

エストロゲン応答蛋白質に関連する加齢性疾患

東京大学大学院医学系研究科
加齢医学講座老化制御学分野
講師 東 浩太郎

Key words : エストロゲン、non-genomic 作用、骨粗鬆症、オートファジー、サルコペニア、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体、乳がん、内分泌療法耐性、TRIM ファミリー蛋白質、ユビキチン化

はじめに

不老不死は、秦の始皇帝の時代から、人類の夢の一つである。これまで、ヘイフリック限界、酸化ストレス、エピゲノム変化、細胞老化関連分泌表現型 (SASP) など、老化に関わる因子が複数同定され、介入による制御が試みられているが、ヒトにおいて有効性が証明された介入はまだ存在しない。哺乳類において老化に影響を与える因子として忘れてはならないのが、性ホルモンである。特に女性 (雌性) において、卵巣から分泌されるエストロゲンは、複数の標的臓器に影響を及ぼす。これは、卵巣という単一臓器の老化が、全身の老化を加速させるといふ、酵母や線虫では観察できない独特の老化促進のメカニズムである。実際、ホルモン補充療法が一時期米国を中心に行われ、いくつかの老化形質は可逆的であった¹⁾。(なおホルモン補充療法は、ランダム化無作為試験において、予想された乳がんの増加に加え、予想に反した動脈硬化の促進もあり¹⁾、臨床試験は打ち切られ、更年期障害の緩和以外の目的では現時点では使用は推奨されていない。一方で、より若年者からの使用であれば動脈硬化予防効果があるのではないかと見直されつつある²⁾。)

この度、内分泌疾患に関する最新情報を寄稿させていただく機会をいただき、有難く思っている。老化は必ずしも「疾患」ではないが、「老化関連疾患」は存在し、予防・治療により、健康寿命の延伸が得られ、幸福な人生につながると信じられている。この意味で、エストロゲン欠乏が関わる加齢性疾患は、広義の内分泌疾患と呼んでも差し支えないと考えている。本稿では、筆者が関わったエストロゲンに関連する研究を紹介させていただく。読者の何らかの気づきのきっかけや、若い研究者の研究のヒントになれば幸いである。

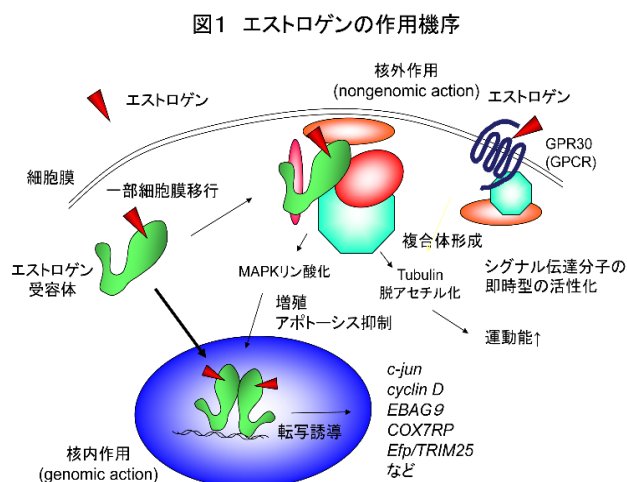
1. エストロゲンの不思議な「即時型」作用

既に 25 年ほど前の事柄になり、最新情報というわけではないが、馴染みのない読者も想定し、私の大学院生時代の研究から書き起こしてみたい。当時は（今でもそうであるが）、エストロゲン（正確にはエストラジオール；以下 E2）は核内受容体であるエストロゲン受容体（以下 ER）に結合して、二量体を形成し、DNA 上のエストロゲン応答配列に結合し、特定の遺伝子の転写を促進し、蛋白質が誘導され、生理作用を発揮するというメカニズムが、主とした作用様式と考えられていた。このプロセスは、転写、翻訳を介するため少なくとも E2 刺激から 30 分はかかると推測されている。しかし、当時、E2 刺激から 5 分から 10 分で、シグナル伝達分子のリン酸化様式が変化するという不思議な現象が知られており、即時型作用と呼ばれていた。また、「核内」受容体が、「核外」でシグナル伝達分子と複合体を形成しているという報告もあり、核内受容体の核外作用もしくは non-genomic 作用と呼ばれていた。

エストロゲン作用を研究するには、ER 陽性の乳がん細胞が扱いやすく、よく用いられる。私は、加齢性疾患の研究室に配属していたのであるが、この不思議なエストロゲン作用を研究するために、がんセンターのシグナル伝達に関する研究室にお世話になることとなった。細胞質や細胞膜に ER を発現させ、結合蛋白質を単離するという実験系を用い、E2 は ER 陽性の乳がん細胞において、細胞骨格である tubulin の脱アセチル化を即時的に引き起こすことを示した³⁾。そのメカニズムとしては、細胞膜近傍で ER と tubulin、tubulin の脱アセチル化酵素である HDAC6 が複合体を形成していることを示した。これは病的には、乳がん細胞の運動性に関わり、エストロゲン存在下での乳がんの浸潤・転移に関わっていることが推測された。

他の研究室からは E2 は non-genomic 作用を介して、乳がん細胞の MAPK の即時型のリン酸化を引き起こす現象⁴⁾や骨芽細胞のアポトーシスを抑制する現象⁵⁾（この現象も MAPK の即時型のリン酸化

を伴う)などが報告されている。即時型反応には、ERを介さず、別の膜レセプター(GPR30)を介するメカニズムもあるようだ⁶⁾。読者の皆様には、エストロゲンの作用は、転写制御を介さないメカニズムも存在することを知らなければ幸いである(図1)。



2. エストロゲン応答遺伝子 EBAG9 と骨粗鬆症

大学院卒業後は留学を経て、東京都健康長寿医療センター研究所に所属し、エストロゲン関連の研究に再度取り組んだ。この研究は、現在の職場に異動した後も継続している。私たちの研究室では、DNA上のエストロゲン結合配列に着目し、独自の応答遺伝子を複数同定していた。そのうちの 하나가 Estrogen receptor-binding fragment associated gene 9 (*EBAG9*)であった。*EBAG9*蛋白質は、複数のがんの予後悪化因子であり、免疫応答の回避に関わっているのではないかと考えられていた。一方で、生体内に広く発現しているにもかかわらず、がん組織以外における生理的な作用は不明であった。そこで、エストロゲン欠乏に関連する加齢性疾患として骨粗鬆症が知られることを手掛かりに、*Ebag9* 遺伝子のノックアウトマウス(以下 *Ebag9* KO マウス)を作成し、骨組織の解析を行った。この結果、*Ebag9* KO マウスでは、骨密度の減少、力学的な脆弱性を認め、*EBAG9* 蛋白質が骨保護に役立っていることを示した⁷⁾。さらに、*Ebag9* KO マウスでは、骨形成が低下しており、骨吸収が増加していた。*EBAG9* 蛋白質は、ゴルジ体に局在し、HeLa細胞においてオートファジーに関わる *TM9SF1* 蛋白質と相互作用しているという結果を得ていたため⁸⁾、骨芽細胞、破骨細胞におけるオートファジーに関

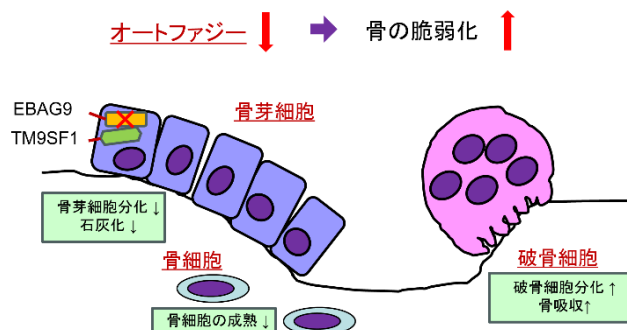
わる因子ではないかと推測し、解析を進めた。その結果、EBAG9はこれらの細胞においてオートファジーを促進していることが示された（図2）。

骨粗鬆症の治療には、臨床的に破骨細胞の機能を抑制する骨吸収抑制薬が多く用いられる。骨組織におい

ては、骨吸収と骨形成が共役しているため、骨吸収抑制薬の使用は、骨形成に対しても抑制方向に作用する。これは、顎骨壊死や非定型骨折など、副作用の原因ともなっている。骨形成促進薬は、テリパラチド、アバロパラチド、ロモソズマブの3剤であり、いずれも注射薬で、使用対象や使用期間が限られる。このうち、骨吸収抑制作用も併せ持つ薬剤はロモソズマブのみである。骨吸収と骨形成が共役していることを考慮すると、骨芽細胞、破骨細胞それぞれの細胞に対して作用していると考えられる。EBAG9においても、骨芽細胞、破骨細胞それぞれへの作用が認められ、いずれも骨保護の方向性であった。このことから、オートファジーを標的とした骨粗鬆症治療が、有用である可能性が示唆される。

読者の中には、これまでの話により、EBAG9蛋白質の作用がエストロゲンの骨保護効果を担っている要素であると考えた方もいらっしゃると思う。もしそうだとすると、*Ebag9* KO マウスと野生型マウスにおいて卵巣摘除を行った場合、野生型マウスにおいても*Ebag9*が誘導されなくなるはずであり、*Ebag9* KO マウスと野生型マウスの差が生じにくくなることが推測される。しかし実際は、*Ebag9* KO マウスの表現型（骨量減少）は、卵巣摘除マウスでより顕著であり⁷⁾、物事はそれほど単純ではないことが示唆された。おそらく、*Ebag9*はエストロゲン以外の要素によっても骨組織においては発現が誘導されており、むしろ閉経後の骨粗鬆症をより顕著にする因子であるということが推測された。

図2 *Ebag9* ノックアウトマウスにおける骨の脆弱化



3. エストロゲン応答遺伝子 COX7RP とサルコペニア

私たちの研究室では独自のエストロゲン応答遺伝子を複数同定し

ていたが、そのうちの 하나가 cytochrome c oxidase subunit 7-related protein (*COX7RP*) であった。この *COX7RP* がコードする蛋白質は、ミトコンドリアの呼吸鎖「超複合体」形成を促進する蛋白質であった⁹⁾。

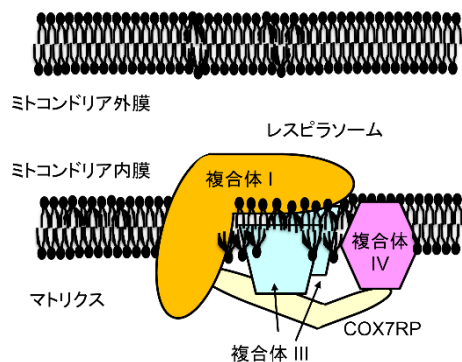
ミトコンドリアは細胞内でエネルギーを産生する細胞内小器官であるが、その役割の大部分はミトコンドリア内膜における電子伝達系が担っている。この電子伝達系には、電子を受け渡す複数の蛋白質複合体が存在し、呼吸鎖複合体と呼ばれる。この複合体同士が、より高次の「超複合体」を形成することが、非変性電気泳動やクライオ電子顕微鏡を用いた研究等で明らかとなってきた。特に、複合体 I、複合体 III、複合体 IV により構成されるものが典型的で、レスピラソームと呼ばれる。

COX7RP 蛋白質は、これらの複合体 I、複合体 III、複合体 IV との結合部位を有し、これらをつなぎとめる架橋のような役割を果たすことにより、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体形成を促進することが推測される¹⁰⁾ (図 3)。このように超複合体が形成されることにより、電子伝達の効率が良くなり、さらに活性酸素が発生しにくくなることが想定されている。私たちの研究室では、トランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスを解析し、*COX7RP* 蛋白質の存在がマウスの筋力増強や持久力向上に関連していることを示した⁹⁾。*COX7RP* 蛋白質はミトコンドリアの機能を高めることにより、筋肉の質の向上を介して、筋機能を高めていることが推測された。

加齢に伴う筋肉の量や機能の低下はサルコペニアと呼ばれる。以前は、加齢に伴い筋力が低下することは仕方がないと思われていたが、近年は介入することにより健康寿命の延伸を得られることが推測され、国際的にも「疾患」として扱われるようになった。しかし、現時点で承認されている治療薬は存在せず、栄養、運動による地道な介入が行われている。

私達は、超複合体の形成促進がサルコペニアの治療に役立つのではないかと考えた。しかし、ヒトを対象に *COX7RP* のトランスジェニックを作成することは倫理的に困難である。そこで、超複合体の形

図3 ミトコンドリア呼吸鎖超複合体とCOX7RP



成促進作用のある薬物を同定することを試みた。蛍光共鳴エネルギー移動現象（FRET現象）にて、複合体Iと複合体IVの近接を定量できる実験系を筋芽細胞を用いて作成し、多数の化合物のスクリーニングを行った。その結果、チロシンキナーゼ Syk の阻害薬として知られる 3,4-methylenedioxy- β -nitrostyrene (MNS) をはじめとする複数の化合物を同定した¹¹⁾。MNS等の薬剤をマウスに注射したところ、マウスの筋力および持久力が向上し（図4）、サルコペニア治療薬の候補になりうると考えられた。今後、ヒトを対象とした臨床試験において、安全性や効果の検証が必要となるが、将来のサルコペニア治療薬の開発に繋がれば幸いである。

図4 MNS投与によるマウスの筋力・筋持久力の向上



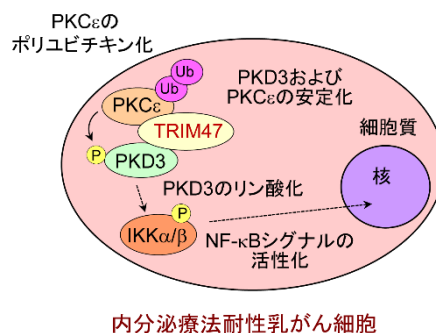
4. エストロゲン応答遺伝子 *TRIM25* と乳がんおよび TRIM ファミリー蛋白質

私たちの研究室では独自のエストロゲン応答遺伝子を複数同定していたが、そのうちの 하나가 Tripartite motif containing 25 (*TRIM25*)であった。この *TRIM25* がコードする蛋白質は estrogen-responsive finger protein (Efp) とも呼ばれ、ER 陽性乳がんの悪性化に関連する蛋白質であった¹²⁾。さらに、自然免疫に関わる Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) 蛋白質を安定化する作用も後に示され¹³⁾、生理的にも重要な蛋白質であることが明らかとなった。

TRIM25 蛋白質は TRIM ファミリー蛋白質という一群の蛋白質の1つである。TRIM ファミリー蛋白質は RING finger ドメインを有することが特徴であり、E3 ユビキチンリガーゼの作用を有している。実際、*TRIM25*/Efp はがん抑制遺伝子 14-3-3 σ をユビキチン化することによりプロテアソームによる分解を誘導し¹²⁾、また RIG-I をユビキチン化することにより安定化することが示されている¹³⁾。

私達の研究室では、TRIM25の研究から着想を得て、類似した構造のTRIMファミリー蛋白質の乳がん細胞の内分泌療法耐性につながる機能の解析を行った。私はTRIM47蛋白質の解析を担当した。ER陽性乳がんの組織においては、TRIM47抗体における染色の反応性の高さが、乳がんの再発（内分泌療法耐性）と関連していた。プロテオミクスの手法を用いた解析にて、TRIM47は、特定のプロテインキナーゼ（Protein kinase C ϵ およびProtein kinase D3）と結合することが示され、そのうちProtein kinase C ϵ （PKC ϵ ）をユビキチン化することを示した。このユビキチン化様式は、ユビキチン分子のLys27を介するポリユビキチン化という珍しいタイプのユビキチン化であり、これがPKC ϵ の安定化につながり、ひいては、PKC ϵ によりリン酸化されるProtein kinase D3（PKD3）の安定化にも関与しており、乳がんの内分泌療法耐性メカニズムのひとつであることが推測された¹⁴⁾（図5）。

図5 乳がんの内分泌療法耐性におけるTRIM47の役割



がんの診療においては、標準的な治療を行ったにもかかわらず、その効果が乏しい場合、がんの性質に合わせた個別の治療が必要になる。遺伝子変異の情報から個別化された治療を提案するゲノム診療が実用化されているが、有効な治療法に結びつかない症例も数多く存在するのが現状である。TRIMファミリーによる蛋白質の修飾や安定化は、遺伝子情報からはうかがい知ることのできない情報であり、遺伝子よりも直接的にがんの振る舞いに直結している情報である。蛋白質の発現や修飾状態を手掛かりに、有効な個別化治療を行う方法を提供することにより、これまで救うことのできなかつた、治療抵抗性のがん患者さんに対する、新たな診断・治療法を提供できるようになるのではないかと考えている。

おわりに

本稿では、エストロゲンに関連する疾患として、骨粗鬆症、サルコペニア、内分泌療法耐性乳がんに触れ、これまでの最新の研究成果について紹介させていただいた。本稿が、読者の内分泌の理解を深め

るとともに、若手研究者の着想につながれば幸いである。これらの研究をさらに発展させ、加齢性疾患の克服、健康寿命の延伸に貢献していきたいと考えている。研究の遂行にあたり、ご指導いただいた先生方、ご協力いただいた共同研究者の方々や大学院生、貴重なサンプルをご提供くださった患者さん方、研究費をご支援くださった山口内分泌疾患研究振興財団をはじめ諸財団や学術振興会のご関係者に感謝をささげたい。

参考文献

- 1) The Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. 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
- 2) Schierbeck LL, Rejnmark L, Tofteng CL, et al. Effect of hormone replacement therapy on cardiovascular events in recently postmenopausal women: randomised trial. *BMJ* 345: e6409, 2012
- 3) Azuma K, Urano T, Horie-Inoue K et al. Association of estrogen receptor alpha and histone deacetylase 6 causes rapid deacetylation of tubulin in breast cancer cells. *Cancer Res* 69: 2935-2940, 2009
- 4) Song RX, McPherson RA, Adam L et al. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol* 16, 116-127, 2002
- 5) Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104: 719-730, 2001
- 6) Mizukami Y. In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo. *Endocr J* 57: 101-107, 2010
- 7) Azuma K, Ikeda K, Shiba S, et al. EBAG9-deficient mice display decreased bone mineral density with suppressed autophagy. *iScience* 27: 108871, 2024
- 8) Miyazaki T, Ikeda K, Sato W, et al. Extracellular vesicle-mediated EBAG9 transfer from cancer cells to tumor microenvironment promotes immune escape and tumor progression. *Oncogenesis* 7: 7, 2018
- 9) Ikeda K, Shiba S, Horie-Inoue K, et al. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat Commun* 4: 2147, 2013
- 10) Azuma K, Ikeda K, Inoue S. Functional Mechanisms of Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplex Assembly Factors and Their Involvement in Muscle Quality. *Int J Mol Sci* 21: 3182, 2020
- 11) Kobayashi A, Azuma K, Takeiwa T, et al. A FRET-based respirasome assembly screen identifies spleen tyrosine kinase as a target to

- improve muscle mitochondrial respiration and exercise performance in mice. *Nat Commun* 14: 312, 2023
- 12) Urano T, Saito T, Tsukui T, et al. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* 417: 871-875, 2002
 - 13) Gack MU, Shin YC, Joo CH, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446: 916-920, 2007
 - 14) Azuma K, Ikeda K, Suzuki T, et al. TRIM47 activates NF-kappaB signaling via PKC-epsilon/PKD3 stabilization and contributes to endocrine therapy resistance in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118: e2100784118, 2021

エストロゲン応答蛋白質に関連する加齢性疾患

2025年10月29日発行

公益財団法人山口内分泌疾患研究振興財団
〒105-0014 東京都港区芝2丁目28-11
E-Mail: office@yamaguchi-endocrine.org