

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860135

研究課題名(和文) テストステロン投与不応性記憶障害の病態解明と治療法の研究

研究課題名(英文) A study of pathology and therapy of the dementia associated with testosterone supplementation-refractory late onset hypogonadism syndrome

研究代表者

國分 啓司 (KOKUBU, Keiji)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：00432740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳の内側扁桃核には、男性ホルモンであるテストステロンから女性ホルモンであるエストロゲンを作り出す芳香化酵素と、2種類のエストロゲン受容体(ER α とER β)が発現している。したがって男性の脳は女性以上にエストロゲンの作用を受けていることが予想される。男性更年期のモデルとして雄ラットから精巢を摘出すると、ER β の量は増加した。精巢を摘出されたラットに、テストステロンやエストロゲンを投与するとER β は再び減少した。一方で、男性ホルモンの一種であるジヒドロテストステロンの投与は、ER β の量に影響を与えなかった。ER β の量は精巢摘出やホルモン投与の影響を受けず安定していた。

研究成果の概要(英文)：Aromatase which create estrogen from testosterone and two types of estrogen receptor (ER α and ER β) are expressed in the medial amygdaloid nucleus of the brain. Therefore, it is expected that the brains of men is influenced by estrogen than the women brain. In the medial amygdaloid nucleus of the castrated male rats used as a model of the male menopause, the quantity of ER β protein was increased in comparison with sham-operated rats. The administration of testosterone or estrogen to the castrated rat decreased ER β protein again. In contrast, the administration of the dihydrotestosterone which was a kind of androgen did not affect the quantity of ER β . The quantity of the ER β protein was stable without being affected by castration and any sex steroidal hormones.

研究分野：神経組織学

キーワード：男性更年期障害 芳香化酵素 アンドロゲン エストロゲン エストロゲン受容体 扁桃核

1. 研究開始当初の背景

内側扁桃体にはテストステロンをエストロゲン (E2) に変換する aromatase が発現しており、テストステロンが豊富な健康男性の脳は、局所的に女性以上の高エストロゲン状態にある。したがって、男性の脳機能を理解する上で、エストロゲンの影響を無視できない。内側扁桃体と、認知・記憶に関わる海馬は、いずれも性ステロイドホルモン受容体を豊富に発現している。

男性の更年期障害は、一般的に精巣からのテストステロン産生の減少が原因と考えられている。しかしながら、更年期障害に伴って発症する記憶障害の治療に対しテストステロン補充療法が有効とする報告や、効果がないとする報告が混在している。そこで、テストステロン補充療法の効果に一貫性が得られない原因として、更年期障害に伴う記憶障害の発症は、脳内エストロゲンの減少によって引き起こされ、テストステロン投与不応性更年期障害では、脳内 aromatase によるエストロゲン合成能力が減退していることが予想される。

しかし、安易な性ステロイド投与治療によっては、かえってその感受性を失うことも考えられる。そのため、各種の性ステロイドホルモン投与状況で、扁桃体のエストロゲン受容体の発現変化も明らかにしていく必要がある。

2. 研究の目的

更年期・ホルモン投与治療環境下の、扁桃体の性ステロイド感受性を明らかにするため、精巣摘出後のラットに各性ステロイドホルモンを投与し、エストロゲン受容体の蛋白量の変化を、免疫組織化学法と Western blot 法により解析する。

3. 研究の方法

更年期モデル動物として、9 週齢 Wistar ラットに精巣摘出 (OCX) を施した。精巣摘出後 3 から 5 日に 4 mg/kg B.W のジヒドロテストステロン (OCX+DHT 群)、テストステロン (OCX+T 群)、エストロゲン (OCX+E2 群) を 1 日 1 回皮下投与したホルモン治療モデル動物を作製した。対照群として sham operation または OCX を施したのち、vehicle (sesame oil) を投与したラットを用いた (Sham operated+V, OCX+V)。

これら動物の扁桃体から Lysate および連続切片を作製し、エストロゲン受容体 (ER α 、ER β) に対する Western blot および免疫組織化学を行った。Western blot の結果は ImageJ (NIH) を用いて、また免疫組織化学の結果は、画像解析ソフト WinROOF (三谷商事) を用いて染色強度を、各群間で比較評価した。

4. 研究成果

研究結果

各群間のラットの扁桃体領域を採取し、ER α および ER β タンパクに対する Western blot を行った結果、OCX+V 群では Sham operated+V 群と比較して、精巣摘出による ER α タンパクの増加が認められた。OCX+V 群に対し、OCX+DHT 群の ER α タンパク量には有意な変化はなかったが、テストステロンまたはエストロゲンの投与により著しい ER α の減少を示した。これに対して扁桃体領域 ER β タンパク量は、精巣摘出および各性ステロイド投与のいずれにも影響を受けなかった (Fig. 1)。

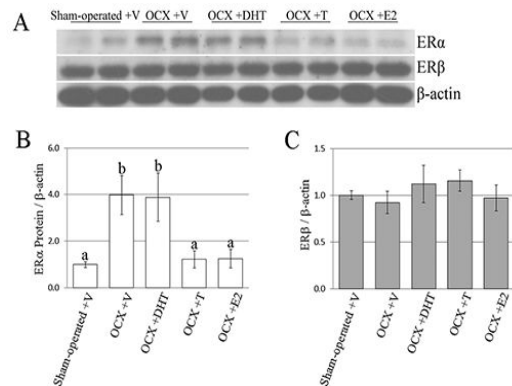


Fig. 1 各性ステロイド環境におけるラット扁桃体領域の ER α および ER β タンパク量の変動 (A)。ER α (B) および ER β (C) の定量評価 (平均値 \pm SE)。統計学的解析には Student's t-test を用いた。 a - b 間: $p < 0.05$

複数の神経核群からなる扁桃体領域の、いずれの神経核において、前述のエストロゲン受容体量の変動が生じているのかをさらに詳細に検討するため、扁桃体領域の連続切片を作製し ER および ER に対する免疫組織化学を行った。その結果、ER、ER ともに内側扁桃体核後背側部においてその発現を認めた (Fig. 2)。

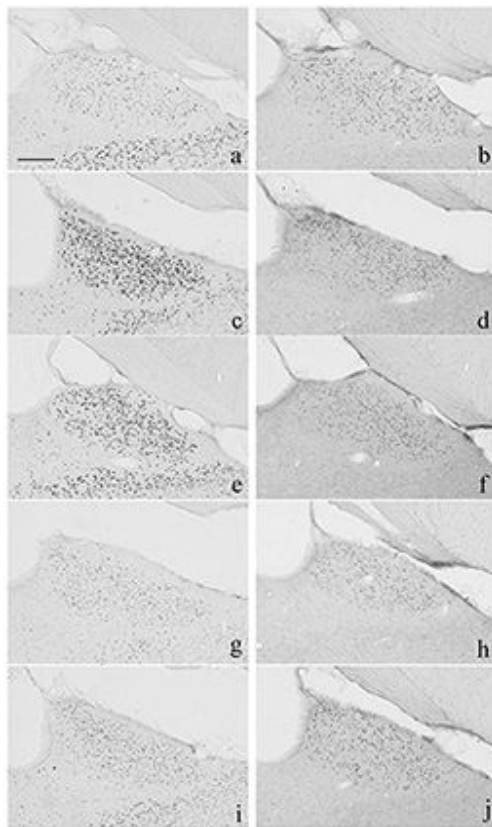


Fig. 2 ラット内側扁桃核後背側部におけるER (a, c, e, g, i) および、ER (b, d, f, h, j) の免疫組織化学像。Sham operated+V (a, b), OCX+V (c, d), OCX+DHT (e, f), OCX+T (g, h), OCX+E2 (i, j). Scale bars = 200 μ m

性ステロイド環境をコントロールされた各群ラットの内側扁桃核後背側部におけるERおよびER免疫反応性の比較評価を行ったところ、Western blotと同様の結果が、形態学的解析によっても得られた (Fig. 2, 3)。これによって内側扁桃核後背側部における各性ステロイド環境におけるERの変動と、ERの安定的発現が明らかになった。

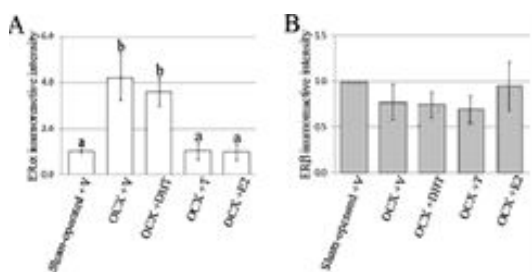


Fig. 3 ラット内側扁桃核後背側部のER α (A) および、ER β (B) 免疫組織化学染色強度 (平均値 \pm SE) の評価。統計学的解析には Student's t-test を用いた。a - b 間: $p < 0.05$

また、実験動物として使用したマウスおよびラットの脳内におけるステロイド感受性

部位を比較した際、どちらか一方の種にのみ存在するアンドロゲン受容体陽性神経核を発見した。このうちマウス特異的な神経核を "tear drop nucleus"、ラット特異的な神経核をそれぞれ "rostral nebular island" と "caudal nebular island" と名付けた。これらについて大きさ、細胞数を雌雄間で比較したところ、いずれの神経核も雄優位な性的二型核であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Jahan MR, Kokubu K, Islam MN, Matsuo C, Yanai A, Wroblewski G, Fujinaga R, Shinoda K. Species differences in androgen receptor expression in the medial preoptic and anterior hypothalamic areas of adult male and female rodents. *Neuroscience*. 2015; 284: 943-61. 査読有
10.1016/j.neuroscience.2014.11.003.

[学会発表](計 8件)

馬場良子、國分啓司、森本景之、藤田守 乳飲期小腸由来オルガノイドの形態学的解析 第121回日本解剖学会 総会・全国学術集会 2016年3月28-30日 ビックパレットふくしま (福島県郡山市)

高橋宏典、馬場良子、國分啓司、森本景之 培養小腸オルガノイドの形態学的解析 第57回日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会 2015年11月21日 九州大学 (福岡県福岡市)

馬場良子、國分啓司、森本景之、藤田守 乳飲期空腸由来オルガノイドの形態学的解析 日本解剖学会 第71回九州支部学術集会 2015年10月31日 熊本大学 (熊本県熊本市)

石松菜那、宮本 哲、中俣潤一、國分啓司、馬場良子、芹野良太、尾辻 豊、森本景之、田村雅仁 腹膜透析モデルラットにおける腹膜炎マーカー (Pentraxin3) の検討 第47回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2015年9月18-19日 長崎大学 (長崎県長崎市)

森本景之、馬場良子、國分啓司、石松菜那、宮本 哲 腹膜透析に関連する腹膜線維化と Matrix Metalloproteinase (MMP) の発現 第47回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2015年9月18-19日 長崎大学 (長崎県長崎市)

馬場良子、國分啓司、石松菜那、森本景之、
藤田 守乳飲期回腸由来オルガノイドの
形態学的解析 第 47 回 日本臨床分子形
態学会総会・学術集会 2015 年 9 月 18-19
日 長崎大学 (長崎県長崎市)

Nemoto J, Jahan MR, Islam MN, Kokubu K,
Yanai A, Wroblewski G, Fujinaga R,
Shinoda K. Morphological analysis of
small intestinal organoids. Species
difference in expression and
localization of androgen receptor in the
suprachiasmatic nuclei of normal and
hormone-manipulated adult rats and mice.
第 120 回 日本解剖学会 総会・全国学術集
会、第 92 回 日本生理学会大会合同大会
2015 年 3 月 21-23 日 神戸国際会議場(兵
庫県神戸市)

Islam MN, Fujinaga R, Takeshita Y, Yanai
A, Jahan MR, Kokubu K, Wroblewski G,
Shinoda K. Localization of
huntingtin-associated protein
1-immunoreactive stigmoid bodies in the
spinal cord of adult rat. 第 120 回 日
本解剖学会 総会・全国学術集会、第 92 回
日本生理学会大会合同大会 2015 年 3 月
21-23 日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

國分 啓司 (KOKUBU, Keiji)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：00432740