

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13年度研究報告書

平成14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3年度を迎え、引き続き(1)副腎腫瘍(2)先天性副腎低形成症(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、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14年1月18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に関してはCYP17の発現調節因子としてCOUP-TF1などの核内オーファンレセプターの発現異常、ヒトHDL受容体遺伝子CLA-1、MENの原因遺伝子menin、細胞外マトリックス蛋白であるThrombospondin2およびステロイドホルモン合成酵素の異常が関連することを明らかにした。癌化のメカニズムについては癌抑制遺伝子、細胞増殖遺伝子、細胞周期蛋白、Zog遺伝子、アポトーシス関連遺伝子などの異常について研究してきましたが、特に細胞増殖抑制遺伝子TGF β 受容体typeIIの発現低下と副腎癌との関連を示した。副腎偶発腫瘍についてのlongitudinalな疫学的長期予後調査の集計では、第2年度に2493例の報告があり約2/3が良性の副腎皮質腫瘍で、原発性副腎癌は1.6%、転移性副腎癌は4%でした。

(2) 先天性副腎低形成症家系の病因としてDAX-1の遺伝子異常を明らかにし、DAX-1は副腎の発生・分化に関与するAd4BP/SF1を抑制していることを示した。

(3) 副腎性血圧異常症のうち、偽性アルドステロン症の11 β HSD2遺伝子変異、一部の本態性高血圧症や糖尿病性高血圧と11 β HSD2の関連およ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受容体やNaチャンネルの遺伝子変異を明らかにした。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受容体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。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がこれまでの診断法では明らかにできない症例の診断に有用であった。治療法として副腎腺腫の腹腔鏡下手術について検討された。

(4) ステロイドホルモン不応症を来す原因としてグルココルチコイド受容体(GR)と転写調節因子AP-1との相互排他的阻害作用、機能を持たないGR β の存在やGRのレドックス状態、胆汁酸剤のGR作動作用を解明しました。

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や臨床的研究により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14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. グルココルチコイド受容体の細胞内局在の検討7
九州大学大学院医学研究院病態制御内科（第三内科） 名和田 新
2. 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13
東京大学分子細胞生物学研究所 加藤 茂明
3. ヒト不全心における鉱質コルチコイド受容体の免疫組織学的検討21
福井医科大学第三内科 宮森 勇

(2) 副腎腫瘍および副腎性高血圧

4. 副腎皮質腫瘍における核内受容体によるホルモン産生異常機構の検討27
慶應義塾大学医学部内科 猿田 享男
5. 偶発腫瘍の自律性ステロイド産生の評価32
－Dex抑制性と副腎静脈サンプリングとの比較－
横浜労災病院内分泌代謝内科 西川 哲男
6. ヒト副腎皮質癌組織におけるTGF β type II receptor発現低下37
東邦大学医学部第一内科 宮地 幸隆
7. 腹腔鏡下副腎摘出術における合併症と開腹移行症例の検討43
大阪大学大学院医学系研究科
臓器制御医学 器官制御外科学（泌尿器科学） 奥山 明彦
8. 原発性アルドステロン症における連続ACTH・アンジオテンシン受容体拮抗薬投与下
副腎静脈サンプリングの意義－アンジオテンシン II 負荷試験－48
京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学 伊藤 裕
9. 鉱質コルチコイドの非古典的標的組織におけるSGKの発現調節61
東京大学大学院医学研究科内科 藤田 敏郎

(3) 11 β -HSDおよびDHEA

10. 血漿コルチゾール・コルチゾン測定の有用性67
岐阜大学医学部第三内科 安田 圭吾
11. 肥満におけるグルココルチコイド代謝の解析71
レプチン欠損肥満マウス (C57BL/6J ob/ob) における11 β -hydroxysteroid
dehydrogenase type1およびグルココルチコイド受容体の検討ー
浜松医科大学小児科 大関 武彦
12. Dehydroepiandrosterone (DHEA) の抗炎症作用に関する研究77
横浜市立大学医学部第三内科 関原 久彦

(4) 副腎の発生分化および遺伝子

13. グルココルチコイドレセプター依存性遺伝子発現調節における79
脂溶性低分子リガンドの意義
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 田中 廣壽
14. グルココルチコイド受容体とAP-1の相互抑制作用の分子機構の研究84
東京大学医科学研究所 伊庭 英夫
15. LH β 遺伝子プロモーターを用いた変異DAX-1蛋白の機能解析87
旭川医科大学小児科 藤枝 憲二
16. 副腎皮質特異的に遺伝子発現を制御するエンハンサーに関する研究93
岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 諸橋 憲一郎
17. 副腎におけるHDL受容体CLA-1の遺伝子発現制御98
香川医科大学第一内科 村尾 孝児
18. DAX-1とWT-1のヒト全身並びに副腎における発現の検討104
東北大学大学院医学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. SIKの核・細胞質間シャトルによるステロイド合成酵素遺伝子の発現調節112
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 (3年目)

- 副腎偶発腫の長期疫学調査集計報告119
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125

研究班構成員名簿135

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3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、副腎ホルモンの産生並びに作用に異常を示す副腎腫瘍、先天性副腎低形成症、副腎性血圧異常症、ステロイドホルモン不応症の4つの疾患を対象として、分子生物学的レベルで病態を明らかにし、それに基づ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：副腎腫瘍の自律的ホルモン産生機構の獲得に関してはCOUP-TF1, DAX-1などの核内オーファンレセプター、ヒトHDL受容体遺伝子CLA-1、MENの原因遺伝子menin、細胞外マトリックス蛋白であるThrombospondin2 およびステロイドホルモン合成酵素の異常について検討した。癌化のメカニズムについては癌抑制遺伝子、細胞増殖遺伝子、細胞周期蛋白、Zog 遺伝子、アポトーシス関連遺伝子などについて研究した。副腎偶発腫瘍の疫学的長期予後調査を連続3年間行い、頻度、病因、腫瘍の大きさやホルモン分泌能の変動についてlongitudinalな調査を継続した。

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。先天性副腎低形成家系のDAX-1異常、Ad4BP異常および病因不明の先天性副腎低形成症などについて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11 β HSD2の各組織での局所的な重要性、糖尿病性高血圧の電解質異常と11 β HSD2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。本態性高血圧症の数%に原発性アルドステロン症が含まれていることが報告されてきたが原発性アルドステロン症の新しい診断法を確立する。

4)ステロイドホルモン不応症：グルココルチコイドレセプター (GR)と転写制御因子AP-1との相互排他的阻害作用、機能を持たないGR β の存在やGRのレドックス状態、胆汁酸剤のGR作動作用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13年度の研究報告会を平成14年1月18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。以下に研究成果の概要について述べる。

(1) 副腎腫瘍

副腎皮質腫瘍におけるホルモン産生異常が、腫瘍部におけるステロイド合成酵素の遺伝子転写レベルにおける発現異常によることを示した。ステロイド合成酵素遺伝子の発現異常においては、核内受容体のCOUP-TFおよびDAX-1がrepressorとして作用する。またCOUP-TFによる転写抑制機構に関わるcorepressorをクローニングして、COUP-TF1に特異的な蛋白-蛋白相互作用を示すCOUP-TF1-interacting protein-1 (CIP-1)を証明した。

CIP-1は、COUP-TFI, COUP-TFII, SF-1と特異的な相互作用を示し、COS-1細胞においては、COUP-TFIによる転写抑制をCIP-1の過剰発現はさらに増強した。CIP-1は、クッシング症候群副腎腫瘍部において高発現を認め、COUP-TFIの作用発現に重要な転写共役因子であり、ホルモン産生自律能獲得に重要な役割をはたしていることを示した。(猿田)

HDL受容体CLA-1はHDLよりコレステロールを副腎に取り込み、副腎におけるステロイドホルモン合成を促進している。副腎におけるCLA-1の発現は副腎特異的転写因子SF-1, DAX-1のみならず、PPAR- γ 、CaMKK-CaMKIVのカルシウムシグナルによっても制御されること明らかにし、ステロイドホルモン合成の最初の段階であるコレステロール取り込みに様々な情報伝達系が関与することを示した。(村尾)

副腎腫瘍における細胞増殖抑制因子TGF β とTGF β 受容体typeI,IIの発現について検討した。コルチゾールやアルドステロン産生副腎腫瘍および非機能性副腎腫瘍ではTGF β とTGF β 受容体typeI,IIの発現が認められたが、副腎皮質癌ではTGF β 受容体typeIIの著明な発現低下が認められ、TGF β による細胞増殖抑制作用が消失していることが示された。(宮地)

核内蛋白がステロイド合成酵素遺伝子の転写制御因子として注目され、核内蛋白のうちDAX-1, WT-1はステロイド合成、代謝ばかりではなく副腎皮質の発達、病態にも関与している。ヒトでのDAX-1分布は血管内皮細胞、血管平滑筋細胞を含め広範に発現しておりステロイド合成、代謝以外の生物学的作用が考えられた。これに対してWT-1は卵巣上皮細胞、子宮内膜間質細胞などに限局して発現していた。正常ヒト副腎皮質においてDAX-1は胎生期から成人まで広範に皮質細胞で発現していたが、癌化により著明に低下していた。WT-1は一部の皮質細胞に弱い発現を認め、副腎皮質癌ではその発現は完全に喪失していた。(笹野)

副腎偶発腫瘍の自律性コルチゾール産生能は、ACTH負荷副腎静脈採血法による対側副腎機能の低下程度とこの検査とよく相関するDex1mg抑制試験が極めて簡便でかつ有用であった。(西川)

副腎偶発腫瘍のlongitudinalな疫学的長期予後調査の第2年度の集計では2493例の報告があり約2/3が良性の副腎皮質腺腫で、原発性副腎癌は1.6%、転移性副腎癌は4%であった。非機能性腺腫の約60%で副腎の摘出手術を受けていた。副腎癌の大きさのカットオフ値4.8cmやmetabolic syndromeを呈するsubclinical Cushing syndromeの診断と積極的な治療の必要性を明らかにした。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る。(宮地)

このように副腎腫瘍の悪性化や自律的ホルモン産生獲得機序の一部を解明出来、副腎偶発腫瘍の長期予後調査により診療指針作成のためのデータベースを得ることが出来た。

(2) 先天性副腎低形成症(先天性アジソン病)

DAX-1遺伝子は、X連鎖性先天性副腎低形成症の責任遺伝子として同定され、副腎皮質の発生分化、視床下部-下垂体-性腺系の機能、さらに性決定機構に関与している。ヒトDAX-1異常に伴われる性腺機能障害について、変異DAX-1のゴナドトロピン分泌に及ぼす効果について検討した。変異DAX-1蛋白ではLH β 遺伝子の転写抑制活性が著明に減弱しており性腺機能低下症の障害部位は下垂体に存在し、さらに睾丸のセルトリ細胞の障

害があり精子形成がないことを明らかにした。DAX-1の変異あるいは機能と病態の重症度とには明らかな相関がみられなかった。(藤枝)

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。副腎皮質や生殖腺の形成に不可欠なAd4BP/SF-1遺伝子のトランスジェニックマウスを作成し、Ad4BP/SF-1遺伝子の副腎特異的エンハンサーを同定した。(諸橋)

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とそのメカニズムを明らかにすることができた。

(3) 副腎性血圧異常症

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AF2coactivatorの内TIF2,p300のみがAF1の転写活性を上昇させ、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た。その中にCBP/p300とcomplexを作るRNA helicase A(RHA)が認められた。RHA/CBP complexはligandとしてaldosterone selectiveにMRのtarget遺伝子promoter上でMR AF1aにrecruitされ、MRの転写活性を上昇させていることが明らかになった。(加藤)

高ナトリウム食あるいは高カリウム食投与により副腎皮質において特異的に誘導される新しいプロテインキナーゼSIK (salt inducible kinase)はSNF1/AMPK familyに属するセリン・トレオニンキナーゼである。GFPを融合したSIKを作成して、SIKの細胞内局在場所を検索すると、静止状態のY1細胞ではSIKは核内に存在するが、Y1をACTHで刺激するとSIKは核から細胞質に移り、SIKの核外移行にはPKAが関与すること、PKAによってSIKのSer577がリン酸化されることによりSIKの核外移行が起こることが明らかになった。(岡本)

ヒト不全心の剖検左室心筋組織内鉱質コルチコイド受容体(MR)の発現をin situ hybridizationおよび免疫組織学的に検討した。正常心筋に比べmRNAレベル、蛋白レベルいずれにおいてもより強い発現を認め、不全心では基礎疾患の如何にかかわらずMRの過剰発現によりアルドステロンの作用が増強される可能性が示唆された。(宮森)

アルドステロンによる心筋の線維化をdehydroepiandrosterone(DHEA)が抑制し、心機能の低下を改善することが示された。(関原)

鉱質コルチコイド作用である腎Na再吸収には、腎皮質集合管における上皮型Naチャンネル(ENaC)の発現並びに活性制御が関与する。鉱質コルチコイドにより誘導されたSerum and Glucocorticoid-regulated Kinase(SGK)によるENaC制御がその分子基盤となる。ラット大動脈平滑筋細胞及び糸球体内皮細胞において、SGKはaldosterone及びcortisolによりHSP90依存性の古典的鉱質コルチコイド受容体経路を介して特異的に発現誘導された。(藤田)

ヒトでの血漿コルチゾール(F)、コルチゾン(E)を測定し、肝臓、腎臓での相互変換と末梢静脈中での平衡状態を検討した。腎臓では1回の血流通過によりFの約10%、肝臓ではEは約75%、Fも約15%減少した。末梢静脈中のE、F濃度は肝臓より腎臓により強く影響を受けていた。(安田)

肥満やインスリン抵抗性の発症に及ぼすグルココルチコイドとレプチンの関連を検討した。レプチン欠損肥満マウス C57BL/6J ob/obマウスに生食水を投与すると11 β HSD1の reductase活性は増加しdehydrogenase活性および遺伝子発現は低下し、またGRの遺伝子発現は増加を認め、レプチンを投与すると正常対照とほぼ同様な値を示した。これらの結果よりレプチン欠損性の肥満においてはグルココルチコイドの過剰分泌のみでなく末梢における代謝も活性型のグルココルチコイドを増加させるように調節されていることが明らかになった。(大関)

患者数3000万人と推計されている本態性高血圧症の5-10%を原発性アルドステロン症が占めると報告されている。原発性アルドステロン症と本態性高血圧症の鑑別は、フロセミド-立位試験とカプトリル負荷試験の両者が有用であるが、治療に際してはACTH負荷副腎静脈採血法にてアルドステロン過剰分泌が片側性か両側性かを判定する必要がある。(西川)

従来の副腎静脈サンプリング法では診断が困難で、ACTH連続負荷・アンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)投与下での副腎静脈サンプリング法にて診断し得た原発性アルドステロン症の症例を報告した。アンジオテンシンII(AII)負荷試験からサンプリングにおけるARB前投与の有用性が示唆され、ACTH負荷試験からは、ACTHの投与方法・量に関し今後更なる検討が必要と思われた。(伊藤)

腹腔鏡下副腎摘出術を施行した副腎良性腫瘍症例のうちの開腹移行および合併症発生症例の検討を行った。開腹手術移行症例は65例中2例、合併症は術中出血4例、術後出血1例、術後尿溢流1例(開腹移行例)であった。トレーニングを積んだ術者が行う腹腔鏡下副腎摘出術は非常に低侵襲で有用な治療と考えられた。(奥山)

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抵抗性を来す機序としてとグルココルチコイド受容体と他のグループに属する転写制御因子のAP-1(cFos/cJun heterodimer)がクロマチン構造変換因子SWI/SNFと競合的相互排他的阻害することによることを明らかにした。また細胞増殖抑制性の癌抑制遺伝子を発現するレトロウィルスベクターの作製に成功した。(伊庭)

グルココルチコイド受容体(GR)のうち、GR α はリガンド依存性に核移行しクラスター状分布するが、antagonistであるRU486やGR β はGR α のクラスター状分布を抑制した。GR α はリガンド依存性にCBPやSRC-1、TIF2などのcoactivatorをクラスターにリクルートした。GRのクラスター状分布と転写活性の相関が示され、グルココルチコイド抵抗症の診断などの臨床応用への可能性が示された。(名和田)

グルココルチコイドなどのホルモン作用はホルモンリガンドとそのレセプターのみならず細胞内外の多くの因子によって制御される。胆汁酸製剤であるウルソデオキシコール酸UDCA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、作用選択的グルココルチコイドレセプター(GR)作動薬であり、合成グルココルチコイドCVZはGR選択的リガンドと考えられる。GR機能はリガンドなどの低分子化合物によって制御されており、GRとの相互作用を解析することにより新しい薬剤の開発の可能性はある。(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検討されだした。

分担研究報告

(1) ステロイドホルモン受容体

グルココルチコイド受容体の細胞内局在の検討

齋藤雅之、高柳涼一、森永秀孝、野村政壽、岡部泰二郎、後藤公宣、柳瀬敏彦、
名和田 新
九州大学大学院医学研究院病態制御内科，老年医学，CREST

研究要旨

グルココルチコイド受容体(GR)の細胞内局在を検討した。GR α はリガンド依存性に核移行しクラスター状分布するが、AntagonistであるRU486やGR α のisoformであるGR β はGR α のクラスター状分布を抑制した。また、GR α はリガンド依存性にCBPやSRC-1, TIF2などのcoactivatorをクラスターにリクルートした。以上の結果より、GRにおいてクラスター状分布と転写活性の相関が示され、グルココルチコイド抵抗症の診断などの臨床応用への可能性が示唆された。

A.研究目的

活性化核内受容体はTarget geneと異なる箇所の核内にクラスター状に分布するとされているが、その生理的意義やメカニズムは不明である。我々は、アンドロゲン受容体(AR)の転写活性化機構の研究において、ARの核内でのクラスター状分布は転写活性と相関する事を見出した(1)。また、活性化ARはCBPやSRC-1, TIF2などのcoactivatorをクラスターにリクルートすること及び活性化グルココルチコイド受容体(GR α)、エストロゲン受容体(ER)もARと同一クラスターに分布することも明らかにした(1)。一方、GRにはGR α とGR β の2つのisoformが存在することが知られ、GR β はGR α の転写活性に対して、抑制的に作用することが明らかにされている(2)。今日、GR α の転写活性化機構並びにGR β の作用機構を共焦点顕微鏡を用いた核内分布の観点から検討した。

B.研究方法

GFP, YFPなどの蛍光蛋白でラベルしたGR α -GFP、GR β -GFP、YFP-SRC-1、YFP-TIF2、YFP-CBPをCOS7、ヒト繊維芽細胞にSuperfectを用いて強制発現させ、共焦点顕微鏡にて細胞内分布を観察した。GR転写活性は、レポーター遺伝子としてMMTV-pGL3を使用し、Dual Luciferase Reporter Assay System (promega)でルシフェラーゼ活性を測定した。

C.研究結果

GR α -GFPは、リガンド非存在下では細胞質に分布するがリガンド(デキサメサゾン 10⁻⁷ M)添加により核移行し、核内にクラスター状に分布した(図1)。まずこのクラスター状分布の詳細を調べるため、最近我々が開発した方法(3)に従い、三次元画像を構築した。リガンド存在下では、GR α -GFPはAR同様、ヘキスト33342で濃染されない、クロマチン構造が緩んで転写が行われていると考えられているEuchromatin領域に核当たり約300のクラスターを形成して分布した(図2)。また、GR α のAntagonistであるRU486 (10⁻⁶ M)存在下ではGR α -GFPの核移行は阻害されなかったものの核内にびまん性に分布した(図3)。一方GR β -GFPはリガンドの有無にかかわらず、核内にびまん性に分布した(図4)。GR β はDose DependentにGR α の転写活性を抑制するが(図5)、GR β 共発現下(GR α の5倍量)では、GR α -GFPは核内にびまん性に分布した(図6)。更にYFP-SRC-1、YFP-TIF2、YFP-CBPは核内にびまん性—軽度クラスター状に分布するが、GR α 及びリガンド存在下ではクラスター状に分布し、GR α はAR同様、リガンド依存性にこれらのcoactivatorをクラスターへリクルートすることが示唆された(図7)。

D. 考察

生体内におけるGR α の転写活性は、リガンド濃度、GR β 、NF- κ B、AP-1などによって制御されている。その中でもGR β は、発現量が多い組織もあり、GR α の転写調節に重要である。GR β のGR α 転写活性抑制のメカニズムとして、GR β はtarget gene 上流のGREにより高いaffinityで結合するため、GR α がGREに結合できなくなる機序や、GR β が直接GR α に結合し、GR α の転写活性が抑制される機序が提唱されている(4)。活性化ERはクラスターとERE間で素早く結合・遊離を繰り返しており、その大部分がクラスター状に分布し、残りがEREに分布していることも報告されており(5)、図4の結果はGR β は直接GR α に結合し、GR α がクラスター状に分布できないformとなる事を示唆する。また、図1、2、3、7の結果より、GR α の細胞内分布の機序はステロイドレセプター間でもhomologyの高いARと同様であり、GR α のリガンド依存性クラスター状分布は転写活性と相関していると考えられた。蛍光蛋白でラベルしたステロイドレセプターのクラスター形成度を調べることは、従来のレポーターアッセイと比較してレポーター遺伝子が不要である、核移行の有無も観察できるなど利点があり、今後転写活性を調べる有力な手段となることが期待される。日常診療においてグルココルチコイドは抗炎症作用、免疫抑制作用、ステロイド補充などの目的で多領域で頻用されている。しかし副作用が問題となったり、逆に大量投与にても全く効果のないグルココルチコイド抵抗性のcaseが存在する。そこで今後我々は、正常人リンパ球におけるGR α -GFPのクラスター形成度の定量化することにより、ステロイド効果の投与前診断への応用を試みる予定である。

E. 結論

GR α の細胞内分布の機序はARと同様であり、GR α のリガンド依存性クラスター状分布は転写活性とリンクしていると考えられた。

参考文献

1. Saitoh M, Takayanagi R, Goto K, Fukamizu A, Tomura A, Yanase T, Nawata H. 2002 Mol Endocrinol in press
2. Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. 1996 J Biol Chem. 271, 9550-9559
3. Tomura A, Goto K, Morinaga H, Nomura M, Okabe T, Yanase T, Takayanagi R, Nawata H. 2001 J Biol Chem 276, 28395-28401.
4. Oakley RH, Jewell CM, Yudt MR, Bofetiad DM, Cidlowski JA. 1999 J Biol Chem. 274, 27857-27866
5. Stenoien DL, Patel K, Mancini MG, Dutertre M, Smith CL, O'Malley BW, Mancini MA. 2001 Nat Cell Biol. 3,15-23

F. 研究発表

1. 論文発表

Mu Y-M, Yanase T, Nishi Y, Takayanagi R, Goto K, Nawata H
Nuclear receptor system constituted by PPAR γ :RXR heterodimers inhibits the expression of cytochrome P450arom in human granulosa cells. Mol Cell Endocrinol 181 239-248, 2001

Nishi Y, Yanase T, Mu Y, Oba K, Ichino I, Saito M, Nomura M, Mukasa C, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Kashimura Y, Haji M, Nawata H
Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN that expresses functional FSH receptor. Endocrinology 142 437-445, 2001

Mu Y, Yanase T, Nishi Y, Saito M, Nomura M, Mukasa C, Okabe T, Goto K, Nawata H
Saturated free fatty acids, palmitic acid and stearic acid induces apoptosis of human granulosa cells. Endocrinology 142 3590-3597, 2001

Tomura A, Goto K, Morinaga H, Nomura M, Okabe T, Yanase T, Takayanagi R, Nawata H.
The subnuclear three-dimensional image analysis of androgen receptor fused to green fluorescence protein. J Biol Chem 276 28395-28401, 2001

Saitoh M, Yanase T, Morinaga H, Tanabe M, Mu YM, Nishi Y, Nomura M, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Nawata H.
Tributyltin or Triphenyltin Inhibits Aromatase Activity in the Human Granulosa-like Tumor Cell Line KGN. Biochem Biophys Res Commun. 289 198-204, 2001

Yanase T, Mu YM, Nishi Y, Goto K, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R, Nawata H.
Regulation of aromatase by nuclear receptors. J Steroid Biochem Mol Biol. 79:187-192, 2001

Saitoh M, Takayanagi R, Goto K, Fukamizu A, Tomura A, Yanase T, Nawata H.
The presence of the amino- and carboxyl-terminal domains in androgen receptor is essential for the completion of a transcriptionally active form with coactivators and intranuclear compartmentalization common to the steroid hormone receptors : A three-dimensional imaging study. Mol Endocrinol in press, 2002

2. 学会発表

第9回日本ステロイドホルモン学会
グルココルチコイド受容体の細胞内局在の検討
斎藤雅之、高柳涼一、後藤公宣、
柳瀬敏彦、名和田 新

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

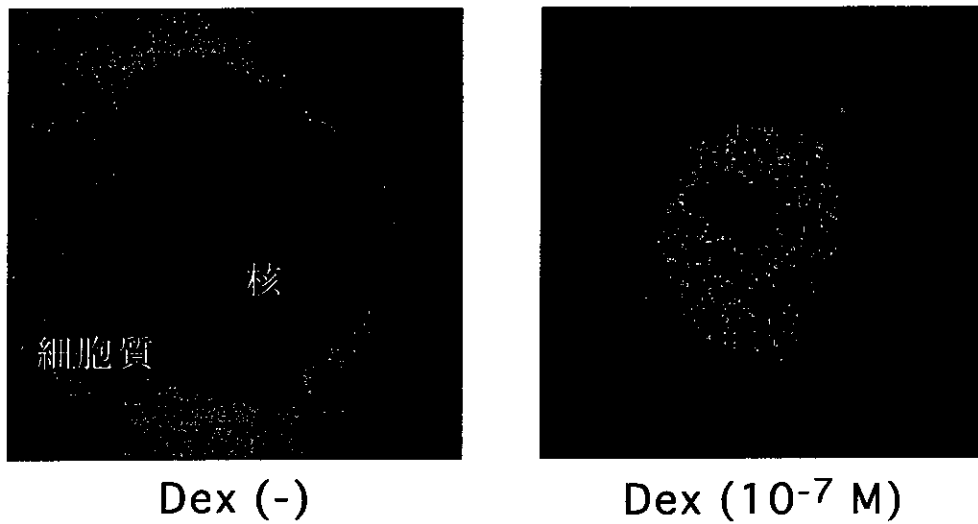


図 1 GR α -GFPの細胞内局在

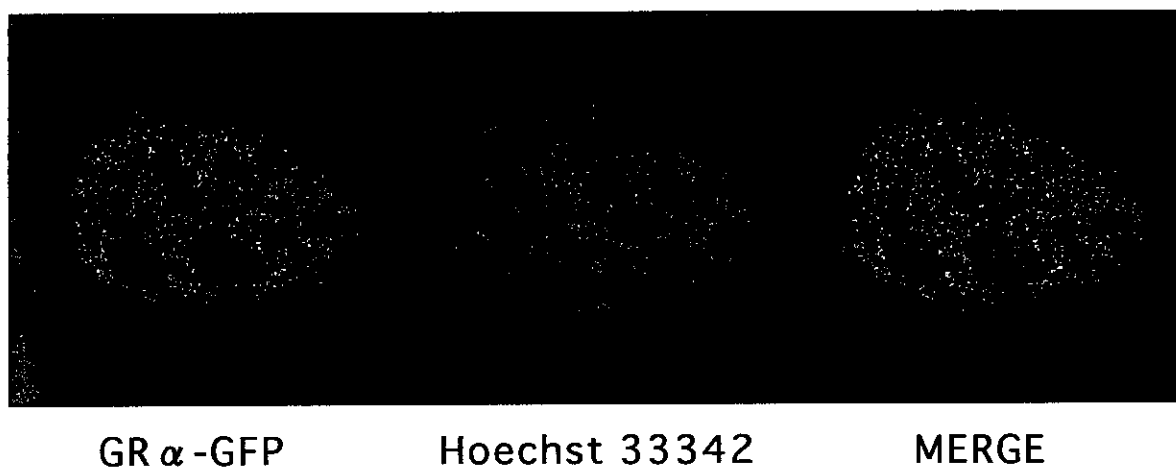


図 2 GR α の核内局在 (3次元解析)

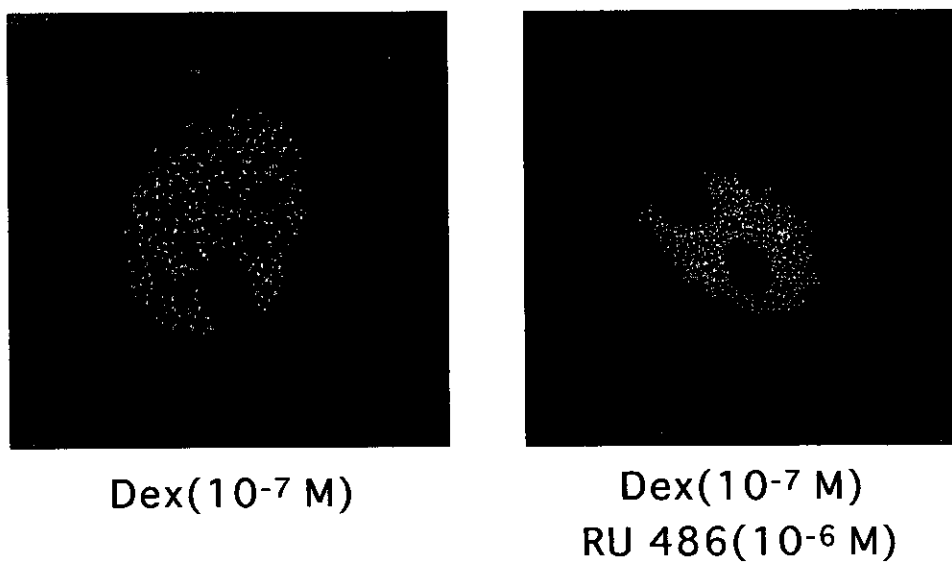
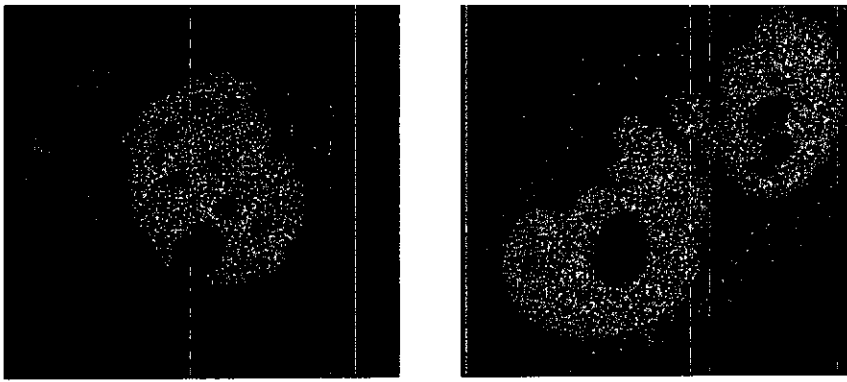


図 3 RU486によるGR α 依存性クラスター形成の抑制



Dex (-)

Dex (10^{-7} M)

図4 GRβの細胞内局在

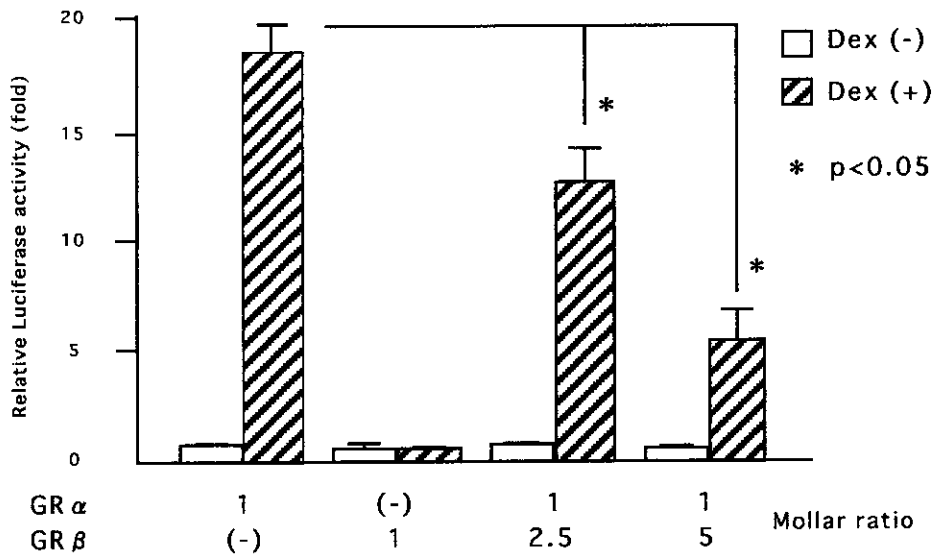
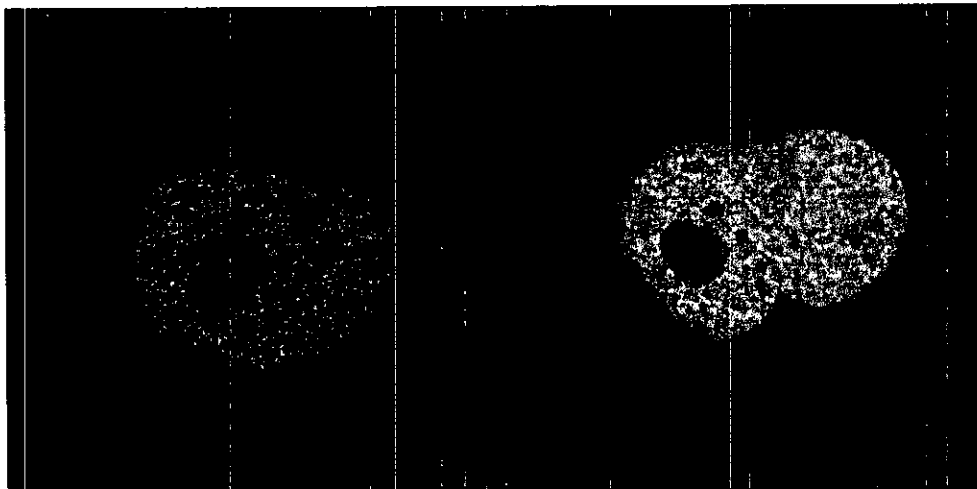


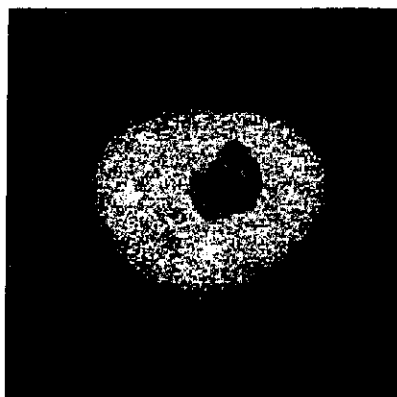
図5 GRβのGRα転写活性の抑制



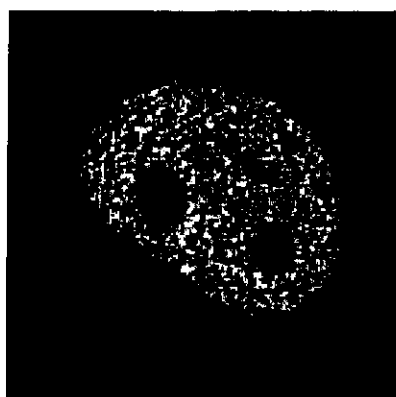
GRα-GFP

GRα-GFP
+
GRβ

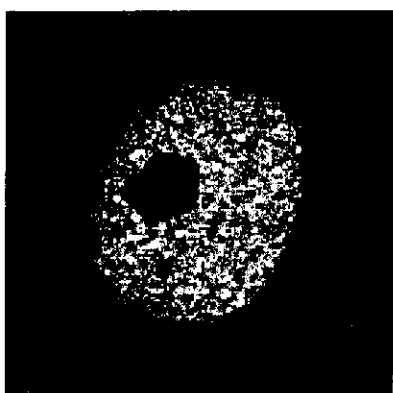
図6 GRβによるGRα依存性クラスター形成の抑制



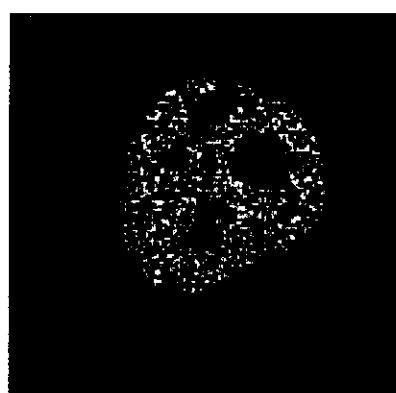
GR α
YFP - SRC-1
(YFP - TIF2)
DEX (-)



GR α
YFP - SRC-1
(YFP - TIF2)
DEX (+)



GR α
YFP - CBP
DEX (-)



GR α
YFP - CBP
DEX (+)

図 7 GR α の転写共役因子のリクルート

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AF2coactivator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。

昨年度までに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CBP/p300とcomplexを作るとされているRNA helicase Aが認められた。

本年度はそのcomplexがMRの転写にどのように影響しているのかを解明しようとした結果それはMRの生体内ligand selectiveな転写に影響を与えることが明らかになった。

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. Baculo virus 発現系を用いた MRAFI 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

我々がすでに同定していた2つのAF1存在領域AF1a,AF1bの内N末端の1-169aa.部分(AF1a)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。

2. 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。

3. MR との結合の確認

得られた因子とMRとの結合をGST pull down,co-immunoprecipitationにて確認する。

4. MR 転写に対する影響の解析

ChIP assayにてMR target 因子 promoter上でのrecruitを証明し、さらにreporter assayにてMR転写に対する影響を解析する。

(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. Baculo virus 発現系を用いた MR AF1 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

Baculo virus にて作成した GST 融合 MR AF1a タンパクを作成し、HeLa 細胞核抽出液より結合因子を精製し、MALDI-TOF MS を用いた mass fingerprinting にてそれらを同定した結果 RHA, CBP をその中に見いだした。

さらにそれらを glycerol density gradient にかけて、complex を形成しているもののみを集めた結果そのヒストンアセチル化活性がその複合体にあることが分かり、その complex の中に RHA, CBP が存在した。従って RHA, CBP を含む複合体が MR-AF1a に結合していることが明らかになった。(Fig1)

2. RHA, CBP complex と MR の結合確認

GST pull down により RHA は MR AF1a と直接結合することが明らかになった。

また RHA の deletion mutant を用いることにより RHA 側の結合領域も同定した。

次に in vivo での結合様式を明らかにするため co-immunoprecipitation, ChIP assay を行った。その結果 RHA/CBP complex は ligand dependent に MR AF1a 領域に結合するのであるが、MR の生体内 ligand である aldosterone, hydrocortisone の内 aldosterone のみに反応して結合し、MR の target 遺伝子である Na-K-ATPase, EnaC promoter 上に recruit されることが明らかになった。(Fig2)

3. MR 転写に対する影響の解析

reporter assay によって RHA と CBP は協調的に MR AF1a の活性は上昇させるが、p160 family の一つである TIF2 は AF1b のみを活性化することが明らかになった。(Fig3)

さらに MR 全長においては RHA と CBP は ligand としては aldosterone selective に MR の転写を上昇させ、それには AF1a 領域が必要であることが明らかになった。(Fig4)

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 complex ごととてくることが重要と考えられている。我々はこれまでにいくつかの核内受容体の AF1 coactivator を同定してきた。核内受容体には ligand によって recruit される coactivator が違うことが既に分かっているが、MR に対する RHA/CBP complex が AF1 に recruit され、その度合いが ligand により異なるという事実は mechanistic に興味深い。さらにその二つの ligand が生体内 ligand であることからその生体内での biological effect の違いを説明する可能性があると考えられる。

近年核内受容体の coactivator は complex として機能しており、それらを complex として取得することが重要と考えられている。我々が今回確立したタンパク精製からそのタンパクの同定に至る process は今後も核内受容体の転写メカニズムを解明していく上で非常に有用な手段となると考えられる。

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-