

シンポジウム4 ホルモン補充療法—その基礎と臨床—

プロゲステロゲンの種類による標的臓器に対する 効果の質的・量的相違とその発現機構

京都府立医科大学助教授 北 脇 城

目 的

2002 年米国 WHI の大規模 RCT において、結合型エストロゲンと medroxyprogesterone acetate (MPA) の同時連続投与によるホルモン補充療法 (HRT) によって冠動脈性心疾患、脳卒中、肺塞栓、乳癌がプラセボに比べて増加したが、子宮内膜癌、骨折は減少したと発表され、これを受けて投与が中止された。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性が生じた。その問題点の一つとしてプロゲステロゲン (P; = 黄体ホルモン, progestin) の種類および投与方法を見直す必要があげられる。そもそも P は、エストロゲン (E) 単独投与の場合のリスクである子宮内膜癌の発生を抑制する目的で E と併用されてきた。ほとんどの大規模臨床研究では P=MPA とされ、P の種類や投与方法についてはほとんど検討されてこなかった。そこで、E のベネフィット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 P 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。しかし、P が作用する各標的臓器における薬剤別の作用の定量的な違いについてはほとんど調べられていない。そこで本研究では、新たな HRT のレジメンを決定するためのエビデンスとなりうるように、子宮内膜、骨、血管、乳腺、神経の各細胞レベルにおける各種 P の作用を検討した。

方 法

1. 子宮内膜：ヒト増殖期子宮内膜を各種 P 存在下に器官培養し、17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (17 β HSD2; 主に E₂ を E₁ に代謝) を Northern 分析と [³H]/[¹⁴C] 標識基質よりの転換率測定により解析した。

2. 骨：HOS および Saos-2 ヒト骨肉腫細胞、正

常ヒト骨芽細胞に E₂、各種 P を添加して培養し、alkaline phosphatase (AP) 活性と BrdU 取り込みを測定した。正常ヒト破骨前駆細胞に sRANKL、E₂、各種 P を添加して培養し、破骨細胞への分化を TRAP 染色により測定した。

3. 血管：ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に IL-1 β と各種 P を添加して培養し、細胞表面の接着分子の発現を ELISA で定量した。ヒト血管平滑筋細胞 (HASMC) に E と各種 P を添加して培養し、サイトカイン発現の変化を RT-PCR で測定した。流血中の白血球が血管内皮に接着することをモデル化した in vitro flow system を用い、各種 P 存在下に単層培養した HUVEC 上に白血球を流し、接着する白血球数を顕微ビデオ撮影装置によって測定した。

4. 乳腺：E 依存性乳癌細胞株 T47D, MCF-7, これに aromatase を transfect した MCF-7aro を E₂ と各種 P 存在下に培養した。細胞をリンスした後に E 活性を増強する aromatase, sulfatase (E₁S $\rightarrow$ E₁), 17 β HSD1 (E₁ $\rightarrow$ E₂), および減弱する sulfotransferase (EST; E₁ $\rightarrow$ E₁S), 17 β HSD2 (E₂ $\rightarrow$ E₁) の 5 酵素について、各々 Northern 分析と [³H]/[¹⁴C] 標識基質よりの転換率を測定した。増殖能は BrdU 取り込み法により測定した。

5. 神経：NGF により分化させたラット PC12 神経細胞を E₂ + 各種 P 存在下に前培養し、amyloid β 添加後の生存細胞数を MTT 法により測定した。

6. Progesterone (P₄) 陰坐剤：50mg の P₄ を含む陰坐剤を子宮摘出前の患者に同意を得て単回投与し、血中および組織内濃度を測定した。

成 績

1. 子宮内膜：17 β HSD2 は分泌期子宮内膜で上

昇する。器官培養したヒト増殖期内膜において、MPA, norethindrone (NET), levonorgestrel (LNG), dienogest (DNG), P_4 はいずれも濃度依存性に 17β HSD2 mRNA および活性を上昇させた。MPA が最も作用が強かった。その上昇は PR の antagonist である mifepristone により抑制されたことから、PR を介した作用であることが示された。各種 P 添加により腺細胞に核下空胞が形成され、分泌期内膜への分化が認められた。

2. 骨：HOS および Saos-2 ヒト骨肉腫細胞、正常ヒト骨芽細胞において、いずれの P も E_2 + P 同時添加により骨形成の指標である AP 活性を上昇させた。MPA が最も強かった。増殖能を示す BrdU 取り込みも上昇した。一方、骨吸収を促進する正常ヒト破骨前駆細胞の破骨細胞への分化は、 E_2 およびいずれの P でも変化がなかった。

3. 血管：動脈硬化の促進は、血管内皮表面における接着分子発現さらには血管平滑筋のサイトカイン発現と相関する。HUVEC において PR-A, PR-B, AR mRNA が発現していた。LNG, NET, MPA はこの順に濃度依存性に ICAM-1, VCAM-1 の発現を増加させた。しかし P_4 および DNG は影響しなかった。また、HASMC の PDGF, IL-1, IL-6, TGF- β 発現は、 E_2 添加により抑制されたが P の同時添加により抑制度が減少した。この作用は MPA が最も強かった。その増加は mifepristone の同時添加により抑制されたが、AR の antagonist である hydroxyflutamide では変化しなかった。次に、動脈硬化の促進には流血中の白血球が血管内皮に接着することから始まる。これをモデル化した in vitro flow system において E_2 は白血球接着を減少させ、 E_2 + MPA, E_2 + P_4 はその効果を打ち消した。

4. 乳腺：E 依存性増殖を示す乳癌組織には ER とともに aromatase も発現しており、細胞内で E 濃度を高めている。MCF-7 細胞において、 E_2 または aromatase の基質である testosterone を添加すると [3 H]thymidine, BrdU 取り込みが促進された。しかし同時に ER antagonist である ICI 182780 あるいは aromatase 阻害剤を添加すると取り込み

が抑制された。 E_2 + P 同時添加群は BrdU 取り込みを抑制したが、T47D の 17β HSD1, MCF-7 の sulfatase, MCF-7aro の aromatase の mRNA 発現, 酵素活性をともに刺激した。MPA は最も強かった。一方、各種 P は EST や 17β HSD2 を有意に変化させなかった。 E_2 + MPA 連続投与では 17β HSD1 と sulfatase の mRNA 発現, 酵素活性は時間依存性により上昇した。しかし、 E_2 投与の最後の 24/48 時間に MPA を併用する順次投与によりこれらの酵素活性の上昇は抑制された。しかし、順次投与に引き続く 24 時間の無添加期間は酵素活性を下げなかった。

5. 神経：分化した PC12 神経細胞において、 10^{-8} M E_2 は amyloid β による細胞毒性を 13% 減弱させた。この細胞毒性は、クロマチン濃縮、アポトーシス体および DNA 断片化を伴うことからアポトーシスと考えられた。ICI 182780 または各種 P の同時添加により E_2 の保護効果が減少した。

6. P_4 腔坐剤：血中濃度は投与 2 時間後にピークに達し、24 時間後にはほぼ投与前値に復帰した。子宮内膜内濃度は最高血中濃度の 5.9 倍と、組織移行が良好であった。

結 論

①子宮内膜では、いずれの P も強度の差はあるが分泌期内膜への分化を促進し、MPA が最も作用が強い。②骨では、E に加えていずれの P も増殖能を上昇させる。MPA が最も作用が強い。③血管では、動脈硬化に対して LNG, NETA, MPA は悪影響を与えるが、 P_4 , DNG は影響が弱い。④乳腺では、P は乳癌リスクを高める。MPA は最も悪影響が強い。順次投与法は、至適条件であれば連続投与法に比してリスクが軽減される可能性がある。⑤神経では、P は E のアポトーシス抑制効果を減弱させる。⑥ P_4 腔坐剤は子宮内膜に十分な組織内濃度をもたらす。

以上より、HRT において MPA 以外の適切な P を適切な投与方法で使用するにより、E のベネフィットをできるだけ損なわずにリスクを回避するレジメンが得られる可能性が認められた。