

健康長寿達成に重要な臓器（骨・筋・脳・血管）機能維持における性ホルモンの役割の解明

代表研究者 東京都健康長寿医療センター研究所・老年病理学  
医師研究員 本間 尚子  
共同研究者 同・トランスレーショナルリサーチ推進部  
部長 森 聖二郎  
同・老年病理学 部長 田久保海誉  
東京都健康長寿医療センター・病理検査科  
部長 新井 富生  
同・高齢者ブレインバンク  
部長 村山 繁雄

【まとめ】

各種臓器・組織の機能維持における性ホルモンの役割に興味を持たれるが、人体組織を用いた研究は少ない。今回、認知機能に着目し、アルツハイマー病(AD)と性ホルモンの関係を、剖検例から採取した前頭葉組織について包括的に調べた。性ホルモンの濃度はAD群・対照群間で差がなかったが、白質の機能型エストロゲン受容体(ER)- $\beta$ 発現がAD群で有意に低下していた。エストロゲン-ER- $\beta$ シグナル伝達系の破綻とADの関係が示唆された。

1. 研究の目的

健康長寿の達成には全身臓器、特に、骨・筋・脳・血管の機能維持が重要である。古今東西、女性が男性より長寿であることはよく知られているが、全身臓器組織の機能維持に及ぼす性ホルモンの影響は大きいと考えられる。これまで性ホルモンと種々の老年期疾患の関係を探る研究は多くなされているが、そのほとんどが、ホルモン補充療法の影響についての疫学的研究や、血中のごく限られた種類のホルモン濃度に着目した研究である。しかし、性腺機能の衰えた老年期における性ホルモン研究では、血中ホルモン濃度よりも、着目する臓器・組織局所のホルモン濃度、ホルモン代謝、ホルモン受容体の検索が重要である。例えば閉経後、血中のエストロゲン、特に estradiol (E2) の濃度は極度に低下するが、エストロゲンが病態上極めて重要な乳癌は、閉経後にも多くみられる。閉経後の乳癌組織にはエストロゲン受容体陽性癌が多く、そのような癌組織中ではE2が血中よりも極めて高濃度に存在することが知られている。乳癌組織局所で、アンドロゲンをエストロゲンに変換するアロマターゼ等の性ホルモン代謝酵素群(図1)が、より強力なエストロゲンであるE2を産生する方向に働いているこ

とがこれまでに示されている。これと同様のことが、他の臓器・組織でも起きている可能性があるため、本研究を着想した。

健康長寿達成やその障害となる老年期疾患を考える上で対象とすべき臓器は多岐にわたり、その全てを短期間で網羅することは不可能である。そのため、今回は、老年期疾患の代表的存在である認知症に着目することとした。認知症は高齢者の quality of life を著しく低下させ要介護状態を引き起こし、患者本人のみならず家族にとっても深刻な問題となる。超高齢社会の我が国において、認知症の克服は医療経済的観点からも極めて重要である。現在、本邦における認知症の原因の約3分の2はアルツハイマー病(AD)であるため、ADを今回の研究対象とした。

女性のADは閉経後に増加する。また、ADは男性に比し女性に有意に頻度が高い。一方、閉経後女性の血中E2は男性以下のレベルに低下することが知られている。これらを考え合わせると、ADに予防的に作用するエストロゲンが、閉経により男性以下のレベルにまで激減することで、閉経後女性にADが増加すると推察される。更年期障害に対してエストロゲン補充療法を受けた女性には、ADの発生が少ないとする多くの報告は、この推察を支持するものである。一方、ホルモン補充療法についての大規模なランダム化比較対照試験では逆の結果が報告され、エストロゲンとADの関係性をめぐり疫学的研究結果は controversial な状況にある。実験的研究では、エストロゲンによる神経保護作用やアミロイド $\beta$ 生成抑制作用が報告されている。

ADとエストロゲンの関係については、上記のごとく疫学的あるいは実験的なものが多く、性ホルモン濃度を測定する場合でも、血液が対象とされることがほとんどだった。前述の通り、

老年期の性ホルモン研究では臓器・組織局所の解析が重要だが、脳組織そのものについての研究は極めて少ない。本研究では、臨床・病理学的情報が完備した剖検例由来の脳について、ADとエストロゲンの関係を多角的に解析し、両者の関係を明らかにすることを目的とした。具体的には、高精度の液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（LC-MS/MS法）を用いた多種類の性ホルモン濃度測定、性ホルモン代謝酵素群および性ホルモン受容体の検索を行った。

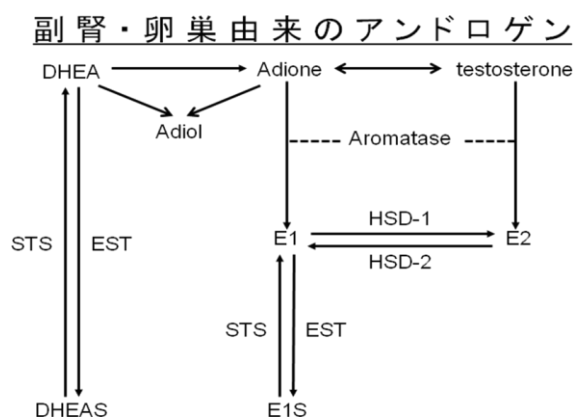


図1. 性ホルモン代謝酵素群

DHEA, dehydroepiandrosterone; DHEAS, DHEA sulfate; Adione, androstenedione; Adiol, androstenediol; E1, estrone; E1S, E1 sulfate; E2, estradiol; STS, steroid sulfatase; EST, estrone sulfotransferase; HSD-1, 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1; HSD-2, HSD type 2

## 2. 研究方法と経過

### 2-1 対象

東京都健康長寿医療センターにて剖検された女性のうち、年齢をマッチさせたAD 13例および対照 12例（平均年齢：AD 81歳 vs. 対照 79歳,  $P = 0.2354$ ）を対象とした。剖検時に採取され、当センター高齢者ブレインバンクに登録・保存されている、前頭葉灰色質および白質組織を解析に用いた。尚、剖検およびブレインバンク登録に際しては、遺族に対し十分な内容説明を行った上、書面で同意を得ている。本研究計画は東京都健康長寿医療センター研究所倫理委員会の承認を得ている。

### 2-2 性ホルモン濃度測定

凍結検体につき、微量識別定量可能な液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（LC-MS/MS法）を用いた解析を行った。エ

ストロゲンとしては、estrone (E1)と E2 を、アンドロゲンとしては、androstenedione (Adione)と androstenediol (Adiol, 図1参照)の濃度を測定した。Adiolはアンドロゲンでありながら、エストロゲン受容体 (ER)に結合し、エストロゲンとしての作用も示すという特徴がある。また、ER- $\alpha$ よりもER- $\beta$ に高い結合性を示すことが報告されている。

### 2-3 性ホルモン代謝酵素群の定量

凍結検体から抽出した mRNA につき、aromatase (Arom), steroid sulfatase (STS), estrone sulfotransferase (EST), 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD-1), 同 type 2 (HSD-2, 図1参照) に対するプライマーを用いた real-time PCR 法を施行し、各酵素の mRNA 発現を定量した。

### 2-4 性ホルモン受容体発現

免疫組織化学的に、エストロゲン受容体 3 種 (ER- $\alpha$ 、ER- $\beta$  1、ER- $\beta$  2) およびアンドロゲン受容体 (AR) の発現を調べた。ER- $\alpha$ はいわゆる ER、ER- $\beta$  1は ER- $\beta$  の wild type、ER- $\beta$  2は ER- $\beta$  の代表的 isotype である。ER- $\beta$  1は機能性で、エストロゲンと結合してシグナル伝達を担う。一方、ER- $\beta$  2はシグナル伝達能をもたず、ER- $\alpha$ 、ER- $\beta$  1の作用を dominant negative に制御する。

#### i. 染色法

ホルマリン固定後パラフィン包埋した組織から作製した薄切切片につき、乳癌研究で確立されている方法を用いた染色を行った。使用した一次抗体はいずれもモノクローナル抗体で、クローン名を表1に示した。ER- $\alpha$ については2種の抗体を用いた。各々の抗体につき適切な抗原賦活化処理を施し、検出には、Envision キットを用いた。

表1. 本研究で使用した1次抗体

性ホルモン受容体	クローン名
ER- $\alpha$	1D5 6F11
ER- $\beta$ 1	PPG5/10
ER- $\beta$ 2	57/3
AR	AR27

#### ii. 評価法

染色の評価は、核について、乳癌で広く用いられる Allred score により行った。染色率を、score 1 (0%)、score 2 (1-9%)、score

3 (10-33%), score 4 (34-66%), score 5 (67%-)の5段階に、染色強度を、score 1(弱)、score 2(中)、score 3(強)の3段階に分け、染色率スコアと染色強度スコアの合計、0, 2, 3-8の8段階にscore化した。

#### 2-5 統計解析

統計解析には解析ソフト JMP を使い、t検定を行った。P<0.05 を有意差ありとした。

### 3. 結果

#### 3-1 性ホルモン濃度

AD群と対照群の間には、前頭葉灰白質・白質とも、E1,E2, Adione, Adiol いずれの性ホルモン濃度にも有意な差はみられなかった。

#### 3-2 性ホルモン代謝酵素群 mRNA 発現量

前頭葉灰白質および白質組織中の各種性ホルモン代謝酵素 (Arom, STS, EST, HSD-1, HSD-2) mRNA 量を AD群と対照群の間で比較したところ、Arom、EST、HSD-1は、灰白質・白質とも AD群と対照群の間で有意な差がなかった。一方、白質の STS と灰白質の HSD-2 は、対照群に有意に高かった (白質 STS,  $P=0.0184$ . 灰白質 HSD-2,  $P=0.0162$ )。

#### 3-3 性ホルモン受容体発現

今回用いた免疫組織化学的条件では、ER- $\alpha$ の核染色は抗体種にかかわらず得ることができなかった。

ER- $\beta$ 1の核染色は、白質のグリア細胞で明瞭に観察されたが、AD群では対照群に比し、有意にER- $\beta$ 1の発現が低かった (図2. Allred score 平均値: AD群 3.2 vs. 対照群 6.5,  $P<0.0001$ )。一方、灰白質でのER- $\beta$ 1核評価は、細胞質の染色や細胞種の多様性のため困難だった。

ER- $\beta$ 2の灰白質での核評価は、ER- $\beta$ 1同様、細胞質の染色や細胞種の多様性のため困難だった。一方、白質では、明らかな陽性と認識しうる核染色は確認できなかった。

ARの核染色は、灰白質・白質とも確認できなかった。

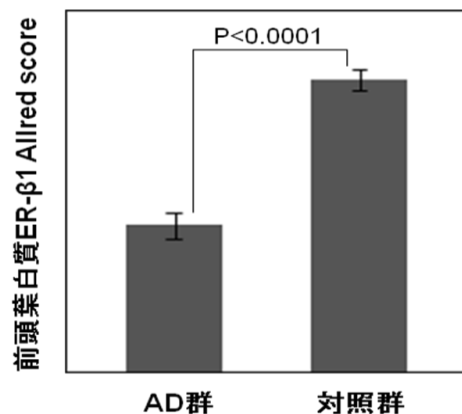


図2. 前頭葉白質 ER- $\beta$ 1の核染色 Allred score 比較: AD群 vs. 対照群

### 4. 結論

エストロゲン (E1, E2) 濃度およびアロマターゼ mRNA 発現は、灰白質・白質とも、AD-対照両群の間に有意な差はなかった。前頭葉組織では、局所エストロゲン産生にも局所エストロゲン濃度にも AD-対照両群間で差がないということを示すものである。一方、白質グリア細胞では、AD群のER- $\beta$ 1発現が対照群に比し著明に低下していた。白質のエストロゲン濃度自体が十分保たれていても、グリア細胞における受容体の欠落によりエストロゲンシグナルが伝わらないことが、ADの病態に関係している可能性がある。エストロゲン-ER- $\beta$ シグナル伝達系の、脳機能維持における重要性が示唆された。

### 5. 今後の課題

これまで、認知機能と性ホルモンの関係について、脳組織そのものを対象として解析した研究はとても限られており、また解析する項目も単一的であった。本研究では、性ホルモン濃度、性ホルモン代謝動態、性ホルモン受容体と、複数の項目について包括的な解析を行った。

前頭葉組織内エストロゲン濃度とADの関係調べた米国の研究では、AD前頭葉組織で局所エストロゲン濃度、局所エストロゲン産生とも正常よりも有意に減少していると報告されている。しかし本研究では、その結果は再現せず、前頭葉組織局所のエストロゲン濃度でなく、その受け手であるER- $\beta$ 1 (機能的ER- $\beta$ )のグリア細胞での欠落が、ADに関わっている可能性が示唆された。両研究には、対象の人種やホルモン濃度測定法など種々の違いがあり、何が結果の差異を生んだのか、今後明らかにする必要がある。一方、両研究は、メカニズムに

違いこそあるものの、エストロゲンが認知機能維持に重要であることを示唆しているという点は共通している。

今回の研究結果からは、グリア細胞における機能的 ER- $\beta$  の発現低下が AD と関係していることが示唆された。これまで多くの研究は灰白質に着目して行われ、また、実験的研究も神経細胞について行われることが多かった。神経系では脇役的存在であるグリア細胞が注目されることは少なかったが、近年、グリア細胞も注目されつつあり、本研究結果もあわせると、「エストロゲン—グリア細胞—AD」という観点からの研究を進めていく必要があると考えられる。現時点では、ER- $\beta$  1 の発現低下が起る原因は不明だが、一つの可能性として、ER- $\beta$  の遺伝子多型の影響が考えられる。我々はこれまで、ER- $\beta$  の代表的遺伝子多型を調べ、大腸癌および近傍粘膜上皮内の ER- $\beta$  発現パターンが、胚細胞レベルの ER- $\beta$  遺伝子多型により異なる可能性を示している。脳で同様のことが起きうるのか、今後調べる必要がある。尚、今回の解析では、確立された抗体を 2 種 (いずれも乳癌治療で保険適応されている抗体) 用いても、ER- $\alpha$  の核染色を得ることができなかった。前頭葉には ER- $\alpha$  が存在しないのか、染色法に問題があったのか (尚、両抗体とも、同時に染色した陽性コントロールの乳癌組織では強染色が得られている)、検討する必要がある。

性ホルモン代謝酵素群 mRNA 発現量の解析で、白質 STS および灰白質 HSD-2 はいずれも AD 群よりも対照群で有意に高かった。この意義についても今後検討を加えていく必要がある。

今回は時間的制約があり、脳、特に、AD のみに着目した研究を行ったが、骨、血管、筋肉など、他臓器の機能維持におけるエストロゲンの役割を調べることにより、今まで見過ごされてきた性ホルモンの機能的重要性が明らかとなる可能性がある。性ホルモンは、関連する食品、サプリメント (大豆イソフラボン等)、薬剤が多く、また肥満度も体内エストロゲン濃度に関係する等、草の根レベルでの制御が比較的容易である。各臓器の機能維持に重要なホルモン種が明らかとなれば、新たな予防・治療方法に結びつく可能性がある。高齢社会先進国の本邦ならではの最先端の研究成果として世界に発信できればと期待している。

## 6. 研究成果の公表方法

現在、本研究の成果を発表するため、英文学術論文を作成中である。学術論文として成果が発表できた後は、ホームページでの情報公開など、一般社会への成果の還元を図りたいと考えている。

以上