

論文の内容の要旨

論文題目 性ホルモン作用に基づく漢方薬成分の探索：血管石灰化に着目して

氏名 七尾（濱井） 道子

はじめに

血管石灰化は加齢とともに増加する血管病変であり、動脈硬化や心血管イベント発症につながる危険因子として重要な意味を持つ。性ホルモンには血管保護作用があり、血管石灰化を抑制するはたらきが報告されているが詳細な機序については明らかになっていない。最近、孫らはリン刺激によるヒト大動脈平滑筋細胞の石灰化モデルを用いて、アンドロゲンが growth arrest-specific gene 6 (Gas6) の転写活性を直接制御することによって血管石灰化の重要な発症機序であるアポトーシスを抑制し、石灰化を抑制することを明らかにした。しかしながら、エストロゲンによる血管石灰化の抑制作用およびその機序については未だに明確になっておらず、今回、エストロゲンによる石灰化抑制作用を明らかにすることを本論文の第一の目的とした。

次に、性ホルモンの補充療法では発がん作用などの有害事象が問題視されることから、適応は症候性の更年期障害に限られているのが現状である。そこで今回、性ホルモン様作用を有する漢方薬補剤成分に注目した。補剤生薬成分の血管およびがん細胞における作用を検討し、機序を明らかにすることで性ホルモンの代替薬としての可能性を探ることが本論文の第二の目的である。

方法・結果

ヒト大動脈平滑筋細胞においてリン刺激（2.6 mM）により誘導される石灰化は、生理的濃度のエストロゲン（1~100 nM）で有意に抑制された（評価方法、o-cresolphthalein complex 法によるカルシウム沈着量の定量、von Kossa 法による石灰化染色）。この石灰化抑制作用

はエストロゲン受容体 (ER) α の特異的阻害剤である MPP や ER α の siRNA によって打ち消されたが、ER β の選択的阻害剤である PHTPP や ER β の siRNA による影響は認められなかった。これらの結果から、エストロゲンによる血管石灰化の抑制作用は ER α を介した作用であることが示唆された。

孫らは、リン刺激による血管平滑筋細胞の石灰化機序としてアポトーシスが重要であり、その分子機序は Gas6/Akt survival 経路の抑制であることを明らかにした。エストロゲンはリン刺激により増加するアポトーシスを濃度依存的に抑制し (評価方法、histone と DNA の sandwich ELISA 法および TUNEL 染色)、さらにリン刺激により抑制された Gas6 と pAkt のタンパク発現を増加させた (評価方法、ウエスタンブロット法)。このエストロゲンの作用はすべて MPP を加えることで打ち消されることから、エストロゲンは ER α を介して Gas6/Akt survival 経路を活性化し、アポトーシスを抑制することで血管石灰化を抑制する機序が示された。エストロゲンによる Gas6 の発現制御は転写活性を促進する作用によるものであり、MPP はこの作用をブロックすることが分かった (評価方法、ルシフェラーゼアッセイ)。また、細胞膜を貫通しない E2-BSA を用いた検討で、リン刺激による Gas6 転写活性の抑制や石灰化に対して E2-BSA の影響がなかったことから、エストロゲンによる血管石灰化の抑制作用は転写を介する genomic 作用であることが示唆された。

次に、性ホルモン様作用を有する漢方薬補剤成分である黄耆 (オウギ) の astragaloside IV、芍薬 (シャクヤク) の paeoniflorin と albiflorin、当帰 (トウキ) の butylidene phthalide、人参 (ニンジン) の ginsenoside Rb1、淫羊藿 (インヨウカク) の icariin を用いて、血管石灰化に対する影響を検討した。リン刺激によるヒト大動脈平滑筋細胞の石灰化において、いずれの成分も性ホルモンと類似した石灰化抑制作用を示した。特に高齢者に対してよく処方される補中益気湯や人参養栄湯に含まれ、代表的な補気剤成分である astragaloside IV (AS-IV) と ginsenoside Rb1 (Rb1) に注目して検討を進めたところ、AS-IV の石灰化抑制作用は MPP により打ち消されることと、Rb1 の石灰化抑制作用はアンドロゲン受容体阻害剤である bicalutamide により打ち消されることが分かった。したがって、AS-IV はエストロゲンと同

様に ER α を介して、Rb1 はアンドロゲンと同様に AR を介して石灰化を抑制することが示唆された。さらに、がん細胞に対する AS-IV と Rb1 の作用を調べるためにヒト乳がん細胞株 (MCF-7) およびヒト前立腺がん細胞株 (LNCaP) を用いて、estrogen response element (ERE) および androgen response element (ARE) 活性 (ルシフェラーゼアッセイ) と細胞増殖 (MTS 法) に対する影響を検討した。その結果、血管石灰化でエストロゲン様作用を示した AS-IV は MCF-7 の ERE 活性を上昇させ、細胞増殖を促進したが、アンドロゲン様作用を示した Rb1 は LNCaP の ARE 活性を上げることなく、細胞増殖にも影響がなかった。これらの結果から、AS-IV はエストロゲンと同様にヒト乳がん細胞の ERE 活性や細胞増殖作用をもつ可能性があること、また Rb1 は細胞によってアンドロゲンと異なる作用を示すことが明らかになった。

ヒト大動脈平滑筋細胞では AR が主に核に発現し、アンドロゲンによる ARE 活性の上昇が認められる。Rb1 (10 nM~1 μ M) は ARE を濃度依存的に活性化した。Rb1 の血管石灰化抑制の作用機序はアポトーシスの抑制であり、具体的には Gas6 の転写活性とタンパク発現の増加によるものであった。また、Rb1 のアポトーシス抑制作用は bicalutamide により打ち消されることから、AR を介する Rb1 の血管石灰化の抑制機序が示された。これらの結果より、Rb1 は血管平滑筋細胞においてアンドロゲンと同じ機序で血管石灰化を抑制する働きがあるが、LNCaP においてはアンドロゲンと異なり ARE 活性や細胞増殖能をもたないことが明らかになった。さらに、LNCaP において Rb1 とテストステロンを同時に添加した条件下では、Rb1 がテストステロンの ARE 活性に対して拮抗作用を持つことが新たに分かった。アンドロゲンの代表的な応答遺伝子である prostate specific antigen (PSA) の転写活性やタンパク発現で確認したところ、テストステロンによる PSA の転写活性やタンパク発現の増加は Rb1 によって有意に抑制された。これらの結果から、Rb1 が selective androgen receptor modulator として作用する可能性が示唆された。テストステロンと異なる Rb1 の作用については、AR 応答遺伝子プロモーター上の結合部位の違いや、共役因子の違いが関与する可能性が考えられ、今後さらなる検討が必要である。

まとめ

エストロゲンの血管石灰化に対する抑制作用は $ER\alpha$ を介した **Gas6** の転写活性化によるアポトーシス抑制によるものであることが明らかになった。エストロゲンの血管石灰化抑制機序の解明は閉経後女性における心血管疾患の予防および治療戦略につながる可能性が期待できる。

漢方薬補剤成分である **Rb1** にはテストステロンと類似した血管石灰化の抑制作用があり、その機序は **AR** を介した **Gas6/Akt survival** 経路の活性化によるアポトーシス抑制であった。一方、**LNCaP** ではテストステロンと異なり、**Rb1** 単独では **ARE** 活性を持たないがテストステロンの作用に対しては拮抗作用があることから、血管平滑筋細胞と前立腺がん細胞では異なる作用を持つことが明らかになった。**Rb1** の血管保護作用と組織特異的な作用機序を解明することが、高齢者の心血管疾患の新たな治療戦略の一助となると考えられる。