

問14 このような泌尿器症状に対し、「ホルモン補充療法」が有効なことをご存知でしたか。

- a. 知らなかった。
- b. 聞いたことはあるが良くは知らなかった。
- c. 知っている。

問15 更年期を過ぎると、膀胱（ぼうこう）の粘膜が弱くなり、トイレが近くなるなどの膀胱炎のような症状が起こりやすくなります。このような症状が起こりやすいですか。

- a. 起こりやすくない。
- b. 起こりやすい。
- c. わからない。

問16 この膀胱炎のような症状に対し、「ホルモン補充療法」が有効であることをご存知でしたか。

- a. 知らなかった。
- b. 聞いたことはあるが良くは知らなかった。
- c. 知っている。

問17 早期に「ぼけ」症状を起こす病気に「アルツハイマー病」があります。「ホルモン補充療法」がこの「ぼけ」の発症を遅らせる可能性があることをご存知でしたか。

- a. 知らなかった。
- b. 聞いたことはあるが良くは知らなかった。
- c. 知っている。

問18 「ホルモン補充療法」をすると、肌がみずみずしく保てることをご存知でしたか。

- a. 知らなかった。
- b. 聞いたことはあるが良くは知らなかった。
- c. 知っている。

問22 「ホルモン補充療法」を受けるとすれば、どのような科で受けていたいですか。

- a. 婦人科
- b. 「ホルモン補充療法」を行っている内科
- c. 「ホルモン補充療法」を受けることができれば、何科でもかまわない。

問23 あなたの現在の職業を教えてください。(現在専業主婦の方で、以前職業に就かれていた方はaに○をつけて、以前の職業に△をつけて下さい。)

- a. 専業主婦 b. 会社員 c. 会社管理職 d. 公務員 e. 公務員管理職
- f. 教員 g. 農業 h. 自由業 () i. 医療従事者 ()
- j. 自営業 k. パート () l. 無職 m. その他 ()

問24 あなたの最終学歴を教えてください。

- a. 大学院 b. 大学 c. 短大 d. 旧制女学校 (注：該当する方のみ)、
- e. 各種専門学校 f. 高校 g. 中学 h. その他 ()

問25 差し支えなければ、あなたのご家庭の昨年1年間の総年収を教えてください。

- a. ~400万円 b. 400~600万円 c. 600~800万円 d. 800~1,000万円
- e. 1,000~1,200万円 f. 1,200~1,500万円 g. 1,500万円以上

問26 差し支えなければ、あなたのご家庭の家族構成を教えてください。あなたを含めて何人でお住まいですか。

人

同居なさっているご家族に○をつけて下さい。

- a. 配偶者 b. 祖父 c. 祖母 d. 父 e. 母 f. 子ども ()人
- g. その他 ()

お忙しい中、私どものアンケートにご協力くださりまして、誠にありがとうございました。

高齢女性の健康増進のためのホルモン
補充療法に関する総合研究班 班員一同

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)

分担研究報告書

ホルモン補充療法と血管内皮機能に関する研究

分担研究者 大内尉義 東京大学大学院医学系研究科加齢学講座教授

【研究要旨】血管内皮機能の障害は動脈硬化の発症、進展過程における初期変化であることから、内皮機能がその後の心血管イベントを予測する因子になれば、その値が閉経後女性にHRTを開始する根拠になりうるとの仮説のもとに、血流依存性血管拡張反応(%FMD)を血管内皮機能の指標とし、%FMDとその後の心血管イベント発症との関連を検討した。男女ともに%FMDが3.5%未満の群は3.5%以上の群と比較して有意に心血管イベント発症が多かった。閉経後女性における解析でも同様の傾向が認められた。閉経後女性において、%FMD値が3.5%未満であることが血管機能の改善からみた場合のHRTの開始基準になりうると思われた。

A. 研究目的

閉経前の女性では動脈硬化性疾患の発症頻度は男性に比べかなり低く明らかな性差が認められるが、その発症は閉経後次第に増加し70歳前後で性差がほぼ消失する。このような疫学的研究や、また多くの動物実験の結果から、エストロゲンには抗動脈硬化作用のあることが示唆されている。エストロゲンを主体とした女性ホルモンを閉経後女性に薬剤として投与する治療法をホルモン補充療法(HRT)というが、この方法は血管機能を保持し、さらに高血圧、肥満、高脂血症などの動脈硬化危険因子を改善する働きを有しており、閉経後女性における動脈硬化の発症を抑制する有力な方法として注目されている。しかし動脈硬化の予防という観点からみた場合、どのような病態を有する閉経後女性にHRTを施行すべきであるのか、その基準については明らかでない。臨床的には高血圧、肥満、高脂血症などの動脈硬化危険因子を多く有する女性が本治療法を受ける候補となることが以前から考えられているが、血管内皮機能の障害は動脈硬化の発症、進展過程においてもっとも早い時期に起こる変化であることから、われわれは血管内皮機能がその後の心血管イベントを予測する因子になりうると思えば、その測定が閉経後女性にHRTを開始する根拠になるのではないかと考えた。そこで、本研究では超音波を用いて非侵襲的に測定した血流依存性血管拡張反応の程度(%flow-mediated dilatation; %FMD)を血管内皮機能の指標として用い、%FMDと心血管イベントの長期予後との関連を男女に分けて検討した。

B. 研究方法

本研究で用いた血管内皮機能検査は血流依存性血管拡張反応を上腕動脈で測定したものである。すなわち、15分間以上安静臥床させた被検者の上腕動脈を7.5MHzのプロー

ブを持つ超音波断層装置で長軸方向に検出し、最大径となる部位の画像を得た上で、ドプラー法により上腕動脈内の血流速度を測定する。測定された平均血流速度と上腕動脈の直径から真円として求めた断面積を掛けると上腕動脈内の血流量を測定することができる。安定した測定が得られたところで、前腕動脈に置いた血圧計のカフを250mmHgまで加圧し、前腕を5分間駆血する。その後一気に駆血を解除すると、上腕動脈の血流量は2-3秒内に約3倍に増加しいわゆる反応性充血が起こる。この増加した血流に対して上腕動脈の径は駆血解除後約1分前後で最大となるように拡張する。これが血流依存性血管拡張反応であり、この血管拡張は血管内皮依存性であり、血管内皮細胞における一酸化窒素(NO)の合成、放出に完全に依存することから、間接的に血管内皮細胞機能を測定していることになるわけである。加圧前の血管径に対して最大何%拡張したかを%FMDとよび、血管内皮機能の測定値とした。われわれの検討により、%FMD値は明らかな動脈硬化性疾患を有さない症例において存在する動脈硬化危険因子の数に応じて低下し、また頸動脈の超音波検査により得られた内膜・中膜複合体の厚みが大いほど低下しており、%FMD値の低下と動脈硬化の発症、進展との間にはきわめて深い関連のあることが示されている。

当施設において上腕動脈における%FMDを超音波を用いて測定し、その後追跡調査可能であった318例のうち、担癌症例等の14例を除いた304例(18-87歳；男性178名、女性126名)を対象とした。全体の%FMDをプロットするとおおよそ正規分布することから、25パーセントイル、75パーセントイル近傍の値として、それぞれ3.5%、7.0%を区切りとして、%FMDの値により3.5%未満、3.5以上7.0%未満、7.0%以上の3群に分けた。この3群の群別と心筋梗塞等の心血管イベントの発症の調査を行い、また%FMDの心血管イベント長期予後への関与をCox比例ハザードモデルにて検討した。(倫理面への配慮)

%FMDの測定は完全に非侵襲的な方法であるが、目的、方法をその都度よく説明し、同意を得た上で行った。データの保管に関しては分担研究者が責任をもって行った。

C. 研究結果

全体での心血管イベントは35例あり、平均観察期間は44ヶ月(2-67ヶ月)であった。Kaplan-Meier法による累積生存曲線の解析を行ったところ、%FMD3.5%未満の群は他の2群に比較して有意に($p<0.01$)心血管イベント発症が多かった(図1)。

男女に分けて検討したところ、男性178名、女性126名の男女両群ともに%FMDが3.5%未満の群は他の2群に比較して有意に心血管イベント発症が多く認められた(図2、3)。Cox比例ハザードモデルにおける検討では、年齢、喫煙習慣、動脈硬化性疾患の既往、%FMDの群別が有意に関与していた。

しかしながら、女性のうち閉経後または閉経を迎えている可能性の高い45歳以上の

111人を対象として解析を行ったところ、平均年齢は63歳となり、%FMD値3.5%未満の群は他の2群に比較して心血管イベント発症が高い傾向があった(p=0.09)。

図1 心血管イベントの非発生率(全体)

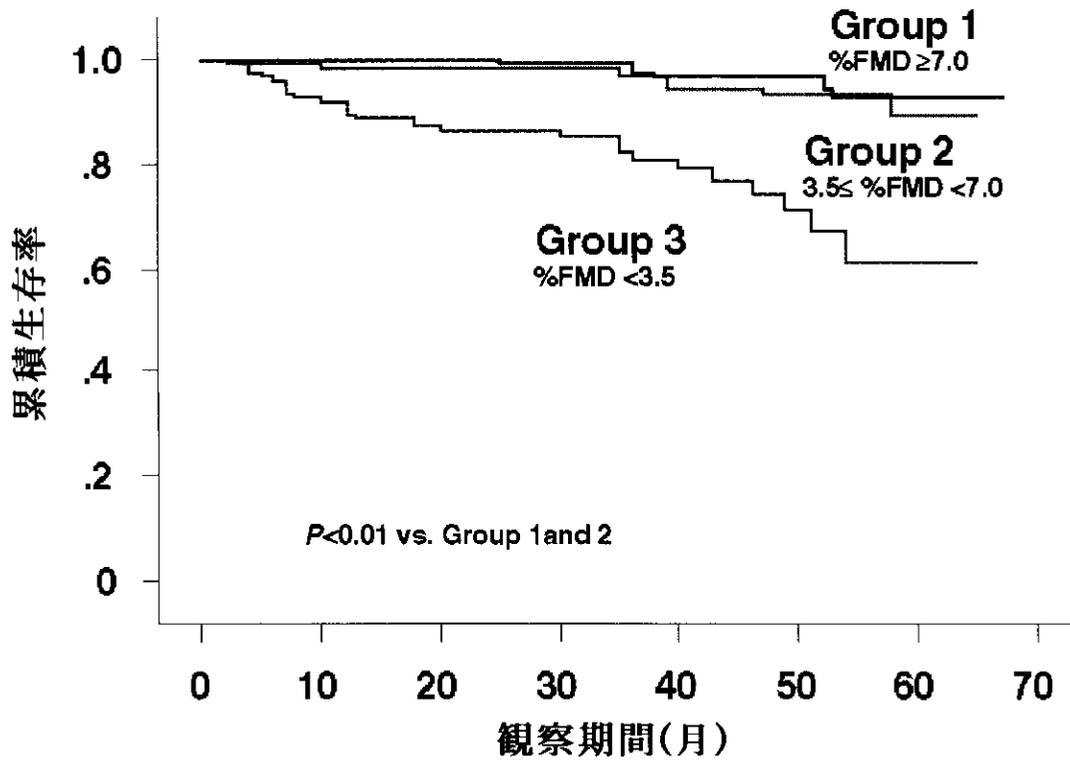


図2 心血管イベントの非発生率(男性のみ)

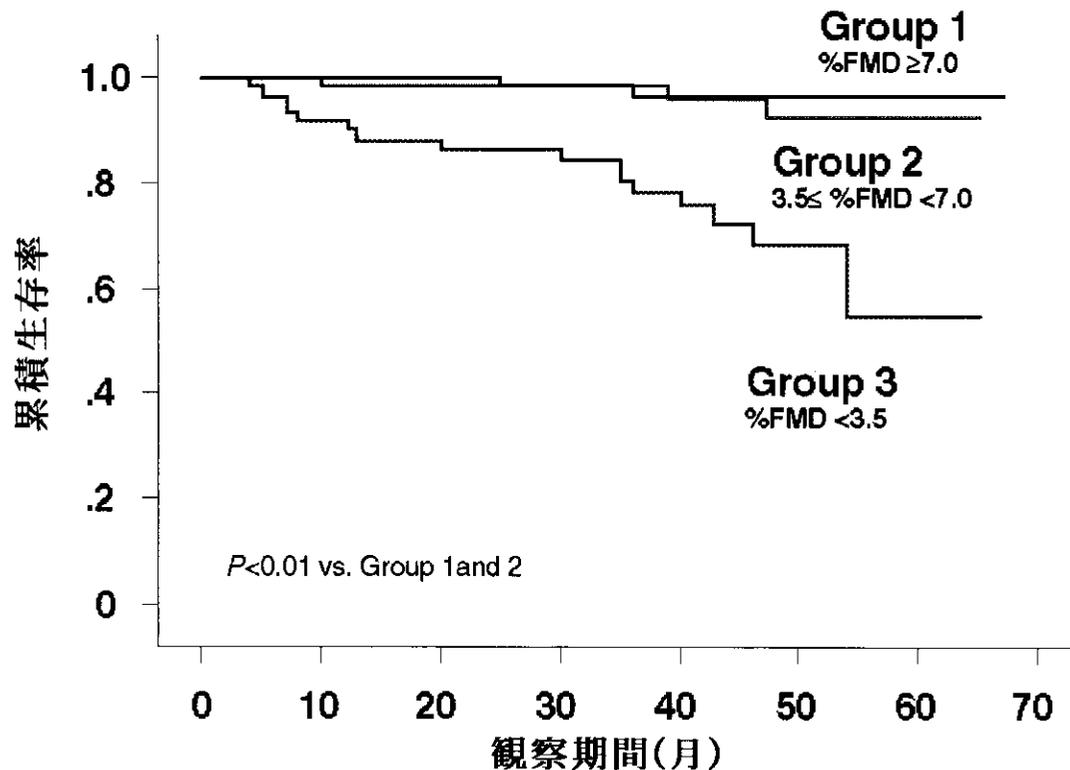
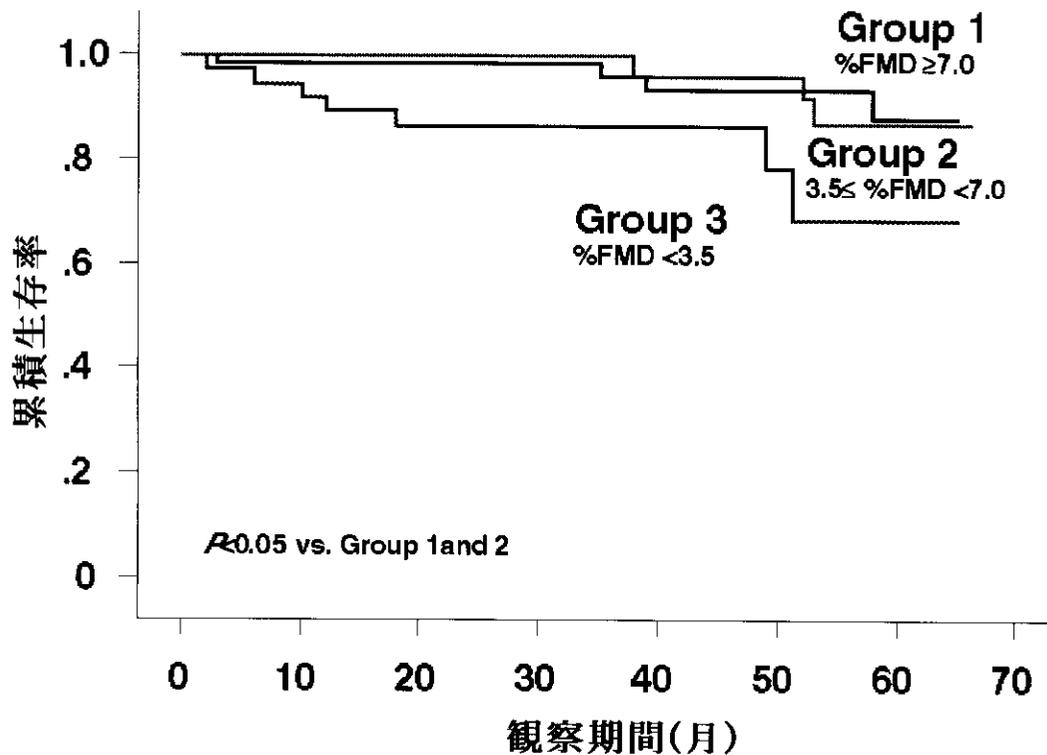


図3 心血管イベントの非発生率(女性のみ)



D. 考察

本研究で用いた血流依存性血管拡張反応は shear stress によって内皮細胞から放出される血管拡張物質、特に NO によって惹起される。これは橈骨動脈において同様の方法で検出した血流依存性血管拡張反応が NO 合成阻害薬である L-NMMA (NG-monomethyl-L-arginine) によって拮抗されることにより証明されている。したがって、本方法で測定している %FMD 値は間接的に血管内皮細胞における shear stress による NO の産生をみていると考えられる。

本研究ではこの方法を用いて測定した血管内皮機能 (%FMD 値) の低下が今後の動脈硬化性イベントの発症予測因子となりうるかについて検討した。その結果、%FMD 値が男性、女性ともその後の心血管イベントの発症に独立した因子として関係し、その予測に有用である可能性が示唆された。したがって、血管内皮機能が著しい低値を示す例には早期から内皮機能を改善させるような介入が必要と考えられる。血管内皮機能を改善する方法としては、高脂血症や高血圧治療、適度な運動、ビタミン C、E の摂取、食品中に含まれる抗酸化物質 (ポリフェノールなど) の摂取などが報告されている。本報告にあるように、HRT は閉経後女性の血管内皮機能を改善させ、心血管イベントの一次、二次予防につながる可能性があるため、血管内皮機能が著しい低値を示す閉経後女性には HRT を考慮すべきと考えられる。

しかしながら、女性のうち閉経後または閉経を迎えている可能性の高い 45 歳以上の

111人を対象として解析を行ったところ、%FMD値が3.5%未満の群は他の2群に比較して傾向はあるものの有意差を認めるまでには至らなかった。これは少ない対象人数ならびに少ないイベント数によるものと考えられ、より多くの症例とより長い経過観察が必要と考えられる。また、今回の検討では心血管イベントとして初発と再発の両方が含まれているが、今後症例が十分蓄積されれば心血管イベントの初発と再発を分けた検討も可能になり、今後の検討課題である。

E. 結論

血流依存性血管拡張反応により測定した血管内皮機能(%FMD値)が著しく低下してある場合には、血管内皮機能を改善させるような何らかの手段をとるべきである。閉経後女性の場合、その方法としてHRTが確実な方法であるため、%FMD値が3.5%未満であることが血管機能の改善からみた場合のHRTの開始基準になりうると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sudoh N, Toba K, Akishita M, Ako J, Hashimoto M, Iijima K, Kim S, Liang YQ, Ohike Y, Watanabe T, Yamazaki I, Yoshizumi M, Eto M, Ouchi Y. Estrogen prevents oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis in rats. *Circulation*. 2001;103(5):724-9.
- 2) Ako J, Eto M, Kim S, Iijima K, Watanabe T, Ohike Y, Yoshizumi M, Ouchi Y. Pericardial constriction due to malignant lymphoma. *Jpn Heart J*. 2000;41(5):673-9.
- 3) Ogawa S, Emi M, Shiraki M, Hosoi T, Ouchi Y, Inoue S. Association of estrogen receptor beta (ESR2) gene polymorphism with blood pressure. *J Hum Genet*. 2000;45(6):327-30.
- 4) Inoue S, Ogawa S, Horie K, Hoshino S, Goto W, Hosoi T, Tsutsumi O, Muramatsu M, Ouchi Y. An estrogen receptor beta isoform that lacks exon 5 has dominant negative activity on both ERalpha and ERbeta. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 279(3):814-9.
- 5) Watanabe T, Akishita M, Toba K, Kozaki K, Eto M, Sugimoto N, Kiuchi T, Hashimoto M, Shirakawa W, Ouchi Y. Influence of sex and age on serum

- nitrite/nitrate concentration in healthy subjects. *Clin Chim Acta*. 2000;301(1-2):169-79.
- 6) Akishita M, Horiuchi M, Yamada H, Zhang L, Shirakami G, Tamura K, Ouchi Y, Dzau VJ. Inflammation influences vascular remodeling through AT2 receptor expression and signaling. *Physiol Genomics*. 2000; 2(1):13-20.
- 7) Akishita M, Iwai M, Wu L, Zhang L, Ouchi Y, Dzau VJ, Horiuchi M. Inhibitory effect of angiotensin II type 2 receptor on coronary arterial remodeling after aortic banding in mice. *Circulation*. 2000;102(14):1684-9.
- 8) Ishikawa M, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Namiki A, Yamaguchi T, Orimo H, Ouchi Y. Expression of parathyroid hormone-related protein in human and experimental atherosclerotic lesions: functional role in arterial intimal thickening. *Atherosclerosis*. 2000;152(1):97-105.
- 9) Hashimoto M, Kozaki K, Eto M, Akishita M, Ako J, Iijima K, Kim S, Toba K, Yoshizumi M, Ouchi Y. Association of coronary risk factors and endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery. *Hypertens Res* 23(3):233-8, 2000
- 10) Ogawa S, Fujita M, Ishii Y, Tsurukami H, Hirabayashi M, Ikeda K, Orimo A, Hosoi T, Ueda M, Nakamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S. Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor alpha and beta pathways. *J Biol Chem*. 2000; 275(28): 21372-9.
- 11) Hoshino S, Hosoi T, Miyao M, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S. Identification of a novel polymorphism of estrogen receptor-alpha gene that is associated with calcium excretion in urine. *J Bone Miner Metab*. 2000;18(3):153-7.
- 12) Ogawa S, Hosoi T, Shiraki M, Orimo H, Emi M, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S. Association of estrogen receptor beta gene polymorphism with bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;269(2):537-41.
- 13) Nagano K, Toba K, Akishita M, Watanabe T, Kozaki K, Eto M, Hashimoto M, Sudoh N, Ako J, Yoshizumi M, Ouchi Y. Prostanoids regulate proliferation of vascular smooth muscle cells induced by arginine vasopressin. *Eur J Pharmacol*. 2000;389(1):25-33.
- 14) Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Kim S, Eto M, Ako J, Liang YQ, Sudoh N, Hosoda K, Nakahara K, Toba K, Ouchi Y. Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation*. 2000; 101(7): 805-11.

2. 学会発表

- 1) 橋本正良, 吉栖正雄, 秋下雅弘, 金 承範, 阿古潤哉, 飯島勝矢, 渡辺徳光, 大池裕美子, 須藤紀子, 江頭正人, 鳥羽研二, 大内尉義. 上腕動脈における血流依存性血管拡張能とその後の心血管イベントとの関連. 第 64 回日本循環器学会総会・学術集会, 2000.4.1-3, 大阪 (Jpn Circ J 64(suppl 1): 253, 2000)
- 2) 阿古潤哉, 吉栖正雄, 秋下雅弘, 金 承範, 橋本正良, 渡辺徳光, 大池裕美子, 鳥羽研二, 大内尉義. 新生内膜肥厚に対する抗酸化剤の影響, 第 32 回日本動脈硬化学会総会, 2000.6.1-2, 舞浜 (動脈硬化 28(suppl):151, 2000)
- 3) 飯島勝矢, 吉栖正雄, 橋本正良, 金 承範, 阿古潤哉, 梁 一強, 渡辺徳光, 大池裕美子, 鳥羽研二, 大内尉義. Red Wine Polyphenol の抗動脈硬化作用 -培養血管平滑筋細胞に対する遊走抑制効果-. 第 32 回日本動脈硬化学会総会, 2000.6.1-2, 舞浜 (動脈硬化 28(suppl):152, 2000)
- 4) 大内尉義, 細井孝之, 佐久間一郎, 大藏健義, 佐藤貴一郎, 井上 聡, 武谷雄二. 閉経後女性のホルモン補充療法に関する医師の意識調査. 第 42 回日本老年医学会学術集会, 2000.6.15-17, 仙台 (日老医誌 37 : 130, 2000)
- 5) 金 承範, 吉栖正雄, 秋下雅弘, 阿古潤哉, 飯島勝矢, 渡辺徳光, 大池裕美子, 橋本正良, 鳥羽研二, 大内尉義. 短期高血圧変動および自律神経性血圧調節系に及ぼす加齢の影響. 第 42 回日本老年医学会学術集会, 2000.6.15-17, 仙台 (日老医誌 37 : 109, 2000)
- 6) 鳥羽研二, 須藤紀子, 秋下雅弘, 阿古潤哉, 金 承範, 飯島勝矢, 大池裕美子, 渡辺徳光, 吉栖正雄, 大内尉義. 老年症候群の縦断的経年変化に関する研究. 第 42 回日本老年医学会学術集会, 2000.6.15-17, 仙台 (日老医誌 37 : 137, 2000)
- 7) 中居龍平, 鳥羽研二, 須藤紀子, 大内尉義. 入院高齢者の意欲の長期変化. 第 42 回日本老年医学会学術集会, 2000.6.15-17, 仙台 (日老医誌 37 : 178, 2000)
- 8) 原美津子, 鳥羽研二, 中居龍平, 須藤紀子, 阿古潤哉, 飯島 節, 秋下雅弘, 弓田 清, 福島康圭, 大内尉義. 要介護認定度・患者の意欲と、医療費. 第 42 回日本老年医学会学術集会, 2000.6.15-17, 仙台 (日老医誌 37 : 182, 2000)
- 9) 大藏 健義, 大内尉義, 細井孝之, 佐久間一郎, 佐藤貴一郎, 井上聡, 武谷雄二, 熊坂高弘. ホルモン補充療法に関する一般女性の意識調査. 第 15 回日本更年期医学会学術集会, 2000.10.14-15, 札幌 (プログラム・要旨集 p.136)
- 10) 須藤紀子, 鳥羽研二, 秋下雅弘, 江頭正人, 阿古潤哉, 金 承範, 橋本正良, 飯島勝矢, 梁 一強, 渡辺徳光, 大池裕美子, 吉栖正雄, 大内尉義. エストロゲンは酸化ストレスによる血管内皮細胞のアポトーシスを抑制し、抗動脈硬化作用を有する. 第 9 回 性差医学研究会, 2000.3.11, 東京・品川, 性差医学 No.7 (印刷中)
- 11) 秋下雅弘, 大内尉義, 堀内正嗣. 高血圧に伴う冠動脈硬化とアンジオテンシン II type2 受容体による抑制作用, 第 5 回高血圧と動脈硬化研究会部会, 2000.6.3, サンケイ

会館、東京、要旨集 p9

12) Ako J, Yoshizumi M, Kim S, Hashimoto M, Iijima K, Sudoh N, Liang YQ, Watanabe T, Ohike Y, Toba K, Ouchi Y. Cell density determines apoptosis and cell cycle arrest in vascular smooth muscle cells in association with p21WAF1/CIP1. 12th International Symposium on Atherosclerosis, 2000.6.25-29, Stockholm, Sweden (Atherosclerosis 151(suppl):240,2000)

13) Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Kim S, Akishita M, ako J, Liang YQ, Sudoh N, Watanabe T, Ohike Y, Toba K, Hosada K, Nakahara K, Ouchi Y. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by red wine polyphenols is associated with downregulation of cyclin a gene expression. 12th International Symposium on Atherosclerosis, 2000.6.25-29, Stockholm, Sweden (Atherosclerosis 151 (suppl): 318,2000)

14) Watanabe T, Yoshizumi M, Ako J, Kim S, Hashimoto M, Iijima K, Sudoh N, Liang YQ, Ohike Y, Akishita M, Toba K, Ouchi Y. The role of nuclear receptor NGFI-B in vascular smooth muscle cell apoptosis. 12th International Symposium on Atherosclerosis, 2000.6.25-29, Stockholm, Sweden (Atherosclerosis 151(suppl):178,2000)

15) Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Kozaki K, Iijima K, Ako J, Kim S, Toba K, Yoshizumi M, Ouchi Y. Association of coronary risk factors and early stage of atherosclerosis in men. 12th International Symposium on Atherosclerosis, 2000.6.25-29, Stockholm, Sweden (Atherosclerosis 151(suppl):25,2000)

16) Akishita M, Horiuchi M, Ouchi Y. Exaggerated vascular remodeling in the mice lacking angiotensin II type 2 receptor. 12th International Symposium on Atherosclerosis, 2000.6.25-29, Stockholm, Sweden (Atherosclerosis 151(suppl): 32,2000)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

骨粗鬆症の予防、治療とホルモン補充療法に関する研究

分担研究者 井上 聡 東京大学大学院医学系研究科加齢医学講座講師

【研究要旨】 日本人閉経後女性において、低用量のHRTが骨量に与える影響を検討したところ、骨量増加効果が期待でき、有害事象も軽度であることが明らかになった。また、老年期骨粗鬆症に対するホルモン補充療法の治療効果を検討し、ビタミンD投与群と比較したところ、低用量のHRT、ビタミンDともに1年間の投与で骨密度維持効果を示した。次にHRT治療選択への遺伝子マーカーの候補として二つのエストロゲン受容体(ER)遺伝子各々の新しい多型を見い出し、骨量、骨代謝マーカーとの相関を示した。さらに、エストロゲン受容体の骨粗鬆症における役割を探る目的で、ER α とER β 両方のシグナルを阻害させた、エストロゲン低応答性トランスジェニックラットを作製し、閉経後骨粗鬆症治療および予防の新しいモデル動物になることを示した。

A. 研究目的

女性ホルモン補充療法(HRT)は骨量増加・保持作用および骨粗鬆症による骨折の発生を抑制する効果を有することより、骨粗鬆症の進展防止および予防の目的で、欧米において広く用いられている。一方、我が国における骨粗鬆症の予防・治療におけるHRTは最近急速に行われつつあるが、日本人におけるHRTの骨粗鬆症の予防・治療における意義については検討が十分でない。実際に、HRTを最も効率的に行うにはいつ開始すべきか、またどのくらいの期間行うべきかなど不明な点も多い。有害事象の問題や治療中に服薬のコンプライアンスが低下し脱落してしまう症例など問題点も指摘されている。そこで、日本人閉経後女性におけるHRTの骨量に及ぼす効果、および安全性ならびに服薬のコンプライアンスについて検討を行った。また、HRTは、主に閉経後骨粗鬆症の治療薬としてその地位を確立しつつあるが、高齢者での検討は少ない。そこで老年期骨粗鬆症における治療効果につきビタミンD加療群と比較し、各群の骨代謝状態につき検討した。さらに、骨粗鬆症は多因子性疾患であり、その背景因子については遺伝的因子の影響が大きいことが示唆されている。閉経後女性における骨密度の減少は個人差があり、これは閉経に伴うエストロゲン産生の低下に対する反応性の多様性にもとづくものと考えられる。この多様性に関与するものとしてエストロゲン作用に個体差があることが想定される。エストロゲン作用を媒介するエストロゲンレセプター(ER)には α と β の二種類が存在することが知られ、この二つのレセプターの量的あるいは質的な多様性、さらにはそれらを規定するER遺伝子の多様性が閉経後骨粗鬆症とそのホルモン補充療法に対する反応性を規定している可能性がある。そこで我々は新規のER α 遺伝子とER β 遺伝子の多型性を探索し骨密度ならびに骨代謝マーカーとの関連

を検討した。さて、ERはステロイドホルモン、レチノイン酸、甲状腺ホルモン、ビタミンD受容体などとともに、核内受容体スーパーファミリーに属しており、リガンド誘導性転写制御因子である。ERは、リガンド結合ドメイン(LBD)に結合したエストロゲンの存在下で、2量体にてDNA結合ドメイン(DBD)を介してゲノム上のエストロゲン応答配列(ERE)に結合し、近傍の標的遺伝子の転写を調節すると考えられている。しかし、典型的なEREを介さない作用や、転写調節を直接引き起こさないnon-genomic効果も報告されている。骨代謝に対するエストロゲンの作用にERを介する働きが必須かどうか解決を見ていない。ER α に変異ある男性患者は骨量低下を示したが、女性ではER α の変異は知られておらず、ER α やER β のノックアウトマウスでは骨量は著明には低下していない。そこで我々は、ER α とER β 両方のシグナルを阻害するドミナントネガティブ体を発見し、これを発現させたトランスジェニックラットを作製することにより、骨に対するエストロゲン作用におけるERの役割を検討した。

B. 研究方法

1. 低用量HRTが骨量に及ぼす効果：閉経後女性36名を対象に、HRTによる骨密度の変化および有害事象の発現頻度・服薬コンプライアンス状況について調査した。HRT開始時の年齢は 63.3 ± 11.7 (Mean \pm S.D.)歳(35-86歳)、で、HRTの方法は、基本的に通常の半量すなわち結合型エストロジェン(CEE)0.3125mgの連日使用によった。骨量測定はdual energy X-ray absorptiometryを用いて、第二腰椎～第四腰椎の骨密度(BMD)を原則として3か月毎に測定し、約2年間にわたり追跡した。有害事象の発生、服薬のコンプライアンスに関しても調査を行った。

2. 老年期骨粗鬆症に対するHRTとビタミンDの効果の比較：対象は60歳以上の退行期骨粗鬆症の女性50例で、1)結合型エストロゲン投与群(HRT群)：18例(通常の半量の結合型エストロゲン0.3125mg/日)、2)ビタミンD投与群(ビタミンD群)：32例1 α (OH)D₃0.5~1.0 μ g/日の2群につき1年間の薬剤効果を両群で比較した。検査項目は、腰椎(L₂₋₄)の骨密度(BMD)と骨代謝マーカーとして、血清アルカリフォスファターゼ(ALP)、カルシウム、燐、尿中カルシウム/クレアチニン比(Ca/Cr)につき1年間の変化につき検討した。

3. ER遺伝子の多型性分析：ER α 遺伝子の多型性分析は閉経後女性306名を対象として、末梢血の白血球分画よりDNAを抽出した。ERの各エクソン(エクソン1からエクソン8まで)の全長を挟み込むようにPCRプライマーを作成し、各エクソン毎にPCRを施行後、その産物を用いてPCR-SSCPを行った。PCR-SSCPゲルより、泳動度の異なるバンドを切り出し、クローン化してDNA塩基配列を決定した。PCR-SSCPにより分類されたgenotypeとBMDならびに骨代謝マーカーとの関連性について検討を加えた。ER β 遺伝子の多型性分析は閉経後女性204人を対象とし、末梢血DNAを用いて

イントロン5に存在するマイクロサテライト多型CAリピートを含む領域をPCR法にて増幅後、シーケンス法により遺伝子多型を同定した。この多型を用い、BMDと各種骨代謝マーカーとの関連性について検討した。

4. エストロゲン受容体の骨代謝における役割：

ER α の変容体(ER α 1-535)をPCR法を用いて作製し、ルシフェラーゼベクターを用いたレポーターアッセイによりER α およびER β のピテロゲニンERE(vitERE)を介するエストロゲン依存性の転写活性への影響を調べた。ニワトリ β アクチンをプロモータに用いた。ER α 1-535発現ユニットをラットの受精卵に導入しトランスジェニックラットを作製した。生まれたラットよりDNAを抽出し、サザン法にてトランスジーンを導入を確認した。またラット各臓器よりRNAを抽出しノザン法でトランスジーンを発現を解析した。6月齢の雌ラットをトランスジェニックラット群、野生群においてそれぞれsham手術群、卵巣摘除群、卵巣摘除後エストロゲン補充群(4週間)にわけて処置し骨量を測定した。

C. 研究結果

1. 低用量HRTが骨量に及ぼす効果：治療開始直前の第2腰椎～第4腰椎BMDは $0.791 \pm 0.173 \text{ g/cm}^2$ ($0.373 - 1.146$, $n=36$)であった。HRTによりBMDは24か月までのすべての測定において、初回時に比較すると増加し、3か月(0.784 ± 0.198 ; $+0.013$ の増加, $p<0.10$)、6か月(0.800 ± 0.160 ; $+0.020$, $p<0.05$)、9か月(0.802 ± 0.162 ; $+0.024$, $p<0.05$)であり以後+2%前後を推移した。有害事象は36例中15例に認め、その内訳は帯下の増加9例・性器出血5例・乳房緊満感4例であったが、いずれも一過性の軽度のもので治療の継続に支障を来たすようなものは認められなかった。服薬のコンプライアンスは、良好(90%以上服薬)28例・やや良好(2/3以上服薬)5例・不良3例であり、不良と判定された3例はすべて60歳未満の症例、やや良好と判定された5例中、2例は50歳代、3例は60歳代と若年者のコンプライアンスは低い傾向を認めた。

2. 老年期骨粗鬆症に対するHRTとビタミンDの効果の比較：1)背景因子：HRT群(平均年齢 71.2 ± 4.9 歳)、ビタミンD群(平均年齢 70.6 ± 6.9 歳)で、両群間に差を認めなかった。その他、身長、体重、BMI、閉経時期、初潮年齢、開始時BMDに有意差を認めなかった。2)骨密度：HRT群でBMDは、 0.732 ± 0.130 から、 0.757 ± 0.128 へと有意に増加($p<0.01$)、ビタミンD群でも 0.752 ± 0.167 から 0.771 ± 0.153 へと有意に増加した($p<0.05$)。3)骨代謝マーカー：ALP(IU)は、HRT群で 143 ± 69 から、 99 ± 41 へ、ビタミンD群で 151 ± 44 から 130 ± 31 へと両群ともに有意に減少した($p<0.0001$ vs $p<0.01$)。尿中Ca/Crでは、HRT群のみで有意の減少を認めた。

3. ER遺伝子の多型性分析：ER α 遺伝子の各エクソン毎にPCR-SSCPを行なったとこ

ろ、エクソン4のPCR-SSCPにおいて、3種の泳動パターンが得られた。PCR-SSCPゲルの各バンドの塩基配列を決定したところ、975番目のシトシンがグアニンに塩基置換を起こしている allele が存在した。この塩基置換を持たない genotype を MM、一つ持つ genotype を Mm、二つ持つ genotype を mm と名付けた。それぞれの genotype の出現頻度は、それぞれ、81名(26.5%)、132名(43.1%)、93名(30.4%)であった。新しく発見された多型性(MM, Mm, mm)と骨塩量ならびに骨代謝マーカーとの関連につき解析を行なったところ、MM群では骨塩量の年間減少率が大きい傾向にあり、尿中カルシウム排泄量(早朝空腹時尿、クレアチニン補正值)が他の genotype に対して有意に多いことが判明した(MM vs mm, 0.247 vs 0.200, $p=0.03$)。一方、ER β 遺伝子多型解析の結果では、ER β CA リピートは18~32の範囲で認められ、特にER β 26CA リピートを有する群とそれ以外の2群間において、腰椎骨骨密度との相関を解析したところ、前者で有意に高値を示すことが明らかになった(Z score; 0.674 vs. 0.128; $p=0.027$)。

4. エストロゲン受容体の骨代謝における役割: ER α のC末を欠失させた変異体(ER α 1-535)を作製し、ニワトリ β アクチンをプロモータに用いた発現ベクターに挿入した。完成したプラスミドを、COS-7細胞にER α もしくはER β およびレポータである vitERE-luc とともに発現させ、エストロゲン依存性の転写活性化への影響をみた。その結果、ER α 1-535はER α のみならずER β による vit-ERE の活性化を容量依存性に阻害し、いわゆるドミナントネガティブ体として働くことがわかった。このER α 1-535発現ユニットをラット受精卵に導入しトランスジェニックラットを作製した。少なくとも2系統(line3とline5)で、ER α 1-535の導入と発現をサザン法およびノザン法で確認した。これら2系統のラットのうち雌を6月齢において手術し Sham 手術群、卵巣摘除群、卵巣摘除後エストロゲン補充群(4週間)にわけて処置し骨量を測定した。Sham 手術群、卵巣摘除群では、トランスジェニックラット群と野生ラット群において有意な差がみられなかった。一方、卵巣摘除後エストロゲン補充群においては野生群でエストロゲン補充によって骨量減少が予防されるに対して、トランスジェニックラット群には骨量減少が予防できず、卵巣摘除群と同程度の骨量減少が観察された。

D. 考察

閉経後女性において低用量 HRT の意義およびコンプライアンスについて検討したところ、(1) 通常の半量(CEE 0.3125 mg/日)の HRT でも骨量は増加し、最高値は+8%にも達した。効果は追跡期間中維持された。(2) 平均閉経後期間15年という高齢者においても HRT は有効であり、また高齢者でのコンプライアンスは良好であった。(3) 低用量 HRT は有害事象が軽度であり使用の継続拒否には直結しなかった。以上より、低用量 HRT は閉経後の骨量減少および退行期骨粗鬆症に対する極めて有効な治療法である

と考えられた。

次に、60歳以上の高齢者骨粗鬆症患者で、老年期骨粗鬆症に対する低用量HRTの1年間の治療効果を骨密度、骨代謝につき検討し、更にビタミンD投与群と比較した。HRT、ビタミンDともに1年間の使用で骨密度維持効果を示した。骨代謝マーカーでは両群ともに血中ALPが減少した。また、HRT群では尿中Ca/Cr比も有意に減少していた。

骨量の新しいマーカーの開発としてHRTの作用点であるERをターゲットとして検索した。ER α のエクソン内の多型性はエクソン4内の1塩基置換を起こしているalleleとして見出され、各genotypeと骨塩量や各種骨代謝マーカーの関連について検討したところ、尿中カルシウム排泄量の多いMM群は、mm群と比べて骨塩量の減少率が速い傾向にあることがわかった。ER α のエクソン内の多型性については報告が少なく、エクソン内に新たな多型性を検出した本研究の意義は大きいと考える。閉経直後の女性は尿中カルシウム排泄量が多く、エストロゲン補充療法により、尿中カルシウム排泄量が減少するという報告もあり、新たなエストロゲン受容体遺伝子の多型性が影響を及ぼしている可能性がある。一方、新たに発見したER β CAリピートの多型解析からER β が骨代謝に関与している可能性が示され、骨量予測に用いる遺伝子マーカーとしての有用性も示唆された。以上、二つのER遺伝子の多型と閉経後女性骨量ならび骨代謝マーカーとの解析を行い、新しいマーカーの開発した。

さらに、今回我々はトランスジェニックにおいてER α とER β 両方のシグナルを阻害すると、骨量を指標にしてエストロゲン補充による骨量減少予防効果に関して抵抗性を示すことを明らかにした。これは、エストロゲンの骨量減少予防作用にER α / β が重要な役割を果たすことを直接示す初めての報告である。また、興味深いことにER α / β の作用を阻害してもSham手術群、卵巣摘除群では骨量に有意な差はみられず、これはER以外の経路で代償されている可能性が示唆された。またこのトランスジェニックはたとえばラロキシフェンなどのエストロゲン関連治療薬がER α / β の作用の減弱時にどのように働くかを検討する実験モデルに応用でき、閉経後骨粗鬆症に対する新しいホルモン補充療法の開発に役立つものと考えられる。

E. 結論

日本人閉経後女性において、また高齢者女性において低用量HRTにて骨量増加効果が十分期待できることが明らかになった。次に、ER遺伝子多型性と骨量、骨代謝マーカーとの関連が認められることを示した。さらに、ER α とER β 両方のシグナルを阻害させた、エストロゲン低応答性トランスジェニックラットを作製し、閉経後骨粗鬆症治療および予防の新しいモデル動物になることを示した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1.論文発表

1) Ogawa S, Hosoi T, Shiraki M, Emi M, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S: Association of estrogen receptor beta (ERbeta) gene polymorphism with bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 269(2), 537-541 (2000)

2) Hoshino S, Hosoi T, Miyao M, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Identification of a novel polymorphism of estrogen receptor alpha gene that is associated with calcium excretion in urine. *J Bone Miner Metab* 18(3), 153-157 (2000)

3) Ogawa S, Fujita M, Ishii Y, Tsurukami H, Hirabayashi M, Ikeda K, Orimo A, Hosoi T, Ueda S, Nakamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S: Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor alpha and beta pathways. *J Biol Chem* 275, 21372-21379 (2000)

2.学会発表

1. 井上聡：[シンポジウム] エストロゲン受容体標的遺伝子とがん (2000.10.4) 第59回日本癌学会(横浜)

2. 井上聡、小川 純人、村松正実、大内尉義：[シンポジウム] エストロゲンレセプターのドミナントネガティブ体と生体機能 (2000.10.14) 第73回日本生化学会(横浜)

3. 井上聡：[シンポジウム] 遺伝子改変技術を用いたエストロゲンレセプターの生態機能解析 (2001.3.10) 第10回性差医学研究会(東京)

4. Ogawa S, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S: Impaired estrogen sensitivity in ERα 1-535 transgenic rats inhibiting both ER alpha and beta pathways, *International Symposium on Nuclear Receptors in Health and Disease*, Stockholm, Sweden (2000.9)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

高齢女性の精神的健康とホルモン補充療法（HRT）

分担研究者 大藏 健義 獨協医科大学越谷病院産科婦人科教授

【研究要旨】（Ⅰ）周期的順次投与法による長期 HRT が脳血流に及ぼす影響に関する検討—結合型エストロゲン(CEE)0.625mg/日または 1.25mg/日を 25 日間投与し、後半の 12 日間に酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)5mg/日または 10mg/日(CEE0.625mg/日に対して MPA5mg/日の割合)を併用投与して、5 日間休薬する周期的順次投与法による HRT を 24 名の閉経後女性に行った。HRT 開始前と開始後に ^{99m}Tc -ECD と SPECT を用いて脳血流を測定した。1 年後、2 年後、3 年後の脳及び小脳の血流量はいずれも 3 週後と同じ程度に有意に増加した。休薬期間を置いた周期的順次投与法では、脳及び小脳血流の改善効果は 3 年間の長期に亘って維持された。（Ⅱ）併用持続療法による HRT が脳血流に及ぼす影響に関する検討（1）通常量併用持続療法—CEE0.625mg/日+MPA2.5mg/日併用持続療法を 15 名の閉経後女性に行い、HRT 開始前と開始後 3 週、半年、1 年に脳血流を測定したが、脳血流量では有意な変化は観察されなかった。小脳血流量は 3 週後と半年後に有意に増加した。しかし、1 年後には小脳血流量の増加は認められず、投与前値のレベルに戻った。したがってこの投与法では、脳血流量と小脳血流量に対する HRT の効果は 3 週後と半年後で乖離が認められたが、1 年後にはその乖離は消失した。（2）低用量（半量）持続併用療法—CEE0.3125mg/日単独または CEE0.3125mg/日+MPA1.25mg/日持続併用療法を閉経後女性に行い、HRT 開始前と開始後 6 週、半年、1 年に脳血流を測定した。脳及び小脳血流量はいずれも 6 週後に有意に増加した。しかし、半年後には脳及び小脳血流量のいずれでも有意な増加は認められなかった。さらに 1 年後には、脳及び小脳血流量はいずれも有意に減少した。CEE+MPA の通常量併用持続投与法で脳血流量の増加が認められなかった理由として、黄体ホルモンの影響だけでなく、エストロゲンの持続投与による脳内エストロゲンレセプターの down-regulation による減少が原因ではないかと推察された。CEE+MPA の投与量を半減した低用量併用持続投与法の 6 週後では、脳及び小脳血流量はいずれも CEE0.625mg/日単独投与と同じ程度に増加した。このことは半量のエストロゲン投与でも脳血流は増加することを示した。同時に、MPA も半減されたため、黄体ホルモンによるエストロゲン効果を抑制する作用は消失したことを示している。しかし、この半量でも持続的に投与を続けるとやはり脳内エストロゲンレセプターの down-regulation により、脳血流増加作用も消失することが推察された。この 1 年後では脳及び小脳血流量はいずれも有意に減少した。

A. 研究目的

エストロゲン補充療法(ERT)は全身に作用し、骨や脂質代謝だけでなく、記憶や脳血流などの脳機能にも影響を及ぼすという重要な作用がある。最近では、ERT を受けていた女性はそうでない女性に比べて、アルツハイマー病発症の危険率が有意に低下したという疫学的調査結果が相次いで報告されている¹⁾。一方、アルツハイマー病の発生と治療におけるエストロゲンの関わりについてそのメカニズムを説明するためには、エストロゲンが脳血流に及ぼす効果を考慮することが重要であるという²⁾。一般的に、ERT が脳血流に及ぼす効果は、ERT の脳機能に及ぼす影響を臨床的に考える際に重要である。

ERT 中に内頸動脈^{3,4)}、中大脳動脈⁴⁾、眼底動脈⁵⁾などをドプラ計測して、血管抵抗が減少し血流量が変化していることを報告した論文はあるが、ERT 中の脳血流そのものを定量的に測定して報告した論文は少ない。平成 10 年度本分担研究⁶⁾、及び平成 8、9 年度文部省科学研究費補助金「研究成果報告書」で著書らは次のような事実を明らかにした。①女性は閉経すると脳血流量が減少する。②閉経後女性に結合型エストロゲン(CEE) 0.625mg/日または 1.25mg/日を 3 週間投与すると、脳血流量はどちらの投与量でも同じ程度に大脳、小脳とも有意に増加する(表 1)。③②の CEE 投与の後半、酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)を 5mg/日または 10mg/日を 8~12 日間併用投与(CEE・MPA の周期的順次投与方法)しても、脳血流の増加率は変わらない(表 1)。④CEE・MPA の周期的順次投与方法による HRT を 1 年間行ったときの脳血流を増加させる効果は②と③の 3 週間投与の場合とほぼ同じであった。⑤3 週間の CEE+MPA 通常量併用持続療法では有意な大脳血流の増加は認められなかった。しかし、さらに長期である 2~3 年間の周期的順次投与方法の効果や、CEE+MPA の長期併用持続療法の効果についてはまだ検討していなかった。したがって、本研究ではこれらの HRT が脳血流に及ぼす効果について検討するとともに、さらに低用量の半量を用いた CEE0.3125mg/日+MPA1.25mg/日では脳血流の推移はどうなるかについても検討した。

B. 研究方法

1. 対象と方法

対象は、獨協医科大学越谷病院産科婦人科更年期外来を受診中で、更年期症状を有するが、脳血管障害を始めとして神経学的徴候を示さない閉経後女性とした。

研究課題(I)と研究課題(II)で用いた脳血流の測定法は technetium-99m ethylcysteinate dimer (99mTc-ECD)と single photon emission computed tomography (SPECT) を用いて、松田らの方法で定量的に測定した。

仰臥位、閉眼、安静状態で、血圧を測定した。99mTc-ECD は右腕内側肘静脈に、21G のトンボ針を留置し、600MBq を生理食塩水 20ml にて、ポーラス投与して、マトリックス 128×128、100 フレーム(F/sec)で収集した。大脳の平均血流量は左右の大脳半球の平均血流量の平均値とした。

基底核と視床を含む断層面から下方へ 9 スライス (9×3.4 mm 幅) 目の画像で得られた小脳のスライス面全体にフリーROI (region of interest) を設定して血流値を求め、これを小脳の平均血流量とした。

脳血流の測定は、午前中に行い、同一人物に関しては同じ時間帯に行った。

尚、脳血流の測定はすべての対象者から同意を得て行った。

研究課題(I)長期間の周期的順次投与方法による HRT が脳血流に及ぼす影響に関する検討
ホルモン補充療法(HRT)を開始したときの対象者 24 名の平均年齢は 50.5±1.0(SE)

歳、平均閉経年数は 3.0 ± 0.6 年であった。以後平均値を示すときは、平均 \pm SE とした。全症例で HRT 開始直前、及び開始後 3 週間と 1 年(平均 13.9 ± 0.5 月)に脳血流を測定した。このうち 22 名では 2 年(平均 25.7 ± 0.4 月)後に、16 名では 3 年(平均 37.7 ± 0.5 月)後に、それぞれ現在までに脳血流を測定済みである。測定は各 HRT 周期の 21 日目及びその前後に行った。HRT は CEE0.625mg/日または 1.25mg/日を 25 日間投与し、後半の 12 日間に MPA5mg/日または 10mg/日(CEE0.625mg/日に対して MPA5mg/日の割合)を併用投与した。5 日間休業して、この周期投与をくり返し行った(周期的順次投与法)。統計学的処理は、paired t-test を用いて検定した。したがって、2 年と 3 年の投与前症例数は、それぞれに対応する 22 名と 14 名であった。

研究課題(II)持続併用療法による HRT が脳血流に及ぼす影響に関する検討

1. CEE0.625mg/日+MPA2.5mg/日持続併用療法(通常量併用持続療法)

HRT を開始したときの対象者 15 名の平均年齢は 50.7 ± 1.4 歳であった。全症例で HRT 開始前と 3 週間後に脳血流を測定した。このうちの 10 名では半年後に、9 名では 1 年後に、それぞれ現在までに脳血流を測定済みである。

2. CEE0.3125mg/日単独または CEE0.3125mg/日+MPA1.25mg/日併用持続療法(低用量併用持続療法)

HRT を開始したときの対象者 18 名の平均年齢は 58.7 ± 4.4 歳であった。このうちの 7 名は子宮摘出済みで CEE 単独とし、残りの 11 名では MPA を併用していずれも持続投与を行った。投与前直前と投与開始後 6 週(n=18)、半年(n=14)、及び 1 年 (n=5) に脳血流を測定して比較した。

C. 研究結果

1、研究課題(I)

a. 大脳血流量

HRT 前後の大脳血流量(CBF)の推移と変化率を表 1 に示した。3 週後、1 年後、2 年後、3 年後の平均 CBF は、いずれも投与前値に対して有意に増加した。平均増加率は 4.8 ~ 7.4%で、各増加率間に有意差はなかった。

表 1 長期 HRT(CEE・MPA の周期的順次投与法)前後の大脳血流量(CBF)の推移と変化率

	投与前値 (n=24)	3 週後 (n=24)	1 年後 (n=24)	2 年後 (n=22)	3 年後 (n=16)
CBF (ml/100g/分)	44.7 ± 1.0	$48.0 \pm 1.1^{***}$	$47.2 \pm 1.0^{***}$	$46.5 \pm 1.0^*$	$46.5 \pm 1.3^{**}$
変化率		7.4 ± 1.1	5.6 ± 1.3	4.8 ± 1.8	5.4 ± 1.8

平均 \pm SE. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001 vs 投与前値
変化率は、投与前値に対して何%変化したかを示している。