

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24170

研究課題名（和文）男性ホルモン低下に着目した加齢に伴う高血圧症の発症原因の探求

研究課題名（英文）Influence of testosterone on endothelial function in rats

研究代表者

竹内 まどか（Takeuchi, Madoka）

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：20853659

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：男性ホルモンが心血管系組織に及ぼす影響に関しては十分な研究がされておらず、男性ホルモン低下に伴う血管機能障害発症のメカニズム解明が求められている。そこで、男性ホルモン低下に伴う血管機能への影響を明らかにし、さらに男性ホルモンを補充した際の効果を検討することを目的とした。去勢によりラット大動脈の弛緩反応が低下した。一方、テストステロン投与により改善せず、通常ラットにテストステロンを投与したところ、内皮機能障害が見られた。テストステロンは低下するだけでなく、過剰になっても内皮機能障害のリスクとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テストステロン低下が血管内皮機能障害のリスクとなる可能性が考えられるが、本研究成果により、過剰な投与も危険である可能性が示唆された。本邦のテストステロン療法で使用頻度の高いエナント酸テストステロンは、2-4週間に125-250mgを投与するように、テストステロン療法におけるテストステロン製剤の使用方法は個人によって投与量・投与間隔ともに広範に及ぶ。高用量の投与で体内のテストステロンが生理的濃度を超えてしまうことはもちろん、投与間隔によっても悪影響を与えうることが示唆された。従って、漫然とした投与をせず、頻回に血中濃度を測定しテストステロン療法を行っていくことは不可欠であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：There are few reports on the effects of androgens on cardiovascular tissues, and elucidation of the mechanism of vascular dysfunction associated with androgen decline is required. Therefore, the purpose of this study was to clarify the effect of androgen reduction on vascular function and to examine the effect of androgen supplementation. Castration reduced the relaxation response of the rat aorta. On the other hand, administration of testosterone did not improve the condition, and when testosterone was usually administered to rats, endothelial dysfunction was observed. Not only is testosterone reduced, but excess testosterone may pose a risk of endothelial dysfunction.

研究分野：医療薬学

キーワード：テストステロン 内皮機能 勃起機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の研究により加齢に伴い男性ホルモンが低下することで更年期様の症状が起こることが知られるようになり、男性ホルモンは性分化だけでなく生命維持への重要性が示唆されている。興味深いことに、男性ホルモンが低下すると心血管系疾患や認知症の発症リスクが上昇する疫学調査結果が報告されている。しかし、男性ホルモンが心血管系組織に及ぼす影響に関しては十分な研究がされておらず、男性ホルモン低下に伴う血管機能障害発症のメカニズム解明が求められている。

2. 研究の目的

男性ホルモン低下に伴う血管機能への影響を明らかにし、さらに男性ホルモンを補充した際の効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 使用動物

性成熟が完了した 11-12 週齢の雄性 Wistar/ST ラットを用いた。このラットは 24 時間いつでも自由に餌と水は摂取可能とし、12 時間ごとの明暗サイクル下で温度および湿度をコントロールした部屋で飼育した。本研究は、名古屋市立大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

3-2. 実験プロトコール

11-12 週齢の雄性 Wistar-ST ラットを用いた。男性ホルモンを低下させるため、ラットから精巣を摘出することで去勢 (castration; Cast) を行う Cast 群 (n=10) ラットを去勢した後に男性ホルモンとして testosterone 含有チューブ (T-tube) を皮下に埋め込み男性ホルモン補充療法を行う Cast + T 群 (n=10) およびコントロールとして開腹縫合のみの Sham 手術を行う Sham 群 (n=10) さらに Sham + T 群 (n=10) を作成した。Cast 群および Sham 群にはチューブのみを皮下に埋め込んだ。

3-2. 等尺性張力測定による大動脈の弛緩反応評価

摘出した大動脈を、4 °C に冷やした Krebs 溶液 (mM: NaCl 119, KCl, 4.6, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 15, D-glucose 11 and NaH₂PO₄ 1.2) 中で周囲に付着した脂肪組織を取り除き、長さ 2mm 程度に切断しリング標本を作製した。このリング標本をイーザーマグヌス装置 (IWASHIYA KISHIMOTO MEDICAL INSTRUMENTS) の 2 本のワイヤーに掛け固定した。ワイヤーのうちの 1 本は圧力トランスデューサーに接続し張力変動をモニターし、PowerLab 4/26 (ADInstruments) を用いて記録した。Organ bath 中は 95% O₂, 5% CO₂ 混合ガスを通気させた Krebs 溶液で満たし、37 °C に保った。

大動脈標本に 0.6 g の基礎張力を負荷した後、張力が定常状態に達するまで 1 時間以上安定化させた。80 mM high K⁺ Krebs 溶液 (mM: NaCl 36.7, KCl, 80, CaCl₂ 2.2, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25, D-glucose 14 and KH₂PO₄ 1.2) を用いて収縮力を確認した後、phenylephrine; Phe 10⁻⁶ M で前収縮させ、プラトーに達した時点で acetylcholine; ACh 及び sodium nitroprusside; SNP を 10⁻¹⁰ M-10⁻⁴ M 累積投与し、弛緩反応を測定した。

3-8. 統計解析

結果は全て平均値 ± 標準誤差で表しており、検定は、two-way analysis of variance (two-way ANOVA) を用い、有意水準を 5% 以内として評価した。

4. 研究成果

4-1. 去勢ラットに対するテストステロン補充の効果

ラットより摘出した大動脈を用いて等尺性張力測定の結果を図 1 に示す。Sham 群に比べて Cast 群で ACh に対する反応性の低下が観察された。これに対し、Cast + T 群では Cast 群と比べて変化は見られなかった。一方、Sham + T 群では Sham 群と比べ、反応性の低下が観察された。SNP に対する反応性を検討したところ、いずれの群においても有意な変化は観察されなかった。

これらの結果より、去勢によりテストステロンが低下することで大動脈における血管内皮機能の低下が生じる可能性が示唆された。一方、テストステロン投与によって血管内皮機能には変化が観察されなかった。これは、Sham + T 群において血管内皮機能低下が観察されてい

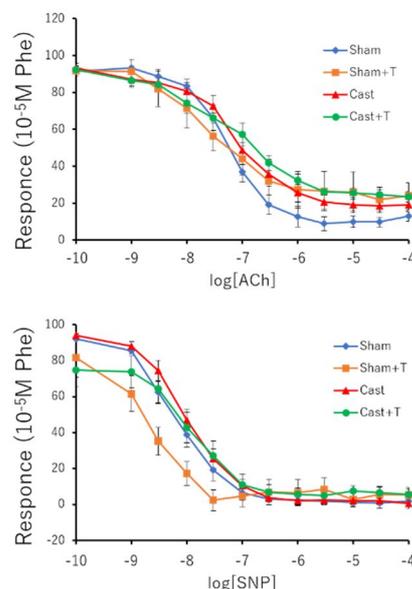


図 1. 去勢ラットの弛緩反応

たことから、本研究におけるテストステロン投与が何らかの副作用をもたらした可能性が考えられた。そこで次に、テストステロンの投与量の評価を行った。

4-2. 正常ラットに対するテストステロン投与の影響

4-2-1. 実験プロトコール

11-12週齢の雄性 Wistar-ST ラットを用いた。ラットをコントロール群、エナント酸テストステロン(testosterone enanthate; T)としてエナルモンデポー(ASKA Animal Health)を 6.25 mg/kg/week の濃度で1週間毎に皮下投与し、4週間投与した T(6.25)群、Tを 25 mg/kg/week の濃度で1週間毎に皮下投与し、4週間投与した T(25)群、Tを 100 mg/kg/week の濃度で1週間毎に皮下投与し、4週間投与した T(100)群の4群を作成した。T(6.25)群ではTを sesame oil(nacalai tesque)で希釈して投与した。

4週間の観察期間を設け、体重、収縮期血圧を測定した。観察期間終了後、心血管機能、生化学パラメータ、組織の評価を行った。

4-2-2. 血液生化学検査

テストステロン投与後の血清テストステロン値の推移を探るため、ラットにTを皮下投与し、投与前、投与から3時間後、6時間後、24時間後、1週間後の5回、尾静脈より血液を継時的に採取した。Tの投与は6.25 mg/kg、25 mg/kg、100 mg/kgの濃度で行った。採取した血液は1.5mLチューブに入れ、30分程度静置させたのち、1200gで10分間遠心分離し、得られた血清を測定まで-20°Cで保存した。

また、吸入麻酔薬イソフルラン(Wako)を高濃度で過麻酔の処置をして安楽死させた直後、ラットの下大静脈を露出させ、18G×1 1/2"注射針(TERUMO)を用いて採血した。採取した血液はベノジェクト 真空採血管(TERUMO)に入れ、1200gで10分間遠心分離し、得られた血清を測定まで-20°Cで保存した。

血清中の総蛋白、アルブミン、GOT、GPT、LDH、 γ -GTP、尿素窒素、クレアチニン、総コレステロール、中性脂肪、ナトリウム、クロール、カリウム、カルシウム、総テストステロン、HDL、LDL、IDL、VLDL濃度の測定は、富士フィルムモノリス株式会社に依頼した。

4-2-3. 血圧測定

テストステロンの投与前日、投与から2週間後、観察期間終了後の計3回、ラットの収縮期血圧を覚醒下にて測定した。測定にはtail-cuff方式のラット・マウス非観血式自動血圧測定装置(Softron BP-98-A-L型)を用いた。ラットを付属の保温器(Softron THC-31)内で37°Cに維持し、30分以上安定させた後、収縮期血圧を測定した。1個体につき5回測定し、最高値および最低値を省いた3回の値を評価に用いた。

4-2-4. 遺伝子学的検討

4-2-4-1. total RNA 抽出

摘出したラット大動脈からRNA iso plus(TaKaRa)を用いて添付プロトコールに従いtotal RNAを抽出した。得られたtotal RNAに対して逆転写反応を行った。

4-2-4-2. cDNA 合成

得られたtotal RNA 1 μ gから、ReverTra Ace- α ®(TOYOBO)を用いてTaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL (TaKaRa Bio)により逆転写反応を行った。逆転写反応の条件は42°Cで20分間、続けて99°Cで5分間行った。得られたcDNAにMiliQ水を加えて5倍希釈し、-20°Cで保存した。

4-2-4-3. real-time PCR

KAPA SYBR (KAPA Biosystems)を用いて、CFX96 real-Time System (BIO RAD)によりreal-time PCRを行った。反応は95°C 3 minの後、95°C 3 sec、60°C 30 sec (40 cycles)の条件で行った。解析はCt法を用いて-actinとの比で比較した。

4-2-5. 組織学的検討

4-2-5-1. 組織切片の作成

摘出した大動脈を凍結組織切片作成用包埋剤 Tissue-Tek® O.C.T. compound (SAKURA Finetek)を用いて包埋し、液体窒素を用いて急速冷凍し-80°Cで保存した。凍結ミクロソーム(LEICA CM1850)を用いて厚さ10 μ mの凍結切片を作成し、風乾させた。

4-2-5-2. Masson trichrome 染色

Masson trichrome 染色を行った。染色・封入後、顕微鏡用デジタルカメラ(Nikon ECLIPSE Ti, Nikon)を用いて標本の写真を撮影した。

4-2-6. 研究成果

4-2-6-1. 生化学パラメータ

体重はT(25)群、T(100)群でControl群と比較して有意に低下した($p < 0.05$)。収縮期血圧はControl群に対してT(25)群で2週目、4週目に有意な増加が見られ、T(6.25)群では2週目のみ有意な増加が見られた。

図2にテストステロン投与後の血中テストステロン値の推移を示した。テストステロン投与3時間後に最も高く、用量依存的に血清テストステロン値が高値であった。その後時間の経過とともに減少し、1週間後には元の数値と同程度まで低下したが、100 mg/kgを投与した場合には、依然として高値を示した(投与前: 3.9 ± 0.6 ng/mL, 100 mg/kg: 12.9 ± 2.0 ng/mL)。

血清テストステロン値は観察期間終了時点で、Control群に対してT(6.25)群、T(25)群では変化はなく、T(100)群では有意に増加した($p < 0.05$)。

血清中のGOT、LDH濃度はT(6.25)群で他の3群に対して有意に低下した($p < 0.05$)。一方、その他の測定項目においては4群間で変化は見られなかった。

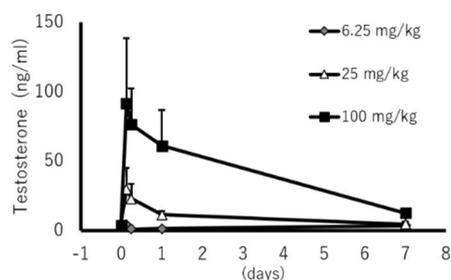


図2. テストステロン投与後の推移

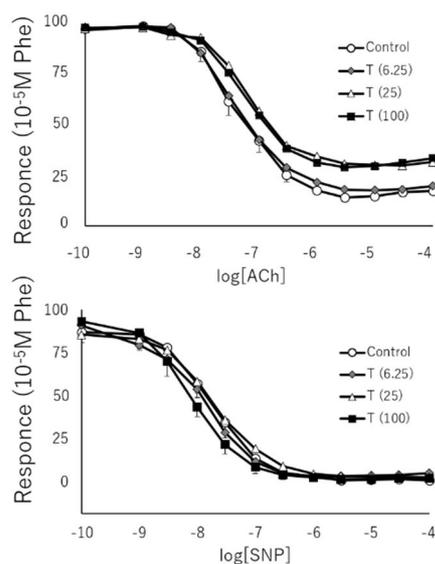


図3. 等尺性張力測定結果

4-2-6-2. 大動脈の弛緩反応

大動脈の弛緩反応の結果を図3に示した。Phe10 μ Mで前収縮させた後にACh(10^{-10} - 10^{-4} M)を累積投与したところ、濃度依存的な弛緩反応が見られた。T(6.25)群ではControl群と同等程度の弛緩反応が見られた。T(25)群ではAChの濃度が 10^{-8} Mの時点からControl群に対して弛緩反応の低下がみられた。T(100)群でも同様にAChの濃度が 10^{-8} Mの時点からControl群に対して弛緩反応の低下傾向が見られ、 10^{-4} Mの時点で有意に弛緩反応が低下した($p < 0.05$)。各群における最大の弛緩率はControl群: $85.9 \pm 1.9\%$ 、T(6.25)群: $82.3 \pm 3.0\%$ 、T(25)群: $70.3 \pm 5.5\%$ 、T(100)群: $71.1 \pm 2.4\%$ であった。

次に、SNPによる弛緩反応の結果をFigure7Bに示した。Phe10 μ Mで前収縮させた後にSNP(10^{-10} - 10^{-4} M)を累積投与したところ、濃度依存的な弛緩反応が見られた。SNPによる弛緩反応については、いずれの濃度においてもControl群とテストステロンを投与した群の間に変化は見られなかった。各群における最大の弛緩率はControl群: $100.4 \pm 1.1\%$ 、T(6.25)群: $98.1 \pm 0.9\%$ 、T(25)群: $98.7 \pm 1.7\%$ 、T(100)群: $99.8 \pm 0.5\%$ であった。

4-2-6-3. mRNA発現解析

大動脈におけるmRNA発現を検討した結果、AR、ROCK-1、NOX-1、M3受容体、eNOS、IL-6のいずれの因子も変化しなかった。

4-2-6-4. Masson trichrome染色

ラットから摘出した大動脈を用いてMasson trichrome染色を行った。4群間で平滑筋の肥大化や大動脈の線維化などの明らかな組織構造の変化は見られなかった。

4-2-6-5. 考察

ラットに過剰のテストステロンを投与したところ、AChの弛緩反応が低下したが、SNPでは変化がなかった。また、Masson trichrome染色による組織学的検討においても大動脈の構造に変化が見られず、過剰量のテストステロン投与によって血管内皮機能が障害されたが血管平滑筋は障害されなかったことが示唆される。

本邦のテストステロン療法で使用頻度の高いエナント酸テストステロンは、2-4週間に125-250mgを投与するように、テストステロン療法におけるテストステロン製剤の使用法は個人によって投与量・投与間隔ともに広範に及ぶ。本実験より、高用量の投与で体内のテストステロンが生理的濃度を超えてしまうことはもちろん、投与間隔によっても悪影響を与えることが示唆された。従って、漫然とした投与をせず、頻回に血中濃度を測定しテストステロン療法を行っていくことは不可欠であると考えられる。

4-3. 去勢ラットの性機能に対するテストステロン投与の効果

4-3-1. 実験プロトコール

12 週齢の雄性 Wistar-ST ラットを用いた。男性ホルモンを低下させるため、ラットに去勢を行う Cast 群 (n=10)、ラットを去勢した 4 週間後に testosterone (3 mg/kg/day) を皮下投与した Cast+T 群 (n=10)、およびコントロールとして開腹縫合のみの Sham 手術を行う Sham 群 (n=10) を作成した。Cast 群および Sham 群には溶媒のみを投与した。投与期間は 4 週間および 8 週間とし、ラットの勃起機能および組織学的評価を行った。

4-3-2. 陰茎海綿体内圧測定による勃起機能評価

勃起機能の評価は海綿体神経の電気刺激下での ICP の変動を測定することで行った。ラットにガス麻酔システム (Small Animals Apparatus NS-1, 矢沢科学) でイソフルラン (Pfizer) 吸入による麻酔をかけた。吸入麻酔はイソフルラン濃度を 4% で導入し、1.5% で維持した。維持麻酔をかけた状態で解剖板に仰向けに寝かせ、ビニールテープを用いて四肢を固定した。70% エタノールで腹側を消毒後、下顎から胸骨にかけて正中切開し、左頸動脈を同定、単離した。単離した左頸動脈の心臓側を動脈クレンメでクランプし、中枢側を糸で二重結紮した。クランプ部と結紮部位の間の動脈を 0.5 mm 程切開し、PE-50 チューブ (Imamura Co. Ltd) を挿管した。チューブは圧トランスデューサーに繋ぎ動脈血圧 (arterial pressure; AP) を測定した。次に下腹部を正中線に沿って陰茎上部から 5-6 cm 正中切開した。陰囊の裏側に位置する陰茎脚を同定しやすくするために、精巣を陰囊から腹腔内に押し上げ、切開した下腹部から引き出した。左陰茎脚を露出させた後、PE-50 チューブに接続した 23G 注射針 (TERUMO) の針を穿刺し、陰茎脚を貫通させないように注意しながらアロンアルファで固定した。PE-50 チューブは圧トランスデューサーに繋ぎ、ICP を測定した。チューブ内はいずれも 50 U/ml のヘパリン生理食塩水で満たした。測定には Power-lab 2/26 (ADINSTRUMENTS) を用いた。前立腺の側面に位置する海綿体神経を同定し、併走している血管や神経を傷付けないように注意しながら、ツル首型精密ピンセットですくい上げて単離した。単離した海綿体神経を双極型鉤電極 (ユニークメディカル) を用いて 1 分間電気刺激を行い、ICP の変動を測定した。刺激は Electronic Stimulator (NIHON KOHDEN) と Isolator SS-202J (NIHON KOHDEN) を用いて 5 V、1-16 Hz、pulse width 5 msec の条件で行った。AP、ICP は LabChart7 (ADINSTRUMENTS) を用いて記録、解析を行った。ICP 値は AP にも左右されるため、刺激で生じた最大 ICP 値をそのときの平均動脈血圧 (MAP; mean arterial pressure) 値で除した ICP/MAP にて評価した。

4-3-3. 研究成果

4-3-3-1. 勃起機能評価

ラットの勃起機能評価の結果を図 4 に示した。4 週間のテストステロン投与ではラットの勃起機能は変化しなかったが、8 週間の投与により有意な改善が観察された ($p < 0.05$)。

4-3-3-2. 組織学的評価

ラットの陰茎海綿体組織の解析結果を図 5 に示した。4 週間のテストステロン投与ではラットの海綿体組織は変化しなかったが、8 週間の投与により有意な改善が観察された ($p < 0.01$)。

4-3-3-3. 考察

本研究では、少量のテストステロンを連日投与する方法を用いて検討した。すると、4 週間の去勢によりいったん低下した性機能がテストステロン投与により改善することが示唆された。しかし、治療には時間を要することが示された。

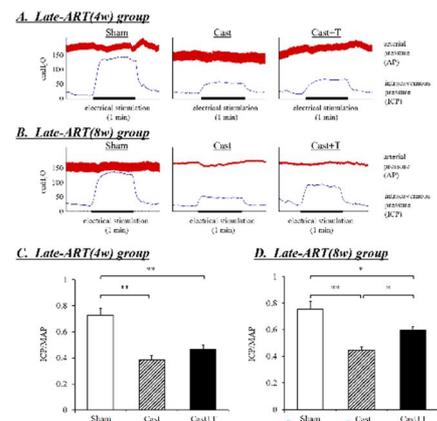


図 4 . ICP 測定結果

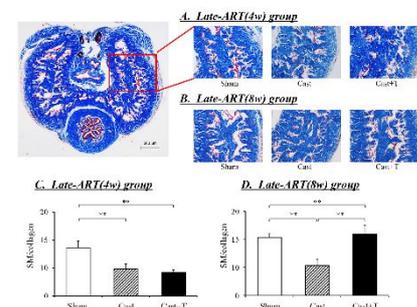


図 5 . 組織学的評価結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kataoka T, Hotta Y, Yamamoto Y, Fukamoto A, Takeuchi M, Maeda Y, Kimura K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of Late Androgen Replacement Therapy on Erectile Function Through Structural Changes in Castrated Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sexual Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	片岡 智哉 (Kataoka Tomoya) (20737928)		
研究協力者	堀田 祐志 (Hotta Yuji) (90637563)		
研究協力者	木村 和哲 (Kimura Kazunori) (00423848)		
研究協力者	前田 康博 (Maeda Yasuhiro) (60275146)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山本 侑佳 (Yamamoto Yuka)		
研究協力者	深本 絢子 (Fukamoto Ayako)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関