

学位論文要旨

氏名 中田 貴大

論文名 エストロゲン欠乏による耳石層変化に対するホルモン治療の効果

学位論文要旨

はじめに

良性発作性頭位めまい症は(以下、BPPV と略)最も患者数の多い末梢性めまい疾患の一つである。これまでの疫学的研究より、閉経に伴うエストロゲン低下が発症に関与することが示唆されており、近年では酸化ストレスとの関連も示唆されている。先行する動物研究より、両側卵巣摘出(以下、OVX と略)による閉経後骨粗鬆症モデル動物では耳石形態変化や耳石層の体積増加を来すことが報告されている。先行研究では OVX による影響を検討した報告はあるものの、骨粗鬆症治療薬の投与によって OVX の影響が変化するかを検討した報告はない。そのため、閉経後骨粗鬆症モデル動物に骨粗鬆症治療薬を投与することによる耳石層変化の影響について検討を行った。また OVX によって耳石層が変化する機序について研究を行った。

方法

本研究は、愛媛大学医学部の動物実験の倫理委員会によって承認されている。

実験には 8 週齢の C57BL/6 マウス(female)を使用した。OVX もしくは偽手術(以下、sham と略)を行い、OVX マウスは、エストラジオール(以下、E2 と略)投与群、ラロキシフェン(以下、RAL と略)、偽薬群の 3 群にランダムに分けた。対照として偽薬を投与した sham 群を使用した。尚、薬剤は徐放剤であるペレットの形状にして皮下投与した。手術より 4 週経過後に安楽死処置を行い、子宮重量と大腿骨骨密度を測定し、OVX 手術の影響の確認と薬剤投与の効果を確認した。さらに内耳骨包を摘出し、 μ CT を用いて $6\mu\text{m}$ の厚さで卵形囊耳石層を撮影した。撮影した μ CT 画像は、Image J software を使用して各スライスの耳石層の面積を計算し、全てのスライスの耳石層面積を合計することで耳石層体積として計算した。

手術より 4 週後に採取した卵形囊組織から RNA 抽出キットを用いて RNA を抽出し RNA シーケンスを実施し、OVX と投薬による遺伝学的変化を検討した。得られたシーケンスデータは CLC Genomics workbench を用いて解析を行った。

手術より 4 週後に内耳骨包を採取し、EDTA で脱灰後、卵形囊組織のパラフィン包埋切片を

作成した。作成したパラフィン切片を用いて、エストロゲン受容体 α (以下、ER α と略)と代表的な酸化ストレスマーカーの一つである 4-hydroxynonenal(以下、4-HNE と略)に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、OVX 群と薬剤投与群での比較を行った。

統計学的検討には、JMP を用いて、ANOVA および Steel-Dwass 検定を行い、p 値 0.05 未満を有意差ありとして判定した。尚、RNA 解析においては FDR-p 値 0.05 未満を有意差ありとして判定した。

結果

OVX 群で子宮重量の有意な低下と骨密度低下を認め、OVX の影響が確認できた。E2 もしくは RAL 投与群で骨密度の有意な増加を認めた。RAL 投与群では sham 群よりも子宮重量の有意な低下を認めた。この結果より、投与薬剤の効果が確認された。

OVX 群で耳石層体積の有意な増大を認めた。E2 もしくは RAL 投与にて耳石層体積の増大が抑制された。卵形囊の RNA 解析にて OVX 群で *Gstp2* 遺伝子の有意な発現低下を認めた。免疫組織化学染色にて、OVX 群で ER α と 4-HNE いずれも他群に比べて発現増加を認めた。

考察

本結果より OVX によって耳石層体積の増大を来し、E2 もしくは RAL 投与によってその影響を抑制できることが判明した。さらに遺伝子解析にて *Gstp2* 遺伝子が OVX によって発現低下を来し、OVX 群では酸化ストレスマーカーの増加を認めた。

Gstp2 遺伝子はグルタチオントランスフェラーゼ(以下、GST と略)Pi2 をコードしている。GST は解毒経路の phase2 であるグルタチオン化の補酵素として機能し、異物を細胞外へ排出できる形状にする。また GSTPi2 はストレスキナーゼの一種である JNK と結合してこれを抑制している。OVX によって GST を含む抗酸化物質が障害される報告もあり、本結果からは OVX による抗酸化能の低下が E2 や RAL によって抑制されることが示唆された。

本研究では OVX によるエストロゲン欠乏によって引き起こされる変化に対して E2 投与と RAL 投与を行った。RAL は選択的エストロゲン受容体モジュレータ(以下、SERM と略)の一種であり臨床で閉経後骨粗鬆症に対して使用される薬剤である。SERM はエストロゲン受容体(以下、ER と略)への作用が臓器によって異なるのが特徴であり、RAL は骨にはアゴニストとして、エストロゲンによる癌化が危惧される子宮にはアンタゴニストとして作用する。内耳にも ER は豊富に存在することが報告されているが、RAL が内耳 ER にアゴニストとして作用したかは不明瞭である。骨代謝は糖代謝や脂質代謝、リンパ球新生など全身に影響することが報告されており、RAL によって改善した骨代謝の間接的作用である可能性が残っているからである。

結語

E2 や RAL の内耳への効果は未知であるが、これらの投与によってエストロゲン欠乏によって引き起こされる耳石層変化が抑制され、その効果が酸化ストレス軽減による効果であることが示唆された。

キーワード (3~5)	良性発作性頭位めまい症, 耳石 エストロゲン, 酸化ストレス, 骨代謝
-------------	--