

プロゲステロゲンと心血管リスク

伊藤 文武, 辰巳 弘, 岩佐 弘一, 岩破 一博, 北脇 城

京都府立医科大学大学院女性生涯医科学

はじめに

2002年に米国 Women's Health Initiative (WHI) の大規模臨床試験の中間報告が出され, ホルモン補充療法 (hormone replacement therapy, HRT) によって冠動脈疾患 (coronary heart disease, CHD), 脳卒中, 肺塞栓, 乳癌がプラセボに比べて増加したことから治験が中止された [1]. この報告以来, HRT の有用性, 適応, 投与方法に関する従来の概念を根本から再検討する必要が生じた. その問題点の1つとして, プロゲステロゲンの併用ということが挙げられる. HRT においては, エストロゲンとして結合型エストロゲン (conjugated equine estrogen, CEE) が, プロゲステロゲンとして酢酸メドロキシプロゲステロン (medroxyprogesterone acetate, MPA) が常用されており, WHI 以外の主要な大規模臨床試験においても MPA をプロゲステロゲンの代表として固定したアームとして取り扱われてきた. プロゲステロゲンの種類は多岐にわたっており, WHI の大規模臨床試験の終了以降, 他のプロゲステロゲンについてリスクおよびベネフィットが検証されつつある. Fournier らは前向きコホート研究により, エストロゲンと天然型のプロゲステロン (P4) との併用あるいはジドロゲステロン (DG) との併用では乳癌リスクを上昇させず, エストロゲン単独投与あるいは MPA を含む他のプロゲステロゲン製剤との併用によって乳癌リスクが上昇したことを示した [2]. 一方, エストロゲン単独投与の WHI (2004) の報告では結果が若干異なる. リスクが上昇しなくなったものは, CHD, 静脈血栓性疾患, そして乳癌である [3]. このようにプロゲステロゲンの種類, 使用の有無により効果と副作用が異なる可能性があるが, プロゲステロゲンの種類による血管内皮への炎症反応への影響を検討した報告はごく限られている [4-9]. そのため各種プロゲステロゲンの動脈硬化発症リスクを個別に検討

し, エストロゲンによる動脈硬化保護作用をできるだけ損なわずに, 同時にそのリスクをより効果的に軽減するプロゲステロゲンを選択し, その投与方法を決定する必要性が望まれている.

動脈硬化が起こるメカニズムとして, その発症の初期段階においては, レセプターと接着因子の相互作用によって単球が血管内皮へ接着することが重要な役割を果たしている. 血管周囲の平滑筋から分泌されるサイトカインもこれを刺激する. 炎症性サイトカインに代表されるさまざまなタンパクや化学物質が血管内皮上の接着因子 (E-selectin, P-selectin, ICAM-1, VCAM-1等) の発現を制御していることが知られている [10, 11] (図1). エストロゲンはこれら血管内皮の接着因子発現を抑制することが示唆されている一方で, ある種のプロゲステロゲンは接着因子発現を亢進させ動脈硬化リスクとなる可能性が指摘されている [6, 12].

本研究では, 血管内皮のモデルとして, ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を使用し, HUVEC における MPA, P4等の各種プロゲステロゲンの接着因子発現への影響を検討した. さらに, 流血中の単球が血管内皮に接着することをモデル化した flow chamber system を用いて, 各種プロゲステロゲンによる HUVEC への単球接着に対する影響を *in vitro* で検討した.

各種プロゲステロゲンによる接着因子発現への影響

今回検討したプロゲステロゲンとして, 天然型の P4, HRT で最も多く使用されている MPA, 子宮内膜症の治療に用いられるジエノゲスト (DNG), 経口避妊薬に使用されているレボノルゲストレル (LNG), 酢酸ノルエチステロン (NETA) を使用した. HUVEC にこれらプロゲステロゲン単独または17 β エストラジオール (E2) と同時添加後に real-time PCR 法により接着因子 (E-selectin, P-selectin, ICAM-1, VCAM-1) の mRNA 発現量をホルモン無添加 (対照) 群と比較した. 臨床的濃度を考慮し, 各種プロゲステロゲンの濃度は100nM, E2の濃度は1nM とした. その結果, MPA および MPA + E2投与群で E-selectin の mRNA 発現レベルが対照群に比し

連絡先: 伊藤文武, 京都府立医科大学大学院女性生涯医科学
〒602-8566 京都府京都市上京区河原町通り広小路上る梶井町465

TEL: 075-251-5560

FAX: 075-212-1265

E-mail: fitoh@koto.kpu-m.ac.jp

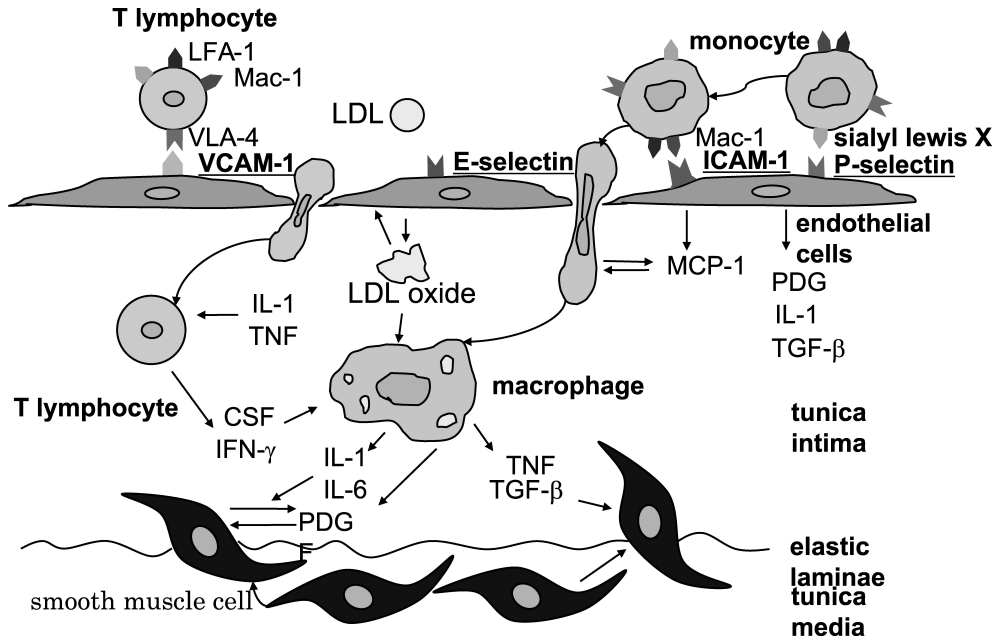


図1 動脈硬化初期病変における細胞間応答

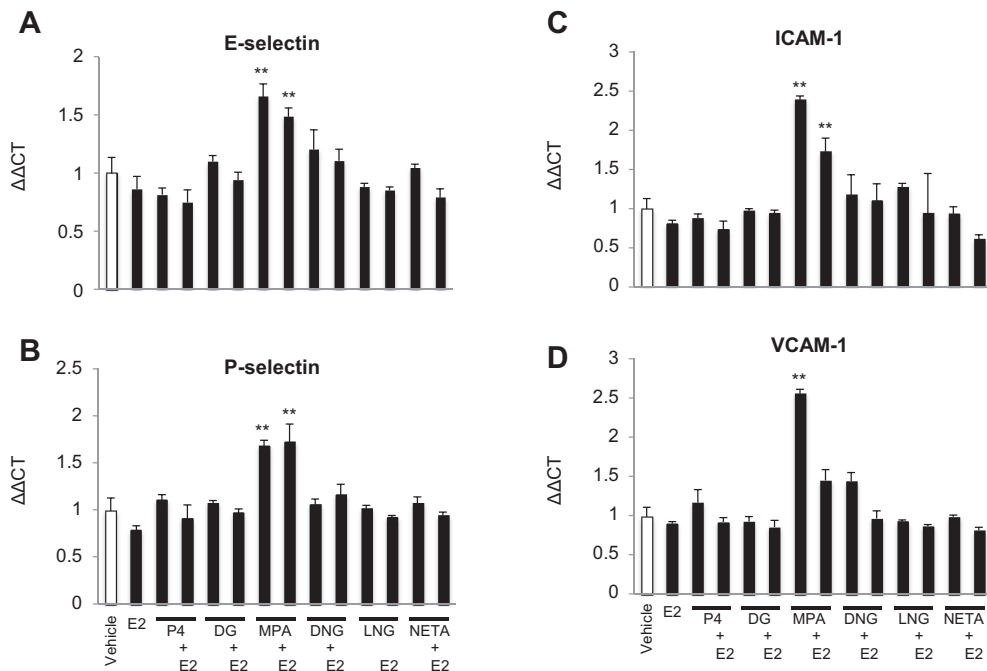


図2 各種プロゲステロン投与による接着因子 mRNA 発現の変化
 (A) E-selectin (B) P-selectin (C) ICAM-1 (D) VCAM-1
 *, p<0.05; **, p<0.01

約1.5倍に上昇した(図2A)。P-selectinにおいても同様にMPAおよびMPA+E2投与群で約1.7倍の上昇を認めた(図2B)。ICAM-1についてもMPAおよびMPA+E2投与群で発現の上昇を認めた(図2C)。VCAM-1についてはMPA投与群のみで発現の上昇を認めた(図2D)。しかし、他のプロゲステロンを投与した場合に

は対照群に比し、有意な変化を認めなかった(図2A-D)。次に、各種プロゲステロンによる接着因子発現への影響をELISA法および免疫組織化学法を用いてタンパクレベルで検討した。その結果、MPAを投与した群において、E-selectinおよびICAM-1は対照群に比し、発現量が有意に増加した。MPA+E2投与群においても、

E-selectin と ICAM-1 の発現が対照群に比し有意に増加した。他のプロゲステロゲンを投与した場合には上記のような有意な変化はみられなかった。また、免疫組織化学法においても、MPA 投与群での E-selectin および ICAM-1 の発現増強が確認された。

以上検討したプロゲステロゲンはプロゲステロンレセプター (PR) にさまざまな親和性をもって結合する。しかし、PR だけではなく、グルココルチコイドレセプター (GR) あるいはアンドロゲンレセプター (AR) に結合することによって、異なった活性あるいは作用を発揮する。MPA は天然型の P4 と異なり、PR の他に、GR と AR にも結合能を有する。そのため、他のプロゲステロゲンとは異なる、この MPA の作用は GR あるいは AR を介するものであると仮定した。そこで、GR のアンタゴニストである mifepristone (RU486) と AR のアンタゴニストである hydroxyflutamide (HF) を用いて抑制実験を行った。その結果、RU486 は MPA による接着因子発現の亢進を一部抑制した。対照的に、HF は AR による炎症反応抑制作用を反映してか、MPA の作用を一部増強させた。逆に GR アゴニストである dexamethasone (Dex) および AR アゴニストである dihydrotestosterone (DHT) を投与し GR, AR 作用の検証を行った。Dex, DHT, Dex + DHT 投与群で接着因子 mRNA の発現は上昇した。接着因子のタンパク発現は Dex + DHT 投与群でのみ増強した。以上から、MPA による接着因子発現の亢進は部分的に GR を介している可能性が示唆された。

各種プロゲステロゲンによる血管内皮への単球接着に対する影響

われわれは、MPA による接着因子発現の上昇が、実際に単球接着に影響を与えているか調べるために、flow chamber system を用いて検討した。カバーガラス上に単層培養した HUVEC を、各種プロゲステロゲンで前培養しておき、この上を横切るように単球細胞を一定の流速で流した。この system においては、一定のずり応力 (shear stress) を単層培養した HUVEC に加えることにより、生理的な条件に近い状態で単球の HUVEC への接着を検討することが可能である [13] (図 3)。今回われわれは、単球系の細胞として U937 を用いて、一定時間灌流させた後に接着した U937 の数を計測し、それぞれ対照群と比較検討した。その結果、MPA を投与した群では対照群に比し単球接着数が有意に増加した (図 4 A, B)。対照的に、E2 単独、P4 単独、P4 + E2、DG + E2、DNG + E2 投与群では対照群に比し単球接着数は有意に

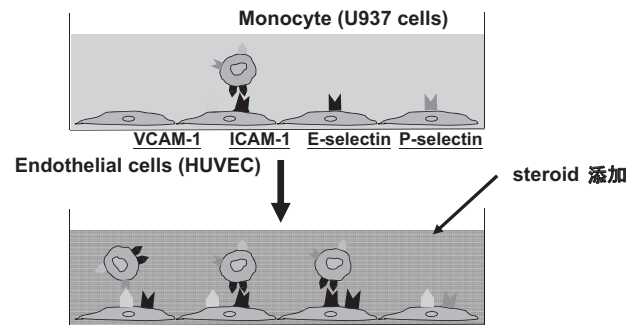


図 3 flow chamber system による血管内皮への単球接着の検討
接着因子の発現が亢進されれば、単球接着数が増加することが予想される。

減少した (図 4 B)。

この MPA による HUVEC への単球接着数の増加が接着因子の発現上昇に起因するものかどうかを検証するため、siRNA で ICAM-1 をノックダウンした HUVEC を用いて flow chamber system で検討した。予想した通り、ICAM-1 をノックダウンした HUVEC においては、MPA を投与した場合でも単球接着数の上昇はみられなかった (図 4 C)。

一方、GR アンタゴニストである RU486 は MPA による単球接着数の増加を一部抑制し、AR アンタゴニストである HF は MPA の作用に影響を認めなかった。Dex および DHT 投与においては、単球接着数に有意な変化を示さなかった。以上の結果から、MPA の血管内皮に対する作用は GR を介していることが示唆されるが、それは部分的でありすべてではないことが考えられる。

おわりに

本研究では、他のプロゲステロゲンと異なり、MPA は HUVEC において接着因子の発現を上昇させることを示した。E-selectin, P-selectin, ICAM-1, VCAM-1 等の接着因子は血管内皮と単球との接着を直接介することが知られている [14]。接着した単球は血管内膜へと侵入し、酸化 LDL を取り込むことで動脈硬化の初期病変となる。そのため、HRT を受けている閉経後女性において、血管内皮上の接着因子発現が増強した状態が長期間持続することは CHD リスクとなりうることが予想される。本研究結果においても、MPA は接着因子発現の増強とともに血管内皮への単球接着数の増加を引き起こした。さらに、ノックダウンの実験により単球接着数の増加が接着因子発現の上昇によることを示した。以上の結果より、HRT に用いられる MPA が動脈硬化リスクとなることが示唆された。

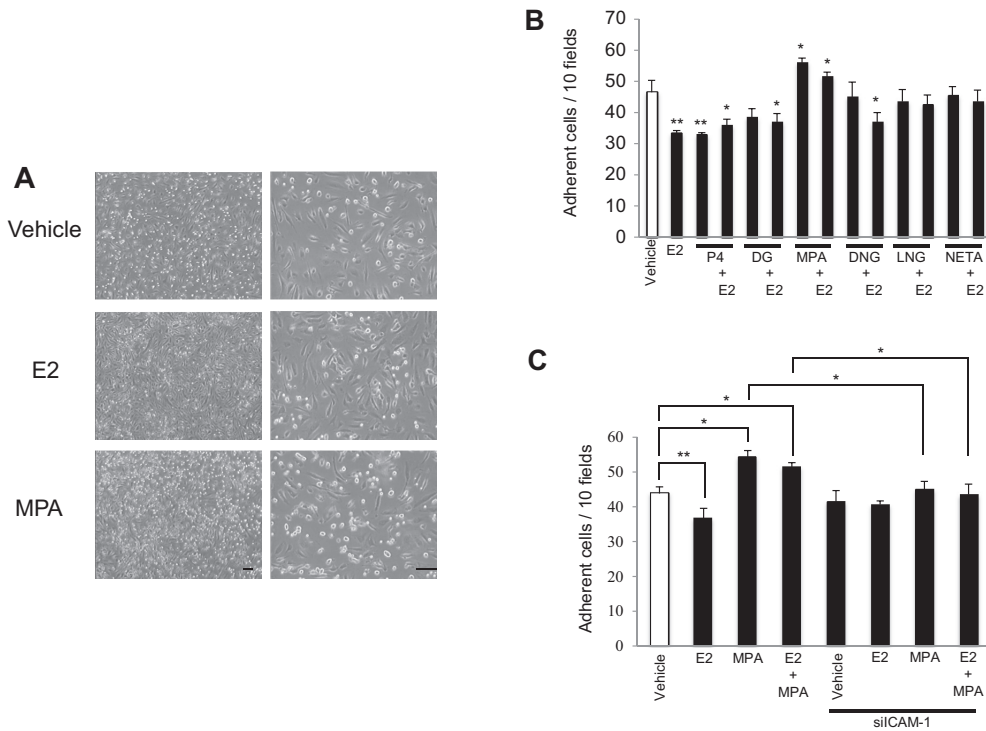


図4 flow chamber system による検討

(A) 円形の小細胞が接着した U937 を示す。

左：弱拡 (×50) 右：強拡 (×100) スケールバーの長さはすべて100μm を示す。

(B) 5 分間 U937 を灌流させた後に計測した HUVEC 上に接着した U937 の個数 * , p<0.05 ; ** , p<0.01

(C) siCAM-1 によりノックダウンした後の flow chamber system による検討 * , p<0.05 ; ** , p<0.01

プロゲステロンには、天然型の P4 と合成プロゲステロンとして MPA や DG などの17α-ヒドロキシプロゲステロン誘導体、LNG や DNG などの19-ノルテストステロン誘導体、そしてドロスピレノン (DRSP) が属する17α-スピロラクトン誘導体がある。各合成プロゲステロンは PR, エストロゲンレセプター (ER), GR, AR 等のステロイドホルモンレセプターに異なる親和性をもって結合する [15]。MPA の特徴として、GR 作用をもつことが知られている [15]。本研究では、PR および GR のアンタゴニストが MPA の作用を減弱させることを示した。一方で、PR 作用のみを有する天然型の P4 では接着因子発現の上昇あるいは単球接着数の増加は認めなかった。また、GR のアゴニストである Dex は接着因子発現を亢進させることを示した。以上の結果から、MPA の作用は一部 GR を介していることが示唆された。

以上のことから、閉経後女性における標準的な HRT で使用される MPA が動脈硬化発症のリスクとなることが示唆された。天然型の P4 あるいは DNG は接着分子の発現を変化させず単球の血管内皮への接着も亢進させないことから、今後の HRT レジメンの選択肢の1つとなる可能性が示唆された。しかし、*in vitro* での研究による限界も存在するため今後 *in vivo* での検討および大

規模臨床試験による個別のプロゲステロン製剤の作用効果につき検討が必要であると考えられた。

謝 辞

本稿は平成26年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究内容を中心にまとめたものである。本稿を執筆する機会を与えていただきました。日本生殖内分泌学会理事長 荷原 稔先生、また本誌編集委員の先生方に感謝申し上げます。

引用文献

1. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA 288, 321-323.
2. Fournier A, Berrino F, Clavel-Chapelon F (2008) Unequal risks for breast cancer associated with different hormone replacement therapies: results from the E3N cohort study. Breast Cancer Res Treat 107, 103-111.
3. Women's Health Initiative Steering Committee (2004) Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA 291, 1701-1712.
4. Løkkegaard E, Andreasen AH, Jacobsen RK, Nielsen LH,

- Agger C, Lidegaard Ø (2008) Hormone therapy and risk of myocardial infarction: a national register study. *Eur Heart J* 29, 2660-2668.
5. Flesch-Janys D, Slinger T, Mutschelknauss E, Kropp S, Obi N, Vettorazzi E, Braendle W, Bastert G, Hentschel S, Berger J, Chang-Claude J (2008) Risk of different histological types of postmenopausal breast cancer by type and regimen of menopausal hormone therapy. *Int J Cancer* 123, 933-941.
 6. Tatsumi H, Kitawaki J, Tanaka K, Hosoda T, Honjo H (2002) Lack of stimulatory effect of dienogest on the expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 by endothelial cell as compared with other synthetic progestins. *Maturitas* 42, 287-294.
 7. Otsuki M, Saito H, Xu X, Sumitani S, Kouhara H, Kishimoto T, Kasayama S (2001) Progesterone, but not medroxyprogesterone, inhibits vascular cell adhesion molecule-1 expression in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 243-248.
 8. Fu XD, Garibaldi S, Gopal S, Polak K, Palla G, Spina S, Mannella P, Genazzani AR, Genazzani AD, Simoncini T (2012) Dydrogesterone exerts endothelial anti-inflammatory actions decreasing expression of leukocyte adhesion molecules. *Mol Hum Reprod* 18, 44-51.
 9. Stevenson JC (2009) Hormone replacement therapy and cardiovascular disease revisited. *Menopause Int* 15, 55-57.
 10. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251, 788-791.
 11. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET (2000) Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 102, 2165-2168.
 12. Caulin-Glaser T, Watson CA, Pardi R, Bender JR (1996) Effects of 17 β -estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *J Clin Invest* 98, 36-42.
 13. Gerszten RE, Luscinskas FW, Ding HT, Dichek DA, Stoolman LM, Gimbrone MA Jr, Rosenzweig A (1996) Adhesion of memory lymphocytes to vascular cell adhesion molecule-1-transduced human vascular endothelial cells under simulated physiological flow conditions in vitro. *Circ Res* 79, 1205-1215.
 14. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A (1993) The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J. Pathol* 171, 223-229.
 15. Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW, Thijssen JH (2008) Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas* 61, 171-180.