

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25461389

研究課題名(和文)アンドロゲン受容体を介した性差依存および非依存性心血管リモデリング制御機構の解明

研究課題名(英文)Role of androgen receptor in sex dependent and independent manner

研究代表者

栗飯原 賢一 (AIHARA, Ken-ichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任教授

研究者番号：70372711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はアンドロゲン-アンドロゲン受容体(AR)系の心血管組織における性依存および非依存性の機能解析を通じて、更年期以降の高齢者心血管疾患予防法の探索を目的とした。これまでの雄性AR欠損マウスの解析に加え、雌性AR欠損マウスの解析では、アンジオテンシンIIなどの圧および酸化ストレスの負荷に対して、雌性生体においてARは、むしろ組織リモデリングの促進因子であることが明らかになった。またマクロファージ特異的な雄性AR欠損マウスの解析の結果では、マクロファージ特異的なARの作用に関しては、粥状動脈硬化症の進展予防効果は、若干みられるもかなり限定的であることが、示唆された。

研究成果の概要(英文)：Not only menopause but also andropause are critical issue to prevent the development of cardiovascular diseases in elderly people. In order to clarify the physiological role of androgen receptor (AR) in the process of cardiovascular remodeling, we studied mouse models of angiotensin II-infused female AR-deficient mice and macrophage-specific male AR-deficient mice. The values of cardiac hypertrophy and left ventricular interstitial fibrosis area showed no difference between the angiotensin II-infused female AR-deficient mice and wild type mice. In contrast, aortic adventitia hyperplasia was attenuated in AR-deficient female mice. In addition, macrophage specific AR-deficient male mice did not show the acceleration of atherosclerotic plaque area. Therefore, AR in macrophage was not associated with the development of atherosclerosis.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：アンドロゲン受容体 アンジオテンシンII ApoE 心筋肥大 動脈硬化 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

急激な高齢化社会を迎え、加齢に伴う更年期障害が深刻な問題となっている。女性では閉経後のエストロゲンの急激な低下により骨粗鬆症に加え、動脈硬化の発症リスクが増加するが、男性でもアンドロゲン低下に伴って動脈硬化性疾患が増加することが報告されており、これらは更年期性心血管病というべき病態である。また、心血管病の発症は一般的に男性の方が女性よりも発症年齢が若く、重症度も高いが、それにも性ホルモンの関与が大きいと考えられている。エストロゲンの心血管保護効果に関しては以前より多くの研究が行われてきた一方、男性においても、アンドロゲン低下に関連して生じる諸病態については、近年男性更年期と提唱され、アンドロゲンの循環器系臓器への重要性が注目されている。このように性ホルモンは更年期疾患に対する保護作用を有しているものの、特に男性ホルモンであるアンドロゲンやその受容体であるアンドロゲン受容体(AR)については、その作用機序は不明な点が多い。

性ホルモンの多彩な生理作用の多くは、核内ステロイド受容体群を介した、情報伝達機構により発揮される。さらに、性ホルモン作用を介した情報伝達系は、動脈硬化等の生活習慣病にも深く関与している。しかしながら、これまで多くの病態研究が盛んに行われているにも関わらず、性差の観点から動脈硬化疾患を多面的に捉えた総合的研究は乏しいのが現状である。申請者らは、性ホルモン特にアンドロゲンと心血管病の関連解明について、これまで精力的に取り組んで来た。臨床研究としては、副腎アンドロゲンの一つである、Dehydroepiandro-sterone sulfate の臨床的抗動脈硬化作用に男女差が存在する事を報告した (Atherosclerosis. 2010;212:310-5)。分子生物学的アプローチ

としては、AR を介した生理作用に着目し、アンドロゲンの心血管系組織における生理的意義を明らかにするために、AR 欠損 (ARKO) マウスを用いた解析を行ってきた。これまでに、ARKO 雄マウスでは心臓成長が障害され、アンジオテンシンII (Ang II) 負荷により、心臓では代償性心筋肥大反応の減弱と心筋間質線維化の促進、左室収縮能の低下 (J Biol Chem. 2005 ; 280:29661-6)、血管では nitric oxide bioavailability の減弱および酸化ストレス亢進を介した血管リモデリングの進行 (Endocrinology. 2009;150:2857-64) を認め、アンドロゲン-AR システムは、Ang II 負荷による血管リモデリングに保護的に作用することを明らかにした。また、Doxorubicin 心筋障害モデルでは、AR の作用として、Akt 経路の活性化や Tfam の up-regulation を介して心筋保護に作用することを示した (Mol Endocrinol. 2010;24:1338-48)。さらに、雌雄のARKO の下肢虚血モデルの検討で、アンドロゲン-AR 系は虚血ストレスに対して主に PI3K-Akt-eNOS 経路を介して cell survival に働き、さらに VEGF 受容体シグナル活性化による angiogenesis の促進に雌雄を問わず重要であることを見いだした (Circulation. 2013;128:60-71)。

これまでの結果を踏まえ、心血管病の根本となる動脈硬化性病変を、更年期性心血管病としてとらえ、雌雄のAR を介した更年期性動脈硬化およびアンジオテンシンII 負荷モデルマウスの確立と、動脈硬化の病態解析を進めることにより、性ホルモン依存性および非依存性の動脈硬化発症制御機構の解明へと発展できる可能性がある。

2. 研究の目的

心血管病の発症・進展には加齢に伴う血中性ホルモン濃度の低下が強く関与していると推測されており、いわゆる更年期性心

血管病への対策は、男女を問わず高齢化社会における重要な臨床課題である。これまで女性ホルモンであるエストロゲン作用の研究は精力的に行なわれて来た一方、男性ホルモン作用についての理解は十分進んでいない。そこで、我々はアンドロゲン-アンドロゲン受容体(AR)系の心血管組織における性依存および非依存性の機能解析を行ない、更年期以降の高齢者心血管疾患予防法の探索を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 雌性AR欠損マウスの心肥大および心筋・血管線維化モデルにおける表現型解析

既に確立済みの20週齢の雌野生型マウスおよび雌AR欠損マウスにアンジオテンシンIIを3mg/kg/dayの割合で放出する浸透圧ミニポンプを埋め込んだ。2週間後に犠牲死させたマウス個体における心体重比の差異を野生型マウスとAR欠損マウスで比較した。また左室乳頭筋レベルにおける病理組織標本としてMasson-Trichrome染色を施し、心筋間質や冠動脈および大動脈中膜肥厚やその外膜部分の線維化の広がり の定量化を両群マウスにおいてこれまで確立した方法にて解析を行った(Ikeda & Aihara et al. J Biol Chem. 2005 ; 280:29661-6, Ikeda et al. Endocrinology. 2009;150:2857-64)。

(2) 雄性マクロファージ特異的AR欠損粥状動脈硬化モデルマウスの樹立と解析

1 病態モデルマウスの確立

Cre-loxP システムの手法を用いて、AR flox マウスをマクロファージ特異的に Cre-recombinase を発現するLysM-Cre-Tg マウスと交配することにより、マクロファージ特異的なAR欠損マウスを作出した。さらに粥状動脈硬化モデルでの検討を行なうためこれらのマウスはあらかじめApoE欠

損マウスのバックグラウンドとし、マクロファージ特異的AR 遺伝子欠損と全身ApoE 遺伝子欠損の2重変異マウスを構築した (AR^{m/Y} ApoE^{-/-})。確立したマウスから採取したマクロファージにおけるAR 遺伝子の発現量の確認後にベースラインの表現型に関する解析を行った。またマウスの組織を用いた解析は20週齢で施行した。

2 動脈硬化病変の解析

大動脈弁直上部の病理組織切片を作成し、Masson-Trichrome染色にて、プラーク面積の計測を行い、マクロファージ特異的AR およびApoE 遺伝子2重欠損マウス (AR^{m/Y} ApoE^{-/-}) とApoE 単独欠損マウス (AR^{X/Y} ApoE^{-/-})での2群間差異の有無についての評価を行った。またその2群のマウスにおけるマクロファージのリクルート状況を評価するためF4/80の免疫染色も同時に行い、評価を行った。

3 大動脈組織を用いた動脈硬化関連因子のPCR array解析とWestern Blot解析

採取大動脈組織からRNAを抽出し、cDNAを合成後に動脈硬化関連因子のPCR array解析を行い、2群間の評価を行った。また採取大動脈組織から蛋白質を抽出し、Western Blot法を用いて、血管リモデリング制御に関わるeNOSおよびMAPKのリン酸化について解析した。

4. 研究成果

(1) 雌性AR欠損マウスの心肥大および心筋・血管線維化モデルにおける表現型解析

アンジオテンシンII負荷後の雌性AR欠損マウスおよび雌性野生型マウスの2群間では、血圧および心拍数に明らかな差は見られなかった他、心臓・体重比にも明確な差異はみられなかった。還元能を示す血清中のBAPは、雌性AR欠損マウスでは、低下し

マウスの解析の結果では、マクロファージ特異的な AR の作用に関しては、粥状動脈硬化症の進展予防効果は、若干みられるもかなり限定的であり、有意な差異を生み出すまでには至らないことが、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 8 件)

1. Kondo T, Endo I, Aihara K, Onishi Y, Dong B, Ohguro Y, Kurahashi K, Yoshida S, Fujinaka Y, Kuroda A, Matsuhisa M, Fukumoto S, Matsumoto T, Abe M. Serum carboxy-terminal telopeptide of type I collagen levels are associated with carotid atherosclerosis in patients with cardiovascular risk factors. *Endocr J*. 査読有 . 2016 ;63:397-404. doi: 10.1507/endocrj.EJ15-0589.
2. Yoshida S, Ikeda Y, Aihara K. Roles of the Androgen- Androgen Receptor System in Vascular Angiogenesis. *J Atheroscler Thromb*. 査読有 . 2016;23:257-265. doi: 10.5551/jat.31047.
3. Shigekiyo T, Sekimoto E, Shibata H, Ozaki S, Okumura T, Fujinaga H, Shibata H, Aihara K, Akaike M. Factor VII Tokushima: the first case of factor VII Cys22Gly with the development of myocardial infarction in the proband receiving recombinant factor VIIa replacement therapy. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 査読有. 2015;26:956-958. doi: 10.1097/MBC.0000000000000346.
4. Yagi S, Aihara K, Fukuda D, Takashima A, Bando M, Hara T, Nishimoto S, Ise T, Kusunose K, Yamaguchi K, Tobiume T, Iwase T, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Akaike M, Sata M. Reduced ratio of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid to arachidonic acid is associated with early onset of acute coronary syndrome. *Nutr J*. 査読有 . 2015;14:111. doi: 10.1186/s12937-015-0102-4.
5. Temma J, Matsuhisa M, Horie T, Kuroda A, Mori H, Tamaki M, Endo I, Aihara K, Abe M, Matsumoto T. Non-invasive Measurement of Skin Autofluorescence as a Beneficial Surrogate Marker for Atherosclerosis in Patients with Type 2 Diabetes. *J Med Invest*. 査読有 . 2015;62(3-4):126-129. doi: 10.2152/jmi.62.126.
6. Yagi S, Aihara K, Akaike M, Fukuda D, Salim HM, Ishida M, Matsuura T, Ise T, Yamaguchi K, Iwase T, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Matsumoto T, Sata M. Predictive Factors for Efficacy of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab J*. 査読有 . 2015;39:342-347. doi: 10.4093/dmj.2015.39.4.342.
7. Ikeda Y, Hamano H, Satoh A, Horinouchi Y, Izawa-Ishizawa Y, Kihira Y, Ishizawa K, Aihara K, Tsuchiya K, Tamaki T. Bilirubin exerts pro-angiogenic property through Akt-eNOS-dependent pathway. *Hypertens Res*. 査読有 . 2015;38:733-740. doi:10.1038/hr.2015.74. E
8. Yagi S, Takashima A, Mitsugi M, Wada T, Hotchi J, Aihara K, Hara T, Ishida M, Fukuda D, Ise T, Yamaguchi K, Tobiume T, Iwase T, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Akaike M, Sata M.

Effect of combination tablets containing amlodipine 10 mg and irbesartan 100 mg on blood pressure and cardiovascular risk factors in patients with hypertension. Ther Clin Risk Manag. 査読有. 2015;11:83-88. doi: 10.2147/TCRM.S72299.

池田 康将 (IKEDA, Yasumasa)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号: 60432754
八木 秀介 (YAGI, Shusuke)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 00507650

〔学会発表〕(計 5件)

- 1: **粟飯原賢一**、長期のアングiotenシンII受容体拮抗薬基盤高血圧治療による心筋リモデリングおよび頸動脈硬化症への効果検証、第38回日本高血圧学会総会、2015.10.10、ひめぎんホール (愛媛県松山市)
- 2: 加藤正樹、森本佳奈、**粟飯原賢一**他、2型糖尿病患者の減塩療法による血圧低下に関連する因子の解析、第15回日本内分泌学会四国支部学術集会、2015.9.5、高知大学医学部 (高知県高知市)
- 3: **粟飯原賢一**、内因性血清尿酸値およびフェブキソスタットによる頸動脈硬化への影響、第47回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2015.7.10、仙台国際センター (宮城県仙台市)
- 4: **粟飯原賢一**、ARB基盤高血圧治療の長期心腎保護効果における糖尿病の影響、第58回日本糖尿病学会年次学術集会、2015.5.22、シーモールパレス (山口県下関市)
- 5: **粟飯原賢一**、本態性高血圧患者におけるアングiotenシン受容体拮抗薬単独およびカルシウム拮抗薬併用による長期心筋保護効果の検証、第88回日本内分泌学会学術総会、2015.4.25、ホテルニューオータニ(東京都千代田区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

粟飯原 賢一 (AIHARA, Ken-ichi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任教授
研究者番号: 70372711

(2)研究分担者