厚生科学研究費補助金

（特定疾患対策研究事業）

副腎ホルモン産生異常に関する研究班

ANNUAL REPORT OF RESEARCH PROJECT FOR DISORDERS OF ADRENOCORTICAL HORMONE PRODUCTION

RESEARCH ON SPECIFIC DISEASES,
MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE, JAPAN

平成 12 年度研究報告書

平成 13 年 3 月

主任研究者　宮 地 幸 隆

はじめに

平成 11 年度より厚生省科学研究費補助金による特定疾患対策研究事業としてスタートした「副腎ホルモン産生異常に関する研究」班は第 2 年度を迎え、引き続き(1)副腎腫瘍、(2)先天性副腎低形成（先天性アジソン病）、(3)副腎性血圧異常症、(4)ステロイドホルモン不応症　の 4 つの疾患を研究対象として設定し、この領域を専門に活躍されている分担研究者（7 人）と研究協力者（11 人）とから構成されています。平成 12 年 12 月 8 日（金）に「副腎ホルモン産生異常に関する研究」班の研究報告会を東京で開催しました。

（1）副腎腫瘍の自律的ホルモン産生機構の獲得と癌化のメカニズムについて分子生物学的手法を駆使して明らかにし、それに基ずく新しい診断法と治療法の開発を目指しました。副腎腫瘍での CYP17 の発現調節因子として COUP-TF および N-CoR の関与、ヒト HDL 受容体遺伝子 CLA-1 と menin の発現、Thrombospondin2, ステロイドホルモン合成異常が検討されました。原発性アルドステロン症の新しい診断法として ACTH および AT1 拮抗薬負荷副腎静脈採血法の有用性、治療法として副腎腺腫の腹腔鏡手術について検討がなされました。副腎偶発腫瘍の longitudinal な疫学的長期予後調査も第 2 年度の調査を継続しました。
（2）先天性副腎低形成の原因として副腎の発生・分化に関与する Ad4BP,DAX-1 などの転写調節因子の異常およびそれらの制御についての研究が行われました。
（3）副腎性血圧異常症のうちミネラルコルチコイド作用過剰による高血圧の組織障害と LOX-1 との関連、塩誘導性キナーゼ(SIK)の活性化、ミネラルコルチコイドレセプター AB 領域の 2 つの転写活性化領域などについての新しい知見が得られました。コルチゾールとコルチゾンの変換を行う 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type1 と type2 の発現が糖尿病性高血圧や下垂体でのグルココルチコイドによる negative feedback に関与していることが検討されました。また DHEA による高血圧症性心筋線維化の予防についての研究が行われました。
（4）ステロイドホルモン不応症を来す病因としてグルココルチコイドレセプターの転写調節共役因子の異常やグルココルチコイドの抗 NF-κB 作用とステロイド不応に対する新しい作動薬の検討が行われました。

以上のように本研究班で対象とした疾患の病因の解明、診断法や治療法の発展、副腎ホルモンの合成および作用について分子生物学的研究など多くの成果があげられました。本研究班の目標に向かってこの 1 年間ご尽力頂きました分担研究者および研究協力者の方々にこころから感謝致しますとともに、多くの御助言を頂きました厚生労働省健康局疾病対策課の方々に厚く御礼申し上げます。

平成 13 年 4 月 5 日　　　　主任研究者　宮地幸隆

目次

総括研究報告 …………………………………………………… 1

主任研究者　宮地幸隆

分担研究報告

（1）ステロイドホルモン受容体

1．　転写制御因子 AP-1 とグルココルチコイド受容体の相互排他的抑制の機構 ………… 5

東京大学医科学研究所　伊庭英夫

2．　作用分離型グルココルチロイド薬創成に関する研究 ………………………… 8

東京大学医科学研究所先端医療研究センター　田中廣壽

3．　ミネラルコルチコイドレセプターの転写制御メカニズムの解明 ………………… 12

東京大学分子細胞生物学研究所分子系統研究分野　加藤茂明

（2）副腎性高血圧

4．　Dehydroepiandrosterone（DHEA）による心筋線維化抑制の検討 ………………… 21

横浜市立大学医学部第三内科　関原久彦

5．　ACTH 連続負荷・アンギオテンシンIIタイプ1(AT1)受容体拮抗薬投与下
副腎静脈サンプリング法の妥当性の検討 ………………………………… 25

京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学　伊藤　裕

6．　本邦における 17α-hydroxylase 欠損疾患者の CYP17 遺伝子解析 ………………… 33

九州大学大学院医学系研究院病態制御内科（第三内科）　名和田　新

7．　副腎性高血圧における食事性カリウムの効果 ………………………………… 38

東京大学大学院医学系研究科内科　藤田敏郎

（3）11β-hydroxysteroid dehydrogenase

8．　ストレプトゾトシン糖尿病における 11β-hydroxysteroid dehydrogenase の解析 ………43

浜松医科大学小児科　大関武彦

9．　非機能性・preclinical Cushing 症候群副腎腺腫における 11β-hydroxysteroid
dehydrogenase タイプ2の発現増加 ………………………………………… 49

岐阜大学医学部第三内科　安田圭吾

10．　下垂体組織における 11β-hydroxysteroid dehydrogenase の発現に関する免疫組
織化学的検討 ……………………………………………………………… 57

東邦大学医学部第一内科　宮地幸隆

（4）副腎腫瘍
11．　アンドロゲン産生副腎皮質癌のステロイド産生能 …… 61
横浜労災病院内科　西川哲男
12．　褐色細胞腫に対する腹腔鏡手術 …… 66
大阪大学大学院医学系研究科臓器制御外科学講座（泌尿器科学）　奥山明彦
13．　副腎腫瘍における Thrombospondin 発現の検討 …… 71
福井医科大学第三内科　宮森　勇
14．　副腎皮質腫瘍における自律的ホルモン産生能に関する研究 …… 76
慶應義塾大学医学部内科　猿田享男

（5）副腎の発生分化
15．　変異 DAX-1 遺伝子の機能解析 …… 83
旭川医科大学医学部小児科　藤枝憲二
16．　副腎皮質形成過程における核内受容体の機能に関する研究 …… 88
岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所　諸橋憲一郎
17．　副腎ホルモン産生における転写因子 menin の役割について …… 93
香川医科大学第一内科　高原二郎
18．　胎児副腎におけるステロイド合成酵素の免疫組織化学的検討 …… 99
東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理学講座 病理診断学分野　笹野公伸
19．　塩誘導性キナーゼ SIK によるステロイドジェネシスの調節機構 …… 116
大阪大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学講座　岡本光弘

副腎偶発腫瘍全国調査（2 年目） …… 127
東邦大学医学部第一内科　宮地幸隆

研究成果の刊行に関する一覧表 …… 131

研究班構成員名簿 …… 149

総括研究報告

総括研究報告

1. 研究目標

厚生科学研究費補助金による特定疾患対策研究事業として平成11年度より副腎ホルモン産生異常に関する研究班の編成が認められ第2年度を迎え多くの立派な研究成果が得られました。この班として、次に示す.副腎ホルモンの産生並びに作用に異常を示す疾患の病態を明らかにし、それに基ずく新しい診断法と治療法の開発を研究目標としました。

(1) 副腎腫瘍：副腎偶発腫瘍の中に副腎癌、悪性褐色細胞腫、preclinical クッシング症候群などが含まれるが、その診断法、治療法は確立されていない。癌抑制遺伝子、細胞増殖遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、細胞周期蛋白などの異常による癌化のメカニズムと核内オーファンレセプター、Zog遺伝子や副腎ホルモン合成酵素異常などを伴う自律的ホルモン産生機構を研究する。副腎偶発腫瘍についての第1年度の疫学的長期予後調査の成績を集計し、ホルモン分泌能や手術の有無、病理診断について第2年度の調査を継続していく。

(2) 先天性副腎低形成：副腎の発生分化はAd4BP,DAX-1などの転写調節因子が整然と発現し遺伝子が活性化されることにより始まる。Ad4BP異常症, DAX-1異常症、ACTHレセプター異常症、病因不明の先天性副腎低形成などの病因を解明し治療法の確立を目指す。

(3) 副腎性血圧異常症：副腎性血圧異常症の中で偽性アルドステロン症、特発性アルドステロン症、偽性低アルドステロン症の病態を解明する。副腎性血圧異常と関連する11βHSD2の各組織での局所的重要性、糖尿病性高血圧及び漢方薬投与時の電解質異常と11βHSD2遺伝子変異及び偽性低アルドステロン症におけるミネラルコルチコイドレセプター（MR）遺伝子変異などを明らかにする。原発性アルドステロン症はその多くが本態性高血圧症として見逃されている可能性があるので、診断法の再検討を行う。

(4) ステロイドホルモン不応症：ステロイドホルモン不応症の一部にグルコココルチコイドレセプター（GR) を修飾するcofactorの異常が明らかになってきており、またGRやGR mRNAのdown regulation、機能を持たないGRβの意義やGRのレドックス状態とステロイドホルモン不応との関連を解明し、新しい観点からの治療法を開発する。

2. 研究の成果

副腎ホルモン産生異常に関する研究班の平成12年度の研究報告会を平成12年12月8日東京において行い、分担研究者ならびに研究協力者の研究成果について発表を行った。発表終了後評価小委員会を開催した。以下に研究成果の概要について述べる。

(1) 副腎腫瘍

副腎皮質腫瘍の自律的ホルモン産生能を獲得する機序の一つとして核内オーファンレセプターCOUP-TF,DAX-1,SF-1の発現異常が示された。ヒト副腎皮質腫瘍のうちCYP17発現過剰を示すコルチゾール産生腺腫では17α hydroxylase 活性高値、17,20lyase活性低値,COUP-TF,DAX-1発現は低下し、CYP17の発現のないデオキシコルチコステロン産生腺腫では17α hydroxylase 活性低値、17,20lyase活性低値を認め,DAX-1の過剰発現とSF-1の発現低下を認めた。副腎皮質腺腫の自律的ホルモン産生能獲得に核内オーファンレセプターCOUP-TF,DAX-1,SF-1の関与が示された。(猿田)

Thrombospondin2(TSP2)は副腎球状層・束状層に発現する細胞外マトリックス蛋白

であり、ACTHにより発現が制御され、ウシでは副腎皮質細胞の遊走化を担う。正常副腎、非機能性副腎腫瘍、クッシング症候群の副腎腫瘍組織でTSP2遺伝子が同程度に発現されており、アルドステロン産生腺腫では約３倍に発現増加しており、TSP2は副腎の発生のみならずアルドステロン産生腺腫の発生にも関与することが示唆された。(宮森)

副腎皮質腫瘍は多発性内分泌腺腫症１型(MEN1)に伴って発生することが比較的多い。MEN1の原因遺伝子meninはCushing症候群を示す副腎皮質腫瘍に強く発現しており、meninはヒトHDL受容体であるCLA-1の発現を調節してCLA-1を介するコレステロールの供給を活性化しステロイドホルモン産生を高めることが考えられる。(高原)

アンドロゲン産生副腎皮質癌のステロイド分泌の特徴では、p-450scc, p-450c17, p-450c21の活性低下、３βHSDは低下ないし不変で、これらの酵素活性はACTHあるいはHCGの調節下にある。アンドロゲン産生自律機構の原因として酵素活性の偏奇性が存在していることが明らかになった。(西川)

各種副腎皮質腫瘍の11βhydroxysteroid dehydogenase type 1(11βHSD1) および type 2(11βHSD2)の発現量は腎臓と比べてそれぞれ約15%,5%であった。11βHSD1は非機能性、preclinical Cushing, Cushing症候群の腺腫で発現量に差がなかったが、11βHSD2は非機能性、preclinical腺腫で増加しており、これらの疾患では分泌されたコルチゾールが11βHSD2により不活化され症状がでにくいことが示された。(安田)

原発性アルドステロン症は近年全高血圧患者の約10%という高頻度であることが示された。しかしこれまでの標準的な方法では診断が困難で、ACTH連続負荷・AT1受容体拮抗薬投与下の副腎静脈サンプリングで局所診断が可能になった症例が示された。(伊藤)

副腎皮質腫瘍の腹腔鏡手術として、副腎皮質良性腫瘍はよく行われるが褐色細胞腫は適応外との意見もある。しかし褐色細胞腫の腹腔鏡手術は解放手術と同程度に安全でしかも侵襲の少ない有用な治療法であることが示された。(奥山)

副腎偶発腫瘍の疫学調査の第1年度の集計では2576例の報告があり副腎偶発腫瘍の定義に当てはまるものは2106例であった。このうち非機能性腺腫が50.3%を占め、副腎癌は1.6%であった。非機能性腺腫のうち約60%で副腎の摘出手術が行われていた。今後副腎偶発腫瘍の診断指針と治療指針を早急に確立すべきと思われる。

副腎腫瘍については腫瘍化や自律的ホルモン産生獲得のメカニズムおよび臨床的に新しい診断法の確立について多くの成果が得られた。

(2)　先天性副腎低形成(先天性アジソン病)

副腎低形成の原因遺伝子として同定されたDAX-1の機能はAd4BP/SF-1に対する抑制作用である。DAX-1の抑制活性を担う領域はアミノ末端側に存在する3回半の繰り返し配列で、コアクチベーターのLXXLLモチーフを介して、オーファンレセプターのAd4BP/SF-1と相互作用をすることを明らかにした。(諸橋)

先天性副腎低形成と診断された男児17家系21症例のDAX-1遺伝子解析を行い3つのナンセンス変異(Y91X, Y271X, Q395X), ３つのフレームシフト変異(151delAG, 935delC, 1376delATinsG), ５つのミスセンス変異(V269D, L278R, W291C, K382N, L466R)を同定した。変異DAX-1は本来のDAX-1によるＳｔAR遺伝子発現抑制能を低下させることを明らかにした。(藤枝)

先天性副腎過形成の一病型である17αhydroxylase欠損症のうち非定型的に生理を有する女性例ではCYP17遺伝子のPhe53あるいは54欠失変異を、高血圧を認めない症例では翻訳開始Metの変異を認めた。前者の症例は性腺機能不全症状は比較的軽度であることから低レニン性本態性高血圧女性患者群や不妊群でこの変異の保有者の存在が推定される。(名和田)

胎児副腎の発育におけるステロイド合成酵素のAd4BP, StAR, P450scc, P450c17, 3βHSD, P450c21, DHEA-ST, P450 oxidoreductase およびcytochrome b5などの発現を免疫組織化学的に検討した。胎児副腎では全妊娠期間を通じて胎児層、移行層においてDHEAの産生を行い、23週以後は移行層においてコルチゾールが、成人層においてアルドステロンが産生されることが示された。(笹野)

先天性副腎低形成(先天性アジソン病)について副腎の発生や分化と関連する遺伝子の異常やステロイド合成酵素の異常を明らかにすることができた。

(3) 副腎性血圧異常症

副腎性高血圧のうち鉱質コルチコイド(DOCA)食塩高血圧ラットに8%KCLを投与することにより腎障害を軽減し、腎臓における内皮型新規酸化LDL受容体LOX-1の発現増強を軽減し、酸化ストレスの指標である血中8-iso-$PGF_2\alpha$高値を改善した。食事性カリウム摂取は鉱質コルチコイド高血圧の臓器障害の軽減に有用であることを示した。(藤田)

食塩食投与で副腎皮質に特異的に誘導されるタンパク質リン酸化酵素であるSIK(塩誘導性キナーゼ)はCYP11Aのプロモーター領域に存在するcAMP responsive element(CRE)を介した遺伝子の転写調節を行い、副腎皮質におけるACTH/cAMP/PKA情報伝達系を介するステロイド生合成を調節することが明らかになった。(岡本)

糖尿病において高血圧の合併が見られる。ストレプトゾトシン糖尿病ではコルチゾールを不活性型のコルチゾンに転換する酵素11βHSD2の遺伝子発現と酵素活性が減少しており高血圧の発症と極めて関連が深い。糖尿病が重症になるにつれ11βHSD2活性はさらに低下し、11βHSD1活性は増加した。(大関)

11βHSD1と11βHSD2およびグルココルチコイドレセプター(GR)の下垂体内の存在について免疫組織化学的に検討した。正常ヒト下垂体corticotrophには11βHSD1は認められなかったが、一方Cushing病の下垂体腺腫には11βHSD1とGRが存在しておりコルチゾンを活性型のコルチゾールに局所で変換しグルココルチコイドのnegative feedbackに影響を及ぼしていることが考えられた。(宮地)

体内の電解質代謝に中心的な役割を果たすミネラルコルチコイドの受容体のN末端側AB領域の恒常性転写促進領域(AF1)を同定し、2つの領域AF1a(1-169aa), AF1b(451-600aa)があることを証明し、さらにAF2coactivator のうちTIF2, p300のみがAF1の転写を活性化することを明らかにした。(加藤)

自然発症高血圧ラットでDHEA投与が血圧を変化させることなく心筋の線維化を抑制し、DHEAあるいはその代謝物による作用と考えられた。(関原)

副腎性血圧異常症は高血圧症の病因として常に考慮する必要があり、治療を考えるうえでも重要であることが示された。

(4) ステロイドホルモン不応症

グルココルチコイドと他のグループに属する転写制御因子のAP-1(c-Fos/c-Jun heterodimer)との間の相互排他的阻害効果は両者がクロマチン構造変換因子SWI/SNFと競合的結合阻害することによることを明らかにした。(伊庭)

胆汁酸製剤であるウルソデオキシコール酸はグルココルチコイドレセプターをDNA結合型に活性化しまたグルココルチコイド依存性に抗NF-κB作用を有している。これらの研究は作用選択的グルココルチコイドレセプター作動薬開発の分子基盤を提供すると考えられる。(田中)

グルココルチコイドの未知の分子生物学的作用機序が解明されつつあり、新しい観点からのグルココルチコイド療法も視野に入り出してきた。

分担研究報告

（1）ステロイドホルモン受容体

転写制御因子 AP-1 とグルココルチコイド受容体の相互排他的抑制の機構

伊庭　英夫
東京大学・医科学研究所

研究要旨
本研究はグルココルチコイドレセプターと他のグループに属する転写制御因子 AP-1 (c-Fos/c-Jun ダイマー)との間の相互排他的な阻害効果の分子機構を追求した。その結果両転写制御因子が、クロマチン構造変換因子 SWI/SNF と互いに競合的に結合してその活性を抑制し合う可能性が示唆された。

A. 研究目的

副腎で分泌される多種のステロイドホルモンの生理作用は主としてその受容体タンパク質を介しているものと考えられるが、これらの転写制御因子とは別のグループに属する転写制御因子 AP-1(Fos ファミリータンパク質と Jun ファミリータンパク質から形成される)との間に見られる相互排他的な抑制作用もこの生理作用の細胞特異性、多様性に大きく関与するものと考えられる。本研究は転写制御因子 AP-1 とグルココルチコイドレセプターを例に取り、AP-1 の側からこの相互作用の分子機構を追求することを目的とする。同時にその解析に用いるヒト培養細胞に対する遺伝子導入法として VSV-G シュードタイプレトロウイルスベクター系を開発・確立していく。

B. 研究方法

(1)　AP-1 に結合するタンパク質の検索

我々はすでに酵母 two ハイブリッド法を用いて c-Jun の転写活性化ドメインと結合する遺伝子を検索した。その結果、転写活性化に関してホルモンレセプターと競合する可能性のある遺伝子を研究対象に選びその分子の機能解析を進める。(2)　VSV-G シュードタイプウイルスの産生系の樹立とヒト由来固形癌由来細胞への遺伝子導入

これまでに我々は VSV-G シュードタイプウイルスベクターを安定して産生するパッケージ細胞を作製している。このウイルスベクターに癌抑制遺伝子をいれ、それを種々のヒト固形癌由来細胞に対して導入して、癌抑制効果等があるか否を検証する。

C. 研究結果

(1) AP-1 に結合するタンパク質の検索

酵母 two ハイブリッド法により c-Jun 結合タンパク質としてクロマチン構造変換因子 SWI/SNF 複合体の 1 サブユニット BAF60a

を検出した。これは c-Jun と強く結合するものの、その他の Jun ファミリータンパク質である JunB や JunD との結合性は弱い。また驚いたことに Fos ファミリータンパク質の c-Fos タンパク質と結合活性を有し、他の Fos ファミリータンパク質とは結合しなかった。また BAF60a は c-Fos/c-Jun ダイマーを同時に結合できることもわかった。グルココルチコイドレセプター（GR）の転写活性化能に SWI/SNF 複合体が関わっている事が最近報じられていることから、AP-1（この場合は c-Fos/c-Jun）とグルココルチコイドレセプターがこの SWI/SNF と互いに競合的に結合してその活性を抑制し合う可能性が示唆された。

(2) VSV-G シュードタイプレトロウイルスベクターのヒト由来固形癌由来細胞への導入

新しいウイルス産生系を用いて作製したベクターを使って以下のような結論が得られた。

1. 転写制御因子 AP-1 の活性を General に阻害する Dominant negative 変異体 supjunD-1 の発現ベクターを、高 MOI で一回のトランスダクションで導入すると、ほとんど全てのヒト固形癌由来細胞株の軟寒天中でのコロニー形成を高い効率で抑制することが可能であった。
2. ヒト、マウス、ニワトリ由来の幅広に細胞種に効率の良い伝子導入が可能で、同じベクターがヒト以外の種を対象とした基礎研究やモデル動物にも使用できることが示された。

D. 考察

AP-1 と GR の両転写因子は SWI/SNF 複合体中の異なったサブユニットを介して相互作用する可能性がある。この分子が相互排他的抑制作用を担う key 分子である可能性がある。ウイルスベクターの開発もほぼ予定通り進んだ。

E. 結論

SWI/SNF 複合体が c-Fos/c-Jun ダイマー同時に結合できる因子として固定された。今後この SWI/SNF と GR との相互作用の詳細を検討し、GR と結合能をもつ SWI/SNF 複合体中のサブユニットを同定したい。その解析にはウイルスベクターを効果的に使用する。

F. 論文発表

1. Kameda, T., Koike,C., Saitoh, K., Kuroiwa, A. and Iba, H. Analysis of cartilage maturation using micromass cultures of primary chondrocytes. Dev. Growth Differ. 42:229-236, 2000.
2. Narita, T., Saitoh, K., Kameda, T., Kuroiwa, A., Mizutani, M., Koike, C., Iba, H. and Yasugi, S. BMP2 are necessary for stomach gland formation in the chicken embryo: A study using virally induced BMP-2 and Noggin expression. Development 127:981-988, 2000.
3. Sukegawa, A., Narita, T., Kameda, T., Saitoh, K., Nohno, T., Iba, H., Yasugi, S.

and Fukuda, K. The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epitherium. Development 127:1971-1980, 2000.

4. Ui, M., Mizutani T., Takada, M., Arai, T., Ito T., Murakami, M., Koike , C., Watanabe, T., Yoshimatsu, K., and Iba, H. Endogenous AP-1 levels necessary for oncogenic activity are higher than those sufficient to support normal growth. Biochem. Biophys. Res. Commun. **in press**

5. Ito, T., Yamauchi M., Nishina, M., Yamamichi, N., Mizutani, T., Ui, M., Murakami, M., and Iba, H. Identification of SWI/SNF complex subunit BAF60a as a determinant of transactivation potential of Fos/Jun diners. J. Biol. Chem. **in press**

6. Fukuda, K., Sakamoto, N., Narita, T,. Saitoh, K., Kameda, T., Iba, H. and Yasugi, S Application of efficient and specific gene transfer system and organ culture tequniques for the elucidation of mechanisms of epithelial mesenchymal interaction in the developing gut Dev. Growth Differ. 42 :207-211, 2000

7. Iba, H. Gene transfer into chicken embryos by retrovirus vectors Dev. Growth. Differ 42:213-218, 2000

8. Iba, H., Arai, T. and Ui, M. A new strategy for efficient production of VSV-G-pseudotyped retrovirus vectors using stable packaging cell lines Bio Techniques Books pp401-411.

作用分離型グルココルチコイド薬創成に関する研究
― ウルソデオキシコール酸によるグルココルチコイドレセプター (GR) 活性化と NF-κB 応答性遺伝子発現の抑制 ―

田中 廣壽[1,2]、三浦 貴徳[3]、吉川 賢忠[1]、大内田 理佳[1]、牧野 雄一[1]
[1]東京大学医科学研究所先端医療研究センター免疫病態分野
[2]東京大学医科学研究所附属病院 内科
[3]旭川医科大学第二内科

研究要旨
作用選択的グルココルチコイドレセプター (GR)作動薬開発の分子基盤を構築することを目的とした。胆汁酸製剤として現在臨床医学領域において使用されているウルソデオキシコール酸は GR を DNA 結合型に活性化して核に移行させるものの転写活性化作用を誘導しなかった。しかし、UDCA は GR 依存性に抗 NF-κB 作用を有していた。したがって、UDCA の作用機構を究明することは作用選択的 GR 作動薬開発に貢献する可能性があると考えられる。

A. 研究目的

副腎皮質ステロイド薬であるグルココルチコイドは、生理的には視床下部一下垂体一副腎系のエフェクター分子として、糖脂質代謝、心血管系、水電解質代謝、免疫系など多くの生体システムの制御にきわめて重要な働きをしている。その作用はヒトにおいてすべての有核細胞に存在するグルココルチコイド受容体 (GR) を介して発現する。GR は核内受容体ファミリーの代表的タンパクであり、DNA と結合して正に転写を調節する以外にもタンパク-タンパク相互作用など様々な方法で他の細胞内情報伝達系と密接にクロストークしているらしい。ここで、免疫抑制作用、抗炎症作用はじめ薬理学的に重要なグルココルチコイド作用の多くはこのような転写レベルにおけるタンパク-タンパク相互作用からも理解可能である。なかでも、AP-1 や NF-κB と GR の相互作用はグルココルチコイドによる情報伝達系と増殖因子、サイトカイン、接着分子などによる情報伝達系のクロストークの分子機構を理解するうえで重要といえる。ここで、われわれはすでに、胆汁酸製剤であるウルソデオキシコール酸 (UDCA)が GR をリガンド非存在下においても核に移行させることを見い出している。そこで、UDCA をプロトタイプ化合物として、グルココルチコイドのこれらの薬理作用を副作用と分離して選択的に発現させる薬剤の開発のための分子基盤

を構築することを目的とした。

B. 研究方法

GR の DNA 結合実験はグルココルチコイド応答性 DNA 配列（GRE）を含むオリゴヌクレオチドをプローブとしたゲルシフトアッセイによった。GR と hsp90 の相互作用は免疫沈降法によって観察した。GR の細胞内局在は、免疫蛍光抗体法、green fluorescent protein (GFP)融合タンパク発現系を用いて検討した。GR の転写活性化作用は GRE 配列の下流にルシフェラーゼの cDNA を有するレポータープラスミドを用いたトランジエントトランスフェクションによって測定した。GR の抗 NF-κB 作用は phorbor myristate ester (PMA)刺激下の NF-κB 応答性レポーター遺伝子の発現に与える効果から検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は試験管内実験および培養動物細胞を用いたものであり、その意味において倫理面への配慮は特に必要無いものと考えられる。なお、遺伝子組み換え実験に関して機関承認を得ていることを付記する。

C. 研究結果・考察

1. UDCA は GR を核に移行させた。その作用は濃度依存性であり、200 μM の場合約 6 時間で約 70％の細胞で GR は核に局在した。
2. UDCA 存在下で核移行した GR は DNA 結合型であった。GRE 依存性転写活性に与える UDCA の効果は、合成グルココルチコイドであるデキサメタゾンに比してきわめて弱かった。しかし、抗 NF-κB 作用はデキサメタゾンとほぼ同等であった。
3. UDCA による抗 NF-κB 作用のメカニズムを解析した結果、IkBα のリン酸化とユビキチンープロテアソーム依存性タンパク分解、p65/p50 の核移行、p65/p50 のタンパク量には変化がなかった。
4. UDCA のかかる抗 NF-κB 作用発現にあたっては GR 依存性と非依存性の二つの経路があることが示唆された。GR 依存性経路に関し、UDCA は核において GR と NF-κB の相互作用に何らかの影響を与える可能性が示唆された。
5. 各種 GR の変異体を用いた解析から、UDCA の作用部位は GR のリガンド結合領域であり、しかも、たとえばデキサメタゾンの作用部位とは明らかに異なっていた。

D. 結論

UDCA は作用選択的 GR 作動薬のプロトタイプであり、その作用機構を今後解析することによってよりすぐれた薬剤の開発に貢献できる可能性がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Pilar Carrero, Kensaku Okamoto, Pascal Coumailleau, Sallyann O'Brien, Hirotoshi Tanaka, and Lorenz Poellinger
Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-Binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1α.
Mol. Cell. Biol. 2000; 20(1): 402-415.

2) Chikao Morimoto, Hiroshi Kobayashi, Rikako Nishijima, Hiritoshi Tanaka, Satoshi Iwata.
Role of β1integrin molecule in T-cell activation and migration.

Mod. Rheumatol. 2000;10(1):8-15

3) Yasuhiko Munakata, Satoshi Iwata, Jorg Dobers, Tomonori Ishii, Mamoru Nori, Hirotoshi Tanaka, Chikao Morimoto.
Inhibitory Effects on Proinflammatory Cytokine Production and Transendothelial Migration of T Cells.
Arthritis Rheum. 2000;43(7):1616-1623

4) Hideto Ikushima, Yasuhiko Munakata, Tomonori Ishii, Satoshi Iwata, Masazumi Terashima, Hiritoshi Tanaka, Stuart F. Schlossman, Chikao Morimoto.
Internalization of CD26 by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor contributes to T cell activation.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 2000;97(15):8439-8444

5) Hirotoshi Tanaka, Yuichi Makino, Kensaku Okamoto, Takahisa Iida, Noritada Yoshikawa, Takanori Miura.
Redox regulation of the nuclear receptor.
Oncology 2000;59(suppl 1):13-18.

6) Takahisa Iida, Yuichi Makino, Kensaku Okamoto, Noritada Yoshikawa, Isao Makino, Tetsuya Nakamura, Hirotoshi Tanaka.
Functional modulation of the mineralocorticoid receptor by cisdiamminedichloroplatinum(II)
Kidney Int. 2000;58(5):1450-1460

7) Hetti Poukka, Ulla Karvonen, Noritada Yoshikawa, Hirotoshi Tanaka, Jorma J. Palvimo, Olli A. Janne.
The RING finger protein SNURF modulates nuclear trafficking of the androgen receptor
J. Cell. Sci. 2000;113(11):2991-3001

8) Kiyoshi Migita, Hirotoshi Tanaka, Kensaku Okamoto, Noritada Yoshikawa, Yasufumi Ichinose, Satoshi Urayama, Satoshi Yamasaki, Hiroaki Ida, Yojiro Kawabe, Atushi Kawakami, Katsumi Eguchi.
FK506 augments glucocorticoid-mediated cyclooxygenase-2 down-regulation in human rheumatoid synovial fibroblasts.
Lab. Invest. 2000;80(2)135-141.

9) Toshio Homma, Osamu Hosono, Satoshi Iwata, Susumu Ando, Katsutoshi Sasaki, Tatsunari Nishi, Hiroshi Kawasaki, Hirotoshi Tanaka, Chikao Morimoto.
Recognition of cell surface GD3 by monoclonal antibody anti-6C2 in rheumatoid arthritis synovial fluid. Expression on human T cells with transendothelial migratory activity.
Arthritis Rheum. (in press)

10) Noriaki Shimizu, Kotaro Sugimoto, Jianwei Tang, Takeyuki Nishi, Iwao Sato, Masaki Hiramoto, Shin Aizawa, Mamoru Hatakeyama, Reiko Ohba, Hideaki Hatori, Tatsufumi Yoshikawa, Fumiko Suzuki, Akira Oomori, Hirotoshi Tanaka, Haruma Kawaguchi, Hajime Watanabe, Hiroshi Handa.
High-performance affinity beads for identifying drug receptors.
Nature Biotechnology 2000;18(8):877-881

11) Naoki Maruyama, Fuminori Hirano, Noritada Yoshikawa, Kiyoshi Migita, Katsumi Eguchi and Hirotoshi Tanaka
Thrombin Stimulates Cell Proliferation in

Human Fibroblast-like Synoviocytes in
Nuclear Factor-kB Activation and Protein
Kinase C Mediated Pathway
J Rheumatol 2000;27(11):2777-85

ミネラルコルチコイドレセプターの転写制御メカニズムの解明

加藤　茂明
東京大学分子細胞生物学研究所

【研究要旨】
ミネラルコルチコイドレセプター(MR)のN端側AB領域の恒常性転写促進領域(AF1)の存在部位を同定したところ2つの領域 AF1a(1-169aa), AF1b(451-600aa)があることが判明した。既知の AF2coactibvator の内 TIF2, p300 のみが AF1 の転写活性を上昇させることが判明したが、それらの直接の結合は in vitro 実験や yeast two hybrid assay にても認められないことから未知の因子がそれらを仲介していることが示唆された。さらに、HeLa 核抽出液より GST-AF1a に結合する因子をタンパク精製にて取得したところ HAT 活性を有する複合体が認められ、その中に p300 と complex を作るとされている RNA helicase A が認められた。その他にも hSNF2h なども認められ、まだまだ別の complex が転写に影響していることが判明した。

A.研究目的

ミネラルコルチコイドは生体内の電解質代謝に中心的な役割を果たし、各種代謝疾患に深く関わっている。その作用は核内に局在する核内受容体(MR)を介し、標的遺伝子群の発現制御を介すると理解されるようになった。本研究ではMRの転写因子としての性状及び共役する補助因子群の検索を目的とする。

B.研究方法

1:AF1 転写活性化領域の同定

MR の A/B 領域の deletion mutant を作製し、それぞれの活性を CAT assay にて測定した。同時にその deletion mutant の発現量を check した。

2:既知の転写共役因子の AF1 転写活性化への関与の測定

既知の転写共役因子の内 p160family に含まれる SRC1, TIF2, AIB1 と p300 について AF1 転写活性化能を上昇させるかを測定した。また実験 3 で同定したこの転写活性化領域のいづれを活性化するのかを明らかにした。

3:Baculo virus 発現系を用いた MRAF1 タンパクの作成とそれを用いた HeLa 細胞核抽出液からの interacting protein の精製

3 にて同定した 2 つの AF1 存在領域の内 N 末端の 1－169aa.部分の GST 融合タンパクを Baculo virus 発現系を用いて作成し、それに結合するタンパクを HeLa 細胞核抽出液より精製する。

4:結合因子の同定

得られたタンパクの band を protease digestion し、MALDI-TOF-MS を用いた mass fingerprinting にて同定する。

(倫理面への配慮)

使用している生物材料は培養細胞であり、倫理面への配慮は必要ないと考えられる。

C.研究結果

1:AF1 転写活性化領域の同定

作成した deletion mutant の活性を CAT assay にて測定することにより N 端 1-170a.a.に AF1a ,450-600a.a.に AF1b という 2 箇所の転写活性化領域が存在することが判明した(Fig. 1)。

2:既知の転写共役因子の AF1 転写活性化への関与の測定

CAT assay にて MR 全長では既知の転写共役因子は転写活性化能があるものの AF1 活性を上昇させるのは TIF2, p300 のみであることが判明した。またそれらは MRAF1 と直接は結合しないことが GST pull down などから明らかになった。

3:Baculo virus 発現系を用いた MRAF1 タンパクの作成とそれを用いた HeLa 細胞核抽出液からの interacting protein の精製

AF1a に結合する因子群は complex を形成しており、その complex は HAT activity を持っていることが
明らかになった(Fig. 2,3)。

4.結合因子の同定

結合するする因子群の中に p300 と結合する RNA helicase A が存在することが明らかになった(fig. 4)。

D.考察

転写共役因子群は近年 complex を形成しており、それらを compex ごととってくることが重要と考えられている。今回取得した AF1a interacting compex はまだまだその精製手法などに改良の余地はあるもののHAT activity を有するものがとれており、AF1 にも転写共役因子 compex が結合していることは明らかと考えられる。今後今回取得された RNA helicase A につきさらに解析を進めていきたい。

E.結論

MR の AF1 の存在部位を同定したところ 2 つの領域 AF1a(1-169aa),AF1b(451-600aa)があることが判明した。

HeLa 核抽出液より GST-AF1a に結合する因子をタンパク精製にて取得したところ HAT 活性を有する複合体が認められ、その中に p300 と complex を作るとされている RNA helicase A が認められた。その他にも hSNF2h なども認められ、まだまだ別の complex が転写に影響していることが判明した。

F.研究発表

1.論文発表

1. Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Arao, Y., Suzawa, M., Kobayashi, Y., Ogawa, S., Yano, T., Yoshikawa, H., Masuhiro, Y., Kato, S.: A subfamily of RNA binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor α