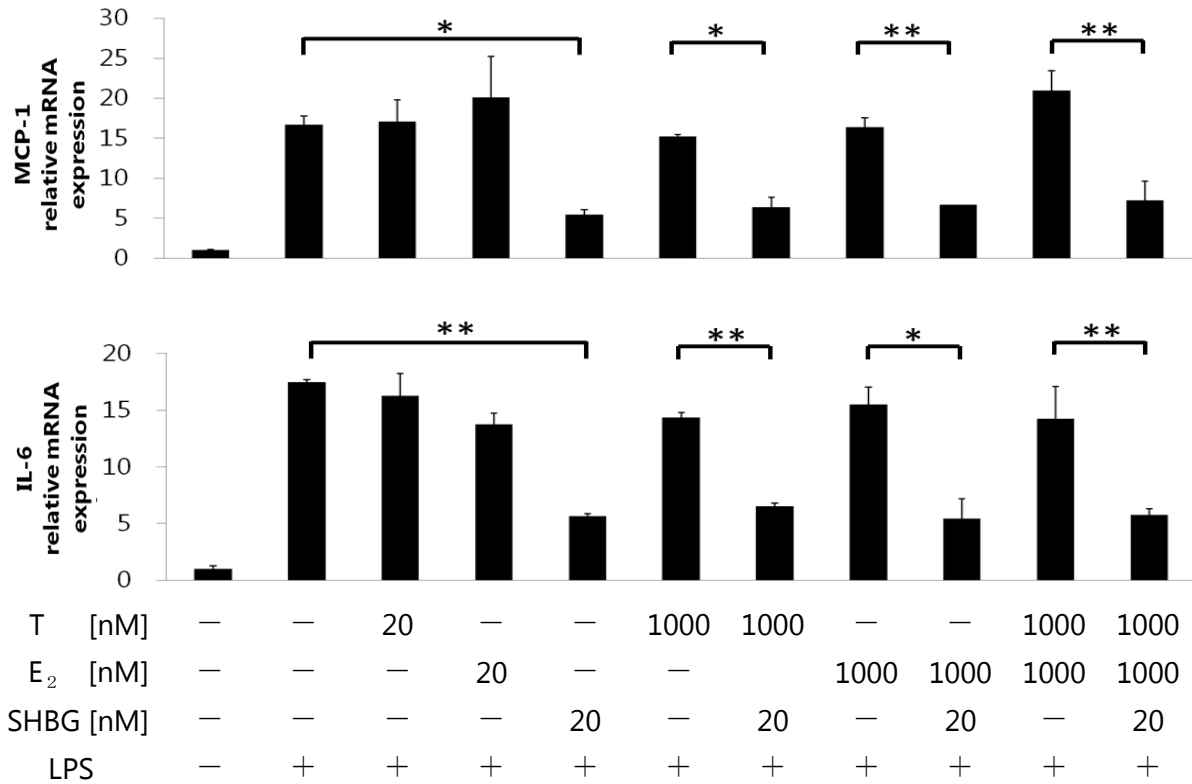


Figure 8. 分化後の 3T3-L1 細胞において SHBG は炎症性サイトカインの遺伝子発現上昇を抑制し、それは性ホルモンの有無にかかわらず発揮される

分化させた 3T3-L1 細胞に対して、serum-free 下で、SHBG 20 nM、テストステロン (T)、エストラジオール (E₂) を各種濃度で組み合わせて、overnight で作用させたのちに LPS 1 ng/ml を添加し、12 時間反応させた。細胞を回収し、mRNA 発現を定量 RT-PCR 法で調べた (n=2 or 3, *: p<0.05, **: p<0.01, mean ± S.D.)。

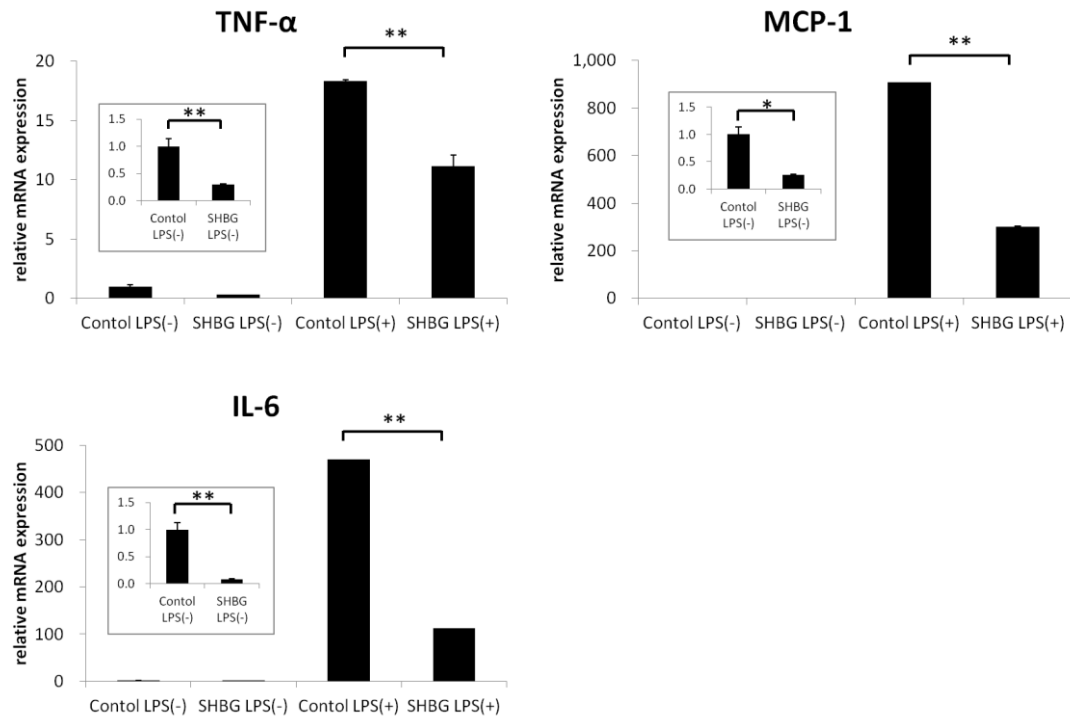


Figure 9. マウスの腹腔マクロファージにおいて SHBG は炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制する

C57BL/6 マウスより腹腔マクロファージを採取、播種して接着させたのち、serum-free 下で SHBG 20 nM を添加、overnight で作用させたのちに、一部には LPS 1 ng/ml を加え、さらに 8 時間後に細胞を回収して炎症性サイトカインの mRNA 発現量を定量 RT-PCR 法で調べた (n=4, *: p<0.05, **: p<0.01, mean ± S.D.)。それぞれのグラフにおいて四角囲みで挿入した図は、LPS(-)でのグラフを拡大したものである。

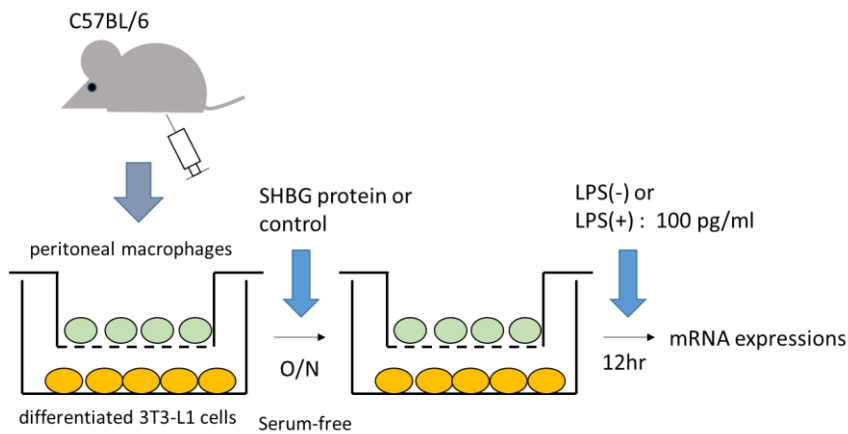
3T3-L1 細胞とマクロファージとの共培養系において、SHBG は炎症性サイトカインの発現を減少させる

最後に、脂肪組織での慢性炎症が脂肪細胞とマクロファージとの相互作用の中で形成されることを踏まえ、分化させた 3T3-L1 細胞とマウス腹腔マクロファージとの共培養系を用いて、SHBG が炎症性サイトカインの発現に与える影響を調べた (Figure 10A)。

LPS 添加により双方の細胞で炎症性サイトカインの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、その際マクロファージの TNF- α 、MCP-1、IL-6 の発現誘導も抑制されていた (Figure 10B)。

以上から、SHBG は、マクロファージと脂肪細胞との相互作用においても、炎症性サイトカインの発現を抑制することが確認された。

(A)



(B)

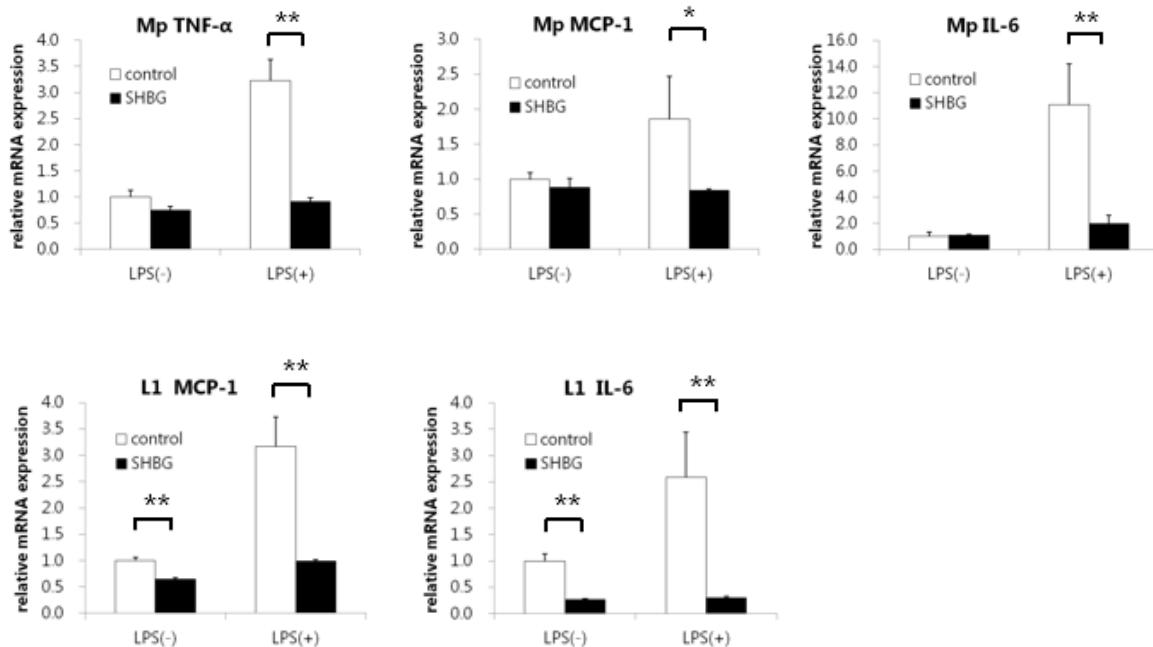


Figure 10. 3T3-L1 細胞とマクロファージの共培養系においても、SHBG は双方の細胞において炎症性サイトカインの mRNA 発現を減少させる

マウス腹腔マクロファージと分化させた 3T3-L1 細胞とを serum-free 下で transwell system で共培養し、SHBG 20 nM を添加した。overnight で作用させたのちに LPS 100 pg/ml を加え、さらに 12 時間後に各々の細胞 (Mp: macrophage, L1: 3T3-L1) を回収した。

(A) 実験概略図。

(B) 定量 RT-PCR 法で炎症性サイトカインの mRNA 発現を調べた (n=2 or 3, *: p<0.05, **: p<0.01, mean ± S.D.)。

考察

SHBG の血中濃度が高いことと肥満やメタボリックシンドローム、2 型糖尿病のリスクとが負に相関することが臨床的に指摘され[26, 66, 67]、また、血中 SHBG 濃度に関わる SNP を用いた解析報告から SHBG 作用が糖尿病発症予防に寄与しうる可能性が示唆されるなど[38, 68]、SHBG の代謝性疾患に対する保護作用を示唆する知見が集積されてきたものの、その機序は未解明である。本研究では、肥満やメタボリックシンドローム、2 型糖尿病の基礎的病態にかかわる因子として重要な、脂肪細胞における脂肪量、脂肪細胞とマクロファージとの相互作用が形成する慢性炎症に関して、SHBG による影響を検討するため、脂肪細胞およびマクロファージを用いて検証をおこなった。

まず、SHBG が脂肪細胞の脂肪量を減少させる可能性について検討した。SHBG は、成熟脂肪細胞に対して用量依存性に脂肪蓄積量を減少させた一方で (Figure 4A-4C)、脂肪前駆細胞からの分化の過程やその間の脂肪蓄積に対しては、明らかな変化を与えなかった (Figure 6A-6C)。さらに、成熟脂肪細胞の脂肪量減少に伴う変化を調べたところ、SHBG 添加により培養上清中のグリセロール濃度が増加した (Figure 7A)。脂肪細胞では、蓄積された脂肪が種々のリパーゼにより分解されると、分解産物であるグリセロールが細胞外に放出されることから[6]、SHBG により成熟脂肪細胞内の脂肪分解が亢進している可能性が考えられた。そこで、脂質代謝関連の蛋白および遺伝子発現が SHBG 添加に伴いどのように変化しているか調べたところ、

ATGL の発現増加、HSL のリン酸化の亢進、PPAR γ や CEBP α 、FAS、FACS、PEPCK の発現減少を認め (Figure 7B-7D)、これらの多彩な変化が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、脂肪細胞における代謝障害に対して保護的に働く可能性があると考えられる [8, 9]。

ただし、これまで脂肪細胞の肥大自体がどのような細胞機能障害に帰結するかについては十分解明されているとはいえず [69]、その背景には、肥大をもたらす刺激因子の直接作用の影響や、生体における周囲環境および他臓器との相互作用の影響などを排除することが難しいことがある。今回の SHBG による脂肪量減少効果については、付随して生じる一連の変化を詳細に調べていく中で、その意義について検討されて行かなければならない。なお、性ホルモンの添加の有無に関わらず種々の蛋白発現変化の傾向が見られたことから、SHBG は、性ホルモン結合に依存せずに同様の効果を発揮する可能性が示唆された (Figure 7E, 7F)。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 (Figure 7G)。シグナルの伝達時間を考慮すると [70]、少なくとも AKT より上流に関しては SHBG により変化を生じていない可能性が高い。インスリンシグナルへの SHBG の影響については、さらに長時間での刺激や、インスリン抵抗性を惹起する系などで、今後さらに検討していく必要があると考えられる。

脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化は、耐糖能維持と関係する。脂肪細胞分化の過程を阻害することが耐糖能悪化を伴うという報告や[5]、分化誘導に必須の因子である PPAR γ を活性化するチアゾリジンが抗糖尿病薬として有効であることを考えると[71, 72]、SHBG が脂肪細胞の分化に対して明らかな影響を与えないことは重要な意義がある。また、脂肪細胞に蓄積された中性脂肪は、エネルギー枯渇時に脂肪酸とグリセロールに分解され、脂肪酸は他の臓器あるいは脂肪細胞におけるエネルギー産生に使われ、グリセロールは肝臓での糖新生に利用される。SHBG は脂肪の分化や初期の脂肪蓄積に対しては明らかな阻害作用を有さず、serum-starvation 刺激下での脂肪減少を容易にしたことから、SHBG 濃度が高いと、生理的に脂肪の蓄積を必要とする条件においては脂肪細胞分化と脂肪蓄積の増加機序が保たれ、空腹時や飢餓状態においては他臓器へのエネルギーの供給が容易になる効果があるかもしれない。脂肪分解が容易になれば、カテコラミンやグルカゴン分泌の抑制につながる可能性もある。カテコラミンやグルカゴンは、それらの分泌動態の変化が代謝障害に関与する可能性が指摘されていることから[73, 74]、SHBG による脂肪分解亢進は、それらのホルモン作用の変化を介して間接的に保護的作用を發揮している可能性もある。

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性サイトカイン産生に与える影響を調べた。脂肪細胞において、LPS により惹起される MCP-1 と IL-6 の発現が SHBG 添加で抑制され (Figure 8)、マクロファージにおいても、LPS 刺激の有無にかかわらず TNF- α 、MCP-1、IL-6 の発現が SHBG 添加で抑制された (Figure

9)。さらに両細胞の共培養系でも同様の結果が確認された (Figure 10A, 10B)。脂肪細胞とマクロファージから産生されるサイトカインは、互いに炎症惹起性に作用して悪循環を形成する[9, 10]。また、脂肪細胞で産生される MCP-1 は、血中の単球に対して脂肪組織への浸潤を促すことで、それを助長する[75]。そのため、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異常が生じにくくなる可能性はあると考えられる。なお、いまだ議論のあるところだが、遊離脂肪酸がマクロファージを刺激することで炎症を増悪させる機序も想定されており[76]、SHBG が脂肪細胞に対して脂肪分解を誘導することは、マクロファージとの相互作用の中では炎症惹起性に作用する可能性がある。しかし、今回共培養系においても抗炎症効果が見られたことから、そのような炎症亢進は前面に現れるものではないと考えられる。炎症による代謝異常については、豚島における炎症や視床下部における炎症を介した機序など多臓器が関わるものであり[77, 78]、SHBG が直接それらの臓器でも抗炎症効果を発揮する可能性についても今後検討が必要である。

ヒトにおいて、脂肪細胞が大きいことと炎症性サイトカインの遺伝子発現の上昇とが相関するという報告はあるが[79]、今回脂肪細胞において見られた SHBG による脂肪量減少作用と抗炎症作用が相互にどのように関わるのかは今後明らかにしていく必要がある。脂肪量減少により抗炎症効果がもたらされるかについては、脂肪量が少

なくなることで炎症惹起性の様々なアディポカイン産生が抑制される可能性がある一方で[11]、脂肪細胞単独の系では脂肪量増大自体は必ずしも炎症惹起性に作用しないという報告もある[69, 80]。また、抗炎症作用により脂肪量が減少するかについては、炎症抑制が脂肪細胞の肥大抑制や肥満予防に寄与する可能性も示唆されている一方で[81]、炎症性サイトカインは脂肪分解の亢進から脂肪量を減少させる作用を有するとの報告もある[82]。以上をふまえると、脂肪量減少と抗炎症と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だろう。

今回、SHBG 蛋白の添加により脂肪量減少作用や抗炎症作用が見られ、また、関連する蛋白や遺伝子の発現変化については性ホルモンの添加の有無に関わらず傾向が保たれることが見出された。その作用機序としては SHBG 受容体を介している可能性がある。SHBG 受容体は細胞表面に発現し、SHBG 単独で、あるいは SHBG と性ホルモンとが共同して受容体に作用するとされており[42, 43, 83]、G 蛋白共役型受容体であることが示唆されているが、未だ同定されていない[84]。なお、主に上皮系の細胞では、エンドサイトーシスにより SHBG と性ホルモンとを内部に取り込む受容体である megalin が報告されており[45]、SHBG と性ホルモンとは関連し合いながら様々な作用を有すると考えられる。その一方で、本研究では性ホルモン添加の有無は SHBG のもたらす種々の因子の発現変化に大きくは影響しなかったことから、SHBG 単独での作用も考慮していくべきである。臨床では SHBG 遺伝子のホモミスセンス

変異を有する症例について、遊離テストステロン濃度が正常であるにも関わらず、性欲低下や筋力低下などの男性ホルモン不足様症状を呈したと報告されているが[85]、SHBGの変異による性ホルモン利用効率の低下のみならず、SHBG単独での作用の消失が影響している可能性もある。また、男性において加齢に伴って総テストステロン量が減少することは、加齢に伴ってSHBGが上昇することと相まって、遊離テストステロン濃度の減少につながり、骨粗鬆症やメタボリックシンドロームなどの代謝障害の一因になるという機序も提唱されているが[86]、血中の遊離性ホルモン濃度は必ずしも各組織でのホルモン利用能と相関せず、むしろSHBGの増加はその利用能を亢進しているかもしれず、あるいは、SHBG単独での作用が性ホルモン作用の低下を補償している可能性もある。なお、性ホルモンの作用として、アンドロゲンやエストロゲンによる脂肪量減少や[32, 33]、アンドロゲンによる炎症亢進[34]、エストロゲンによる炎症抑制など[35]、様々な報告がなされてきたが、その作用には濃度や投与のタイミング、細胞周囲の環境や内部の代謝状態など種々の条件が影響し、複雑である[32, 87-90]。本研究の知見は、性ホルモン研究においても新たな視点を与えるものと考えられる。

最近、ヒトSHBGを発現するトランスジェニックマウス[91]と肥満糖尿病モデルのdb/dbマウスとの交配マウスについて、解析結果が報告された[92]。それによると、SHBGトランスジェニックマウスでは脂肪重量が減少していたとされ、本研究で得られた脂肪量減少の知見が、*in vivo*でも確認されていると言える。なお、同報告では

炎症マーカーについての報告はないが、脂質や血糖値、インスリン値などに明らかな違いは見出されておらず、SHBG による代謝への保護効果が発揮されるためには、何らかの条件が必要であることが示唆される。今後はそのような条件を見出すことで、生体における SHBG の生理的意義が明らかになるものと考えられる。たとえば臨床的には、閉経後女性における 2 型糖尿病リスク低下との関連報告が比較的多いため [37]、卵巣切除による閉経モデルでの SHBG の役割の検討は有意義だろう。また、単糖類負荷が SHBG 発現を減らすことや [93]、食事中的大豆などに含まれるフィトエストロゲンが血中 SHBG 濃度を上昇させることが報告されており [94]、摂餌内容によって SHBG の効果が変化するかなども検討していく必要があるだろう。SHBG が代謝異常に対して抑制的に働く機序およびそれが発揮される条件の詳細を明らかにすることは、メタボリックシンドロームや糖尿病の発症機序に関する新たな知見につながる可能性がある。代謝障害の発症機序については不明な点が多く、たとえば糖尿病治療に有効な薬剤が発症予防には無効である場合がある [95]。肥満者数や糖尿病患者数の増加に歯止めをかけるためには、その過程に関与する機序の解明が必要不可欠であり、SHBG 作用の解明がそれに寄与できるかもしれない。さらに、SHBG は前立腺癌や乳癌との関連も指摘されており [96, 97]、それらの病態の理解や治療の開発にも役立つ可能性がある。

Figure 11 に、本研究の結果と、推測される SHBG の作用の概念図を示す。肥満やメタボリックシンドローム、糖尿病において重要な役割を果たしている脂肪およびマ

クロファージに SHBG が与える影響について *in vitro* で検討したところ、成熟脂肪細胞において脂肪量の減少と炎症性サイトカイン発現の減少を、またマクロファージにおいても炎症性サイトカイン発現の減少をもたらし、脂肪細胞とマクロファージとの相互作用においても抗炎症効果を発揮することが確認された。これらの脂肪量減少作用や抗炎症作用が長期的に作用することが、臨床的に示唆されている抗肥満作用やメタボリックシンドローム、糖尿病の予防効果に関与している可能性がある。本研究は、SHBG が代謝障害に対して保護的に働きうる機序について、分子生物学的手法を用いて示唆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、糖尿病の新たな予防戦略や創薬に繋がることが期待されると考えられた。

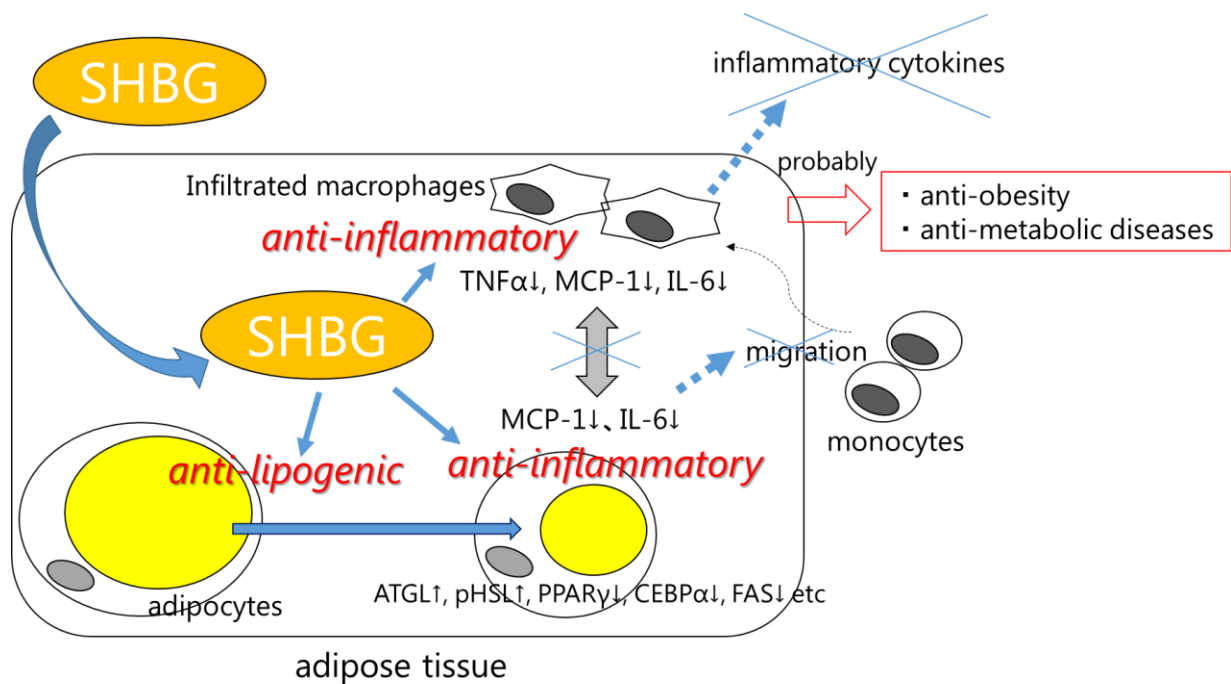


Figure 11. 本研究による結果の概念図

SHBGにより、脂肪細胞における脂肪量減少と、種々の蛋白発現変化やシグナル変化を認めた。また脂肪細胞とマクロファージにおいて炎症性サイトカインの発現低下を認め、SHBGには抗炎症作用もあると考えられた。これらの変化が、肥満の予防や種々の代謝障害の形成抑制をもたらし、臨床的に示唆されている、肥満やメタボリックシンドローム、糖尿病の予防効果につながっている可能性がある。

引用文献

1. WHO. *Obesity and overweight*. 2015 [cited 2016 15 Feb]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
2. Lavie, C.J., A. De Schutter, P. Parto, E. Jahangir, P. Kokkinos, F.B. Ortega, R. Arena, and R.V. Milani, *Obesity and Prevalence of Cardiovascular Diseases and Prognosis - the Obesity Paradox Updated*. Prog Cardiovasc Dis, 2016.
3. Arnold, M., M. Leitzmann, H. Freisling, F. Bray, I. Romieu, A. Renehan, and I. Soerjomataram, *Obesity and cancer: An update of the global impact*. Cancer Epidemiol. **41**: p. 8-15, 2016.
4. Campbell, J.M., M. Lane, J.A. Owens, and H.W. Bakos, *Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: a systematic review and meta-analysis*. Reprod Biomed Online. **31**(5): p. 593-604, 2015.
5. Wu, Z., E.D. Rosen, R. Brun, S. Hauser, G. Adelmant, A.E. Troy, C. McKeon, G.J. Darlington, and B.M. Spiegelman, *Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity*. Mol Cell. **3**(2): p. 151-8, 1999.
6. Masoodi, M., O. Kuda, M. Rossmeisl, P. Flachs, and J. Kopecky, *Lipid*

- signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism.*
Biochim Biophys Acta. **1851**(4): p. 503-18, 2015.
7. Patni, N. and A. Garg, *Congenital generalized lipodystrophies--new insights into metabolic dysfunction.* Nat Rev Endocrinol. **11**(9): p. 522-34, 2015.
 8. Rutkowski, J.M., J.H. Stern, and P.E. Scherer, *The cell biology of fat expansion.* J Cell Biol. **208**(5): p. 501-12, 2015.
 9. Dali-Youcef, N., M. Mecili, R. Ricci, and E. Andres, *Metabolic inflammation: connecting obesity and insulin resistance.* Ann Med. **45**(3): p. 242-53, 2013.
 10. Odegaard, J.I. and A. Chawla, *Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis.* Science. **339**(6116): p. 172-7, 2013.
 11. Chawla, A., K.D. Nguyen, and Y.P. Goh, *Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease.* Nat Rev Immunol. **11**(11): p. 738-49, 2011.
 12. Weisberg, S.P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, and A.W. Ferrante, Jr., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.* J Clin Invest. **112**(12): p. 1796-808, 2003.
 13. Xu, H., G.T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C.J. Chou, J. Sole, A. Nichols, J.S. Ross, L.A. Tartaglia, and H. Chen, *Chronic inflammation in fat plays a*

- crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest.* **112**(12): p. 1821-30, 2003.
14. Cani, P.D., J. Amar, M.A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A.M. Neyrinck, F. Fava, K.M. Tuohy, C. Chabo, A. Waget, E. Delmee, B. Cousin, T. Sulpice, B. Chamontin, J. Ferrieres, J.F. Tanti, G.R. Gibson, L. Casteilla, N.M. Delzenne, M.C. Alessi, and R. Burcelin, *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes.* **56**(7): p. 1761-72, 2007.
15. Creely, S.J., P.G. McTernan, C.M. Kusminski, M. Fisher f, N.F. Da Silva, M. Khanolkar, M. Evans, A.L. Harte, and S. Kumar, *Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. Am J Physiol Endocrinol Metab.* **292**(3): p. E740-7, 2007.
16. Brun, P., I. Castagliuolo, V. Di Leo, A. Buda, M. Pinzani, G. Palu, and D. Martines, *Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **292**(2): p. G518-25, 2007.
17. Glass, C.K. and J.M. Olefsky, *Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. Cell Metab.* **15**(5): p. 635-45, 2012.
18. Dunn, J.F., B.C. Nisula, and D. Rodbard, *Transport of steroid hormones:*

- binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. J Clin Endocrinol Metab.* **53**(1): p. 58-68, 1981.
19. Pugeat, M.M., J.F. Dunn, and B.C. Nisula, *Transport of steroid hormones: interaction of 70 drugs with testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. J Clin Endocrinol Metab.* **53**(1): p. 69-75, 1981.
20. Hammond, G.L., *Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. Biol Reprod.* **85**(3): p. 431-41, 2011.
21. Zmuda, J.M., P.D. Thompson, and S.J. Winters, *Exercise increases serum testosterone and sex hormone-binding globulin levels in older men. Metabolism.* **45**(8): p. 935-9, 1996.
22. Pugeat, M., N. Nader, K. Hogeveen, G. Raverot, H. Dechaud, and C. Grenot, *Sex hormone-binding globulin gene expression in the liver: drugs and the metabolic syndrome. Mol Cell Endocrinol.* **316**(1): p. 53-9, 2010.
23. Simo, R., A. Barbosa-Desongles, A. Lecube, C. Hernandez, and D.M. Selva, *Potential role of tumor necrosis factor-alpha in downregulating sex hormone-binding globulin. Diabetes.* **61**(2): p. 372-82, 2012.
24. Mayo Clinic, M.M.L. *Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG), Serum.*

[cited 2016 15 Feb]; Available from:

<http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/9285>.

25. Wang, C., G. Jackson, T.H. Jones, A.M. Matsumoto, A. Nehra, M.A. Perelman, R.S. Swerdloff, A. Traish, M. Zitzmann, and G. Cunningham, *Low testosterone associated with obesity and the metabolic syndrome contributes to sexual dysfunction and cardiovascular disease risk in men with type 2 diabetes*. *Diabetes Care*. **34**(7): p. 1669-75, 2011.
26. Zhang, J., X. Huang, M. Liao, Y. Gao, A. Tan, X. Yang, H. Zhang, L. Mo, Y. Zhang, Z. Lu, C. Wu, Y. Hu, and Z. Mo, *Both total testosterone and sex hormone-binding globulin are independent risk factors for metabolic syndrome: results from Fangchenggang Area Male Health and Examination Survey in China*. *Diabetes Metab Res Rev*. **29**(5): p. 391-7, 2013.
27. Pasquali, R., *Obesity and androgens: facts and perspectives*. *Fertil Steril*. **85**(5): p. 1319-40, 2006.
28. Skalba, P., M. Wojtowicz, and J. Sikora, *Androgen and SHBG serum concentrations in late post-menopause women*. *Med Sci Monit*. **9**(3): p. Cr152-6, 2003.

29. Liao, C.H., H.Y. Li, H.J. Yu, H.S. Chiang, M.S. Lin, C.H. Hua, and W.Y. Ma, *Low serum sex hormone-binding globulin: marker of inflammation?* Clin Chim Acta. **413**(7-8): p. 803-7, 2012.
30. Maggio, M., G.P. Ceda, F. Lauretani, S. Bandinelli, A.M. Corsi, F. Giallauria, J.M. Guralnik, G. Zuliani, C. Cattabiani, S. Parrino, F. Ablondi, E. Dall'aglio, G. Ceresini, S. Basaria, and L. Ferrucci, *SHBG, sex hormones, and inflammatory markers in older women.* J Clin Endocrinol Metab. **96**(4): p. 1053-9, 2011.
31. Polari, L., E. Yatkin, M.G. Martinez Chacon, M. Ahotupa, A. Smeds, L. Strauss, F. Zhang, M. Poutanen, N. Saarinen, and S.I. Makela, *Weight gain and inflammation regulate aromatase expression in male adipose tissue, as evidenced by reporter gene activity.* Mol Cell Endocrinol. **412**: p. 123-30, 2015.
32. Arner, P., *Effects of testosterone on fat cell lipolysis. Species differences and possible role in polycystic ovarian syndrome.* Biochimie. **87**(1): p. 39-43, 2005.
33. Homma, H., H. Kurachi, Y. Nishio, T. Takeda, T. Yamamoto, K. Adachi, K. Morishige, M. Ohmichi, Y. Matsuzawa, and Y. Murata, *Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen*

- response element on the lipoprotein lipase promoter. J Biol Chem.* **275**(15): p. 11404-11, 2000.
34. Su, C., M. Chen, H. Huang, and J. Lin, *Testosterone enhances lipopolysaccharide-induced interleukin-6 and macrophage chemotactic protein-1 expression by activating the extracellular signal-regulated kinase 1/2/nuclear factor-kappaB signalling pathways in 3T3-L1 adipocytes. Mol Med Rep.* **12**(1): p. 696-704, 2015.
35. Pektas, M., A.H. Kurt, I. Un, R.N. Tiftik, and K. Buyukafsar, *Effects of 17beta-estradiol and progesterone on the production of adipokines in differentiating 3T3-L1 adipocytes: Role of Rho-kinase. Cytokine.* **72**(2): p. 130-4, 2015.
36. Rojas, J., M. Chavez, L. Olivar, M. Rojas, J. Morillo, J. Mejias, M. Calvo, and V. Bermudez, *Polycystic ovary syndrome, insulin resistance, and obesity: navigating the pathophysiologic labyrinth. Int J Reprod Med.* **2014**: p. 719050, 2014.
37. Ding, E.L., Y. Song, V.S. Malik, and S. Liu, *Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. Jama.* **295**(11): p. 1288-99, 2006.
38. Ding, E.L., Y. Song, J.E. Manson, D.J. Hunter, C.C. Lee, N. Rifai, J.E.

- Buring, J.M. Gaziano, and S. Liu, *Sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes in women and men*. N Engl J Med. **361**(12): p. 1152-63, 2009.
39. Veldhuis, J.D., O.P. Bondar, R.B. Dyer, S.A. Trushin, E.W. Klee, R.J. Singh, and G.G. Klee, *Immunological and mass spectrometric assays of SHBG: consistent and inconsistent metabolic associations in healthy men*. J Clin Endocrinol Metab. **99**(1): p. 184-93, 2014.
40. Gong, Y., H. Xiao, C. Li, J. Bai, X. Cheng, M. Jin, B. Sun, Y. Lu, Y. Shao, and H. Tian, *Elevated t/e2 ratio is associated with an increased risk of cerebrovascular disease in elderly men*. PLoS One. **8**(4): p. e61598, 2013.
41. Maggio, M., F. Lauretani, S. Basaria, G.P. Ceda, S. Bandinelli, E.J. Metter, A.J. Bos, C. Ruggiero, G. Ceresini, G. Paolisso, A. Artoni, G. Valenti, J.M. Guralnik, and L. Ferrucci, *Sex hormone binding globulin levels across the adult lifespan in women--the role of body mass index and fasting insulin*. J Endocrinol Invest. **31**(7): p. 597-601, 2008.
42. Queipo, G., M. Deas, C. Arranz, C. Carino, R. Gonzalez, and F. Larrea, *Sex hormone-binding globulin stimulates chorionic gonadotrophin secretion from human cytotrophoblasts in culture*. Hum Reprod. **13**(5): p. 1368-73, 1998.

43. Nakhla, A.M., M.S. Khan, N.P. Romas, and W. Rosner, *Estradiol causes the rapid accumulation of cAMP in human prostate*. Proc Natl Acad Sci U S A. **91**(12): p. 5402-5, 1994.
44. Porto, C.S., M.F. Lazari, L.C. Abreu, C.W. Bardin, and G.L. Gunsalus, *Receptors for androgen-binding proteins: internalization and intracellular signalling*. J Steroid Biochem Mol Biol. **53**(1-6): p. 561-5, 1995.
45. Hammes, A., T.K. Andreassen, R. Spoelgen, J. Raila, N. Hubner, H. Schulz, J. Metzger, F.J. Schweigert, P.B. Lippa, A. Nykjaer, and T.E. Willnow, *Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids*. Cell. **122**(5): p. 751-62, 2005.
46. Avvakumov, G.V., A. Cherkasov, Y.A. Muller, and G.L. Hammond, *Structural analyses of sex hormone-binding globulin reveal novel ligands and function*. Mol Cell Endocrinol. **316**(1): p. 13-23, 2010.
47. Berthois, Y., J.A. Katzenellenbogen, and B.S. Katzenellenbogen, *Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture*. Proc Natl Acad Sci U S A. **83**(8): p. 2496-500, 1986.
48. Ntambi, J.M. and K. Young-Cheul, *Adipocyte differentiation and gene expression*. J Nutr. **130**(12): p. 3122s-3126s, 2000.

49. Fowler, S.D. and P. Greenspan, *Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O*. *J Histochem Cytochem.* **33**(8): p. 833-6, 1985.
50. Rizzatti, V., F. Boschi, M. Pedrotti, E. Zoico, A. Sbarbati, and M. Zamboni, *Lipid droplets characterization in adipocyte differentiated 3T3-L1 cells: size and optical density distribution*. *Eur J Histochem.* **57**(3): p. e24, 2013.
51. Ishiyama, M., Y. Miyazono, K. Sasamoto, Y. Ohkura, and K. Ueno, *A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability*. *Talanta.* **44**(7): p. 1299-305, 1997.
52. Ouchi, N., A. Higuchi, K. Ohashi, Y. Oshima, N. Gokce, R. Shibata, Y. Akasaki, A. Shimono, and K. Walsh, *Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity*. *Science.* **329**(5990): p. 454-7, 2010.
53. Sha, H., Y. He, H. Chen, C. Wang, A. Zenno, H. Shi, X. Yang, X. Zhang, and L. Qi, *The IRE1alpha-XBP1 pathway of the unfolded protein response is required for adipogenesis*. *Cell Metab.* **9**(6): p. 556-64, 2009.
54. Charytonowicz, E., M. Terry, K. Coakley, L. Telis, F. Remotti, C. Cordon-Cardo, R.N. Taub, and I. Matushansky, *PPARgamma agonists*

- enhance ET-743-induced adipogenic differentiation in a transgenic mouse model of myxoid round cell liposarcoma. J Clin Invest. 122(3): p. 886-98, 2012.*
55. Dusaulcy, R., C. Rancoule, S. Gres, E. Wanecq, A. Colom, C. Guigne, L.A. van Meeteren, W.H. Moolenaar, P. Valet, and J.S. Saulnier-Blache, *Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. J Lipid Res. 52(6): p. 1247-55, 2011.*
56. Taniguchi, C.M., K. Ueki, and R. Kahn, *Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. J Clin Invest. 115(3): p. 718-27, 2005.*
57. Chakrabarti, P. and K.V. Kandror, *FoxO1 controls insulin-dependent adipose triglyceride lipase (ATGL) expression and lipolysis in adipocytes. J Biol Chem. 284(20): p. 13296-300, 2009.*
58. Haschemi, A., P. Kosma, L. Gille, C.R. Evans, C.F. Burant, P. Starkl, B. Knapp, R. Haas, J.A. Schmid, C. Jandl, S. Amir, G. Lubec, J. Park, H. Esterbauer, M. Bilban, L. Brizuela, J.A. Pospisilik, L.E. Otterbein, and O. Wagner, *The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. Cell Metab. 15(6): p. 813-26, 2012.*
59. Liang, J., J. Wang, Y. Saad, L. Warble, E. Becerra, and P.E. Kolattukudy,

- Participation of MCP-induced protein 1 in lipopolysaccharide preconditioning-induced ischemic stroke tolerance by regulating the expression of proinflammatory cytokines. J Neuroinflammation. 8: p. 182, 2011.*
60. Iwashita, M., H. Sakoda, A. Kushiya, M. Fujishiro, H. Ohno, Y. Nakatsu, T. Fukushima, S. Kumamoto, Y. Tsuchiya, T. Kikuchi, H. Kurihara, H. Akazawa, I. Komuro, H. Kamata, F. Nishimura, and T. Asano, *Valsartan, independently of AT1 receptor or PPARgamma, suppresses LPS-induced macrophage activation and improves insulin resistance in cocultured adipocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab. 302(3): p. E286-96, 2012.*
61. Zhou, Y., B.L. Liu, K. Liu, N. Tang, J. Huang, Y. An, and L. Li, *Establishment of the insulin resistance induced by inflammatory response in 3T3-L1 preadipocytes cell line. Inflammation. 31(5): p. 355-64, 2008.*
62. Duncan, R.E., M. Ahmadian, K. Jaworski, E. Sarkadi-Nagy, and H.S. Sul, *Regulation of lipolysis in adipocytes. Annu Rev Nutr. 27: p. 79-101, 2007.*
63. Zimmermann, R., J.G. Strauss, G. Haemmerle, G. Schoiswohl, R. Birner-Gruenberger, M. Riederer, A. Lass, G. Neuberger, F. Eisenhaber, A. Hermetter, and R. Zechner, *Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. Science. 306(5700): p. 1383-6, 2004.*

64. Yang, X., B.L. Heckmann, X. Zhang, C.M. Smas, and J. Liu, *Distinct mechanisms regulate ATGL-mediated adipocyte lipolysis by lipid droplet coat proteins*. Mol Endocrinol. **27**(1): p. 116-26, 2013.
65. Anthonsen, M.W., L. Ronnstrand, C. Wernstedt, E. Degerman, and C. Holm, *Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro*. J Biol Chem. **273**(1): p. 215-21, 1998.
66. Glass, A.R., R.S. Swerdloff, G.A. Bray, W.T. Dahms, and R.L. Atkinson, *Low serum testosterone and sex-hormone-binding-globulin in massively obese men*. J Clin Endocrinol Metab. **45**(6): p. 1211-9, 1977.
67. Andersson, B., P. Marin, L. Lissner, A. Vermeulen, and P. Bjorntorp, *Testosterone concentrations in women and men with NIDDM*. Diabetes Care. **17**(5): p. 405-11, 1994.
68. Perry, J.R., M.N. Weedon, C. Langenberg, A.U. Jackson, V. Lyssenko, T. Sparso, G. Thorleifsson, H. Grallert, L. Ferrucci, M. Maggio, G. Paolisso, M. Walker, C.N. Palmer, F. Payne, E. Young, C. Herder, N. Narisu, M.A. Morken, L.L. Bonnycastle, K.R. Owen, B. Shields, B. Knight, A. Bennett, C.J. Groves, A. Ruukonen, M.R. Jarvelin, E. Pearson, L. Pascoe, E. Ferrannini, S.R. Bornstein, H.M. Stringham, L.J. Scott, J. Kuusisto, P.

- Nilsson, M. Neptin, A.P. Gjesing, C. Pisinger, T. Lauritzen, A. Sandbaek, M. Sampson, E. Zeggini, C.M. Lindgren, V. Steinthorsdottir, U. Thorsteinsdottir, T. Hansen, P. Schwarz, T. Illig, M. Laakso, K. Stefansson, A.D. Morris, L. Groop, O. Pedersen, M. Boehnke, I. Barroso, N.J. Wareham, A.T. Hattersley, M.I. McCarthy, and T.M. Frayling, *Genetic evidence that raised sex hormone binding globulin (SHBG) levels reduce the risk of type 2 diabetes*. Hum Mol Genet. **19**(3): p. 535-44, 2010.
69. Kim, J.I., J.Y. Huh, J.H. Sohn, S.S. Choe, Y.S. Lee, C.Y. Lim, A. Jo, S.B. Park, W. Han, and J.B. Kim, *Lipid-overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation*. Mol Cell Biol. **35**(10): p. 1686-99, 2015.
70. Humphrey, S.J., G. Yang, P. Yang, D.J. Fazakerley, J. Stockli, J.Y. Yang, and D.E. James, *Dynamic adipocyte phosphoproteome reveals that Akt directly regulates mTORC2*. Cell Metab. **17**(6): p. 1009-20, 2013.
71. Tontonoz, P., E. Hu, R.A. Graves, A.I. Budavari, and B.M. Spiegelman, *mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer*. Genes Dev. **8**(10): p. 1224-34, 1994.
72. Lehmann, J.M., L.B. Moore, T.A. Smith-Oliver, W.O. Wilkison, T.M. Willson, and S.A. Kliewer, *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand*

- for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)*. J Biol Chem. **270**(22): p. 12953-6, 1995.
73. Peppas, M., C. Koliaki, P. Nikolopoulos, and S.A. Raptis, *Skeletal muscle insulin resistance in endocrine disease*. J Biomed Biotechnol. **2010**: p. 527850, 2010.
74. Lee, Y., M.Y. Wang, X.Q. Du, M.J. Charron, and R.H. Unger, *Glucagon receptor knockout prevents insulin-deficient type 1 diabetes in mice*. Diabetes. **60**(2): p. 391-7, 2011.
75. Kanda, H., S. Tateya, Y. Tamori, K. Kotani, K. Hiasa, R. Kitazawa, S. Kitazawa, H. Miyachi, S. Maeda, K. Egashira, and M. Kasuga, *MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity*. J Clin Invest. **116**(6): p. 1494-505, 2006.
76. Shi, H., M.V. Kokoeva, K. Inouye, I. Tzameli, H. Yin, and J.S. Flier, *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance*. J Clin Invest. **116**(11): p. 3015-25, 2006.
77. Donath, M.Y., M. Boni-Schnetzler, H. Ellingsgaard, and J.A. Ehses, *Islet inflammation impairs the pancreatic beta-cell in type 2 diabetes*. Physiology (Bethesda). **24**: p. 325-31, 2009.

78. Milanski, M., A.P. Arruda, A. Coope, L.M. Ignacio-Souza, C.E. Nunez, E.A. Roman, T. Romanatto, L.B. Pascoal, A.M. Caricilli, M.A. Torsoni, P.O. Prada, M.J. Saad, and L.A. Velloso, *Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver*. *Diabetes*. **61**(6): p. 1455-62, 2012.
79. Skurk, T., C. Alberti-Huber, C. Herder, and H. Hauner, *Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion*. *J Clin Endocrinol Metab*. **92**(3): p. 1023-33, 2007.
80. Lee, Y.S., P. Li, J.Y. Huh, I.J. Hwang, M. Lu, J.I. Kim, M. Ham, S. Talukdar, A. Chen, W.J. Lu, G.K. Bandyopadhyay, R. Schwendener, J. Olefsky, and J.B. Kim, *Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance*. *Diabetes*. **60**(10): p. 2474-83, 2011.
81. Gao, H., N. Mejhert, J.A. Fretz, E. Arner, S. Lorente-Cebrian, A. Ehlund, K. Dahlman-Wright, X. Gong, S. Stromblad, I. Douagi, J. Laurencikiene, I. Dahlman, C.O. Daub, M. Ryden, M.C. Horowitz, and P. Arner, *Early B cell factor 1 regulates adipocyte morphology and lipolysis in white adipose tissue*. *Cell Metab*. **19**(6): p. 981-92, 2014.
82. Souza, S.C., H.J. Palmer, Y.H. Kang, M.T. Yamamoto, K.V. Muliro, K.E. Paulson, and A.S. Greenberg, *TNF-alpha induction of lipolysis is mediated*

- through activation of the extracellular signal related kinase pathway in 3T3-L1 adipocytes. J Cell Biochem. 89(6): p. 1077-86, 2003.*
83. Fortunati, N., F. Fissore, A. Fazzari, F. Piovano, M.G. Catalano, M. Becchis, L. Berta, and R. Frairia, *Estradiol induction of cAMP in breast cancer cells is mediated by foetal calf serum (FCS) and sex hormone-binding globulin (SHBG). J Steroid Biochem Mol Biol. 70(1-3): p. 73-80, 1999.*
84. Kahn, S.M., D.J. Hryb, A.M. Nakhla, N.A. Romas, and W. Rosner, *Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. J Endocrinol. 175(1): p. 113-20, 2002.*
85. Vos, M.J., G.S. Mijnhout, J.M. Rondeel, W. Baron, and P.H. Groeneveld, *Sex hormone binding globulin deficiency due to a homozygous missense mutation. J Clin Endocrinol Metab. 99(9): p. E1798-802, 2014.*
86. Yeap, B.B., *Testosterone and ill-health in aging men. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 5(2): p. 113-21, 2009.*
87. Mauvais-Jarvis, F., D.J. Clegg, and A.L. Hevener, *The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. Endocr Rev. 34(3): p. 309-38, 2013.*
88. Kelly, D.M. and T.H. Jones, *Testosterone: a metabolic hormone in health and disease. J Endocrinol. 217(3): p. R25-45, 2013.*

89. Straub, R.H., *The complex role of estrogens in inflammation*. *Endocr Rev.* **28**(5): p. 521-74, 2007.
90. Mayes, J.S. and G.H. Watson, *Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity*. *Obes Rev.* **5**(4): p. 197-216, 2004.
91. Janne, M., H.K. Deol, S.G. Power, S.P. Yee, and G.L. Hammond, *Human sex hormone-binding globulin gene expression in transgenic mice*. *Mol Endocrinol.* **12**(1): p. 123-36, 1998.
92. Saez-Lopez, C., M. Rivera-Gimenez, C. Hernandez, R. Simo, and D.M. Selva, *SHBG-C57BL/ksJ-db/db: a new mouse model to study SHBG expression and regulation during obesity development*. *Endocrinology*: p. en20151677, 2015.
93. Selva, D.M., K.N. Hogeveen, S.M. Innis, and G.L. Hammond, *Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormone-binding globulin gene*. *J Clin Invest.* **117**(12): p. 3979-87, 2007.
94. Low, Y.L., A.M. Dunning, M. Dowsett, R.N. Luben, K.T. Khaw, N.J. Wareham, and S.A. Bingham, *Implications of gene-environment interaction in studies of gene variants in breast cancer: an example of dietary isoflavones and the D356N polymorphism in the sex hormone-binding globulin gene*. *Cancer Res.* **66**(18): p. 8980-3, 2006.

95. Holman, R.R., S.M. Haffner, J.J. McMurray, M.A. Bethel, B. Holzhauer, T.A. Hua, Y. Belenkoy, M. Boolell, J.B. Buse, B.M. Buckley, A.R. Chacra, F.T. Chiang, B. Charbonnel, C.C. Chow, M.J. Davies, P. Deedwania, P. Diem, D. Einhorn, V. Fonseca, G.R. Fulcher, Z. Gaciong, S. Gaztambide, T. Giles, E. Horton, H. Ilkova, T. Jenssen, S.E. Kahn, H. Krum, M. Laakso, L.A. Leiter, N.S. Levitt, V. Mareev, F. Martinez, C. Masson, T. Mazzone, E. Meaney, R. Nesto, C. Pan, R. Prager, S.A. Raptis, G.E. Rutten, H. Sandstroem, F. Schaper, A. Scheen, O. Schmitz, I. Sinay, V. Soska, S. Stender, G. Tamas, G. Tognoni, J. Tuomilehto, A.S. Villamil, J. Vozar, and R.M. Califf, *Effect of nateglinide on the incidence of diabetes and cardiovascular events*. *N Engl J Med.* **362**(16): p. 1463-76, 2010.
96. Lee, J.K., S.S. Byun, S.E. Lee, and S.K. Hong, *Preoperative Serum Sex Hormone-Binding Globulin Level Is an Independent Predictor of Biochemical Outcome After Radical Prostatectomy*. *Medicine (Baltimore)*. **94**(28): p. e1185, 2015.
97. Charni, M., A. Molchadsky, I. Goldstein, H. Solomon, P. Tal, N. Goldfinger, P. Yang, Z. Porat, G. Lozano, and V. Rotter, *Novel p53 target genes secreted by the liver are involved in non-cell-autonomous regulation*. *Cell Death Differ.* **23**(3): p. 509-20, 2016.

謝辞

博士課程在学中、御指導頂きました指導教員の糖尿病・代謝内科門脇孝教授にまず深甚なる謝意を表します。

そして、研究開始当初より懇切丁寧に御指導頂きました宮崎大学医学部 迫田秀之先生、日本大学医学部 藤城緑先生、朝日生命成人病研究所 櫛山暁史先生に深く御礼申し上げます。また、実験にあたり多くの御指導・ご協力を頂きました、東京大学糖尿病・代謝内科 金子直先生、朝日生命成人病研究所 菊池貴子先生、広島大学医学部 浅野知一郎先生、山本屋武先生に深謝いたします。

最後に、研究遂行にあたり、多大なサポートをしてくださった実験助手の嶋崎喜代子さん、白井夏呼さん、藤田政子さん、福田裕理子さんに深く感謝いたします。