

ルドステロン産生腺腫でのみ認められ、それぞれ負と正の関係であった(図4および図5)。

【考察】

今回初めて、正常副腎、副腎腫瘍における TSP1 と TSP2 の発現が確認された。また、アルドステロン産生腺腫組織内では TSP2 発現が正に調節されていることから、ヒト副腎組織内においてもその発現調節に ACTH が強く関与しているものと推測された。副腎における TSP1 発現の意義は明らかではないが、ACTH 作用により TSP1 から TSP2 へのクラススイッチが生じていた可能性がある。

TSP2 は ACTH 作用として知られている副腎皮質細胞の遊走化を担っていることから、centripetal migration にも関与し得ると考えられている。TSP2 の発現は球状・束状層へ局在していることから、副腎の発生のみならず、副腎腫瘍(特にアルドステロン産生腺腫)の産生機構にも関与し得ると推測された。

【研究発表】

1.論文発表

- 1) Hatakeyama H, Inaba S, Miyamori I: 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in human aortic smooth muscle cells. *Hypertens. Res.* 2001 Jan; 24 (1): 33-37
- 2) Hatakeyama H, Inaba S, Naomi Taniguchi, Miyamori I: Functional ACTH Receptor in Cultured Human Vascular Endothelial Cells: Possible Role in the Ca^{2+} control of Blood Pressure. *Hypertension* 2000 Nov; 36(5): 862-865
- 3) Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Miyamori I, Mabuchi H: Cardiac aldosterone production in genetically hypertensive rats. *Hypertension* 2000 Oct; 36(4): 495-500
- 4) Takeda Y, Inaba S, Furukawa K, Fujimura A, Miyamori I, Mabuchi H: Effects of chronic neutral endopeptidase inhibition in rats with

cyclosporine-induced hypertension. *J Hypertens.* 2000 Jul; 18(7): 927-33

5) Miyamori I, Inaba S, Hatakeyama H, Taniguchi N, Takeda Y: Idiopathic hyperaldosteronism: analysis of aldosterone synthase gene. *Biomed Pharmacother* 2000 Jun; 54 Suppl 1: 77s-79s

6) Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Miyamori I, Mabuchi H: Sodium-induced cardiac aldosterone synthesis causes cardiac hypertrophy. *Endocrinology* 2000 May; 141(5): 1901-4

7) Hatakeyama H, Inaba S, Takeda R, Miyamori I: 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in human vascular cells. *Kidney Int.* 2000 Apr 26; 57(4): 1352-1357

図1 TSP1 Expression in Adrenal Tissues

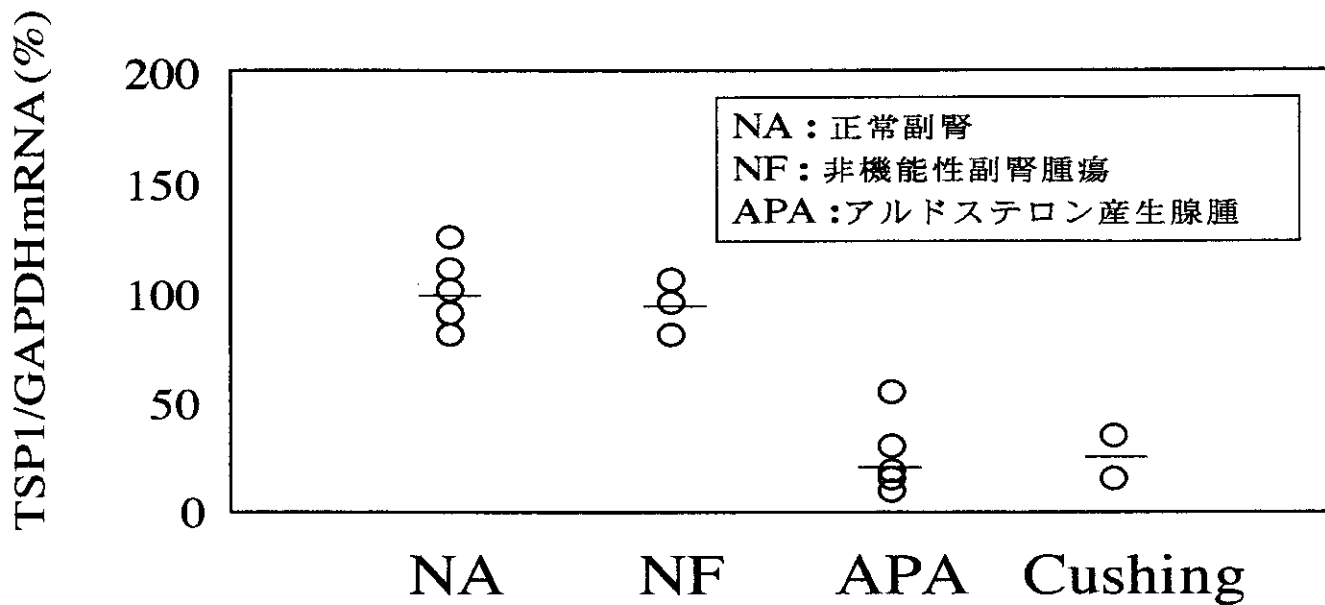


図2 TSP2 Expression in Adrenal Tissues

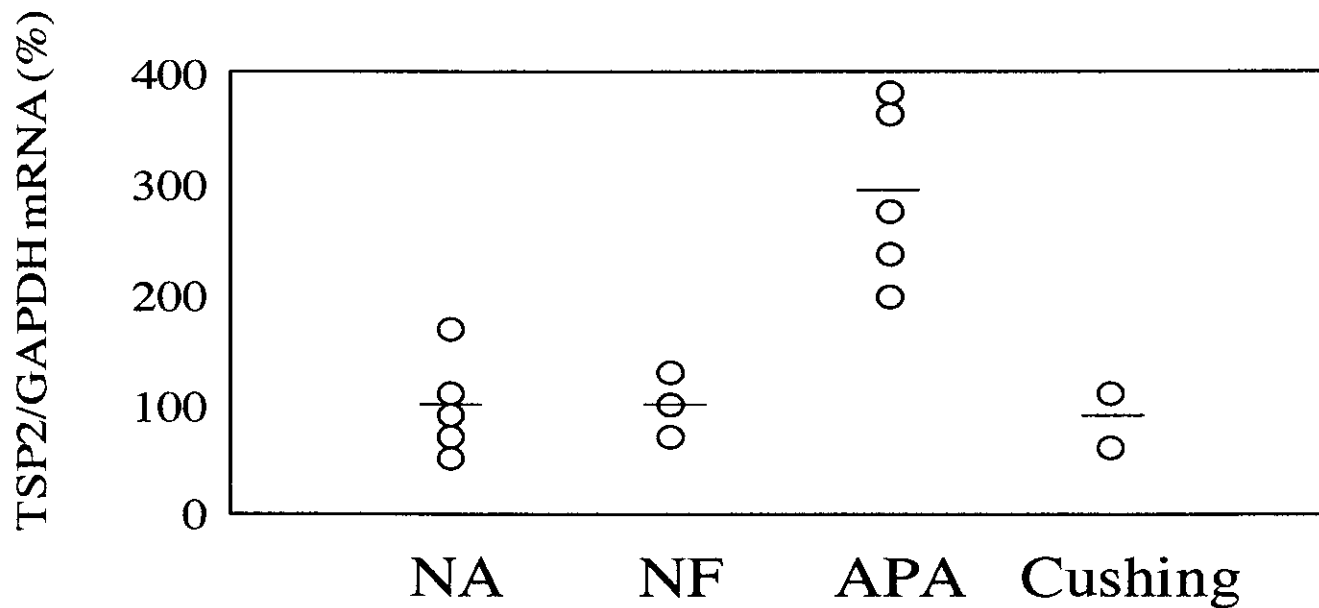


Figure 3 ACTH Receptor Expression in Adrenal Tissues

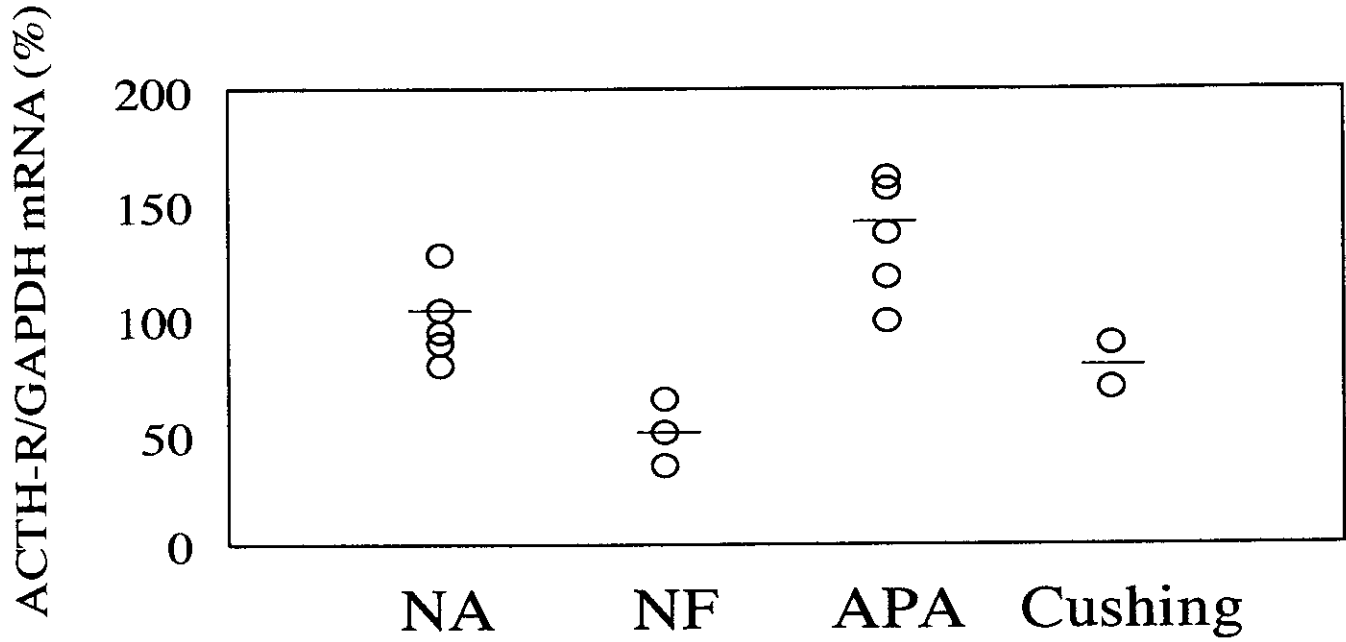


Figure 4 Regression analysis between ACTH-R mRNA and TSP1 mRNA expression in adrenal tissues

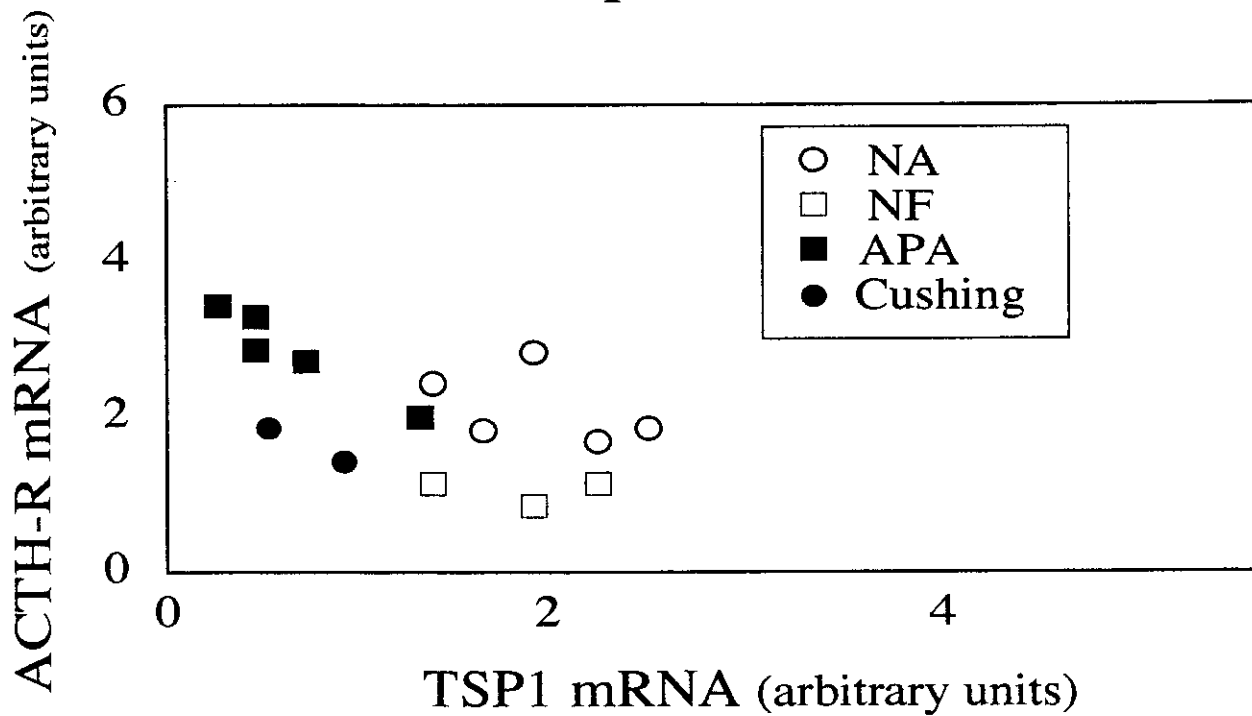
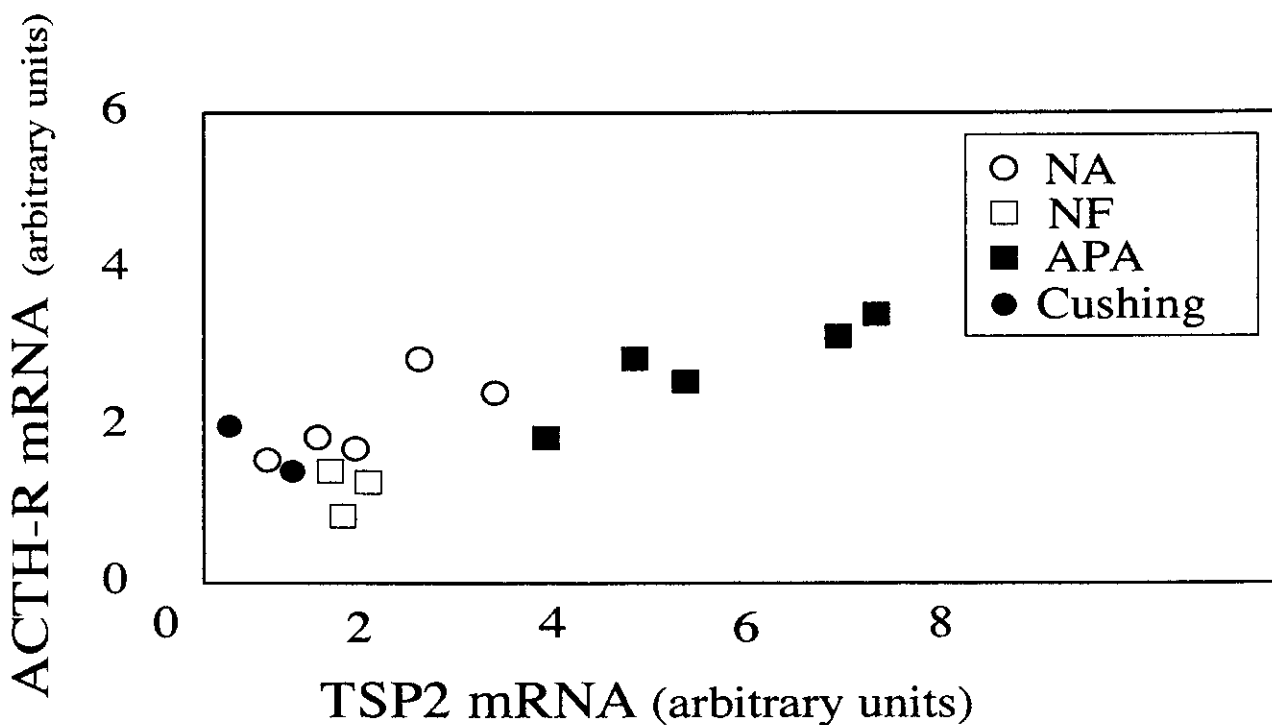


Figure 5 Regression analysis between ACTH-R mRNA and TSP2 mRNA expression in adrenal tissues



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

柴田洋孝^{1,2}、池田やよい⁴、向井徳男⁵、諸橋憲一郎⁵、栗原 勲²、安藤 孝²、鈴木利彦²、小林佐紀子²、林 晃一²、林 松彦²、齊藤郁夫¹、村井 勝³、猿田享男²

慶應義塾大学保健管理センター¹、同 医学部内科²、同 医学部泌尿器科³、筑波大学基礎医学系解剖学⁴、岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所⁵

研究要旨

糖質コルチコイド産生の鍵となる、ウシ CYP17 遺伝子の転写調節において、そのプロモーター領域の CRS2 配列には、核内オーファンレセプター COUP-TF および SF-1 が相互排他的に結合して、転写活性を抑制または活性化する。さらに、DAX-1 は SF-1 に結合すると、SF-1 による転写活性を抑制する。このような転写調節の有無を検討するために、CYP17 酵素活性および、各種転写因子の発現量を Northern blot, Western blot および免疫組織化学分析により、ヒト副腎皮質腫瘍において検討した。CYP17 過剰発現を認めるコルチゾール産生腺腫 (CS)において、COUP-TF および DAX-1 の発現低下を認めた。一方、CYP17 の発現をほとんど欠損しているデオキシコルチコステロン産生腺腫 (DOC)では、DAX-1 の過剰発現および SF-1 の発現低下を認めた。CYP17 酵素活性のうち、CS では、17 α -hydroxylase 活性高値、17, 20-lyase 低値を、DOC では、17 α -hydroxylase 活性低値、17, 20-lyase 低値を認めたことより、CYP17 の 17 α -hydroxylase 活性のみが選択的に、COUP-TF, DAX-1, SF-1 などによって調節されていることが示された。

A. 研究目的

我々は現在までに、副腎皮質腫瘍におけるホルモン産生異常の病因として、腫瘍部特異的にステロイド合成酵素の発現異常があることを報告してきた。しかし、そのメカニズムについては不明である。昨年度、本班研究において我々はウシ CYP17 遺伝子が、核内オーファンレセプターの SF-1, COUP-TF および転写共役因子により転写調節されることを明らかにした。そこで、ヒト副腎皮質腫瘍におけるそれらの関与を調べるために、CYP17 およびその転写調節因子である SF-1, COUP-TF, DAX-1 について検討した。

B. 研究方法

対象：コルチゾール産生腺腫 (n=15)、デオキシコルチコステロン産生腺腫 (n=2)および腎細胞癌にて同時摘出さ

れた正常副腎 (n=5)を供した。

CYP17 酵素活性：副腎組織より既報の方法でミクロソーム分画を調製し、in vitro の再構成系にて測定した。

尿中ステロイドプロフィール：24 時間蓄尿を行い、既報のガスクロマトグラフー質量分析ー選択的イオンモニタリング法(GCMS-SIM)にてステロイド代謝産物を測定し、クレアチニン補正を行った。

Northern blot, Western blot, 免疫組織化学分析：いずれも既報の方法に従った。

(倫理面への配慮)

患者に対しては、十分なインフォームド・コンセントと得た上で研究に用いた。

C. 研究結果

CYP17 酵素活性

17 α -hydroxylase 活性は、CS 腫瘍部 (10.5 \pm 1.2 nmol/min/mg protein) で CS 非腫瘍部 (2.9 \pm 1.2 nmol/min/mg protein) および NL (3.1 \pm 1.0 nmol/min/mg protein) の 3 倍高値を認めた (p<0.01)。一方、DOC 腫瘍部では 17 α -hydroxylase 活性は、6 分の 1 (0.5 \pm 0.4 nmol/min/mg protein) の低値を認めた (p<0.01)。

尿中ステロイドプロファイルの結果では、CS において 17 α -hydroxylase 活性高値、17, 20-lyase 低値を、DOC において 17 α -hydroxylase 活性および 17, 20-lyase いずれも低値を認めた。したがって、CS および DOC では 17, 20-lyase 活性はいずれも低値をしめし、17 α -hydroxylase 活性のみが選択的対照的な所見を認めた。

CYP17, COUP-TF, SF-1, DAX-1 の発現

CYP17 酵素活性に一致して、CYP17 の発現は CS で高値、DOC で低値を認めた。そして、CS において COUP-TFI, COUP-TFII, DAX-1 の発現低下を認めしたが、DOC においては、DAX-1 の過剰発現と SF-1 の発現低下を認めた。次に、免疫組織化学分析を行ったところ、正常副腎においては、COUP-TF, SF-1, DAX-1 とともに副腎皮質細胞の核に局在を認め、COUP-TF に関しては、それに加えて副腎皮質間質細胞の核にも発現を認めた。しかし、腫瘍組織においてはこれらの共発現のプロファイルは消失し、Northern, Western blot の結果と同様に腫瘍特異的な発現プロファイルが確認された。

D. 考察

本研究の結果から、正常副腎皮質では CYP17, COUP-TF, SF-1, DAX-1 はいずれも共発現を認めるが、コルチゾールおよびデオキシコルチコステロン産生腫瘍では、その発現プロファイルに解離を認めた。すなわち、腫瘍部における CYP17 の発現量と COUP-TF, DAX-1 の発現量の間には逆相関関係を認めた。*in vitro* での bovine CYP17 gene promoter を用いた transient transfection assay において、COUP-TFI, DAX-1 が SF-1 依存性 CYP17 プロモーター活性

を抑制する結果をふまえると、副腎皮質腫瘍におけるヒト CYP17 遺伝子の発現に、COUP-TF および DAX-1 が関与している可能性が示唆された。

Suzuki らは、COUP-TFII の副腎における発現が、アルドステロン産生腺腫で強く、非機能性腫瘍で中等度、コルチゾール産生腺腫で低下していることを報告しており、我々の COUP-TFI の副腎における発現プロファイルの報告と若干の差異を認めている。この差異は COUP-TFI と COUP-TFII は相同性が高いオーファンレセプターであるが、遺伝子ノックアウトマウスの研究から、COUP-TFI (-/-) は運動ニューロンの異常、COUP-TFII (-/-) は embryonal lethal であり、心臓、血管系の発生異常をきたすという表現型の違いがあることから、機能分担が異なっていると考えられる。

また、CYP17 の酵素活性で 17 α -hydroxylase のみが腫瘍で異なり、17, 20-lyase がいずれの腫瘍でも抑制されている理由は不明であるが、CYP17 蛋白の発現量と 17 α -hydroxylase 活性は強い相関を認めることから、17, 20-lyase 活性はその他の因子、たとえばチトクローム b5 などにより調節されている可能性が示唆された。

本研究の結果より、COUP-TF, DAX-1 などの核内オーファンレセプターにより CYP17 の発現が腫瘍特異的に調節されて、自律的ホルモン産生能を呈する可能性が考えられ、今後、COUP-TF, DAX-1 により CYP17 を含めたステロイド合成調節異常のメカニズムをさらに詳細に検討していく予定である。

E. 結論

ヒト副腎皮質において、核内オーファンレセプターの COUP-TF, SF-1, DAX-1 がステロイド産生を調節しており、コルチゾールおよびデオキシコルチコステロン産生腺腫においては、特に repressor である COUP-TF, DAX-1 の発現異常をきたすことにより、腫瘍におけるステロイド産生異常に関与していることが示唆された。

- F. 研究発表
1. 論文発表
- 1) E.Kikuchi, H.Yanaiharu, J.Nakashima, K.Honma, T.Ohigashi, H.Asakura, M.Tachibana, H.Shibata, T.Saruta, M.Murai. Urinary steroid profile in adrenocortical tumors. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 54 Suppl 1: 194-197, 2000.
 - 2) H.Kawabe, H.Shibata, H.Hirose, M.Tsujioka, I.Saito, T.Saruta. Determinants for the development of hypertension in adolescents. A 6-year follow-up. *Journal of Hypertension* 18:1557-1561, 2000.
 - 3) H.Shibata, Y.Ikeda, K.Morohashi, I.Kurihara, T.Ando, T.Suzuki, S.Kobayashi, K.Hayashi, M.Hayashi, I.Saito, T.Saruta. Orphan receptors COUP-TF and DAX-1 as targets in disordered CYP17 expression in adrenocortical tumors. *Endocrine Research*, 26(4): 1039-1044, 2000.
 - 4) T.Ando, H.Shibata, I.Kurihara, T.Suzuki, S.Kobayashi, K.Hayashi, M.Hayashi, I.Saito, M.Murai, T.Saruta. Expression and regulation of bcl-2 family genes in human adrenocortical adenomas in comparison with adrenal hyperplasia of Cushing's disease. *Endocrine Research*, 26(4): 853-859, 2000.
 - 5) I.Kurihara, H.Shibata, T.Suzuki, T.Ando, S.Kobayashi, M.Hayashi, I.Saito, T.Saruta. Transcriptional regulation of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) in glucocorticoid action. *Endocrine Research*, 26(4): 1033-1038, 2000.
 - 6) T.Suzuki, H.Shibata, T.Ando, I.Kurihara, S.Kobayashi, K.Hayashi, M.Hayashi, H.Kawabe, I.Saito, M.Murai, T.Saruta. Risk factors associated with persistent postoperative hypertension in Cushing's syndrome. *Endocrine Research*, 26(4): 791-795, 2000.
 - 7) 栗原 勲, 柴田洋孝, 安藤 孝, 鈴木利彦, 笹野公伸, 林 晃一, 林 松彦, 村井 勝, 猿田享男. 副腎癌が疑われた巨大副腎皮質腺腫による Pre-clinical Cushing 症候群の一例. *ホルモンと臨床* 48 (増刊号): 127-131, 2000.
 - 8) 菊地栄次, 矢内原仁, 大東貴志, 中島 淳, 橘 政昭, 本間桂子, 柴田洋孝, 猿田享男, 村井 勝. 副腎皮質癌における尿中ステロイドの検討 *ホルモンと臨床* 48 (増刊号): 166-169, 2000.
 - 9) 柴田洋孝, 齊藤郁夫. 二次性高血圧症の疫学. *日本臨床* 58:439-442, 2000.
 - 10) 柴田洋孝, 齊藤郁夫. 二次性高血圧症のスクリーニング. *日本臨床* 58:443-447, 2000.
 - 11) 柴田洋孝, 猿田享男. 特集 心血管系と内分泌因子 エストロゲンの循環領域での役割 *ホルモンと臨床* 48(10): 51-61, 2000.
 - 11) 柴田洋孝, 猿田享男. Evidence に基づく内科的治療のすすめ方 アルドステロン症 *最新医学* 55(6): 1382-1391, 2000.
 - 12) 柴田洋孝, 齊藤郁夫. 副腎皮質機能低下症 *ホルモンと臨床* 49 (特別増刊号): 97-103, 2001.
 - 14) 柴田洋孝, 猿田享男. Cushing 症候群 *ホルモンと臨床* 49 (特別増刊号): 104-108, 2001.
 - 15) 柴田洋孝, 猿田享男. 女性ホルモンと血管機能 *最新医学* 55(11): 19-27, 2000.
 - 16) 柴田洋孝, 猿田享男. 副腎皮質機能低下症の診断と治療 *臨床成人病* 30(12):1637-1642, 2000.
2. 学会発表
- 1) 第 97 回日本内科学会講演会 (京都, 2000 年 4 月)
副腎腫瘍患者における尿ステロイド一斉分析～Cushing 症候群と pre-clinical Cushing 症候群の比較検討～
柴田洋孝, 齊藤郁夫, 安藤 孝, 栗原 勲, 鈴木利彦, 林 晃一, 林 松彦, 猿田享男
 - 2) 第 97 回日本内科学会講演会 (京都,

- 2000年4月)
 “アルドステロンエスケープ“：
 アンジオテンシンII受容体拮抗薬
 における臨床的検討
 佐藤敦久，高根裕史，柴田洋孝，
 猿田享男
- 3) 第73回日本内分泌学会総会(京都，
 2000年6月)シンポジウム
 核内オーファンレセプターおよび
 転写共役因子によるステロイド産
 生異常の分子機構—副腎皮質腺腫
 における検討—
 柴田洋孝，齊藤郁夫，猿田享男
- 4) 第73回日本内分泌学会総会(京都，
 2000年6月)
 副腎腫瘍における核内オーファン
 レセプターCOUP-TF，DAX-1およ
 びSF-1によるCYP17遺伝子の発
 現調節
 柴田洋孝，池田やよい，諸橋憲一
 郎，安藤孝，栗原勲，鈴木利
 彦，
 林晃一，林松彦，齊藤郁夫，
 猿田享男
- 5) 第73回日本内分泌学会総会(京都，
 2000年6月)
 Pre-clinical Cushing症候群および
 Cushing症候群における副腎ホル
 モン産生異常症のメカニズムの検
 討
 林晃一，柴田洋孝，安藤孝，
 栗原勲，鈴木利彦，本間桂子，
 粕谷泰次，笹野公伸，林松彦，
 齊藤郁夫，猿田享男
- 6) 第73回日本内分泌学会総会(京都，
 2000年6月)
 Cushing症候群患者の術後高血圧
 の予後に関する因子の検討
 鈴木利彦，柴田洋孝，安藤孝，
 栗原勲，本間桂子，林晃一，
 林松彦，齊藤郁夫，猿田享男
- 7) 第73回日本内分泌学会総会(京都，
 2000年6月)
 ヒト副腎皮質由来H295R細胞に
 におけるホルモン分泌調節とアポト
 ーシスの制御
 安藤孝，柴田洋孝，栗原勲，
 鈴木利彦，林晃一，林松彦，
 齊藤郁夫，猿田享男
- 8) 第73回日本内分泌学会総会(京都，
 2000年6月)
 両側副腎偶発腫瘍で発見された先
 天性副腎過形成(21-水酸化酵素
 欠損症)の一例
 栗原勲，柴田洋孝，鈴木利彦，
 安藤孝，笹野公伸，林晃一，
 林松彦，村井勝，齊藤郁夫，
 猿田享男
- 9) 第73回日本内分泌学会総会(京都，
 2000年6月)
 糖尿病(DM)患者における尿中Free
 cortisone/free cortisol (free E/F)比を
 指標とした11 β -hydroxysteroid
 dehydrogenase type 2 (11 β -HSD2)
 活性の変化と，同活性に及ぼすア
 ンジオテンシン変換酵素(ACE)阻
 害薬の効果(第2報)
 佐藤敦久，本間桂子，柴田洋孝，
 竹下栄子，渡辺清明，粕谷泰次，
 猿田享男
- 10) IXth International Conference on the
 Adrenal Cortex (Toronto, 2000年6
 月)
 Orphan receptors COUP-TF and
 DAX-1 as targets in disordered
 CYP17 expression in adrenocortical
 tumors
 Hirotaka Shibata, Yayoi Ikeda, Ken-
 ichirou Morohashi, Isao Kurihara,
 Takashi Ando, Toshihiko Suzuki,
 Sakiko Kobayashi, Kouichi Hayashi,
 Matsuhiko Hayashi, Ikuo Saito, and
 Takao Saruta
- 11) IXth International Conference on the
 Adrenal Cortex (Toronto, 2000年6
 月)
 Risk factors associated with persistent
 postoperative hypertension in
 Cushing's syndrome
 Toshihiko Suzuki, Hirotaka Shibata,
 Takashi Ando, Isao Kurihara, Sakiko
 Kobayashi, Kouichi Hayashi,
 Matsuhiko Hayashi, Hiroshi Kawabe,
 Ikuo Saito, and Takao Saruta
- 12) IXth International Conference on the
 Adrenal Cortex (Toronto, 2000年6
 月)
 Transcriptional regulation of steroid
 receptor coactivator-1 (SRC-1) in
 glucocorticoid action

- Isao Kurihara, Hiroataka Shibata, Toshihiko Suzuki, Takashi Ando, Sakiko Kobayashi, Matsuhiko Hayashi, Ikuo Saito, and Takao Saruta
- 13) IXth International Conference on the Adrenal Cortex (Toronto, 2000年6月)
Expression and regulation of bcl-2 family genes in human adrenal tumors - Possible role in adrenal tumorigenesis
Takashi Ando, Hiroataka Shibata, Isao Kurihara, Toshihiko Suzuki, Sakiko Kobayashi, Kouichi Hayashi, Matsuhiko Hayashi, Ikuo Saito, Masaru Murai, and Takao Saruta
- 14) 82nd Annual Meeting of the Endocrine Society (Toronto, 2000年6月)
Nuclear orphan receptor COUP-TF and DAX-1: Key molecules in the pathophysiology of disordered CYP17 expression in human adrenocortical tumors.
Hiroataka Shibata, Yayoi Ikeda, Ken-ichiro Morohashi, Isao Kurihara, Takashi Ando, Toshihiko Suzuki, Kouichi Hayashi, Matsuhiko Hayashi, Kiroshi Kawabe, Ikuo Saito, and Takao Saruta.
- 15) 82nd Annual Meeting of the Endocrine Society (Toronto, 2000年6月)
Cyclic AMP-independent regulation of MCL-1: Cause or consequence of adrenal tumorigenesis in Cushing's syndrome?
Takashi Ando, Hiroataka Shibata, Isao Kurihara, Toshihiko Suzuki, Kouichi Hayashi, Matsuhiko Hayashi, and Takao Saruta.
- 16) 82nd Annual Meeting of the Endocrine Society (Toronto, 2000年6月)
Risk factors of persistent hypertension after removal of adrenal tumors in Cushing's syndrome.
Toshihiko Suzuki, Hiroataka Shibata, Takashi Ando, Isao Kurihara, Kouichi Hayashi, Matsuhiko Hayashi, Hiroshi Kawabe, Ikuo Saito, Masaru Murai, and Takao Saruta.
- 17) 第12回日本内分泌外科学会総会 (東京, 2000年6月)
二度の骨転移病変切除を行った悪性褐色細胞腫の一例
栗原 勲, 柴田洋孝, 鈴木利彦, 安藤 孝, 菅 卓郎, 松本守雄, 林 晃一, 林 松彦, 猿田享男
- 18) 11th International Congress of Endocrinology (Sydney, 2000年11月)
Cortisol metabolism in Cushing's and pre-clinical Cushing's syndrome: Impaired activities of A-ring reductases and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase
Hiroataka Shibata, Takashi Ando, Isao Kurihara, Toshihiko Suzuki, Sakiko Kobayashi, Keiko Honma, Yasuji Kasuya, Kouichi Hayashi, Matsuhiko Hayashi, Hiroshi Kawabe, Ikuo Saito, and Takao Saruta.
- 19) Society for Cardiovascular Endocrinology and Metabolism Fourth Annual Meeting (Palm Cove, Australia, 2000年10月)
Nuclear orphan receptors COUP-TF and DAX-1: Key molecules in autonomous hormone production from human adrenocortical tumors
Hiroataka Shibata and Takao Saruta
- 20) 第8回日本ステロイドホルモン学会総会 (大阪, 2000年11月)
グルココルチコイド作用における核内受容体コアクチベーターSRC-1の転写調節
栗原 勲, 柴田洋孝, 鈴木利彦, 安藤 孝, 小林佐紀子, 林 松彦, 齊藤郁夫, 猿田享男
- 21) 第8回日本ステロイドホルモン学会総会 (大阪, 2000年11月)
シンポジウム「副腎偶発腫瘍の診断と治療指針」
副腎皮質腫瘍における自律的ホルモン産生能
柴田洋孝, 猿田享男

- 22) 第 8 回日本ステロイドホルモン学会総会（大阪，2000 年 11 月）
抗アルドステロン薬はコラーゲン代謝を低下させ心肥大退縮効果を示す
佐藤敦久、高根裕史、柴田洋孝、猿田享男
- 23) 第 28 回内分泌代謝研究会（東京，2000 年 12 月）
Pre-clinical Cushing 症候群の一例
栗原 勲、柴田洋孝、熊谷裕生、安藤 孝、鈴木利彦、小林佐紀子、林 晃一、林 松彦、猿田享男

G. 知的所有権の取得状況
特になし。

(5) 副腎の発生分化

変異 DAX-1 遺伝子の機能解析

藤枝憲二^{1, 2}、阿部修司²、田島敏広²、中江淳²、菅原照夫³

1. 旭川医科大学医学部小児科
2. 北海道大学医学部小児科
3. 北海道大学医学部第二生化学講座

研究要旨

DAX-1 遺伝子は、X 連鎖型先天性副腎低形成の責任遺伝子として同定された。しかし、機能として副腎皮質の発生分化、視床下部一下垂体一性腺系の機能、さらには性決定機構にも関与することが推定されている。そこで、DAX-1 蛋白の構造と機能について理解を深めるために、先天性副腎低形成症と臨床診断された男児 17 家系 21 症例を対象に DAX-1 遺伝子解析を行うとともに、同定された変異 DAX-1 蛋白の構造と機能について検討したので報告する。最初に、PCR 直接シーケンス法により 患児の DAX-1 遺伝子の塩基配列を決定した。PCR で増幅できなかった症例では、Southern hybridization を施行し DAX-1 遺伝子の欠失を確認した。次に、同定した変異について human StAR 遺伝子プロモーターを組み込んだルシフェラーゼ発現 vector と wild type / mutant DAX-1 発現 vector を Y-1 細胞に cotransfect し、ルシフェラーゼアッセイを行い機能を評価した。結果、21 例中 19 例に DAX-1 遺伝子異常を認めた。ナンセンス変異 (Q395X, Y91X, Y271X)、フレームシフト変異 (1610 del AT ins G, 388 delAG, 1169 delC)、ミスセンス変異 (V269D, L278R, W291C, K382N, L466R) を同定し、3 例に DAX-1 遺伝子の欠失を認めた。ルシフェラーゼアッセイでは wild type の DAX-1 は StAR 遺伝子プロモーター活性を 8%まで抑制した。しかし、変異 DAX-1 (Y91X, Y271X, V269D, L278R, W291C, K382N, L466R) では、61%から 106%の抑制となった。このことから今回同定した 5 種類の DAX-1 ミスセンス変異は、StAR 遺伝子発現抑制能を低下させることが示された。

A. 目的

X 連鎖型先天性副腎低形成症(X-linked AHC)は、副腎の発生分化の障害のため新生児期から乳幼児期にかけて、体重増加不良、全身色素沈着、塩喪失など急性副腎不全で発症し、青年期においては、低ゴナドトロピン性性腺機能低下症を合併する疾患である。責任遺伝子として、DSS (dosage-sensitive sex

reversal) -AHC critical region on the X, gene 1

(DAX-1) 遺伝子が同定されている。DAX-1 遺伝子は核ホルモンレセプタースーパーファミリーに属する新しいオーファンレセプターであり、DAX-1 蛋白の C 端側は、核ホルモンレセプタースーパーファミリーのリガンド結合ドメインと高い相同性を持ち、DNA 結合ドメインと考えられる N 端側は、アミノ

酸 65 個から 67 個からなる 3 回半の繰り返しのユニークな配列を有している。DAX-1 遺伝子は視床下部、下垂体、副腎、性腺に発現しており、副腎の形成、視床下部-下垂体-性腺系機能に大きな役割を果たしているだけでなく、性分化にも関与していることが示唆されている。そこで、DAX-1 蛋白の構造と機能について理解を深めるために、AHC 症例を対象に DAX-1 遺伝子解析を行うとともに、同定された変異 DAX-1 蛋白の機能について検討した。

B. 対象と方法

AHC と臨床的に診断された男児 17 家系 21 症例を対象に、両親、もしくは本人の同意を得た上で DAX-1 遺伝子の解析を行った。対象となった症例は、新生児期から 6 才 7 カ月の間に発症し、検査所見上、低 Na 高 K 血症と ACTH 上昇、Cortisol 低下を示していた。思春期年齢に達していた 6 例すべてに低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の合併が認められた。

患児の末梢血リンパ球より DNA を抽出し、PCR 直接シーケンス法により DAX-1 遺伝子のエクソンとエクソン-イントロン境界領域の全塩基配列を決定した。PCR で DAX-1 遺伝子が増幅できなかった症例では Southern hybridization を施行することにより、DAX-1 遺伝子の欠失の有無を確認した。

Steroidogenic acute regulatory 蛋白(StAR 蛋白)はステロイド合成においてコレステロールをミトコンドリア膜内に移送する働きをしており、SF-1 蛋白はこの StAR 遺伝子の発現

を促進し、DAX-1 蛋白は抑制することが報告されている。そこで、同定された変異 DAX-1 蛋白の機能を評価するため、human StAR 遺伝子プロモーター (-1293 から +39) を組み込んだ ルシフェラーゼ発現ベクター

(1.3KbStAR pGL2 vector) と DAX-1 発現ベクター (wild type / mutant type) をマウス副腎腫瘍細胞である Y-1 細胞に cotransfect し、StAR 遺伝子プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにより測定した。

さらに、DAX-1 遺伝子変異の部位と発症時期、ルシフェラーゼアッセイの結果に相関があるか検討した。

C. 結果

PCR 直接シーケンス法により症例の DAX-1 遺伝子塩基配列を決定した結果、新しい 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 (151 del AG, 935 del C, 1376 del AT ins G)、5 つのミスセンス変異 (V269D, L278R, W291C, K382N, L466R) を同定した。L278R は人種の異なる 2 家系で認められた。PCR により DAX-1 遺伝子が増幅が出来なかった 3 症例に対し Southern hybridization を施行した結果、DAX-1 遺伝子の欠失が確認された。また、今回の解析では 2 症例で DAX-1 遺伝子異常を同定できなかった。

ルシフェラーゼアッセイ (図 1) では、コントロールの StAR 遺伝子プロモーター活性を 100% とするとき、wild type DAX-1 蛋白では 8% まで抑制した。同様に N 端側に報告されている V126M 変異とコントロールのため

人為的に作製した K362N 変異 DAX-1 蛋白ではともに 16%と StAR 遺伝子プロモーター活性を抑制し、wild type と有意差は認められなかった。

しかし、変異 vector (ナンセンス変異 Y91X, Y271X, ミスセンス変異 V269D, L278R, W291C, K382N, L466R) を cotransfect した場合、61%から 106%の抑制となり、変異 DAX-1 蛋白では StAR 遺伝子プロモーター活性抑制能が低下することが示された。

変異の部位と発症時期を示した (図 2)。同一家系内でも発症の時期が異なっており、変異の部位と発症時期には関係が認められなかった。ルシフェラーゼアッセイの結果と発症時期についても同様に関係が認められなかった。

D. 考案

DAX-1 遺伝子解析の結果、ナンセンス変異 (Y91X, Y271X, Q395X)、フレームシフト変

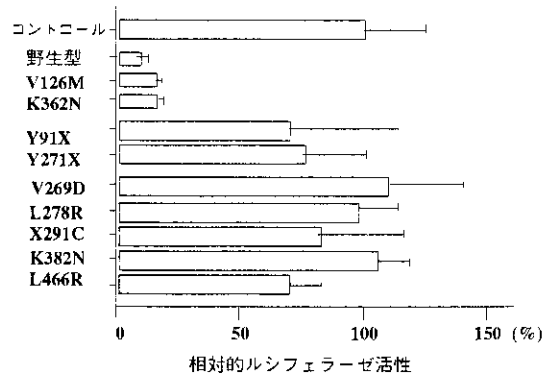


図1 StAR プロモーター活性に及ぼすDAX-1の効果

異(151 del AG, 935 del C, 1376 del AT ins G)、ミスセンス変異 (V269D, L278R, W291C, K382N, L466R)、3 例の DAX-1 遺伝子欠失症例が同定されたことから、DAX-1 遺伝子変異にはいわゆるホットスポットは認められない。

しかし、今回同定された変異及び今までに報告された変異をまとめて示した場合 (図 3)、V126M を除くとミスセンス変異はすべて C 端側に存在している。この V126M 変異が認められた症例はナンセンス変異 W171X を合わせ持っており、また、ルシフェラーゼアッ

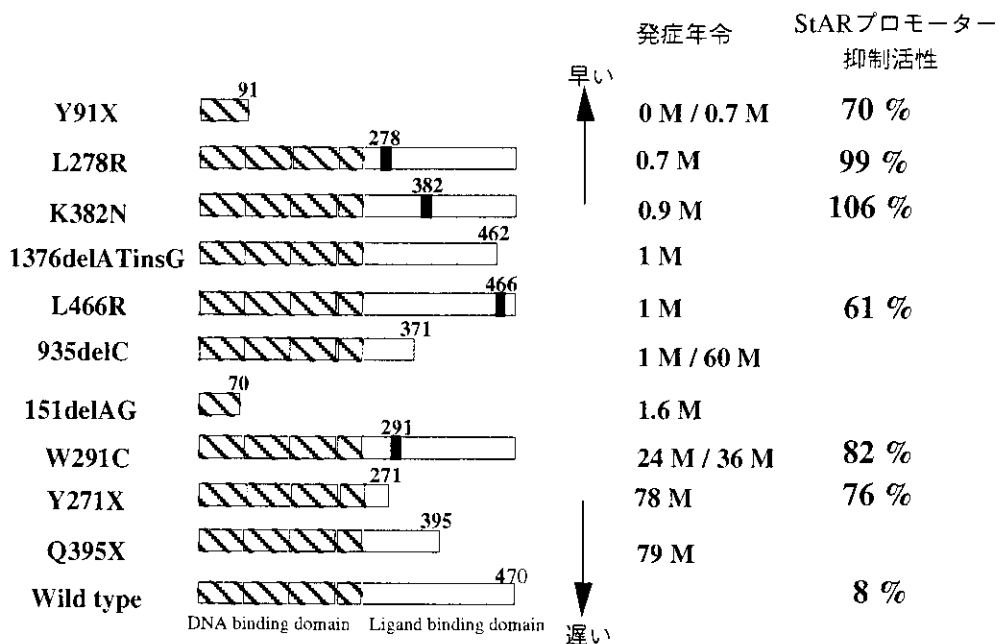


図2 DAX-1遺伝子変異と副腎不全発症年齢

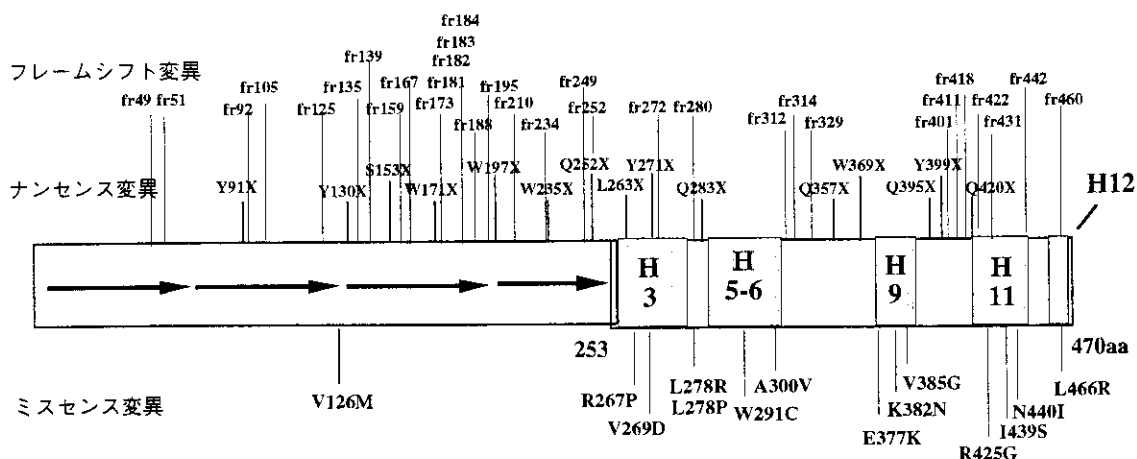


図3 DAX-1遺伝子変異部位

セイの結果 V126M 変異 DAX-1 蛋白はコントロールと同様に StAR 遺伝子活性を抑制していることから多型と考えられる。ナンセンス変異およびフレームシフト変異では早期の終止コドンを生じ、DAX-1 蛋白の C 端側のすべて、もしくは一部を欠失した形になっており、欠失症例では C 端側部分のすべてが消失している。従って、今までに報告された変異はすべて、DAX-1 蛋白 C 端側のリガンド結合ドメインに影響を与え得るものだけであり、DAX-1 蛋白では C 端側のリガンド結合ドメインが機能上重要な役割を担っていると考えられる。

さらに、DAX-1 蛋白は 470 個のアミノ酸から成っているが、今回 C 末端にミスセンス変異 L466R と、コドン 459 番から変異を起こすフレームシフト変異 1376 del AT ins G が同定された。このことより、C 末端の数アミノ酸部分も DAX-1 蛋白の機能上必須な部分と考えられる。

同一家系内でも副腎低形成症の発症の時期が異なっており、変異の部位と発症時期について相関が認められなかった。また、ルシフェラーゼアッセイの結果と発症時期について

も関係が認められなかった。これは DAX-1 蛋白と相互に働く因子による影響も考えられる。マウスの *dax-1* 遺伝子をノックアウトした場合には、ヒトの場合と異なり副腎低形成を生じないことから、DAX-1 遺伝子機能の低下を補う機構が存在している可能性がある。一方、副腎皮質ホルモンの必要量が感染やストレスなどの環境的因子に左右されるため、発症時期が DAX-1 蛋白機能低下の程度の指標になっていない可能性も考えられる。今後の症例の蓄積が必要である。

E. 結論

先天性副腎低形成症に対し DAX-1 遺伝子解析を行い、ナンセンス変異 3 家系、フレームシフト変異 3 家系、ミスセンス変異 6 家系、欠失を 3 家系に同定した。DAX-1 変異蛋白では StAR 遺伝子プロモーター活性の抑制機能が低下していた。ミスセンス変異は DAX-1 蛋白 C 端側にのみ認められ、その機能の重要性が示唆され、さらに C 末端の数アミノ酸部分も重要な機能を持っていると考えられた。変異の部位と発症時期には相関が認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fujieda K, et al: DAX-1 mutations in adrenal hypoplasia congenita. Molecular Steroidogenesis (Okamoto M, Ishimura Y, Nawata H, eds), Universal Academy Press, pp341-344, 2000

2. 学会発表

阿部修司ほか：X連鎖型先天性副腎低形成症における DAX-1 遺伝子解析と変異 DAX-1 蛋白の機能評価
第 73 回日本内分泌学会、2000

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

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

諸橋 憲一郎

岡崎国立共同研究機構、基礎生物学研究所
発生生物学研究系細胞分化研究部門

研究要旨

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ことが明らかにされてきたが、その分子メカニズムは不明であった。本研究では DAX-1 のアミノ末端側に存在する 3 回半からなる繰り返し配列の構造と機能に着目し、この領域に抑制活性が存在することを明らかにしたものである。

A. 研究目的

副腎低形成の原因遺伝子として同定された DAX-1 の抑制活性を担う領域の同定を通じ、本分子の機能調節機構を明らかにする。また、本研究を通じ副腎低形成の発症メカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

培養細胞系を用い、ステロイドホルモン産生組織特異的発現を示す遺伝子の転写活性をルシフェラーゼリポーター遺伝子の活性を指標に測定する。

C. 研究成果

1. 抑制活性を担う領域の同定

DAX-1 全長、アミノ末端側、カルボキシル末端側を各々発現させることで、

Ad4BP/SF-1 に対する抑制活性を担う領域を検討したところ、全長が有していた抑制活性とほぼ同様の活性をアミノ末端側が有することが明らかになった。この領域の配列を種々の動物間で比較したところ LXXLL モチーフが保存されていた。この配列は当初核内受容体と相互作用するコアクチベーターに見い出されたものであり、この配列を通じ核内受容体と相互作用することで、転写を活性化することが知られていた。そこで DAX-1 に見い出された LXXLL モチーフの機能検討するためにこの領域に変異を導入した DAX-1 を作製し、転写抑制活性を測定した。期待通りに 3 つの LXXLL 配列に変異を導入すると、DAX-1 の抑制活性はほぼ消失した。

2, DAX-1 に見られる LXXLL モチーフの特徴

コアクチベーターに存在する LXXLL モチーフと DAX-1 におけるモチーフを機能と構造の点で比較検討した。コアクチベーターに存在する LXXLL モチーフは種々の核内受容体と相互作用することが確認されているが、そのほとんどがリガンドが明らかにされているもので、しかも相互作用はリガンド依存的であることが知られている。そこで、この点を DAX-1 のモチーフを用いて調べたところ、DAX-1 の場合も同様に ER, TR, RXR などとリガンド依存的に相互作用することが明らかになった。一方、コアクチベーターに存在する LXXLL モチーフはリガンドが不明とされるオーファンレセプターとの間では相互作用が確認されない。ところが DAX-1 は Ad4BP/SF-1 をはじめ ERRb, LHR などのオーファンレセプターとの間で相互作用することが示された。この結果はロイシン残基以外に相互作用の特異性を規定するアミノ酸が存在することを示唆するものであった。そこで DAX-1 とコアクチベーターの LXXLL モチーフについてロイシン以外のアミノ酸の入れ替えを行った。その結果、オーファンレセプターとの相互作用に必要なアミノ酸は XX のアミノ酸とこのモチーフの両側のアミノ酸であることが明らかになった。

D. 考察

本研究では DAX-1 の抑制活性に着目し、この活性を規定する領域を同定した。興味深いことに、コアクチベーターに見いだされた LXXLL モチーフが DAX-1 にも存在し、このモチーフを通じて Ad4BP/SF-1 の転写を抑制することが明らかになった。これまで DAX-1 のカルボキシ末端側に存在する LBD (Ligand binding domain) に NcoR や Alian などの抑制性のコファクターの結合が示されてきたが、我々の今回の結果はアミノ末端側のみでも抑制活性を有することを示している。両者の結果を考慮すれば、DAX-1 が抑制性の因子として機能するには、はじめにアミノ末端側を通じ Ad4BP/SF-1 と相互作用し、次いでカルボキシ末端側を通じ抑制性のコファクターをリクルートする、というメカニズムを推測することが可能である。

一方、LXXLL モチーフを通じた核内受容体との相互作用がロイシン以外のアミノ酸によっても規定されていることが明らかになった。特にオーファンレセプターとの相互作用にはコアクチベーターではなく DAX-1 に見られるアミノ酸配列が要求される。これは LXXLL モチーフにも異なる特異性を有するものがあることを示した初めての例である。

E. 結論

DAX-1 の抑制活性が繰り返し配列内の LXXLL を通じた相互作用によることが

明らかになった。またこのモチーフフロイシン以外のアミノ酸がオーファンレセプターとの相互作用に必要であることが明らかになった。

F. 研究発表

(7) 論文発表

- 1, Identification of Novel First Exons in Ad4BP/SF-1 (NR5A1) Gene, and Their Tissue- and Species-Specific Usage. (2000)
R, Kimura, H, Yoshii, M, Nomura, N, Kotomura, T, Mukai, S, Ishihara, K, Ohba, T, Yanase, O, Gotoh, H, Nawata, & K, Morohashi
Biochem. Biophys. Res. Commun. 278, 63-71

(8) 学会発表

1、招待講演

- (1) 第73回 日本内分泌学会 (京都)
4月16～18日
シンポジウム「性の分化機構とその異常」
「性分化の遺伝子制御」
諸橋憲一郎、河辺顕、向井徳男、水崎博文、石原悟
- (2) 第6回 山口県生殖内分泌研究会
(山口) 8月10日
特別講演「生殖腺の性分化と遺伝子

発現調節」

諸橋憲一郎

- (3) 第72回 日本生化学会 (京都)
10月11日～14日
シンポジウム「核内レセプターの高次機能」
「生殖腺の分化を制御する核内受容体の細胞質-核間輸送」
川尻要、生田統悟、鈴木大河、日下雅友、渡辺潤子、諸橋憲一郎

- (4) 第72回 日本生化学会 (京都)
10月11日～14日
シンポジウム「内分泌攪乱物質の生体に及ぼす分子機構」
「生殖腺の性分化と核内受容体の機能」
諸橋憲一郎、中村直仁、鈴木大河、向井徳男、難波聡、水崎博文、河辺顕、藤井義明

- (5) 第53回 日本細胞生物学会年会
(福岡) 10月31日～11月2日
シンポジウム「核内レセプターと脂溶性シグナル分子の発生・分化に対する作用機構」
「生殖腺の分化を支える核内受容体」
諸橋憲一郎、河辺顕、鈴木大河、向井徳男、中村直仁、水崎博文、日下雅友、生田統悟、梅園和彦、川尻要

- (6) 第23回日本分子生物学会(神戸)
12月13~16日
シンポジウム「内分泌攪乱物質の生
体に及ぼす分子機構」
「性の分化を支える遺伝子発現調
節」
諸橋憲一郎、吉岡秀文、川尻要

K. Kawajiri
"Adrenocortical and Gonadal
Differentiation Regulated by
Transcription Factors,
Ad4BP/SF-1
(NR5A1) and Dax-1 (NR0B1)

2、一般演題

- (7) 第3回 内分泌攪乱物質問題に関す
る国際シンポジウム(横浜)
12月16日~18日
生殖腺の性分化を支える転写因子
諸橋 憲一郎

- (1) 第33回日本発生生物学会(高知)
5月27~27日
榎田武史、笠原恵、諸橋憲一郎、吉
岡秀文
ニワトリの性腺特異的に発現する
Ad4BP/SF-1 の発現解析

- (8) 2nd International Symposium on
the Biology of Vertebrate Sex
Determination (Hawaii)
April 10-14
K. Morohashi, K. Kawabe, H.
Mizusaki, T. Suzuki,
N. Nakamura, M. Kasahara,
T. Ikuta, S. Ishihara, H. Yoshika,
K. Umesono, K. Kawajiri
"Transcriptional Regulation in
Differentiating Gonads"

- (2) 第73回日本内分泌学会(京都)
柴田洋孝、池田やよい、諸橋憲一郎、
安藤孝、栗原勲、鈴木利彦、林晃一、
林松彦、齋藤郁夫、猿田享男
副腎腫瘍における核内オーファンレ
セプター COUP-TFI、Dax-1 および
SF-1 による CYP17 遺伝子転写調節

- (9) 9th Adrenal Cortex Conference
(Toronto) Invited Speaker
June 17-20
K. Morohashi, T. Mukai,
K. Kawabe, T. Suzuki,
Mizusaki, S. Ishihara,
K. Umesono,

- (3) 第72回 日本生化学会 (京都)
10月11日~14日
加納拓也、廣谷真樹、升田暢之、諸
橋憲一郎、吉岡秀文、貞野宏之、大
隅隆
転写関連蛋白質と核マトリックスの
相互作用

- (4) 第23回日本分子生物学会(神戸)
12月13~16日