

エストロゲンの皮膚老化防御における分子機構の解明

金沢大学医学系研究科 分子移植学 (産婦人科学講座)

井 上 正 樹

Telomerase activity is present in most malignant cells and provides a mechanism for the unlimited potential for division on neoplastic cells. Although telomerase is known to be regulated by several factors, the roles of sex steroid hormones have not been understood in target tissues such as breast, uterine endometrium and skin. In the series of our studies, we have examined the effect of sex steroid hormones including estrogen, progesterone and SERM on the telomerase activity and investigated the molecular mechanism of their effects. Estrogen has up-regulated telomerase activity as well as hTERT mRNA in ER-positive cells. Gel shift and luciferase assays have revealed that estrogen-responsive element of hTERT promoter sequences is responsible for transcriptional activation by activated ER. Estrogen has also activated c-Myc expression and then it has been cleared that c-Myc/Max play additional role in estrogen-induced transactivation of hTERT. On the other hand, progesterone significantly induced hTERT mRNA expression in short-time exposure and inhibited the estrogen-induced activation of hTERT expression in long time exposure. The p21/Waf1/Cip1 played an integral role in this inhibition. SERM has up-regulated hTERT mRNA in uterine endometrial cells and down-regulated in breast cancer cells. hTERT protein was immunohistochemically detected in stem cells of the skin. The immortalized cells with normal structural and functional characteristics which we have established could be a powerful tool for the understanding of the roles of sex steroid in aging and the clinical application.

1. 緒 言

日本においては高齢化が進み、高齢者の生活習慣に関連した慢性疾患克服が国民の福利厚生上重要な課題となっている。これら疾病の予防的見地から、欧米を中心に最近では日本においても閉経後におけるホルモン補充療法が推奨されている。これらエストロゲンを主軸にした補充療法は皮膚の幼若化を促すことが臨床的に示されている。しかし、エストロゲンなどステロイドホルモンの皮膚構成細胞に与える影響、特に細胞寿命に与える効 について細胞分子レベルでの解明はなされていない。

最近の分子生物学の研究成 により、細胞の老化機構が明らかになりつつある。即ち、細胞の老化は染色体末端に存在する6塩基 (TTAGGG) の繰り返し配列 (テロメア) が細胞分裂ごとに短縮し、老化、細胞死に至るいわゆる“テロメア分子時計”により制御されている。この分子時計の制御にはテロメア - の短縮や延長が関与することが示唆されている。テロメアを延長させる酵素、テロメラーゼは細胞が増殖に際するテロメアの短縮を防ぎ、細胞に永久分裂寿命を与えうると考えられている¹⁾。

そこで、エストロゲンを初めとする女性ホルモンがテロメア・テロメラーゼ分子を介して細胞老化を刻む分子時計

に与える影響や各種ホルモン剤の相互作用を分子生物学的に調べ、中高年者の皮膚老化防止に対するホルモン治療の効、最適のホルモン剤の組み合わせやその薬剤を探ること、さらにはホルモンの生命維持機構の解明を本研究の一連の目的とする。

2. 実験と結

2. 1 hTERT プロモーターのクローニング

テロメアの伸長作用を有する酵素；テロメラーゼは3つのサブユニット (*hTR*: human telomerase RNA, *TPI*: telomerase associated protein, *hTERT*: human telomerase reverse transcriptase) からなることが明らかとなり、1997年8月には Nakamura らと Myerson らによって *hTERT*: 遺伝子がクローニングされた²⁾。さらに、1999年には蛋白発現にきわめて重要な役割を担うプロ - モーターのクローニングは世界に先駆け我々によってなされた³⁾。h TERT 遺伝子プロモーターは TATA-box と呼ばれる転 開始配列を有しCG塩基配列に極めて富んでいた (図1)。各種癌細胞や正常細胞に hTERT プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポーター遺伝子を導入して活性を調べたところ癌細胞にはテロメラーゼの転 活性が強く見られた。転 活性化に必要な部は180bpであり、c - MYC や SP1 が転 因子として作動する事も示してきた⁴⁾。

2. 2 TERT の組織学的局在

テロメラーゼ活性を担う hTERT 蛋白に対する抗体を作成し免疫染色にて蛋白の局在を調べた。皮膚組織に於いては正常の成熟角化細胞には hTERT の蛋白発現はないが、基底の顆粒細胞には癌細胞と同様の強い発現を認めた。抗



Molecular mechanism of estrogen against the senescence of skin cells.

Masaki Inoue

Department of reproductive biology, Medical science, Kanazawa University

原の発現は細胞核のみならず細胞質にも認めた (図2)。しかし、細胞質における存在の意味は現在不明である⁵⁾。若年者皮膚には蛋白発現が強い事も判明した。

2. 3 ホルモンのテロメラーゼ活性に対する影響

これまで、テロメラーゼ活性は弱いながらも血液幹細胞、消化管クレプトの幹細胞に観察されることは知られていた。我々は女性ホルモン (エストロゲンとプロゲステロ

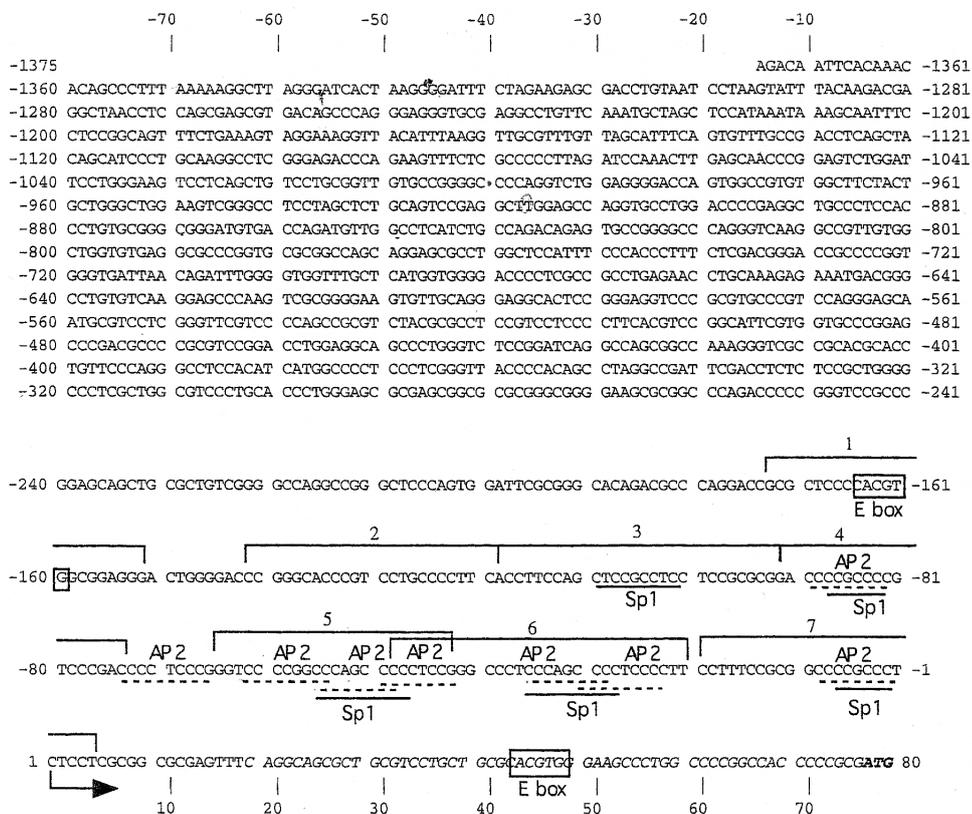


図1 hTERT プロモーターの塩基配列。CG 配列に富み TATA-box を有する。主たる転 領域には SP1、cMyc などの転 因子の結合部 が存在する。

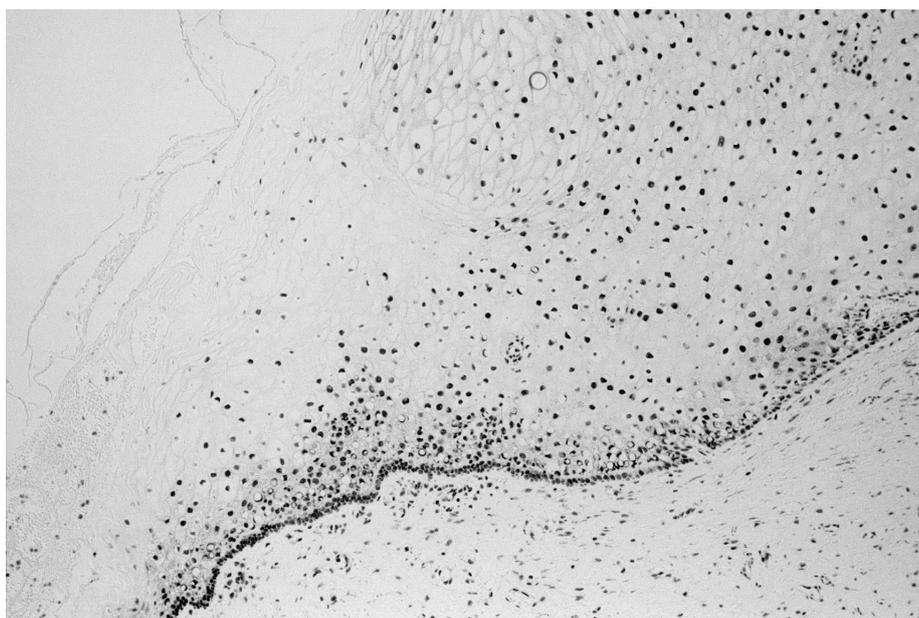


図2 上皮細胞における hTERT 蛋白の局在。hTERT 蛋白は扁平上皮細胞の顆粒層細胞 (上皮幹細胞) には発現を見るが、分化した角化層には認めない。免疫組織染色 x 33

ン) によって月経周期を惹起する子宮内膜に周期的にテロメラーゼ活性と hTERT 遺伝子の発現が同期して強く発現する事を見出した^{6,7)}。即ち、ホルモンによりテロメラーゼ活性が制御されテロメアの延長を介して細胞寿命に影響を与える事が示唆された。

そこで、エストロゲンとプロゲステロゲンの両者を発現する内膜癌細胞株 (Ishikawa 株、HEC 株) や乳癌株 (T47D) を用いてルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフト法を用いてホルモンによるテロメラーゼ活性や hTERT の制御機構を調べた⁸⁾。

エストロゲンの標的細胞である皮膚のケラチノサイト、皮下の繊維芽細胞、骨細胞、乳癌細胞、内膜癌細胞についてエストロゲン付与するとテロメア長やテロメラーゼ活性が上昇する事が判明した。ルシフェラーゼアッセイでエストロゲン受容体結合部 が hTERT プロモーター上流の約 1500pb に存在しエストロゲン添加でテロメラーゼ活性やルシフェラーゼ活性が増加する事が示された。ゲルシフトアッセイでも受容体が結合する事が確認された。即ち、エストロゲンが hTERT プロモーターに受容体を介して結合しテロメラーゼ活性を増加しテロメアを延長する事により細胞老化に抵抗性に作用する事が示された。さらに、エストロゲンは c Myc 蛋白を活性化してテロメラーゼ活性を挙げる間接的な作用も判明した。

一方、プロゲステロンは hTERT mRNA の発現を短時間では有意に誘導した。即ち、この活性増加は一過性であり、3 時間から有意に増加し 12 時間でピークに達しその後減少した。しかし、24 時間以上の長時間作用させるとプロゲステロンはエストロゲンによる hTERT 発現増強作用を抑制した。プロゲステロンによる抑制作用は MAP・ERK キナーゼインヒビターにより抑制される事が判明した。従って、プロゲステロンによるテロメラーゼ制御機構には MAP キナーゼを介する経路が極めて重要である事が明らかとなった。プロゲステロン添加により初期変化としては未知の転 因子のリン酸化を じて活性化された転 因子が作動しテロメラーゼ活性を挙げるが、晩期には P21 の誘導を じて転 因子を抑制する 2 相性の作用を有する事が明らかとなった⁹⁾。

エストロゲンと同様にエストロゲン受容体に作用して抗エストロゲン作用を有する SERM (選択的エストロゲン受容体制御因子) であるタモキシフェンは乳癌細胞株では hTERT を抑制的に、子宮内膜癌細胞株では促進的に作用する事が示された¹⁰⁾。タモキシフェンは実際に臨床的に乳癌治療薬として使用されているが、副作用として内膜癌発生が高まる事が知られている。我々の結 論は臨床的な事実に対して分子生物学的な根拠を与えるものである。これはホルモン剤が臓器によりその作用が微妙に異なる事を示しており、皮膚細胞における効 果や作用の結 論は興味ある

点である。

2. 4 エストロゲンの皮膚に対する細胞生物学的変化

文献的にはエストロゲンが皮膚の弾力性増強のために必要なコラーゲンの産生能に対する影響、皮膚の保水性維持のために必要なヒアルロン酸の分泌能、などを上昇させる事が知られているが、その分子機構には不明な点が多い。これらについてはについてホルモン受容体を有する細胞株で検討中である。純正の女性ホルモンのみならず SERM や女性ホルモン作用を有する内分泌攪乱物質いわゆる環境ホルモンについても興味ある点である。正常細胞に腫瘍抑制遺伝子を抑制した後に hTERT 遺伝子を導入すれば容易に正常機能を持つ正常不死化細胞を作る事が可能となったので¹¹⁾、皮膚細胞においても同様に不死化細胞株を樹立し、細胞レベルでのアポトーシスや増殖能、形態変化など老化との関連について今後検討する。

2. 5 紫外線や活性酸素の皮膚障害に対する効

テロメラーゼの酵素活性の中心をなす hTERT はテロメア延長を介して老化防止機能を有するのみならず、 の作用もあることが推測されている。即ち DNA 複製時の遺伝子エラーや外部刺激による遺伝子障害の修復作用である。皮膚由来の正常不死化細胞を用いて、放射線や紫外線さらには活性酸素による遺伝子障害に対する修復機構の分子メカニズムの解明と臨床応用への展開を図る予定である。癌の放射線感受性の回復や外部刺激からの皮膚の保護薬や基材の開発に道を開く可能性がある。

3. 考 察

我々の研究成 果によってホルモン特にエストロゲンがテロメラーゼ活性化機構を介して細胞寿命延長に作用する事が示された。一方、エストロゲンや黄体ホルモンなどの女性ホルモンはホルモン補充療法として既に臨床の現場で使用されている。その効 果として保水性の維持や弾力性の増加が示唆されているが、皮膚老化の側 面から分子レベルでの検討はされていない。女性ホルモンや関連物質がどのような作用を持つのか、有効性のみならず副作用を検討する上でも、これら分子機構の解明に大変興味を持たれている。我々の実証した方法で正常不死化細胞株を樹立し、それら細胞を用いた実験系でその効 果が解明されるものと期待される。

正常細胞は分裂回数が有限で、この限界状態を細胞の senescence (老化) という。この細胞老化は細胞分裂を重ねることで生じるが、分子レベルでの調節はテロメアを短縮することで成り立つ。この分子時計を巻き戻し、細胞の若々しさを維持するにはテロメラーゼを活性化させることにより可能となる。従来より、女性ホルモンは個体の発

生・発育・若年性維持に生理的な役割をなすことが知られていたが、分子レベルでの研究は進んでいない。エストロゲンの分子標的としてテロメラーゼ hTERT 遺伝子プロモーターが解析され、女性ホルモンが直接あるいは間接的に hTERT 遺伝子を制御し、テロメア長の支配を介して生命維持現象に関与する事が本研究で明らかになった (図3)。

臨床の現場ではエストロゲンが更年期後の女性にホルモン補充療法として、欧米では DHEA, 成長ホルモンや甲状腺ホルモンなどの混合薬が老化防止薬として使われ始めている現在、早急にこれらホルモン剤の分子レベルでの生命機能に関する検討は独創的で且つ時代の要請でもある。さらに、皮膚由来の正常機能を持つ不死化細胞株の樹立はコスメトロジー研究に利用できるだけでなく、将来の再生医療に利用できるものと期待される。

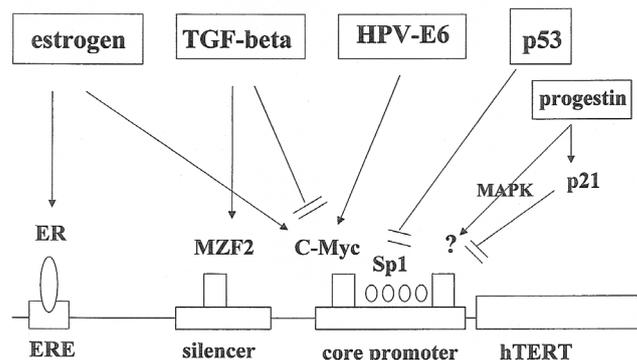


図3 hTERT の転 制御。エストロゲンを始めとした種々の転 因子が hTERT プロモーターに間接的あるいは直接的に結合して転 制御する。テロメラーゼ活性を支配する事により細胞老化を制御する。

(文 献)

- 1) Heyflick L, et al. The serial cultivation of human diploid strains. *Exp Cell Res*, 25:585-621, 1961.
- 2) Nakayama J et al. TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell*, 88:875-884, 1997.
- 3) Takakura M, et al. Cloning of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene promoter and identification proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res*. 59:551-557, 1999.
- 4) Kyo S, Inoue M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells. How can we apply them for cancer therapy? *Oncogene* 21:688-697, 2002.
- 5) Kyo S, Masutomi K, Maida Y, Kanaya T, Yatabe N, Nakamura M, Tanaka M, Takarada M, Sugawara I, Murakami S, Taira T, Inoue M. Significance of immunological detection of human telomerase reverse transcriptase. *Am J Pathol* 163:859-867, 2003.
- 6) Kyo S, Takakura M, Kohama T, Inoue M. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res*.57:610-614, 1997.
- 7) Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Wang Zhuo, Fujimoto

- K, Nishio Y, Orimo A, Inoue M. Estrogen activates telomerase. *Cancer Res*. 59:5917-5921, 1999.
- 8) Tanaka M, Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Sagawa T, Yamashita K, Inoue M. Expression of telomerase activity in human endometrium is localized to epithelial glandular cells and regulated in a menstrual phase-dependent manner correlated with cell proliferation. *Am. J. Pathology* 153: 1985-1991, 1998.
- 9) Wang Z, Kyo S, Takakura M, Tanaka M, Yatabe N, Maida Y, Fujiwara M, Hayakawa J, Ohmichi M, Koike K, Inoue M. Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression via activation of MAP kinase signaling pathway. *Cancer Res*. 60: 5376-5381, 2000.
- 10) Wang Z, Kyo S, Maida Y, Takakura M, Tanaka M, Yatabe N, Koike K, Hayakawa J, Ohmichi M, Inoue M. Tamoxifen regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression differently in breast and endometrial cancer cells. *Oncogene*, 21:3517-3524,2002.
- 11) Kyo S, Nakamura M, Kiyono T, et al. Successful immortalization of endometrial glandular cells with normal structure and functional characteristics. *Am J Pathol* 163:2259-2269,2003.