

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22866

研究課題名(和文)漢方補剤のエストロゲン用作用に基づいたフレイル予防作用の機序解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of Frailty preventive action based on estrogen-like action of Chinese herbal medicine

研究代表者

七尾 道子(Nanao-Hamai, Michiko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40876091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：血管・筋肉老化の発症におけるエストロゲン(E2)の作用と慢性炎症の関与について検討した。

メスマウスに卵巣摘出による女性ホルモン欠乏惹起後に腹部大動瘤(AAA)を誘導した。卵巣摘出+AAA誘導によって大動脈瘤の形成が進行し、炎症性マクロファージが中膜から外膜に浸潤した。大動脈RNA解析では炎症性サイトカインであるIL-6, IL-1の発現が上昇した。これらの変化はE2補充により抑制された。また、卵巣摘出により筋重量と握力が低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

女性では、更年期以降のエストロゲン減少によってサルコペニアや心血管病などの発症リスクが高まり、フレイルになりやすいことが報告されている。近年、慢性炎症を基盤に細胞や臓器の老化及び機能低下が引き起こされることが報告されている。本研究では、マウスモデルにおいて女性ホルモン欠如を惹起し、血管炎症が血管老化ならびに筋肉の老化・機能低下に及ぼす影響を検討した。女性ではエストロゲン分泌の低下が全身の炎症を惹起し、血管老化やサルコペニアを介してフレイルに繋がるという機序がわかれば、新たなフレイル予防策の提案が可能となる。

研究成果の概要(英文)：The effects of estrogen (E2) and the involvement of chronic inflammation in the development of vascular and muscle aging were investigated.

Abdominal aortic aneurysm (AAA) was induced in female mice after induction of female hormone deficiency by ovariectomy. Ovariectomy + AAA induction led to progressive aortic aneurysm formation and inflammatory macrophage infiltration from the tunica media to the adventitia. Aortic RNA analysis showed increased expression of inflammatory cytokines IL-6 and IL-1. These changes were suppressed by E2 supplementation. Oophorectomy also decreased muscle weight and grip strength.

研究分野：加齢医学

キーワード：血管老化 慢性炎症 フレイル サルコペニア エストロゲン 漢方薬

1. 研究開始当初の背景

女性では、更年期以降エストロゲン分泌が低下し、加齢と共に動脈硬化や骨粗鬆症、サルコペニア、認知症の発症リスクが高まることが知られている。これらの病態は心身の機能低下に繋がっており、フレイル発生の危険因子となる。実際、フレイルのリスクは、閉経後女性では同年代の男性に比較して高いことが報告されている。このように、内因性エストロゲンは臓器保護的に作用すると考えられ、その作用機序として抗炎症作用も示唆されているが詳細は不明である。

近年、慢性炎症を基盤に細胞や臓器の老化及び機能低下が引き起こされることが報告されていることから、女性ではエストロゲン分泌の低下が全身の炎症を惹起し、血管老化やサルコペニアを介してフレイルに繋がるのではないかと考えた。

ホルモン補充療法には凝固系亢進や乳がん、子宮がんの増加など有害作用の発現リスクも一定以上あるため、更年期症状以外に対しては基本的に行うべきではないと勧告されている。申請者は、エストロゲン様作用をもつ漢方薬に抗炎症作用があり、発がん作用や血栓症などの副作用を持たない、エストロゲンに替わるフレイル予防薬となりうるのではないかとという仮説を立てた。漢方医学では気血の不足（気虚、血虚）を補うために使用される生薬及び方剤を補剤といい、虚弱な高齢者に広く処方される。古くから中国では更年期障害や月経前症候群に対して使用されてきた当帰、リウマチ疾患に使用されてきた芍薬、所謂万能薬として使用されてきた人参にエストロゲン様作用があることが報告されているが、具体的な作用機序については不明な点が多く、科学的なエビデンスが求められている。

2. 研究の目的

本研究では、エストロゲン様作用を持つ生薬に注目し、閉経後のフレイル関連臓器の老化や機能不全に対する生薬の効果を検討する。その作用機序としてエストロゲンによる抗炎症作用を想定し、生薬のフレイルに対する作用とその機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1). エストロゲン低下が血管炎症を介して血管老化に与える影響とエストロゲン補充による改善効果

野生型メスマウス（20週齢）において、エストロゲン欠乏を卵巣摘出により惹起した。血管炎症は申請者らが以前確立した塩化カルシウムの刺激とアンジオテンシンIIの持続投与による腹部大動脈瘤（Abdominal aortic aneurysm: AAA）モデルを用いた（Son BK et al., Nat Commun, 2015）。

まず、卵巣摘出後に血管炎症を誘導したマウス（卵巣摘出+AAA誘導マウス）で、炎症惹起に伴う大動脈瘤形成の亢進と炎症性サイトカインの上昇が認められるかを検証した。具体的には、卵巣摘出+AAA誘導マウスの大動脈径の計測、血中および大動脈の炎症性サイトカインの変化をsham手術の対照群と比較検討した。次に、卵巣摘出後にエストロゲン(E2)を補充することにより（卵巣摘出+エストロゲン補充+AAA誘導マウス）、血管炎症および血管老化が抑制できるか、卵巣摘出+AAA誘導マウスと比較検討した。E2の補充は卵巣摘出術後に60日徐放剤（1剤あたり0.01mg,0.05mgの2用量）を皮下に埋め込み、比較検討した。

2). エストロゲン低下が筋炎症を介して筋老化・機能低下に与える影響

まず、エストロゲン低下および血管炎症の筋肉への影響を検討するために、野生型メスマウス(20週齢)において、エストロゲン欠乏を卵巣摘出により惹起した。卵巣摘出後に上記の方法で血管炎症を誘導し、炎症惹起に伴って骨格筋(ヒラメ筋、腓腹筋)の老化および機能低下が生じるかどうかを sham 手術の対照群と比較検討した。具体的には、骨格筋重量、筋力(握力検査)、運動機能(wire hang テスト)を測定し評価をした。

次に、ワイヤーを用いた廃用性サルコペニア誘導の筋肉に影響がどの時期に生じるのかを検討するために、野生型メスマウス(10週齢)の下肢筋をワイヤー固定し、廃用性サルコペニアを誘導した(サルコペニアマウス)。ワイヤー固定後、1日、3日、1週間、2週間、4週間後に骨格筋(ヒラメ筋、腓腹筋)を回収し、形態学的、病理組織学的に sham 手術の対照群と比較した。また、骨格筋の機能を筋力や運動機能で評価した。

4. 研究成果

1). エストロゲン低下が血管炎症を介して血管老化に与える影響とエストロゲン補充による改善効果

大動脈径は AAA 誘導によって拡大し、さらに卵巣摘出+AAA 誘導群では sham+AAA 誘導群と比較し、優位に拡大した(図1)。大動脈の EVG 染色では、中膜の構造破壊が AAA 誘導によって生じ、卵巣摘出+AAA 誘導群でさらに進行した(図2)。

免疫染色では、卵巣摘出+AAA 誘導群では卵巣摘出を行っていない群と比較して f4/80 陽性のマクロファージがより浸潤し、IL-6 などのサイトカインに反応してリン酸化される pSTAT3 が同じく中膜でより陽性となった。Real time PCR を用いた大動脈組織の RNA 解析では、炎症性サイトカインである IL-6 と IL-1 β が sham+AAA 誘導群と比較し、卵巣摘出+AAA 誘導群で優位に上昇した(図3)。

Western blot 法を用いた大動脈組織のタンパク解析では、IL-6 下流炎症経路である pSTAT3 の活性が AAA 誘導によって活性化し、さらに卵巣摘出による女性ホルモン欠乏により活性化した(図4)。

以上の結果より、卵巣摘出+AAA 誘導によって、大動脈瘤部の局所炎症が亢進し、大動脈瘤の形成が進行することが示唆された。

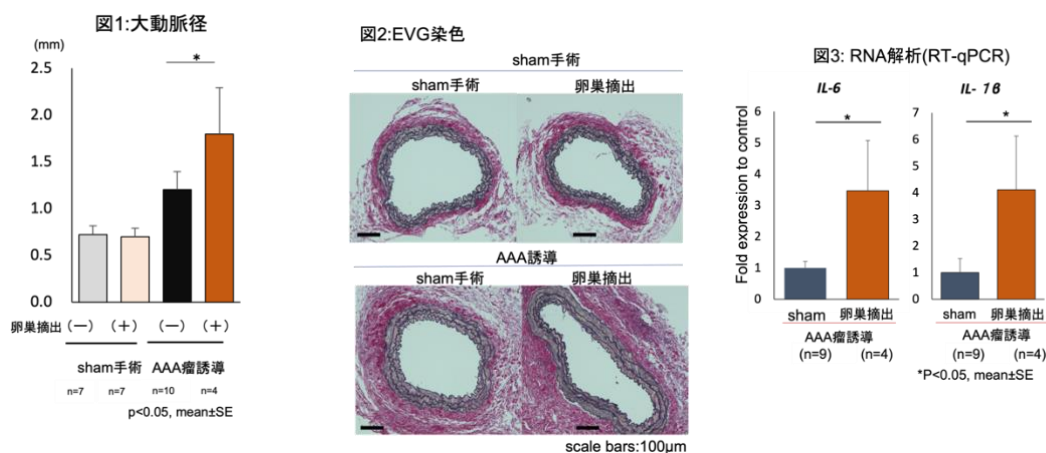
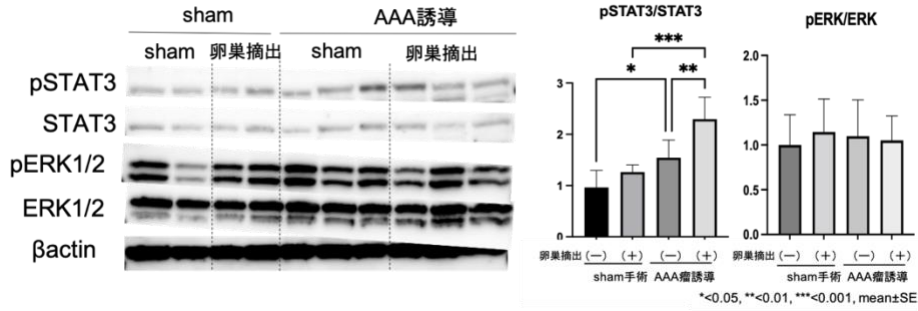


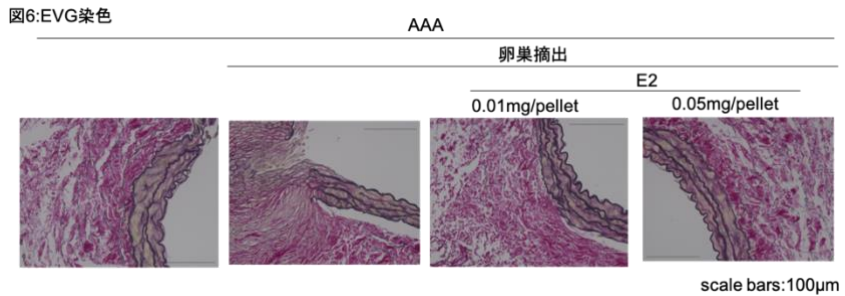
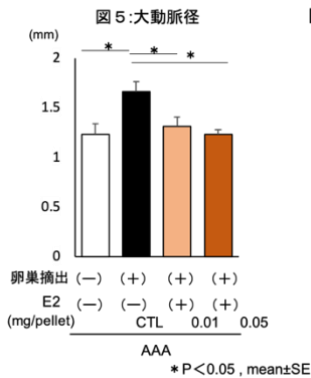
図4: Western blot解析



次に、内因性女性ホルモンの欠乏によって生じた上記の影響が、エストロゲン (E2) の働きによるものかどうかを検討するため、卵巣摘出後に E2 (60 日間徐放剤) を皮下に埋め込み AAA 誘導後の変化を対照群の CTL 群と比較した。

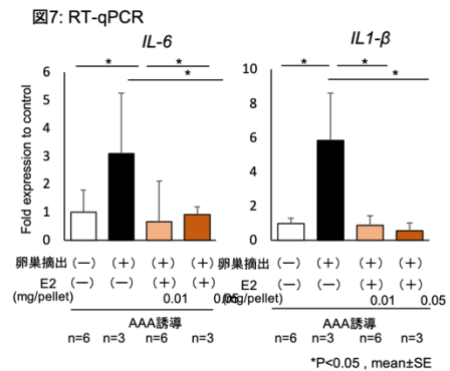
卵巣摘出によって拡大した大動脈径は、E2 の補充により sham+AAA 群と同等レベルまで優位に縮小した。補充した E2 の量間に優位差は見られなかった (図 5)。EVG 染色での血管構造解析では、卵巣摘出+AAA 誘導によって中膜の構造が壊れ、E2 補充によって sham+AAA 群と同程度まで瘤の形成が抑えられ、中膜の構造も保たれた (図 6)。

Real time PCR を用いた大動脈組織の RNA 解析では、炎症性サイトカインである IL-6, IL-1β が卵巣摘出+AAA によって上昇し、E2 補充によって sham+AAA 群と同レベルまで抑制された。補充した E2 の用量間に優位差は認められなかった (図 7)。



以上により、卵巣摘出による女性ホルモンの欠乏は大動脈瘤の形成を促進し、E2 の補充によりその形成を抑制することができた。E2 による瘤の形成抑制にはマクロファージの浸潤、IL-1β、IL-6 の抑制が関連することが示唆された。E2 補充量としては用量依存性はなく、従来の低用量 E2 より低量でも心血管系には効果がある可能性が示唆された。

今後、エストロゲン受容体の関与など詳細な機序解明により、大動脈瘤に対する性ホルモンや Selective Estrogen Receptor Modulator の補充など治療戦略の一助となる。



2). エストロゲン低下が筋炎症を介して筋老化・機能低下に与える影響

野生型メスマウス (20 週齢) において、エストロゲン欠乏を卵巣摘出により惹起した。卵巣摘出後に AAA を誘導し、エストロゲン低下および血管炎症の筋肉への影響を検討した。まず、骨格筋重量は、ヒラメ筋では卵巣摘出によって優位に重量が減少したが AAA による影響はみられなかった。腓腹筋も卵巣摘出によって重量が減少したが優位な差は見られず、AAA による影響もみられなかった (図 8)。

卵巣摘出後に E2 を補充し、E2 による筋肉への影響を検討したところ、卵巣摘出によって低下した握力は、E2 の補充によって増加傾向にあったが有意な差は見られなかった。また、wire hang テストによる運動機能評価でも卵巣摘出によって運動機能は低下し、E2 補充によって回復するようではあったが、優位な差は認められなかった。今後 n 数を増やして再検討予定としている。

図8: 骨格筋重量

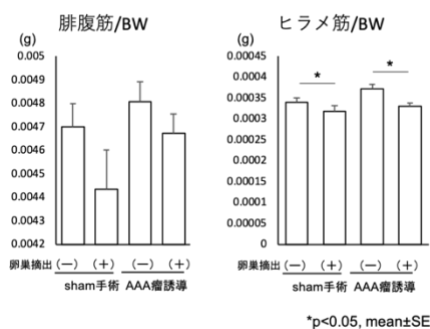


図9: 握力

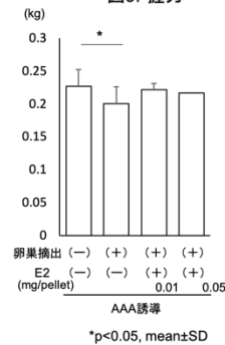
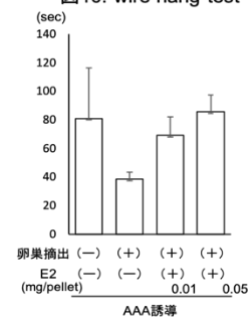


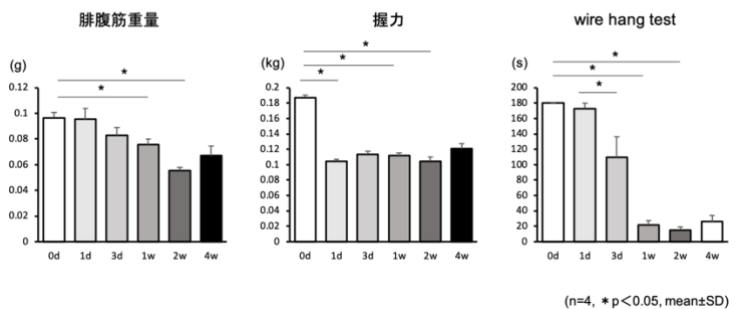
図10: wire hang test



次に、野生型メスマウス(10 週齢)の下肢筋をワイヤー固定し、廃用性サルコペニアを誘導した。筋肉への影響がどの時期に生じるのかを検討するため、ワイヤー固定後、1 日、3 日、1 週間、2 週間、4 週間後に骨格筋 (ヒラメ筋、腓腹筋) を回収した。腓腹筋重量は 3 日後より優位に低下し、2 週間後が最も低下した。握力による筋力評価では 1 日後より低下し、その後の大きな変化は見られなかった。Wire hang 検査による筋肉の機能検査では、

3 日後より優位な低下がみられ、1 週間後に低下後は大きな変化は見られなかった (図 11)。筋肉の重量・機能ともにワイヤー固定 1 週間後には低下することが示唆された。

図11



今後は、以上の結果をもとに、筋代謝関連因子 (合成系および分解系) やアポトーシス、老化関連因子 (Sirt1 など) の発現に対する影響も検討予定である。骨格筋内の炎症は、骨格筋での炎症性細胞の局所や形質を病理組織学的に検証予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 七尾道子、孫輔卿、豊島弘一、大浦美弥、小室絢、小川純人、秋下雅弘
2. 発表標題 卵巣摘出は大動脈瘤形成と局所炎症を促進する：マウスモデルを用いた検討
3. 学会等名 性差医学・医療学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 七尾道子、孫輔卿、豊島弘一、大浦美弥、小室絢、小川純人、秋下雅弘
2. 発表標題 エストロゲン欠乏による大動脈瘤形成の促進作用 - 卵巣摘出マウスモデルを用いた検討 -
3. 学会等名 第63回 日本老年医学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 七尾道子、孫輔卿、豊島弘一、大浦美弥、小室絢、小川純人、秋下雅弘
2. 発表標題 エストロゲンは腹部大動脈瘤の形成を抑制する：卵巣摘出マウスを用いた検討
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Michiko Nanao-Hamai, Bo-Kyung Son, Aya Komuro, Miya Oura, Koichi Toyoshima, Zehan Song, Sumito Ogawa, Masahiro Akishita
2. 発表標題 Inhibitory effects of estrogen on abdominal aortic aneurysm formation in ovariectomized mice
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 七尾道子、孫輔卿、宋 沢涵、豊島弘一、大浦美弥、小室絢、小川純人、秋下雅弘
2. 発表標題 エストロゲンによる大動脈瘤形成の制御—マウスモデルを用いた検討—
3. 学会等名 第64回日本老年医学会学術集会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 七尾道子、孫輔卿、宋 沢涵、豊島弘一、大浦美弥、小室絢、小川純人、秋下雅弘
2. 発表標題 大動脈瘤形成に対するエストロゲンの抑制作用：マウスモデルを用いた検討
3. 学会等名 第54回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関