

氏名	野口 将道
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	論薬博第 698 号
学位授与の日付	平成 15 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	卵巣摘出ラットを用いた更年期 hot flash 発現におけるカルシトニン遺伝子関連ペプチドの役割に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 佐藤 公道 教授 辻本 豪三 教授 中山 和久

論文内容の要旨

Hot flash (HF) は、女性の閉経に伴う典型的な更年期障害の一つであり、上半身に発現する熱感を特徴とし、皮膚温は上昇する。多くの場合、発汗、動悸などの循環障害を伴い、突発的に繰り返し発現するので、不眠、疲労、不安を併発し、QOLを低下させる。しかし、その発現機構は未だ明らかではなく、その機序の解明と治療薬の開発が求められている。最近、更年期女性において、HF発現時に血管拡張神経ペプチドの一種であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) の血中濃度が上昇することが報告された。著者はこれに着目し、HF発現における CGRP の役割について、主に卵巣摘出 3 週間後の雌性ラット (OVXラット) を用いて検討し、以下のような興味ある新知見を得た。

第一章 ラットにおける CGRP 作用への卵巣摘出の影響

先ず、3種の代表的な血管拡張神経ペプチド (CGRP, サブスタンス P: SP, 血管作用性小腸ポリペプチド: VIP) の血管拡張作用と皮膚温上昇の相関性を調べた。前者は、偽手術ラットまたは OVXラットから摘出した腸間膜血管床灌流標本におけるプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ の血管収縮に対する弛緩作用を、後者は、ウレタン麻酔した偽手術ラットまたは OVXラットの足底部に装着した温度センサーにより計測した皮膚温を、それぞれ指標として調べた。どちらの群のラットにおいても、灌流液中に適用された3種のペプチドはいずれも濃度依存的な血管弛緩作用を示し、また、静脈内注射された3種のペプチドとも皮膚温を用量依存性に上昇させた。これらの作用間には3種のペプチドとも正の相関が認められた。さらに、偽手術ラットと OVXラット間での両作用の強さを比較したところ、SPおよびVIPに関しては有意差がなかったが、CGRPに関しては、両作用とも OVXラットの方が偽手術ラットよりも有意に強く発現した。これらの結果は、血管拡張神経ペプチドの中でも CGRP の皮膚温上昇作用が卵巣摘出、即ち卵巣ホルモン欠乏により有意に増強されることを示しており、この現象が HF 発現に深く関わっている可能性を示唆している。

第二章 ラット卵巣摘出による CGRP 誘発皮膚温上昇増強のメカニズム

前章で記述した CGRP の作用は、CGRP 受容体拮抗薬 (CGRP₈₋₃₇) の前処置で完全に抑制されたことから、この作用は CGRP 受容体を介する作用であることが確認された。そこで、偽手術ラットおよび OVXラットの摘出腸間膜血管床から動脈以外の組織を除去した標本を用いて CGRP 受容体の結合実験を行ったところ、受容体の親和性には両ラット間で差はなかったが、受容体数は OVXラットの方が偽手術ラットよりも有意に増加していた。さらに、内在性の血漿 CGRP 濃度は OVXラットの方が偽手術ラットよりも有意に低下していた。これらの結果は、血中 CGRP 濃度の低下による受容体のアップレギュレーションを示唆している。次に、CGRP 受容体数増加の要因と考えられる血中 CGRP 濃度の低下原因を明らかにするため、CGRP の脊髄後根神経節 (DRG) における産生とカプサイシン刺激による知覚神経から血中への放出について検討した。CGRP の産生に関しては、DRG での CGRP mRNA 発現量および CGRP 含有量のいずれも、偽手術ラットと OVXラット間で有意差はなかったが、CGRP の放出に関しては、OVXラットのカプサイシン刺激後の血中 CGRP 濃度の方が偽手術ラットのそれよりも有意に低かった。これらの結果は、卵巣ホルモン欠乏は CGRP 産生に有意な影響を与える

ことなく、放出能を有意に減弱させ、血中CGRP濃度の低下を招くことを示唆している。以上の成績から、著者は、卵巣摘出による卵巣ホルモン欠乏がCGRP放出能の低下に起因した血中CGRP濃度の低下を引き起こし、これが引き金になってCGRP受容体数を増加させ、CGRPに対する反応性（皮膚温上昇作用）が増強する、という仮説を提唱した。

第三章 ラット卵巣摘出によるCGRP誘発皮膚温上昇増強に対するエストロゲンと桂枝茯苓丸の作用

前章で提唱したメカニズムを検証するためエストロゲン（E₂）補充の影響を調べ、さらに「ほてり」治療の適応を持つ漢方方剤、桂枝茯苓丸の作用を検討した。E₂の補充は、卵巣摘出により減少した血中E₂濃度を正常に戻し、OVXラットで認められた①カプサイシン誘発CGRP放出量減少、②血中CGRP濃度低下、③血管CGRP受容体数増加および④CGRPの血管拡張作用増強のいずれの変化をも回復・正常化させ、CGRP誘発皮膚温上昇作用の増強を解消した。これらの結果は、卵巣摘出後のCGRP誘発皮膚温上昇作用増強に至る一連の現象（①～④）がエストロゲン欠乏に起因していることを強く支持している。一方、桂枝茯苓丸は、OVXラットで認められる血中E₂濃度の低下に影響することなく、上述した①～④を全て回復・正常化し、CGRP誘発皮膚温上昇の増強を抑制した。これらの結果は、本方剤が血中E₂濃度に依存することなくOVXラットにおける皮膚温上昇増強を改善することを示しており、更年期HFに悩む女性患者だけでなくエストロゲン補充禁忌患者に併発するHFに対しても有効な治療薬となりうる可能性を示唆している。

以上本研究は、OVXラットを用いて、更年期HFの発現に深く関わる機構として、CGRPの役割に光を当てると共に、桂枝茯苓丸のHF治療に対する有用性を指摘した。本研究の成果は、複雑な更年期障害の発現機構の全容解明および新薬開発の重要な基礎的知見となるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

女性の閉経期に、上半身の熱感、皮膚温上昇、発汗、動悸などの循環障害などが突発的に繰り返し発現し、不眠、疲労、不安の併発によりQOLを低下させるhot flash（HF）は、典型的な更年期障害の一つであるが、発現機構は未詳であり、その解明と治療薬の開発が求められている。著者は、HF発現時にカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）の血中濃度が上昇するとの報告に注目し、閉経モデル動物として卵巣摘出3週間後の雌性ラット（OVXラット）を用いてHF発現におけるCGRPの役割について検討し、以下のような新知見を得た。

第一章 ラットにおけるCGRP作用への卵巣摘出の影響

代表的な血管拡張神経ペプチドとして知られるCGRP、サブスタンスP、血管作用性小腸ポリペプチドについて、血管拡張作用（摘出腸管膜血管床灌流標本でのプロスタグランジンF_{2α}による血管収縮に対する弛緩作用）および皮膚温に対する作用（ウレタン麻酔下、足底部に装着した温度センサーにより計測した皮膚温）を調べたところ、3種のペプチドのいずれも、偽手術ラットおよびOVXラットの標本において、灌流液中への適用による濃度依存的血管拡張作用と静脈内注射による用量依存的皮膚温上昇作用を惹起し、これら両作用間には正の相関が認められた。しかし、両標本間での作用強度は、CGRPに関してのみ、両作用ともOVXラットの方が偽手術ラットよりも有意に強く発現した。これらの結果は、3種の代表的血管拡張神経ペプチドの中でもCGRPの皮膚温上昇作用が卵巣摘出（卵巣ホルモン欠乏）により有意に増強されることを示している。

第二章 ラット卵巣摘出によるCGRP誘発皮膚温上昇増強のメカニズム

前章に記した偽手術およびOVXラットにおけるCGRPの皮膚温上昇作用がCGRP受容体を介することをCGRP受容体拮抗薬CGRP₈₋₃₇を用いて確認し、さらに内在性の血漿CGRP濃度はOVXラットの方が偽手術ラットよりも有意に低下していること、摘出腸管膜血管床から動脈以外の組織を除去した標本におけるCGRP受容体数はOVXラットの方が偽手術ラットよりも有意に増加していること、脊髄後根神経節におけるCGRP産生は変化していないこと、カプサイシン刺激後の血中CGRP量増加（CGRP放出能）はOVXラットの方が有意に低いことなどを明らかにした。これらの結果を基に、卵巣ホルモン欠乏はCGRP産生に影響を与えることなく、放出能を低下させ、血中CGRP濃度の低下を招き、これが引き金になってCGRP受容体数を増加させ、CGRPに対する反応性（皮膚温上昇作用）を増強する、という仮説を提唱した。

第三章 ラット卵巣摘出によるCGRP誘発皮膚温上昇増強に対するエストロゲンと桂枝茯苓丸の作用

エストロゲン（E₂; 0.01mg/ml/kg s. c.）または桂枝茯苓丸（100, 300, 1000mg/10ml/kg p. o.）を卵巣摘出後14日目から

1日1回7日間投与すると、OVXラットで見られたCGRPのカプサイシン誘発放出量減少、血中濃度低下、血管での受容体数増加、血管拡張作用増強、皮膚温上昇増強は全て回復・正常化した。しかし、OVXラットでの血中E₂濃度低下はE₂処置により回復したが、桂枝茯苓丸処置では変化しなかった。これらの結果は、OVXラットでのCGRPに関連した一連の変化はエストロゲン欠乏に起因していること、および桂枝茯苓丸は血中E₂濃度非依存的に上記のCGRPに係る一連の変化を抑制することを示している。

以上の本研究結果は、更年期HF発症機構におけるCGRP系の役割を明確にすると共に、桂枝茯苓丸が卵巣ホルモン非依存的にCGRP系に影響しHFを抑制するという臨床的有用性を示唆している。これらの成果は、更年期障害の発現機構の全容解明および新薬開発のための有用な基礎的知見と考えられる。

よって、本論文を博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成15年8月21日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。