

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592121

研究課題名（和文）エストロゲン受容体  $\alpha$  と  $\beta$  を介した誘導型 NO 合成酵素発現調節に関わる共役因子の解析

研究課題名（英文）Analysis of regulation of the inducible nitric oxide synthase gene by estrogen receptor alpha and beta.

研究代表者

堤 誠司 (TSUTSUMI SEIJI)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：50323168

研究成果の概要（和文）：従来ホルモン補充療法(HRT)において、エストロゲン(E2)と共に用いられていたメドロキシプロゲステロン酢酸エステル(MPA)は、E2による血管内皮細胞における一酸化窒素(NO)産生誘導活性を減弱し、血管拡張作用を抑制する。MPAの代わりに子宮内膜症治療剤である黄体ホルモン製剤のジエノゲスト(DNG)をE2と併用し、血管内皮機能を解析した結果、DNGはE2が誘導する血管内皮細胞のNO産生を抑制せず、MPAに代わるHRT薬として使用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of dienogest (DNG), which has a profile similar to that of natural progesterone (P4) on the favorable effects of estrogen in endothelial function. Human umbilical vein endothelial cells were treated with medroxyprogesterone acetate (MPA), DNG, or P4 with or without estradiol (E2), and then we examined nitric oxide (NO) production. Although MPA attenuated E2-induced NO production, neither DNG nor P4 inhibited E2 effects. These results suggest that DNG did not inhibit the restoration of vasodilatation by E2. DNG may have an advantage compared with MPA on the endothelial function in postmenopausal women receiving hormone therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：エストロゲン、エストロゲン受容体、血管平滑筋、誘導型 NO 合成酵素、転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 心血管系疾患による死亡は、欧米諸国と同様に我が国でも男女の死因の第一位であり、女性の心血管疾患の発症は、閉経前は男性に比べ低率であるが閉経を境にして男性と同様の増加を示す(Barrett-Connor E. et al. JAMA. 1991;265:1861-1867)。この原因としてエストロゲン(E2)分泌が減少することにより、血管の保護作用が低下することが一因と考えられており、その重要な因子の一つに一酸化窒素(NO)がある(Chen Z. et al. J Clin Invest. 1999;103:401-406)。

(2) 心血管系におけるNOの作用は、血管平滑筋の弛緩作用、血管平滑筋増殖抑制、白血球・血小板凝集抑制作用、活性酸素産生抑制など、生理的機能維持にはもちろん、敗血症性ショックによる低血圧などの病態形成においても重要な役割を果たしている。(Lowenstein CJ. et al. Ann Intern Med. 1994;120:227-237)。

NOはNO合成酵素(nitric oxide synthase: NOS)により産生され、NOSには3つのタイプ(神経型: neuronal NOS (nNOS)、誘導型: inducible NOS (iNOS)、内皮型: endothelial NOS (eNOS))が存在する(Nathan C. et al. Cell. 1994;78:915-918)。

(3) 血管平滑筋細胞においては、種々のサイトカインやステロイドホルモンによりiNOSが刺激され、NOが産生されるがその機序は十分に解明されてい

い。

我々は今まで、E2による心血管系の作用について(Doshida M. et al. J Biol Chem. 2006;281:24270-8, Takahashi K. et al. J Endocrinol. 2003;178:319-329, Mori-Abe A. et al. J Endocrinol. 2003;178:417-426)、および神経細胞の神経突起伸長作用(Du B. et al. J Endocrinol. 2004;183:605-615)などエストロゲン受容体(ER)を介する細胞保護作用のシグナル伝達について解析してきた。さらに、E2による作用が血管平滑筋細胞と、血管内皮細胞との間で相反する事を見だし、そのメカニズムについて検証した(Kawagoe J. et al. Endocrinology. 2007;148:6092-9)。

また、iNOSの発現調節機構に関しては、ERに存在する $\alpha$ と $\beta$ の二つのサブタイプが、血管平滑筋細胞においてE2はER $\alpha$ を介して抑制的に、逆にER $\beta$ を介して促進的にiNOSの発現を調節していることを解明した(Tsutsumi S. et al. J Endocrinol. 2008;199:267-73)。

(4) このような基礎的な背景をもとに、更年期症状を呈する女性で、子宮を有する女性における行われるホルモン補充療法(HRT)では、E2に加え、E2単独投与による子宮内膜癌の発生増加を予防するために、黄体ホルモンの併用が必須とされている。黄体ホルモン剤は合成黄体ホルモン剤である酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)が用いられている。E2は血管内皮細胞におい

てNOの産生を促進し、血管保護的な作用を有するが、MPAは天然型プロゲステロン(P4)と異なり、E2のNO産生促進作用を抑制することが明らかになってきている。そのため、E2の血管に対する好ましい作用を抑制しない黄体ホルモン剤の使用が今後のHRTの課題である。

(5) 子宮内膜症治療薬であるジェノゲスト(DNG)はプロゲステロン受容体(PR)に選択性の高いPR作動薬であり、血管においてもP4様作用が期待される薬剤である。諸外国ではすでにHRTに使用されているが、心血管系への影響については解析されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、血管平滑筋細胞および血管内皮細胞において、ERを介するNOSの発現に関わる調節機序をさらに解明することを目的とし、さらにDNGがE2の血管保護作用のひとつである、血管内皮におけるNO産生促進作用に与える影響について、基礎・臨床の両面から検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 基礎研究：

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて、

- ① MPA, DNG, P4がE2のNO産生促進作用に与える効果を、NO検出用蛍光色素(DAF2-DA)を用いて解析した。
- ② PI3-kinase/AktおよびERKを介したeNOSのリン酸化をwestern blot法で検討した。

### (2) 臨床研究：

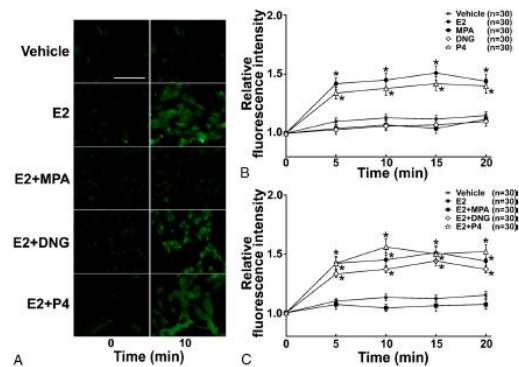
卵巣摘出術により外科的に閉経となった20名の女性を、非投薬のコントロール群、E2貼付剤単独群、MPA併用群、ジェノゲスト併用群の4群(各群5名)に分けた。術

後7日目より1週間の投薬を行うとともに、術前、投薬前、投薬後で血流依存性血管拡張反応(FMD)を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 基礎的研究：

- ① MPAはEにより誘導されるNOの産生を有意に抑制( $p < 0.05$ )したが、DNGおよびP4は抑制しなかった。

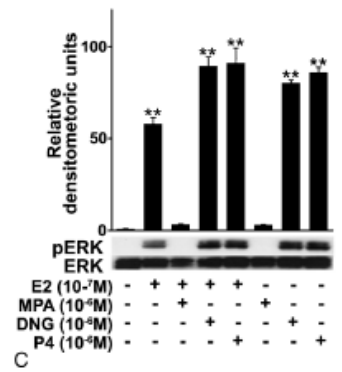
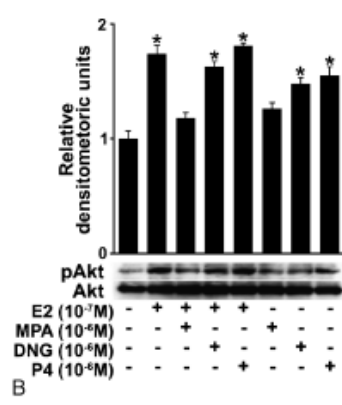
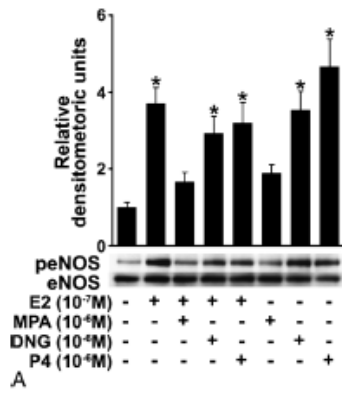


図A: リガンド投与後10分後のNO産生を蛍光で検出した。MPA併用群ではE2によって誘導されるNO産生が減少している。

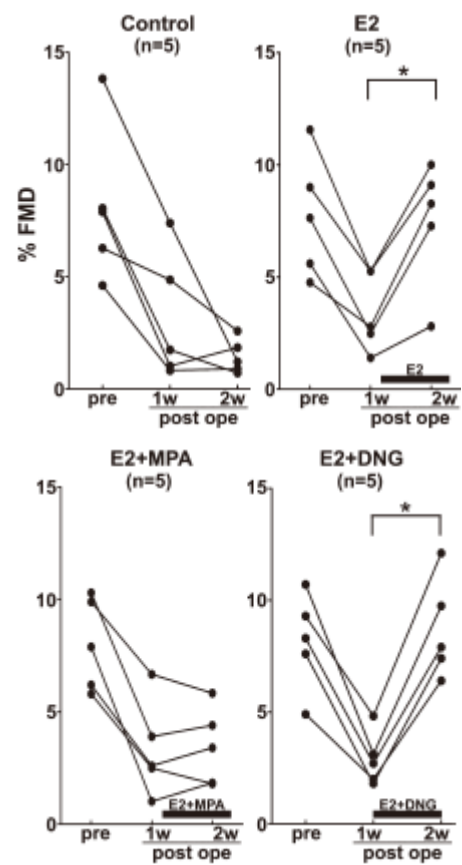
図B: リガンドをそれぞれ単独で投与した際の蛍光強度の時間的経過を示す。E2とP4単独では蛍光強度が増強する。MPA, DNG単独では、コントロール同様に蛍光強度は変わらない。

図C: リガンドを併用して投与すると、MPA併用群では蛍光強度が増強されない。

- ② MPAはEにより誘導eNOS(A), Akt(B)およびERK(C)のリン酸化を有意に抑制( $p < 0.05$ )したが、DNGおよびP4は抑制しなかった。



(2) 臨床的研究：  
術後7日目に低下するFMDをE2は術前のレベルまで回復させた。MPAはこのE2の作用を有意に抑制したが、DNGは抑制しなかった。



(3) 考察：

DNGはE2のNO産生促進を介した血管拡張反応を抑制しないことが示唆された。心血管系への影響を考慮すると、DNGはMPAよりもHRTにおいてE2と併用する薬剤としてより適していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

①Estrogen induces neurite outgrowth via Rho family GTPases in neuroblastoma cells. Takahashi K, Piao S, Yamatani H, Du B, Yin L, Ohta T, Kawagoe J, Takata K, Tsutsumi S, Kurachi H. Mol Cell Neurosci. 2011;48:217-24. PMID: 21864685 (査読あり)

②Effect of dienogest on estrogen-induced nitric oxide production in human umbilical vein endothelial cells and endothelium-dependent vasodilatation in postmenopausal women. Henmi N, Takahashi K, Amita M, Takata K, Ohta T, Tsutsumi S, Takahashi T, Kurachi H. Menopause. 2010;17:615-21. PMID: 20386344 (査読あり)

③Molecular mechanism of the inhibition of estradiol-induced endometrial epithelial cell proliferation by clomiphene citrate. Amita M, Takahashi T, Tsutsumi S, Ohta T, Takata K, Henmi N, Hara S, Igarashi H, Takahashi K, Kurachi H. Endocrinology. 2010;151:394-405. PMID: 19934375 (査読あり)

[学会発表] (計1件)

① 逸見典子 他. エストロゲンの血管内皮機能改善作用に対するジェノゲストの影響に関する基礎的・臨床的検討. 第61回日本産科婦人科学会 2009. 4. 3-5、国立京都国際会館

[その他]

ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/ObGyn/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堤 誠司 (TSUTSUMI SEIJI)  
山形大学・医学部・講師  
研究者番号 : 50323168

### (2) 研究分担者

高橋 俊文 (TAKAHASHI TOSHIFUMI)  
山形大学・医学部・講師  
研究者番号 : 20302292  
倉智 博久 (KURACHI HIROHISA)  
山形大学・医学部・教授  
研究者番号 : 40153366

### (3) 連携研究者

なし。