

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591200
 研究課題名（和文） 性ステロイドの肺高血圧に及ぼす影響—特発性肺動脈性高血圧の性差を鑑みて—
 研究課題名（英文） Effects of sex steroids on pulmonary hypertension—From the standpoint of sex difference in idiopathic pulmonary arterial hypertension—
 研究代表者
 土井 庄三郎（DOI SHOUZABUROU）
 東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：80262195

研究成果の概要：

性ステロイドの肺高血圧(PH)に及ぼす影響を、雄精巣および雌卵巢の摘出によりラットで検討した。PHモデルは、血管内皮細胞増殖因子受容体阻害剤SU-5416投与後の低酸素下飼育で作成した。体重増加率、右室/左室の圧と重量比、肺細小動脈の新生内膜増殖性変化を含むリモデリングに関して調べた。

PHモデルで、ヒトPAH（肺動脈性肺高血圧）類似の肺細小動脈リモデリングを有する重症PHを認めた。性ステロイドによる肺細小動脈リモデリングの抑制効果は認めなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科（小児循環器）学

キーワード：肺動脈性肺高血圧、肺細小動脈新生内膜増殖性変化、血管内皮細胞増殖因子受容体阻害剤SU-5416、性差、性ステロイド、精巣・卵巢摘出

1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性肺動脈性肺高血圧（IPAH, 従来の原発性肺高血圧 PPH に相当）は従来より、厚生労働省の定める難治性疾患に指定されている。その発生機序に関しては、種々の方面から研究が進められてきたが、未だに詳細は解明されていない。IPAH の主要な病態は、肺細小動脈内皮細胞機能の低下による肺細

小動脈平滑筋の過剰収縮、血小板凝集の亢進と肺細小動脈血管壁（血管内皮、中膜平滑筋、外膜基質と線維）のリモデリングと考えられている。

最近ではPAHに対する3系統の治療薬が国内外で使用されている。一酸化窒素(NO)－cGMP 経路の賦活、プロスタサイクリン(PGI₂)－cAMP 経路の賦活、そして受容体結合

阻害によるエンドセリン 1(ET-1)経路の抑制効果をもつ3系統の薬剤の併用療法が現在では主流で、疾患の予後は従来に比し大いに改善してきている。しかしそれぞれの薬剤の選択基準は示されておらず、またいずれの薬剤を用いても本疾患を完治させることは不可能である。その理由は、3系統の薬剤による過剰収縮と血小板凝集の抑制だけでは、血管壁リモデリングが改善しないことにある。

(2) 一般的に IPAH の患者数は、女性が男性の約 2.5 倍と大きな性差が存在し、しかも若年女性に高頻度に発生する。ほかの PAH も女性に多く認められる。遺伝子変異(BMP2, Endoglin や ARK1)も原因の一部としてわかってきているものの、このような性差を説明することはできていない。

テストステロンやエストロジェンなどの性ステロイドホルモン(以下性ステロイド)は、主として核受容体と結合し、特定遺伝子群の転写活性化により生理学的作用を発揮するが、これを genomic action と呼んでいる。一方急性効果に関しては、膜上受容体を介すると考えられ、non-genomic action と呼んでいる。心血管系では non-genomic action が性ステロイドホルモンの主作用と考えられ、心血管系に対して保護的に働くことが注目されている。エストロジェンは従来より酸化 LDL を低下させることにより、抗動脈硬化作用を発揮することは有名であり、血管内皮機能を正常に保つ作用があるとされている。一方、テストステロンの体血管拡張作用に関しては最近の関心事であり、いくつかの報告がなされている(Endocrinology149: 2517-26, 2008)。以上のような性ステロイドの効果は体血管に対するものであり、肺細小動脈に対する作用に関してはわずかな報告のみである。IPAH が女性に多い理由として、テストステロンの肺血管リモデリング抑制効果が存在するか否かは不明である。

2. 研究の目的

(1) IPAH 患者の肺細小動脈リモデリングの特徴として、新生内膜の増殖性変化を生じることを鑑み、ラットモデルとして中膜平滑筋のみ肥厚するモノクロタリン(MCT)や低酸素飼育ラットモデルを使用せず、新生内膜の増殖性変化を伴う PH ラットモデルを新たに試作する。そして PH、RVH および肺細小動脈リモデリングを確認することにより、今回の実験で使用する PH モデルを確立すること。

(2) IPAH 患者数には性差があり女性に多い理由を解明するために、上記の試作確立した新 PH ラットモデルを使用し、雄ラットでは精巣摘除(castration, cast と略) および雌ラットでは卵巣摘除(Ovalectomy, ovx と略)、

性ステロイドの PH、RVH および肺細小動脈リモデリング(中膜/壁厚比および血管内腔の閉塞性変化)に対する効果を調べること。

(3) 雌ラットの ovx および雄ラットの cast による血中テストステロンやエストロジェンなどの性ステロイド血中濃度の変化を測定し cast 及び ovx の効果を確かめること。

3. 研究の方法

(1) 肺細小動脈内腔の閉塞性変化を伴う新 PH ラットモデルの作成

①ラットの性成熟週齢を鑑み7週齢ラットに、20mg/kg の血管内皮細胞増殖因子受容体(VEGFR)阻害剤 SU-5416 (以下 SU-5416 と略)を1回皮下投与し、その翌日から低酸素下(低圧性低酸素チャンバー内飼育)で3週間飼育し PH 群とする。コントロール(CTR)群としては、SU-5416 の溶媒のみを皮下投与し、room air 下で同期間飼育した。

②上記の PH 群および CTR 群ラットの体重を経時的に計測し体重増加率を計算で求め、SU-5416 皮下注後3週間の低酸素下飼育後に ketamine(100mg/kg)と xylazine(4mg/kg)のカクテルを筋肉内投与し、十分な安静を得たのち、24G 直針を用いて胸壁からの直接穿刺法にて右室圧、左室圧を測定し右室圧/左室圧比を計算した。その後 pentobarbital の過剰投与(60mg/kg)にて屠殺し、心臓および肺を摘出した。摘出した心臓の右室、左室+心室中隔重量を測定し、右室/(左室+心室中隔)重量比を計算した。肺は肺動脈に4%formaline+PBS を注入した後、気管から0.5%agarose+1%formaline を20cmの高さから重力で注入し、肺胞を充満した。4%formaline+PBS に一晩つけた後パラフィン包埋し薄切標本を作り、Hematoxylin-Eosin (HE)染色と Elastic van Gieson (EvG)染色を行った。直径20~100 μ m の肺細小動脈を無作為に10本選択し、血管の長径と短径の平均値の半分を血管壁厚として分母に、中膜の厚さを4か所(0時・3時・6時・9時)で測り、その平均値を分子として中膜/血管壁厚比を求めた。また血管内腔の閉塞性変化に関しては、同様径の肺細小動脈を無作為に50本選択し、内膜増殖性病変がないもの(0群: Open)、血管内腔断面積の50%以下を占めるもの(P0群: Partially Occluded)、血管内腔断面積の50%を超えるもの(C群: Closed)の3段階で評価した。

(2) 雄ラットの cast 群、雌ラットの ovx 群の作成

①エーテル麻酔下に雄ラットの陰囊皮膚を消毒切開し、下の筋膜、精巣鞘膜を切開し、精巣をピンセットで押し出し、周囲組織の結

紮により両側精巣を摘出し閉腹した。またエーテル麻酔下に雌ラットの下腹部皮膚、下の筋膜を切開し、卵管との位置関係から両側卵巣を摘出し閉腹した。

②上記の手術施行 1 週間後に、20mg/kg の SU-5416 を皮下投与し、その翌日から低酸素下で3週間飼育し cast 後 PH (castPH) 群、ovx 後 PH (ovxPH) 群とした。そして雄 CTR (mCTR) 群、雌 CTR (fCTR) 群、雄 PH (mPH) 群、雌 PH (fPH) 群と以下の項目に関して比較検討した。体重増加率、右室圧/左室圧比、右室/(左室+心室中隔)重量比、直径 20~100 μ m の肺細小動脈について中膜/血管壁厚比および新生内膜増殖性変化を(1)②と同様の方法で O 群、PO 群、C 群の3段階で評価した。

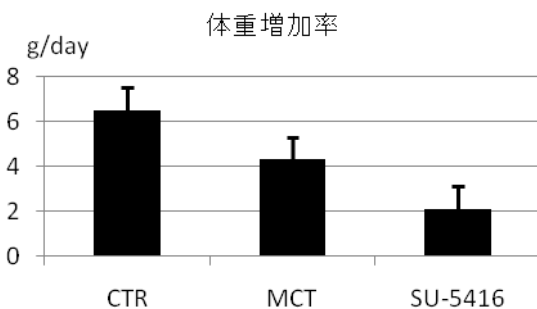
(3) mPH 群、fPH 群、castPH 群、ovxPH 群で、3 週間の低酸素下飼育後に採血を施行し、血清中の testosterone, DHT (dihydrotestosterone), DHEA (dehydroepiandrosterone), androstenedion (副腎 androgen), estradiol 濃度を液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析 (LC-MS/MS) 法で測定した。それぞれの定量下限値は、3pg/ml, 4pg/ml, 4pg/ml, 4pg/ml, 0.1pg/ml であった。

4. 研究成果

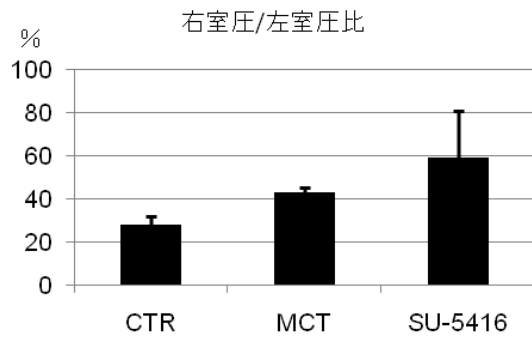
[研究の主な成果]

(1) このたび新たに試作した雄の新 PH モデル群と CTR 群における結果は、以下に示す通りであった。従来使用してきた旧 MCT 誘発 PH モデル群 (以下、旧 PH 群) の結果とも、比較検討した。

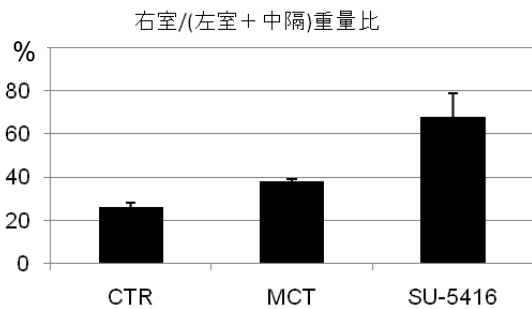
①体重増加率はそれぞれ 2.1 ± 0.3 g/d, 6.5 ± 0.7 g/d と、新 PH 群で旧 PH 群 4.3 ± 0.4 g と比較して、体重増加は有意に悪かった。



②右室圧/左室圧比はそれぞれ $59 \pm 22\%$, $28 \pm 4\%$ 性で、新 PH 群で旧 PH 群の $43 \pm 2\%$ と比較して、右室圧は有意に高く、より重症の PH を呈することが示された。

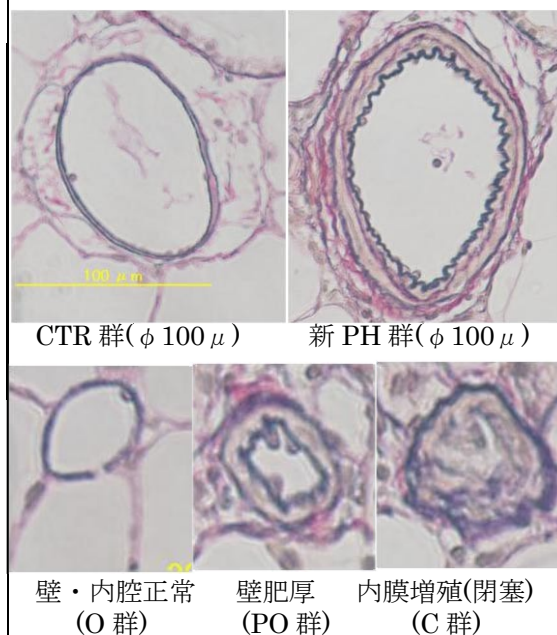


③右室/(左室+心室中隔)重量比はそれぞれ $68 \pm 11\%$, $26 \pm 2\%$ で、新 PH 群で旧 PH 群の $38 \pm 1\%$ と比較して、PH による有意に著明な RVH を呈した。



④肺細小動脈の中膜/血管壁厚比はそれぞれ $21.3 \pm 0.5\%$, $6.3 \pm 0.1\%$ と、新 PH 群で中膜平滑筋の肥厚は旧 PH 群と比較して有意に著明であった。新生内膜増殖性変化は、CTR 群と旧 PH 群では全く存在しなかったが、新 PH 群では O 群が 30%しか存在せず、PO 群または C 群が 70%を占め、新生内膜の増殖性変化を有意に顕著に認めた。

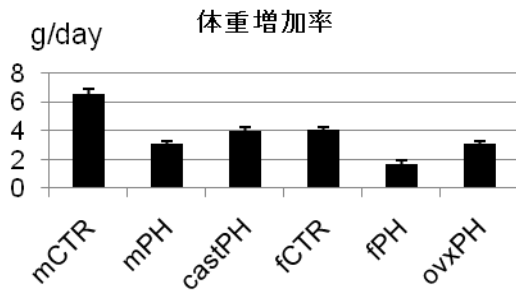
新生内膜増殖性変化



以上の結果より、新 PH 群は旧 PH 群と比較して、ヒト PAH の重症度および病理変化に類似しており、よりヒト PAH の適切なモデルであることが検証された。今回の実験では新 PH モデルを使用して、性ステロイドの PH に及ぼす影響を検討した。

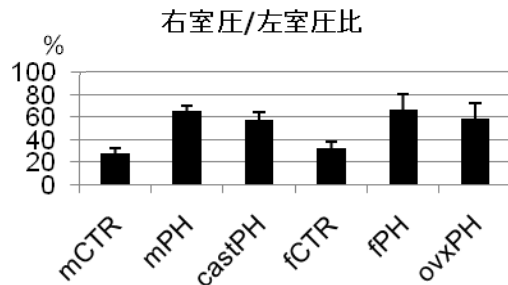
(2) mCTR 群、fCTR 群、mPH 群、fPH 群、castPH 群、ovxPH 群の 6 群で、体重増加率、右室圧/左室の圧と重量比および肺細小動脈リモデリングの程度は以下のとおりであった。

① 体重増加率は、それぞれの群において、 6.5 ± 0.4 , 4.1 ± 0.1 , 3.1 ± 0.2 , 1.7 ± 0.2 , 4.0 ± 0.2 , 3.1 ± 0.2 (mean \pm SD) g/d であった。



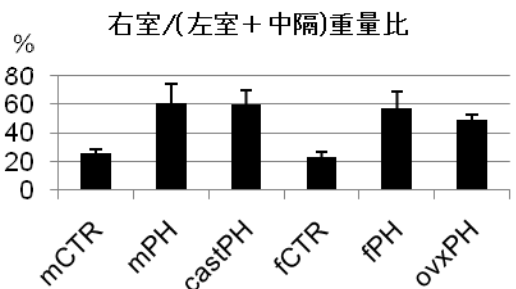
以上の結果から雌雄いずれにおいても、体重増加率は、PH 群では有意に減少していた。一方 cast および ovx による体重増加率は、いずれにおいてもわずかに改善していた。

② 右室/左室圧比は、それぞれの群において、 28 ± 4 , 32 ± 6 , 65 ± 5 , 66 ± 14 , 57 ± 7 , 58 ± 14 (mean \pm SD)% であった。



以上の結果から雌雄いずれにおいても、PH 群で、有意な RVH を呈していた。一方 cast および ovx による右室圧/左室圧比の変化は有意差を認めなかった。

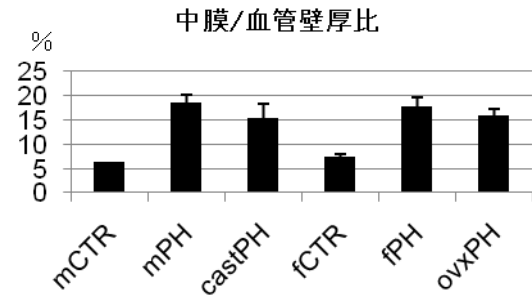
③ 右室/(左室+中隔)重量比は、それぞれの群において、 26 ± 2 , 23 ± 4 , 61 ± 13 , 57 ± 12 , 60 ± 10 , 49 ± 4 (mean \pm SD) % であった。



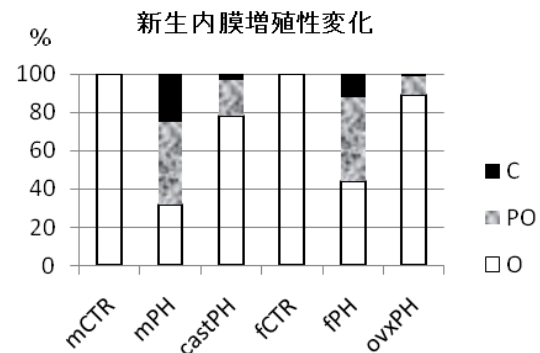
以上の結果から雌雄いずれにおいても、PH 群では、RV 重量は有意に増加していた。一方 cast および ovx による変化は有意差は認めなかった。

④ 肺最小動脈のリモデリングの程度は mCTR 群、fCTR 群、mPH 群、fPH 群、castPH 群、ovxPH 群の 6 群で、以下のとおりであった。

肺細小動脈中膜/血管壁厚比は、それぞれの群において、 6.3 ± 0.1 , 7.5 ± 0.5 , 18.5 ± 1.6 , 17.8 ± 1.9 , 15.4 ± 3.0 , 15.9 ± 1.4 (mean \pm SD) % であった。



新生内膜の増殖性変化は、それぞれの群において (O 群, PO 群, C 群) の割合は、 $(100 \pm 0, 0 \pm 0, 0 \pm 0)$, $(100 \pm 0, 0 \pm 0, 0 \pm 0)$, $(32 \pm 3, 43 \pm 1, 25 \pm 4)$, $(44 \pm 16, 44 \pm 10, 11 \pm 11)$, $(78 \pm 20, 19 \pm 17, 4 \pm 5)$, $(89 \pm 12, 10 \pm 11, 1 \pm 1)$ (mean \pm SD) % であった。



以上の結果から雌雄いずれにおいても、PH 群では、肺細小動脈中膜/血管壁厚比は増加し、また新生内膜の増殖性変化を認め、肺細小動脈内腔の閉塞性変化が生じていた。一方 cast および OVX による新生内膜の増殖性変化は、いずれにおいても有意差は認めなかったがむしろ軽快する傾向を認めた。

(3) mPH 群、fPH 群、castPH 群、ovxPH 群の 4 群で、testosterone, DHT, DHEA, androstenedion, estradiol 血中濃度は以下のとおりであった。

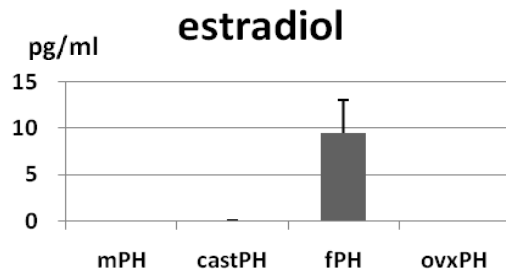
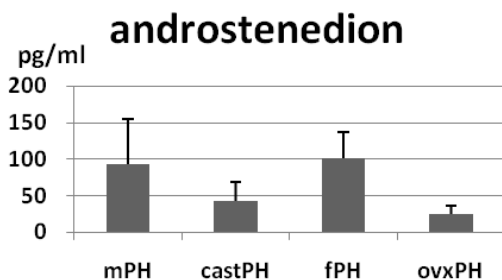
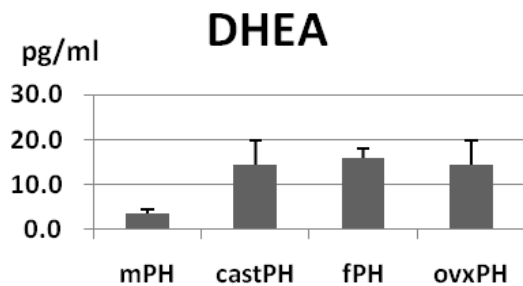
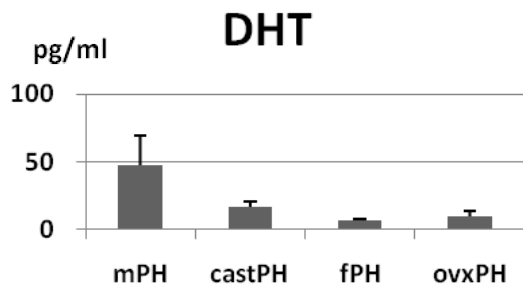
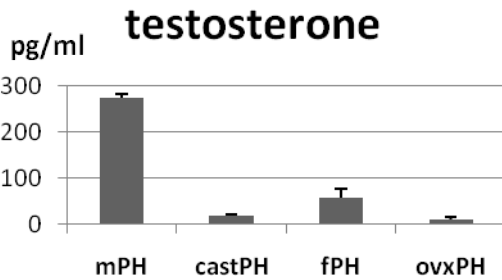
Testosterone はそれぞれの群において、 273.5 ± 7.7 , 56.1 ± 21.4 , 17.0 ± 4.2 , 9.6 ± 4.4 pg/ml であった。

DHT はそれぞれの群において、 48.0 ± 21.5 , 7.1 ± 1.1 , 17.0 ± 4.2 , 9.6 ± 4.5 pg/ml であった。

DHEA はそれぞれの群において、 3.5 ± 0.8 , 15.9 ± 2.1 , 14.3 ± 5.5 , 4.3 ± 2.6 pg/ml であった。

Androstenedion はそれぞれの群において、 92.7 ± 61.7 , 100.8 ± 36.6 , 42.3 ± 25.6 , 24.7 ± 11.5 pg/ml であった。

Estradiol はそれぞれの群において、 0.05 ± 0.04 , 9.50 ± 3.59 , 0.02 ± 0.02 , 0.01 ± 0.01 pg/ml であった。



以上の結果から、雄 PH 群では cast により testosterone および DHT は有意に低下し、雌 PH 群では ovx により estradiol は有意に低下していた。一方 DHEA および androstenedion は cast および ovx により有意な変化を認めなかった。

[得られた成果の国内外における位置づけとインパクト]

今回の研究で使用したモデルラットは、最初に Taraseviciene-Stewart L. らが報告し (FASEB J. 15:427-38, 2001)、新生内膜増殖による細小動脈の閉塞性変化を伴う、重症で進行性の PAH モデルとして提唱した (Am J Physiol. 291:L668-76, 2006)。その後 Oka M. らも本モデルを使用して、PAH 発症の機序として Rho-kinase による血管収縮の重要性を示した (Circulation Res. 100:923-29, 2007)。今回同様の方法で SU-5416 を使用して国内で初めて試作した新 PAH モデルラットでは、MCT 誘発の PH モデルラットでは認めない、ヒト PAH の病理変化では認められる新生内膜の増殖性変化を認めた。また PH・RVH の程度も、MCT 誘発の PH モデルラットに比し重症であり、ヒト PAH に類似する重症度と考えられた。

以上のことから本実験で使用した新 PAH モデルは、従来よりよく使用されてきた MCT または低酸素誘発の PH モデルより優れており、現在使用可能な薬剤でも完治できない IPAH の研究に、今後より使用されていくことは間違いない。新生内膜の増殖性変化を伴う血管リモデリングを回復させることのできる、有効な治療薬を開発することが IPAH を完治させる唯一の方法と考えられるためである。

上記の内容から国内におけるインパクトは、大きいものと考えられる。今後本モデルを使用した研究成果が、ヒト PAH の機序解明と治療薬の開発に大いに役立つものと考えられる。

性ステロイドの PH に対する効果を、今回の研究では雄ラットの cast により testosterone や DHT の効果、雌ラットの ovx により estradiol の効果をそれぞれ調べた。cast により雄ラットの血中 testosterone や DHT 濃度は明らかに低下しており、一方 ovx により雌ラットの estradiol 濃度は明らかに低下していた。

雄ラットの cast および雌ラットの ovx で

は、体重増加率は有意に改善していたものの、一方 PH や RVH は全く変化を認めなかった。これは PH とは無関係な食欲の増強をもたらす何らかの因子が関与しているものと思われる。また肺細小動脈リモデリングも中膜/血管壁厚比では変化を認めず、新生内膜の増殖性変化は有意差を認めないものの、むしろ改善する傾向を認めた。これは性ステロイドの血管リモデリングへの影響を肯定する結果であり、PHやRVHをも改善させるためには、ラットの週齢、cast または ovx 施行時期や SU-5416 の投与量など実験計画の再検討の必要性を示唆するものかもしれない。今回の実験プロトコールで性ステロイドである testosterone, DHT や estradiol の血中濃度と PH とは無関係という結果となり、女性に多い PAH の性差は、性ステロイドの血中濃度からは説明できなかった。

過去の性ステロイドと PH に関する報告では、Jones RD により testosterone による肺血管拡張効果は、estradiol に変換されての間接的効果ではなく、直接的に主に電位依存性 Ca チャンネル阻害と、次に細胞内 Ca store からの放出抑制からの、血管平滑筋細胞内 Ca 濃度の低下によると報告されている (J Cardiovasc Pharmacol. 39:814-23, 2002)。また Farrukh らは、DHEA の低酸素性肺血管収縮の抑制効果は、可溶性グアニレート・シクラーゼによる K チャンネルの活性化によると報告し (Am J Physiol. 274:186-95, 1998)、Simoncini らは NO 産生増加による内皮機能増強によると報告している (Endocrinol. 144:3449-55, 2003)。一方 Oka M. らは DHEA の低酸素性肺血管収縮の抑制効果は、可溶性グアニレート・シクラーゼ発現の増加と NO に対する肺動脈拡張反応性亢進によるもので、性ステロイド調節によるものではないと報告している (Cardiovasc Res. 74:377-87, 2007)。Dessouroux A. らは HIF1- α (Hypoxia inducible factor-1) の蓄積抑制効果を示すことにより、PH 治療の可能性を提唱している (J Sterid Biochem Mol Biol. 109:81-89, 2008)。以上のように性ステロイドの PH に対する影響に関する報告は、非常に controversial である。以上、DHEA の PH に対する効果の報告が多く、今回の実験は cast または ovx にて DHEA 血中濃度に変化を認めなかったことが、PH 改善を認めなかった理由とも考えられる。

国内外に与えるインパクトとしては、testosterone の PH 改善効果は in vivo 実験では証明できなかったが、そのことにより性差に関しては、他の因子にも注目すべきことを伝えるメッセージになったものと思われる。Positive な結果が得られなかったことは残念であるが、ただモデル作成に時間を要したこともあり、実験個体数が少なく種々の条

件を変えての実験ができなかった。そのため今回の研究結果だけからでは性ステロイドが性差に関与していないと結論づけることはできないと思われる。

[今後の展望]

本研究では、性ステロイドの PH に対する効果を、雄ラットの cast と雌ラットの ovx による生理的、病的变化を調べる方法を試みた。他の方法として、腹腔内徐放カプセルの留置による、雄ラットへの慢性的エストロゲン投与や雌ラットへの慢性的テストステロンまたは DHT 投与による、より性ステロイドの直接的な PH に対する効果を調べることも考えられる。

以上の実験により、性ステロイドの PH に対する有効性が証明された場合には、その機序として NO、PGI₂ や ET-1 などがどのように関わっているのかを、生化学的手法により証明することが課題となる。それにより新治療薬としての展望が開けるものと思われる。

逆に性ステロイドと PH の関与がないとすれば、ヒト PAH の性差が何故存在するのかを、IPAH の遺伝子 (BMPRII, Endoglin, ARK1) 変異を鑑みて、分子生物学的手法を利用して証明する研究は、PAH 新治療薬開発の 1 つの方法として必要と考えられる。

5. 研究組織

(1) 研究代表者

氏名：土井 庄三郎

所属研究機関：東京医科歯科大学

部局：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号：80262195

(2) 研究分担者

① 氏名：東 洋

研究所属機関：東京医科歯科大学

部局：生体材料工学研究所

職名：教授

研究者番号：20134736

② 氏名：今村 公俊

研究所属機関：東京医科歯科大学

部局：生体材料工学研究所

職名：助教

研究者番号：40422472

③ 氏名：佐々木 章人

研究所属機関：東京医科歯科大学

部局：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号：20328454