

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09546

研究課題名（和文）動脈硬化リスクを軽減しうる安全なホルモン補充療法の分子基盤確立

研究課題名（英文）The establishment of the safe hormone replacement therapy that can reduce arteriosclerosis 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）・講師

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）：本研究では、ホルモン補充療法に用いられるE2およびEqによる実際の動脈硬化発症リスクを検討するためにin vivoでの実験を行った。ApoE蛋白欠損マウスを動脈硬化モデルマウスとして使用し、E2およびEqを皮下投与したのち9および12週後に大動脈およびその分枝を摘出した。摘出した大動脈およびその分枝をen face解析およびaortic root解析を用いることにより動脈硬化病変の検討を行った。その結果、control群に比しE2では動脈硬化抑制作用が見られたが、Eqの投与ではある程度の抑制効果は認められたものの、その効果はE2に比し減弱していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、EqおよびE2の経皮投与は脂質プロファイルを変化させることなくアテローム性動脈硬化病変の形成を阻害し、E2の方がより優れた効果を示した。これらの結果は、Eqを含むCEEよりもE2の短期および長期の使用が、動脈硬化の発生に対してより優れた抑制効果を有する可能性を示唆している。しかしながら、ホルモン補充療法に併用される酢酸メドロキシプロゲステロン（MPA）および天然型のP4を含むプロゲステンの動脈硬化発症に対する効果は未解明なためさらに詳しい検討が必要であり、動脈硬化予防のための最適なHRTレジメンを解明するためのさらなる研究が必要である可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, in vivo experiments were conducted to examine the actual risk of atherosclerosis induced by E2 and Eq used in hormone replacement therapy. E2 and Eq were subcutaneously administered. Aorta and its branches were examined for atherosclerotic lesions using en face analysis and aortic root analysis. The results showed that E2 showed an inhibitory effect on atherosclerosis compared to the control group, but the effect of Eq was weaker than that of E2, although a certain degree of inhibition was observed.

研究分野：女性医学

キーワード：ホルモン補充療法 動脈硬化 エストロゲン

### 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 がそれぞれ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。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点で独創的である。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 で常用されている 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。さらに研究代表者らは CEE に含まれる Eq が天然型の E2 と異なり、接着因子の発現および単球接着数を上昇させることをすでに予備実験により見出している。また、研究代表者らは当領域ではこれまでに報告のない動脈硬化モデルマウスを用いた実験系を確立させることに成功した。

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、各種エストロゲンおよびエストロゲン様物質を添加した後に、以下の方法で接着因子の発現、単球接着の変化、制御機序を検討した。さらに ApoE 蛋白欠損マウスを使用し *in vivo* での解析を行った。

#### 各種エストロゲンおよびエストロゲン様物質による接着因子発現変化の検討

エストロゲンとして、天然型の E2、エストロン (E1)、エストリオール (E3)、エステトロール (E4)、CEE に含まれる Eq、エクイレニン (EL)、経口避妊薬に含まれるエチニルエストラジオール (EE) を用いた。以上のエストロゲンを HUVEC に単独投与あるいは同時投与を行い、real-time PCR 法で mRNA 発現変化を比較検討し、ELISA 法でタンパク発現変化を比較検討した。

#### 各種エストロゲンおよびエストロゲン様物質による HUVEC への単球接着の検討

カバーガラス上に単層培養した HUVEC に上記エストロゲン様物質を添加した後、flow chamber

systemにより単球接着数を比較検討した。HUVEC上を単球系の培養細胞株であるU937を一定の速度で灌流させ、一定時間後に接着したU937の個数を計測し比較検討を行う。接着因子発現が増加したHUVECでは単球接着数が増加することはすでに予備実験により確認している。

### 各種エストロゲンおよびエストロゲン様物質による炎症性サイトカイン発現変化の検討

接着因子の発現はTNF- $\alpha$ やIL-1、IL-6等の炎症性サイトカインあるいはNF- $\kappa$ Bを介する経路により制御されていることが報告されている(Jahnke et al, 1995)。そのため、各種エストロゲンにより接着因子発現が増強される場合、各種炎症性サイトカインの発現変化を介していることが想定される。それらを検証するため、各種エストロゲンを投与したHUVECにおける炎症性サイトカイン発現変化をreal-time PCR法、ELISA法、免疫組織化学法で検討した。

炎症反応の経路として重要な役割を占めるNF- $\kappa$ Bの発現および局在についてはWestern blot法、蛍光免疫組織化学法を用いて検討した。

### モデルマウスを使用した、各種エストロゲンおよびエストロゲン様物質によるアテローム性動脈硬化病変の解析

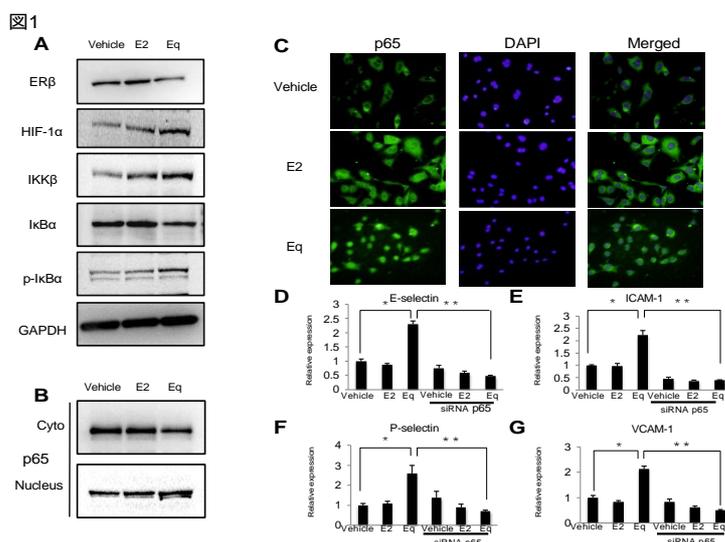
ApoE蛋白はLDLなどのリポ蛋白を構成する主要アポリポ蛋白質の一つで、LDLレセプターのリガンドとして機能し、リポ蛋白質を血中から除去することに関与する。ApoE蛋白を欠損させたマウスは、血漿中の総コレステロールが増加し、高脂肪食を摂取させることによりアテローム性動脈硬化病変を早期に観察することができる(Andrew et al, 1992)。そこで本研究では、動脈硬化モデルマウスであるApoE蛋白欠損マウスを使用した。

すべての群で卵巣を摘出して内因性エストロゲンを抑制した上で、高脂肪食のみを与える群と、高脂肪食を与えつつも各種エストロゲンおよびエストロゲン様物質を摂取させる群で解析を行い、3-6ヶ月後の体重、子宮重量、脂質マーカー(総コレステロール、中性脂肪、LDL、HDL)、炎症マーカー(TNF、MCP-1など)、血管のプラーク量を比較して、各種エストロゲンおよびエストロゲン様物質の動脈硬化進展抑制効果を検証した。

プラークの評価は、既報通り大動脈弓部に切開をいれて展開し(Daugherty et al, 2017)、大動脈弓部および腕頭動脈部のアテローム性動脈硬化病変の面積を求めて解析する。すでに研究代表者による先行研究で本評価法の手技は確立できている。加えて、大動脈洞部の凍結切片を作成し、脂肪染色を行い大動脈弁近傍の動脈硬化病変についても解析した。

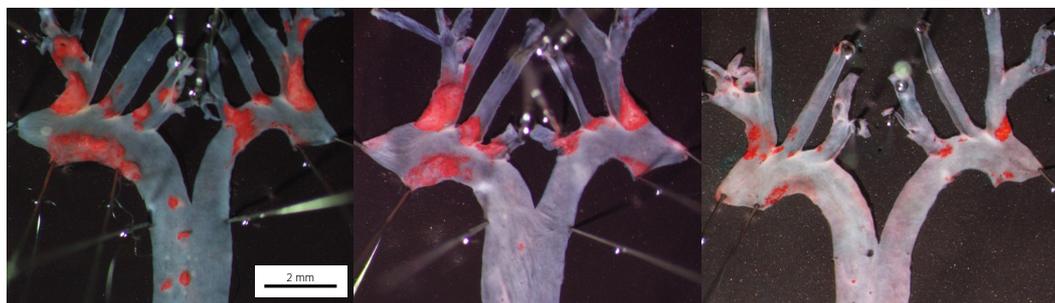
## 4. 研究成果

Eqは、E2または他のタイプのエストロゲンではなく、接着分子E-selectinおよびICAM-1のmRNA発現およびタンパク質発現を、対照群と比較して有意に増加させた。Eq処理により、U937単球系細胞のHUVECへの接着は対照群と比較して増加し、エストロゲン受容体(ER)の発現は減少し、NF- $\kappa$ Bの活性化に関与するタンパク質の発現は対照群と比較して増加した。さらに、HUVEC核におけるNF- $\kappa$ Bサブユニットp65の蓄積は、Eq処理によって促進された。対照的に、E2処理ではHUVECに接着した単球細胞数は増加せず、ERやNF- $\kappa$ B活性化タンパク質の発現も変化しなかった(図1A-G)。



さらに、E2およびEqによる実際の動脈硬化発症リスクを検討するためにin vivoでの実験を行った。ApoE蛋白欠損マウスを動脈硬化モデルマウスとして使用し、E2およびEqを皮下投与したのち9および12週後に大動脈およびその分枝を摘出した。摘出した大動脈およびその分枝をen face解析およびaortic root解析を用いることにより動脈硬化病変の検討を行った。その結果、control群に比しE2では動脈硬化抑制作用が見られたが、Eqの投与ではある程度の抑制効

果は認められたものの、その効果はE2に比し減弱していることを見出した(図2、3)。



Placebo

Equilin

E2

図2 en face解析結果



Placebo

Equilin

E2

図3 aortic root解析結果

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shimura Koki, Tarumi Yosuke, Fujii Maya, Ogawa Kanae, Maeda Eiko, Tanaka Yukiko, Okimura Hiroyuki, Kataoka Hisashi, Takaoka Osamu, Ito Fumitake, Koshiba Akemi, Khan Khaleque N., Kusuki Izumi, Kitawaki Jo, Mori Taisuke	4. 巻 30
2. 論文標題 Low-Nutrient Environment-Induced Changes in Inflammation, Cell Proliferation, and PGC-1 Expression in Stromal Cells with Ovarian Endometriosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Reproductive Sciences	6. 最初と最後の頁 1094 ~ 1102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43032-022-01089-5	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 Okimura Hiroyuki, Tanaka Yukiko, Fujii Maya, Shimura Koki, Maeda Eiko, Ito Fumitake, Khan Khaleque N., Nakamura Yoshitaka, Mori Taisuke, Kitawaki Jo	4. 巻 88
2. 論文標題 Changes in the proportion of regulatory T cell subpopulations during menstrual cycle and early pregnancy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 e13636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aji.13636	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 Fujii Maya, Koshiba Akemi, Ito Fumitake, Kusuki Izumi, Kitawaki Jo, Mori Taisuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Postoperative Pregnancy Outcomes Following Laparoscopic Surgical Management in Women with Stage III/IV Endometriosis: A Single-Center Follow-Up Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gynecology and Minimally Invasive Therapy	6. 最初と最後の頁 153 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/gmit.gmit_132_22	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 Izumi Yuko, Kataoka Hisashi, Koshiba Akemi, Ito Fumitake, Tanaka Yukiko, Takaoka Osamu, Maeda Eiko, Okimura Hiroyuki, Sugahara Takuya, Tarumi Yosuke, Shimura Koki, Khan Khaleque N., Kusuki Izumi, Mori Taisuke	4. 巻 209
2. 論文標題 Hepcidin as a key regulator of iron homeostasis triggers inflammatory features in the normal endometrium	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 191 ~ 201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2023.10.402	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 Tahara Nanami, Ito Fumitake, Kawamata Mari, Otani Masahiro, Mori Taisuke	4. 巻 40
2. 論文標題 Dienogest does not augment the gene expression of adhesion molecules, MCP-1, and monocyte adherence in human endothelial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gynecological Endocrinology	6. 最初と最後の頁 2270621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09513590.2023.2270621	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 Tarumi Yosuke, Mori Taisuke, Shimura Koki, Izumi Yuko, Okimura Hiroyuki, Kataoka Hisashi, Kokabu Tetsuya, Ito Fumitake, Koshiba Akemi, Khan Khaleque N, Kusuki Izumi, Kitawaki Jo	4. 巻 107
2. 論文標題 Progesterone Receptor Status of Epithelial Cells as a Predictive Marker for Postoperative Recurrence of Endometriosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 1552 ~ 1559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgac118	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 Kakibuchi Akiyo, Ito Fumitake, Kokabu Tetsuya, Okimura Hiroyuki, Takaoka Osamu, Mori Taisuke	4. 巻 97
2. 論文標題 Robot-assisted laparoscopic hysterectomy for early-stage endometrial cancer with massive uterine leiomyomas: A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Surgery Case Reports	6. 最初と最後の頁 107473 ~ 107473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijscr.2022.107473	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 Okimura Hiroyuki, Tanaka Yukiko, Fujii Maya, Shimura Koki, Maeda Eiko, Ito Fumitake, Khan Khaleque N., Nakamura Yoshitaka, Mori Taisuke, Kitawaki Jo	4. 巻 88
2. 論文標題 Changes in the proportion of regulatory T cell subpopulations during menstrual cycle and early pregnancy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 e13636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aji.13636	査読の有無 無
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 Kitamura Y, Ito F, Kokabu T, Mori T, Kusuki I, Kitawaki J.	4. 巻 10
2. 論文標題 Primary Ovarian Leiomyoma Associated with Multiple Uterine Leiomyomas.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gynecol Minim Invasive Ther.	6. 最初と最後の頁 50-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/GMIT.GMIT_97_19	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 Waratani M, Ito F, Tanaka Y, Mabuchi A, Mori T, Kitawaki J.	4. 巻 47
2. 論文標題 Severe coronavirus disease pneumonia in a pregnant woman at 25 weeks' gestation: A case report.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res	6. 最初と最後の頁 1583-1588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.14701	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 Tarumi Yosuke, Mori Taisuke, Okimura Hiroyuki, Maeda Eiko, Tanaka Yukiko, Kataoka Hisashi, Ito Fumitake, Koshiba Akemi, Kusuki Izumi, Kitawaki Jo	4. 巻 86
2. 論文標題 Interleukin 9 produced by helper T cells stimulates interleukin 8 expression in endometriosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 e13380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aji.13380	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 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Takoka O, Mori T, Shimura K, Ogawa K, Okimura H, Kataoka H, Ito F, Koshiba A, Kusuki I, Kitawaki J.
2. 発表標題 Daidzein-rich isoflavone aglycones inhibit HSD17beta 1 in endometriosis.
3. 学会等名 73th Annual Congress of Japan Society of Obstetrics and Gynecology. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tarumi Y, Mori T, Koshiba A, Shimura K, Okimura H, Kataoka H, Ito F, Khan KN, Kusuki I, Kitawaki J.
2. 発表標題 Low expression of progesterone receptor acts as a predictive factor for recurrence of ovarian endometrioma and concurrence of deep endometriosis.
3. 学会等名 73th Annual Congress of Japan Society of Obstetrics and Gynecology. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fujii M, Tanaka Y, Okimura H, Sugahara T, Maeda E, Kataoka H, Ito F, Koshiba A, Khan KN, Mori T, Kusuki I, Kitawaki J.
2. 発表標題 Local variation of regulatory T cells during menstrual cycle in endometriosis.
3. 学会等名 73th Annual Congress of Japan Society of Obstetrics and Gynecology. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fujii M, Koshiba A, Shimura K, Otani M, Ito F, Mori T, Kusuki I, Kitawaki J.
2. 発表標題 Effects of laparoscopic surgery with complete excision of deep endometriosis on pregnancy rate of non-assites reproductive technology.
3. 学会等名 22th Annual Congress of the Asia Pacific Association for Gynecologic Endoscopy and Minimally Invasive Therapy (APAGE 2021). (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 伊藤文武, 北脇 城.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 1626
3. 書名 § 20-30 早発閉経. 1252専門家による 私の治療 [2021-22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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------