

氏 名 久保 卓郎

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士乙第433号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第2項

学 位 授 与 年 月 日 平成29年 9月13日

学 位 論 文 題 目 Effects of  $\beta$ -estradiol on cold-sensitive receptor channel TRPM8 in ovariectomized rats

(卵巣摘出ラットの寒冷受容体 TRPM8 チャンネルに対する  $\beta$  エストラジオールの効果)

審 査 委 員 主査 教授 西 英一郎

副査 教授 宇田川 潤

副査 教授 平田多佳子

## 論文内容要旨

*整理番号	<b>437</b>	(ふりがな) 氏名	久保 卓郎
学位論文題目	Effects of $\beta$ -estradiol on cold-sensitive receptor channel TRPM8 in ovariectomized rats (卵巣摘出ラットの寒冷受容体 TRPM8 チャンネルに対する $\beta$ エストラジールの効果)		
<p>【目的】顔面紅潮、発汗、息切れ、冷え等の血管運動障害による諸症状は、閉経後の女性において一般的に認められる徴候である。これらの症状は、しばしば生活の質を著しく低下させる。ホルモン補充療法、特にエストロゲン補充療法は、閉経後の症状に対し最も広汎に用いられる効果的な治療法である。</p> <p>血管運動障害のうち、冷えは通常の気温下の無害な寒冷刺激に対してもしばしば観察されるが、冷えの機序は未だ完全には解明されていない。近年の研究では、哺乳類では transient receptor potential (以下、TRP) チャンネルのサブファミリーのうち、TRPA1 と TRPM8 が寒冷知覚と関係することが知られている。TRPA1 が 17℃以下の有害な寒冷刺激で活性化されるのに対し、TRPM8 は 30℃以下の無害な寒冷刺激で活性化される。</p> <p>先人の研究において、両側卵巣摘出したラット (以下、OVX ラット) では、血清エストロゲンの低下に伴い、皮膚の TRPM8 受容体の蛋白質と mRNA が過剰発現することが示された。そこで、今回我々は更年期の冷えと TRPM8、エストロゲン補充の関係を解明することを目的として、OVX ラットを更年期モデルとして用いて、エストロゲン補充が OVX ラットの皮膚 TRPM8 受容体の過剰発現を抑制するかどうかを調べた。</p> <p>【方法】本研究では総数 15 匹の Sprague Dawley ラットを以下の 3 群に振り分け、エストロゲン投与の有無による皮膚の TRPM8 受容体の発現を定性的および定量的に評価した。</p> <p>NON-OPE 群：無手術かつエストロゲン非投与群 (N= 5)</p> <p>OVX 群：両側卵巣摘出術後エストロゲン非投与群 (N= 5)</p> <p>OVX+E2 群：両側卵巣摘出術後エストロゲン投与群 (N= 5)</p> <p>OVX+E2 群の、エストロゲン補充の方法は、両側卵巣摘出術後 7 日より <math>\beta</math>-エストラジオール 5<math>\mu</math>g/kg/day の皮下注射を 28 日間連日行った。OVX+E2 群のエストロゲン補充の終了後、3 群の全てのラットの血清エストラジオール濃度を測定した。また、皮膚の TRPM8 受容体の mRNA の発現量をリアルタイム RT-PCR 法で、TRPM8 受容体の蛋白質の発現量を ELISA 法および免疫組織化学染色で評価した。なお、免疫組織化学染色の定量的評価方法として、2 光子共焦点レーザー蛍光顕微鏡による観察下で標本の TRPM8 受容体の染色の強さを、0 点から 3 点までの 4 段階でスコア化した。統計学的解析は GraphPad Prism を使用し、Mann-Whitney U 検定を用いて行った。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

別紙様式 3 の 2 (課程博士・論文博士共用)

(続紙)

【結果】血清エストラジオール濃度は、OVX 群では NON-OPE 群と比して有意な低下を認め ( $p < 0.01$ )、両側卵巣摘出術が卵巣の残存なく行われたことが示唆された。また、OVX+E2 群では OVX 群と比して有意な上昇を認め ( $p < 0.01$ )、エストロゲン補充も確実に行われたことが示唆された。

次に TRPM8 受容体の mRNA 発現レベルは、いずれの 2 群間でも有意差を認めなかったが、OVX+E2 群では OVX 群と比して低下する傾向を認めた ( $p = 0.0873$ )。

しかし、TRPM8 受容体の蛋白質濃度に関しては、ELISA 法でもいずれの 2 群間でも有意差を認めず、OVX+E2 群では OVX 群と比して低下する傾向を認めなかった ( $p = 0.426$ )。また、免疫組織化学染色での TRPM8 受容体の染色の強さをスコア化したのが、いずれの 2 群間でも有意差を認めず、OVX 群では NON-OPE 群と比して有意差を認めなかった ( $p = 0.2857$ )。

【考察】今回の実験では OVX+E2 群では OVX 群と比して血清エストラジオール濃度の上昇を認め、また、皮膚の TRPM8 受容体の mRNA の発現は低下傾向を示したのに対し、TRPM8 受容体の蛋白質の発現には差を認めなかった。即ち、OVX+E2 群と OVX 群との間で TRPM8 受容体の mRNA と蛋白質の発現に解離を認めた。mRNA と蛋白質の解離の原因として、実験過程における技術上の問題以外に、mRNA から蛋白質を合成する翻訳過程における遺伝子レベルの調節機序なども挙げられる。具体的には、OVX+E2 群では OVX 群と比して TRPM8 の mRNA の発現レベルが著しく低下したにもかかわらず、遺伝子レベルの機序により OVX+E2 群の TRPM8 の蛋白質の発現が一定量を維持するように調節された可能性も考えられる。

我々の研究は 1 群あたりのラットの数も少なく ( $N = 5$ )、統計学的にも限界があった。今後さらにラットの個体数を増やして実験を行う必要がある。

TRPM8 とエストロゲンの関係は未だ不明な点が多い。海外の研究ではヒトの乳癌細胞における TRPM8 の発現とエストロゲンレセプター (ER) の関係について報告されているが、それによると ER 陽性の乳癌細胞では ER 陰性のそれと比して TRPM8 の過剰発現を示す割合が有意に高かったことが示されている。このように、TRPM8 とエストロゲンの関係は、動物種によって、また正常細胞か腫瘍細胞か等によって異なる可能性もある。TRPM8 とエストロゲンの関係についての遺伝子レベルの更なる解明が待たれる。

【結論】8-エストラジオール補充は、OVX ラットにおいて皮膚 TRPM8 受容体の蛋白質の発現には顕著な変化を示さなかったが、TRPM8 受容体の mRNA の発現を低下させる傾向を示した。このような傾向から、エストロゲン補充療法は、閉経後女性における冷え症を改善させる可能性があるかと推察された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	437	氏名	久保 卓郎
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと</p> <p>本論文では卵巣摘出ラットの寒冷受容体 TRPM8 チャンネルに対する <math>\beta</math> エストラジオールの効果について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) 両側卵巣摘出ラットにおいて血清エストラジオール濃度が有意に低下すること。</li><li>2) 両側卵巣摘出ラットにエストロゲンを補充することで血清エストラジオール濃度が有意に上昇すること。</li><li>3) 両側卵巣摘出ラットにエストロゲンを補充することで、腰背部皮膚における TRPM8 mRNA 発現に減少傾向を認めること。</li><li>4) 両側卵巣摘出ラットにエストロゲンを補充しても、TRPM8 タンパク質発現に有意な変化は認めないこと。</li></ol> <p>本論文は、エストロゲンが寒冷受容体 TRPM8 チャンネル発現に及ぼす効果、引いては閉経後女性の冷えの機序について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 401 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 29 年 8 月 29 日)</p>			