

# 女性の抗老化メカニズムの解明へ向けた多面的アプローチ

東京大学大学院医学系研究科産婦人科学講座 准教授 平池 修

## 要 約

女性ホルモン・エストロゲンは、二次性徴発来以降分泌が高まり、性成熟期において周期ごとの分泌レベル増減を繰り返すが、やがて閉経を迎えると分泌が極度に低下する。エストロゲン産生能が低下するとともに身体臓器の機能低下すなわち老化が進むことから、女性の身体機能はエストロゲン分泌状態により、大きく影響されるといえる。エストロゲンの生体作用をもたらす主な因子は核内受容体・エストロゲン受容体(ER)である。エストロゲン作用の典型的メカニズムは、二種類存在するER( $\alpha$ および $\beta$ )がリガンド17 $\beta$ -estradiol( $E_2$ )によって核内に移行し転写因子として作用することを基軸にしており、ERの作用機構を理解する上で、ERに結合し影響を及ぼす転写共役因子やER作用を修飾する分子などが担う機構の解析は重要である。

生殖臓器における加齢性変化の理解の一手段として、ERの機能・活性制御と、ERに共役する転写因子群の果たす分子機構を検討した。老化メカニズムの解明の一助としてNAD<sup>+</sup>依存性ヒストン脱アセチル化酵素sirtuin1(SIRT1)を筆頭とするサーチュインファミリー分子の生殖臓器における機能を検討した。女性の加齢に伴う妊孕能低下には卵子の質低下および卵子数の減少が密接に関連し、卵子の劣化および減少には毒物などの外的要因または酸化ストレスの蓄積などが悪影響を与えるため、卵巣老化の基礎的理解として酸化ストレス機構にも着目し研究を重ねてきた。

エストロゲンは女性の健康と老化を考える上で重要な因子であるが、エストロゲンに関連する女性に特有の疾患に目を向けることは、女性の健康を包括的に考える上でも重要であり、これら一連の研究を通して、女性が疾患に悩まされないよりよい生活を送るための基盤を構築することが、産婦人科医師として重要と考えている。

## 緒 言

女性は二次性徴発来以降月経周期が確立すると排卵が起こる。生殖能力の獲得には排卵周期の確立が重要であり、排卵が起こると同時に卵巣の発育卵胞、特に顆粒膜細胞からエストロゲンが産生されるようになることが性成熟において重要である。エストロゲン分泌は排卵期が最大になることから性成熟期においては月経周期ごとの分泌レベル増減を繰り返す。排卵すべき卵子の貯蔵が少なくなる、つまり排卵予備能が低下するにつれて、エストロゲンの分泌レベルは低下し、やがて閉経を迎えるとエストロゲン分泌は極度に低下する(図1)<sup>1</sup>。エストロゲンの生体作用はヒトの生殖器である子宮や卵巣の成熟が主であるが、生殖器外においても多彩な作用を担う。例えば皮膚は、月閉経期になると肌のたるみが生じる。その原因は加齢や紫外線、酸化、糖化などが指摘されているが、エストロゲンの減少は、肌の

弾力を保つコラーゲン線維、エラスチン線維の変性および減少による機能低下、皮脂分泌減少による肌の乾燥などを招き、肌のたるみが進行する。一般的に男性は女性より10年ほど寿命が短いといわれているが、その理由のひとつに、男性が心血管疾患で死亡する確率が高いことが挙げられる。閉経前ではその傾向が明らかであるが、閉経後にはこの女性の優位性は失われる。その原因として高血圧が進み、脂質プロファイルも悪化し、総コレステロール値とLDL-コレステロール値は上昇するが、HDL-コレステロール値は閉経後に減少することが疫学的に明らかである。閉経後はエストロゲンの分泌が著しく低下するため、エストロゲンには心血管疾患の予防効果があるのではないかと推測されている。このように、エストロゲン分泌レベルが低下していくと同時に身体臓器の機能低下すなわち老化が進行する。ことから、女性の身体成熟度はエストロゲン分泌状態

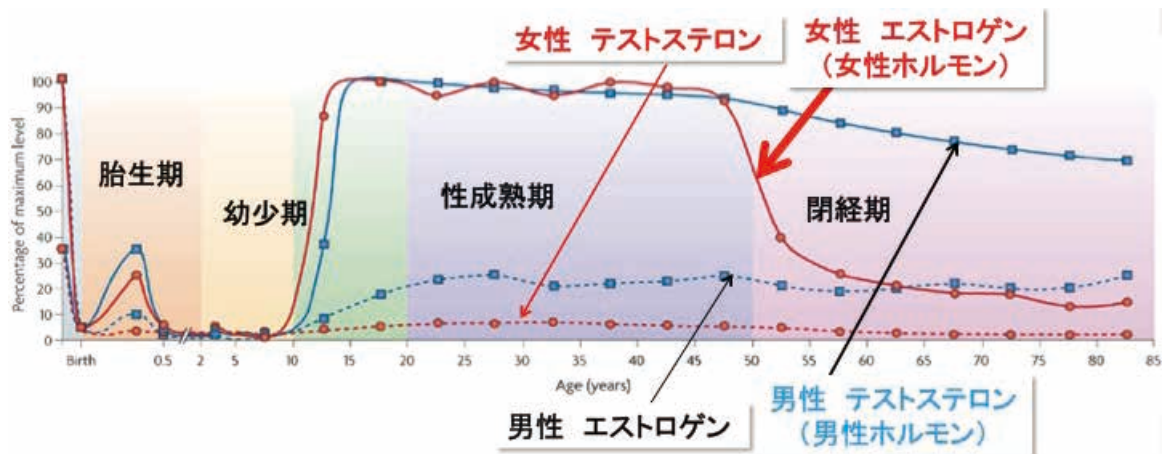


図1. 男女の年齢における性ステロイドホルモン・エストロゲンおよびテストステロンの分泌状態の変化を表す概念図(文献1より改変引用)

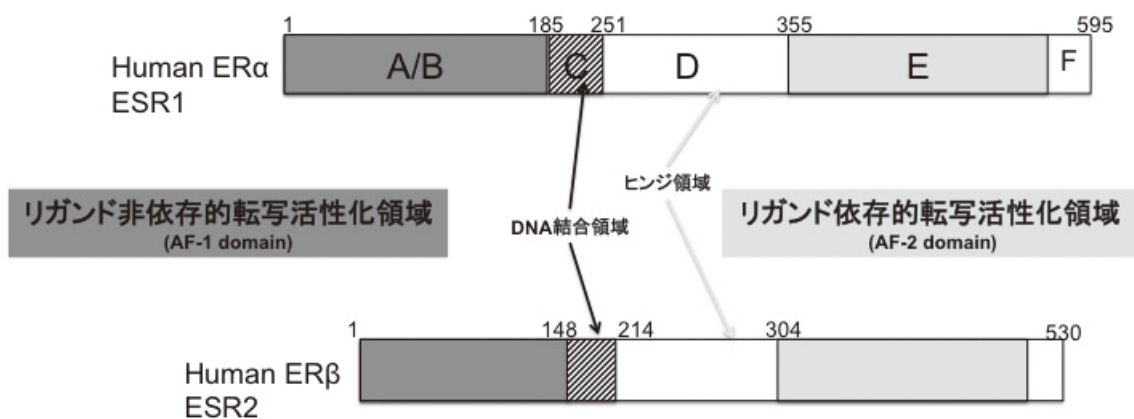


図2. ヒト・エストロゲン受容体の構造

ER $\alpha$ およびER $\beta$ は、N末端のリガンド非依存的転写活性化領域 (AF-1) とリガンド依存的転写活性化領域 (AF-2) は相同性が低いものの、DNA結合領域とヒンジ領域は相同性が高い。遺伝子座は異なるので全く別個の遺伝子である。

により、大きく影響されるといえる。

閉経後の中高年女性にみられるエストロゲン欠乏症状を改善するためには、ホルモン補充療法(HRT)が必要となるが、1990年代後半から大規模臨床試験が発展するにつれ深刻な有害作用も存在することが明らかとなってきた。特に2002年に発表された米国大規模臨床試験Women's Health Initiative studyの中間報告では、HRT群における冠動脈疾患、乳がん発症率が事前設定値を超えただけでなくoverall survivalにも悪影響がみられたことから臨床試験そのものが急遽中止になったことは全世界に衝撃を与えた。このように HRTには有害事象も存在するため、エストロゲンの人体各組織における生理的作用特性の理解のためには、エストロゲンの作用機序の理解も必要である。

エストロゲンの生体作用をもたらすのは核内受容

体・エストロゲン受容体(ER)である。エストロゲン作用の典型的メカニズムは、二種類存在するER $\alpha$ およびER $\beta$ (図2)が、主たるリガンド17 $\beta$ -estradiol (E $_2$ )によって核内に移行し転写因子として作用する、というものであり(図3)、E $_2$ は間接的に細胞増殖作用などといった生物学的作用および効果を発揮する。エストロゲンの生体作用は、それ以外にも、1)直接的に抗酸化作用がある、2)膜ERを介して作用する、3)増殖因子などのシグナルによりERそのものが修飾を受け作用する(図3)というメカニズムが知られており、単一のメカニズムではない。ER $\alpha$ およびER $\beta$ の臓器・組織によってその発現分布には特徴があり(図4)、HRTの効果を考える上で重要な要素である。この組織ごとの分布の差はHRTと悪性腫瘍発生との関連において端的に現れ、発症リスクが1)増加するもの；卵巣癌、乳癌、2)不変であ

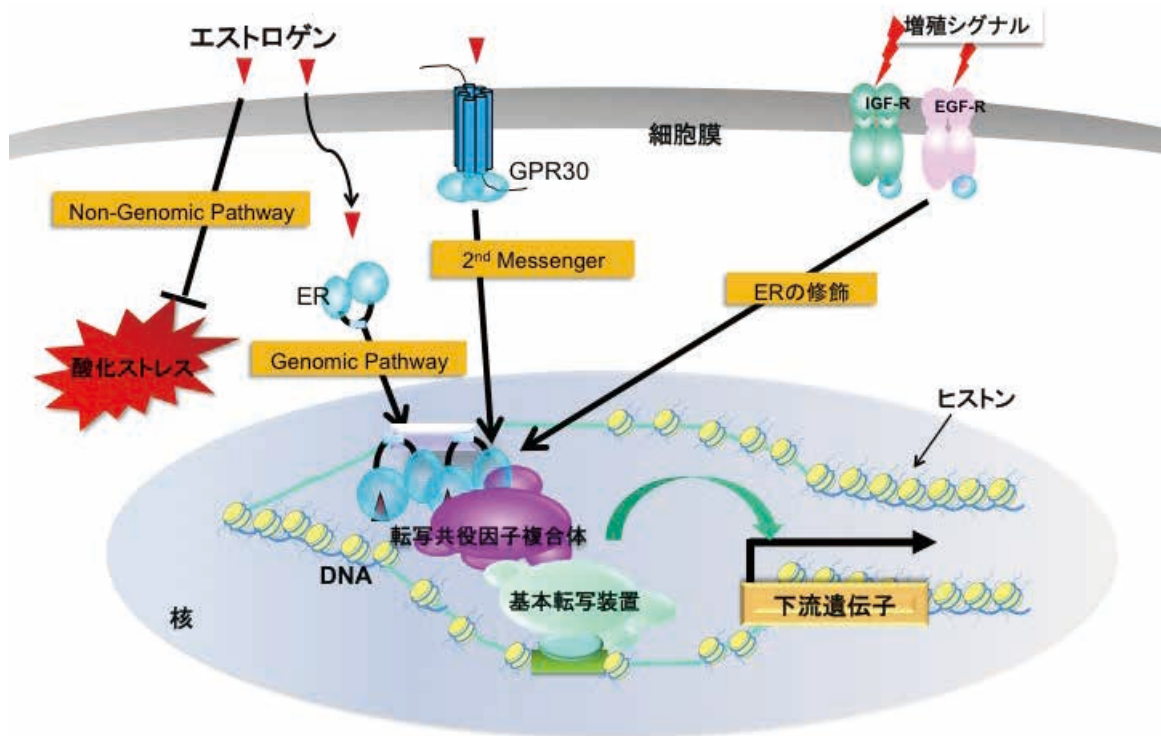


図3. エストロゲンの細胞内生体作用の模式図

1) non-genomic pathwayは、エストロゲンそのものが直接的作用をもたらすというものであり、抗酸化作用が有名である。それ以外に、genomic pathwayつまり細胞膜を通過したエストロゲンが細胞質に存在するERと結合して核内に入り、DNA結合領域に結合することで下流遺伝子の発現に影響を及ぼすという経路、膜ERを介して作用する経路、増殖因子などのシグナルによりERそのものが修飾を受け作用する経路などが知られている。

るもの；子宮体癌、3)減少するもの；大腸癌、胃癌とに分けられ、ホルモン投与の効果が組織によって明らかな差異を出していることは興味深い事実である<sup>2</sup>。組織特異性は組織におけるER共役因子の分布が異なるという考え方もあり、エストロゲン依存性腫瘍の形成過程において、エストロゲンそのものだけでなく、ERおよびそれに結合または修飾し影響を及ぼす共役因子が担う分子機構の解析は重要である。生殖臓器における加齢性変化の理解の一手段として、ERおよびERの機能を調節する因子群の解析が必須であると考え、ERの活性制御と、ERと共役する転写因子群の果たす分子機構を検討した。

抗老化因子であるNAD<sup>+</sup>依存性ヒストン脱アセチル化酵素sirtuin1 (SIRT1)を筆頭とするサーチュインファミリー分子は、その抗老化メカニズムだけでなくER調節機能があることが知られている。サーチュインファミリー分子の活性に影響を与えるレスベラトロールは、赤ワインに多く含まれるポリフェノールであり、フレンチ・パラドックスに関連することでも有名であるが、レスベラトロールの生殖臓器における多彩な機能にも着目した<sup>3</sup>。

女性の加齢に伴う妊娠能低下には卵子の質低下お

よび卵子数の減少が密接に関連し、卵子の劣化および減少には毒物などの外的要因または酸化ストレスの蓄積などが悪影響を与えるため、エストロゲンの抗酸化作用を考慮して、卵巣老化の基礎的理解として酸化ストレス機構において主要な役割を果たす転写因子Nrf2の卵巣における機能を解析した<sup>4</sup>。

## 1. エストロゲン受容体の機能解析

### ①ノックアウトマウスを用いたER $\beta$ の機能解析

ER $\beta$ は全身に発現し膀胱粘膜上皮や大腸上皮などの恒常性を保つ役割がある(図4)。卵巣顆粒膜細胞にも発現しており、ER $\beta$ ノックアウトマウスの卵胞は血流供給が不十分であり卵胞形成に至らないという形質である。ER $\beta$ ノックアウトマウスの子宮における機能解析を試みたところ、子宮内膜上皮細胞に腫瘍形成はみられなかったが、その表現型は増殖促進、分化抑制、アポトーシス抵抗性、細胞接着構造の異常など、悪性腫瘍細胞に類似した特徴を有していたことが明らかになった。またER $\beta$ ノックアウトマウスの大腸における形質を検討した。子宮と同様に増殖促進、分化抑制、アポトーシス抵抗性、細胞接着構造の異常といった形質がみられ、大



腸上皮細胞が野生型より早く管腔表面に移動していることが判明したため、脱落する細胞が多いため大腸そのものに異常所見を呈していないという可能性が示唆された。

## ②ER $\alpha$ およびER $\beta$ の転写制御機構の解明

FOXL2を欠損した患者は家族性早発卵巣機能不全症になることが知られているが、FOXL2がER  $\beta$  特異的転写活性抑制因子であり、FOXL2によりER  $\beta$  下流遺伝子であるアロマターゼの活性が抑制されることと、FOXL2が比較的小卵胞に発現する傾向があることから、FOXL2の機能として、前胞状卵胞および1次卵胞など小卵胞の発育を抑制する可能性が示唆された。SIRT1抑制因子である乳癌抑制候補因子DBC1(CCAR2)は、ER  $\beta$  の有する乳癌防御作用を抑制し造腫瘍的に作用しうること、DNAミスマッチ修復因子であるhMSH2はER  $\beta$  の機能には関与しないがER  $\alpha$  特異的に転写活性を抑制する因子であること、着床関連因子である転写因子HAND2がユビキチン・プロテアソーム系を介しER  $\alpha$  の分解を促進する、といった機能を明らかにした。

## 2. サーチュインファミリー分子の機能解析

抗老化因子であるサーチュインファミリー分子の代表的存在であるSIRT1は、ER  $\alpha$  のエストロゲン依存的転写活性化能を抑制するER共役因子である。サーチュイン分子はSIRT1からSIRT7までのサブタイプが存在し、Class III ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)として作用する。HDACは配列の相同性などにより、クラスI: HDAC1、HDAC2、

HDAC3、HDAC8、クラスII: HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC9、HDAC10、クラスIII: Sirtuin、クラスIV: HDAC11と、4つのクラスに分類され、いずれも発がん抑制を含めた重要な機能を担う。SIRT1は酵母や線虫の寿命を延長することで注目を集めたが、最近ではこれら7つのサブタイプ全てが、核、細胞質、ミトコンドリアなど細胞内に独自の局在を示し、生体における代謝、抗炎症、認知機能、腫瘍形成などといった広範な役割を担うことが明らかになってきている<sup>5</sup>。

SIRT1は、p53、FOXO、PGC-1 $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、 $\beta$ カテニンなど細胞内シグナル因子群を脱アセチル化することで、遺伝子発現制御、細胞死、ストレス反応、老化、脂質・糖代謝促進などの機能を有している。赤ワインに含まれるポリフェノールであるレスベラトロールは、SIRT1活性化を介して細胞死抵抗因子の発現量を抑制することが明らかになっている。また、レスベラトロールは植物エストロゲンとしてERの転写活性化作用があり、ER  $\alpha$  に対してはアンタゴニストとしての作用がないが、ER  $\beta$  活性に関しては相加的に作用することから、レスベラトロールはSIRT1活性のみならずER  $\beta$  の活性を高めることによって、多くの細胞において分化促進、細胞増殖抑制作用をもつ可能性がある。サーチュインファミリー分子のホルモン依存性臓器における生理的機能を検討するため、SIRT1、3、6の生殖臓器における機能を解析し、レスベラトロールが全身的な作用を持つことに着目し、レスベラトロールの産婦人科領域における病態生理的作用に関する研究を行った。

表1

| Table1 | 細胞内局在     | 機能                | 標的                                   | 生体内での役割      |
|--------|-----------|-------------------|--------------------------------------|--------------|
| SIRT1  | 核         | 脱アセチル化            | PGC1 $\alpha$ , FOXOs, NF $\kappa$ B | 代謝、炎症、神経変性疾患 |
| SIRT2  | 細胞質       | 脱アセチル化            | H4, $\alpha$ -tubulin                | 細胞周期、転写      |
| SIRT3  | 核、ミトコンドリア | 脱アセチル化            | AceCS2                               | 代謝           |
| SIRT4  | ミトコンドリア   | ADP-リボシルトランスフェラーゼ | GDH                                  | インスリン分泌      |
| SIRT5  | ミトコンドリア   | 脱アセチル化            | 不明                                   | 不明           |
| SIRT6  | 核         | ADP-リボシルトランスフェラーゼ | DNAポリメラーゼ $\beta$                    | DNA修復        |
| SIRT7  | 核         | 不明                | RNAポリメラーゼI                           | rDNA転写       |

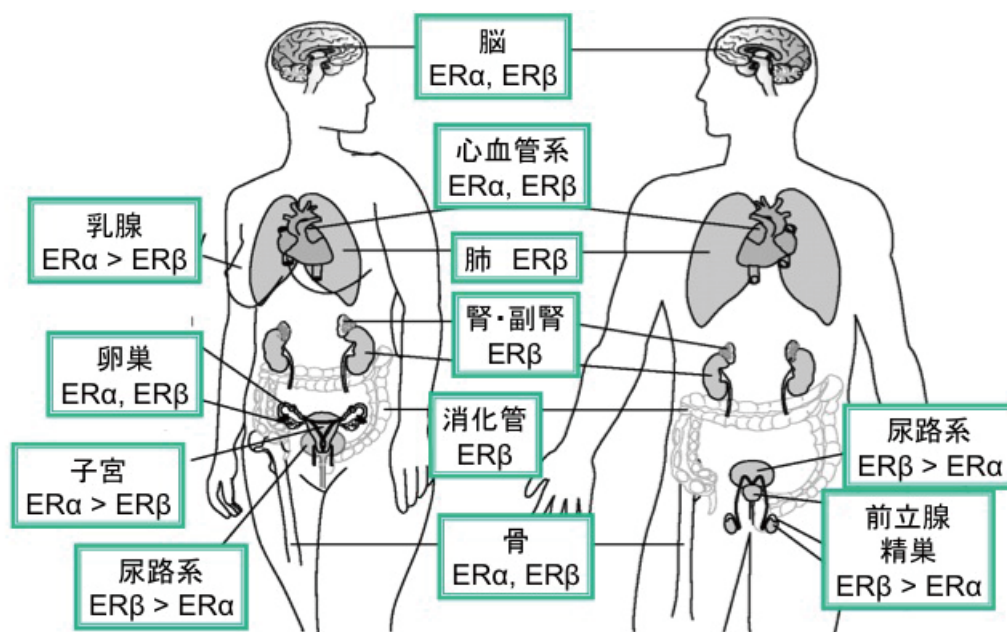


図4. エストロゲン受容体の全身における分布を示す(文献7より改変引用)

#### ①SIRT1のホルモン依存性臓器における機能

SIRT1がヒトおよびラットの子宮・卵巣組織に発現していることを示した。SIRT1の活性化が顆粒膜細胞に及ぼす影響をみるために、ラット顆粒膜細胞を用いて、レスベラトロールにより処理したところ、SIRT1の発現、StAR、LH受容体、アロマターゼなどの黄体化関連因子群タンパク発現が上昇し、黄体ホルモン・プロゲステロン値の上昇に結びついた。子宮内膜癌細胞株Ishikawaの内在性SIRT1発現を制御することで、細胞接着分子E-cadherinの発現が正に制御されることを示した。レスベラトロールにより、SIRT1とE-cadherinの発現が共に濃度依存的に上昇するのみならず、E-cadherinプロモーターも正に制御されることと、子宮内膜癌培養細胞株Ishikawaを子宮側、絨毛癌培養細胞株JARを配偶子に模したin vitro spheroid assayを着床モデルとして検討したが、SIRT1活性化により着床能が亢進することがわかった。

よってレスベラトロールは、SIRT1発現とE-cadherinの発現を上昇させることで着床能向上に寄与することを見出した。家族性乳がん・卵巣がん原因遺伝子BRCA1産物の転写活性化能は、DBC1とともにSIRT1の発現調節に関与すること、SIRT1の乳癌組織における発現はHER2発現と逆相関しており、SIRT1の高発現は乳癌の予後不良因子である可能性を示唆した。また、漢方・六君子湯は卵巣がん培養細胞株において、SIRT1発現を正に制御するこ

とで上皮間葉移行を阻害し抗腫瘍的作用がある報告もした。

#### ②SIRT3の卵巣顆粒膜細胞における機能

サーチュインファミリーの中で主要な抗酸化因子であるSIRT3の生理的意義を、ヒト黄体化顆粒膜細胞を用いて検討した。ヒト黄体化顆粒膜細胞を初代培養し、過酸化水素により処理すると細胞の酸化ストレスが顕著に現れカタラーゼ、SOD1など抗酸化因子の発現が上昇するが、SIRT3の発現も上昇した。siRNAを用いて内在性SIRT3をノックダウンすると、細胞に酸化ストレスが顕著に現れることを蛍光免疫染色法にて示した。また内在性SIRT3のノックダウンにより、アロマターゼ、 $17\beta$ -HSDなどの卵胞発育促進因子群のmRNAやStAR、p450scc、 $3\beta$ -HSDなどの黄体化関連因子群のmRNAが上昇することが判明した。その結果、内在性SIRT3のノックダウンにより培地上清プロゲステロン値が低値となったことから、SIRT3は卵巣顆粒膜細胞の抗酸化作用に影響を及ぼすことが示唆された。

#### ③SIRT6の子宮体癌培養細胞における機能

サーチュインファミリーの中で主要な癌抑制因子であるSIRT6は、正常細胞に対し子宮内膜癌培養細胞株では発現が低下しており、SIRT6が抗アポトーシスタンパクSurvivinの発現を転写レベルで抑制することで抗腫瘍機能を発揮することを明らかにした。

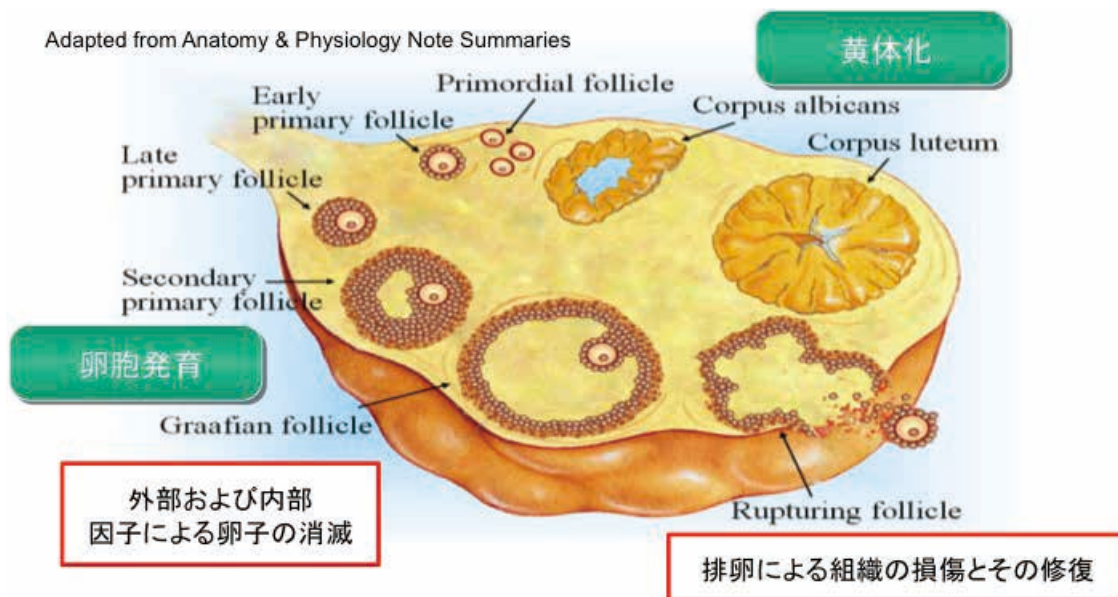


図5. 卵巣における酸化ストレス蓄積メカニズム

卵巣が組織として老化することは卵子およびその付属物の老化と解釈できるが、具体的には卵子数の減少、卵巣組織のダメージなどが想定される。

#### ④植物エストロゲン・レスベラトロールのホルモン依存性組織における機能解析

レスベラトロールにより子宮内膜癌細胞株の細胞死が誘導されるが、この細胞死にはレスベラトロールによるオートファジーの抑制が関与していることを見出した。子宮内膜症は生殖可能年齢女性に好発し、不妊、月経痛などをもたらす発生原因不明な疾患であるが、子宮外の組織において子宮内膜が増殖性に発育する疾患と定義される。子宮内膜症マウスモデルを作成しER $\beta$ アゴニストを使用した実験によると、2週間のER $\beta$ アゴニスト投与で病変サイズが縮小したという既報がある。また子宮内膜症マウスモデルにおいてレスベラトロールが子宮内膜症組織の病変進展を抑制することが報告されており、レスベラトロールの子宮内膜症への治療効果に関する研究が色々な方面から進められており、子宮内膜症モデルマウスおよびラットにおいて、レスベラトロールは子宮内膜症病巣での上皮細胞・間質細胞両者の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導すること、病変における血管新生を抑制することなども報告された。我々は、子宮内膜症間質細胞におけるSIRT1の存在を免疫組織化学染色法にて示し、レスベラトロールが濃度依存性に培養子宮内膜間質細胞のTNF- $\alpha$ 誘導性IL-8分泌を抑制することを示した。siRNAを用いて培養子宮内膜間質細胞の内在性SIRT1をノックダウンすると、レスベラトロールによるIL-8分泌抑制作用が脱抑制されることか

ら、レスベラトロールによるTNF- $\alpha$ 誘導性IL-8分泌にはSIRT1が関与している可能性が考えられた。Survivin発現を抑制しTNF- $\alpha$ -related-apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 依存性の細胞死を促進すること、マクロファージ由来の炎症性サイトカイン分泌を抑制することでLPS投与による早産を抑制するという、抗炎症機序を明らかにした。レスベラトロールには顕著な抗炎症作用があることが知られているため、今後臨床応用されるべき基礎を示した。

#### 卵巣における酸化ストレスメカニズムの解析

周閉経期においては卵子の質低下および卵子数の減少が不可避である。卵巣老化の基礎的理解として酸化ストレス機構において主要な役割を果たす転写因子Nrf2の卵巣における機能を解析し、排卵抑制による卵巣組織のダメージ回避がどのような好影響を及ぼすのか検討した。

Nrf2はストレス応答型の転写因子であり、定常状態ではユビキチンリガーゼKeap1により分解性制御を受けている<sup>4</sup>。卵巣においてNrf2が機能を持ち、酸化ストレス応答を司っていること、マウスにNrf2活性化低分子化合物を内服させると卵巣組織の酸化ストレス蓄積が軽減できるため卵子の温存につながることを示した。臨床的に低用量エストロゲン・プロゲステン製剤を内服させると排卵を持続的に抑制させることが可能であるが、マウスにおいて持続的排卵抑制をすると生産獲得の可能性が増えることを



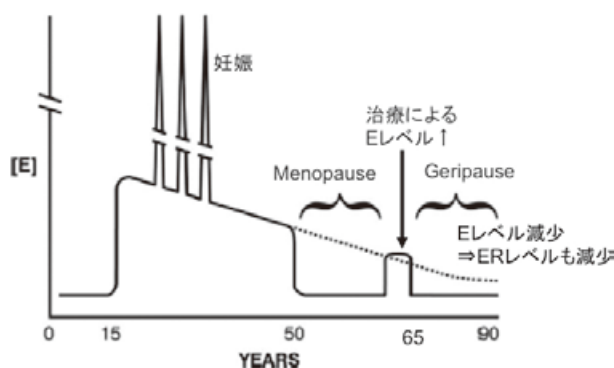


図6. Euestrogenemia仮説を説明する図

周閉経期に急激にエストロゲンレベルが低下することが、女性の高血圧、脂質異常症、骨粗鬆症などの疾患の本態であるが、緩やかにエストロゲンレベルを低下させることによってこれら疾患が予防できるという考え方を示す（文献6より改変引用）

示した。ヒト卵巣卵胞液の個別解析により、酸化ストレス蓄積および抗酸化機能抑制は受精、卵割に悪影響を及ぼすことを示した。

## おわりに

抗老化というキーワードを主軸にして、広範囲に渡る研究を展開した。身体が完全な調和を保つためには一定レベルのエストロゲンが必要であり、全身に存在するERはエストロゲンに対して適切に反応するが、閉経期における急激なエストロゲンレベルの低下はERの反応にも悪影響を及ぼすことで全身的影響をもたらすという考え方がある。エストロゲン効果に関する仮説としては、Timing仮説、Critical window説、Geripause (Eskin)、Euestrogenemia仮説<sup>6</sup>と多くある。Geripauseは2003年にEskinらが示した概念であり、老年期になるとエストロゲン分泌レベルが低下するだけでなくERのレベルまたは反応が低下してきて、エストロゲンに反応する臓器の悪影響が顕著に出てくるという考え方である。突然エストロゲンレベルが途絶するのは閉経、Surgical castrationもしくは卵巣実質を温存しない手術であるが、緩やかにエストロゲンレベルを低下させることによって疾患の予防になるという考え方がEuestrogenemia仮説の主な点である(図6)。エストロゲンについてはまだ検証すべき事実が多く残されている。

抗老化にかかわる分子は多く存在するが、エストロゲンに関する研究として、ER、SIRT1の研究を始めてから、それ以外にも多様な分子機構を明らかにすることが出来た。エストロゲンは女性の健康と老化を考える上で重要な因子であるが、エストロゲ

ンに関連する女性に特有の疾患に目を向けることは、女性の健康を包括的に考える上でも重要であり、これら一連の研究を通して、女性が疾患に悩まされないよりよい生活を送るための基盤を構築することが、産婦人科医師として重要と考えている。今後も基礎的研究だけでなく、臨床的研究にも幅を広げることで、女性の健康・抗老化に貢献したい。これら研究は私単独の能力のみでなし得たものではなく、家族、共同研究者、指導教官に多大な謝辞を捧げたい。

## 参考文献

1. Ober, C., Loisel, D.A. & Gilad, Y. Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nat Rev Genet* 9, 911-922 (2008).
2. Wada-Hiraike, O., Warner, M. & Gustafsson, J.A. New developments in oestrogen signalling in colonic epithelium. *Biochem Soc Trans* 34, 1114-1116 (2006).
3. Wada-Hiraike, O. Benefits of the Phytoestrogen Resveratrol for Perimenopausal Women. *Endocrines* 2, 457-471 (2021).
4. Wada-Hiraike, O. Nrf2 and oxidative stress. *Pathology: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants* 1st edition, 77-86 (2020).
5. Finkel, T., Deng, C.X. & Mostoslavsky, R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 460, 587-591 (2009).
6. Turner, R.J. & Kerber, I.J. Renal stones, timing hypothesis, and eu-estrogenemia. *Menopause* 19, 104-108 (2012).
7. Drummond, A.E. & Fuller, P.J. The importance of ERbeta signalling in the ovary. *J Endocrinol* 205, 15-23 (2010).

## **Abstract**

After the onset of puberty, the secretion of estrogen increases due to the production from ovulatory follicles, but the secretion level eventually declines, and the secretion finally diminishes at final menstrual period. In concordance with the decline of estrogen production, the functions of body organs deteriorate, and it is known as aging process. Thus, it can be said that women's body functions are greatly affected by the secretion of estrogen.

The main factors responsible for the biological effects of estrogen are estrogen receptors (ERs).

For better understanding the mechanism of ER action, we examined the regulation of ER function. The function of sirtuin family molecules was also investigated to elucidate the mechanism of aging. The decline of fertility in women with aging is closely related to the deterioration of oocyte quality and the decrease in the number of oocytes. Since external factors such as toxins or the accumulation of oxidative stress have adverse effects on the deterioration and decrease in the number of oocytes, we have also focused on the mechanism of oxidative stress as a basic understanding of ovarian aging.

Estrogen is an important factor in women's health and aging, but it is also important to focus on estrogen-related diseases specific to women to comprehensively consider women's health. I believe it is important to build a foundation for women to live a better life without suffering from diseases.