

令和元年6月4日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10644

研究課題名(和文) テストステロンによる虚血性心臓血管障害の増悪機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the exacerbation mechanisms of ischemic cardiovascular disease induced by testosterone.

研究代表者

坂梨 まゆ子 (SAKANASHI, MAYUKO)

金城学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：80363662

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)： テストステロンは、心血管保護作用を有することが知られているが、近年、虚血性心疾患を増悪するという臨床報告が相次いでいる。この機序の解明のため、我々は生体内の一酸化窒素合成酵素を完全欠損した心筋梗塞発症モデルマウスを用いた実験を行い、テストステロンが、血管収縮増強を介して血圧を上昇させ、糖や脂質の代謝を促進するアディポネクチンを減少させ、血中脂質や血糖値を増加させることにより、心筋梗塞を伴う死亡を招くことを見出した。本研究により、テストステロンによる虚血性心疾患の増悪作用には、生体内の一酸化窒素量の低下が一つの要因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

男性においてテストステロンは、生体内の量的低下が動脈硬化やそれに続く虚血性心疾患を惹起すると考えられており、疾患発症の予防としてテストステロン補充療法に対する期待が寄せられている。しかし、本研究により生体内の一酸化窒素量が減少した状況下においては、テストステロンは心血管傷害作用により、虚血性心臓血管疾患を増悪化することが示唆された。本研究の成果は、内皮機能の低下などにより一酸化窒素量の減少が予測される高齢男性や、内皮傷害が疑われる男性患者に対して、テストステロン補充療法を行うべきでないという根拠となる点において、大きな学術的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Testosterone is known to have cardiovascular protective effects, however, there have been opposite reports that it aggravates ischemic cardiovascular disease for past few years. To clarify this mechanism, we examined using myocardial infarction developing model mice which lack all nitric oxide synthase isoforms. The major results were as follows; testosterone raised systolic blood pressure with increment of vascular contractility, decreased plasma adiponectin which is involved in regulating glucose levels as well as fatty acid breakdown, increased plasma cholesterol and blood sugar, and so induced cardiovascular death. The findings in this study indicate that the reduced nitric oxide level may contribute to the aggravating effects of testosterone for ischemic cardiovascular disease.

研究分野：薬理学

キーワード：一酸化窒素 テストステロン 心筋梗塞

1. 研究開始当初の背景

狭心症や心筋梗塞に代表される虚血性心疾患は、動脈硬化や血栓による冠動脈の狭窄や攣縮の惹起により生じる疾患である。虚血性心疾患の発症には性差が介在し、男性は、女性に比して早期に罹患し死亡率が高い。女性ホルモンであるエストロゲンの心血管保護作用は、虚血性心疾患の発症の抑制に寄与するが、男性ホルモンのテストステロンもまた、心血管保護作用を示すことが明らかになってきた。テストステロンの低下が動脈硬化を惹起するという報告 (Svartberg J et al., *J Intern Med.* 2006) や、血中テストステロン値の増加が心血管疾患の死亡リスクの低下に関与する (Khaw et al., *Circulation* 2007) といった報告は、男性におけるテストステロンの量的低下が、虚血性心疾患の発症や死亡率の上昇に関与することを示唆するものである。

ところが近年、テストステロンの有害作用に関する臨床研究の結果が相次いで報告された。米国で実施された高齢男性集団へのテストステロン補充療法ランダム化比較試験は、有害な心血管イベントの発生により早期に中止され (Basaria et al., *N Engl J Med* 2010)、さらに、冠動脈疾患を有する血清テストステロン低値男性におけるコホート研究は、テストステロン補充療法が心血管系の有害転帰リスク増加と関連することを示した (Vigen et al., *JAMA* 2013)。これらの相反する報告は、テストステロンが虚血性心疾患に対して有益作用をおよぼすのか、有害作用をおよぼすのかを調節する、鍵となる要因が存在する可能性を想起させる。

2. 研究の目的

我々は、テストステロンが心血管保護作用を有するにも関わらず、心血管有害転帰リスクを増加させる要因の一つに、生体内の一酸化窒素 (Nitric oxide: NO) 量の変化が関与するのではないかと推測した。その根拠は、テストステロンの有害作用がみられた臨床研究では、対象者が、生体内 NO レベルの低下した高齢者や冠動脈疾患の罹患患者であったためである。そこで本研究では、テストステロンが虚血性心疾患を増悪する機序を解明することを目的とし、生体内の NO 合成酵素をすべて欠損し NO レベルが低下したマウスの心筋梗塞モデルを用いて、テストステロンによる影響を検討した。

3. 研究の方法

- (1) 実験モデルの作製とテストステロンの持続投与： 実験では、C57BL/6 マウス (野生型、8週齢) または神経型 NO 合成酵素 (neuronal nitric oxide synthases: nNOS)、誘導型 NOS (inducible NOS: iNOS)、内皮型 NOS (endothelial NOS: eNOS) の3種類の NOS を完全欠損した n/i/eNOS KO マウス (雄、8週齢) を用いて、両側腎臓の 2/3 を亜全摘 (2/3nephrectomized: NX) した。以前の研究により我々は、このマウスが心筋梗塞を発症することを報告している (Uchida et al., *J Mol Cell Cardiol* 2014)。さらに、テストステロンの影響を検討するため、2/3NX n/i/eNOS KO マウスに精巣全摘手術または偽手術を施し、低テストステロン群と正常レベル群を作製した。一部の実験では、低テストステロン群を2群に分け、徐放性テストステロンチューブまたは空チューブを皮下埋込し、テストステロンの持続投与を行った。
- (2) 心筋梗塞の危険因子の検討： 収縮期血圧を非観血的血圧測定、血漿サンプル (空腹時) の脂質レベルを比色法、血糖値を電極法により測定した。血漿アディポネクチンは、ELISA 法により測定した。
- (3) 血管反応性の検討： 胸部大動脈を摘出し、輪状標本を用いて Magnus 法による血管反応性の検討を行った。

(4) 心筋 mRNA 発現の検討： 心筋梗塞モデルマウスの低テストステロン群および正常テストステロン群における心筋の mRNA 発現を、RNA シークエンスにより測定し解析を行った。

4 . 研究成果

(1) 以前の我々の研究において、2/3NX n/i/eNOS KO マウスは、90%以上が心筋梗塞により死亡したことから、心筋梗塞発生の大まかな指標として生存率の検討を行った。テストステロンによる心筋梗塞への影響を検討したところ、正常テストステロンレベル (sham) 群に比して、低テストステロン (ORX) 群では、著明な生存率の改善を認めた。そこで ORX 群にテストステロンを持続投与し、テストステロンレベルを正常状態まで増加させたところ、テストステロン未投与時に認められた生存率の改善は、有意に抑制された。これらよりテストステロンは、生体内の NO レベルの低下した状況では、心筋梗塞を伴う死亡を増加させることが明らかとなった。

(2) 次に心筋梗塞の危険因子を検討した。正常テストステロンレベル群に比して低テストステロン群では、総コレステロール、空腹時血糖値および収縮期血圧の有意な低下を認め、これらの低下は、テストステロンの持続投与によりいずれも抑制された。したがって、生体内の NO レベルの低下した状況では、テストステロンは、血圧上昇を招き、脂質代謝や耐糖能に異常を引き起こすことで心血管系に悪影響をおよぼす可能性が示唆された。

(3) 血圧上昇の要因の一つには、血管反応性の変化が考えられることから、胸部大動脈の反応性を検討した。正常テストステロンレベル群では、低テストステロン群に比して、静止張力下でのフェニレフリンおよびテストステロン累積投与による血管収縮性の増強を認めた。一方、フェニレフリンで前収縮させた標本に対するテストステロンの血管弛緩作用は、両群間で有意な差を認めなかった。これらよりテストステロンは、生体内 NO レベル低下時には、交感神経系の活性化による血管収縮を増強することが示唆された。

(4) 正常テストステロンレベル群と低テストステロン群における心筋の mRNA 発現を次世代シーケンスにより網羅的に解析したところ、正常レベル群においては、心筋傷害に關与する炎症関連遺伝子 (MCP-1 など) 血管収縮や血圧上昇に關与する遺伝子 (アンジオテンシン変換酵素、エンドセリン) 内皮機能や糖質代謝の悪化に關与する遺伝子 (アンジオポエチン関連タンパク) 等が有意に増加しており、一方、脂質代謝を調節するアディポネクチン遺伝子は有意に低下していた。そこで血中のアディポネクチン量を測定したところ、テストステロン正常レベル群では、低テストステロン群に比して、有意にアディポネクチンが低下しており、心筋のアディポネクチン遺伝子発現結果との相関が認められた。現在、遺伝子発現に有意差の見られた項目について、タンパクレベルの発現変化等を引き続き解析している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Mika Kina-Tanada, Mayuko Sakanashi (2 番目, equally contribution), Toshihiro Matsuzaki (5 番目), Masato Tsutsui (25 番目, last author)

Long-term dietary nitrite and nitrate deficiency causes the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and cardiovascular death in mice.

Diabetologia 60(6):1138-1151 (2017) 査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

Sakanashi M, Taira Y, Matsuzaki T, Tsutsui M et al.

Sex Difference of Cardiovascular Death in the 2/3 Nephrectomized-Nitric Oxide Synthases

Deficient Mice: Involvement of Androgen

18th World congress of basic and clinical pharmacology (2018年)

Tsutsui M, Kina-Tanada M, Sakanashi M, Matsuzaki T et al.

Long-Term Dietary Nitrite and Nitrate Deficiency Causes Metabolic Syndrome, Endothelial Dysfunction, and Cardiovascular Death in Mice

18th World congress of basic and clinical pharmacology (2018年)

Tsutsui M, Sakanashi M, Taira Y, Matsuzaki T et al.

Sex Difference in Sudden Death of 2/3 Nephrectomized Triple Nitric Oxide Synthases-Deficient Mice.

The 8th Congress of the International Society for Gender Medicine (2017年)

Tsutsui M, Kubota H, Noguchi K, Matsuzaki T, Sakanashi M et al.

Deleterious effect of all nitric oxide synthases in cerebral infarction in male mice: involvements of sex difference and testosterone.

American Heart Association Scientific Sessions 2017 (2017年)

坂梨まゆ子、喜名美香、松崎俊博、筒井正人 他

低 NO2-/NO3-食の長期的な摂取はメタボリックシンドロームを惹起する

日本薬学会第 137 年会 (2017年)

Tsutsui M, Kina M, Sakanashi M, Arasaki A.

Pathogenetic roles of the exogenous NO production system in metabolic syndrome, endothelial dysfunction, and cardiovascular death in mice.

第 90 回日本薬理学会 (2017年)

坂梨まゆ子、平良雄司、内田太郎、松崎俊博、筒井正人 他

2/3 腎摘 NO 合成酵素完全欠損マウスの突然死における性差

第 46 回日本心脈管作動物質学会 (2017年)

久保田陽秋、野口克彦、坂梨まゆ子、松崎俊博、筒井正人 他

脳梗塞における NO 合成酵素の有害な作用:性差およびテストステロンの関与

第 46 回日本心脈管作動物質学会 (2017年)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松崎 俊博

ローマ字氏名：MATSUZAKI Toshihiro

所属研究機関名：琉球大学

部局名：大学院医学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：50244330

研究分担者氏名：筒井 正人

ローマ字氏名：TSUTSUI Masato

所属研究機関名：琉球大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：70309962

(2)研究協力者

研究協力者氏名：野口 克彦

ローマ字氏名：NOGUCHI Katsuhiko

研究協力者氏名：谷本 昭英

ローマ字氏名：TANIMOTO Akihide

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。