

29. 堀江公仁子、坊農秀雄、岡崎康司、井上聡：ゲノム情報に基づく新規アンドロゲン応答配列群の同定 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
30. 秋下雅弘：[シンポジウム]生活習慣病に及ぼすテストステロンの影響。性ホルモンと生活習慣病：基礎と臨床 (2003.5.9) 日本内分泌学会総会 (横浜)
31. 小林久美子、秋下雅弘、園原和樹、町田綾子、鳥羽研二：物忘れ外来患者における炎症性サイトカインと脈波速度の関連 (2004.7.23) 第 36 回日本動脈硬化学会総会 (福岡)
32. 秋下雅弘、山田思鶴、鳥羽研二：虚弱高齢女性におけるアンドロゲン濃度と日常生活機能との関係および運動療法の効果 (2004.6.25) 第 77 回日本内分泌学会総会 (京都)
33. 小林久美子、秋下雅弘、鳥羽研二：高齢男性患者におけるアンドロゲン濃度と脈波伝播速度 (2004.6.25) 第 77 回日本内分泌学会総会 (京都)
34. 秋下雅弘：[シンポジウム]生活習慣病に及ぼすテストステロンの影響。性ホルモンと生活習慣病：基礎と臨床 (2003.5.9) 日本内分泌学会総会 (横浜)
35. 黄錦鴻、浅輪珠恵、高戸毅、堺隆一：マウス高転移性メラノーマ細胞の細胞運動における Fyn と cortactin の協調的役割 (2003.9.25-27) 第 62 回日本癌学会総会 (名古屋)
36. 東浩太郎、堀江公仁子、井上聡、大内尉義、堺隆一：細胞膜近傍におけるエストロゲン受容体  $\alpha$  の機能解析 (2003.9.25-27) 第 62 回日本癌学会総会 (名古屋)
37. 田中正光、鎌田礼子、堺隆一：Eph 受容体/Ephrin による細胞接着制御の解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
38. 東浩太郎、田中正光、井上聡、横田淳、大内尉義、堺隆一：骨肉腫細胞の転移性に関わる paxillin のチロシンリン酸化亢進 (2004.9.29-10.1) 第 63 回日本癌学会学術総会 (福岡)
39. 田中正光、鎌田礼子、堺隆一：Eph 受容体/Ephrin による細胞接着制御の解析 (2004.9.29-10.1) 第 63 回日本癌学会学術総会 (福岡)
40. 堺隆一、三宅泉、箆島裕子、浅輪珠恵：神経芽腫におけるドッキング分子 ShcC のリン酸化の意味 (2004.11.21-22) 第 20 回日本小児がん学会 (京都)
41. 池田和博、菱沼俊樹、津久井通、村松正實、井上聡：ラット脳におけるエストロゲン標的遺伝子の網羅的探索 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
42. 野本 聡、池田和博、趙建宏、香山不二雄：ラットの子宮において DRE1 という仮想的なアクチン結合タンパク質の mRNA のエストロゲンを介した不安定性 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
43. 保母るつ子、池田和博、竹田省、井上聡：エストロゲン応答遺伝子 COX7RP の子宮内膜癌における発現とその機能 (2004.4.10-13) 第 56 回日本産科婦人科学会 (東京)
44. 池田和博、保母るつ子、竹田省、井上聡：細胞増殖におけるエストロゲン応答遺伝子 COX7RP の役割 (2004.12.8-11) 第 27 回日本分子生物学会 (神戸)
45. 近藤宇史：[シンポジウム]Role of intranuclear translocation of glutathione S-transferase in the acquisition of cancer cells to drug-resistance (2003.8.20-22) 国際レドックスシンポジウム (札幌)
46. 近藤宇史：婦人科癌における GST  $\pi$  の核内局在の関連 (2003.9.25) 第 62 回日本癌学会 (名古屋)
47. 近藤宇史：Mitochondria-mediated

- caspase-independent apoptosis induced by doxorubicin in human lung cancer cells (2003.10.15-18) 第 76 回日本生化学会 (東京)
48. 近藤宇史: Melatonin inhibits VEGF gene expression by Doxorubicin (2003.10.15-18) 第 76 回日本生化学会 (東京)
49. 近藤宇史: [シンポジウム] 老化を制御するシグナル: エネルギー代謝とストレス応答の交差点—酸化ストレス性細胞障害を防御するシグナル伝達と細胞内アンチオキシダントによる制御 (2004.11.6) 第 26 回日本基礎老化学会シンポジウム (東京)
50. 近藤宇史: 心筋芽細胞の参加ストレス障害に対するエストラジオールの防御作用の機構 (2004.10.28) 第 28 回日本過酸化脂質・フリーラジカル学会 (名古屋)
51. 近藤宇史: 核内グルタチオン S-トランスフェラーゼ  $\pi$  による酸化的 DNA 障害の抑制 (2004.10.28) 第 28 回日本過酸化脂質・フリーラジカル学会 (名古屋)
52. 近藤宇史: 核内グルタチオン S-トランスフェラーゼ  $\pi$  による酸化的 DNA 傷害の抑制 (2004.9.29-10.1) 第 63 回日本癌学会学術総会 (福岡)
53. 近藤宇史: 原発性脳腫瘍の放射線耐性機序における小胞体分子シャペロンの役割(2004.9.29-10.1) 第 63 回日本癌学会学術総会 (福岡)
54. 近藤宇史: ER retention of calreticulin and structural implications (2004.10.16) 第 77 回日本生化学会大会 (横浜)
55. 近藤宇史: Protective effect of Estradiol on oxidative stress-induced apoptosis-implication of redoxregulation (2004.10.16) 第 77 回日本生化学会大会 (横浜)
56. 近藤宇史: Nuclear glutathione S-transferase  $\pi$  prevents apoptosis by reducing the oxidative stress-induced formation of exocyclic DNA adducts. (2004.10.16) 第 77 回日本生化学会大会 (横浜)
57. 近藤宇史: [特別講演]老化研究の最前線 (2004.11.16) 第 291 回日本皮膚科学会地方会 (長崎)
58. 武山健一、大竹史明、加藤茂明: [シンポジウム] (2003.10.15-18) 第 76 回日本生化学会 (横浜)
59. 武山健一、松本高広、加藤茂明: アンドロゲンレセプター転写制御機構における転写共役因子群の分子遺伝学的解析 (2004.6.24-26) 第 77 回日本内分泌学会学術総会 (京都)
60. 柳澤純: [シンポジウム] ユビキチン・ネットワークによる核内レセプターの制御(2003.12.12) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
61. 川辺洋一、柳澤純: [シンポジウム] エストロゲンレセプター (ER  $\alpha$ ) の制御機構(2003.12.11) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
62. 津久井通、今澤由紀子、大羽沙弥佳、浦野友彦、藤田雅代、佐藤美幸、村松正實、井上聡: BGP コンディショナルトランスジェニックマウスにおける骨代謝の解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
63. 津久井通、今澤由紀子、大羽沙弥佳、藤田雅代、浦野友彦、村松正實、井上聡: BGP コンディショナルトランスジェニックマウスにおける骨代謝の解析 (2004.11.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
64. 今澤由紀子、津久井通、大羽沙弥佳、栗原真紀、堀江公仁子、村松正實、井上聡: Cre/LoxP システムを用いた骨代謝におけるエストロゲンシグナルの解析 (2004.11.8-11) 第 27 回日本分子生物学会年会 (神戸)
65. 大羽沙弥佳、津久井通、今澤由紀子、池田和博、堀江公仁子、久武幸司、朧泰壽、村松正實、井上聡: トランスジ

エニックマウスを用いた卵巣における  
エストロゲンシグナルの解析  
(2004.11.8-11) 第 27 回日本分子生物学  
会年会 (神戸)

66. 津久井通、大羽沙弥佳、今澤由紀子、  
井上聡 : Analysis of ovarian function in

conditional transgenic mice by  
overexpressed ER  $\alpha$  and ER  $\beta$  .  
(2005.1.22-23) 平成 16 年度 内分泌攪  
乱物質の環境リスク国際シンポジウム  
(京都)

分 担 研 究 報 告 書

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書（総合）

血管の老化と動脈硬化におけるステロイド作用機構の解明と応用

分担研究者 秋下 雅弘

東京大学大学院医学系研究科加齢医学助教授

【研究要旨】

性ステロイドと動脈硬化の関係について基礎的・臨床的研究を行った。ラットを用いた検討では、血中エストロゲン濃度が上昇しない程度のエストロゲン投与量でも頸動脈内膜肥厚は十分に抑えられ、しかも有害反応は最小限であった。また、血管平滑筋細胞のエストロゲン応答遺伝子をマイクロアレイにより探索し、エストロゲンに反応して増加する4つの遺伝子、caveolin-1、SmLIM、enigma、Id3a を同定した。アデノウイルスベクターを用いた発現実験では、エストロゲンによる血管平滑筋細胞増殖抑制には ER $\beta$  が、心筋線維芽細胞増殖抑制作用には ER $\alpha$  と ER $\beta$  が関与することがわかった。高齢患者における血中アンドロゲン濃度と動脈硬化指標を横断的に解析したところ、高齢男性ではテストステロンの低下が動脈硬化の進展に関係する可能性が見出された。さらに、虚弱高齢男性を対象とした横断研究では、テストステロン濃度は日常生活活動度、認知機能、意欲と有意な相関を示し、テストステロンの低下が日常生活機能の全般的低下に関係することがわかった。これら性ステロイドと動脈硬化に関する研究結果は、老年病の予防・治療に寄与すると考えられる。

A. 研究目的

動脈硬化には性差と閉経の影響がみられ、その主因はエストロゲンの抗動脈硬化・血管保護作用であるとされる。実際、観察研究では、エストロゲンによるホルモン補充療法（Hormone Replacement Therapy, HRT）を行っている閉経後女性における動脈硬化性疾患の発症頻度は行っていない女性の約半分であった。一方、最近米国で行われた大規模臨床試験 Women's Health Initiative では、閉経後女性に対する通常の HRT により動脈硬化性疾患はむしろ増加してしまい、血栓症などエストロゲンの有害作用を減らす工夫が必要とされるようになった。そのような観点から、臨床的には低用量補充療

法の有用性が検討されつつあり、半量でも血管内皮機能改善作用は保持しつつ凝固・線溶系や脂質、炎症に対する好ましくない作用がみられないことが報告されている。このような低用量エストロゲンの動脈硬化に対する効果を有害作用とのバランスから検討することを一つの目的とし、ラット内膜肥厚モデルを用いた研究を行った。また、エストロゲンの血管作用を網羅的に解析する目的で、マイクロアレイを用いてラット血管平滑筋でエストロゲンに反応する遺伝子を探索した。エストロゲンの血管作用の特異性についてさらに検討するため、アデノウイルスベクターを用いてエストロゲン受容体（ER）サブタイプの発現実験を行った。

これらの研究成果は、血管特異的に好ましい作用を発揮しうる HRT あるいは選択的エストロゲン受容体調節薬など HRT の代替療法の効果を検討する基礎となるものと考えられる。

本研究ではさらに、男性ホルモンのテストステロンと副腎由来アンドロゲンである Dehydroepiandrosterone (DHEA) 血中濃度の動脈硬化における意義を検討することを目的とした。従来、エストロゲンの抗動脈硬化作用に対してテストステロンは動脈硬化促進的に働くと考えられてきた。実際、筋肉増強目的など健常人におけるテストステロン服用はアンドロゲン過剰状態を作り出し、循環・代謝異常を来す。しかし最近では、高齢男性におけるアンドロゲン濃度の低下が動脈硬化性疾患の危険因子であることを示唆する報告が多くみられるようになった。そこで、高齢患者を対象として動脈硬化関連指標と血中アンドロゲン濃度との関連を検討するとともに、日常生活機能の軽度低下した高齢男性を対象として血中テストステロン濃度と日常生活機能との関連について横断的検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 低用量エストロゲンの内膜肥厚抑制効果

1) 薬剤投与と頸動脈傷害モデルの作成: 10 週齢の Wistar 系雌性ラットを用いた。全体を 10 群に分け、9 群に卵巣摘出手術を残りの 1 群に sham 手術を行った。4 日間の回復期間の後、6 群は水溶性  $17\beta$ -estradiol もしくは対照溶媒を充填した浸透圧ポンプ (Alza) を背部皮下に植え込んだ。エストロゲンの効果と比較する目的で、残りの 3 群に対してはアンジオテンシン II タイプ 1 受容体拮抗薬カンデサルタンとその対照溶媒を充填した浸透圧ポンプを植え込んだ。3 日後に左頸動脈に対するバルーン傷害手術を行った。麻酔下に左総頸動脈とその分枝を露

出し、内頸動脈より挿入した血栓除去用 2F Fogarty バルーンカテーテルを用いて総頸動脈内を擦過し、血行再建を行って手術を終了した。これらすべての動物実験は東京大学の実験動物指針にしたがって実施した。

2) 血中ホルモンと脂質の測定: バルーン傷害手術 2 週間後、体重測定とテイルカフ法による血圧測定を行い、16 時間の絶食後に麻酔下で脱血屠殺した。採血した血液を用い、高感度 RIA による estradiol, estrone, progesterone の測定、酵素法による総コレステロールとトリグリセリド測定、およびヘパリン Ca-Ni 法による HDL-コレステロールの測定を行った。

3) 組織計測: 脱血屠殺後、ホルマリン緩衝液により 100 mmHg で圧還流固定した。子宮を摘出し、重量を測定した。左頸動脈を摘出し、後固定・パラフィン包埋した。5 枚の亜連続横断切片を Elastica van Gieson 染色し、コンピューター取り込み画像から画像解析ソフトを用いて内膜と中膜面積を計測した。

### 2. ラット血管平滑筋のエストロゲン応答遺伝子検索

1) 動物処置と RNA 調整: 8 週齢の Wistar 系雌性ラットを用いた。全体を 3 群に分け、2 群に卵巣摘出手術を、残りの 1 群 (Sham, n=4) に sham 手術を行った。2 週間の回復期間の後、卵巣摘出の 1 群 (OVX-E, n=5) には 3 週間徐放  $0.5\text{ mg } 17\beta$ -estradiol ペレット (Innovative Research) を、他の 2 群 (OVX+V, n=5; Sham) にはプラセボペレットを植え込んだ。2 週間後に脱血屠殺し、胸部大動脈を分離摘出した。血清 estradiol 濃度は Sham 群で  $5.6\pm 1.5\text{ pg/ml}$ 、OVX+V 群で  $2.8\pm 1.0\text{ pg/ml}$ 、OVX+E 群で  $74.5\pm 12.1\text{ pg/ml}$  であった。摘出した胸部大動脈は、カミソリ刃で内皮を剥落した後、すみやかに液体窒素中で凍結した。プールした各群の大動脈組織は Isogen を用いて RNA に調整した。

2) マイクロアレイ:各群2プールの total RNA 1  $\mu$ g から約 100  $\mu$ g の cRNA を増幅し、high-density oligonucleotide microarray (GeneChip Rat GenomeU34A, Affymetrix) とハイブリダイズさせた。このマイクロアレイは、約 7000 種のラット遺伝子に対応するプローブを含む。OVX+V 群の発現量に対して OVX+E 群で 1.5 倍以上の変化を示した遺伝子を同定した。

3) 大動脈組織および培養血管平滑筋細胞における発現確認:ラット大動脈組織における mRNA 発現量の確認は、total RNA 1  $\mu$ g と各遺伝子特異的プライマーを用いた real-time PCR により行った。培養血管平滑筋細胞は Wistar ラット胸部大動脈由来平滑筋細胞を用い、confluent に達した後 100 nM 17 $\beta$ -estradiol もしくは対照溶媒を含む培養液に置き換え 24 時間後に細胞を回収した。total RNA を調整し、各遺伝子の発現を Northern blot により検討した。

### 3. 血管平滑筋細胞 (VSMC) および心筋線維芽細胞 (CF) 増殖における ER サブタイプの役割

1) 細胞培養:ラット VSMC は酵素法により Wistar ラットの大動脈から、ラット CF は Wistar ラット胎仔心臓から従来の報告に従い得た。ヒト大動脈由来 VSMC は Clonetics 社より購入した。細胞は 10% ウシ胎児血清 (Intergen), 25mM HEPES (pH7.4) ペニシリン (100 U/ml), ストレプトマイシン (100  $\mu$ g/ml) を添加した Dulbecco's 変法 Eagle's 培地 (DMEM; Nikken Bio Medical Laboratory) にて、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で 37°Cで培養し、第 6-10 継代の細胞を使用した。また E2 を用いる実験では、dextran-coated charcoal にて処理しステロイドを除去した FBS (DCC-FBS)および弱いエストロゲン作用を有する phenol red を含まない DMEM (phenol red-free DMEM)を用いた。

2) ER を組み込んだアデノウイルスベクターの作成および細胞への感染:

CMV-IE エンハンサー、ニワトリ  $\beta$ -アクチンプロモーターおよびヒト ER  $\alpha$ 、ER  $\beta$  と ER  $\beta$  のドミナントネガティブ変異型を組み込んだ複製欠失型アデノウイルスベクターをアデノウイルス発現ベクターキット (Takara) を用いて作成し、それぞれ以下、AxCAER  $\alpha$ 、AxCAER  $\beta$  および AxCAERDN  $\beta$  と命名した。アデノウイルスの感染は、ウイルスをディッシュに定めた培養液量で 2 時間細胞に曝露させ、その後 phosphate-buffered saline (PBS)にて 1 回洗浄し培養液を交換後、各実験を行った。

3) VSMC および CF の増殖:増殖については、DNA 合成の指標としての [<sup>3</sup>H]-thymidine 取り込みと細胞数の算定により検討した。24-well プレート上に細胞を 70-90%コンフルエントまで培養し、phenol red-free RPMI1640 に置き換え、増殖停止させた。24 時間後、17- $\beta$  estradiol (E2; Sigma Aldrich) を含む 5% DCC-FBS で 24 時間刺激し、次いで [<sup>3</sup>H] thymidine 1  $\mu$ Ci/ml によるパルス標識を 3 時間行、取り込まれた [<sup>3</sup>H]-thymidine の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測した。6-well に細胞をまき、70-90%コンフルエントになるまで培養したところで phenol-red-free RPMI1640 に置き換え、24 時間増殖停止させた。5%DCC-FBS を含む phenol-red-free RPMI1640 に E2 または vehicle を添加したものに置き換え、さらに 48 時間培養した。細胞はトリプシン処理して懸濁させ、Coulter Counter を用いて細胞数をカウントした。

4) 遺伝子導入およびルシフェラーゼアッセイ:レポータープラスミドとして、ERE-TK-Luc レポータープラスミドおよびホタルルシフェラーゼレポーターベクターを使用した。VSMC もしくは CF へウイルス感染後、FuGENE6 (Roche)を用いて ERE-TK-Luc レポータープラスミドおよび pRL-SV40 コントロールプラスミドをプロトコールに従って細胞へ遺伝子

導入を 24 時間 10% DMEM 中で行った。その後 PBS で培養液を洗浄し、続いて 1% phenol red-free RPMI1640 に交換し 24 時間培養し、その後 E2 あるいは vehicle を含む 1% phenol red-free RPMI1640 に交換し 24 時間培養した。細胞を lysis buffer で溶かし回収し、プロトコールに従ってルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。

5) ウェスタンブロット法: VSMC もしくは CF を 10cm ディッシュ上にまきコンフルエント後、発現ウイルスベクターを感染させ、その後 PBS で洗浄し phenol red-free RPMI1640 で 24 時間培養した。RIPA バッファーに溶解させたサンプルは 12% SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロースメンブレンにブロットし、抗 ER  $\alpha$  ポリクロナール抗体 (H-184, Santa Cruz) もしくは抗 ER  $\beta$  ポリクロナール抗体にて免疫ブロットを行い、ECL システム (Amersham) で検出した。

#### 4. 高齢患者における血中アンドロゲン濃度と動脈硬化指標との関連

1) 対象: 杏林大学医学部付属病院高齢医学科物忘れ外来通院中の症例を対象とした。脳卒中、冠動脈疾患、閉塞性動脈硬化症の既往例は除外し、アルツハイマー型痴呆もしくは軽度認知機能障害と診断された症例で、合計 134 名 (男性 46 名、女性 88 名)、年齢  $76 \pm 7$  歳 (平均  $\pm$  SD) を解析に用いた。

2) 測定項目: アンドロゲンとして、遊離テストステロン (free-T)、Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)、動脈硬化関連マーカーとして高感度 CRP、interleukin (IL)-6、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  の血中濃度を測定した。また、血管硬化度の指標として脈波伝播速度 (PWV) を、日本コーリン製 form PWV/ABI を用いて、上腕～足首間の PWV として測定した。さらに、脳 MRI の FLAIR 画像から白質の虚血病変のうち脳室周囲

白質病変 (periventricular hyperintensity, PVH) を Junqué の重症度分類 (PVH スコア、0~40) により、深部白質病変 (deep white matter hyperintensity, DWMH) とともに定量評価した。

3) 統計解析: 高感度 CRP、MCP-1、IL-6、TNF- $\alpha$  は、正規分布をとるよう対数変換して解析に用いた。各指標間の相関は Pearson の単相関係数により計算した。多因子の解析は重回帰分析により行った。P<0.05 を有意と判定した。

4) 倫理面への配慮: 杏林大学「医の倫理委員会」の承認を得て実施した。

#### 5. 虚弱高齢男性における血中テストステロン濃度と日常生活機能

老人保健施設 (まほろばの郷、長野県塩尻市) に通所もしくは入所中の高齢男性 54 名 (70-95 歳、平均  $82 \pm 6$  (SD) 歳) を対象とした。悪性腫瘍、内分泌疾患、急性疾患、低栄養は除外した。一般血液検査に加え、血中総テストステロン、遊離テストステロン濃度を測定し、日常生活機能として基本的 ADL (Barthel Index)、手段的 ADL (Lawton & Brody)、認知機能 (改訂長谷川式, HDSR)、うつ (GDS)、意欲 (Vitality Index) との関係について解析した。杏林大学「医の倫理委員会」による承認を得て行った。

### C. 研究結果

#### 1. 低用量エストロゲンの内臓肥厚抑制作用

表 1 に各群の血圧、血清脂質、ホルモン、体重および子宮重量を示す。卵巣摘

表 1. 各群の血圧、血清脂質、ホルモン濃度、体重および子宮重量

Item	OVX + E2 ( $\mu$ g/kg/d)						OVX + candesartan ( $\mu$ g/kg/d)		
	0	0.2	1	2	10	20	0	2	20
No. of rats	7	10	6	4	6	5	4	4	4
SBP (mmHg)	121.4	113.2	123.2	120.2	127.2	121.4	121.7	122.2	116.8
TC (mg/dl)	78.9	75.5	85.4	78.10	84.8	95.5*	113.3**	79.2	89.4
HDL-C (mg/dl)	20.2	21.3	20.2	15.3	23.2	27.1	30.1*	17.2	21.2
Triglyceride (mg/dl)	41.5	53.8	45.9	64.16	81.13*	87.210*	153.25**	64.1	25.6
E2 (pg/ml)	19.4**	8.1	9.1	12.2	20.2**	54.65**	96.93**	11.3	11.1
Pro (ng/ml)	20.5	13.2	6.3	21.5	9.2	11.3	5.2	16.4	21.8
Body weight (g)	269.6	282.8	281.8	260.5	264.6	257.5*	263.7	285.10	290.25
Uterus (mg)	661.102**	1742.0	321.23	577.46*	511.276*			1482.2	140.5

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*, P<0.05, \*\*, P<0.01 vs OVX+0  $\mu$ g/kg/d of E2. E2, 17 $\beta$ -estradiol; SBP, systolic blood pressure; TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; E1, estrone; Pro, progesterone

出後の E2 補充により用量依存的に血清 E2 濃度は増加し、2  $\mu\text{g/kg/day}$  の E2 補充で sham 手術群と同等の血清 E2 濃度に達した。すべての群で血清 estrone 濃度は測定感度以下で、progesterone 濃度は変化しなかった。血清総コレステロール、トリグリセリド、HDL コレステロールはすでに報告されているように高用量補充群で増加したが、2  $\mu\text{g/kg/day}$  もしくはそれ以下の用量の E2 では変化しなかった。体重は高用量群で低下したのに対し、子宮重量は用量依存的に E2 補充で増加し、低用量でも補充なしに比べて有意な増加を示した。

ラット頸動脈の新生内膜肥厚は E2 補充により濃度依存性に減少し、0.2  $\mu\text{g/kg/day}$  の E2 補充でも有意な効果がみられた (図 1、図 2)。2  $\mu\text{g/kg/day}$  もしくはそれ以下の用量の E2 による効果が 20  $\mu\text{g/kg/day}$  のカンデサルタン投与と同等の効果であった点は特記すべき点である。

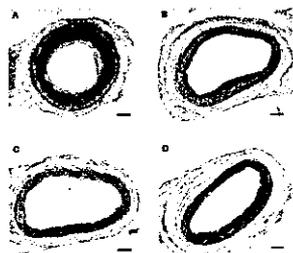
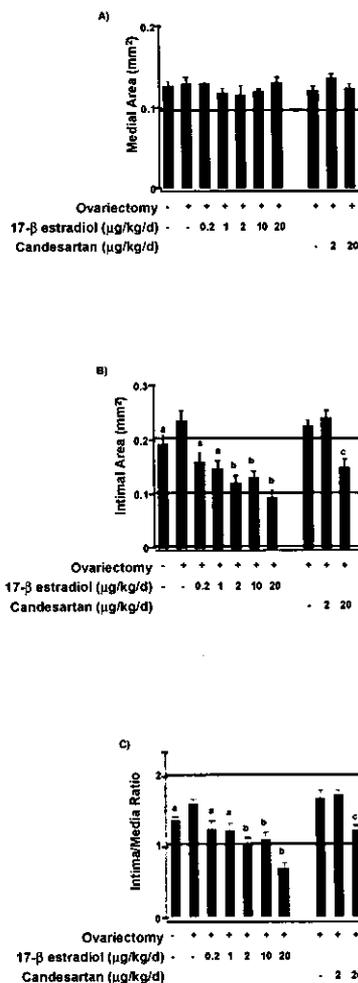


図 1. 頸動脈バレーン傷害 2 週間後の代表的横断面標本 (Elastica van Gieson 染色)。A, 対照溶液投与; B, 0.2  $\mu\text{g/kg/day}$  17 $\beta$ -estradiol 投与; C, 20  $\mu\text{g/kg/day}$  17 $\beta$ -estradiol 投与; D, 20  $\mu\text{g/kg/day}$  candesartan 投与

## 2. 血管平滑筋におけるエストロゲン応答遺伝子の同定

検索した約 7000 遺伝子のうち、約 2000 の遺伝子が大動脈組織に存在すると考えられた。表 2 にマーカー遺伝子の発現を示すが、G3PDH が各群で同等に発現している点はマイクロアレイの系が適切に行われたことを、平滑筋マーカーの SM22 が高発現し内皮マーカーの von Willebrand factor と endothelial nitric oxide synthase の発現が極めて低かった点は用いた大動脈

図 2. ラット頸動脈バレーン傷害 2 週間後の組織計測による中膜面積 (A)、内膜面積 (B)、内膜/中膜面積比 (C) の評価。データは mean $\pm$ SEM で示す。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. 卵巣摘出 + 17 $\beta$ -estradiol (-), † $P < 0.01$  vs. 卵巣摘出 + candesartan (-)



組織が平滑筋組織に由来することを意味する。アンジオテンシン変換酵素が OVX+E で低発現であった点は報告通りだが、その他のマーカー遺伝子について

表 2. マーカー遺伝子と従来報告のあるエストロゲン応答遺伝子の発現

Accession No.	Definition	Sham (intensity)	OVX+v (intensity)	OVX+E (intensity)
M17701	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	1278.5	1232.6	1246.0
M83107	SM22	4350.8	4487.8	4631.9
U50044	von Willebrand	8.7	-54.8	-19.8
AF110508	内皮型-酸化窒素合成酵素	48.4	48.1	45.3
M90065	アンジオテンシン I 受容体	-7.5	5.1	4.2
U03734	アンジオテンシン変換酵素	216.6	239.9	148.3
X06769	c-fos	1600.1	307.7	231.8
S64044	プロゲステロン受容体	61.3	31.7	39.8
X07467	glucose-6-phosphate dehydrogenase	474.0	352.1	454.2
Y00396	c-myc	44.4	36.3	33.3

は必ずしも過去の報告のような変動を示さなかった。結局、20 遺伝子を候補遺伝子として選び出し、real-time PCR とあわせて発現レベルを評価した。最終的に 4 つの遺伝子、caveolin-1, enigma, SmLIM, Id3a がエストロゲン応答遺伝子として同定された。表 3 にこれら 4 遺伝子のマイクロアレイ結果を、図 3 に real-time PCR

表3. DNAマイクロアレイにより同定された 4 遺伝子の発現レベル

Accession No.	Definition	Sham (Intensity)	OVX+V (Intensity)	OVX+E (Intensity)	OVX+E / OVX+V
U48247	Enigma	288.3	128.8	455.5	3.5
Z46814	Caveolin1	874.3	329.1	894.4	2.1
U44948	SmLIM1	1288.9	1260.7	2054.9	1.6
AF000942	Id3a	201.7	224.6	318.3	1.4

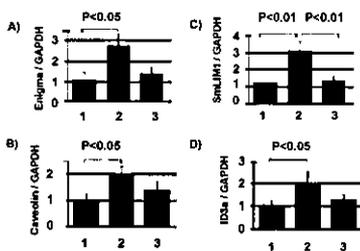


図3. 4つのエストロゲン応答遺伝子、enigma (A)、caveolin-1 (B)、SmLIM (C)、Id3a (D)のreal-time PCRによる発現解析。OVX+V (lane 1, n=5), OVX+E (lane 2, n=5), Sham (lane 3, n=4)からえた大動脈組織を解析した。

の結果を示すが、いずれの遺伝子もエストロゲン補充により 2~3 倍に発現が増加している。逆にエストロゲン補充で発現が低下する遺伝子は同定されなかった。最後に、培養血管平滑筋細胞を用いた検討では、やはり 4 遺伝子ともに E2 添加で発現が 1.5~2 倍に増加し、エストロゲンに応答することを確認した (図 4)。

### 3. VSMC における ER サブタイプの増殖抑制作用

ERE レポータープラスミドのルシフェラーゼ活性の内因性 ER による転写活性を、E2 の VSMC 増殖抑制作用については DNA 合成能をそれぞれ検討した。E2 は vehicle に比べ ERE レポータープラスミドのルシフェラーゼ活性を約 3 倍高め、

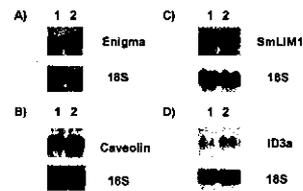


図4. ラット培養血管平滑筋細胞における4遺伝子の発現とエストロゲンの効果。大動脈由来平滑筋細胞を対照溶液 (lane 1) もしくは100 nmol/L 17β-estradiol (lane 2) にて24時間刺激後回収し、遺伝子発現をノーザンブロットにて解析した。

そして VSMC の増殖を用量依存的に 10% 程度まで抑制した。次に、アデノウイルスを用いて ER サブタイプを過剰発現して同様の実験を行った。ノーザンおよびウェスタンブロットでは、内因性の ER サブタイプ発現は検出できなかったのに対し、感染させた VSMC では MOI に依存して遺伝子およびタンパクの発現レベルが著明に増加した。AxCALacZ を VSMC に感染させると、DNA 合成は 30 MOI 以上では用量依存性に減少した。そこで、アデノウイルスが DNA 合成に影響しない 30 MOI 以下で検討を行った。図 5 および図 6 に示したように、AxCAER α を

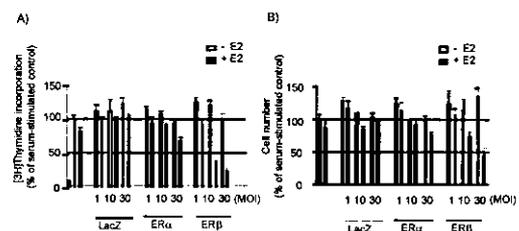


図5. VSMC増殖に対するERサブタイプ過剰発現の効果。3種類のアデノウイルスベクター (AxCALacZ, AxCAER α, AxCAER β) を感染させたラットVSMCを、E2 100 nmol/L 存在下もしくは非存在下で、5% DCC-FBSにより増殖させ、[3H]thymidineの取り込み (A) および細胞数 (B) を測定した。

感染させた VSMC では DNA 合成の抑制作用は E2 の存在にかかわらず増強効果は 30 MOI でわずかに認める程度であった。対照的に、AxCAER β を感染させた VSMC では、5 MOI 以上では E2 の存在下で DNA 合成の抑制作用は増強し、10 MOI では約 50 %減少させた (図 5、図 6)。これに並行して、48 時間 5% DCC-FBS で刺激した VSMC 細胞数の増加は、AxCAER

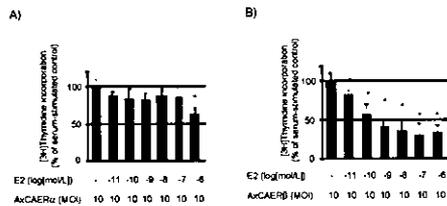


図6. VSMC増殖に対するERサブタイプ過剰発現の効果；E2の濃度依存性

AxCAER $\alpha$  (A) もしくはAxCAER $\beta$  (B) を感染させたラットVSMCを、表示したE2存在下で5% DCC-FBSにより増殖させ[3H]thymidineの取り込みを測定した。\* $p < 0.05$  vs. E2 (-)

$\beta$ で感染させたVSMCではE2の存在下で10および30 MOIにて減少を認めたが、AxCALacZ または AxCAER $\alpha$ で感染させたVSMCにおいては減少を認めなかった(図5)。また、10 MOIのAxCAER $\beta$ を感染させたVSMCでは0.01 nmol/Lという低濃度のE2においても、DNA合成は有意に抑制された(図6)。一方、この作用はAxCAER $\alpha$ で感染させたVSMCではほとんど認められなかった(図6)。さらに、AxCAER $\beta$ を感染させたVSMCでの抑制作用はAxCAERDN $\beta$ の共感染で用量依存的に減弱した(図7)。VSMC増

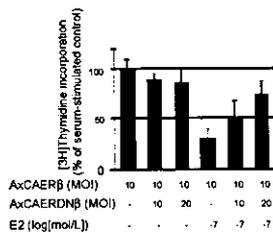


図7. ER $\beta$ に対するドミナントネガティブERの拮抗作用  
ラットVSMCにAxCAER $\beta$ 単独感染もしくはAxCAERDN $\beta$ の共感染によりドミナントネガティブERを発現させ、E2 100 nmol/L存在下もしくは非存在下で[3H]thymidineの取り込みを測定した。

殖抑制作用におけるER $\alpha$ とER $\beta$ のヘテロ二量体化の効果を検討するために、AxCAER $\alpha$ 及びAxCAER $\beta$ で感染したVSMCにおいてthymidineの取り込みを測定したが、拮抗作用は認められなかった。同様にヒトVSMCを用いて行った増殖実験では、やはりAxCAER $\beta$ を感染させた場合にのみ増殖抑制の増強効果を認めた。

COS-7細胞に非感染あるいは

AxCALacZを感染させた場合、ERの転写活性はE2の添加によって変化しなかった。しかし、AxCAER $\alpha$ およびAxCAER $\beta$ を感染させると、E2存在下でERの転写活性は以前示した研究と同様に増加した。以上のことからアデノウイルスベクターにより過剰発現させたER $\alpha$ またはER $\beta$ は転写因子として機能することを確認した。そこで、同様にVSMCへERを過剰発現させたときに、転写活性を加算的に増加させるかどうかを検討した。その結果、10 MOIにてAxCAER $\alpha$ またはAxCAER $\beta$ を感染させたVSMCにおける転写活性は若干増加し、AxCADNER $\beta$ の共感染にて活性はほぼ完全に消失した。

#### 4. CFにおけるERサブタイプの増殖抑制作用

ラットCFにおける内因性のERの発現を検討するためにRT-PCR法にて検討し、ER $\alpha$ およびER $\beta$ ともに発現を認めた。次に、CFの細胞増殖に対するE2の作用を検討するためにDNA合成を検討したところ、生理的濃度(～100 nmol/L)のE2はCFの増殖を最大で約10%抑制した。

AxCALacZを60 MOI以上で感染させるとMOI依存性にDNA合成を抑制させた(図略)。したがって、アデノウイルス自身によるDNA合成に対する影響を受けない60 MOI以下でDNA合成を検討した。AxCALacZを感染させたCFではE2によるDNA合成の抑制作用に影響を与えなかった。一方、AxCAER $\alpha$ あるいはAxCAER $\beta$ を10 MOI以上で感染させたCFにおいてDNA合成は有意に抑制され、その作用はMOI依存적であり、効果は両サブタイプでほぼ同等であった(図8)。また、この増殖抑制作用は低濃度のE2においても十分にみられた。ERサブタイプを過剰発現させたCFにおける抑制作用が実際にERを介しているかを検討するために、AxCAER $\alpha$ あるいはAxCAER $\beta$ とAxCADNER $\beta$ を共感染させ

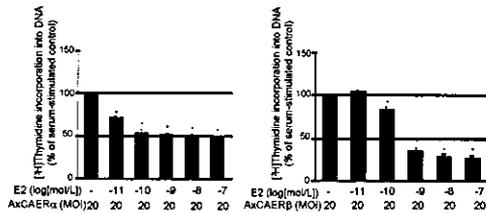


図8. CF増殖に対するERサブタイプ過剰発現の効果  
AxCAER $\alpha$  (A) もしくはAxCAER $\beta$  (B) を感染させたラットCFを、  
表示した E2存在下で 5% DCC-FBS により増殖させ、<sup>3</sup>H]thymidine  
の取り込みを測定した。\* $p<0.05$  vs. E2 (-)

て検討を行った。20 MOI の AxCAER $\alpha$ あるいは AxCAER $\beta$ を単独で感染させた CF では約 50-70%の DNA 合成の抑制が認められたが、AxCADNER $\beta$ の共感染によりその抑制作用は AxCADNER $\beta$ の MOI 依存性に減少した。次に、CF  $\rightarrow$  ER を過剰発現させたときに、転写活性が増加するかどうかを検討した。20 MOI の AxCAER $\alpha$ または AxCAER $\beta$ を感染させた CF における転写活性は 3 倍以上に増加し、AxCADNER $\beta$ の共感染にて活性はほぼ完全に消失した。

#### 5. 高齢患者における血中アンドロゲン濃度と動脈硬化指標との関連

男性では、free-T は PWV および DWMH と有意な負の相関を示したが、PVH や高感度 CRP、炎症性サイトカインとは相関しなかった (表 4)。DHEAS は DWMH

表4. 高齢患者における  
アンドロゲン濃度と動脈硬化指標の相関

	男性 (n=46)		女性 (n=88)
	free-T	DHEAS	DHEAS
年齢	-.435*	-.596*	-.196*
PWV	-.330*	-.172	-.035
PVH	-.108	-.148	-.168
DWMH	-.300*	-.271*	-.092
logCRP	-.151	-.172	-.035
logMCP-1	.164	.053	-.078
logIL-6	-.205	-.047	-.073
logTNF $\alpha$	-.010	.173	.017

相関係数を示す。\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.1$

との間に負相関する傾向を示したものの、そのほかの指標とは相関しなかった。一方、女性では、DHEAS が PVH と負相関する傾向を示したが、高感度 CRP、炎症

性サイトカインとは相関しなかった。逆に、DHEAS と PWV との間には有意な正の相関がみられた。年齢を変数に入れた重回帰分析では、PWV や PVH、DWMH は年齢との関連が強く、女性の DHEAS と PWV との関連 ( $\beta=0.341$ ,  $p<0.001$ ) 以外はホルモンが動脈硬化マーカーの有意な決定因子ではなかった。

#### 6. 虚弱高齢男性における血中テストステロン濃度と日常生活機能

総テストステロンおよび遊離テストステロン濃度は、GDS 以外の機能評価項目と有意な正相関を示した (表 5)。年齢、

表5. 日常生活機能諸指標の分布および  
血中テストステロン濃度と各指標との単相関係数

	Barthel Index	IADL	HDS-R	GDS	Vitality Index
Mean $\pm$ SD	73 $\pm$ 27	2.1 $\pm$ 2.0	18 $\pm$ 7	6.3 $\pm$ 3.1	8.8 $\pm$ 1.8
(Range)	(5-100)	(0-5)	(2-29)	(1-13)	(3-10)
総テストステロン	.422*	.279*	.344*	.077	.370*
遊離テストステロン	.369**	.390**	.512**	.164	.484**

基本的 ADL は Barthel Index により、手段的 ADL は Lawton and Brody's IADL により、認知機能は改訂長谷川式知能評価スケール (HDS-R) により、気分は Geriatric Depression Scale (GDS; 15 項目) により、意欲は Vitality Index により評価した。  
\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

血清アルブミン、血清総コレステロールを独立変数に加えた重回帰分析でも、遊離テストステロン濃度は HDSR ( $\beta=0.403$ ,  $p=0.03$ ) および Vitality Index ( $\beta=0.407$ ,  $p=0.02$ ) の有意な決定変数であった。なおこの集団では、総テストステロン、遊離テストステロンいずれも、年齢、Body Mass Index、ヘモグロビン、リンパ球数、血清アルブミン、総コレステロールとは相関しなかった。

#### D. 考察

##### 1. 低用量エストロゲンの内膜肥厚抑制作用

本研究では、2  $\mu$ g/kg/day 以下の E2 投与でも、ラット頸動脈内膜形成は十分に抑制され、しかも子宮と血清脂質に対しては最小限の影響ですんだ。E2 を含むエストロゲンの投与が内膜肥厚を抑制することは、様々な動物モデルで報告さ

れている。しかし、我々の以前の報告を含めて、いずれも血中 E2 濃度が卵巣摘出を行っていない対照群を上回る程度の投与量であり、低用量エストロゲンの効果は検証されていなかった。本研究では、過去の報告同様、10~20  $\mu\text{g/kg/day}$  の E2 投与により血清 E2 濃度は sham 手術群の 3 倍以上に上昇し、2  $\mu\text{g/kg/day}$  の E2 投与で sham 群と同程度であった。1  $\mu\text{g/kg/day}$  以下の E2 投与量では、血清 E2 濃度が上昇しなかったばかりか血清脂質も変化せず、0.2  $\mu\text{g/kg/day}$  の E2 では子宮重量の増加も有意なものではなかった。これらの結果は、循環血液中の E2 濃度が上昇していなくても組織・細胞レベルではエストロゲンの作用が発揮されうることを意味し、有害作用の観点からエストロゲンの投与量を考える際のヒントを与えてくれる。本研究は動物実験であり、直接臨床に反映させることはできないが、最近検討されつつある低用量 HRT の論拠になる成果といえよう。

## 2. 血管平滑筋におけるエストロゲン応答遺伝子の同定

ほとんど平滑筋層からなるラット大動脈組織で、エストロゲンに反応して発現が増加する 4 種類の遺伝子を同定した。これらのうち、caveolin-1 については血管平滑筋細胞でエストロゲンが ER $\alpha$  を介して転写活性を高めることが報告されているが、他の 3 遺伝子についてはエストロゲンによる発現調節の報告はない。

caveolin-1 は細胞膜のカベオラ分画に存在し、細胞内シグナル伝達を介して細胞機能、血管トーン調節に関与する。したがって血管平滑筋細胞におけるエストロゲン応答性の caveolin-1 発現増加は血管機能改善につながる可能性がある。SmLIM と enigma は、double-zinc-finger 構造を有する LIM タンパクに属し、タンパクの相互作用により細胞の増殖や分化に関わるとされる。特に SmLIM は血管平滑筋で大量に発現し、平滑筋細胞の分

化過程で発現してくる。enigma は PDZ-LIM タンパクで、アダプタータンパクとしてキナーゼやホスファターゼと結合して細胞機能調節に関わる。一方、Id3a は Id3 遺伝子の alternative splicing により産生され、helix-loop-helix 型転写因子として平滑筋細胞の増殖、分化に関わることが報告されている。これら 3 つの転写因子の機能から考えて、エストロゲンによる血管トーン調節や血管平滑筋細胞の増殖・分化に関係することが想定され、今後検討を行う必要がある。エストロゲンによる 4 遺伝子の発現調節機構についても、今回の研究では明らかでない。エストロゲンによる caveolin-1 の転写調節を検討した報告 (Razandi, 2002) では、3 kb のプロモーター領域に典型的エストロゲン応答配列は存在しなかった。また、他の 3 遺伝子についてはプロモーター配列がわかっていない。今後、4 遺伝子についてエストロゲンによる発現調節機構と機能的役割を解析していくことが、血管特異的に好ましい作用を発揮しうる HRT を模索する基礎となるものと考えられる。

## 3. VSMC および CF 増殖における ER サブタイプの役割

本研究では、いずれの ER サブタイプが VSMC および CF の増殖抑制作用に関与しているかを明らかにする目的で ER $\alpha$  および ER $\beta$  を組み込んだアデノウイルスを作製した。非感染の VSMC および CF ではエストロゲン添加によりエストロゲン応答配列の転写が活性化し、増殖抑制作用を示した。VSMC に ER $\alpha$  あるいは ER $\beta$  を過剰発現させると、それぞれ転写活性の増加を認めたが、VSMC 増殖抑制作用は ER $\alpha$  ではなく ER $\beta$  においてリガンド依存性に増強した。一方 CF では、両サブタイプともに過剰発現により転写活性、増殖抑制効果は増強された。

以前のわれわれの報告や他の施設からの報告において、エストロゲンは VSMC および CF の増殖を抑制することがす

に明らかになっている。また、ER アンタゴニストである ICI182,780 あるいはタモキシフェンがエストロゲンの増殖抑制作用に拮抗することが報告されており、エストロゲンの VSMC および CF 増殖抑制作用は ER を介することを示唆する。しかし、これらの阻害剤は ER サブタイプの選択性はなく、さらにタモキシフェンは臓器によってアゴニスト作用を有する。したがって、本研究によって、VSMC では ER  $\beta$  が、CF では ER  $\alpha$ 、ER  $\beta$  の両者が増殖抑制を介することが初めて明らかになった。それではエストロゲンの増殖抑制作用において ER サブタイプ間でどのような差異があるのでしょうか？また、VSMC と CF で結果が異なる理由は何であろうか？リガンド結合能の違い、下流のエストロゲン応答遺伝子あるいは応答シグナルの違い、ER に結合する共役因子の違いなどが可能性として挙げられる。本研究では ER の転写活性がサブタイプ間ではほぼ同等であり、細胞増殖抑制作用におけるサブタイプ間の相違は応答遺伝子の発現、共役因子の結合の相違によるのかもしれない。エストロゲンによる増殖抑制作用に関連する細胞内シグナル伝達経路としては MAPK 活性の抑制、MAPK ホスファターゼ-1 の発現およびチロシンホスファターゼの活性の上昇、cyclic AMP-アデノシン経路を介するなど、いくつかの研究から明らかにされている。これらの点は本研究からは明らかでなく、今後の検討課題である。また、今回の研究は培養細胞レベルの検討であり、臨床研究へフィードバックするためには少なくとも動物実験により心血管病変形成に対する作用を検討する必要がある。

#### 4. 高齢男性における血中アンドロゲン濃度と動脈硬化指標および日常生活機能との関連

後期高齢者を中心とした物忘れ外来の男性患者において、血中テストステロン濃度の低下が機能診断および画像診断上

の動脈硬化と関連する可能性が示された。この結果は、中高年男性を対象とした欧米の症例対照研究や疫学研究の結果と一致する。ただし、今回は症例数が少なく、多変量解析では年齢の影響を無視できなかった。今後、より多数例で解析する必要があるとともに、テストステロン補充療法やその代替療法の効果について検討していかなければならない。一方、男性の DHEAS については同様の関係がみられず、女性ではむしろ DHEAS 高値が PWV 高値と関連した。動脈硬化とアンドロゲンとの関係において性差が存在するとともに、アンドロゲンでもテストステロンと DHEA では意味が異なるのであろう。この点も、健常高齢者を含むより幅広い高齢者層で検討していく必要がある。

虚弱高齢者において、血中テストステロン濃度の低下が全般的日常生活機能障害と関連することを見出した。これまでに、テストステロン濃度の低下が虚弱高齢男性の移乗、食事に関する ADL と関係するという報告、地域在住高齢者で認知機能と関係するという報告があるが、いわゆる総合機能評価の手法による研究は本研究が初めてである。高齢者における日常生活機能の低下には様々な原因があるが、脳虚血病変による痴呆や運動麻痺、失調、冠動脈疾患による心機能低下、閉塞性動脈硬化症による歩行障害など動脈硬化を背景とするものが多い。したがって、上記高齢男性患者で示されたようなテストステロン低下と関連した動脈硬化が日常生活機能障害の要因となっている可能性も示唆される。今後は、全般的な日常生活機能改善効果を目的としたテストステロン補充療法の模索を行う必要がある。

#### E. 結論

ラット血管傷害モデルにおいて、低用量エストロゲンでも内膜肥厚は十分に抑

えられた。血管平滑筋においてエストロゲンに反応して増加する 4 つの遺伝子を同定した。血管平滑筋細胞では ER  $\beta$  が、心筋線維芽細胞では ER  $\alpha$ 、ER  $\beta$  両方のサブタイプがエストロゲンの増殖抑制作用を媒介する。また、高齢男性ではテストステロンの低下が動脈硬化の進展に関係し、そのことと関連して日常生活機能の全般的低下に結びつく可能性がある。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Akishita M, Yamada S, Nishiya H, Sonohara K, Nakai R, Toba K: Effects of physical exercise on plasma concentrations of sex hormones in elderly women with dementia. *J Am Geriatr Soc* in press.
2. Watanabe T, Miyahara Y, Akishita M, Nakaoka T, Yamashita N, Iijima K, Kim H, Kozaki K, Ouchi Y: Inhibitory effect of low-dose estrogen on neointimal formation after balloon injury of rat carotid artery. *Eur J Pharmacol* 502, 265-270, 2004.
3. Mita Y, Akishita M, Tanaka K, Yamada S, Nakai R, Tanaka E, Nakamura T, Toba K: Improvement of inappropriate prescribing and adverse drug withdrawal events after admission to long-term care facilities. *Geriatr Gerontol Int* 4, 146-150, 2004.
4. Watanabe T, Akishita M, Nakaoka T, He H, Miyahara Y, Yamashita N, Wada Y, Aburatani H, Yoshizumi M, Kozaki K, Ouchi Y: Caveolin-1, Id3a and two LIM protein genes are upregulated by estrogen in vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 75, 1219-29, 2004.
5. Nagai K, Akishita M, Machida A, Sonohara K, Ohni M, Toba K: Correlation between pulse wave velocity and cognitive function in non-vascular dementia. *J Am Geriatr Soc* 52, 1037-1038, 2004.
6. Kobayashi K, Akishita M, Yu W, Hashimoto M, Ohni M, Toba K: Interrelationship between non-invasive measurements of atherosclerosis; flow-mediated dilation of brachial artery, carotid intima-media thickness and pulse wave velocity. *Atherosclerosis* 173, 13-18, 2004.
7. Eto M, Toba K, Akishita M, Kozaki K, Watanabe T, Kim S, Hashimoto M, Sudoh N, Yoshizumi M, Ouchi Y: Reduced endothelial vasomotor function and enhanced neointimal formation after vascular injury in a rat model of blood pressure lability. *Hypertens Res* 26, 991-998, 2003
8. Nakamura T, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Orimo H, Ouchi Y: Influence of sex and estrogen on vitamin D-induced arterial calcification in rats. *Geriatr Gerontol Int* 3, 145-149, 2003
9. Watanabe T, Akishita M, He H, Miyahara Y, Nagano K, Nakaoka T, Yamashita N, Kozaki K, Ouchi Y: 17beta-Estradiol inhibits cardiac fibroblast growth through both subtypes of estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 454-459, 2003
10. Watanabe T, Akishita M, Nakaoka T, Kozaki K, Miyahara Y, He H, Ohike Y, Ogita T, Inoue S, Muramatsu M, Yamashita N, Ouchi Y: Estrogen receptor beta mediates the inhibitory effect of estradiol on vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res* 59, 734-744, 2003
11. Akishita M, Yamada S, Nishiya H, Sonohara K, Ohni M, Toba K: Testosterone and comprehensive geriatric assessment in frail elderly men. *J Am Geriatr Soc* 51, 1324-1326, 2003

## 2. 学会発表

### 【国際学会】

1. Akishita M, Yamada S, Nishiya H, Sonohara K, Ohni M, Toba K: Relationship between plasma androgen levels and comprehensive geriatric assessment (2004.5.18). The American Geriatrics Society Annual Meeting, Las Vegas, USA.
2. Akishita M, Kobayashi K, Machida A, Sonohara K, Toba K: Correlation between pulse wave velocity and cognitive function in non-vascular dementia (2004.5.18) The American Geriatrics Society Annual Meeting, Las Vegas, USA.

### 【国内学会】

1. 小林久美子、秋下雅弘、園原和樹、町田綾子、鳥羽研二：物忘れ外来患者における炎症性サイトカインと脈波速度

の関連 (2004.7.23) 第 36 回日本動脈硬化学会総会 (福岡)

2. 秋下雅弘、山田思鶴、鳥羽研二：虚弱高齢女性におけるアンドロゲン濃度と日常生活機能との関係および運動療法の効果 (2004.6.25) 第 77 回日本内分泌学会総会 (京都)
3. 小林久美子、秋下雅弘、鳥羽研二：高齢男性患者におけるアンドロゲン濃度と脈波伝播速度 (2004.6.25) 第 77 回日本内分泌学会総会 (京都)
4. 秋下雅弘：[シンポジウム]生活習慣病に及ぼすテストステロンの影響。性ホルモンと生活習慣病：基礎と臨床 (2003.5.9) 日本内分泌学会総会 (横浜)

- H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書（総合）

脳・血管・骨の老化でのステロイド作用における  
シグナル伝達系の役割の解明とその応用

分担研究者 堀 隆一

国立がんセンター研究所 細胞増殖因子研究部部長

【研究要旨】

ステロイドホルモンは多くの組織で多様な生理作用を持つことがわかっており、その機序としては主として核内で受容体と結合して転写制御に関わる genomic な作用を中心に研究が進められてきたが、ここ数年来、血管細胞、神経細胞、骨芽細胞、乳癌細胞など多種の細胞で、シグナル伝達に関わる分子群に細胞膜や細胞質で直接働きかけ、短時間でその効果を表す nongenomic な作用の存在が示唆されてきている。本研究ではこれらの nongenomic な作用がどのような分子を介して、どのような生理機能を制御しているのかを明らかにすることを目的として始められ、細胞膜で発現させたエストロゲン受容体の AF-2 ドメインがチロシン残基でリン酸化されること、AF-1 ドメインを介して tubulin や HSP-70 等の分子と複合体形成を行うことを示すことに成功した。脳・血管・骨等の組織におけるステロイドの量的変化と細胞老化とのかかわりを、nongenomic 作用からも理解することにより、そのシグナル経路などを標的とした新しい治療薬の開発にもつながるものと考えられる。

A. 研究目的

哺乳類のステロイドホルモンは様々な生理活性を有しているが、その本体は低分子量の脂溶性分子である。疎水性のホルモン分子は標的細胞の細胞膜を通過した後、特異的な受容体蛋白質と結合し、DNA と結合能を獲得して、核内に蓄積する。エストロゲンでは  $\alpha$  型レセプター (ER  $\alpha$ ) と  $\beta$  型レセプター (ER  $\beta$ ) が組織特異的に準備されており、エストロゲンと結合したレセプターによる核内転写活性の変化が、その主たる生理作用をもたらすと長年考えられてきた。このいわゆる classical な作用は、エフェクター蛋白質の発現レベルでの調節を介するため、効果を現すまで数十分から数時間か

かると考えられる。ところが、ステロイドホルモンには、これより遥かに短い時間経過で観察される生理作用も存在することが以前より知られており、転写因子としての働きを介さず、細胞質内でのシグナル伝達を介して、即時型反応を引き起こす nongenomic な作用と呼んで区別されてきたが、その詳細については全くわからなかった。

この数年来の研究により、細胞内シグナル伝達とエストロゲン即時反応をつなぐデータが相次いで紹介された。神経細胞、骨芽細胞、卵巣細胞、乳癌細胞など多くの細胞では、エストロゲンの刺激後、すぐに増殖因子のシグナル伝達に関わる Ras-Raf-MAP キナーゼ系のシグナル伝達

経路が活性化することが見出された。また血管上皮細胞ではエストロゲンが数分間で Ras-MAP キナーゼと PI3 キナーゼ-AKT 経路を活性化し、血管内皮細胞性 NO 合成酵素(eNOS)活性を上げることにより NO 産生を促し、血管に対して生理的な保護作用をもたらすことがわかったが、これにはエストロゲン受容体がシグナル伝達分子として関わっていることが示唆された。

ステロイドホルモンおよびその受容体の作用機構

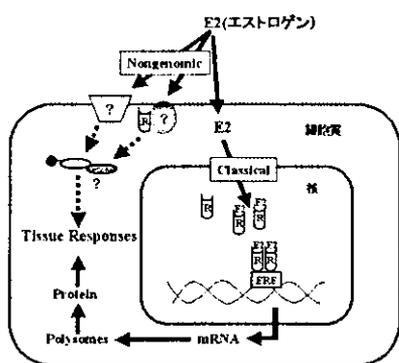


図 1

以上のようにエストロゲンは核外に微量に存在するエストロゲン受容体を介して、あるいは未知の別の受容体分子を介してその nongenomic なシグナルを伝えると考えられている (図 1)。

図 2 にエストロゲンの nongenomic 作用の特徴をまとめる。細胞の増殖・生存などをはじめとする多彩な生理作用がエストロゲンの Nongenomic な効果として短時間で作用することから、エストロゲンの生理活性を考える上では避けて通れない重要な作用機序であると考えられる。

前述のようにエストロゲンの nongenomic な作用は通常のエストロゲン受容体 (ER  $\alpha$ 、ER  $\beta$ ) が細胞膜にも存在して特別なシグナルを伝えるという立場と、全く異なる受容体が細胞膜に存在してエストロゲンの核外シグナルを伝えるという立場と 2 つの大きく異なる説に基づくアプローチがされてきたが、ここ

### エストロゲンのNongenomic作用

#### 生理学的反応

- ・迅速な血管拡張と一酸化窒素(NO)産生を血管上皮細胞にもたらす。
- ・マクロファージ、骨芽細胞、海馬細胞などにおける迅速な細胞内Ca濃度の上昇
- ・酸化ストレスからの神経保護作用
- ・エトポシドや足場喪失刺激などによる骨細胞のアポトーシスの抑制
- ・乳腺細胞における即時的な細胞増殖刺激

#### Nongenomic作用としての特徴

- ・ mRNA の転写や蛋白質合成を必要としない数分程度の短時間で起こる反応
- ・ 細胞膜・細胞質に局在するシグナル伝達分子との相互作用 (Ras-Raf-MAP キナーゼ経路が頻りに活性化される)
- ・ 多くの報告でエストロゲン受容体  $\alpha/\beta$  が核外でこのNongenomic作用の発現に関わることが示唆されている。

→ 脳・血管・骨でのステロイドの生理作用に深く関わる可能性があり

図 2

数年少なくともエストロゲン受容体は nongenomic な作用に大きく貢献するというデータが立て続けに発表されている。最近ではエストロゲン受容体やアンドロゲン受容体などのステロイドホルモン受容体は Src キナーゼと相互作用して、Src を活性化しその結果として Ras や下流の Erk-2 の活性化と細胞の増殖亢進をもたらすという報告や、アダプター分子 Shc との直接結合によりその下流の Ras-MAPK 経路のシグナルを ON にする主張するグループもある。

Kousteni らは、卵巣除去手術や精巣除去手術を行ったマウスで骨芽細胞のアポトーシスが著明に増加する現象を解析し、エストロゲン受容体やアンドロゲン受容体がりガンド依存性に Src/Shc/Erk の活性化を引き起こし、これらの細胞のアポトーシスを誘導する nongenomic な作用を提唱している。以上のようにこれまで得られたデータを統合すると、細胞膜から核につながるユニークなステロイド特異的シグナル伝達の存在を示唆するが、情報はあくまで断片的であり、それぞれのデータはまだ相容れない部分も多い。

本研究はここ 2~3 年で急速にデータが集まりつつある、ステロイド刺激による細胞膜及び細胞質の蛋白質群を介したシグナル伝達に焦点を当て、ステロイドが種々の生理機能を発揮するにあたって、核外において受容体を含むどのような複

合体を介したシグナルがどのような機序で形成されるのかを明らかにすることを目的とする。そのために老化の引き金として重要性が示されているエストロゲン及びエストロゲン受容体のシグナルに的を絞って、細胞内局在や結合能に影響を与える受容体の変異体などを用いつつ研究を行う。細胞としてはモデル系として研究が進んでおり材料の調整のしやすい腫瘍細胞で系を立ち上げるが、最終的には老化における重要性に鑑み、神経細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞・破骨細胞などを用いて、これらの細胞に対するエストロゲンの保護作用が、細胞内シグナル伝達によって、どのような繊細な調節を受けているのかを明らかにすることを目的とする。これらの細胞内シグナル伝達経路を明らかにすることができれば、それを標的として新しい作用機序の老化治療薬の開発につながる可能性があると考えられる。

### B. 研究方法

図 3 に示す通り、エストロゲン受容体はその DNA 結合ドメインの両側に、比較的良く保存された 2 つの機能ドメイン AF-1 と AF-2 をもつ。

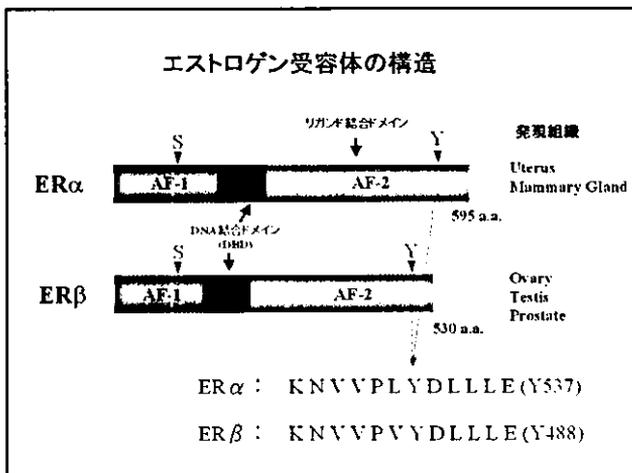


図 3

エストロゲン受容体はこれまでの報告からチロシン残基でのリン酸化が観察されており、AF-2 ドメインの C 末側、ER $\alpha$

では第 537 残基のチロシンがメインのチロシンリン酸化部位であることが示唆されており、そのチロシン残基周辺の配列は、ER $\alpha$  と ER $\beta$  の間で完全に保存されている (図 2)。しかしながらエストロゲン受容体が細胞内シグナル伝達においてその重要性が強調されているチロシンリン酸化を受ける意味について詳細はまだ不明である。膜移行したエストロゲン受容体の結合蛋白質を同定するためにこれらの AF-1 及び AF-2 ドメインを Flag タグと図 4 に示したように Src の膜移行シグナルを付加した形で発現ベクターを構築した。

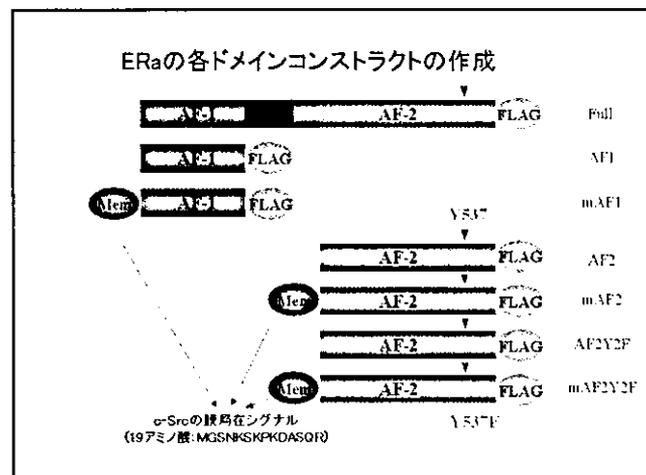


図 4

更に MCF-7 細胞をはじめとする乳癌細胞株に発現させ、膜移行シグナルをつけないコントロールも含めて、各々複数の安定発現株を樹立した。またチロシンリン酸化状態やリン酸化依存的結合のコントロールとして、第 537 残基のチロシンをフェニルアラニンに変えたコントロール (537F 変異体) も作成して、同様に発現細胞を調整した (図 4)。

AF-2 のチロシンリン酸化の状態を FLAG タグによる免疫沈降の後、抗リン酸化チロシン抗体にて確認する。また同じく FLAG による免疫沈降で、膜に局在させた AF-1 および AF-2 に特異的に結合する蛋白質群を検出し、可能な限り質量分析により同定する。AF-2 については

その結合がチロシンリン酸化依存的であるかどうかを、537F 変異体と比較することにより明らかにする。同定された結合分子に関してはそれぞれの結合様式を明らかにする。具体的にはエストロゲン受容体の微細な変異体を作製し結合能を調べる。

更に神経細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞において、比較的大量の細胞を培養できるシステムを構築し、エストロゲン刺激による AF-2 のリン酸化や、エストロゲン受容体結合蛋白質群の解析を同様の手法により開始する。

またエストロゲン刺激前後で Src ファミリーキナーゼの活性の変化や基質のリン酸化などを解析し、エストロゲン刺激により機能調節を受ける Src ファミリーキナーゼの有無について調べる。一方で AF-1 ないし AF-2 が欠損する変異型のエストロゲン受容体を膜特異的に過剰発現させることにより、それぞれの核外シグナルのみを止める dominant negative な効果をもたらす受容体蛋白質の発現ベクターを設計する。アデノウイルスベクターを用いてこのような dominant negative 変異体を神経細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞などに発現させ、MAPK のリン酸化、NO 産生や破骨細胞機能の抑制などをマーカーにエストロゲンの生理作用がどのように修飾されるかについて解析する。

### C. 研究結果

MCF-7 細胞の系で樹立した安定発現細胞株の免疫細胞染色の結果から、エストロゲンの AF-1 ドメインや AF-2 ドメインをそのまま発現させた MCF-7 細胞では、蛋白質発現は細胞質に見られるのに対し、膜局在シグナルを付加した蛋白質は予想通り、膜に局在が移行していることが観察された (図 5)。

また抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより AF-2 ドメインが膜移行させたときのみチロシ

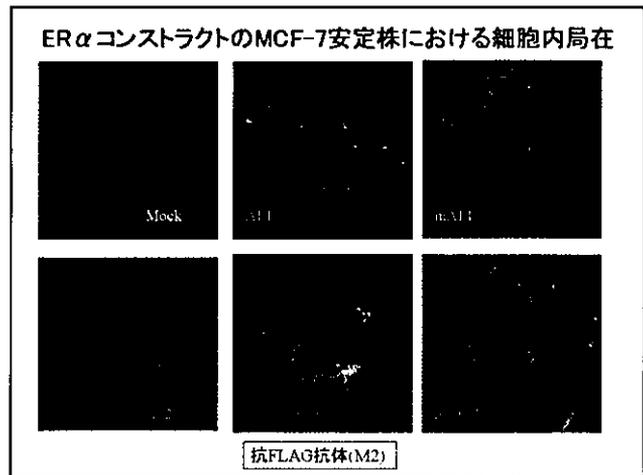


図 5

ンリン酸化を受けることが観察された。このリン酸化は 537 番のチロシンをフェニルアラニンに変えた変異体 537F ではほぼ消失したことから、この部位が膜におけるチロシンリン酸化部位の候補と考えられた。

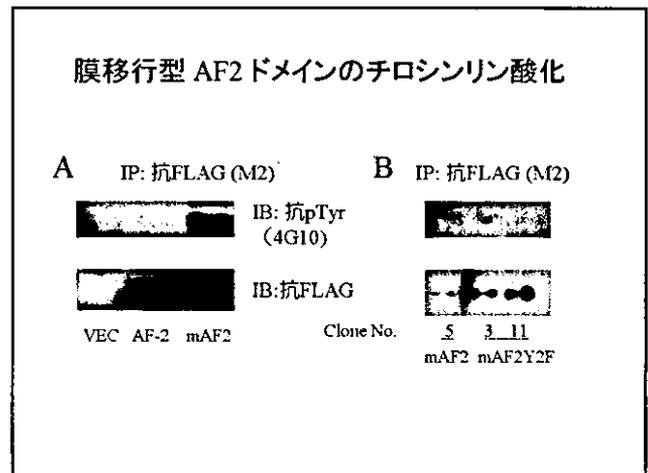


図 6

我々は大量培養した細胞溶出液から抗 Flag 抗体で結合蛋白質を精製した。図 5 に示す通り AF-1 ドメインに特異的に結合する多くの蛋白質群が銀染色により観察されたのに対し、AF-2 ドメインと特異的に結合する蛋白質はこのスケールの精製では明確に検出はできなかった。

AF-1 ドメインに特異的に結合する蛋白質群を質量分析により解析した結果、Hsp-70 と  $\beta$  チューブリンの同定に成功した。図 8 に示すように特異的抗体を用い