

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16775

研究課題名(和文) エストロゲンによる動脈硬化作用機序の解明と安全なホルモン補充療法の基盤確立

研究課題名(英文) The effects of estrogens on atherosclerosis risk

研究代表者

伊藤 文武 (Ito, Fumitake)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60756849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：E2、Eq等の各種エストロゲンを用いてヒト臍帯静脈血管内皮細胞における接着因子発現への影響を検討した。結果、Eq投与群で接着因子の発現上昇を認めた。しかし、他のエストロゲン投与した場合には対照群に比し、有意な変化を認めなかった。この発現変化はタンパクレベルにおいても同様であった。flow chamber systemを用いて検討した結果、Eqを投与した群では対照群に比し単球接着数が有意に増加した。対照的に、E2、E3、E4投与群では対照群に比し単球接着数は有意に減少した。以上から天然型のE2と異なり、CEEに含まれるEqは動脈硬化発症のリスクとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

閉経後女性における標準的なホルモン補充療法で使用されるCEEに含まれるEqが動脈硬化発症のリスクとなることが示唆され、天然型のE2はホルモン補充療法レジメンにより適していると考えられる。しかし、in vitroでの研究による限界も存在するため今後in vivoでの検討および大規模臨床試験による個別のエストロゲン製剤の作用効果につき検討が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the association between various estrogen types and atherosclerosis risk, we examined their effect on adhesion-molecule expression in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). In estrogen-treated HUVECs, the mRNA and protein expression levels of adhesion molecules were quantified by real-time polymerase chain reaction and enzyme immunoassay. Additionally, a flow-chamber system was used to assess the effects of estrogens on the adherence of U937 monocytoid cells to HUVECs. Equilin, but not 17 $\beta$ -estradiol (E2) or other types of estrogen, significantly increased the mRNA ( $P < 0.01$ ) and protein ( $P < 0.05$ ) expression of the adhesion molecules E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 as compared with levels in controls.

研究分野：女性ヘルスケア

キーワード：ホルモン補充療法 動脈硬化 接着因子 エクイリン エストラジオール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ホルモン補充療法 (hormone replacement therapy, HRT) はエストロゲン欠乏に起因する更年期症状の緩和や骨粗鬆症のリスク低下等の目的で用いられる。閉経後女性では同年齢の男性に比し動脈硬化を含む心血管疾患の発症率が高く、閉経後女性での血中エストロゲンは男性よりも有意に低いことからエストロゲンの動脈硬化保護作用が示唆されてきた。そのため、閉経後女性に対する HRT により動脈硬化リスクは低下すると長年信じられてきた。しかし、2002 年に米国 The Women's Health Initiative (WHI) により、HRT は動脈硬化リスクをむしろ上げるという中間報告がなされ、大規模臨床試験は中止となった。この報告以来、HRT の有用性、適応、投与方法に関する従来の概念を根本から再検討する必要性が生じた。

その問題点のひとつとして、これまでの臨床試験での HRT では、エストロゲンとして CEE が、プロゲステロンとして MPA が漫然と使用されてきたことが挙げられる。しかし、研究手法の困難さから、ステロイドホルモンの血管内皮への影響を検討した基礎的研究はごく限られており、いまだ一定の見解が得られていない。

研究代表者らは、MPA が血管内皮における接着因子の発現を増強させ、さらに血管内皮への単球接着を促進させることを基礎実験により初めて明らかにした (日産婦優秀論文賞 2015)。さらに新規合成プロゲステロンであるドロスピレノンが動脈硬化発症のリスクを上昇させないことを明らかにし、MPA に替わるプロゲステロンの候補となることを提案した。

一方、エストロゲンとして使用される CEE は、妊馬尿から抽出される合剤であり、ヒトには存在しないエクイリン (Eq) 等が含まれる。ヒトにおいて最も活性の高いエストラジオール (E2) が動脈硬化保護作用を持つことはある程度のコンセンサスが得られている一方で、他のエストロゲンについての動脈硬化リスクに対する影響は検討がほとんどなされていない。しかし、WHI の報告以降も E2 と CEE を区別することなく動脈硬化リスクに対する臨床研究が行われている。そのため、各種エストロゲンの動脈硬化リスクに対する影響を個別に検討する必要がある。

## 2. 研究の目的

動脈硬化の初期段階において、単球の血管内皮への接着は重要な役割を果たしている。単球は、血管内皮上の接着因子 (E-selectin、P-selectin、ICAM-1、VCAM-1 等) を介して血管内膜へと侵入し、活性化型マクロファージとなることで動脈硬化の初期病変が形成される。それゆえ、血管内皮上の接着因子発現の増強は単球接着数の増加とともに動脈硬化の初期病変の形成を促進させる。これまで基礎的研究がごく限られていた当領域において、本グループは血管内皮への単球接着を再現するモデルとして flow chamber system を独自に確立させ、動脈硬化リスクを評価する系をすでに構築している。研究代表者らはこの系を用いて、新規合成プロゲステロンの動脈硬化リスクに対する影響を網羅的に検討することに成功し、HRT で繁用されている MPA が血管内皮への単球接着を促進し、動脈硬化リスクとなることを世界に先駆けて in vitro で初めて明らかにした。本研究で、CEE を含む各種エストロゲン、さらには食品由来のホルモン様物質の血管内皮への影響を動脈硬化リスクの観点から明らかにし、それらにより炎症反応が惹起されるあるいは抑制される機序が解明されれば、より効果的で副作用の少ない HRT レジメンの確立および動脈硬化に対する予防も兼ねた HRT の確立が可能となることで、我が国の健康増進効果へも寄与することが期待される。

## 3. 研究の方法

本研究では、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて、各種エストロゲンを添加した後に、以下の方法で接着因子の発現、単球接着の変化、制御機序を検討する。

接着因子の発現変化を real-time PCR 法、ELISA 法、免疫組織化学法で検討する。

HUVEC への単球接着の変化を flow chamber system で検討する。

上記、におけるステロイドホルモン受容体の影響を、各種ステロイドホルモン受容体拮抗薬による抑制実験あるいはレポーター遺伝子アッセイで検討する。

各種エストロゲンによる炎症性サイトカイン発現への影響を real-time PCR 法、ELISA 法、蛍光免疫組織化学法で検討する。

各種エストロゲン、ステロイドホルモン受容体、炎症性サイトカイン発現への一連の制御機序を解析する。

#### 4. 研究成果

各種エストロゲンについて上記の方法で検討を行った結果、Eq 投与群で接着因子である E-selectin および ICAM-1 の mRNA 発現レベルが対照群に比し約 1.6 倍に上昇した。P-selectin および VCAM-1 においても同様に Eq 投与群で 2.1 倍から 2.6 倍の上昇を認めた(図 1)。しかし、他のエストロゲンを投与した場合には対照群に比し、有意な変化を認めなかった。この発現変化はタンパクレベルにおいても同様であり、

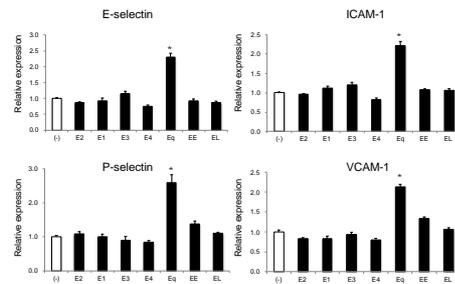


図 1

Eq を投与した群において、E-selectin、ICAM-1 は対照群に比し発現量が有意に増加した(図 2)。P-selectin および VCAM-1 の発現は、Eq 投与群で増加傾向ではあったが有意な変化はみられなかった。他のエストロゲンを投与した場合には上記のような有意な変化を認めなかった。flow chamber system を用いて検討した結果、Eq を投与した群では対照群に比し単球接着数が有意に増加した(図 3)。対照的に、E2、E3、E4 投与群では対照群に比し単球接着数は有意に減少した。さらに詳細に検討したところ、Eq は ER $\beta$  の発現を低下させ、NF- $\kappa$ B 活性化経路を介することで接着分子発現および単球接着数を上昇させることが *in vitro* で明らかになった。以上から天然型の E2 と異なり、標準的な HRT に用

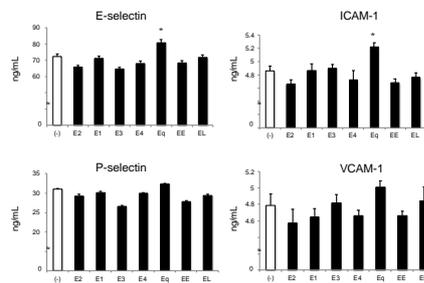


図 2

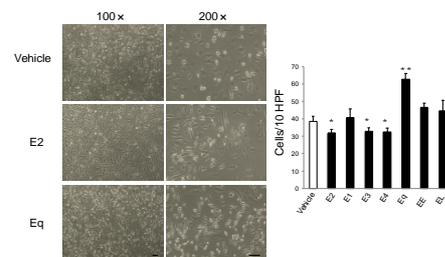


図 3

いられる CEE に含まれる Eq は動脈硬化発症のリスクとなる可能性が示唆され、より安全な HRT に使用しうる薬剤として E2 が候補となる可能性が見出された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okimura Hiroyuki, Tatsumi Hiroshi, Ito Fumitake, Yamashita Suguru, Kokabu Tetsuya, Kitawaki Jo	4. 巻 44
2. 論文標題 Endometrioid carcinoma arising from diaphragmatic endometriosis treated with laparoscopy: A case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 972 ~ 977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13595	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takaoka O., Mori T., Ito F., Okimura H., Kataoka H., Tanaka Y., Koshiba A., Kusuki I., Shigehiro S., Amami T., Kitawaki J.	4. 巻 181
2. 論文標題 Daidzein-rich isoflavone aglycones inhibit cell growth and inflammation in endometriosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 125 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsbmb.2018.04.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koshiba Akemi, Mori Taisuke, Okimura Hiroyuki, Akiyama Kanoko, Kataoka Hisashi, Takaoka Osamu, Ito Fumitake, Matsushima Hiroshi, Kusuki Izumi, Kitawaki Jo	4. 巻 44
2. 論文標題 Dienogest therapy during the early stages of recurrence of endometrioma might be an alternative therapeutic option to avoid repeat surgeries	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 1970 ~ 1976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13725	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori Taisuke, Ito Fumitake, Koshiba Akemi, Kataoka Hisashi, Tanaka Yukiko, Okimura Hiroyuki, Khan Khaleque N., Kitawaki Jo	4. 巻 44
2. 論文標題 Aromatase as a target for treating endometriosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 1673 ~ 1681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13743	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori Taisuke, Makino Hiroshi, Okubo Tomoharu, Fujiwara Yoichiro, Sawada Morio, Kuroboshi Haruo, Tsubamoto Hiroshi, Murakoshi Homare, Motohashi Takashi, Kitawaki Jo, Ito Kimihiko	4. 巻 45
2. 論文標題 Multi-institutional phase II study of neoadjuvant irinotecan and nedaplatin followed by radical hysterectomy and the adjuvant chemotherapy for locally advanced, bulky uterine cervical cancer: A Kansai Clinical Oncology Group study (KCOG-G1201)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 671 ~ 678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13885	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yabumoto Kazuya, Ito Fumitake, Matsushima Hiroshi, Mori Taisuke, Kusuki Izumi, Kitawaki Jo	4. 巻 45
2. 論文標題 Massive prolapsed submucous fibroid treated with laparoscopic surgery: A case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 942 ~ 946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13901	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Fumitake, Mori Taisuke, Tarumi Yosuke, Okimura Hiroyuki, Kataoka Hisashi, Tanaka Yukiko, Koshiba Akemi, Kitawaki Jo	4. 巻 14
2. 論文標題 Equilin in conjugated equine estrogen increases monocyte-endothelial adhesion via NF- B signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0211462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0211462	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Yuji, Matsushima Hiroshi, Mori Taisuke, Kokabu Tetsuya, Ito Fumitake, Kitawaki Jo	4. 巻 45
2. 論文標題 Retroperitoneal fibrosis after chemo radiotherapy for cervical cancer: A case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 938 ~ 941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kataoka Hisashi, Mori Taisuke, Okimura Hiroyuki, Matsushima Hiroshi, Ito Fumitake, Koshiba Akemi, Tanaka Yukiko, Akiyama Kanoko, Maeda Eiko, Sugahara Takuya, Tarumi Yosuke, Kusuki Izumi, Khan Khaleque N, Kitawaki Jo	4. 巻 34
2. 論文標題 Peroxisome proliferator-activated receptor- coactivator 1 -mediated pathway as a possible therapeutic target in endometriosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Reproduction	6. 最初と最後の頁 1019~1029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/humrep/dez067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori Taisuke, Ito Fumitake, Koshiba Akemi, Kataoka Hisashi, Takaoka Osamu, Okimura Hiroyuki, Khan Khaleque N., Kitawaki Jo	4. 巻 18
2. 論文標題 Local estrogen formation and its regulation in endometriosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 305~311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito Fumitake, Kokabu Tetsuya, Matsushima Hiroshi, Koshiba Akemi, Mori Taisuke, Kusuki Izumi, Kitawaki Jo	4. 巻 21
2. 論文標題 Protocol for a modified vaginal pipe for total laparoscopic hysterectomies: Experimental research	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Surgery Protocols	6. 最初と最後の頁 5~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isjp.2020.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Fumitake Ito, Osamu Takaoka, Yukiko Tanaka, Akemi Koshiba, Hiroshi Tatsumi, Taisuke Mori, Jo Kitawaki
2. 発表標題 Effects of drospirenone on adhesion molecule expression and monocyte adherence in human endothelial cells
3. 学会等名 70th Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics & Gynecology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤文武
2. 発表標題 ホルモン補充療法におけるエストロゲンおよびプロゲステロゲンの動脈硬化発症リスクへの影響.
3. 学会等名 第34回日本女性医学学会学術講演会 学会奨励賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 伊藤文武, 北脇 城.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 3
3. 書名 産科婦人科疾患最新の治療 2019-2021 .	

1. 著者名 伊藤文武, 北脇 城.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 1
3. 書名 私の治療 [2019-20年度版]	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----