

産婦人科領域におけるサーチュインファミリー分子と植物エストロゲン・レスベラトロールの役割

東京大学医学部附属病院 女性診療科・産科 講師 平池 修

はじめに

女性は思春期以降性成熟期を迎えると月経周期が確立し、排卵が惹起され生殖能力を獲得する。排卵周期が確立すると卵巣・発育卵胞からエストロゲンが産生されるようになるが、エストロゲンはヒトの生殖器を中心として身体各臓器の組織成熟をもたらす。エストロゲンの生殖器外作用としては、皮膚、血管内皮、骨などに対する作用が有名である。周閉経期から卵巣からの排卵が途絶してくるが、卵巣機能は閉経後にはほぼ廃絶する。よって、エストロゲン産生能が低下していくにつれ身体臓器の機能低下すなわち老化が起きることから、女性の身体成熟度はエストロゲン分泌状態により、大きく影響されることがわかる。

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。HRTはおよそ1950年代頃より米国を中心に普及が始まり、全世界的に広まっていった。導入当初は更年期症状の緩和だけでなく、エストロゲンの生殖器外作用の類推から副効用として冠動脈疾患や骨粗鬆症も予防できるとの発想があり、恰も万能薬のような扱いを受けた。実際抗動脈硬化作用もあることが疫学的に分かってきた¹⁾ことから、時代の寵児としての扱いを受けてきたが、次第に有害作用が存在することが疫学的調査により明らかとなってきた。Women's Health Initiative study²⁾中間報告が2002年に発表され、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てしまい急遽臨床試験そのものが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の特性を理解する必要がある。

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 (α および β) がリガンド 17β -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、 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。このようにERの作用機構は分子生物学的に精緻であるが、ホルモン依存性腫瘍の形成過程において、ERに結合し影響を及ぼす転写共役因子が担う分子機構の解析は重要である。中でも我々は NAD^+ 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機能に着目した。サーチュインファミリー分子はSIRT1からSIRT7までのサブタイプが存在し、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³⁾。SIRT1は、p53、FOXO、PGC-1 α 、NF- κ B、 β 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ことが近年明らかになっている(図1)。

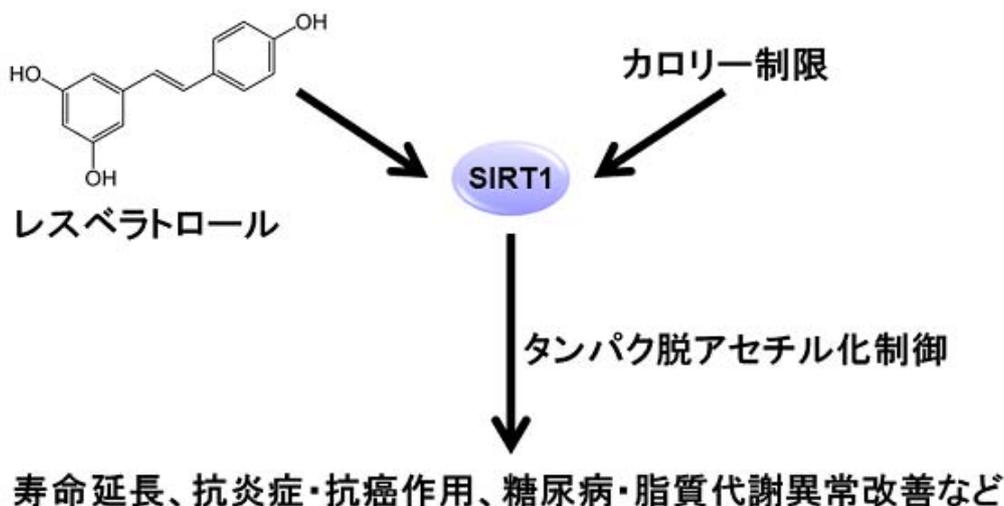


図1 SIRT1 活性化のメカニズムとその生体作用

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、動物実験などで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、*in vitro* の実験系ではおよそ 10^{-6} ~ 10^{-5} M のオーダーで ER の活性化作用があり、ER α に対してはアンタゴニストとしての作用がないが、ER β 活性に関しては相加的に作用する一種の Selective Estrogen Receptor Modulator として考えられている⁴⁾。レスベラトロールは SIRT1 活性のみならず ER β 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。近年では、サーチュインファミリー分子の構造解析から、レスベラトロールは SIRT1 および SIRT5 を活性化させるが、サーチュインファミリーの中で最も強く抗酸化機能を持つ SIRT3 の機能を抑制することが示唆されている⁵⁾。

我々は、サーチュインファミリー分子の産婦人科領域における機能解析を、E₂ 標的組織との関わりから検討しており、その最近の知見を紹介する。

ヒト卵巣における SIRT1 および SIRT3 の生理的意義

ヒト卵巣における SIRT1 および SIRT3 の存在を免疫組織化学染色法にて検討したところ、卵巣顆粒膜細胞における SIRT1 および SIRT3 の存在が確認された。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初代培養し、レスベラトロールにより処理したところ、細胞数は低下するものの細胞死は発生していなかったが、SIRT1 の発現が上昇し、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することが判明した。ラット卵巣顆粒膜細胞培地にレスベラトロールを添加（最終濃度 100 μ M）して培養を継続したところ、48 時間時点での培地上清プロゲステロン値は有意に高値を示していたため、黄体化関連因子群の発現上昇が、実際にプロゲステロン値の上昇に結びついていることが示された⁶⁾。顆粒膜細胞の黄体化は、妊娠維持に正の作用をするが、レスベラトロールは黄体化関連因子の発現を介し顆粒膜細胞の黄体化を促進するというメカニズムが示された(図 2A)。サーチュインファミリーの中で抗酸化作用に主たる役割をもつ SIRT3 の卵巣における生理的意義を、体外受精プログラムにおいて得られる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、 17β -HSD1 などの卵胞発育促進因子群の mRNA や StAR、p450scc、 3β -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(図 2B)⁷⁾。サーチュインファミリーはこのように卵巣顆粒膜細胞において機能的であり、サブタイプ別の特定機能を担っていることが見出された。

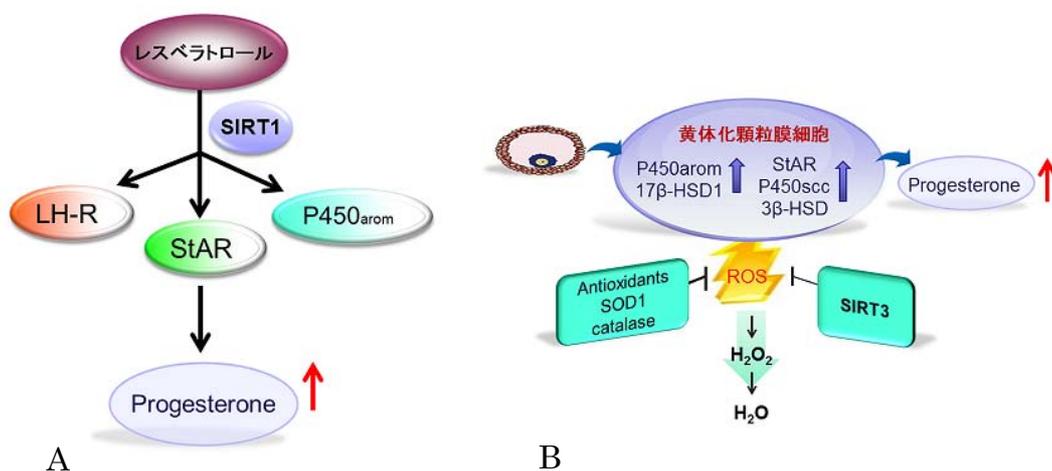


図2 卵巣におけるサーチュインファミリーの機能の模式図
 A: レスベラトロールによる黄体化促進機構
 B: SIRT3 による卵胞発育および黄体化促進機構

子宮内膜症とレスベラトロール

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源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 β アゴニストを使用した実験によると、2週間の ER β 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⁸⁾。ER β アゴニストには NK 細胞やマクロファージを活性化させる作用があることから、免疫的機序により子宮内膜症に対し抑制的に作用するこ

とが期待される。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いる。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。子宮内膜症患者に対し、レスベラトロールとエストロゲン・プロゲステロン製剤との併用で COX-2 発現を抑制することから疼痛の緩和作用も示されており、臨床的な有用性が明らかになりつつある。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- α 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- α 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(図3)⁹⁾。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。

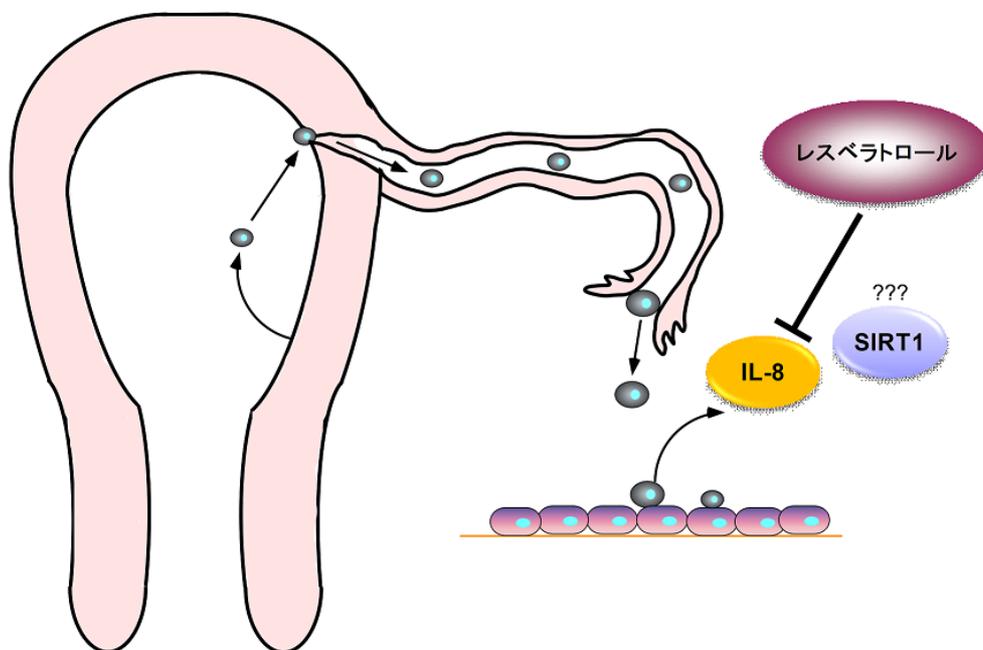


図3 子宮内膜症間質細胞に対するレスベラトロールの抗炎症作用の模式図

SIRT1 の子宮内膜における作用

免疫組織化学染色法を用いて SIRT1 が子宮内膜に存在することを示し、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が判明した。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。また SIRT1 のレプレッサーである Sirtinol により、着床能が抑制されることを見出した。よってレスベラトロールは、SIRT1 そのものの発現とそれ単独でも E-cadherin の発現を上昇させることで着床能向上に寄与するということを見出した(図 4)¹⁰⁾。

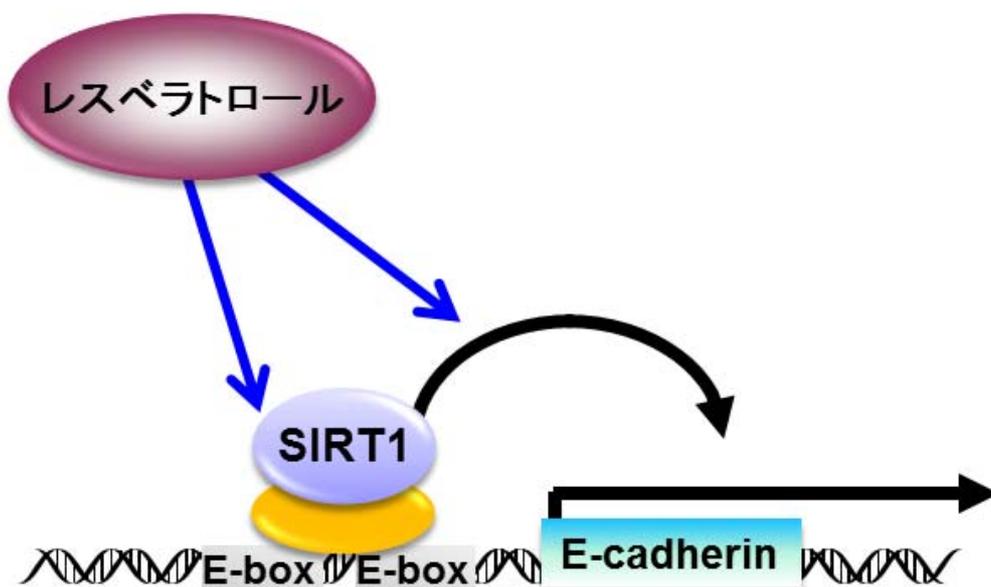


図 4 レスベラトロールの着床促進作用の模式図

レスベラトロールは SIRT1 発現を促進するだけでなく、E-cadherin 発現を直接的に促進することが示唆されている。

おわりに

SIRT1 は産婦人科領域においても、着床促進、黄体化促進、抗炎症などの多彩な機能が存在することが明らかとなった。また、SIRT3 も卵巣における抗酸化作用が存在することで、サーチェインファミリーの産婦人科領域における多様な分子機構が明らかになった。

SIRT1 は転写調節因子としての作用があるが、ER α と内在性複合体を形成し、ER α 自体が SIRT1 プロモーターに結合することで SIRT1 発現が増加し、結果としてカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼの発現が上昇する一方、癌抑制遺伝子である cyclin G2 や p53 の発現は減少するような遺伝子発現調節メカニズムが存在する。SIRT1 によるホルモン依存性組織の制御はさらに複雑なものであることが推察されることから、これからの研究の進展が望まれる。食事制限およびレスベラトロールは、いずれも SIRT1 の活性化をもたらす。レスベラトロールの有用な作用を診療・HRT に取り入れることで、ER 活性と SIRT1 活性の精緻なバランスを取りつつより優れた HRT になる可能性がある。

【引用文献】

- 1) Stampfer, M.J., *et al.* Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *New Engl J Med* 325, 756-762 (1991).
- 2) Rossouw, J.E., *et al.* Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321-333 (2002).
- 3) Finkel, T., Deng, C.X. & Mostoslavsky, R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 460, 587-591 (2009).
- 4) Bowers, J.L., Tyulmenkov, V.V., Jernigan, S.C. & Klinge, C.M. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 141, 3657-3667 (2000).
- 5) Gertz, M., *et al.* A molecular mechanism for direct sirtuin activation by resveratrol. *PloS one* 7, e49761 (2012).
- 6) Morita, Y., *et al.* Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. *Reprod Biol Endocrinol* 10, 14 (2012).
- 7) Fu, H., *et al.* SIRT3 positively regulates the expression of folliculogenesis- and luteinization-related genes and progesterone secretion by manipulating oxidative stress in human luteinized granulosa cells. *Endocrinology* 155, 3079-3087 (2014).
- 8) Harris, H.A., Bruner-Tran, K.L., Zhang, X., Osteen, K.G. & Lyttle, C.R. A selective estrogen receptor-beta agonist causes lesion regression in an experimentally induced model of endometriosis. *Hum Reprod* 20, 936-941 (2005).
- 9) Taguchi, A., *et al.* Resveratrol suppresses inflammatory responses in endometrial stromal cells derived from endometriosis: a possible role of the sirtuin 1 pathway. *J Obstet Gynaecol Res* 40, 770-778 (2014).
- 10) Shirane, A., *et al.* Regulation of SIRT1 determines initial step of endometrial receptivity by controlling E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 424, 604-610 (2012).