

更年期動物モデルにおける亜硝酸薬及びPDE-5阻害薬誘発ホットフラッシュ発現の 性差に関する研究

勢島 仁美

福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

Gender differences in tail-skin flushing induced by nitrates and phosphodiesterase type 5 inhibitors in a climacteric mouse model

Hitomi Sejima

Department of Pharmaceutical Care and Health Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

Flushing is one of the most common vasodilation-related adverse effects associated with both nitrates and phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitors. The present study aimed at investigating the effects of orchidectomy and ovariectomy on isosorbide dinitrate-, sildenafil-, vardenafil-, and tadalafil-induced flushing of tail-skin in mice. Either orchidectomy or ovariectomy markedly increased the tail-skin temperature, a good parameter of flushing, induced by isosorbide dinitrate (0.5 µg/kg, i.p.). These observations suggest that either testosterone withdrawal or estrogen withdrawal is included in the risk factors for isosorbide dinitrate-induced flushing. In contrast, sildenafil (100 mg/kg, p.o.), vardenafil (10 mg/kg, p.o.), and tadalafil (40 mg/kg, p.o.)-induced flushing of tail-skin in mice was aggravated with ovariectomy but not orchidectomy. Correspondingly, the expression of *PDE-5* mRNA in tail artery of orchidectomized male mice significantly decreased compared with those in tail artery of sham-operated mice, but this deterioration was not observed in tail artery of ovariectomized female mice. The present findings suggest that estrogen withdrawal, but not testosterone withdrawal, is included in the risk factors for PDE-5 inhibitors-induced flushing and that the down-regulation of *PDE-5* mRNA expression in tail artery resulting from testosterone deficiency, but not estrogen deficiency, may contribute to the potential mechanism for the gender differences in occurrence of PDE-5 inhibitors-induced flushing in climacteric age.

Keywords: Climacteric Age; Gender Difference; Hot Flush; Nitrate; Phosphodiesterase type 5 inhibitor

【緒言】

ヒトは加齢に伴う内分泌環境の変化による健康低下として更年期を受容する。女性は、閉経後の血漿中エストロゲン濃度の急激な低下により、生殖機能のみならず身体機能全般に種々の変化がもたらされ、更年期を境に高脂血症、うつ病、糖尿病、骨粗鬆症などの疾病罹患率が高まる。一方、男性は女性ほど劇的な変化は認められないものの、加齢とともに血漿中テストステロン濃度が緩やかに減少し、勃起障害 (erectile dysfunction:ED) に代表される性機能障害や、精神的ストレス状態を背景とした不定愁訴が出現する。

ヒトの生理機能やその加齢変化には性差があり、痛風、心筋梗塞、肺がん、COPD、自己免疫疾患、骨粗鬆症、関節リウマチ、うつ病、アルツハイマー病などの疾患罹患率に性差が存在することが明らかとなっている。また、経口糖尿病薬、高血圧薬、抗不整脈薬などの薬剤の臨床効果や有害作用発現にも性差があることが報告されており、種々の疾患治療において、性差を考慮した医療（Gender-Specific-Medicine）の実践が望まれている。

薬物有害作用発現頻度に性差が認められる薬剤

薬物名	有害作用	発現頻度
アセトアミノフェン	肝障害	女性>男性
NSAIDs	胃腸障害	女性>男性
塩酸ピオグリタゾン	浮腫	女性>男性
ACE阻害薬	空咳	女性>男性
キニジン	QT延長	女性>男性
ソタロール	QT延長	女性>男性
エリスロマイシン	QT延長	女性>男性

当研究室では、「更年期」を薬物有害作用発現の危険因子の一つとして捉え、有害作用の早期発見・予測・軽減・回避対策の構築を目的とした一連の研究を展開してきた。その中で、Ca拮抗薬ニフェジピンの有害作用である hot flush は、更年期女性で増悪することを動物モデルで実証した。

ニフェジピンと同様に有害作用として hot flush の発現頻度が高い薬物として、亜硝酸薬やホスホジエステラーゼ-5型（PDE-5）阻害薬が知られている。亜硝酸薬は、静脈血管、冠血管及び末梢動脈において、一酸化窒素（NO）供与体として可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）を活性化し、cGMPを上昇させて血管の弛緩を起こし、狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患の治療薬として繁用されている。また、PDE-5阻害薬は、陰茎海綿体のPDE-5を選択的に阻害し、NO刺激により産生されたcGMPの分解を抑制し血管の弛緩を起こし、主に男性のED治療薬として使用されているが、近年では肺高血圧症や女性の sexual dysfunction 及び子宮内膜発育不全に対しても使用されている。両薬物ともに更年期の男性及び女性に対して使用頻度が高く、その血管拡張作用に伴う hot flush、頭痛、動悸などの有害作用の発現頻度が高い薬物である。

【目的】

本研究では亜硝酸薬及びPDE-5阻害薬誘発 hot flush 発現の性差について、精巣摘出マウス及び卵巣摘出マウスを用いて検討し、その性差形成機構を解明することを目的とした。本研究は、薬物応答性の変動を「加齢（更年期）」と「性差」の両面から捉え、更年期薬物療法において性差を考慮した治療計画を立案する上での基盤となるエビデンスの構築を目指すものである。

【方法】

実験動物ならびに飼育方法

実験動物は7週齢のICR系雄性マウス、雌性マウス（九動株式会社、熊本）を用いた。マウス飼育環境は室温21～25℃、湿度50～70%、照明時間は7:00～19:00に設定した。飼育はプラスチック製ケージ（横28cm×奥行き34cm×高さ18cm）を用い、飼育室内で1～2週間予備飼育後、実験に用いた。水道水、固形飼料（CRF-1:日本クレア株式会社）は自由摂取とした。固体の識別は尾へのフェルトマーカーによ

る動物番号の記載によりおこなう。また、ケージはラベル法にて識別した。

使用薬物

硝酸イソソルビド (ALEXIS[®], BIOCHEMICALS, USA) は、投与量が体重 10g あたり 0.1 mL となるように生理食塩水に溶解し、vehicle には生理食塩水を用いた。また、シルデナフィルクエン酸塩 (バイアグラ[®], ファイザー株式会社, 東京), 塩酸バルデナフィル水和物 (レビトラ[®], バイエル薬品株式会社, 大阪), タダラフィル (シアリス[®], 日本イーライリリー株式会社, 神戸) は、それぞれ投与量が体重 10g あたり 0.05 mL となるように 2% Tween 80 (和光純薬工業株式会社, 大阪) に懸濁溶解し、vehicle には蒸留水を用いた。

精巣摘出術

マウスをペントバルビタール (ネンブタール注射液[®], 大日本住友製薬株式会社, 大阪) 麻酔下 (50 mg/kg, intraperitoneal; i. p.) にて、両側精巣を摘出し (ORX 群), 術後 14 日から実験に供した。また、マウス腹部を切開し、精巣を摘出しない偽手術マウスを対象群 (Sham 群) とした。

卵巣摘出術

マウスをペントバルビタール (ネンブタール注射液[®], 大日本住友製薬株式会社, 大阪) 麻酔下 (50 mg/kg, intraperitoneal; i. p.) にて、両側卵巣を摘出し (OVX 群), 術後 28 日から実験に供した。また、マウス腹部を切開し、卵巣を摘出しない偽手術マウスを対象群 (Sham 群) とした。

尾部表面温度 (TST) の測定

マウスを無麻酔下でマウスホルダー (室町機械株式会社, 東京) に固定し、尾根部より 1 cm の尾部表面温度 (TST) をサーモトレーサー (TH5100, NEC 三栄株式会社, 東京) を用いて測定した。得られた熱画像はリモートプログラム (TH51-723) 及び熱画像処理プログラム (TH51-701) を用いて処理し、1 分間毎に画像を解析した。マウスは、測定環境に慣らすため、マウスホルダーに固定後 10 分間放置した後、マウスをホルダーから取り出し、実験に用いた。

硝酸イソソルビド誘発 hot flush の検討では、まず、vehicle (生理食塩水) を腹腔内投与し TST を 30 分間測定した。測定終了後、直ちに同一マウスに同薬物を腹腔内投与し、TST を 30 分間測定した。

一方、クエン酸シルデナフィル、塩酸バルデナフィル水和物及びタダラフィル誘発 hot flush の検討では、まず、vehicle (蒸留水) を経口投与し TST を 60 分間測定した。測定終了後、直ちに同一マウスに同薬物を経口投与し、TST を 60 分間測定した。

尾動脈 PDE-5 遺伝子発現量の測定

実験動物の尾動脈を摘出し、Torizol 試薬を用いて全 RNA を抽出した後、Real Time Quantitative PCR 法 (Mx 3000P Multiplex Quantitative PCR system) を用いて、PDE-5 遺伝子発現量を測定した。なお、PDE-5 遺伝子と β -actin (内部標準) との蛍光シグナルの比から PDE-5 mRNA 相対量を算出した。

統計処理

データは平均 \pm 標準誤差で示した。2 群間の比較は unpaired Student's t-test を用い、危険率が 5% 未満 ($P < 0.05$) の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

1) 硝酸イソソルビド誘発 hot flush に対する精巣摘出及び卵巣摘出の影響

精巣摘出の影響

硝酸イソソルビド250 µg/kg投与では, Sham群とORX群との間で Δ TSTに有意な変化は認められなかったが, 500及び1,000 µg/kg投与では, Sham群と比較してORX群では Δ TSTが顕著に上昇した (Fig. 1A)。

卵巣摘出の影響

硝酸イソソルビド250 µg/kg投与では, Sham群とOVX群との間で Δ TSTに有意な変化は認められなかったが, 500及び1,000 µg/kg投与では, Sham群と比較してOVX群では Δ TSTが顕著に上昇した (Fig. 1B)。

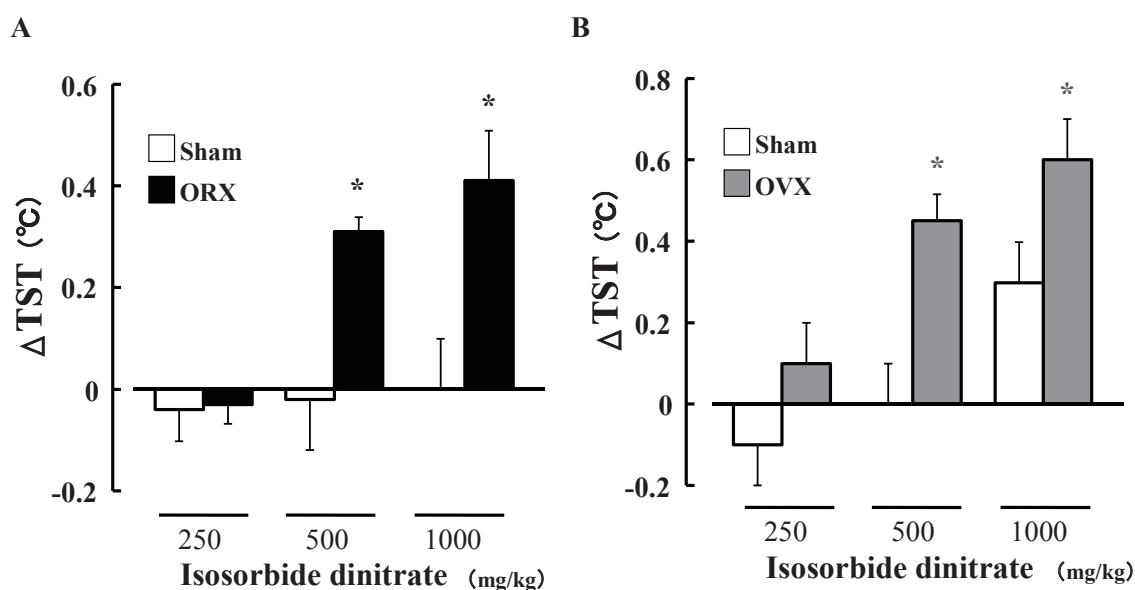


Fig.1 Effects of isosorbide dinitrate on the tail skin temperature (TST) of sham-operated (Sham), orchidectomized (ORX) and ovariectomized (OVX) mice.

* $p < 0.05$ vs corresponding Sham mice.

2) PDE-5阻害薬誘発 hot flush に対する精巣摘出及び卵巣摘出の影響

精巣摘出の影響

シルденаフィル50及び100mg/kg投与では, Sham群とOVX群との間で Δ TSTに有意な変化は認められなかった (Fig. 2A)。同様に, バルденаフィル5及び10 mg/kg投与, タダラフィル20及び40 mg/kg投与では, Sham群とORX群との間で Δ TSTに有意な変化は認められなかった (Fig. 3A, Fig. 4A)。

卵巣摘出の影響

シルденаフィル50 mg/kg投与では, Sham群とOVX群との間で Δ TSTに有意な変化は認められなかったが, 100 mg/kg投与ではSham群と比較してOVX群では Δ TSTが顕著に上昇した (Fig. 2B)。

バルденаフィル5 mg/kg投与では, Sham群とORX群との間で Δ TSTに有意な変化は認められなかったが, 10 mg/kg投与ではSham群と比較してOVX群では Δ TSTが顕著に上昇した (Fig. 3B)。

タダラフィル20 mg/kg投与では, Sham群とORX群との間で Δ TSTに有意な変化は認められなかった

が、40 mg/kg投与ではSham群と比較してOVX群では Δ TSTが顕著に上昇した (Fig.4B)。

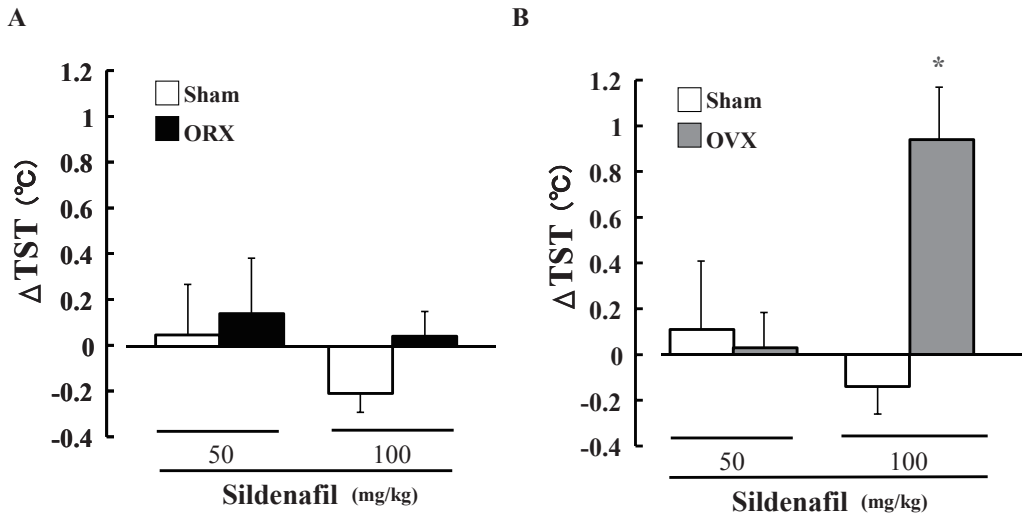


Fig.2 Effects of sildenafil on the tail skin temperature (TST) of Sham-operated (Sham), orchidectomized (ORX) and ovariectomized (OVX) mice.

* $p < 0.05$ vs corresponding Sham mice.

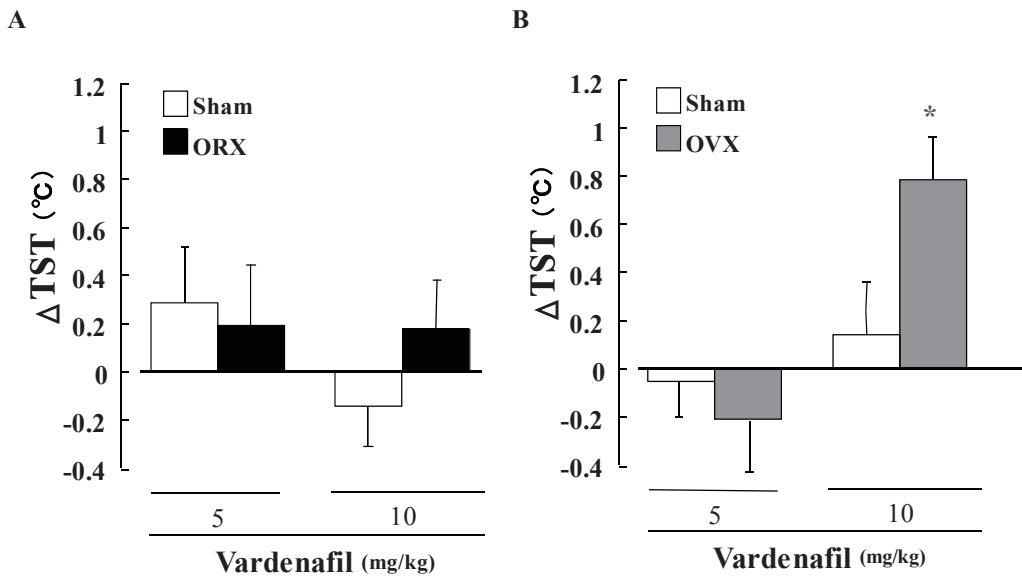


Fig.3 Effects of vardenafil on the tail skin temperature (TST) of Sham-operated (Sham), orchidectomized (ORX) and ovariectomized (OVX) mice.

* $p < 0.05$ vs corresponding Sham mice.

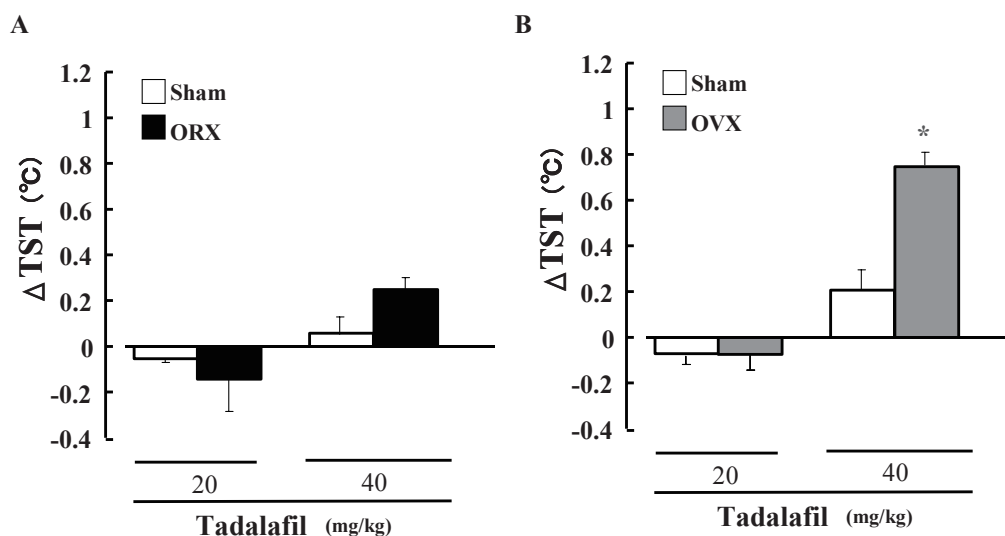


Fig.4 Effects of tadalafil on the tail skin temperature (TST) of Sham-operated (Sham), orchidectomized (ORX) and ovariectomized (OVX) mice.
* $p < 0.05$ vs corresponding Sham mice.

3) 尾動脈PDE-5遺伝子発現量に対する精巣摘出及び卵巣摘出の影響

ORX群ではSham群と比較してPDE-5遺伝子発現量が有意に低下していた (Fig.5A)。一方、OVX群ではSham群と比較してPDE-5遺伝子発現量に差は認められなかった (Fig.5B)。

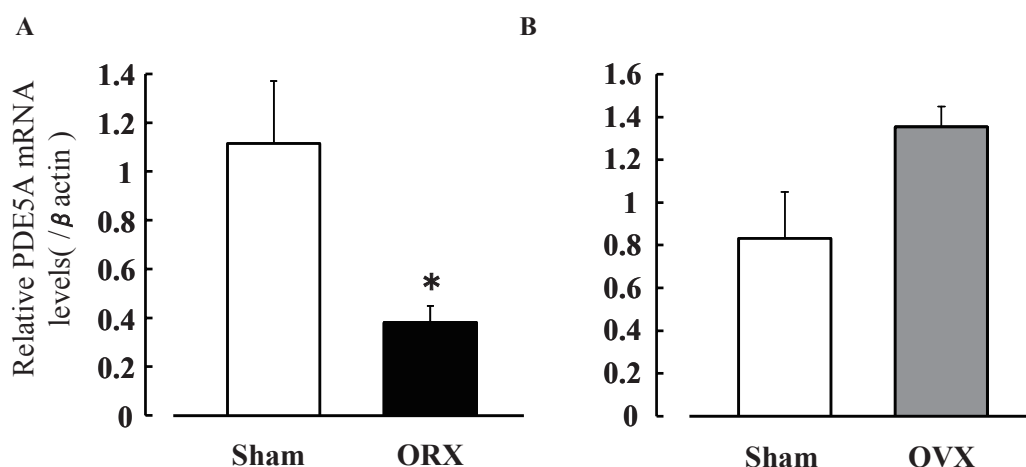


Fig.5 Relative PDE-5 mRNA levels in tail artery tissues of sham-operated (Sham), orchidectomized (ORX) and ovariectomized (OVX) mice. Values are expressed as the relative ratio to β -actin. * $p < 0.05$ vs corresponding Sham mice.

【考察】

本研究では、薬物誘発hot flushに対する精巣摘出及び卵巣摘出の影響について検討を行い、更年期における薬物有害作用の性差について探索した。その結果、亜硝酸薬誘発hot flushは女性・男性ともに更年期で易発性となる可能性が示唆された。エストロゲンは血管内皮型NO合成酵素 (eNOS) に作用しNOの産生を増加させ、エストロゲン欠乏は血管のeNOS発現を低下させる。また、エストロゲンは血管平

滑筋に直接作用して血管を拡張させる。一方、テストステロンは血管平滑筋に直接作用して血管を弛緩させる。また、テストステロンは血管内皮細胞由来のNO合成の調節を介して、内皮細胞依存性の弛緩反応を促進する。このように、テストステロンもエストロゲンと同様に、血管平滑筋への直接作用や内皮細胞由来のNOを介した作用によって末梢微細循環調節に重要な役割を担っている。今回の実験で得られたOVX群、ORX群における亜硝酸薬誘発hot flush発現は、エストロゲン又はテストステロン欠乏による血管弛緩反応の自己調節機能異常に起因するものと推察される。すなわち、更年期においてはエストロゲン又はテストステロン欠乏によって内因性のNO産生量が低下し、血管弛緩反応の自己調節機能が破綻した状態下にある。ここに外因性NO刺激が加わると血管弛緩反応がより増幅して血流増加が易発性となり、hot flushを発現するものと考えられる。

一方、PDE-5阻害薬（シルденаフィル、バルデナフィル、タダラフィル）誘発hot flushは女性更年期でのみ易発性となる可能性が示唆された。尾動脈切片を用いた検討結果から、ORX群ではSham群に比べPDE-5遺伝子発現量が有意に低下していた。近年、精巣摘出ラットでは海綿体におけるPDE-5遺伝子発現量が低下し、これはテストステロン補充により回復することが報告されている。また、臨床試験において、テストステロンが低下した患者ではシルденаフィルに対する反応性が低下することが報告されている。これらの動物実験成績と臨床試験成績を併せて考えると、ORX群でhot flushが誘発されなかった機構として、テストステロン欠乏によるPDE-5遺伝子発現量の低下が関与する可能性が示唆された。

【総括】

更年期における薬物誘発hot flushに対する精巣摘出と卵巣摘出の影響を検討した結果、その影響は誘発薬物によって差異があり、PDE5阻害薬誘発hot flush発現には性差があることが明らかとなった。

本研究は、薬物応答性の変動を「加齢（更年期）」と「性差」の両面から捉え、薬物療法において性差を考慮した治療計画（Gender-Specific Pharmacotherapy）を立案する上での基盤となるエビデンスを提供するものである。

【公表論文】

Sejima H, Tominaga K, Egawa T, Ikeda M, Shibuya K, Kameyama N, Yamauchi A, Shuto H, Kataoka Y. Gender differences in tail-skin flushing induced by nitrates and phosphodiesterase type 5 inhibitors in a climacteric mouse model. *Eur J Pharmacol* 624(1-3):66-70 (2009).

【謝辞】

本研究に際し、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室 片岡泰文教授に心より深甚なる謝意を表します。

本論文を査読していただき、貴重な御意見と御校閲を賜りました福岡大学薬学部臨床心身治療学教室 美根和典教授、福岡大学薬学部実務薬剤学教室 二神幸次郎教授に謹んで感謝致します。

本研究において終始適切な御指導、御助力、御校閲を賜りました福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室 首藤英樹准教授に心より深く感謝致します。

本研究において多大なる御協力と御助言を賜りました福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室 山内淳史准教授、道具伸也准教授、富永宏治准教授、今給黎修准教授、小田真稔講師、西奥剛助教、古賀允久助教、辻（高田）美友子助教、松本純一助教、渡辺拓也助教、長郷あかね助教、町田崇助手に謹んで感謝の意を表します。

最後に本研究に尊い命を提供して頂きました動物達の命に深く感謝致します。