

《様式B》

研究テーマ 「マイクロ RNA 解析技術を用いた Testosterone の血管内皮機能に対する多面的解析」

研究責任者 所属機関名 名古屋市立大学大学院 医学研究科 臨床薬剤学
官職又は役職 助教
氏 名 片岡 智哉 メールアドレス kataoka@med.nagoya-zu.ac.jp

共同研究者 所属機関名 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 病院薬剤学
官職又は役職 講師
氏 名 堀田 祐志

所属機関名 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 病院薬剤学
官職又は役職 講師
氏 名 前田 康博

所属機関名 名古屋市立大学大学院 医学研究科 臨床薬剤学
官職又は役職 教授
氏 名 木村 和哲

(平成 27 年度募集) 第 28 回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000 字程度)
※産業技術として実用化の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。
2. 実施内容および成果の説明 (A4 で、5 ページ以内)

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要

男性ホルモンは二次性徴に必要であり、生殖器系組織などの器官形成にとって重要であることは古くから知られている。しかし、近年の研究によ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。これまで、加齢や生活習慣病、ストレスなどにより男性ホルモンが低下することで心血管系疾患や認知症の発症リスクが上昇することが報告されている。しかし、その発症メカニズムについては十分な研究がされておらず不明な点が多い。

本研究では男性ホルモンのエピゲノム作用をマイクロ RNA 解析技術を用いて多面的に検討し、男性ホルモンが血管内皮機能に及ぼす影響を解明することを目的とした。

性成熟が完了した 11 週齢の雄性 Wistar ST ラットを用いて、男性ホルモンを低下させるため、精巣を摘出する去勢群を作成し、去勢後に男性ホルモンを補充する去勢+T 群、および sham 手術のみの Sham 群を作成し、4 週間後に機能評価を行った。

去勢後 4 週目において、ラットの大動脈における血管内皮機能を評価したところ、ACh に対する弛緩反応は低下傾向にあったものの、有意差は存在しなかった。一方、陰茎海綿体においては有意な ACh に対する反応性の低下が観察された。

血中のマイクロ RNA の発現変動を検討したところ、去勢により let-7f、let-7d、miR-326 の発現低下および miR-150 の発現上昇が観察され、テストステロン投与により改善された。これらの因子の異常は免疫系に作用し、酸化ストレスの増加および炎症性サイトカインの上昇が報告されている。本研究でも NADPH oxidase-1、NADPH oxidase-4 および p22^{phox} の発現が有意に上昇しており、NADPH oxidase を介した酸化ストレスを発生させた可能性が考えられる。一方、catalase や SOD-2、GPx-1 などの酸化ストレスを分解する因子に関しては変化が見られなかったが、去勢により IL-6 や NF-κB のような炎症性サイトカインの発現増加も観察された。一方、テストステロン投与によりマイクロ RNA の異常が改善され、酸化ストレスの発生が抑制され、炎症性サイトカインの抑制が見られており、テストステロン低下によるマイクロ RNA の異常を介した可能性が考えられる。

本研究によってテストステロン低下によりマイクロ RNA を介した炎症メカニズムが血管内皮機能障害を引き起こす可能性が世界で初めて示唆された。現在のところ、テストステロンの低下による NADPH oxidase 増加のメカニズムは解明されていないが、今後はマイクロ RNA の阻害剤や遺伝子改変動物を用いた検討により、これらの経路の解明を試みたい。

2. 実施内容および成果の説明

I. 背景

男性ホルモンは二次性徴に必要であり、生殖器系組織などの器官形成にとって重要であることは古くから知られている。しかし、近年の研究によ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。本邦では2007年に『加齢男性性腺機能症候群（LOH症候群）診療の手引き』が出版され、LOH症候群治療が広く行われるようになった。LOH症候群とは、加齢に伴う男性ホルモンの一種であるテストステロン低下により引き起こされる更年期様の症状のことをいい、本邦における患者数は500～600万人にのぼり、高齢化に伴い今後も更なる増加が懸念されている。LOH症候群の研究が進むにつれ、テストステロンの別の作用が明らかにされつつある。これまで、加齢や生活習慣病、ストレスなどにより男性ホルモンが低下することで心血管系疾患や認知症の発症リスクが上昇することが報告されている。しかし、その発症メカニズムについては十分な研究がされておらず不明な点が多い。

本研究では男性ホルモンのエピゲノム作用をマイクロRNA解析技術を用いて多面的に検討し、男性ホルモンが血管内皮機能に及ぼす影響を解明することを目的とした。

II. 実験材料および方法

II-1. 実験プロトコール

性成熟が完了した11週齢の雄性Wistar STラットを用いて以下の3群を作成した。男性ホルモンを低下させるため、精巣を摘出する去勢群を作成し、去勢後に男性ホルモンを補充する去勢+T群、およびsham手術のみのSham群を作成した。男性ホルモンは外径3.17 mm×内径1.57 mmのシリコンチューブ2.2 cmにテストステロンを充填し、ラットの皮下に移植して補充療法を行った。Sham群およびCast群にはシリコンチューブのみ皮下に移植した。去勢4週間後を終了点とし、ラットの血管内皮機能を評価する。動物は、温度および湿度がコントロールされた部屋で、自由に餌と水を摂取することができるようにし、12時間毎の明暗サイクルで飼育した。

II-2. Isometric Tension Studyによる張力測定

ラットより摘出した大動脈を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)中で大動脈を約0.5 cmの大きさにプレパレーションし、リング標本作製した。95% O₂–5% CO₂で通気した37°CのKrebs溶液で満たした微小マグナス装置に固定した。一方、ラットから陰茎を摘出し、4°Cに冷やしたKrebs溶液中で白膜を取り除き、長さ約1 cmの陰茎海綿体のみの標本作製した。95% O₂–5% CO₂で通気した37°CのKrebs溶液で満たしたマグナス管に固定した。陰茎海綿体標本の一端をセルフィンで固定し、他端をトランスデューサーの先端に糸で接続して固定し、薬物による張力変動をモニターした。各標本に600 mgの基礎張力を負荷し、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 potassium solution (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、大動脈は10⁻⁶ M phenylephrineで、陰茎海綿体は10⁻⁵ M NAで前収縮させた標本にacetylcholine (ACh)とsodium nitroprusside (SNP) 10⁻¹⁰–10⁻⁴ Mの範囲で累積投与し、その弛緩力を測定した。AChおよびSNPによる弛緩力の測定には、前収縮させた張力に対する割合を用いて解析した。

II-3. 陰茎海綿体内圧 (intracavernous pressure; ICP) 測定による勃起機能評価

麻酔の導入を 3.0% イソフルラン、維持を 1.0-1.5% イソフルランによる吸入麻酔で行った。麻酔下で、手術台に仰向けに四肢を固定し、下顎から胸骨にかけてハサミで正中切開した。精密ハサミや精密ピンセット、綿棒を用いて筋肉を分け、左総頸動脈を露出させた。先曲り精密ピンセットを用いて膜に覆われている左総頸動脈に糸をかけた。糸で左総頸動脈を持ち上げながら精密ハサミを用いて膜を除去した。左総頸動脈の心臓側をブルドッククレンメでクランプした。左総頸動脈の頭部側を糸で結紮した。クランプ部と結紮部の間の血管を精密ハサミで 1/3 ほど切開し、切開部上部の血管を精密ピンセットでつまみ上げ、血管内に左総頸動脈カニューレを挿入し、二重結紮により固定を行い、動脈圧を測定した。動脈圧の測定には 50 U/L heparin で満たした polyethylene (PE)-50 チューブをカニューレとして用い、圧トランスデューサーに接続して動脈圧をモニターした。

次いで、下腹部を陰茎上部から肋骨の下部まで正中切開した。陰のうを押し、精巣を上部へ押し上げた。陰のうを切開し、左側陰茎脚を露出させ、23 G 注射針付きカニューレを陰茎脚から挿入し、接着剤で固定し、ICP を測定した。ICP の測定には 50 U/L heparin で満たした PE-50 チューブの先端に 23G 注射針を接続し、圧トランスデューサーに接続して ICP をモニターした。

前立腺付近に存在する海綿体神経を 5 V, 1-16 Hz, Duration 5 msec の条件にセットした Electronic Stimulator で双極形鉤電極を用いて 1 分間電気刺激を行い、ICP の変動をモニターした。

動脈圧と ICP は Chart & Scope を用いて記録、解析した。測定された ICP の最大値を動脈圧の平均血圧 (mean arterial pressure; MAP) で割った ICP/MAP を評価の指標とした。

II-4. マイクロアレイ解析による遺伝子発現解析

ラットの大静脈より採取した血清を用いて、マイクロアレイ法によりマイクロ RNA の発現変動を網羅的に解析した。また、摘出した陰茎海綿体を用いて、マイクロアレイ法により遺伝子の発現変動を網羅的に解析した。解析は Agilent 社製の解析システムを用い、株式会社マクロジェン・ジャパンに抽出・解析を依頼した。

II-5. Real-time PCR 解析による遺伝子発現解析

摘出した陰茎海綿体から ISOGEN 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 を用いて、260 nm と 280 nm の吸光度を測定した。260 nm の吸光度を 280 nm の吸光度で除した値が 1.8 以上のサンプルについて逆転写反応を行った。得られた total RNA 1 µg から、ReverTra Ace-α®を用いて添付書類の組成で 2720 Thermal Cycler を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応は 42 °C 20 分間、99 °C 5 分間の条件で行った。合成した cDNA は milli Q で 5 倍に希釈し -20°C で保存した。

Real-time PCR 解析に用いた primer は表 1 の通りである。Primer はあらかじめ、sense primer と antisense primer が 5 µM になるよう調整した。CFX Connect™ リアルタイム PCR 解析システムで real-time PCR を行った。反応条件は 50°C 2 min、95°C 10 min、95°C 15 sec、60°C 1 min (40 cycle) で行った。解析には $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて GAPDH との比で比較した。

II-6. 統計処理

測定結果はすべて平均値 ± 標準誤差で表記した。統計解析には Tukey-Kramer's t-test を用い、危険率 5% 未満を有意と判定した。

III. 結果

III-1. Isometric Tension Study による張力測定

大動脈の張力測定結果を Fig.1 に示す。ACh を累積投与すると濃度依存的に弛緩反応が増大した。Cast 群では Sham 群に比べて弛緩反応が低下傾向であったが、いずれの濃度においても有意差は見られなかった ($p > 0.05$)。

一方、陰茎海綿体の張力測定結果を Fig.2 に示す。ACh を累積投与すると濃度依存的に弛緩反応が増大した。Cast 群では Sham 群に比べて弛緩反応が有意に低下し ($P < 0.01$)、Cast+T 群では Cast 群に比べて有意に上昇した ($P < 0.01$)。

いずれの組織においても SNP に対する反応性に差は見られなかった ($p > 0.05$)。

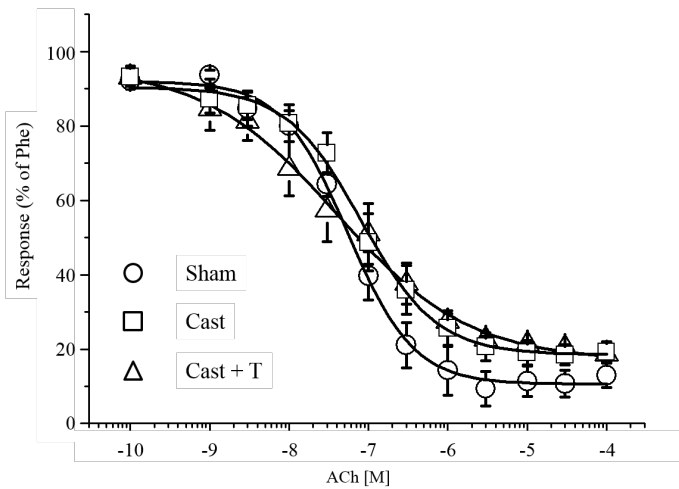


Fig. 1 大動脈における ACh に対する弛緩反応

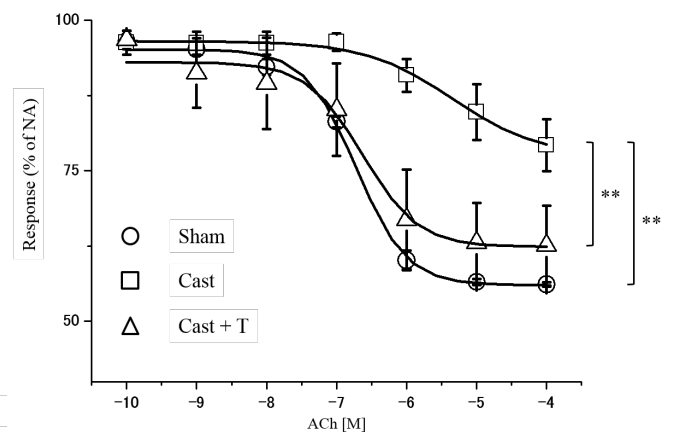


Fig. 2 陰茎海綿体における ACh に対する弛緩反応

III-2. ICP 測定による勃起機能評価

ICP 測定結果を Fig.3 に示した。海綿体神経電気刺激における周波数を増大させると ICP/MAP も増大した。8 Hz と 16 Hz において Cast 群では Sham 群に比べ、ICP/MAP が有意に低下した ($P < 0.01$)。一方、Cast+T 群では Cast 群に比べ、ICP/MAP が有意に上昇した ($P < 0.01$)。

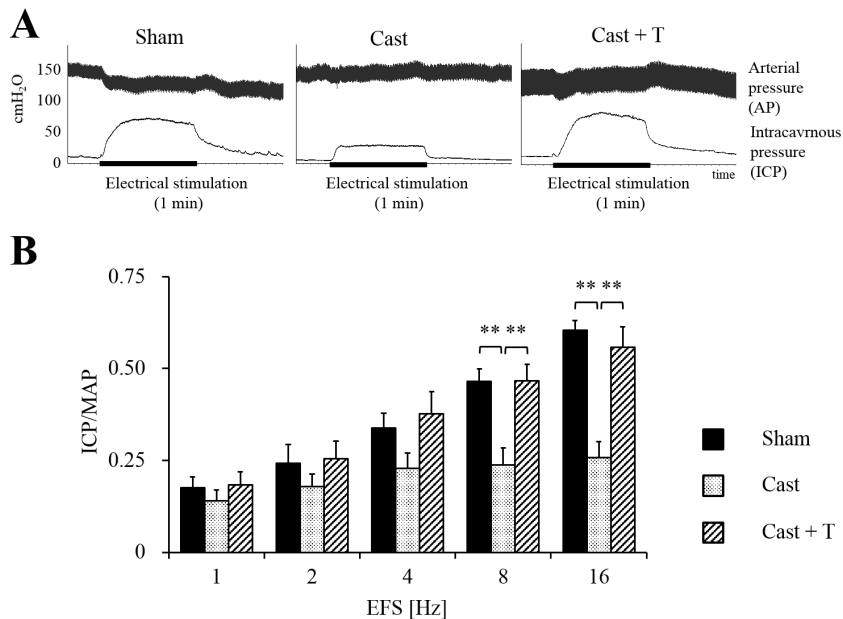


Fig. 3 ICP 測定結果

A) 代表的なチャート、B) ICP/MAP 解析結果

III-3. マイクロアレイ解析による遺伝子発現解析

マイクロアレイ解析による結果を Fig.4 に示す。血清中マイクロ RNA に関しては、Cast 群で let-7f や let-7d、miR-326 など、9 個の因子の発現低下が観察され、miR-150 など 6 個の因子の発現上昇が観察された。一方、陰茎海綿体における遺伝子発現変動を観察したところ、Colla1 や Colla2 など 64 個の因子の発現低下が観察され、Igfbp3 や Cdkn1a など 9 個の因子の発現上昇が観察された。

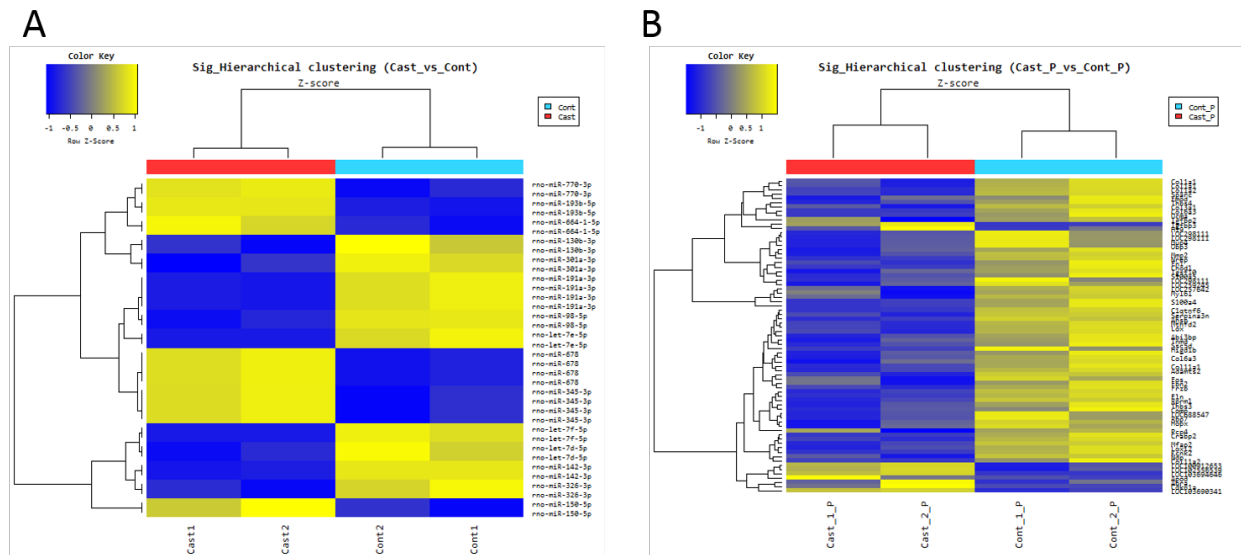


Fig. 4 マイクロアレイ解析結果

A) 血清中マイクロ RNA 発現量の変化、B) 陰茎海綿体中 RNA 発現量の変化

III-4. Real-time PCR 解析による遺伝子発現解析

Real-time PCR 法を用い、NADPH oxidase-1, NADPH-4, p22^{phox}, catalase, SOD-2, GPx-1, iNOS, IL-6, NF-κB の各種 mRNA 発現変動の結果を Fig.5 に示した。Cast 群では Sham 群に比べ、NADPH oxidase-1、NADPH oxidase-4 および p22^{phox} の発現が有意に上昇した ($P < 0.05$)。一方、Cas+T 群では Cast 群に比べ、NADPH oxidase-1、NADPH oxidase-4 および p22^{phox} の発現が有意に低下した ($P < 0.01$)。一方、Catalase、SOD-2 および GPx-1 の発現に変化は見られなかった ($P > 0.05$)。また、Cast 群では Sham 群に比べ、IL-6 の発現が有意に上昇した ($P < 0.05$)。さらに、Cast 群では Sham 群に比べ、NF-κB の発現が上昇傾向にあり、Cas+T 群では低下傾向にあった ($P < 0.10$)。

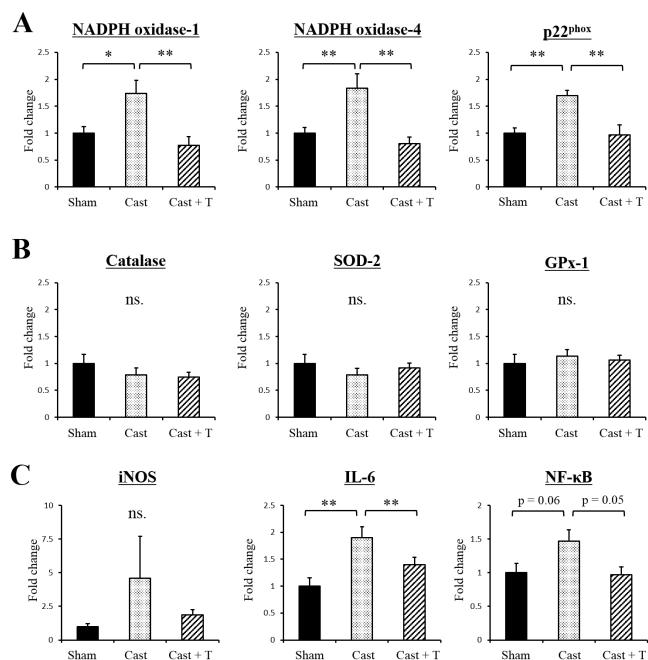


Fig. 5 real time PCR による mRNA 発現解析

A) 酸化ストレス産生関連因子

B) 酸化ストレス分解関連因子

C) 炎症性サイトカイン関連因子

IV. 考察

本研究によってテストステロン低下によりマイクロ RNA を介した炎症メカニズムが血管内皮機能障害を引き起こす可能性が示唆された。

去勢後 4 週目において、ラットの大動脈における血管内皮機能を評価したところ、ACh に対する弛緩反応は低下傾向にあったものの、有意差は存在しなかった。一方、陰茎海綿体においては有意な ACh に対する反応性の低下が観察された。陰茎海綿体は末梢血管であるが大動脈は大血管であり、去勢後 4 週の時点においては障害が現れなかった可能性が考えられる。また、陰茎海綿体はテストステロンの影響を受けやすい組織であったため、血管内皮機能障害が現れた可能性も考えられる。本研究ではテストステロン低下により血管内皮機能障害が引き起こされた陰茎海綿体における障害発症メカニズムの検討を行った。

これまでの報告と同様に本研究においても、去勢ラットではテストステロンの低下に伴い、ICP/MAP の低下がみられ、勃起機能の低下が観察された。一方、テストステロン投与により去勢ラットの ICP/MAP が上昇し、勃起機能の回復が得られた。

血中のマイクロ RNA の発現変動を検討したところ、去勢により let-7f、let-7d、miR-326 の発現低下および miR-150 の発現上昇が観察され、テストステロン投与により改善された。これらの因子の異常は免疫系に作用し、酸化ストレスの増加および炎症性サイトカインの上昇が報告されている。本研究でも NADPH oxidase-1、NADPH oxidase-4 および p22^{phox} の発現が有意に上昇しており、NADPH oxidase を介した酸化ストレスを発生させた可能性が考えられる。一方、catalase や SOD-2、GPx-1 などの酸化ストレスを分解する因子に関しては変化が見られなかった。しかし、去勢により IL-6 や NF- κ B のような炎症性サイトカインの発現増加も観察された。つまり、テストステロンの低下ということ自体が陰茎海綿体において酸化ストレスの発生および組織の炎症を引き起こす可能性が示唆された。Khasnavis らの報告では、マウスを去勢すると脳の血管において iNOS や炎症性サイトカインの発現が上昇することが示されている。テストステロンが血管の炎症性サイトカイン発生を抑制する報告はヒトの細胞を用いた研究でも示されており、テストステロンが血管の炎症を制御する何らかの作用を有することは十分に考えられる。一方、テストステロン投与によりマイクロ RNA の異常が改善され、酸化ストレスの発生が抑制され、炎症性サイトカインの抑制が見られており、テストステロン低下によるマイクロ RNA の異常を介した可能性が考えられる。現在のところ、テストステロンの低下による NADPH oxidase 増加のメカニズムは解明されていないが、今後はマイクロ RNA の阻害剤や遺伝子改変動物を用いた検討により、これらの経路の解明を試みたい。

V. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる研究助成を賜りました一般財団法人東海産業技術振興財団並びに関係各位に深謝致します。また、共同研究者の木村和哲教授、前田康博講師、堀田祐志助教にも感謝致します。