

- 6)中川祐一、劉雁軍、大関武彦:11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2の異常と関連疾患. ホルモンと臨床 1998, 増刊号 :17-20.
- 7)Liu YJ, Nakagawa Y, Toya K, et al. : Effects of spironolactone on systolic blood pressure in experimental diabetic rats. 2000, 57: 2064-2071.
- 8)Seckl JR, Walker BR : Minireview: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1— a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. Endocrinology 2001, 142: 1371-1376
- 9)Nakanishi T, Li R, Liu Z et al.: Sexual dimorphism in relationship of serum leptin and relative weight for the standard in normal-weight, but not in overweight, children as well as adolescents. Eur J Clin Nutr 2001, 55: 989-993.
- 10)De Vos P, Saladin R, Auwerx J, et al.: Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. J Biol Chem. 1995, 270:15958-15961.
- 11)Bornstein SR, Uhlmann K, Haidan A, et al.: Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. Diabetes 1997, 46: 1235-1238.
- 12)Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, et al. : Differentiation of adipose stromal cells: the roles of glucocorticoids and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. Endocrinology 1999, 140: 3188-3196.
- 13)Livingstone DEW, Jones GC, Smith K, et al. : Understanding the role of glucocorticoid in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. Endocrinology 2000, 141: 560-563.
- 14)Picard F, Richard D, Huang Q, et al. :Effects of leptin adipose tissue lipoprotein lipase in the obese ob/ob mouse. International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders 1998, 22: 1088-1095.
- 15)Jenson M, Kilroy G, York DA, et al.: Abnormal regulation of hepatic glucocorticoid receptor mRNA and receptor protein distribution in the obese Zucker rat. Obesity Res 1996, 4:133-143.
- 16)Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, et al.: Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. Diabetes 1996, 45: 531-535.
- 17)Harris RB, Zhou J, Redmann SM, et al.: A leptin dose-response study in obese(ob/ob) and lean(+/?) mice. Endocrinology 1998,139: 8-19.

F. 研究発表

1. 学会発表

中川祐一、劉雁軍、中西俊樹、三枝弘和、李仁善、藤澤泰子、大関武彦
：レプチン欠損肥満マウス(C57BL/6J)の肝臓における11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1およびグルココルチコイド受容体の解析.
第9回日本ステロイドホルモン学会.平成13年11月27日.東京

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

3.その他

なし

表：生食水およびレプチン投与肥満マウスにおける
 血中グルコース、コルチコステロン、インスリン値

群	N	グ ル コ ー ス (mg/dl)	コ ル チ コ ス テ ロ ン (μ g/dl)	イ ン ス リ ン (pmol/l)
生食水投与 対照マウス	8	152 \pm 11	4.4 \pm 1.2	32 \pm 2.7
生食水投与 肥満マウス	9	188 \pm 15*	13.9 \pm 3.3#	148 \pm 12.6#
レプチン投与 肥満マウス	8	136 \pm 12¶	8.1 \pm 1.8*	79 \pm 9.8¶

値は平均値 \pm 標準誤差で示す. *P < 0.05 (対照マウスとの比較)

#P < 0.001 (対照マウスとの比較)

¶P < 0.01 (生食水投与肥満マウスとの比較)

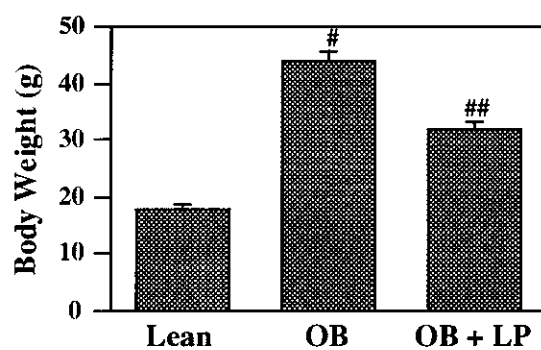


図 1. 生食水投与肥満マウス (OB)、レプチン投与肥満マウス (OB+LP)

および生食水投与対照マウス (Lean) における体重の比較.

#P < 0.001 (Lean との比較). ##P < 0.01 (OB との比較).

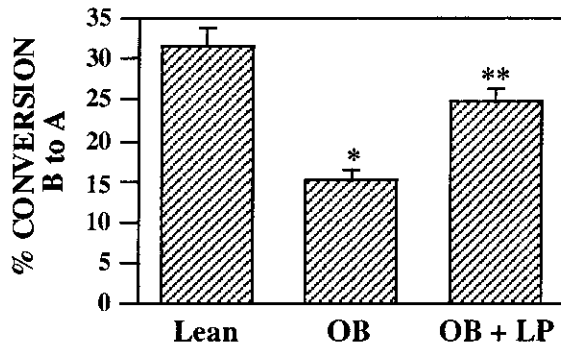


図2. 肝臓における 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 の dehydrogenase 作用の検討.

酵素活性はコルチコステロン(B)からデハイドロコルチコステロン(B)への転換率で求めた.

Lean:生食水投与対照マウス. OB:生食水投与肥満マウス. OB+LP:レプチン投与肥満マウス.

* $P < 0.001$ (Lean との比較). ** $P < 0.01$ (OB との比較).

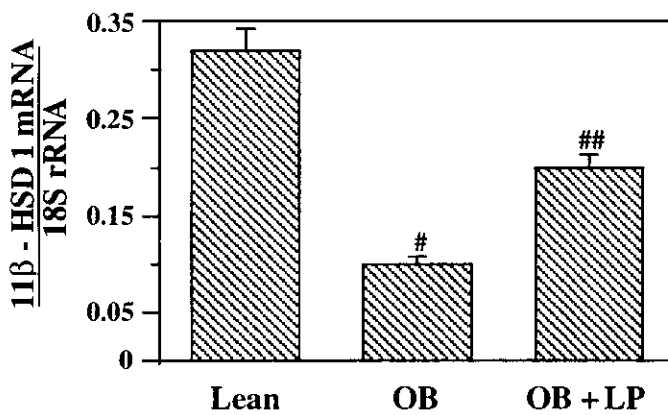


図3. 肝臓における 11β hydroxysteroid dehydrogenase type 1 遺伝子発現の検討.

遺伝子発現量は 11β hydroxysteroid dehydrogenase type 1 と 18S rRNA の遺伝子発現量の比により表した.

Lean:生食水投与対照マウス. OB:生食水投与肥満マウス. OB+LP:レプチン投与肥満マウス.

$P < 0.001$ (Lean との比較). ## $P < 0.01$ (OB との比較).

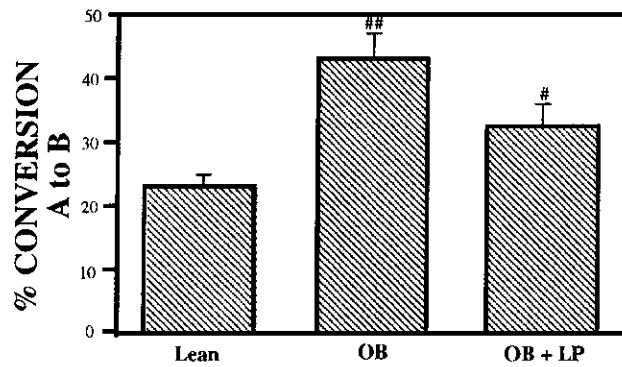


図4. 肝臓における11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1の reductase 作用の検討.
 酵素活性はデハイドロコルチコステロン(A)からコルチコステロン(B)への転換率で求めた.
 Lean:生食水投与対照マウス. OB:生食水投与肥満マウス. OB+LP:レプチン投与肥満マウス.
 ##p< 0.001 (Leanとの比較). #P < 0.01(OBとの比較).

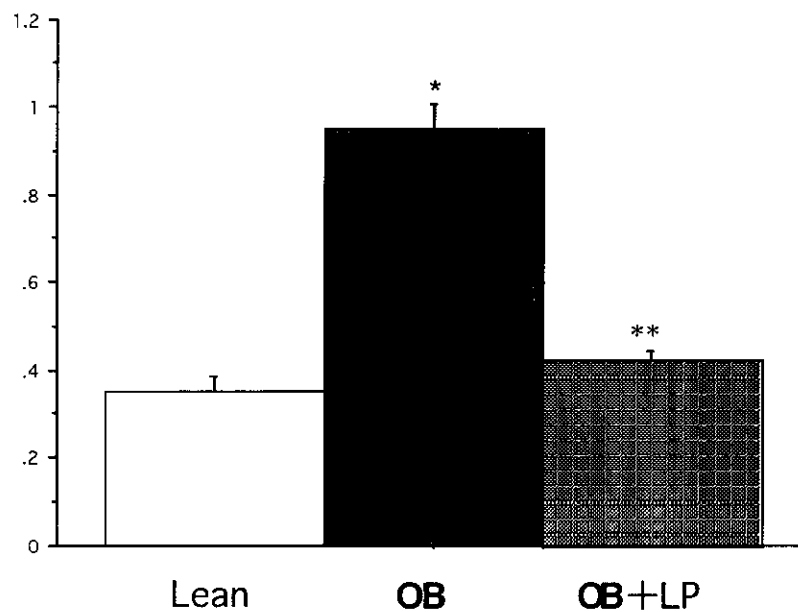


図5. 肝臓におけるグルココルチコイド受容体遺伝子発現の検討.
 Lean:生食水投与対照マウス. OB:生食水投与肥満マウス. OB+LP:レプチン投与肥満マウス.
 *p< 0.001 (Leanとの比較). **P < 0.01(OBとの比較).

Dehydroepiandrosterone (DHEA)の抗炎症作用に関する研究

横浜市立大学第3内科

関原久彦

研究要旨

マウス肝炎モデルにおいて DHEA は著明な肝障害抑制効果を示した。

肝炎モデルでの解析では、DHEA には各種サイトカイン遺伝子の転写調節による抗炎症作用、アポトーシス抑制作用を認めた。

A. 研究目的

Dehydroepiandrosterone (DHEA) は副腎から分泌される主要なホルモンの一つであるが、いまだその生理的意義ははっきりしない。我々は DHEA の抗炎症作用を各種サイトカインの転写レベルでの抑制および、アポトーシスに対する作用を肝炎モデルマウスにおいて検討を行うことを計画した。

B. 研究方法

マウス急性肝炎モデルは、植物レクチンである Concanavalin A をマウス尾静脈より静注することにより作成する。DHEA の急性肝炎に対する薬理作用を血清トランスアミナーゼ値を測定することにより評価する。各種サイトカイン、ケモカインの遺伝子発現の変化は、Realtime PCR により定量する。肝組織は炎症に対して容易にアポトーシスに陥るが、DHEA がアポトーシスを抑制するかを、TUNEL や、DNA Ladder 法を用いて検討する。

C. 研究結果

(1) *in vivo*

DHEA の肝炎に対する効果を調べるため、Con A 投与後 30 時間後における肉眼所見及び H-E 染色標本による病理所見を観察したところ、control 群では広範な bridging necrosis が認められたのに対し、DHEA 投与群ではネクロシスの著明な減少が認められた。Con A 投与後 0、8、20、30 時間後の GPT 値では、DHEA 投与群が有意に減少していた。また、DHEA 投与群の GPT 値は DHEA の容

量に依存して著減しており、DHEA の特異的作用ではないことが示された。さらに Real-time PCR 法による各種炎症性メディエーターの mRNA レベルでの発現も、DHEA 投与群においては劇的に抑制していた。一方で TUNEL 法及び DNA ラダー法においても、DHEA 投与群ではアポトーシス細胞数が顕著に減少していた。

(2) *in vitro*

DHEA の直接的効果を見るために、H4IIE 細胞に DHEA を暴露後、アポトーシスを誘導した実験では、アポトーシス細胞を TUNEL 法及び DNA ラダー法を用いて検出したところ、DHEA 投与群でアポトーシス細胞数が顕著に減少していた。また、RAW 細胞において、LPS にて刺激後、DHEA を投与し、Real-time PCR 法によって炎症性メディエーター(TNF- α ・iNOS)の発現を測定したところ、これも DHEA 投与群が劇的に発現を抑制していた。

D. 考察

in vivo 及び *in vitro* における結果より、DHEA は Con A によって活性化された T cell より促進される IFN- γ 、TNF- α や iNOS などの炎症性メディエーターやサイトカインの発現の転写レベルでの抑制を介して炎症を抑制していると考えられた。また、グルココルチコイドがアポトーシスを誘導するのに対し、DHEA はアポトーシスのメディエーターとして知られている Fas の発現を抑制することによってアポトーシスを抑制していると考えられた。

E. 結論

DHEA は、副腎より分泌される重要なホルモンの一つであり、米国では OTC(over the counter)として、容易に入手できる薬剤である。しかし、一方で、その生理的作用は未だよくわかっていない。今回、本稿では、我々の自験成績であるマウス肝組織及びラットの培養肝細胞における DHEA のアポトーシス抑制作用を報告したが、1999 年には Kasper らが、cyproterone acetate(CPA)によってアポトーシスを誘導された、ラットの初代培養肝細胞において DHEA の抗アポトーシス作用を報告しており、また、2000 年には Chmielewski らが dexamethasone によって誘導された胸腺細胞においてアポトーシスの抑制作用を報告している。以上よりアポトーシス抑制作用を介した DHEA の抗炎症作用は、生理的作用を解明していく突破口となるだろうと考えられ、今後の研究の発展が望まれるところである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Aoki K, Homma M, Hirano T, Oka K, Satoh S, Mukasa K, Ito S, Sekihara H: mRNA and enzymatic activity of hepatic 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 are elevated in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life Sci.* 2001: 69(21), 2543-2549

8. 青木一孝、関原久彦: DHEA の生理的意義 *内分泌・糖尿病科* 2001;13(1): 104-108

9. 青木一孝、関原久彦 デヒドロエピアンドロステロン (DHEA), デヒドロエピアンドロステロンサル

フェイト (DHEA-S), *臨床検査診断マニュアル* 2001:627-629

10. 青木一孝、関原久彦 副腎アンドロジェン *Annual Review 内分泌,代謝* 2002: 234-238

2. 学会発表

1. 青木一孝, 松井大輔, 武山健一, 加藤茂明, 向笠浩司, 関原久彦: デヒドロエピアンドロステロンの糖新生系酵素 glucose-6-phosphatase の転写調節に与える影響: *日本内分泌学会総会*, 平成 13 年 6 月

2. Aoki K, Matsui D, Schmoll D, Takeyama K, Kato S, Sekihara H: Effect of dehydroepiandrosterone on glucose-6-phosphatase gene promoter on in H4IIE cells. *米国内分泌学会 アメリカ(デンバー)* 平成 13 年 6 月

3. Yoshida S, Nakajima A, Sekihara H: Novel therapy for acute hepatitis utilizing DHEA. *米国内分泌学会 アメリカ(デンバー)* 平成 13 年 6 月

4. 中島 淳、関原久彦
DHEA を用いた急性肝障害の治療法
日本消化器免疫学会ワークショップ 平成 13 年 8 月

5. 中島 淳、関原久彦
DHEA を用いた急性肝障害の治療法
日本消化器病学会シンポジウム 平成 13 年 10 月
H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
特になし

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

(4) 副腎の発生分化および遺伝子

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脂溶性低分子 リガンドの意義

田中 廣壽^{1,2}、吉川 賢忠^{1,2}、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

研究要旨

近年、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ことが判明している。また、リガンドによるレセプター機能調節機構は実に多彩であり、その解明はレセプターを標的とした創薬への展開を考える上でも重要である。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 UDCA は作用選択的グルココルチコイドレセプター(GR)作動薬の、合成グルココルチコイド CVZ は GR 選択的リガンドの、各々プロトタイプと考えられる。GR 機能はリガンドなどの低分子化合物によって多彩に制御可能であり、今後、GR との相互作用を詳細に解析することによってすぐれた薬剤の開発に貢献できる可能性がある。

A. 研究目的

副腎皮質ステロイドホルモン作用はホルモンとその標的臓器に存在するレセプターのみならず、他の因子によっても精緻に制御されることが明らかになっている。たとえば、細胞内の環境や他のシグナル伝達系とのクロストークに関する報告が蓄積しており、われわれも、副腎皮質グルココルチコイドの働きが細胞の酸化還元環境によって修飾されることを報告した。一方、レセプター以降の、転写制御に関わる転写共役因子やメディエーターなども同定され、副腎皮質ステロイ

ドホルモン作用機構の全貌の解明に近づきつつある。ホルモン作用を規定する因子をすべて同定して、その分子機構を解明することは、したがって、ホルモンの生体内における意義やその働きの異常を解析するにあたりきわめて重要である。また、得られた知見をもとに、ホルモン抵抗症や過敏症などの病態において、新たな原因を発見しうる可能性もある。すでに、アンドロゲンレセプターに関して、転写共役因子の異常によってアンドロゲン不応症となり、睾丸女性化症をあらわしている患者が報告されている。

ここで、副腎皮質ステロイドホルモンの中でもグルココルチコイドは、生理的には視床下部-下垂体-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レセプター (GR) を介して発現する。GR は核内レセプター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。一方、グルココルチコイドは多くの疾患治療にも用いられており、薬理的に重要な免疫抑制作用、抗炎症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されている。なかでも、転写因子 AP-1 や NF- κ B 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も重要といえる。

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 を活性化させるが転写活性を誘導しないことを明らかにしている。また、合成グルココルチコイドであるコルチバゾール(CVZ)はきわめて強力な GR アゴニ

ストであるが電解質貯留作用はほとんどないことが知られている。したがって、これらの低分子化合物による GR 活性化以降の過程を究明することは GR 機能の多彩な修飾機構の分子基盤解明に大きく貢献すると考えられる。そこで、本研究は、UDCA と CVZ をモデル化合物として低分子化合物リガンドによる GR 応答性遺伝子発現制御機構を解明することを目的とする。これらにより、GR 機能を選択的に発現させるリガンド創成の基盤構築が可能になるであろう。

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 をはじめとした核内レセプターの細胞内局在は、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ェントトランスフェクションによって測定した。GR の抗 NF- κ B 作用は phorbol myristate ester (PMA)刺激下の NF- κ B 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 の作用機構

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 μ M の場合約 6 時間で約 70% の細胞で GR は核に局在した。しかし、他のステロイドホルモンレセプターの局在には影響なかった。
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、に比してきわめて弱かった。しかし、抗 NF- κ B 作用は DEX とほぼ同等であった。
3. Gal4 融合タンパクを用いて、UDCA による抗 NF- κ B 作用のメカニズムを解析した。UDCA は GR 依存性に、p65 の転写活性化能を抑制することが示唆された。
4. UDCA は GR のリガンド結合領域の C 末端部分に作用すること、作用部位は DEX とは異なることが判明した。
5. UDCA によって活性化された GR は転写共役因子である TIF2 とは相互作用しなかった。

(2) CVZ

1. 各種ステロイドレセプターの細胞内局在に与える作用を CVZ、デキサメタゾン (DEX)、コルチゾール(F)を比較した検討した。CVZ は GR のみを核に移行させた。DEX と F は GR のみならずミネラルコルチコイドレセプター(MR)をも核に移行させた。
2. CVZ は GR のリガンド結合領域の比較的広範な領域と結合する可能性が示された。

D. 考察

UDCA は作用選択的 GR 作動薬の、CVZ は GR 選択的リガンドの、各々プロトタイプと考えられる。今後、GR との相互作用を詳細に解析することによってすぐれた薬剤の開発に貢献できる可能性がある。

E. 結論

GR 機能はリガンドなどの低分子化合物によって多彩に制御可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Toshio Homma, Osamu Hosono, Satoshi Iwata, Susumu Ando, Katsutoshi Sasaki, Tatsunari Nishi, Hiroshi Kawasaki, Hirotohi 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. 2001 Feb;44(2):296-306

2) Keiji Komura, Shin-ichi Hayashi, Kensaku Okamoto, Isao Makino, Lorenz Poellinger, Hirotohi Tanaka.

Aryl hydrocarbon receptor/dioxin receptor in U937 cells and human macrophages.

Mol. Cell. Biochem., 2001;226:107-117

3) Yasutomo Nomura, Hirotohi Tanaka, Lorenz Poellinger, Fumihiro Higashino, Masataka Kinjo.

Monitoring of *in vitro* translation of green fluorescent protein and its fusion proteins by fluorescence correlation spectroscopy.

Cytometry, 2001;44:1-6

4) Yuichi Makino, Renhai Cao, Kristian Svensson, Goran Bertilsson, Mikael Asman, Hirotohi Tanaka, Yihai Cao, Anders Berkenstam, Lorenz Poellinger.

Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression

Nature, 2001;414(29):550-554

5) Takanori Miura, Rika Ouchida, Noritada Yoshikawa, Yuichi Makino, Tetsuya

Nakamura, Chikao Morimoto, Isao Makino, Hirotohi Tanaka

Functional modulation of the glucocorticoid receptor and repression of NF- κ B by ursodeoxycholic acid.

J. Biol. Chem., 2001;276: 47371-47378

6) Jacqueline McGuire, Kensaku Okamoto, Murray L. Whitelaw, Hirotohi Tanaka, and Lorenz Poellinger

Definition of a Dioxin Receptor Mutant that is a Constitutive Activator of

Transcription: Delineation of overlapping repression and ligand binding functions within the PAS domain

J. Biol. Chem., 2001;276: 41841-41849

7) Noritada Yoshikawa, Yuichi Makino, Kensaku Okamoto, Isao Makino, Hirotohi Tanaka

Distinct interaction of cortivazol with the ligand binding domain confers glucocorticoid receptor specificity.

J. Biol. Chem., 2002;277: 5529-5540

8) Tetsuya Nakamura, Rika Ouchida, Tsunenori Kodama, Toshiyuki Kawashima, Yuichi Makino, Noritada Yoshikawa, Sumiko Watanabe, Chikao Morimoto, Toshio Kitamura, and Hirotohi Tanaka

Cytokine Receptor Common Subunit-mediated STAT5 Activation Confers NF- κ B Activation in Murine proB Cell Line Ba/F3 Cells

J. Biol. Chem. 2002;277: 6254-6265

9) Saeko Kataoka, Akihiko Kudo, Hiroshi Hirano, Hayato Kawakami, Toshio Kawano,

Eiji Higashihara, Hirotohi Tanaka, Francoise Delarue, Jean-Daniel Sraer, Tomoatsu Mune, Zygmund S. Krozowski, and Kunimasa Yan
11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Is Expressed in the Human Kidney Glomerulus
J Clin Endocrinol Metab 2002;87: 877-882

10) Takeyuki Nishi, Noriaki Shimizu, Masaki Hiramoto, Yuki Yamaguchi, Makoto Hasegawa, Shin Aizawa, Hirotohi Tanaka, Kohsuke Kataoka, Hajime Watanabe, Hiroshi Handa

Site-specific reduction and activation of NF- κ B by Ref-1 during nuclear translocation revealed by a novel system for measuring redox state of individual cysteine residues.

Mol. Cell. Biol. In press

G. 知的所有権の取得状況

特になし。

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

伊庭 英夫

東大・医科研・感染免疫大部門・宿主寄生体学分野

研究要旨

転写制御因子 AP-1 が、多くの核内レセプターと相互作用をして、互いに排他的な抑制作用をする現象が知られながら、その分子機構はほとんど未知である。副腎における種々のホルモン・生理活性を知る上で、この問題の重要性が高いという視点から研究を進めてきたが、本年度は AP-1、ER の相互排他的制御には両因子の転写活性化に共通に必要とされる SWI/SNF 複合体が関与する可能性があることを示した。さらに本年度は細胞増殖抑制性の癌抑制遺伝子を発現するベクターの開発にも成功した。従って、副腎細胞内での両転写因子の相互作用とホルモンの生理作用を遺伝子解析する方法論と将来のヒト遺伝子治療への筋道ができた。

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 (GR) 及びエストロゲンレセプター(ER)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。本年度はさらにその解析に用いる遺伝子導入法としてこれまでに開発・確立してきた VSV-G シュードタイプレトロウイルスベクター系をさらに改良して細胞

障害性の遺伝子を発現するベクターの作製も並行して行う。

B. 研究方法

(1) BAF60a と AP-1 の結合様式の解析

我々は昨年までの研究で酵母 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、クロマチン構造変換因子 SWI/SNF 複合体の 1 つのサブユニットである BAF60a を単離した。本年度は BAF60a と AP-1 の構成タンパク質である Fos/Jun ファミリータンパク質の相互作用の詳細を *in vivo* で解析し、その生物学的活性も解析する。

(2) AP-1 とホルモンレセプターの相互排他的制御の機構解析

米国の研究で SWI/SNF 複合体のサブユニットである BRG-1 が ER や GR

と結合することが知られているので、本年度はこの複合体をめぐって AP-1 がホルモンレセプター、特に GR や ER と競合する可能性を検討する。

(3) 細胞障害性遺伝子を発現する新規レトロウイルスベクター

癌抑制遺伝子は多く細胞増殖阻害性や障害性をもつために、これらの発現ベクターは、その産生細胞の増殖をも阻害する為に、一般に力価が低くなることが問題である。これを克服するベクターを作製する。

C. 研究結果

(1) BAF60a と AP-1 の結合様式の解析

BAF60a 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中では c-Fos タンパク質とのみ結合活性を有し、さらに c-Fos/c-Jun ダイマーをダイマーとして結合できることがわかった。BAF60a と各 Fos/Jun ダイマーの親和性は、そのダイマーの転写活性化能とよい相関があり、BAF60a が AP-1 の転写活性能の決定因子であることが示された。

(2) AP-1 とホルモンレセプターの相互排他的制御の機構解析

AP-1 と同様 GR や ER も SWI/SNF 複合体がその転写活性化に関わっている事が知られることから、これらの核内レセプターが、AP-1 (特に c-Fos/c-Jun ダイマー) とこのクロマチン構造変換因子を競合しあっているか否かを検討するためにこれら SWI/SNF 複合体の各サブユニットと ER や GR と結合活性を分析した。これまでに ER がリガンド依存的に結合する SWI/SNF 複合体のサブユニット 1 つを同定した。

(3) 細胞障害性遺伝子を発現する新規レト

ロウイルスベクター

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。産生されたウイルスを種々のヒト固形癌由来細胞に対して導入して、そのウイルス学的性質を記述している。細胞増殖抑制性又は細胞障害性の遺伝子を発現する高力価のベクターの産生が今後の一つの重要な課題である。本年度我々は、細胞障害性の導入遺伝子の発現をさせない型で pre-packaging cell line をつくり、VSV-G 遺伝子と同様にこの外来遺伝子の発現も Cre-recombinase で誘導されるような新規のウイルスベクターを開発し、実際に高力価の p53 発現ベクターをデザイン通りに作製することに成功している。さらに他の癌抑制遺伝子である *patched* を発現するベクターの作製を終え、いくつかの上皮癌細胞の発癌性の著しい抑制に成功した。

D. 考察

これまでの予備的な研究から ER や GR は、SWI/SNF 複合体の複数のサブユニットと異なった接面を使って結合している可能性も示唆されている。今後 ER、GR が結合するサブユニット、及びその結合領域をせばめていき、立体障害等により AP-1 の結合を阻害しうるか否かを詳しく検証したい。

E. 結論

AP-1 と ER が SWI/SNF 複合体とそれぞれ結合するサブユニットを明確に記述した。立体障害等のために両転写因子が同時にはこの複合体に結合できない可能性があり、両因子間の相互排他的機構として魅力的な仮説となりうる。今後ヒト培養細胞内こうしたサブユニットやその変異体の遺伝子を本研究で開発した VSV-G シュードタ

イプレトロウイルスベクターを使って導入してその生物活性を測定し、遺伝的にその検証を進める。

F. 研究発表

論文発表

1. 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 dimers. *J. Biol. Chem.* 276: 2852-2857 (2001)
2. Fang, S-H., Chiang, B-L., Wu, M-H, Iba, H., Lai, M-Y., Yang, P-M., Chen, D-S., and Hwang, L-H. Functional measurement of Hepatitis C virus core-specific CD8⁺ T-cell responses in the livers or peripheral blood of patients using autologous peripheral blood mononuclear cells as targets or stimulators. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3895-3901 (2001)
3. Koike, C., Mizutani, T., Ito, T., Shimizu, Y., Yamamichi, N., Kameda, T., Michimukai, E., Kitamura, N., Okamoto, T. and Iba, H. Introduction of wild-type *patched* gene suppresses the oncogenic potential of human squamous cell. *Oncogene* in press (2002)

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

藤枝憲二 1、奥原宏治 2、田島敏広 2、阿部修司 2、中江淳 1

1 旭川医科大学小児科, 2 北海道大学医学部小児科

研究要旨

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、機能として副腎皮質の発生分化、視床下部-下垂体-性腺系の機能、さらには性決定機構に参与している。本研究では、ヒト DAX-1 異常症の性腺機能について検討を加えるとともに、その障害部位を明らかにし、また変異 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、表現型と遺伝子型との相関を検討した。その結果、思春期年齢以降に認められる性腺機能低下症には異質性があり、またその障害部位は下垂体さらには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。さらに DAX-1 の変異あるいは機能と病態の重症度とは明らかな相関がみられないことを明らかにした。

A. 研究目的

DAX-1 は、核ホルモン受容体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、その遺伝子は X 染色体短腕上の X連鎖性先天性副腎低形成症の責任領域と遺伝子量依存性に性逆転を来す Dosage Sensitive Sex Reversal の責任領域の重複領域からクローニングされた。ヒト DAX-1 異常症において副腎低形成症と思春期年齢後に明となる低ゴナドトロピン性の性腺機能低下症がみられることが知られている。そこで、すでに同定した DAX-1 異常症のなかから思春期年齢に至っている症例の性腺機能を検討し、その異常の程度と障害部位を明らかにする。さらに同定した DAX-1 変異の機能を検討し、それと性腺機能との関係を明らかにすることを目的とした。

B. 研究対象と方法

すでに DAX-1 異常症として同定されている症例から思春期年齢に達している症例を対象とし、性腺機能の評価を行った。また変異 DAX-1 の機能は、マウス下垂体ゴナドトロプ由来 α T3-1 細胞を用いたルシフェ

ラーゼ・プロモーター・アッセイにて検討した。PCR で増幅したラット LH β の 5'-flanking region をそれぞれ promoterless のウミホタル・ルシフェラーゼ・レポーター・ベクターの上流に ligate してプロモーターコンストラクトを作成した。LH β 遺伝子プロモーターコンストラクトはト DAX-1 に加えてさらにマウス SF-1 とラット Early Response Protein-1/Egr-1 の cDNA 発現ベクターとともに α T3-1 細胞にそれぞれ一過性に co-transfect した後、細胞を壊してルシフェラーゼ活性を測定した。

C. 研究結果

1) DAX-1 異常症における性腺機能低下症の病態の多様性

思春期年齢に達している DAX-1 異常症の 4 例中 3 例において LHRH 試験にて LH/FSH 値は低反応を示していた。他の 1 例は LH/FSH, テストステロンの上昇を伴う spontaneous な puberty を認め性腺機能不全に関して異質性が存在した。性腺機能低下症の障害部位について検討すると、1 例において LHRH 間歇投与によるプライミング後、

再度 LHRH 負荷試験を行うも反応性の改善はえられず本症例では下垂体機能不全が責任部位と考えられた。一方、hCG 負荷では全例血中のテストステロン値の有意の上昇が認められた。しかし、セルトリ細胞機能の低下が認められ、精子形成はなかった。

2) 変異 DAX-1 の機能解析

ラット LH β 遺伝子プロモーター活性は SF-1 と Egr-1 によって協調的に増強された。DAX-1 はこの SF-1 と Egr-1 による協調的な転写促進作用を著明に抑制したが、各種変異 DAX-1 ではこの転写抑制能が減弱していた。さらに、ラット LH β 遺伝子プロモーター活性に対する変異 DAX-1 の量的効果を、co-transfect する DAX-1 発現ベクターの量を変えることで検討した。変異 DAX-1 において減弱した抑制効果は、その発現量を増やすことで代償されうる。

3) 変異の種類と臨床症状の重症度と機能解析の結果との相関

遺伝子型と臨床型との間に明らかな相関は認められなかった。また機能解析の結果も必ずしも臨床症状の重症度を反映するものではなかった。

D. 考察

DAX-1 異常症でみられる性腺機能低下には、一部性腺機能が維持されている症例も存在し異質性がみられることが明らかとなった。永続性の機能低下を示した例では中枢性の低ゴナドトロピン性性腺機能低下症が成因としてあり障害部位は下垂体にあると考えられた。さらに、睾丸機能はテストステロン産生は正常であるが、精子形成能は障害されていた。この結果二次性徴の獲得は可能であるが、妊孕能はないことが明らかとなった。変異 DAX-1 の機能解析では、すべての変異が LH β 遺伝子プロモーター活性の抑制効果を減弱していた。DAX-1 の抑制効果は、

DAX-1 が直接 LH β 遺伝子プロモーター領域に結合して引き起こすというより、むしろ DAX-1 と SF-1, あるいは Egr-1 までも含めた蛋白-蛋白相互作用を介する機構によって起こっていると推測された。

DAX-1 の臨床像の多様性と遺伝子変異の種類あるいは機能の障害の程度とには相関が認められなかった。このことはその臨床像の形成には何らかの後天的要因や DAX-1 の上流・下流の転写調節因子の作用を含めて、さらに未知のメカニズムによる修飾が関与している可能性が示唆された。

E. 結論

DAX-1 異常症における低ゴナドトロピン性性腺機能低下症には臨床症状の重症度に異質性が認められた。また in vitro の機能解析において、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いたが、減弱の程度と疾患の重症度や変異の種類との間には明らかな相関が認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Lebl J, Fujieda K, Kalvachova B, Votava F: A boy with adrenal insufficiency and DAX-1 gene defect, *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Vyziva* 4,2:136-139, 2001

Sugawara T, Abe S, Sakuragi N, Fujimoto Y, Nomura E, Fujieda K, Saito M, Fujimoto S: RIP140 modulates transcription of the steroidogenic acute regulatory protein gene through interactions with both SF-1 and DAX-1. *Endocrinology* 142:3570-3577, 2001

藤枝憲二：先天性副腎過形成症の遺伝子解析、*日本小児科学会雑誌*、105:827-834, 2001

藤枝憲二：Addison 病、小児疾患の診断・治療基準、*小児内科*、33 (増刊号):224-225, 2001

林時仲、藤枝憲二：胎児医療の現況と未来展望、薬物療法、産婦人科の世界、53:837-843, 2001

藤枝憲二：先天性副腎過形成症、内分泌・糖尿病科、13:13-20, 2001

伊藤善也、藤枝憲二：先天性副腎過形成症の疫学、日本臨床、本邦臨床統計集、59 (増刊号):167-176, 2001

藤枝憲二：先天性副腎過形成症の新生児マスキングの発展の歴史と現状、小児内科 33:1674-1678, 2001

藤枝憲二：性の決定・分化のメカニズム、新版ターナー症候群、岡田義昭監修 メディカルレビュー社、PP9-20, 2001

藤枝憲二：21 ヒドロキシラーゼ欠損症、遺伝子検査外注早わかり事典、中井利昭、奈良信雄、登勉、野村文夫、水澤英洋、船渡忠男、川上康編集、中外医学社、pp60, 2001

2. 学会発表

藤枝憲二：DAX-1 異常症の病態、性分化研究会、岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所主催

木下英一、藤枝憲二：先天性副腎皮質過形成症の出生前診断・治療の現状、シンポジウム内分泌疾患のマスキングの現状と将来展望 第74回日本内分泌学会学術総会 奥原宏治、阿部修司、佐藤孝平、中江淳、田島敏広、藤枝憲二：DAX-1 遺伝子異常による低ゴナドトロピン性性腺機能不全症、クリニカルアワー 興味ある症例 I 遺伝子 異常による性分化・性成熟異常症

第74回日本内分泌学会学術総会

藤枝憲二：先天性副腎不全の臨床、第1回日本内分泌学会北海道地方会教育講演

Okuhara K, Tajima T, Nakae J, Abe S,

Satoh K, Fujieda K: Naturally-occurring DAX-1 mutation reduces its ability to repress LH β gene promoter activity.

83rd Annual Meeting of The Endocrine Society

Okuhara K, Tajima T, Nakae J, Abe S, Satoh K, Fujieda K: Naturally-occurring DAX-1 mutation reduces its ability to repress LH β gene promoter activity.

Pediatric Endocrinology Montreal 2001

猪俣弘明、鳥海幸子、内田千絵、野中俊秀、鈴木一広、大嶋寛子、太田節雄、寺嶋周、阿部修司、藤枝憲二：新しい de novo DAX-1 遺伝子変異を有し、新生児期に発見された先天性副腎低形成症の1例、第104回日本小児科学会、

向井徳男、藤枝憲二：マウス副腎における Dax-1 の発現制御

第35回日本小児内分泌学会

奥原宏治、阿部修司、田島敏広、佐藤孝平、中江淳、藤田敬之助、近藤琢磨、甲田直也、望月弘、藤枝憲二：StAR 遺伝子、LH β 遺伝子プロモーターを用いた変異 DAX-1 の in vitro 機能解析

第35回日本小児内分泌学会

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

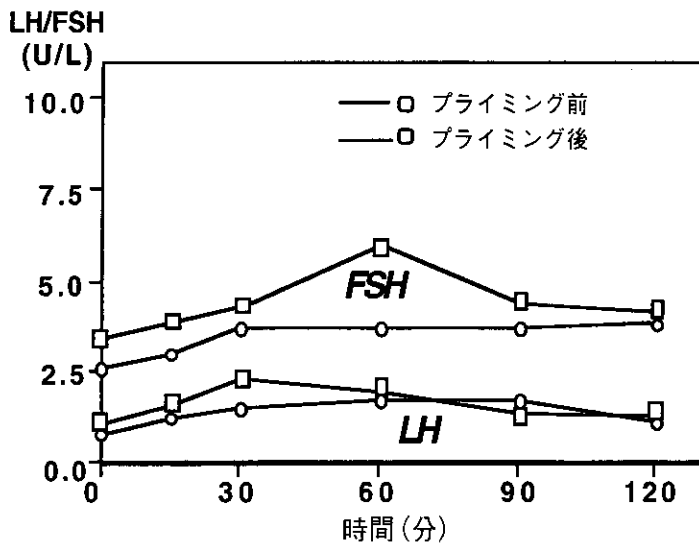
なし

3. その他

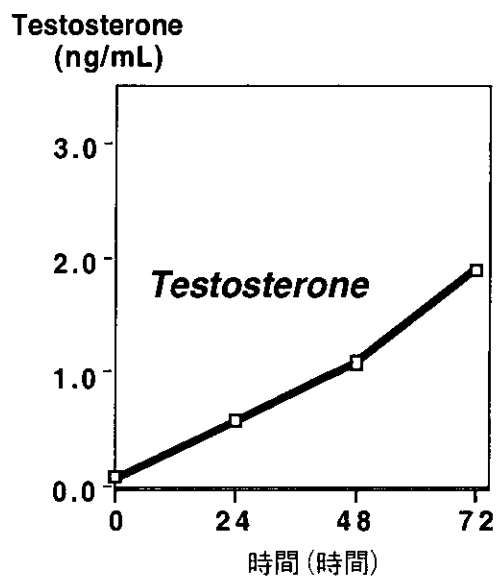
なし

Q395X 変異をもつ DAX-1 異常症における性腺機能

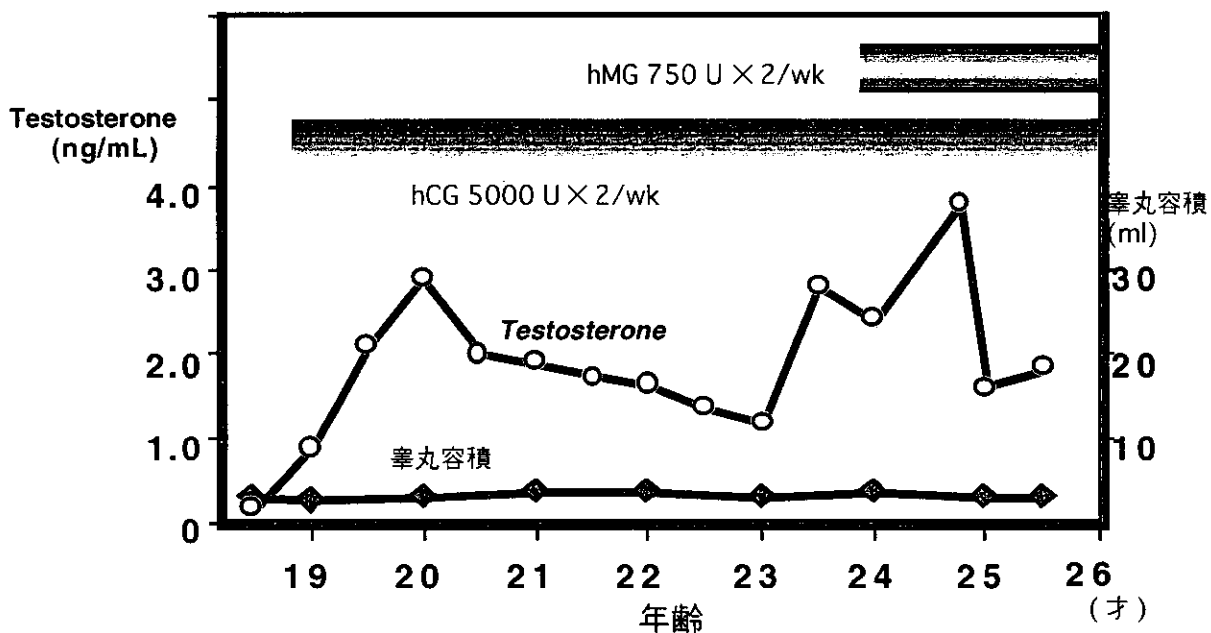
LHRH テスト



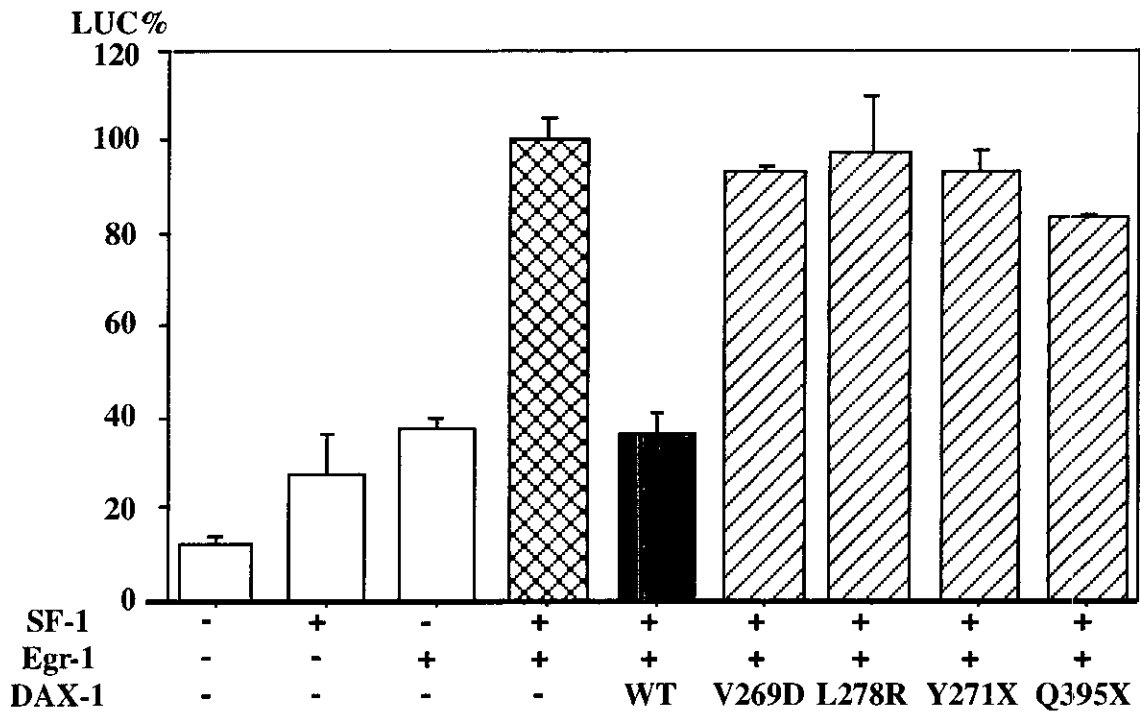
hCG テスト



hCG/hMG 療法の効果



ラット LHβ遺伝子転写活性に対する変異 DAX-1 の作用



ラット LHβ遺伝子転写活性に対する変異 DAX-1 の作用

