

慢性閉塞性肺疾患の肺気腫形成過程に対するテストステロンの作用

青野 健太郎

福岡大学薬学部生物薬剤学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

The effect of testosterone on the development of pulmonary emphysema in chronic obstructive pulmonary disease

Kentaro Aono

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

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a type of inflammatory lung disease that is characterized by progressively worsening airflow obstruction due to chronic bronchitis and emphysema. COPD is typically caused by smoking and recent clinical studies have shown that men may be less sensitive to the effects of cigarette smoke than women. Additionally, COPD is most likely to occur after the age of 40, when sex hormone levels decrease. These studies suggest that male hormones may have a protective effect on the development of COPD. In order to investigate this, we created an experimental model of testosterone-deficient COPD in mice by performing orchiectomy and administering porcine pancreatic elastase (PPE). Our aim was to understand the role of testosterone in the pathogenesis of COPD using this mouse model.

Administering PPE (2 units) to orchiectomized (ORX) mice resulted in a decreased survival rate and delayed weight recovery following treatment. Microarray analysis of lung tissue indicated that ORX/PPE mice had an increased protease/antiprotease imbalance compared to sham/PPE mice. Furthermore, administering 0.5 units of PPE increased emphysema formation in ORX mice compared to sham mice, and significantly increased the number of total T cells, CD4-positive T cells, and CD8-positive T cells in ORX mice as measured by inflammatory cell counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) using flow cytometry. These changes were suppressed by testosterone supplementation in ORX mice. The weight and cortical area of the thymus were significantly increased in ORX mice. In addition, gene expression analysis using RT-PCR revealed that Aire expression was decreased in the thymus of ORX mice. T cell depletion induced by CD3 antibody administration suppressed PPE-induced emphysema formation in ORX mice.

In conclusion, our findings suggest that testosterone may inhibit the progression of COPD through T cell-mediated immune tolerance mechanisms.

keywords : Chronic obstructive pulmonary disease, testosterone, emphysema, inflammation, T cells

【緒言/目的】

慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD) は、タバコ煙を主とする有害性物質を長期に吸入することで生じる炎症性の肺疾患であり、進行性の気流制限を基盤病態とする [1]。COPD

における気流閉塞の主な原因は、末梢気道炎症に伴う気道狭窄（末梢気道病変）および肺胞の不可逆的な破壊（気腫性病変）である [2]。WHO が2019年に実施した調査によれば、COPDは全世界における死因の第3位であった。また、各国における40歳以上のCOPD有病率は10%前後であり、本邦においても40歳以上のCOPD有病率は8.6%、潜在患者数は530万以上と推測されている [3, 4]。

COPD患者の約90%に喫煙歴があると言われ、喫煙がCOPD発症の最大の危険因子であることは明らかである [5]。しかし、COPD病態の発症や進展機構は非常に異質的であり、年齢・性別など患者の内因的要素が病態形成に大きな影響を及ぼす [6]。実際、COPD発症に関わるタバコ煙への感受性には明確な性差が存在し、女性は男性と比べて少ないタバコの喫煙数でCOPDを発症する [7]。また、COPDの重症化は喫煙者の15～20%程度に限られることから、タバコ煙での感受性の違いやCOPDの発症・進展を加速または遅延させる生体内制御機構が存在する可能性が高い [8]。

近年の臨床研究やメタ解析は、COPD患者における血清テストステロン値が健常者と比較して低値であることを明らかとした [9]。COPDの重症度評価には、呼吸機能の指標である1秒量 (FEV₁) ならびに努力肺活量 (FVC) が用いられ、FEV₁やFVCの呼吸機能の指標と血清テストステロン値は相関することや中高年のCOPD患者に対するテストステロン補充がCOPDの急性増悪に伴う入院加療率を減少させることも報告された [10, 11]。これらの報告は、テストステロンがCOPDの発症・進展機構において抑制的な作用を示し、加齢に伴うテストステロン量の低下がCOPD病態の発症・進展の一因となる可能性を示唆する。しかし、テストステロンのCOPDにおける役割やその詳細な作用機序は未だに明らかとされていない。

本研究では、豚膵エラスターゼ (Porcine Pancreatic Elastase: PPE) 誘発肺気腫形成におけるテストステロンの保護的な役割を評価し、COPD病態形成におけるテストステロン低下の関与を明らかにする。

【実験方法】

1. 精巣摘出マウス (ORXマウス) の作成

Sejimaらの方法を参照し、ORXによるテストステロン欠乏モデルマウスを作製した [12]。8週齢のマウスを三種混合麻酔で麻酔し、表皮および腹膜を切開して5mmの穴を開けた。切開部から精巣を引き出し、止血鉗子で精巣を固定し、精巣を切除した。4号縫合糸ならびに針で腹膜および表皮を縫合し、イソジンで縫合部を消毒した。精巣摘出を除く上記の処置を行ったマウスをshamマウスとした。

2. 肺気腫モデルマウスの作成

イソフルラン麻酔下で10週齢のマウスを体位が45～65度の仰臥位になるように固定台に保持した後、MicroSprayerを気管支に挿入して、任意のUnit (0.25, 0.5, 2 Unit) のElastaseもしくはPBSを25 μ l投与した。気管支内投与に使用するPBSは滅菌ろ過したものを使用した。

3. 組織学的解析

モデルマウスより作成した組織切片をHE染色により染色した。肺組織の顕微鏡画像を撮影し、画像の横幅の長さから組織画像の平均肺胞径 (Mean Liner Intercept: MLI) を算出した。胸腺組織においても同様に顕微鏡画像を撮影し、胸腺総面積および皮質・髄質面積の測定を実施した。

4. マイクロアレイ解析

セルイノベーター株式会社 (福岡, 日本) に委託し、SurePrint G3 Mouse Gene Expression Microarray

8x60K v2マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。サンプルは各実験群からそれぞれ5匹分の肺組織サンプルを抽出し、1つのプールサンプルとした。

5. RT-PCR解析

回収した組織サンプルからセパゾールを用いてRNA抽出を行った。抽出したRNAをVILO cDNA Synthesis Kitを用いて逆転写し、Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mixを用いてRT-PCRを行った。

6. 蛍光活性化細胞選別解析 (FACS解析)

抗体処理した肺胞洗浄液 (Bronchial Alveolar Lavage Fluid: BALF) をFACS Verseを用いて分析した。次に、分析されたデータをFlow Jo Softwareを用いて解析した。解析したデータから白血球数、好中球数、マクロファージ数、T細胞数、CD4陽性T細胞数、CD8陽性T細胞数について定量解析を行った。

7. テストステロン補充マウスの作成

Sonらの方法を参照し、テストステロン補充マウスを作製した [13]。ORXマウスにゴマ油に溶解したテストステロンプロピオン酸 (Testosterone Propionate: TP) を10 mg/kgの濃度で週2回皮下投与した。ゴマ油のみを投与したマウスをVehicle群とした。

8. T細胞欠損マウスの作成

Annaらの方法を参照し、後天的なT細胞欠損モデルマウスを作成した [14]。マウスに生理食塩水に溶解したCD3抗体10 μ gを3日間、連続で腹腔内投与した。その後、3日空けて再度同様に調製したCD3抗体を腹腔内投与した。対照群にはCD3抗体のIsotype (Control IgG) 10 μ gを同様に調製して投与した。

9. 統計解析

解析結果は平均値 \pm 標準誤差で示しており、2群間の比較はStudent's T検定、4群間の比較はOne-way ANOVA Tukey検定により行った。生存率の比較解析はLog-Rank検定を実施した。有意差の判定は両側検定により、P値が0.05未満となるとき有意差を認めるものと定めた。

【結果/考察】

1. ORX処置およびPPE誘発肺気腫モデルマウスにおける生存率と肺の形態学的評価

テストステロン欠乏がPPE誘発肺気腫形成に与える影響を評価するためにマウスにORX術を施し、2週間後にPPE 2 Unitの気管支内投与を実施した。PPE投与から3週間の生存率を評価した後、肺の形態学的評価およびマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行った。

PPE気管支内投与から3週間の各モデルマウスにおいて、ORX/PPE群以外のマウスの生存率はいずれも100%であった。一方で、ORX/PPE群の生存率は53.8%となり、ORX/PPE群の生存率は他の3群と比較して有意に低下した (Fig. 1A)。PPE投与3週間後において、生存したマウスの肺胞径の拡大についてHE染色とMLIの定量を用いて評価を行ったが、sham/PPE群とORX/PPE群のMLIの拡大に有意な差は認められなかった (Fig. 1B)

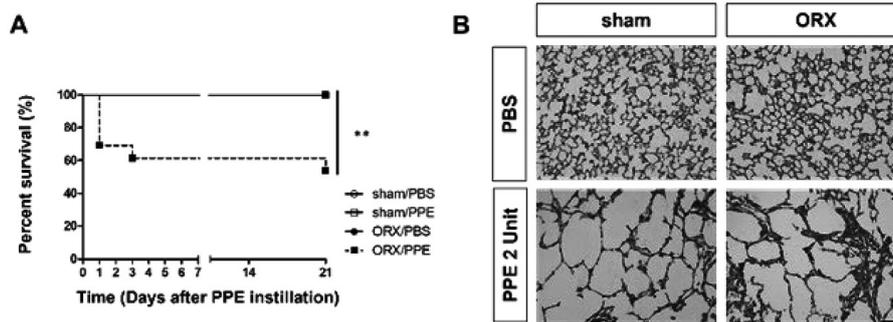


Fig. 1 Effect of orchiectomy (ORX) on survival rate and lung morphology in PPE inhaled mice. (A) Survival plots of sham-surgery and ORX mice after intratracheal instillation of PPE. sham and ORX mice were treated with PBS or PPE (2 U). $n \geq 6$ mice were used in each group. $**p < 0.01$ by log-rank test comparing the ORX/PPE group to other groups. (B) Representative photomicrographs of hematoxylin and eosin stained lung sections obtained from the indicated mice at 21 d post intratracheal instillation of PBS or PPE (2 U). Scale bar = 100 μm .

2. マイクロアレイ解析

肺のマイクロアレイ解析の結果、ORX/PPE群でsham/PPE群と比較して有意に減少する発現変動遺伝子 (DEGs) としてプロテアーゼインヒビター活性が検出され、個別の遺伝子として Ahsg, Stfa2, Serpina3m の発現量の減少を RT-PCR を用いて確認した (Fig. 2)。

形態学的評価において ORX/PPE 群と sham/PPE 群間で MLI に差は認められなかったが、ORX マウスにおいて PPE 投与後の高い死亡率や肺気腫形成に関与するプロテアーゼインヒビター関連遺伝子の発現に変化があることが明らかとなった。

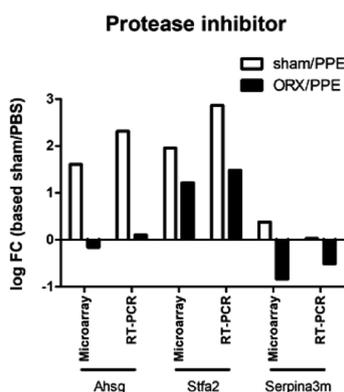


Fig. 2 Validation of microarray data by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). Microarray data of three selected genes were validated by RT-qPCR. Microarray gene expression data (white bars) of selected genes (Serpina3m, Stfa2, and Ahsg) were compared to results obtained from RT-qPCR (black bars). Y-axis is the log-transformed means of fold changes.

3. 低用量PPE投与におけるORXマウス肺の形態学的変化および炎症評価

PPE投与量をORXマウスが死亡しない用量(0.25, 0.5 Unit/匹)に変更し, テストステロン低下が肺気腫形成に及ぼす影響について評価を行った。また, PPE 0.5 Unit投与2日後において, 肺への炎症細胞の浸潤についてもFACS法を用いて解析を行った。

低UnitでのPPE投与ではORX群でのみ顕著な肺気腫の拡大が観察できた(Fig. 3A)。PPE 0.5 unit投与時においては, sham群と比較してORX群でMLIが有意に増加した(Fig. 3B)。PPE投与2日後, BALF中のT細胞数もORX群でsham群と比較して有意に増加した(Fig. 3C)。これらの結果から, ORX処置はPPE誘発の肺炎症および肺気腫形成を増加させることが明らかとなった。

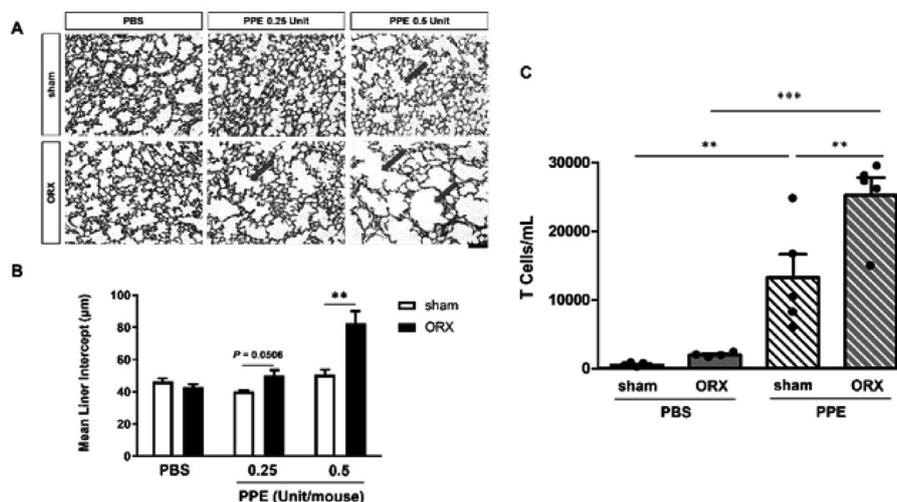


Fig. 3 Effect of ORX on lung morphology and inflammatory T cells in low dose of PPE inhaled mice. (A) Representative photomicrographs of HE stained lung sections obtained from the indicated mice at 21 d post intratracheal instillation of PBS or PPE (0.25, 0.5 U). Arrows indicate the enlarged alveoli area. Scale bar = 100 μm. (B) Mean linear intercept (MLI) of alveolar space for each group of mice. $n \geq 4$ mice were used in each group. $**p < 0.01$ by unpaired t test comparing ORX/PPE 0.5 U group to sham/PPE 0.5 U group. (C) Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice administered PBS or PPE (0.5 U) for 2 d was used to specific the T cell counts by flow cytometry analysis. $n \geq 4$ mice were used in each group. Each bar represents the mean \pm S.E.M. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ by One-way ANOVA test.

4. テストステロン補充および肺気腫モデルマウスにおける肺の形態および炎症評価

肺気腫の増悪と免疫細胞の誘導がテストステロンの欠乏によるものであることを確認するために, ORXマウスにテストステロンプロピオン酸 (TP) を皮下投与し, PPE 0.5 Unitで肺気腫を誘発させ, MLI測定およびBALF中の炎症細胞数の測定を行った。

TP群ではvehicle群と比較して, 肺気腫形成の減少が観察され, 画像解析による平均肺胞径の定量において, TP群のMLIはvehicle群と比較して有意に減少した(Fig. 4A, 4B)。BALF中のT細胞数とそのサブタイプが有意に減少した(Fig. 4C)。ORXマウスにおけるPPE誘発肺気腫形成の増大にテストステロンが関与することが示された。

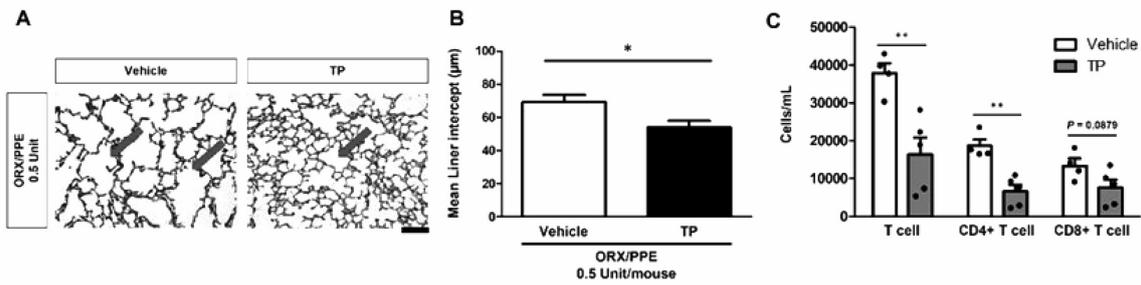


Fig. 4 Effect of testosterone administration on lung morphology and inflammatory T cells in ORX/PPE mice. (A) Representative photomicrographs of HE stained lung sections obtained from the indicated mice after 21 d intratracheal instillation of PPE (0.5 U). Arrows indicate enlarged alveoli area. Scale bar = 100 μ m. (B) Quantification of MLI for each group of mice. $n = 5$ mice were used in each group. Each bar represents the mean + S.E.M. * $p < 0.05$ by unpaired t test. (C) BALF of mice administrated PPE (0.5 U) for 2 d was used to specific the T cell, CD4+ T cell, CD8+ T cell counts by flow cytometry analysis. $n \geq 4$ mice were used in each group. Each bar represents the mean + S.E.M. ** $p < 0.01$ by unpaired t test.

5. ORX処置による胸腺組織の変化

T細胞は一次リンパ器官である胸腺で増殖および成熟を行い、血中へと放出される。この胸腺機能の制御にはステロイドホルモンならびに性ホルモンが関与しており、中枢免疫機構には大きな性差が存在している。そこで、ORXに伴うPPE誘発肺気腫形成の増悪に対する胸腺やT細胞の変化と関連について検討を行った。

ORXマウスの胸腺は肥大化し、shamマウスと比較し胸腺重量と皮質面積が有意に増大した (Fig. 5A-5C)。RT-PCRによる遺伝子発現解析の結果、ORXマウスの胸腺組織におけるAire遺伝子の発現はsham群と比較して有意に減少していた (Fig. 5D)。

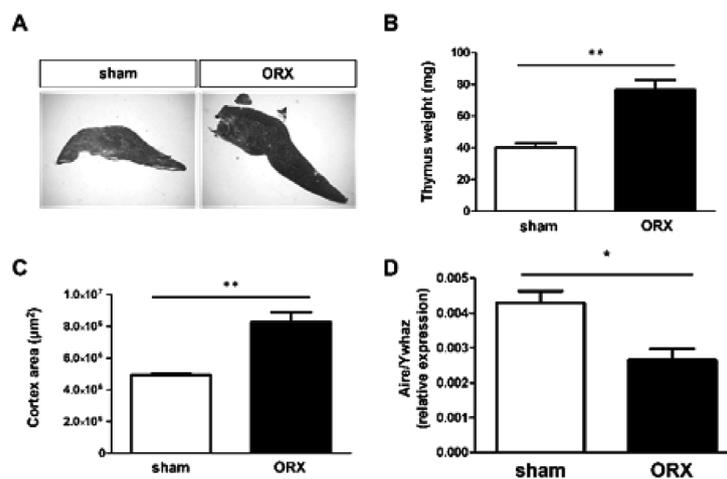


Fig. 5 Effect of ORX on Thymus morphology and gene expression. (A) Representative photomicrographs of HE stained Thymus sections obtained from the indicated mice 14 d after ORX surgery. (B-D) Quantification of Thymus weight, cortex area and gene expression of Aire in each group of mice. $n = 3$ mice were used in each group. Each bar represents the mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by unpaired t test.

6. T細胞除去および肺気腫モデルマウスにおける肺の形態学的評価

ORXマウスにおけるPPE誘発気腫性病変の拡大へのT細胞の関与を明らかにするため、CD3抗体の投与によるT細胞の除去を行い、ORXマウスにPPEによる肺気腫を誘導した。

ORX/PPE/Isotype群のMLIは、sham/PPE/Isotype群と比較し有意に増加した。さらに、ORX/PPE/Isotype群で有意に増加したMLIの増加はCD3抗体を投与したことで有意に抑制された (Fig. 6A, 6B)。ORXマウスにおけるPPE誘発の肺気腫の拡大および急性期の肺へのT細胞の浸潤増加が明らかとなっている。ゆえに、ORX処置による肺へのT細胞の浸潤増加がテストステロン低下時の肺気腫形成の増大に繋がる可能性が示唆された。

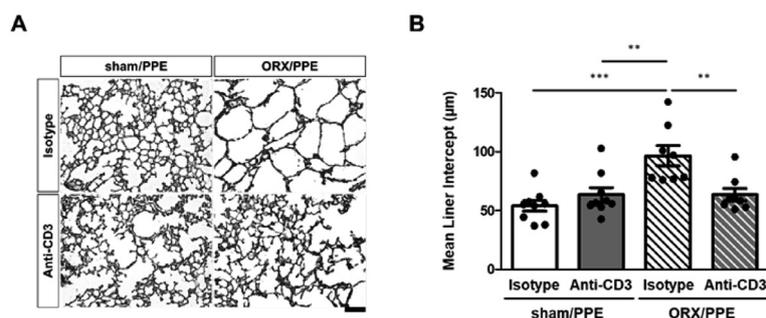


Fig. 6 Administration of CD3 antibody reduced the effects of ORX. (A) Representative photomicrographs of HE stained lung sections obtained from the indicated mice after 21 d intratracheal instillation of PPE (0.5 U). Scale bar = 100 μm . (B) Quantification of MLI for each group of mice. $n \geq 8$ mice were used in each group. Each bar represents the mean \pm S.E.M. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by One-way ANOVA test.

【結論】

本研究では、テストステロンの欠乏がT細胞の肺浸潤増加を介してPPE誘発肺気腫形成を増大させることを明らかにした。この実験証拠は、テストステロンがT細胞を中心として免疫寛容機構を介してCOPD進展を抑制する新たな機序を提起するものである。また、COPDの新たな予防・治療法を講じる上で、COPD病態形成に対するテストステロン-T細胞免疫機構の関与を明らかにしたことは非常に意義深い。

【参考文献】

- [1]. Tudor RM, Petrache I. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*. 2012;122:2749-2755.
- [2]. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2000;343:269-280.
- [3]. World Health Organization, The top 10 causes of death, 2019. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. (accessed 2021-11-29)
- [4]. Fukuchi Y, Nishimura M, Ichinose M, et al. COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology*. 2004;9:458-465.
- [5]. Barnes PJ. Small Airways in COPD. *N Engl J Med*. 2004;350:2635-2637.
- [6]. TB Grydeland, A Dirksen, HO Coxson, et al. Quantitative computed tomography: emphysema and airway

wall thickness by sex, age and smoking. *Eur Respir J.* 2009; 34; 858-865 .

- [7]. A Lambert, B Dieter, I Barjaktarevic, et al. Women with COPD Experience Increased Symptom Burden, Frequent and Severe Exacerbation, and Impaired Functional Capacity as compared to Men in SPIROMICS. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019; 199; A5941 .
- [8]. Won-Kyung Cho, Chum Geun Lee, Lark Kyun Kim. COPD as a Disease of Immunosenescence. *Yonsei Med J.* 2019; 60(5): 407-413 .
- [9]. Mousavi SA-J, Kouchari M-R, Samdani-Fard SH, et al. Relationship between serum levels of testosterone and the severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Tanaffos.* 2012; 11 : 32–35 .
- [10]. A Slim, A Hedhli, Y Ouahchi, et al. Testosterone and chronic obstructive pulmonary disease. *Rev Mal Respir.* 2020; 37; 790-799 .
- [11]. J Baillargeon, RJ Urban, Wei Zhang, et al. Testosterone replacement therapy and hospitalization rates in men with COPD. *Chron Respir Dis.* 2019; 16; 1479972318793004 .
- [12]. Sejima H, Tominaga K, Egawa T, et al., Gender differences in tail-skin flushing induced by nitrates and phosphodiesterase type 5 inhibitors in a climacteric mouse model. *Eur J Pharmacol.* 2009; 624; 66-70 .
- [13]. [5] BK Son, Kojima T, Ogawa S, et al. Testosterone inhibits aneurysm formation and vascular inflammation in male mice. *J Endocrinol.* 2019; 241; 307-317 .
- [14]. Wilhelmson AS, Lantero Rodriguez M, Svedlund Eriksson E, et al. Testosterone Protects Against Atherosclerosis in Male Mice by Targeting Thymic Epithelial Cells-Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018; 38; 1519-1527 .