




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 (課)・論	第 号	氏 名	河 野 浩 明
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	小 野 克 重	
	副査氏名	三 股 浩 光	
	副査氏名	岩 坂 日 出 男	
<p>論文題名 Receptor-Mediated Suppression of Cardiac Heat-Shock Protein 72 Expression by Testosterone in Male Rat Heart (オスラット心臓におけるテストステロンの受容体を介した心臓熱ショック蛋白 72 発現抑制)</p> <p>論文掲載誌 Endocrinology 148: 3148-3155, 2007.</p> <p>論文要旨 Testosterone (T)の心臓保護効果については、オスラットにおける Castration(除睾術)や Flutamide (アンドロゲン受容体拮抗薬)投与が虚血再灌流後の心機能を改善したとする報告がある一方で、Castration により虚血に対する心臓障害が増悪し T の補充によりそれが回復したとする報告があり、いまだに議論の対象になっている。筆者等は、ラット心を用い、熱ショック蛋白 (HSP72) 発現および虚血再灌流障害に対する T の効果を検討した。また心筋細胞においても HSP72 発現および低酸素再酸素化障害に対する T の効果を検討した。10 週齢のオス SD ラットに Castration もしくは Sham operation を施した。Castration を施行した群に対し、4 週後に T (10mg/kg)を腹腔内に単回投与した。その 6 時間後 Hyperthermia (HT; 43°C, 20 分)もしくは Normothermia (NT; 37°C, 20 分)負荷を与えた。24 時間後に心臓を単離し、Western blot 解析および Langendorff 灌流装置を用いた虚血再灌流実験を行った。心室筋細胞は、生後 3-5 日の Wistar ラット及び 10 週齢のオス SD ラットから単離した。3 日後、T もしくは vehicle を培養液中に添加し、30 分後に HT または NT 負荷を与えた。24 時間後に細胞を回収し、Western blot 解析および低酸素再酸素化実験を行った。Castration により血中 T 濃度は測定感度以下になった。ラット心において、Castration 単独では HT による HSP72 発現誘導に影響を及ぼさなかったが、Castration したラットに T を補充すると HSP72 発現が抑制された。HT 負荷を与えたラットでは、虚血再灌流後の心機能は、Castration 群と Sham operated 群で、ほぼ同等に良好な回復を示したが、T 補充により虚血再灌流後の心機能回復が阻害された。ラット心筋培養細胞を用いて、EMSA 法により HSP72 の転写因子である HSF-1 (heat shock factor-1)活性を評価した。また HSP72 を標的とした siRNA (HSP72 siRNA) の効果も検討した。ラット左室から単離した心室筋細胞において、虚血再灌流後のアポトーシス陽性細胞は Castration 群と Sham operated 群で同等であったが、Castration + T 補充群で有意に増加した。ラット心筋細胞及び成獣(本研究では 10 週齢)ラットの培養心室筋細胞においても、T を培養液に添加することにより、低酸素再酸素化後のアポトーシス陽性細胞が有意に増加した。ラット心筋細胞において、HT により誘導された HSP72 発現は T により阻害された。低酸素再酸素化において、HT はアポトーシスを軽減したが、その効果は T により阻害された。Flutamide は T による HSP72 発現抑制効果を阻害した。HSF-1 活性は HT により著明に増加したが T 投与により減弱した。しかし Flutamide を前投与しておくと、T による HSF-1 活性の抑制効果は認められなかった。ラット心筋細胞において、HSP72 siRNA は、HT によりもたらされる低酸素再酸素化に対する細胞保護効果を抑制した。この研究で、HT により誘導された心臓 HSP72 発現が T により抑制されることを、生体心及び培養心筋細胞において証明した。T の効果は、in vivo では虚血再灌流後の逸脱 CK 値、アポトーシス、心機能で評価し、in vitro では低酸素再酸素化によるアポトーシスや逸脱 LDH 値にて評価した。今回の in vitro の実験では、培養液に T を投与後 30 分で HT を与えた。T による HSP72 発現抑制効果も HSF-1 活性の抑制効果も Flutamide により阻害された。</p> <p>本論文はテストステロンが少なくとも部分的にアンドロゲン受容体を介して、転写レベルを調節することによって HSP72 発現抑制に働くことを示したものであり、審査委員の合議により学位論文に値するものと判断した。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 河野 浩明

論 文 題 目

Receptor-Mediated Suppression of Cardiac Heat-Shock Protein 72 Expression by Testosterone in Male Rat Heart
(オスラット心臓におけるテストステロンの受容体を介した心臓熱ショック蛋白 72 発現抑制)

要 旨

【緒言】

Testosterone (T)の心臓保護効果については、オスラットにおける Castration(除睾術)や Flutamide(アンドロゲン受容体拮抗薬)投与が虚血再灌流後の心機能を改善したとする報告がある一方で、Castrationにより虚血に対する心臓障害が増悪しTの補充によりそれが回復したとする報告があり、いまだに議論の対象になっている。

今回我々は、ラット心を用い、熱ショック蛋白 (HSP72) 発現および虚血再灌流障害に対する T の効果を検討した。また心筋細胞においても HSP72 発現および低酸素再酸素化障害に対する T の効果を検討した。

【方法】

10 週齢のオス SD ラットに Castration もしくは Sham operation を施した。Castration を施行した群に対し、4 週後に T(10mg/kg)を腹腔内に単回投与した。その 6 時間後 Hyperthermia (HT; 43°C, 20 分) もしくは Normothermia (NT; 37°C, 20 分)負荷を与えた。24 時間後に心臓を単離し、Western blot 解析および Langendorff 灌流装置を用いた虚血再灌流実験を行った。

心室筋細胞は、生後 3-5 日の Wistar ラット及び 10 週齢のオス SD ラットから単離した。3 日後、T もしくは vehicle を培養液中に添加し、30 分後に HT または NT 負荷を与えた。24 時間後に細胞を回収し、Western blot 解析および低酸素再酸素化実験を行った。

ラット仔心筋培養細胞を用いて、EMSA 法により HSP72 の転写因子である HSF-1 (heat shock factor-1)活性を評価した。また HSP72 を標的とした siRNA (HSP72 siRNA) の効果も検討した。

【結果】

1)Castration により血中 T 濃度は測定感度以下になった。ラット心において、Castration 単独では HT による HSP72 発現誘導に影響を及ぼさなかったが、Castration したラットに T を補充すると HSP72 発現が抑制された。

2)HT 負荷を与えたラットでは、虚血再灌流後の心機能は、Castration 群と Sham-operated 群で、ほぼ同等に良好な回復を示したが、T 補充により虚血再灌流後の心機能回復が阻害された。

- 3)ラット左室から単離した心室筋細胞において、虚血再灌流後のアポトーシス陽性細胞は Castration 群と Sham-operated 群で同等であったが、Castration+T 補充群で有意に増加した。
- 4)ラット仔培養心筋細胞及び成獣（本研究では 10 週齢）ラットの培養心室筋細胞においても、T を培養液に添加することにより、低酸素再酸素化後のアポトーシス陽性細胞が有意に増加した。
- 5)ラット仔培養心筋細胞において、HT により誘導された HSP72 発現は T により阻害された。低酸素再酸素化において、HT はアポトーシスを軽減したが、その効果は T により阻害された。
- 6)Flutamide は T による HSP72 発現抑制効果を阻害した。
- 7)HSF-1 活性は HT により著明に増加したが T 投与により減弱した。しかし Flutamide を前投与しておく、T による HSF-1 活性の抑制効果は認められなかった。
- 8)ラット仔培養心筋細胞において、HSP72 siRNA は、HT によりもたらされる低酸素再酸素化に対する細胞保護効果を抑制した。

【考察、結語】

この研究で、HT により誘導された心臓 HSP72 発現が T により抑制されることを、生体心及び培養心筋細胞において証明した。T の効果は、*in vivo* では虚血再灌流後の逸脱 CK 値、アポトーシス、心機能で評価し、*in vitro* では低酸素再酸素化によるアポトーシスや逸脱 LDH 値にて評価した。

T を用いた実験では、急性効果と慢性効果が異なる可能性があり結果の解釈に注意が必要である。T の作用には、受容体を介する *genomic pathway* と受容体を介さない *nongenomic pathway* が存在する。*Nongenomic pathway* を介する効果は、通常 *genomic mechanism* よりも早く現れ(数秒から数分)、アンドロゲン受容体拮抗薬で阻害されないという特徴を有する。これら二つの効果は、逆に作用する場合があるため、T の効果が受容体を介するか否かを見極めることは重要である。

今回の *in vitro* の実験では、培養液に T を投与後 30 分で HT を与えた。T による HSP72 発現抑制効果も HSF-1 活性の抑制効果も Flutamide により阻害された。本研究で認められた T による HSF-1 活性抑制の機序は不明である。T は投与後、心筋の細胞質内に移行し、核のアンドロゲン受容体に結合し HSF-1 を活性化させたのかもしれない。T が直接 HSF-1 の 3 量体化やリン酸化を抑制した可能性もある。他の間接的な機序によって HSF-1 活性を阻害した可能性も否定できない。急性の *nongenomic* 効果を完全に除外できたとはいえないが、今回の結果から、T が少なくとも部分的にアンドロゲン受容体を介して、転写レベルを調節することによって HSP72 発現抑制に働くことが示唆された。