2. 病的老化とそのエストロゲンによる予防の機序

折茂 彰¹⁾ 井上 聡¹⁾ 野田 哲生²⁾ 村松 正實¹⁾

Key words : estrogen, estrogen receptor (ER), estrogen-responsive gene, efp (estrogen-responsive finger protein), senile disease

(日老医誌 1999; 36: 95—98)

研究背景

閉経後の女性における骨粗鬆症の増加は、高齢化が進む現代社会において、高齢者が活動的な生活を送る上の障害の1つとなっている。エストロゲン補充による骨粗鬆症の改善に加えて、最近では虚血性心疾患やアルツハイマー型痴呆症などに対する治療効果も報告されており¹⁾、これら老年病に対するエストロゲンの有効性が期待されている。一方、副作用として、乳癌、子宮内膜症や子宮癌などの増加が大きな問題点となるが、プロゲステロンとの併用にてこれらある程度抑えることが可能とされ、今後エストロゲン、プロゲステロンの量比を検討した臨床的研究が重要になってくると思われる。とはいえ、最近の環境ホルモンの騒ぎの中、ホルモン補充療法の適応を明確にすることおよびその安全性に関する理解も深めていくことが必須である。そもそも女性に閉経という現象がなぜ起こるのか、それは生体に対し有利なのか不利なのか、加えてエストロゲンのこれら老年病に対する効果、及び発癌や細胞増殖に対する作用の分子機構はほとんど明らかになっていないのである。我々はその第一歩として、エストロゲンの下流応答遺伝子の機能解析を行うことによりエストロゲンの作用機構の解明を検討している。エストロゲンははじめとするステロイド、サイロイド、レチノイン酸などの脂溶性物質は、細胞内に拡散し核にある受容体に結合後、ホルモン応答配列に結合して新たな下流応答遺伝子の転写活性化を引き起こすことが知られている。我々はエストロゲン受容体との

図1 エストロゲン作用の媒介因子としてのエストロゲン応答遺伝子群

結合性を利用して、3'の non-coding 領域にエストロゲン応答配列を有し RING finger motif を持ったエストロゲン下流応答遺伝子 efp を同定している²⁾。RING finger motif は多くの転写調節因子に見つけられており、蛋白-蛋白結合に重要であるとされ、その family の多くのメンバーは癌化、細胞増殖、アポトーシス、細胞情報伝達、細胞周期、発生など広範囲に関係し、転写調節因子として働くことがわかっている^{3,4)}。efp がエストロゲン情報伝達の媒介調節因子として働く可能性について、今回作製した efp 遺伝子欠損マウスの実験結果をもとに考察したい。

結果および考察

efp は ERα の発現部位に一致して子宮の内膜細胞、乳腺の上皮細胞や卵巣の顆粒膜細胞で強く発現しており、また17β-estradiol 刺激に対し子宮やヒト乳線由来細胞などで約2～8時間をピークとする迅速な応答性を示したことから、一次的応答遺伝子としてある特定のエストロゲン作用を媒介している可能性が示唆されている^{2,5)}。図1に示すようにエストロゲン下流応答遺伝子群は、エストロゲン受容体の直下で誘導される一次的応答

The Molecular Mechanisms of Estrogen Action Against Senile Disease

1) Akira Orimo, Satoshi Inoue, Masami Muramatsu: 埼玉医科大学第二生化学

2) Tetsuo Noda: 癌研細胞生物部
Akira Orimo

Email: aorimo@saitama-med.ac.jp

図2 (1) ジーンターゲティング法によるマウス *etp* 遺伝子の欠失 RING finger motif が削除され、Neo カセットが挿入された。

遺伝子群およびその後の二次的、三次的反応により誘導されてくる二次的、三次的応答遺伝子群に大別され、エストロゲンの多彩な作用に至るまでの媒介因子と考えられる⁶⁾。一次的応答遺伝子群の中には、他に IGF (insulin-like growth factor) を代表とするいくつかの growth factor が知られている。また、最近、乳癌の原因遺伝子として知られる BRCA1 や cyclin D1 などエストロゲンで誘導される (二次的、三次的応答遺伝子群に属する) ことが報告されており^{7,8)}、エストロゲンと乳腺上皮の増殖や乳癌との関係および子宮内膜の増殖作用との関係で注目されている。しかしながら、これらの遺伝子誘導がエストロゲン作用と直接関係するかについては不明である。一方、骨や血管においてもエストロゲン誘導性の遺伝子は少数しか知られておらず、ヒト骨肉腫由来細胞株にて、type1 プロコラーゲンや TGFβ が⁹⁾、ラット大腿骨において TGFβ3 の発現が誘導されること¹⁰⁾が報告されている。また血管においては、エストロゲンが内皮型 nitric oxide synthase (NOS) の発現を誘導し、血管拡張作用を促す事が報告されている¹¹⁾。以前より我々は、血管壁におけるエストロゲン受容体 α (ERα) の存在および受容体を介したエストロゲンの抗動脈硬化作用の可能性を示唆してきており¹²⁻¹⁴⁾、また *efp* 遺伝子が血管平滑筋細胞や骨芽細胞で発現していることより、*efp* ホモ接合体マウスの脈管系や骨格系について解析を行うことを計画した。*efp* 遺伝子欠損マウスは RING finger domain の一部を PGK-neo カセットで置き換えた形の targeting vector に起因し (図2-1) その後 *efp* 変異 ES (Embryonic Stem) cell を選択し blastocyst に microinjection することによりキメラマウスを得て、ヘテロ接合体マウス同士の掛け合わせによりホモ接合体マウスが得られた。発生に必須の因子¹⁵⁾である場合は、胎生致死になる事が

	ヒト ERα 遺伝子異常症	ERα 遺伝子欠損マウス
身体所見	高身長 (204cm) 外反肘, 黒色棘細胞症	正常範囲
骨格系	骨端線未閉鎖 骨量減少 (-2SD)	骨量異常 (雄では骨量低下, 雌では上昇傾向)
血管系	冠動脈の石灰化	機械的血管内膜障害に対するエストロゲンの血管保護作用の残存
精子所見	精子数正常 精子生存率低下	精子形成障害, 精巣萎縮 不妊娠
女性生殖器		子宮, 乳腺: 低形成 卵巣: 過形成, 排卵障害による不妊娠

図3 ヒト ERα 遺伝子異常症と ERα 遺伝子欠損マウスの比較

多いが *efp* ホモ接合体マウスは、Southern blot による genotype の結果よりメンデルの法則に従って生まれてくることがわかった。また、Northern blot 解析や Western blot 解析にてホモ接合体マウスでは完全な *efp* 蛋白の欠損が確認された。*efp* ホモ接合体マウスの動脈硬化症に関する解析として、コレステロール diet 投与後の血管壁の性状および血管内皮障害やカフモデルなどに関しても現在検討中である。また、骨格系に関しては現在骨密度等を定量中であり、老化性の変化も含めて鋭意追究する予定である。

図3に示す様に1994年に ERα 遺伝子の変異をホモ接合体で持った男性例¹⁶⁻¹⁸⁾が報告され、また1993年にエストロゲン受容体 α (ERα) の遺伝子欠損マウス¹⁹⁻²⁵⁾が作製されて以来、エストロゲン研究は急速な進歩を遂げているが、ここで問題となるのはこれらのモデルにおいて ERα 遺伝子の機能欠損が、必ずしも骨量の減少や動脈硬化を引き起こさなかったことである。つまり ERα 遺伝子変異を有した症例には確かに骨量の減少がみられたが、その家系自体に骨量減少傾向がみられ遺伝子特異的な変化とは言い切れないこと、また明らかな虚血性心疾患の既往が認められていないこと¹⁷⁾。加えて、ERα 遺伝子欠損マウスにおいても、雄では骨量減少が見られたものの、雌では逆に増加傾向にあったことや、機械的血管内皮障害に対する血管保護作用が残存していた²⁴⁾ことが報告されたのである。これらの現象の解釈として、1996年に新規のエストロゲン受容体として発見された ERβ²⁶⁻²⁸⁾ (核内受容体の family に属し ERα に非常によく類似した構造を持つ) の代償作用を考えることができる。ERβ は、リガンド結合実験や転写活性化実験などより、ERα 同様にエストロゲンの受容体として機能することが証明されており、加えて ERα との結合実験に

図2 (2) efp 遺伝子欠損マウスの外見

W:野生型, E:ヘテロ接合体マウス, O:ホモ接合体マウス

よりヘテロダイマー、ホモダイマーを形成することも示されている^{29,30)}。成体内機能に関してはまだはっきりしていないが、今後はER α 、ER β 欠損モデルの解析が待たれるところであり、それらの下流応答遺伝子の解析についても次のstepとして行われるべき課題である。

最後に、efp ホモ接合体マウスで現在わかっている異常についてふれると、efp ホモ接合体マウスは成長障害などを来すことなく発育するが(図2-2)、性周期の一致した各群の雌マウスの子宮重量/全体重を比較したところホモ接合体マウスにおいて有意に子宮重量/全体重の減少が確認された。また、卵巣摘出手術後2週間後の各群の雌マウスにエストロゲンを投与し、その反応性を子宮重量/全体重の増加の割合で比較したところ、ホモ接合体マウスにおいて子宮重量/全体重の増加は有意に低値であった(折茂 彰ら投稿準備中)。この様なホモ接合体マウスにみられた子宮における低形成およびエストロゲン低応答性は、efp が子宮内膜の増殖をエストロゲン依存性に positive に制御している可能性を示唆しており、増殖因子、細胞周期関連蛋白などとの関係についてのメカニズムの検討が興味深いところである。また、これらの異常の程度はER α 遺伝子欠損マウスの異常と比較すると軽度であり、他の下流応答遺伝子による代償機構が働いている事が十分に予測され、生体のネットワークの多様性を想像させられる。今後も複数の応答遺伝子の単離そしてその遺伝子欠損マウスの作製に加え、遺伝的な掛け合わせ実験等により、エストロゲンの受容体以降の情報伝達を明らかにしていきたい。加えて閉経や動脈硬化症や骨粗鬆症といった老年病との関係を追求していきたい。

おわりに

本稿では、病的老化である骨粗鬆症や動脈硬化症に対するエストロゲン予防効果のメカニズムについて下流応答遺伝子を中心に記載した。下流応答遺伝子に関する研究は核内受容体以外の他の転写因子でも同様に、今後更に追求していかなければならない未知の分野の一つである。今後、病的老化以外に正常老化現象に対する性ホルモンの作用メカニズムに関しても追求したい。

文 献

- 1) Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, et al.: Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 1996; 348: 429—432.
- 2) Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Kondo S, Toyoshima H, Kondo T, et al.: Genomic binding-site cloning reveals a novel estrogen responsive gene that encodes a RING finger protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11117—11121.
- 3) Saurin AJ, Borden KLB, Boddy MN, Freemont PS: Does this have a familiar RING? *TIBS* 1996; 21: 208—214.
- 4) Orimo A, Inoue S, Ikeda K, Sato M, Kato A, Tominaga N, et al.: Molecular cloning, localization and developmental expression of mouse brain finger protein (ZNF179); distribution of bfp mRNA partially coincides with the affected areas of Smith-Magenis Syndrome (SMS). *Genomics*, 1998; 54, 59—69.
- 5) Orimo A, Inoue S, Ikeda K, Noji S, Muramatsu M: Molecular cloning, structure and expression of mouse estrogen-responsive finger protein (efp); co-localization with estrogen receptor mRNA in target organs. *J Biol Chem* 1995; 270: 24406—24413.
- 6) 折茂 彰, 井上 聡, 村松正実: エストロゲンレセプターの下流応答遺伝子とその生体内機能. *実験医学* 1998; 16: 2447—2453.
- 7) Marks JR, Huper G, Vaughn JP, Davis PL, Norris J, McDonnell DP, et al.: BRCA1 expression is not directly responsive to estrogen. *Oncogene* 1997; 14: 115—121.
- 8) Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, Dauvois S, Parker MG, Truss M, et al.: 17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G (1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene* 1996; 12: 2315—2324.
- 9) Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme KA, Gallegos A, Korc M, et al.: Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science* 1988; 241: 81—84.
- 10) Yang NN, Bryant HU, Hardikar S, Sato M, Galvin RJ,

- Glasebrook AL, et al.: Estrogen and raloxifene stimulate transforming growth factor-beta 3 gene expression in rat bone: a potential mechanism for estrogen-or raloxifene-mediated bone maintenance. *Endocrinology* 1996; 137:2075—84.
- 11) Binko J, Majewski H: 17 beta-Estradiol reduces vasoconstriction in endothelium-denuded rat aortas through inducible NOS. *Am J Physiol* 1998; 274: 853—859.
  - 12) Orimo A, Inoue S, Ikegami A, Hosoi T, Akishita M, Ouchi Y, et al.: Vascular smooth muscle cells as target for estrogen. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195: 730—736.
  - 13) Orimo A, Inoue S, Ouchi Y, Orimo H: Vascular smooth muscle cells possess estrogen receptor and respond to estrogen. *Ann NY Acad Sci* 1995; 748: 592—594.
  - 14) Akisita M, Ouchi Y, Miyoshi H, Orimo A, Kozaki K, Eto M, et al.: Estrogen inhibits endothelin-1 production and c-fos gene expression in rat aorta. *Atherosclerosis* 1996; 125: 27—38.
  - 15) Okuda A, Fukushima A, Nishimoto M, Orimo A, Yamagishi T, Nabeshima Y, et al.: UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *EMBO J* 1998; 17: 2019—2032.
  - 16) Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, et al.: Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 1994; 331: 1056—1061.
  - 17) Sudhir K, Chou TM, Chatterjee K, Smith EP, Williams TC, Kane JP, et al.: Premature coronary artery disease associated with a disruptive mutation in the estrogen receptor gene in a man. *Circulation* 1997; 96: 3774—3777.
  - 18) Sudhir K, Chou TM, Messina LM, Hutchison SJ, Korach KS, Chatterjee K, et al.: Endothelial dysfunction in a man with disruptive mutation in oestrogen-receptor gene. *Lancet* 1997; 349: 1146—1147.
  - 19) Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O: Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11162—11166.
  - 20) Korach KS: Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science* 1994; 266: 1524—1527.
  - 21) Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Lindzey J, Golding TS, Lubahn DB, et al.: Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 1441—1454.
  - 22) Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, et al.: Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 1996; 137: 4796—4805.
  - 23) Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, et al.: A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 1997; 390: 509—512.
  - 24) Iafrati MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan TR Jr, Lubahn DB, et al.: Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice. *Nat Med* 1997; 3: 545—548.
  - 25) Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Sukovich D, Burton G, Lubahn DB, et al.: Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption. *J Clin Invest* 1997; 99: 2429—37.
  - 26) Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA: Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5925—5930.
  - 27) Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T, et al.: The complete primary structure of human estrogen receptor b (ERb) and its heterodimerization with ERa *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243: 122—126.
  - 28) Lindner V, Kim SK, Karas RH, Kuiper GG, Gustafsson JA, Mendelsohn ME: Increased expression of estrogen receptor-beta mRNA in male blood vessels after vascular injury. *Circ Res* 1998; 83: 224—229.
  - 29) Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA: Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 1486—1496.
  - 30) Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG: Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem* 1997; 272: 19858—19862.