

68. 老年病の新規ホルモン作用標的の解明とその臨床応用

井上 聡

*東京大学 大学院医学系研究科 抗加齢医学講座

Key words : エストロゲン, 筋肉, サルコペニア, ミトコンドリア

緒 言

エストロゲンは、核内受容体であるエストロゲン受容体 α あるいは β を介して、転写調節に働く¹⁾。女性では、加齢に伴い閉経となり、血中エストロゲン濃度は低下して、エストロゲン作用不足による各臓器の機能低下を招くことが知られている。筋骨格系においても、その機能や組織量が老化とともに低下し、エストロゲン作用が関連している。すなわち、老年病としては、エストロゲン低下は骨粗鬆症やサルコペニアに直結する課題である。骨におけるエストロゲン作用機構として、我々はエストロゲンシグナルを改変したラット²⁾やマウス^{3,4)}による解析を進めてきた。その結果、エストロゲンシグナルの減弱は骨量低下に、また骨芽細胞での活性化は骨量増加に至り、そのメカニズムはOPGの上昇によるものであった³⁾。また軟骨細胞でのエストロゲンシグナル化の活性化は体長短縮に至っている⁴⁾。これらの骨格系での所見と比べ、筋肉におけるエストロゲン作用は動物モデルでもヒトでも詳細はよくわかっていない。女性ホルモンであるエストロゲンは、骨量の維持や筋肉量・筋力の維持作用を有し、運動能力とも密接に関係していると考えられるが、そのメカニズムには不明な点が多い。我々は、エストロゲンに制御されるミトコンドリア呼吸鎖スーパー複合体形成因子 *COX7RP* を発見し、*COX7RP* 遺伝子改変動物を作製することによって、運動負荷に対する動物の反応性とエネルギー代謝の面で、通常動物と大きな違いを生じることを見出した⁵⁾。*COX7RP* 欠損マウスは運動持続能が低く虚弱型で、逆に *COX7RP* 過剰発現マウスは運動持続性が優れており、マラソンランナー型の能力を獲得していた。このことより、エストロゲンあるいはミトコンドリアからの介入は筋力の維持に有用であることが期待される。本研究ではエストロゲンシグナルを改変した動物モデルを利用して、筋骨格系の機能と運動持続能におけるエストロゲン作用とミトコンドリア関連遺伝子の関連性を明らかにすることを目的とした。

方 法

本研究ではとくにエストロゲンの運動持続能に対する影響の基礎的解析を行った。動物としては、雌 C57BL/6J マウスを、① 偽手術 (Sham) + Vehicle 投与群、② 卵巣摘出 (OVX) + Vehicle 投与群、③ 卵巣摘出 (OVX) + Estradiol benzoate (E) 投与群の3群に分け、Treadmillにて運動持続時間の測定を2週間おきに行った。手術後10週以上経過したところで、子宮、骨、骨格筋などのサンプル採取、RNA抽出、遺伝子発現量、マイクロアレイ解析を進めた。また、筋芽細胞を用いた解析については、細胞としてマウス筋芽細胞様細胞株 (C2C12細胞) を用い、筋細胞への分化誘導は2%ウマ血清含有 DMEM 培地により行った。さらに常時活性型 $ER\alpha$ を発現する組換えアデノウイルス (Ad-ca $ER\alpha$) もしくはコントロールアデノウイルス (Ad-DsRed) により遺伝子導入後、 ER アンタゴニスト ICI182,780 (ICI) 処理による検証も加え、定量的 PCR 法による遺伝子発現解析、ATP 量測定を次の組み合わせで行った。(i) Ad-DsRed + ICI (-)、(ii) Ad-DsRed + ICI (+)、(iii) Ad-ca $ER\alpha$ + ICI (-)、(iv) Ad-ca $ER\alpha$ + ICI (+)。

結 果

結果として、エストロゲンの運動持続能に対する影響については、Sham + Vehicle 群、OVX + Vehicle 群、OVX + E 群における運動持続時間を比較解析したところ、OVX + Vehicle 群で運動持続時間が短縮し、エストロゲン補充で回復していることが明らかになり、図1に代表的な写真で示している。トレッドミルで30分経過後、OVX + Vehicle 群では、運動できなくなっているのに対し、Sham + Vehicle 群と OVX + E 群では運動持続能が維持されている。

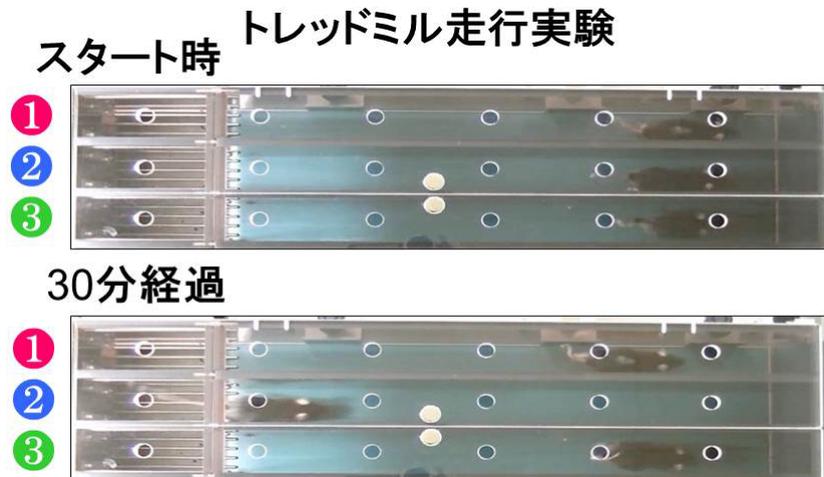


図1. Treadmill を用いた運動持続試験

エストロゲンの運動持続能に対する影響の基礎的解析として、動物としては、雌 C57BL/6J マウスを、① 偽手術 (Sham) + Vehicle 投与群、② 卵巣摘出 (OVX) + Vehicle 投与群、③ 卵巣摘出 (OVX) + Estradiol benzoate (E) 投与群 の3群に分け、Treadmill にて運動持続時間の測定を行った。

手術後10週以上経過したところで、骨格筋などをはじめとする組織をサンプリングした。その際の子宮は OVX + Vehicle 群において外見上明らかに縮小していることが確かめられた。

エストロゲンの骨に対する影響については、Sham + Vehicle 群、OVX + Vehicle 群、OVX + E 群のマウスの大腿骨を用いて、骨密度 (BMD) の測定を行い、OVX + Vehicle 群が他の2群と比較して減少しており、OVX + E 群は Sham + Vehicle 群と同程度に高い BMD を示すことが認められた。エストロゲンは骨量減少の抑制効果を有することが知られており、本研究において検証された。

エストロゲンの骨格筋における遺伝子発現制御について、Sham + Vehicle 群、OVX + Vehicle 群、OVX + E 群のマウスの筋肉組織より RNA を抽出し、マイクロアレイ法により遺伝子発現を解析した。その結果、ミトコンドリア関連遺伝子、筋関連遺伝子の発現変動が明らかになった。とくにミトコンドリア遺伝子 *Ucp3* がエストロゲンによる負の調節を受けていた (図2)。

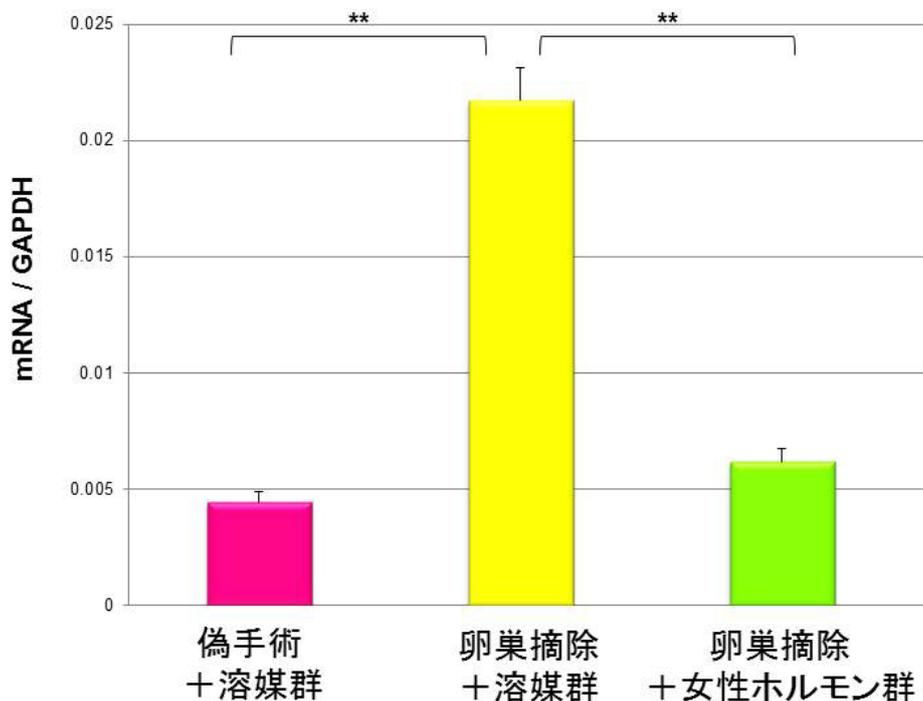


図2. ヒラメ筋における Uncoupling protein 3 (Ucp3) の mRNA レベルでの発現上昇
 Uncoupling protein 3 (Ucp3) mRNA 量を、表記した3群のマウス筋肉(ヒラメ筋)において qRT-PCR 法により測定し、Gapdh との相対 mRNA 量として表記した。平均値を棒グラフで、標準偏差値をバーで示し、統計解析は Student's t-test を用いた。
 **は $P < 0.01$ を示す。

細胞レベルでの検証実験として、筋芽細胞株を使用した *in vitro* 解析を行った。マウス筋芽細胞株(分化誘導した C2C12 細胞)において、コントロール群の Ad-DsRed + ICI (-) 群に比較して Ad-caER α + ICI (-) 群で Ucp3 の発現が上昇しており、Ad-caER α + ICI (+) 群で抑制されていた。分化誘導した C2C12 細胞での ATP 量を調べたところ、Ad-caER α 導入し ICI を加えていない細胞で ATP 量が有意に増加し、Ad-caER α 導入後 ICI を加えた細胞では抑制されていた。

考 察

考察としては、エストロゲンは運動持続能に関係することが示され、骨格筋において UCP3 をはじめとするミトコンドリア関連遺伝子などの発現制御に関わることが示唆された。ヒトにおいて持久運動によって UCP3 の発現量が減少することが報告されている⁶⁾。したがって、ミトコンドリア機能と、エストロゲン作用、運動能の3者の関連が注目される。臨床的な観察として、我々は骨粗鬆症治療薬として本邦でも使用されているエストロゲン受容体調節薬(SERM)が日本人女性において骨量を維持するだけでなく、体重減少も防止して、そこに筋量維持作用の関与を想定し、報告したところである⁷⁾。今後は、このような臨床的観察も観点に入れながら、卵巣摘除のような実験モデル動物^{8,9)}を十分に活用し、運動持続能と骨・筋におけるエストロゲンの作用メカニズムを卵巣除去マウス、遺伝子改変マウス、細胞モデル系を用いて解析を進めていく。

文 献

- 1) Muramatsu M, Inoue S. Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Apr 2;270(1):1-10. Review. PubMed PMID: 10733896.

- 2) Ogawa S, Fujita M, Ishii Y, Tsurukami H, Hirabayashi M, Ikeda K, Orimo A, Hosoi T, Ueda M, Nakamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S. Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor alpha and beta pathways. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14;275(28):21372-9. PubMed PMID: 10806217.
- 3) Ikeda K, Tsukui T, Horie-Inoue K, Inoue S. Conditional expression of constitutively active estrogen receptor α in osteoblasts increases bone mineral density in mice. *FEBS Lett*. 2011 May 6;585(9):1303-9. doi: 10.1016/j.febslet.2011.03.038. Epub 2011 Apr 12. PubMed PMID: 21439958.
- 4) Ikeda K, Tsukui T, Imazawa Y, Horie-Inoue K, Inoue S. Conditional expression of constitutively active estrogen receptor α in chondrocytes impairs longitudinal bone growth in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Sep 7;425(4):912-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.170. Epub 2012 Aug 9. PubMed PMID: 22902633.
- 5) Ikeda K, Shiba S, Horie-Inoue K, Shimokata K, Inoue S. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat Commun*. 2013;4:2147. doi: 10.1038/ncomms3147. PubMed PMID: 23857330.
- 6) Russell AP, Wadley G, Hesselink MK, Schaart G, Lo S, Léger B, Garnham A, Kornips E, Cameron-Smith D, Giacobino JP, Muzzin P, Snow R, Schrauwen P. UCP3 protein expression is lower in type I, IIa and IIx muscle fiber types of endurance-trained compared to untrained subjects. *Pflugers Arch*. 2003 Feb;445(5):563-9. Epub 2002 Nov 23. PubMed PMID: 12634927.
- 7) Urano T, Shiraki M, Kuroda T, Tanaka S, Uenishi K, Inoue S. Preventive effects of raloxifene treatment on age-related weight loss in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab*. 2017 Jan;35(1):108-113. doi: 10.1007/s00774-015-0733-8. Epub Jan 11. PubMed PMID: 26754796.
- 8) Nagai S, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shiba S, Nagasawa S, Takeda S, Inoue S. Estrogen modulates exercise endurance along with mitochondrial uncoupling protein 3 downregulation in skeletal muscle of female mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Nov 25;480(4):758-764. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.129. Epub 2016 Oct 29. PubMed PMID: 27983991.
- 9) Kitajima Y, Ono Y. Estrogens maintain skeletal muscle and satellite cell functions. *J Endocrinol*. 2016 Jun; 229(3):267-75. doi: 10.1530/JOE-15-0476. Epub 2016 Apr 5. PubMed PMID: 27048232.