

平成30年 6月13日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08141

研究課題名(和文) 心血管系の発生と病態に關与する性ステロイド代謝酵素の分子形態学的解析

研究課題名(英文) Molecular and morphological analysis of sex steroid metabolizing enzymes involved in the development and pathology of cardiovascular system

研究代表者

鶴尾 吉宏 (TSURUO, Yoshihiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：90207449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：正常ラットおよび肺高血圧症モデルを用いて、心血管系における性ステロイド代謝酵素の発現を免疫組織化学的に調べた。5 α -リダクターゼ1型酵素(5 α -R1)と3 α -ヒドロキシステロイド・デヒドロゲナーゼ(3 α -HSD)、17 α -ヒドロキシラーゼ/17,20-リアーゼ(CYP17)、3 β -ヒドロキシステロイド・デヒドロゲナーゼ(3 β -HSD)、5 β -リダクターゼ(5 β -R)が、内皮細胞や線維芽細胞、心房の心筋細胞に発現した。肺高血圧症モデルでは、肺動脈での5 α -R1と3 α -HSDの発現が増加した。性ステロイド代謝酵素によって産生されるステロイドが心血管系の機能調節に關与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The expression of sex steroid metabolizing enzymes in the cardiovascular system was analyzed by immunohistochemical method using normal rats and pulmonary hypertension models. The analyzed enzymes were 5 α -reductase type 1 (5 α -R1), 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD), 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17), 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) and 5 β -reductase (5 β -R). These enzymes were expressed in the endothelia, fibroblasts and atrial myocardial cells. The expression of 5 α -R1 and 3 α -HSD in the pulmonary artery increased in pulmonary hypertension models. Hence, the steroids produced by sex steroid metabolizing enzymes are supposed to be involved in the regulation of the cardiovascular function.

研究分野：解剖学 神経内分泌

キーワード：性ステロイド ステロイド代謝酵素 心血管系 分子形態学的解析 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

心血管系は、心臓とそれにつながる動脈と静脈の脈管系からなり、血液、酸素、栄養物質や各種の伝達物質を体内で移送する重要な器官である。そのため個体発生の過程では、血管系は早期から発生が開始し、未分化な血管網が伸展と退縮を繰り返しながら、血管内皮細胞の周りに平滑筋細胞が集まり成熟した血管として発達する。血管を構成する内皮細胞や平滑筋細胞は、中胚葉起源の間葉細胞、神経堤細胞、骨髄細胞に由来することが分かっており、これら細胞の発生と分化に関与する多くの因子について研究が行われている。

このうち、心血管系についてのステロイドホルモンの作用については、アルドステロンやコーチゾル、コルチコステロンなどの鉱質および糖質コルチコイドの働きが主に調べられているが、これらのホルモン受容体に対する genomic な作用を調べた研究がこれまでの主流である。一方、性ステロイドホルモンの心血管系への作用についても、エストラジオールあるいはテストステロンなどの性腺から分泌され、あるいは外部から投与された性ステロイドが及ぼす働きに対する各々のホルモン受容体を介した作用を調べた研究がほとんどである。

このように、ステロイド産生に関与する酵素の心血管系における発現とその働きについては、鉱質および糖質コルチコイドの産生に関わる代謝酵素 (CYP11B2、11 β -HSD1 型あるいは 2 型) やエストラジオールの産生に関わる代謝酵素であるアロマトラーゼについてのいくつかの報告はあるが、発生過程における発現や組織化学的な細胞の局在についての詳しい検索はこれまで行われていないのが現状である。

そこで、我々は心血管系における性ステロイド代謝に関与する酵素の発現とその働きの解明に焦点を当て、心血管系の発達過程において、これまで調べられていない性ステロイド代謝酵素の発現について、心血管系の構成細胞である血管内皮細胞と平滑筋細胞、および心筋

細胞を中心に解析して、心血管系の発生と機能に及ぼす性ステロイド代謝酵素の働きを明らかにする。さらに、この結果をもとにして、いくつかの心疾患病態モデルや培養内皮細胞などを用いて、性ステロイド代謝酵素の心血管機能や病態への関与をさらに詳細に解明していく。

2. 研究の目的

血管の発生過程は、発生初期において血管が初めて出来て血管網を作成する脈管形成 (vasculogenesis) と、成熟段階で、既存の血管から枝分かれして新しい血管が出来る血管新生 (angiogenesis) に分類されていたが、1997 年に血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell, EPC) が成人末梢血中に見出され、成熟時でも後天的に脈管形成型の血管再生が起こることが分かった。

まず、個体発生の脈管形成の過程における性ステロイド代謝酵素の発現と働きを明らかにし、次に、血管内皮前駆細胞や、各種の心血管疾患病態モデルを用いて、性ステロイド代謝酵素の心血管系における局所ホルモンとしての働きを明らかにする。

予備的な実験から、性ステロイド代謝で重要な役割を果たしている 5 α -リダクターゼ 1 型酵素が、胎仔血管由来の内皮細胞に発現することを確認している。5 α -リダクターゼ 1 型酵素の発現は、神経系における研究においても発生早期から認められることから、胎仔の心血管系の発達過程においてもこの酵素は早期から発現し、局所ホルモンとしてパラクリンあるいはオートクリン的に、心血管系の発達に関与していることが十分に推測される。

性ステロイド代謝酵素としては、5 α -リダクターゼと協調して作用する 3 β -ヒドロキシステロイド・デヒドロゲナーゼ (3 β -HSD)、5 α -リダクターゼ、5 β -リダクターゼのもう一つのアイソザイムである 5 β -リダクターゼ 2 型酵素、17 β -ヒドロキシステロイド・デヒドロキシラーゼ (17 β -HSD)、7 α -ヒドロキシラーゼ (CYP7B1) などを中心として、心血管系における時間的・空間的

な解析を進める。

我々の教室では、前述したステロイド代謝酵素を含む複数の代謝酵素について特異抗体を作製し、その局在の研究を進めており、良い結果を得ている。このようにして得た特異抗体による免疫組織化学と *in situ* hybridization 法によって、ステロイド代謝酵素の局在をタンパクおよび mRNA のレベルで明らかにする。

本研究では、心血管系の発生過程ならびに病態モデルを用いた成体での血管新生において、局所ホルモンとして作用する性ステロイドホルモンを合成・代謝する酵素の発現を解析することによって、性ステロイド代謝酵素がどのように局所で機能的な役割を果たしているのかを解明する。

3. 研究の方法

本研究は、性ステロイド代謝酵素によって産生されるステロイドが局所ホルモンとして心血管系で機能することに関して、性ステロイドを代謝する酵素の発現とその作用を明らかにし、心血管系の発生と各種の心血管疾患の病態において性ステロイド代謝酵素が果たす役割を形態学的に解析する。個体発生の早期からの心血管系の発生に焦点を当て、心血管系の構成細胞である血管内皮細胞と平滑筋細胞、および心筋細胞における性ステロイド代謝酵素の発現と局在を追跡する。さらに、成体末梢血から得た血管内皮前駆細胞や各種の心血管疾患病態モデルを用いて、性ステロイド代謝酵素の心血管系の発生と病態における役割についての解析を進める。

正常発達過程での心血管系における性ステロイド代謝酵素の発現を、各代謝酵素に対して作製した特異抗体による免疫組織化学と *in situ* hybridization 法によって明らかにする。このようにして発現が確認された性ステロイド代謝酵素によって産生されるステロイドが作用する non-genomic および genomic に働く受容体やイオンチャネルなどの発現と局在を検索し、性ス

テロイド代謝酵素の発現と局在との時間的・空間的な相互連関を解析する。

性ステロイド代謝酵素としては、5 α -リダクターゼ1型、2型、3 β -HSD、5 β -リダクターゼ、17 β -HSD (1-14型)、CYP7B1 などを中心として検討し、これらの代謝酵素で産生される性ステロイドが結合して作用するものとして、GABA_A 受容体、アンドロゲン受容体、ER α 、 β などの心血管系の細胞で発現する受容体やイオンチャネルとの関連について検討を進める。

4. 研究成果

心血管系を構成する細胞のうち、循環機能の制御に主要な働きをしている血管内皮細胞と平滑筋および心筋細胞について、これら細胞における性ステロイド代謝酵素の発現と局在を分子形態学的に調べて機能を明らかにすることを目的として実験を行った。初年度はラット心臓における5 α -リダクターゼ1型酵素と3 β -HSDについて、これら酵素の発現を免疫組織化学的に明らかにした。次年度は、この結果をもとに他の性ステロイド代謝酵素の発現についても調べた。CYP17は、僧帽弁および大動脈弁の内皮細胞および線維芽細胞と心房の心筋細胞に発現することを認めた。3 β -ヒドロキシステロイド・デヒドロゲナーゼ(3 β -HSD)と5 α -リダクターゼについてもほぼ同じ発現パターンを示すことが確認できた。最終年度では、これらの結果をもとにして、心臓の各部位において局所的に産生されると考えられる性ステロイド代謝酵素の変化について肺高血圧症の実験モデル動物を用いて解析した。モノクロタリン(40 mg/kg)を皮下に投与して3週間後に肺高血圧症を示したラットの心臓について、大動脈、肺動脈、半月弁、房室弁、心房および心室の心筋細胞における上記の性ステロイド代謝酵素の発現を免疫組織化学的に調べた。大動脈および大動脈弁においては、内皮細胞と線維芽細胞における、5 α -リダクターゼ1型と3 β -HSDの酵素の発現には有意な変化は認められなかったが、肺動脈および肺動脈弁において、5 α -リダクターゼ1型と3 β -HSDの

酵素の発現量が内膜と外膜の部分において増加していた。以上のことから、5-リダクターゼ1型と3-HSDの2つの代謝酵素によって合成されるステロイドが、肺動脈の収縮機能に対して作用を及ぼしていることが示唆された。

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 2件)

1. Nishi T, Yamamoto Y, Yamagishi N, Iguchi M, Tamai H, Ito T, Tsuruo Y, Ichinose M, Kitano M, Ueyama T. Lansoprazole prevents the progression of liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis model rats. J Pharm Pharmacol 70(3), 383-392, 2018 doi: 10.1111/jphp.12870 査読有
2. Nakamura M, Hayashi K, Kubo H, Harada M, Izumi K, Tsuruo Y, Yogo T. Mesoscopic multimodal imaging provides new insight to tumor tissue evaluation: an example of macrophage imaging of hepatic tumor using organosilica nanoparticles. Sci Rep 7(1), 3953, 2017 doi: 10.1038/s41598-017-04043-7 査読有

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

鶴尾 吉宏 (TSURUO, Yoshihiro)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部
(医学系)・教授
研究者番号：90207449

(2)研究分担者

山本 悠太 (YAMAMOTO, Yuta)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：00580672

伊藤 隆雄 (ITO, Takao)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：30315931

上山 敬司 (UEYAMA, Takashi)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：50264875
(削除:2017年6月21日)