

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K09141

研究課題名（和文）男性ホルモン補充に起因する虚血性心血管疾患に対する生体内NO量制御の有用性の検証

研究課題名（英文）The evaluation of the utility of in vivo NO level regulation for ischemic cardiovascular disease caused by androgen supplementation.

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：内因性または外因性に生体内NO産生が低下したマウスで心筋梗塞を易発症するモデルを作製したところ、低テストステロン群に比べてテストステロンレベルが正常な群（テストステロン補充モデル）で生存率および冠危険因子の増悪が認められた。生体内のNO量が低下していると、テストステロンは、動脈硬化を進展させ、慢性炎症を惹起し、心筋梗塞を増悪させるが、硝酸塩の経口投与によりNO産生量を正常化させることで、これらの増悪作用が抑制され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

加齢男性・性腺機能低下（late-onset hypogonadism: LOH）症候群の治療として、テストステロン補充療法が行われているが、近年、テストステロン補充による心血管疾患の増悪作用に関する報告が相次いでいる。本研究は、テストステロン補充が有害作用を呈する機序に、生体内のNO産生低下が関与し、硝酸塩の投与により生体内のNOレベルを増加させることで、有害作用の発現を抑制しうる可能性を示した。本研究で得られた知見は、より安全にテストステロン補充療法を行うための新たな治療法の開発に、貢献を果たすことが期待される。

研究成果の概要（英文）：We have generated mice with reduced levels of endogenous or exogenous NO production and developed models that prone to myocardial infarction. In these mice, the normal testosterone level group (testosterone replacement model) showed decreased survival rates and worsening coronary risk factors compared to the low testosterone level group. When NO levels were reduced in vivo, testosterone contributed to the development of atherosclerosis, induction of chronic inflammation, and exacerbation of myocardial infarction. However, it was suggested that these exacerbating effects could be suppressed by normalizing NO levels through oral administration of nitrates.

研究分野：病態生理学

キーワード：テストステロン補充 一酸化窒素 虚血性心疾患

## 1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う種々の機能変化の中で、精巣をはじめとする生殖内分泌器官の老化は重要である。現在、加齢男性・性腺機能低下 (late-onset hypogonadism: LOH) 症候群は、テストステロン低下に伴う多臓器機能障害と理解されており、その治療としてテストステロン補充による薬物療法が広く施行されている。これまでにテストステロン補充による血中テストステロン値の増加は、性機能や精神症状の改善のみならず、虚血性心疾患や脳梗塞の死亡リスク低下に寄与することが明らかにされた (Khaw et al., *Circulation* 2007 他)。ところが、高齢男性へのテストステロン補充療法ランダム化比較試験 (Basaria et al., *N Engl J Med* 2010) や、冠動脈疾患を有する血清テストステロン低値の男性におけるコホート研究 (Vigen et al., *JAMA* 2013)、さらに高齢者および心疾患既往のある若年者を対象としたレトロスペクティブ研究 (Finke et al., *PLoSOne* 2014) において、テストステロン補充療法が心血管系の有害転帰リスクの増加と関連することが相次いで報告された。これらの臨床試験の結果は、テストステロンによる二面的な心血管疾患の調節機構を示唆するものであるが、何を契機にテストステロンが有害性を表すのか、その詳細な機序についてはこれまで解明されていない。

そこで申請者らは、テストステロンによる有害作用の成因の解明に着手すべく、虚血性心疾患をターゲットとした実験モデルの作製に着手した。テストステロンの有害性が示された高齢者や心疾患の既往歴のある男性において、内皮機能障害に起因する NO 産生低下が認められたとの報告 (Di Massimo C et al., *Life Sci.* 2006, 他) に着想を得て、申請者らは内因性 NO 産生が完全に破綻し、かつ心血管疾患を誘発するモデルマウスの開発に取り組み、NO 合成酵素 (NOS) 完全欠損 (n/i/eNOS-KO) マウスを用いた心筋梗塞発症モデルを作製した。また近年、NO 産生に外因性の硝酸イオン摂取が重要な役割を果たしていることが明らかにされたことから、野生型マウスへの低硝酸塩食負荷による外因性 NO 産生低下モデルも併せて作製した。申請者らは、低硝酸塩食負荷の長期投与は、急性心筋梗塞死を含む有意な心血管死を誘発することを確認している (Kina et al., *Diabetologia* 2017)。

## 2. 研究の目的

本研究は、生体内 NO レベルを低下させることで心筋梗塞を発症する n/i/eNOS-KO マウスや低硝酸塩食負荷マウスを用いて、テストステロン補充が心筋梗塞の発症または増悪におよぼす影響を検討し、増悪が認められる場合は、その機序を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) モデル動物の作製

内因性 NO 産生低下モデルマウスを用いる実験では、雄性 NO 合成酵素完全欠損 (n/i/eNOS-KO) マウス (8 週齢) に 3 種混合麻酔 (メドミジン塩酸塩 0.3 mg/kg + ミダゾラム 4 mg/kg + ブトルファノール酒石酸塩 5 mg/kg) を腹腔内投与し、両側腎臓の 2/3 を亜全摘 (2/3nephrectomized: NX) することで早期心筋梗塞発症モデルを作製した。このモデルマウスに精巣全摘手術 (orchidectomy: ORX) または偽手術 (sham) を施し、ORX 群については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、持続投与によるテストステロン補充を行い、生存率の比較を行った。

外因性 NO 産生低下モデルマウス実験では、野生型マウス (雄性 C57BL/6) を用いて ORX および sham 群を作製し、コントロールは LabDiet 5001 (Lab Diet 社) と水道水を、低硝酸塩食負荷群は、特別食 (LabDiet 5001 とカロリー及びアルギニンの量は同一だが硝酸塩を抜いたもの。オリエンタル酵母工業製) とイオン交換水を 1 年間自由摂取させた。

### (2) モデル動物の生体内 NO レベルの上方制御が生存率におよぼす影響

各種濃度の硝酸ナトリウム溶液を自由飲水により 3 週間経口投与し、生体内 NO レベルが正常レベルである雄性野生型マウスと同程度になる濃度を検討した。実験から得られた適正濃度の硝酸ナトリウム溶液 (3 mM) を、内因性 NO 産生低下心筋梗塞発症モデルマウスでは低テストステロン群、ならびにテストステロン補充群に、外因性 NO 産生低下モデルマウスについては、ORX 群と sham 群に経口投与し、生存率を比較検討した。

### (3) 心筋および内臓脂肪の心筋梗塞関連因子の発現解析

内因性 NO 産生低下モデルマウスでは、低テストステロン群および正常レベルテストステロン群の心筋を用いて、心筋梗塞関連因子の mRNA 発現レベルの差を RNA シークエンスにより比較検

討した。外因性 NO 産生低下モデルマウスでは、低テストステロン群および正常レベルテストステロン群の内臓脂肪を用いて、心筋梗塞関連因子のタンパク発現および mRNA 発現の差を、Western blot および定量的 PCR により比較検討した。

#### 4. 研究成果

(1) NO 産生低下モデルマウスにおけるテストステロン補充が心筋梗塞の発症または増悪におよぼす影響の検討

内因性 NO 産生低下モデルである n/i/eNOS KO マウスに 2/3 腎臓全摘を行うと、9 割以上が心筋梗塞により死亡することが確認されている (Uchida et al., *J Mol Cell Cardiol.* 2014) ことから、心筋梗塞発生の粗指標として生存率の検討を行った。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 (Fig. 1)。また、sham 群に比して ORX 群では、心筋梗塞の危険因子の指標となる総コレステロール、空腹時血糖値および収縮期血圧が、いずれも有意に低下していた。次に ORX 群へのテストステロン補充を行い、テストステロンレベルを正常レベル (sham 群と同程度) まで増加させたところ、ORX 群で認められた生存率の改善は、有意に抑制された (Fig. 2)。また、ORX 群と ORX+テストステロン補充群とで心筋梗塞の各種危険因子の指標を比較検討したところ、いずれの項目もテストステロン補充群で増悪していた。そこで、生存率の増悪が認められた正常テストステロンレベルの 2/3NX<sub>n</sub>/i/eNOS KO マウスの生体内 NO レベルを正常レベル (野生型マウスと同程度) まで増加させる目的で、硝酸塩溶液を自由摂取により経口投与したところ、硝酸塩非投与群に比して生存率の有意な改善が認められ (Fig. 3)、心筋梗塞の各種危険因子の指標についても改善が認められた。

外因性 NO 産生低下モデルである低硝酸塩食負荷は、飼育期間中に死亡に至ることはなかったことから、心筋梗塞の危険因子の指標の比較を行った。Sham マウスと ORX マウスに対して低硝酸塩食負荷を行ったところ、sham マウスでは通常食負荷群に比して低硝酸塩食負荷群で、血漿脂質、内臓脂肪量、空腹時血糖値の有意な増加が認められた。中でも内臓脂肪量は、著増を示した。一方、ORX マウスでは、低硝酸塩食負荷によりこれらに有意な変化を認めなかった。したがって、外因性 NO レベルの低下は、テストステロンレベルが正常な状態では心筋梗塞の発症リスクを有意に悪化させるものの、テストステロンレベルが低下した状況では、有意な影響をおよぼさないことが明らかとなった。

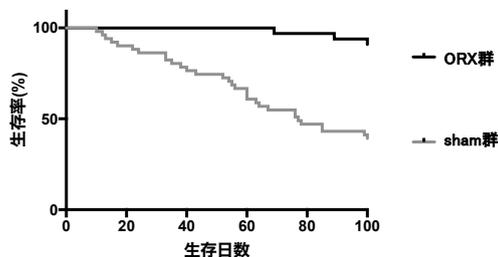


Fig. 1 正常テストステロン群(sham)と低テストステロン群 (ORX) の生存率の比較

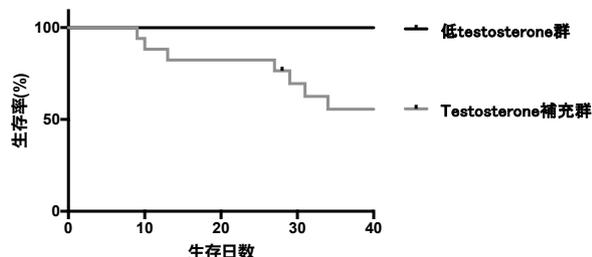


Fig. 2 低テストステロン群 (ORX) とテストステロン補充群の生存率の比較

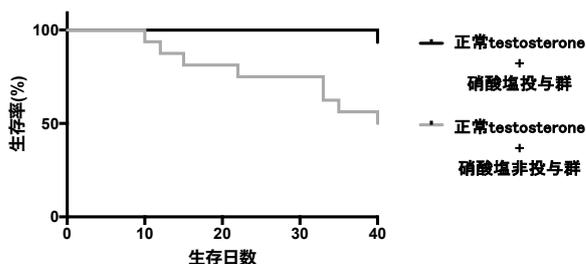
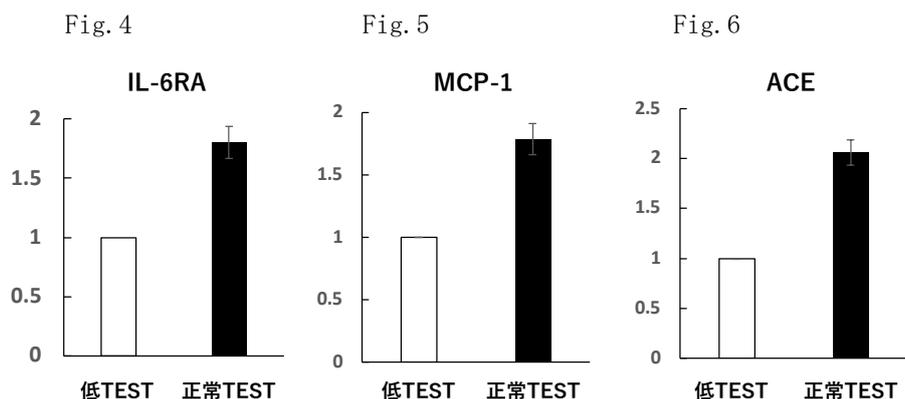


Fig. 3 正常テストステロン+硝酸塩投与群と正常テストステロン+硝酸塩非投与群の生存率の比較

## (2) NO 産生低下モデルマウスにおけるテストステロン補充が心筋梗塞増悪を引き起こす機序の検討

NO 産生の低下した状態においては、テストステロン補充によるテストステロンレベルの正常化が、心筋梗塞やその発症リスクを増悪させる可能性が示唆されたことから、内因性 NO 産生低下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の心筋を用いて、炎症および脂質代謝の関連因子の mRNA 発現レベルの比較を行った。炎症の指標である IL-6 は、心筋梗塞時に発現が増加することが知られている。そこで心筋の IL-6 受容体の発現を検討したところ、低テストステロン群に比して正常テストステロン群では有意に増加していた (Fig. 4)。また、IL-6 の産生を誘導し、動脈硬化の進展に寄与する MCP-1 の発現についても、低テストステロン群に比して正常テストステロン群で有意な増加を認めた (Fig. 5)。アンジオテンシン II は、心筋梗塞の発症原因である動脈硬化を促進することが知られている。そこで、アンジオテンシン II の産生を担うアンジオテンシン変換酵素の発現についても同様に検討したところ、低テストステロン群に比して正常テストステロン群で有意な増加を認めた (Fig. 6)。以上よりテストステロン補充によるテストステロンレベルの正常化は、NO 産生の低下した状態においてアンジオテンシン II や MCP-1 の産生を増加させ、動脈硬化を進展させることにより慢性炎症を惹起し、心筋梗塞の発症を促進させる可能性が示唆された。

さらに、外因性 NO 産生低下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の内臓脂肪組織を用いて、炎症及び脂質代謝の関連因子のタンパク発現レベルの比較を行った。炎症時に誘導され、大量の NO 産生を担い炎症を増悪させる誘導型 NO 合成酵素の発現は、低テストステロン群に比して正常テストステロン群では有意に増加していた。また、動脈硬化の進展抑制に關与するアディポネクチンの発現は、低テストステロン群に比して正常テストステロン群では低下しており、一方、動脈硬化の進展に關与する TNF- $\alpha$  の発現は、低テストステロン群に比して正常テストステロン群で増加していた。



本研究において、生体内の NO 産生が低下した状況でのテストステロン補充は、動脈硬化の進展により慢性炎症を惹起し、心筋梗塞を増悪させるが、硝酸塩投与により生体内の NO 産生レベルを正常化させることで、増悪が抑制される可能性が明らかとなった。本研究で得られた知見をもとに、更に研究を発展させることで、心血管疾患のハイリスク患者に対するテストステロン補充療法を、より安全に行う治療法の開発が可能になると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 比嘉章太郎、坂梨まゆ子、山下弘高、平良雄司、下川宏明、古川浩二郎、筒井正人
2. 発表標題 NO合成酵素完全欠損下におけるテストステロンの有害な心血管作用
3. 学会等名 第76回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2023年

〔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
研究分担者	松崎 俊博  (Matsuzaki Toshihiro)  (50244330)	琉球大学・医学研究科・助教   (18001)	
研究分担者	筒井 正人  (Tsutsui Masato)  (70309962)	琉球大学・医学研究科・教授   (18001)	

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
---------	---------