


Genotype -Phenotype relation

変異	副腎不全 発症年齢	StARプロモーター 抑制活性	HHG	LHβプロモーター 抑制活性
Wild		100%		100%
Y91X	0日/20日	34%	(思春期前)	0%
Y271X	6才	27%	不完全型	1%
Q395X	6才	0%	完全型	20%
V269D	17日	0%	完全型	1%
L278R	21日	0%	完全型	0%
W291C	2才/3才	20%	(思春期前)	16%
K382N	27日	0%	(思春期前)	23%
L466R	30日	44%	(思春期前)	18%

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

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

副腎皮質や生殖腺の形成に不可欠な Ad4BP/SF-1 遺伝子はこれらの組織に極めて特異的な発現を示す。本実験ではトランスジェニックマウスの作成を通じて、Ad4BP/SF-1 遺伝子の副腎特異的エンハンサーを解析した。

A. 研究目的

Ad4BP/SF-1 遺伝子には生殖腺や副腎皮質特異的エンハンサーが存在し、これらの制御下に発現の厳密な特異性が発揮されている。本研究では、特に副腎皮質特異的なエンハンサーを同定することで副腎皮質における遺伝子転写の特異性を副腎皮質の発生の観点から検討することを目的に行われた。また、副腎皮質特異的なエンハンサーを用いることで、あらゆる遺伝子を副腎皮質で発現させることが可能となることから、副腎皮質の再生や治療にも応用できることが期待される。

B. 研究方法

Ad4BP/SF-1 遺伝子内には副腎皮質特異的なエンハンサーが存在するはずである。しかしながら、このエンハンサーが遺伝子のどの領域に存在するかは不明である。そこでまず Ad4BP/SF-1 遺伝子を含む YAC クローンを単離した。この YAC クローンからコスミドクローンを作成し、

それぞれのクローンに存在するエンハンサー活性をトランスジェニックマウスを作成することで確認した。以上の動物実験は岡崎国立共同研究機構動物実験委員会の定める規定に従って申請し、その内容は規定に準拠するものであることが認められたものである。

C. 研究成果

1, コスミドコンティグの作成とその解析
Ad4BP/SF-1 を含む YAC クローンは全体がおよそ 480 kb からなるものであった。このクローンには Ad4BP/SF-1 遺伝子の他に上流と下流に他の遺伝子の存在が確認されたことから、少なくとも Ad4BP/SF-1 遺伝子とその制御領域とともに含まれているものと思われた。そこでこの YAC クローンからコスミドライブラリーを作成した。ここで用いたコスミドベクターには Ad4BP/SF-1 遺伝子の基本転写調節領域と、その下流に Lac Z 遺伝子を配置しており、クローンされた

遺伝子断片のエンハンサー活性をそのまま調べることができるように工夫されていた。これらのコスミドクローンから、YAC 全長をカバーするように複数のクローンを単離した。これらのクローンを解析したところ Ad4BP/SF-1 遺伝子上流およそ 30 kb 付近に GCNF (Germ Cell Nuclear Factor) 遺伝子が、40 kb 下流には他の遺伝子の存在が確認された。従って、我々が得た複数のコスミドクローンには Ad4BP/SF-1 の全長が入っていることが確認されたことになる。

2, トランスジェニックマウスの作成によるエンハンサーの同定

ここで得られたコスミドクローンはおよそ 20 から 30 kb の Ad4BP/SF-1 遺伝子断片を含んでいる。これらのコスミド DNA を精製し、トランスジェニックマウスを作成した。Ad4BP/SF-1 遺伝子は副腎皮質の他に生殖腺や脳下垂体、視床下部腹内側核などに発現することが知られている。それぞれのクローンにつき胎児組織における発現を検討したところ、ある領域を有するクローンで副腎皮質と視床下部腹内側核での発現が確認された。この領域を絞り込むことで現在までに副腎皮質特異的エンハンサーとしておよそ 2 kb からなる領域を得ることができた。

D. 考察

本研究では Ad4BP/SF-1 遺伝子の副腎皮質特異的転写を規定するエンハンサー

領域を同定することができた。この領域は 2 kb の長さからなるために、いかなる転写調節エレメントが存在するかは未だ明らかではないが、今後さらにエンハンサー領域を絞り込むことでエレメントの同定が可能であると思われる。

本実験では副腎皮質特異的なエンハンサー領域が同定されつつあるが、これまでに副腎皮質特異的エンハンサーは同定されておらず、副腎皮質の分化を考える上で極めて重要な情報をもたらすことが期待される。

E. 結論

Ad4BP/SF-1 遺伝子の副腎皮質特異的発現を規定するエンハンサー領域を同定することができた。

F. 研究発表

(7) 論文発表

1, Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis implies their closely related and distinct functions. (2001)

Y. Ikeda, Y. Takeda, T. Shikayama, T. Mukai, S. Hisano, & K. Morohashi
Develop. Dynam. **220**, 363-376

2, Expression profiles of COUP-TF, DAX-1 and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors: Possible implications in steroidogenesis. (2001)

H. Shibata, Y. Ikeda, T. Mukai, K. Morohashi, I. Kurihara, T. Ando, T. Suzuki, S. Kobayashi, M. Murai, I. Saito, and T. Saruta.

Mol. Genet. Metab. 74, 206-216.

3, Activation of cAMP-dependent Protein Kinase increases the protein level of Steroidogenic Factor-1.

R. Asoy, G. Mellgren, K. Morohashi, & J. Lund

Endocrinol. in press

(8) 学会発表

1、招待講演

(1) 第10回 性差医学研究会 (東京)

3月10日 諸橋憲一郎

生殖腺の形成を支える転写因子と細胞増殖因子

(2) 第74回 日本内分泌学会 (横浜)

6月30日

サテライトシンポジウム

諸橋憲一郎

第2回ウーマンヘルスフォーラム

生殖腺の形成を支える転写因子と細胞増殖因子

(3) CREST 領域シンポジウム

9月19日

内分泌攪乱物質 諸橋憲一郎

生殖腺の性分化-精巣と卵巣の構築を支える役者達

(4) 第5回 日本小児内分泌学会 (東京)

10月5日 ランチョンセミナー

諸橋憲一郎

生殖腺の分化を支える分子的基盤-転写調節因子と細胞増殖因子

(4) The 45th International NIBB Conference (Okazaki, Japan)

March 3-5, Invited speaker

Recent Progress in Endocrine Disruptor Research

"Transcription Factors implicated in Gonad Differentiation"

Ken-chirou Morohashi

(6) Novartis Foundation Symposium No. 244 (London, UK)

April 30-May 3, Invited speaker

The Genetics and Biology of Determination

"Concerted Regulation of gonad differentiation by transcription Factors and Growth Factors"

Ken-ichirou Morohashi

- (7) The Endocrine Society's 83rd Annual Meeting (Denver, USA) June 20-23, Fifth Shionogi Transpacific Symposium-Frontiers in Reproductive Endocrinology, Invited speaker
"Organogenesis of Gonads and Trnascrption Factors"
Ken-ichirou Morohashi, Hidefumi Yoshioka, Kaname Kawajiri
- (8) 14th International Congress of Developmental Biology (Kyoto, Japan) July 8-12, Invited speaker/Session organizer
Symposium 'differentiation of sexes'
Transcriptional regulation in differentiating gonads.
K. Morohashi, K. Kawabe, T. Suzuki, H. Mizusaki, H. Yoshioka

2、一般演題

- (1) 34回日本発生物学会(京都)
7月8~12日
14th International Congress of Developmental Biology
H. Yoshioka, K. Morohashi
Signals from adjacent tissues induce an indifferent/bipotential gonad formation in chick intermediate mesoderm

- (2) A. Shimono, K. Morohashi, R. Behringer
Isolation and functional analysis of Lim1 downstream genes.
- (3) H. Yokoi, K. Morohashi, T. Kobayashi, M. Tanaka, Y. Nagahama, Y. Wakamatsu, H. Takeda, K. Araki, K. Ozato
Evolutional significance of medaka sox9 in gonad and cartilage development
- (5) Y. Katoh-Fukui, M. Kusaka, S. Ina, S. Okamoto, T. Kamiya, K. Morohashi
Expression analyses of male and gonad specific genes in XY sex-reversal M33 mutant mouse.
- (6) 第9回日本ステロイドホルモン学会
(東京) 11月17日
向井徳男, 鹿山達司, 藤枝憲二, 名和田新, 諸橋憲一郎
マウス副腎における Dax-1 の発現調節
- (7) 第24回日本分子生物学会(横浜)
12月9~12日
吉岡秀文, 杉山紀之, 榎田武史, 金澤洋平, 山野井恵, 諸橋憲一郎
鳥類の生殖腺の分化機構

- (8) 水崎博文, 河辺顕, Mohamad Zubair,
有吉悦子, 笠原恵, 吉岡秀文, 諸橋憲
一郎

Dax-1 遺伝子の転写制御における
Ad4BP/SF-1 と Wnt-4 シグナルの相
互作用

- (9) Mohamad Zubair, 岡早苗, 石原悟,
諸橋憲一郎

転写因子 Ad4BP/SF-1 遺伝子の転写
調節領域の解析

- (10) 加納卓也, 山下大輔, 深水昭吉, 諸
橋憲一郎, 貞野宏之, 大隅隆

転写調節関連蛋白質と核マトリックス
の相互作用の解析

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

副腎における HDL 受容体 CLA-1 の遺伝子発現制御

香川医科大学第一内科

村尾孝児、井町仁美、石田俊彦、高原二郎

研究要旨

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。今回の検討において副腎における 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が判明した。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が推定された。

A. 研究の目的

1996 年 Acton らによりマウス scavenger receptor class B type 1 (SR-B1)が HDL 受容体であると報告された。また我々はマウス SR-B1 相同遺伝子である CLA-1 がヒト HDL 受容体であり、副腎で強く発現されていることを報告してきた。また副腎におけるステロイド産生の最初の基質はコレステロールであり、副腎にコレステロールを提供する HDL-HDL 受容体とステロイドホルモン合成には密接な関係があることも報告してきた。今回は HDL 受容体 CLA-1 の副腎における遺伝子発現制御について検討し、ステロイドホルモン合成

経路への影響について検証する。

B. 研究方法

マウス副腎皮質腫瘍由来細胞株 (Y-1)はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した。正常副腎は患者の同意を得て腎癌の根治的手術時に採取した。

RT-PCR：副腎腫瘍より total RNA を抽出し cDNA を作成した。CLA-1 mRNA を既報の PCR 法にて検出した。内因性コントロールとして β -actin を使用した。

Western blot：副腎腫瘍細胞株より細胞膜成分を抽出し 7.5% SDS-PAGE にて分画した。PVDF 膜に転写後、1 次抗体、anti-CLA-1 抗

体で1時間処理後、2次抗体、HRP 抱合 anti-モルモット IgG 抗体で1時間振盪し ECL にて可視化した。

Transfection：種々の転写因子、SF-1, DAX-1, PPAR- γ , CaMKK-CaMKIV cDNAfull を含む発現ベクターおよび CLA-1 promoter を挿入した reporter gene をマウス副腎皮質腫瘍由来細胞株(Y-1)にリポソーム法にて遺伝子導入し、CLA-1 の転写活性に与える転写因子群および情報伝達系の影響について検討した。

C. 研究結果

既に副腎皮質において CLA-1 が発現されていることおよび CLA-1 を介するコレステロールの取込みが副腎におけるステロイドホルモン合成を促進することを報告してきている。そこで副腎におけるステロイドホルモン産生を刺激することが知られている ACTH の影響について検討した。10 nM の ACTH および 1 μ M の 8-Br-cAMP の刺激により CLA-1 の発現が増強した。また PPAR- γ のリガンドであるチアゾリジン誘導体は CLA-1 の発現を刺激した。次に種々の転写因子および情報

伝達系が CLA-1 の転写活性に与える影響について検討した。CLA-1 のプロモーターを挿入した reporter gene を Y-1 細胞に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を測定し、CLA-1 転写活性とした。まず副腎特異的転写因子 SF-1, DAX-1 の影響について検討した。SF-1 は CLA-1 のプロモーター活性を促進し、逆に DAX-1 は抑制的に働いた (図1)。またその影響は dose-dependent-manner に観察された。チアゾリジン誘導体に関しては、Y-1 にチアゾリジン誘導体を添加することにより、CLA-1 のプロモーター活性が上昇した。さらにチアゾリジン誘導体の核内受容体である PPAR- γ 1, 2 の遺伝子導入により、CLA-1 の転写活性は上昇した (図2)。カルシウム情報伝達系に関しては、Ca-CaM 系を介する CaM-kinase-kinase-CaMKIV に注目して検討した。CaMKIV およびその上流域にある CaMKK の遺伝子導入により、CLA-1 の転写活性が促進された。

D. 考察

マウス SR-B1 およびヒト CLA-1 はステロイド産生組織で発現されており、特に副腎において強く発

現されている。マウスにおいては SR-B1 のノックアウトマウスが作製されており、SR-B1 ノックアウトマウスでは副腎におけるコレステロール含量が 72% も低下することが報告された(3)。また Temelらは SR-B1 に対する抗体で HDL との結合を阻害すると副腎細胞からのステロイドホルモン合成が極端に低下すると報告している(4)。マウスでは HDL が主な cholesterol 供給物質であり、ヒトでは LDL であることが知られているが、ヒトにおける cholesterol 供給物質としての HDL の役割については不明である。我々の検討により、ヒトにおいても HDL 受容体はステロイドホルモン合成に基質を提供することで重要な役割を演じていることが判明した。一方 ACTH の投与によりマウス副腎における SR-B1 の発現が増すことが報告されており、今回の検討においても同様に ACTH-cAMP は CLA-1 の発現を促進し、転写レベルにおいても活性促進作用を認めた。また CLA-1 のプロモーター内には副腎特異的転写因子 SF-1 の結合サイトがあり、今回の検討においても SF-1 の転写促進活性を認めている。DAX-1 は CLA-1 の転写抑

制作用があり、おそらく SF-1 の活性を制御していることが推定された。PPAR- γ 群は、CLA-1 の遺伝子発現を促進することが報告されており、今回の検討では副腎においても同様に遺伝子発現、転写活性化を認めた。つまり PPAR- γ のリガンドであるチアゾリジン誘導体は、副腎におけるステロイドホルモン産生に何らかの影響を与えることが推察される。また PKA 系だけでなくカルシウムの情報伝達系も CLA-1 の発現に影響を与えており、ステロイドホルモン合成にも影響を与える可能性が考えられた。

E. 結論

副腎皮質に HDL 受容体 CLA-1 の発現を認め、CLA-1 は HDL よりコレステロールを抜き取ることにより副腎皮質にステロイドホルモン合成の基質を提供していた。また CLA-1 の副腎における遺伝子発現に関しては、様々な情報伝達系、転写因子が関与していることが示された。今後、詳細な作用機序を解明することにより、ステロイドホルモン合成の初期ステップの明らかにする必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Cancer 92:1393-1401, 2001

Arterioscler Thromb Vasc Biol
21:1592-1597, 2001

Horm Metab Res 33:389-393,
2001

2. 学会発表

K.Murao,H.Imachi,WM

Cao,J.Takahara,T.Ishida:

Role of HDL receptor,CLA-1 on
steroidogenesis in adrenal gland.

The11th ASEAN FEDERATION OF
ENDOCRINE SOCIETIES
CONGRESS 2001.11 Jakarta

G. 知的所有権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

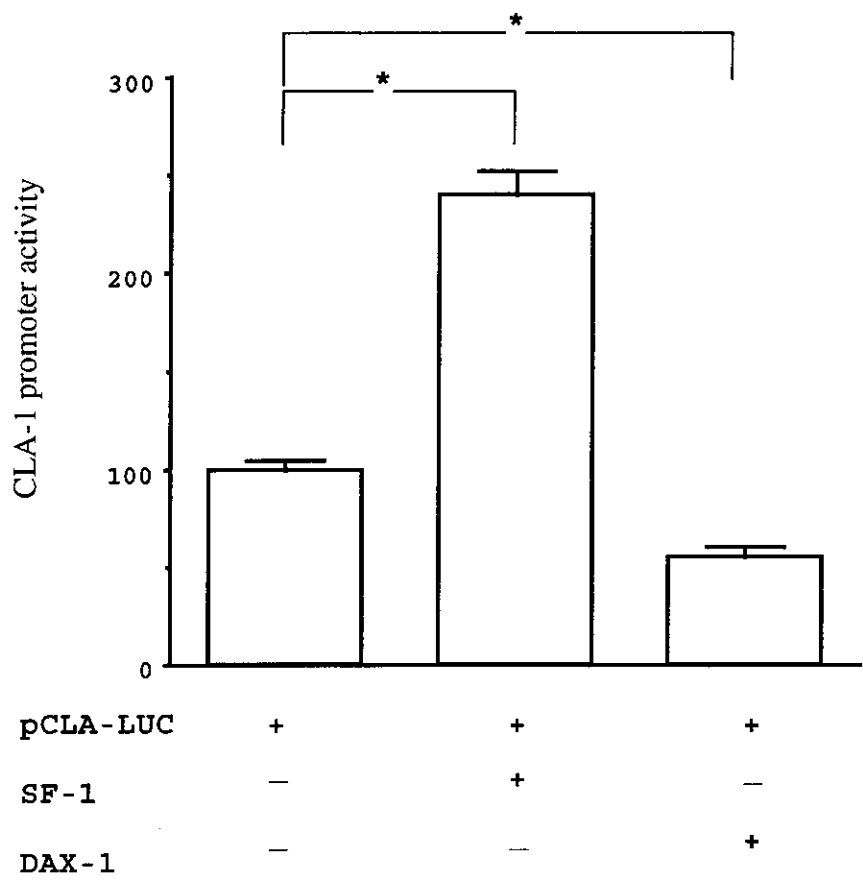


図 1, SF-1, DAX-1がCLA-1 promoterに与える影響について

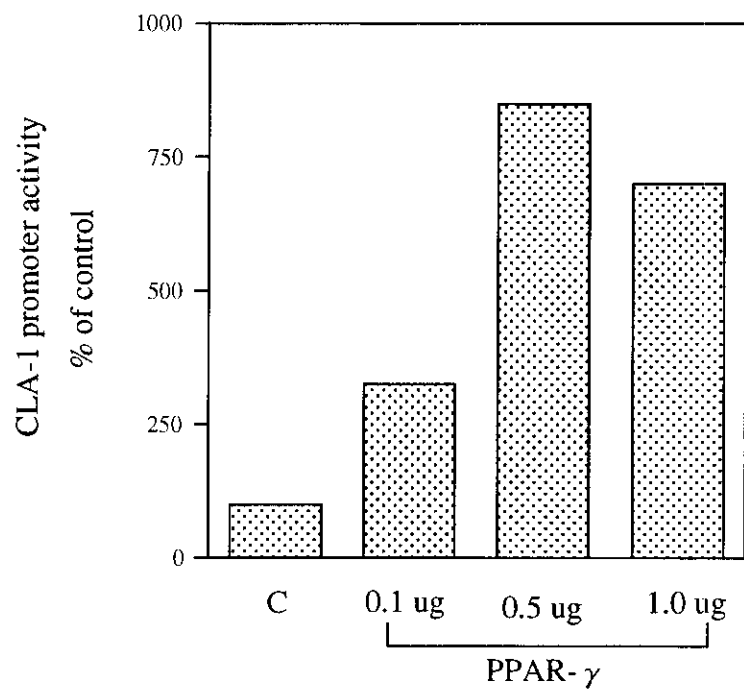


図2, PPAR- γ のCLA-1 promoterに及ぼす影響

DAX-1 と WT-1 のヒト全身並びに副腎における発現の検討

笹野公伸、佐藤容子、鈴木貴

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

研究要旨

近年種々の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を集めてきており、ステロイド合成代謝はこれらの核内蛋白によって促進、抑制を含めて制御されている可能性が高くなってきている。これらの核内蛋白の内でも 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可能性が高くなってきている。しかし副腎を含む生体内における発現や病態におけるこれらの動態、生物学的意義は明らかではない。そこで本研究では、上記の事を明らかにする目的で剖検から得た種々のヒト組織ならびに副腎皮質ホルモン産生異常症におけるこれら2つの核内蛋白の発現動態を免疫組織化学的に検討した。これらのヒト全身組織においての分布動態で DAX-1 は血管内皮細胞、血管平滑筋細胞を含めて多くの全身組織でかなり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より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のに対して、WT-1 は一部の皮質細胞に弱い発現を認めるだけであった。DAX-1 の発現動態は腫瘍を含めて副腎皮質ホルモン産生異常動態と明確な関連性は認められておらず、癌化により著明に低下しているのが認められた。WT-1 の方も同様にホルモン産生動態と明らかな関連性はなく、副腎皮質癌になるとその発現は完全に喪失するのが認められた。

A. 研究目的

ステロイド合成、代謝は種々のステロイド合成酵素の発現が複雑に関連して行われている事は良く知られている。ACTHをはじめとするペプチドホルモンなどの膜受容体を介するシグナルによりこれらのステロイド合成、代謝は制御されているが、近年 Ad4BP, COUP-TF, Nur-1, RXR, RAR などの種々の核内蛋白を介するシグナルによってもステロイド合成酵素遺伝子の転写制御が制御されている事が明らかになってきており大きな注目を集めてきている。すなはちステロイド合成代謝はこれらの核内蛋白によって促進、抑制を含めて制御されている可能性が高くなってきている。これらの核内蛋白の中で先天性副腎低形成の原因遺伝子であるとも考えられている DAX-1 は Ad4BP の転写活性を抑制する事が考えられている。又 Wilms tumor Denys-Drash 症候群の原因遺伝子である WT-1 は性腺分化過程において Ad4BP と共役して雄への性分化に関与する以外にもステロイド合成代謝との関与が提唱されてきている。一方これらの核内受容体と副腎皮質ホルモン合成動態との関連性を考えていくにあたり、副腎皮質にお

いてのみの所見を考えるだけでは正確なその動態を把握することは困難であり全身組織における発現分布と対応させて考えていく必要がある。ところがステロイド合成、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可能性が高くなってきているこれら DAX-1, WT-1 の副腎を含む生体内における発現や病態における動態は DAX-1 の副腎腫瘍における報告以外はほとんど検討されてきていない。そこで本研究では剖検から得た種々のヒト組織ならびに副腎皮質ホルモン産生異常症でこれら2つの核内蛋白の発現動態を免疫組織化学的に検討した。

B. 研究方法

1. 検体

ヒト正常組織は東北大学医学部附属病院で行われた様々な年齢の男女双方の剖検例 20 例を検討した。検討した臓器は表 1, 2 にまとめて記載してある。ヒト副腎皮質ホルモン産生異常症は以下のような 10%ホルマリンで固定されてパラフィン包埋された病理組織検体で検索した。すなはち胎児副腎 3 例 (15, 18, 21 週)、成人正常副腎 6 例、副腎皮質腺

腫 38 例 (Cushing :11, Primary aldosteronism (PA) :12, preclinical Cushing :6, non-functioning 9), 副腎皮質癌 11 例である。なお本研究計画は東北大学倫理委員会の承認 (2000-145)を得て施行している。

2. 方法

抗体としては DAX-1, WT-1 共に Santa Cruz 社から市販されているマウス単クローン抗体を用いた。免疫組織化学は Histofine (Nichirei) を用いた ABC (Avidin Biotin Complex)法で施行した。陽性コントロールとして WT-1 は胎児腎臓組織、DAX-1 は胎児期副腎を用いた。

C. 研究結果

全身組織における DAX-1、WT-1 の分布

結果は DAX-1 は表 1 に WT-1 は表 2 にまとめである。DAX-1 は検討したすべての組織の血管平滑筋細胞、血管内皮細胞でその発現が核に認められた。他に副腎皮質細胞、乳管及び前立腺の腺管上皮細胞、精巣のセルトリ細胞ならびに Leydig 細胞、子宮内膜腺管細胞、胎盤の合胞体栄養細胞、甲状腺の濾胞細胞、肺の肺胞上皮細胞、腎臓の近位ならびに遠位尿細管細胞、骨格筋細胞、心臓の心筋細胞などで広範に核に発現が認められた。正常副腎皮質細胞においては DAX-1 は胎児期においては胎児層、成人層双方で、そして成人副腎ではほとんどすべての副腎皮質実質細胞の核で著名な発現が認められた。一方 WT-1 は乳腺の間質-脂肪細胞、卵巣の上皮細胞、腎臓の糸球体の内皮細胞、気管支纖毛上皮細胞、子宮内膜の間質細胞などかなり限局した発現動態を示していた。正常副腎皮質実質細胞においては WT-1 は胎児期から発現が認められたが、その発現の程度は極めて弱く一定の発現パターンも見られなかった。これらのヒト全身組織における DAX-1, WT-1 の発現動態は性、年齢による差異は認められなかった。

副腎皮質ホルモン産生異常症における WT-1, DAX-1 の発現動態

副腎皮質疾患において DAX-1, 並びに WT-1 の発現動態は以下の通りである。

DAX-1: 副腎皮質腺腫では 22/38 例で陽性。Cushing 8/11、PA 6/12, preCushing 2/6, non-functioning 6/9 である。副腎皮質癌では 11 例中 1 例しか陽性所見は認められなかった。

WT-1: 副腎皮質腺腫では 15/38 例で陽性。Cushing 5/11、PA 4/12, preCushing 2/6, non-functioning 4/9 である。副腎皮質癌では 11 例中 1 例も発現は見られなかった。

D. 考察

DAX-1 はヒト組織においてはほとんどすべての血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の核で発現が認められている以外にも多くの組織の実質細胞で顕著な発現が見られており、性腺副腎の分化やステロイド合成、代謝の制御以外に広範な生物学的意義を有している事が示唆された。今後 DAX-1 が原因遺伝子とも考えられている副腎皮質低形成におけるこれらの組織の機能の解析も含めて、DAX-1 のヒトにおける生理学的意義をより解明していく事が望まれる。一方 DAX-1 は胎生期からほとんどすべての副腎皮質実質細胞の核で著名な発現が認められており、AD4BP 同様に正常副腎皮質の発達、分化、恒常性の維持などに重要な役割を果たしている事が考えられた。しかし Ad4BP や COUP-TF などとは異なり、副腎皮質実質細胞の腫瘍化に伴いその発現が低下し特に癌化すると発現は極めて低下する事が明らかになった。又副腎皮質ホルモン産生異常症との明らかな関係も認められず、これらの現象は DAX-1 の腫瘍化による正常組織の有する形質の喪失の一環として考えられ、副腎皮質の腫瘍性のステロイド合成、代謝には Ad4BP や COUP-TF とは異なりあまり関与していない事が考えられた。

WT-1 は DAX-1 と比較すると極めて限局した組織分布動態を示しており、その作用の解明には今後の検討が必要であると思われた。しかし副腎皮質における発現動態は正常でもその発現は弱くあわせてステロイドホルモン合成パターンとの間に明らかな関係も認められなかった。これらの事から WT-1 は今迄ステロイド合成との関与が提唱されてきた他の核内蛋白と比較すると、副腎皮質の分化、発達、機能との関係がそれほど顕著なものではないと考えられた。一方 DAX-1 同様に副

腎皮質実質細胞の腫瘍化、特に癌化によりその発現が著名に低下する事が示された。

E. 結論

核内受容体の DAX-1, WT-1 のステロイド合成、代謝との関連性を検討する目的で剖検から得た種々のヒト組織ならびに副腎皮質ホルモン産生異常症におけるこれら 2 つの核内蛋白の発現動態を免疫組織化学的に検討した。ヒト全身組織において DAX-1 は血管内皮細胞、血管平滑筋細胞を含めて多くの全身組織でかなり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より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のに対して、WT-1 は一部の皮質細胞に弱い発現を認めるだけであった。DAX-1 の発現動態は腫瘍を含めて副腎皮質ホルモン産生異常動態と明確な関連性は認められておらず、癌化により著名に低下しているのが認められた。WT-1 の方も同様にホルモン産生動態と明らかな関連性はなく、副腎皮質癌になるとその発現は完全に喪失するのが認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Brereton P, Suzuki T, **Sasano H**, Li K, Duarte C, Obeyesekere V V, Haeseleer F, Palczewski K, Smith I I, Komesaroff P, Krozowski Z. Pan1b (17betaHSD11)-enzymatic activity and distribution in the lung. *Molecular and cellular Endocrinology* 171:111-117 2001
2. Takamura T, Nagai Y, Taniguchi M, Yamashita H, Nakamura S, Ikeda T, Kobayashi K, Suzuki T, **Sasano H**. Adrenocorticotropin-independent unilateral adrenocortical hyperplasia with Cushing's syndrome: Immunohistochemical studies of steroidogenic enzymes, ultrastructural examination and a review of the literature. *Pathology International* 51:118-122 2001
3. Honma W, Kamiyama Y, Yoshinari K, **Sasano H**, Shimada M, Nagata K, Yamazoe Y. Enzymatic characterization and interspecies difference of phenol sulfotransferases, ST1A forms. *Drug metabolism and disposition* 29:274-281 2001
4. Suzuki T, **Sasano H**, Kaneko C, Ogawa S, Darnel AD, Krozowski ZS. Immunohistochemical distribution of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human eye. *Molecular and cellular Endocrinology* 173:121-125 2001
5. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Sone M, Satoh F, Kitamuro T, Noshiro T, Hayashi Y, **Sasano H**, Shibahara S. Expression of melanin-concentrating hormone receptor messenger ribonucleic acid in tumor tissues of pheochromocytoma, ganglioneuroblastoma, and neuroblastoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86:369-374 2001
6. Muramatsu Y, Sugino N, Suzuki T, Totsune K, Takahashi K, Tashiro A, Hongo M, Oki Y, **Sasano H**. Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in normal cycling human ovaries. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86:1362-1369 2001
7. Suzuki T, Moriya T, Sugawara A, Ariga N, Takabayashi H, **Sasano H**. Retinoid receptors in human breast carcinoma: possible modulators of in situ estrogen metabolism. *Breast Cancer Research and Treatment* 65:31-40 2001
8. Suzuki S, Tsubochi H, Suzuki T, Darnel AD, Krozowski ZS, **Sasano H**, Kondo T. Modulation of transalveolar fluid absorption by endogenous aldosterone in adult rats. *Experimental Lung Research* 27:143-155 2001
9. Ariga N, Suzuki T, Moriya T, Kimura M, Inoue T, Ohuchi N, **Sasano H**. Progesterone receptor a and b isoforms in the human breast and its disorders. *Japanese Journal of Cancer Research* 92:302-308 2001
10. Meng L, Zhou J, **Sasano H**, Suzuki T, Zeitoun

- KM, Bulun SE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 11 secreted by malignant breast epithelial cells inhibit adipocyte differentiation by selectively down-regulating CCAAT/enhancer binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma: mechanism of desmoplastic reaction. *Cancer Research* 61:2250-2255 2001
11. Shimizu C, Kubo M, Takano K, Takano A, Kijima H, Saji H, Katsuyama I, **Sasano H**, Koike T. Interleukin-6 (IL-6) producing pheochromocytoma: direct IL-6 suppression by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 54:405-410 2001
 12. Narasaka T, Suzuki T, Moriya T, **Sasano H**. Temporal and spatial distribution of Corticosteroidogenic Enzymes Immunoreactivity in developing human adrenal. *Molecular and cellular Endocrinology* 28:111-120 2001
 13. Suzuki T, Damel AD, Akahira JI, Ariga N, Ogawa S, Kaneko C, Takeyama J, Moriya T, **Sasano H**. 5alpha-Reductases in human breast carcinoma: possible modulator of in situ androgenic actions. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86:2250-2257 2001
 14. Takeyama J, Suzuki T, Inoue S, Kaneko C, Nagura H, Harada N, **Sasano H**. Expression and Cellular Localization of Estrogen Receptors alpha and beta in the Human Fetus. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86:2258-2262 2001
 15. Uzuki M, **Sasano H**, Muramatsu Y, Totsune K, Takahashi K, Oki Y, Iino K, Sawai T. Urocortin in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Science (Colch)* 100:577-589 2001
 16. Murakami M, Suzuki T, Nakagawasai O, Murakami H, Murakami S, Esashi A, Taniguchi R, Yanagisawa T, Tan-No K, Miyoshi I, **Sasano H**, Tadano T. Distribution of various calcium channel alpha(1) subunits in murine DRG neurons and antinociceptive effect of omega-conotoxin SVIB in mice. *Brain Research* 903:231-236 2001
 17. Matsuzaki S, Murakami T, Uehara S, Canis M, **Sasano H**, Okamura K. Expression of estrogen receptor alpha and beta in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertility and Sterility* 75:1198-205 2001
 18. Ito K, Suzuki T, Moriya T, Utsunomiya H, Sugawara A, Konno R, Sato S, **Sasano H**. Retinoid receptors in the human endometrium and its disorders: a possible modulator of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86:2721-2727 2001
 19. Makino S, Oda S, Saka T, Yasukawa M, Komatsu F, **Sasano H**. A case of aldosterone-producing adrenocortical adenoma associated with preclinical Cushing's syndrome and hypersecretion of parathyroid hormone. *Endocrine Journal* 48:103-111 2001
 20. Cho YY, Kang MJ, Sone H, Suzuki T, Abe M, Igarashi M, Tokunaga T, Ogawa S, Takei YA, Miyazawa T, **Sasano H**, Fujino T, Yamamoto TT. Abnormal uterus with polycysts, accumulation of uterine prostaglandins, and reduced fertility in mice heterozygous for acyl-coa synthetase 4 deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284:993-997 2001
 21. Utsunomiya H, Suzuki T, Kaneko C, Takeyama J, Nakamura J, Kimura K, Yoshihama M, Harada N, Ito K, Konno R, Sato S, Okamura K, **Sasano H**. The analyses of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86:3436-3443 2001
 22. Moriya T, Suzuki T, Pilichowska M, Ariga N, Kimura N, Ouchi N, Nagura H, **Sasano H**. Immunohistochemical expression of gonadotropin releasing hormone receptor in human breast carcinoma. *Pathology International* 51:333-337 2001

23. Ise T, Shimoda A, Takakuwa H, Kato T, Izumiya Y, Shimizu K, Suzuki T, **Sasano H**, Yokoyama H, Kobayashi K. A chimeric CYP11B1/CYP11B2 gene in glucocorticoid-insuppressible familial hyperaldosteronism. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 55:131-134 2001
24. Midorikawa S, Sanada H, Hashimoto S, Suzuki T, Watanabe T, **Sasano H**. Analysis of cortisol secretion in hormonally inactive adrenocortical incidentalomas: study of in vitro steroid secretion and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes. *Endocrine Journal* 48:167-174 2001
25. Semba S, Yamakawa M, **Sasano H**. The cadherin-catenin superfamily in endocrine tumors. *Endocrine Pathology* 12:1-13 2001
26. Inoue T, Akahira J, Takeyama J, Suzuki T, Darnel AD, Kaneko C, Kurokawa Y, Satomi S, **Sasano H**. Spatial and topological distribution of progesterone receptor A and B isoforms during human development. *Molecular and Cell Endocrinology* 182:83-89 2001
27. **Sasano H**, Matsuzaki S, Suzuki T. Estrogen receptor mRNA in situ hybridization using microprobe system. *Methods Molecular Biology* 176:317-325 2001
28. Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Satoh F, Ito S, Kimura Y, **Sasano H**, Murakami O. Role of urotensin II in patients on dialysis. *The Lancet* 358:810-811 2001
29. Nakamura Y, Son Y, Kohno Y, Shimono D, Kuwamura N, Koshiyama H, **Sasano H**, Matsuda T. Case of adrenocorticotrophic hormone-independent macronodular adrenal hyperplasia with possible adrenal hypersensitivity to angiotensin II. *Endocrine Journal* 15:57-61 2001
30. Akahira JI, Suzuki T, Ito K, Darnel AD, Moriya T, Sato S, Yaegashi N, Okamura K, **Sasano H**. Expression of 5 α -reductases in human epithelial ovarian cancer: its correlation with androgen receptor status. *Japanese Journal of Cancer Research* 92:926-932 2001
31. Ito K, **Sasano H**, Watanabe K, Ozawa N, Sato S, Yajima A. Immunohistochemical study of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) in normal and abnormal endometrium. *International Journal of Gynecological Cancer* 3:122-127 2001
32. Sano T, Hirasawa G, Takeyama J, Darnel AD, Suzuki T, Moriya T, Kato K, Sekine H, Ohara S, Shimosegawa T, Nakamura J, Yoshihama M, Harada N, **Sasano H**. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression and enzyme activity in the human gastrointestinal tract. *Clinical Science (Lond)*.101:485-491 2001
33. Suzuki T, Inoue S, Kawabata W, Akahira J, Moriya T, Tsuchiya F, Ogawa S, Muramatsu M, Sasano H. EBAG9/RCAS1 in human breast carcinoma: a possible factor in endocrine-immune interactions. *British Journal of Cancer* 85:1731-1737 2001
34. 笹野公伸、鈴木貴、森谷卓也 副腎皮質疾患の臨床病理－副腎偶発腫を中心に－*泌尿器外科* 14:411-414;2001
35. 笹野公伸、奈良坂俊明、鈴木貴 副腎ホルモンの調整機構－機能と形態－*ホルモンと臨床* 49:3-10;2001
36. 鈴木貴、笹野公伸 内分泌関連疾患における遺伝子研究の現状と展望 *医学のあゆみ* 197:1159-1163;2001
37. 笹野公伸、鈴木貴、森谷卓也 副腎偶発腫瘍の病理 *ホルモンと臨床* 49:23-25;2001
38. 鈴木貴、尾川清佳、金子智香、笹野公伸 ヒト眼組織における 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes の局在 *ホルモンと臨床* 43:64-67;2001
39. 谷口普、生山祥一郎、平松真祐、塩川左斗志、西村純二、秦聡孝、佐藤文憲、今川全晴、野村芳雄、笹野公伸 アルドステロン・コルチゾール同時産生副腎腫瘍の 1 例 *日本内科学会雑誌* 90:139-142;2001

2. 学会発表

1. A role for the transcription factor nurr1 in adrenal aldosterone production MH Bassett, T Suzuki, H Sasano, PC White, WE Rainey. The Endocrine Society's 83rd Annual Meeting Denver U.S.A. June 20-23 2001
2. Mineralocorticoid receptor, type1 and type2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart A Konishi, C Kaneko, T Inoue, T Suzuki, H Sasano. The Endocrine Society's 83rd Annual Meeting Denver U.S.A. June 20-23 2001
3. Expression of urocortin and corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the human heart Y Kimura, K Takahashi Y Muramatsu, C Kaneko, T Suzuki, K Totsune, H Sasano. The Endocrine Society's 83rd Annual Meeting Denver U.S.A. June 20-23 2001
4. 5 α -reductases in human breast carcinoma:possible modulator of in situ androgenic actions T Suzuki, AD Darnel, J Akahira, S Ogawa, J Takeyama, T Moriya, H Sasano. The Endocrine Society's 83rd Annual Meeting Denver U.S.A. June 20-23 2001
5. Progesterone receptor a and b isoforms in human neurogenic and soft tissue tumors T Inoue, J Akahira, J Takeyama, T Suzuki, AD Darnel, C Kaneko, M Hadori, T Kumabe, Y Kurokawa, S Satomi, H Sasano. The Endocrine Society's 83rd Annual Meeting Denver U.S.A. June 20-23 2001
6. Expression and regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD)in a human fetal epithelial cell line AD Darnel, T Suzuki, S Suzuki, C Kaneko, H Sasano. The Endocrine Society's 83rd Annual Meeting Denver U.S.A. June 20-23 2001

組織	DAX-1		
	++	+	+/-
全ての組織	血管内皮細胞	血管平滑筋細胞	
泌尿器生殖器			
精巣	Sertoli cell	Leydig cell	間質細胞
	精上皮細胞		
前立腺			間質細胞
卵巣			間質細胞
子宮内膜	腺上皮細胞		
	間質細胞		
	平滑筋細胞		
乳腺	導管上皮細胞		
	間質細胞		
	脂肪細胞		
内分泌系組織			
副腎皮質	副腎皮質実質細胞		間質細胞
甲状腺	濾胞上皮		
	間質細胞		
呼吸器			
肺	肺胞上皮		
気管、気道	繊毛上皮細胞		
	腺管上皮		
	間質細胞		
腎臓	遠位尿管	近位尿管	
	糸球体内皮細胞		
	間質細胞		
消化器			
食道	扁平上皮細胞		
	平滑筋細胞		
	間質細胞		
胃	間質細胞		腺窩上皮細胞 j
	平滑筋細胞		
腸管	間質細胞		上皮細胞
	平滑筋細胞		
肝臓		Sinusoid endothelium	肝細胞
			胆管上皮細胞
膵臓			腺房細胞
			Islet
			導管上皮細胞
顎下腺	腺房細胞		
	導管上皮細胞		
	間質細胞		
その他			
耳下腺	腺房細胞		
	導管上皮細胞		
	間質細胞		
皮膚	扁平上皮細胞		
	汗腺		
	間質細胞		
	皮脂腺		
心臓	心筋細胞		
骨格筋	骨格筋細胞		
	間質細胞		

表1 全身組織におけるDAX-1の発現動態のまとめ

++:ほとんどの細胞で強陽性、+:一部の細胞で陽性かほとんどの細胞で弱陽性、+/-:一部の細胞で弱陽性、陰性

組織	WT1		
	+	、 +/-	-
全ての組織			血管内皮細胞 血管平滑筋細胞
生殖器			
精巣			Sertoli cell Leydig cell 間質一部
前立腺			腺管上皮細胞 間質細胞
卵巣	表層上皮細胞		間質細胞
子宮	内膜間質細胞	平滑筋細胞	腺管上皮細胞
乳腺	間質細胞 脂肪細胞		導管上皮細胞
内分泌系			
副腎		皮質実質細胞	間質細胞
甲状腺		濾胞細胞	間質細胞
呼吸器			
肺			肺胞上皮細胞
気管、気管支	線毛上皮細胞		腺房細胞 間質細胞
腎臓	糸球体内皮細胞 ボーマン嚢細胞		遠位尿管 近位尿管 間質細胞
消化管			
食道			扁平上皮細胞 平滑筋細胞 間質細胞
胃			腺窩上皮細胞 間質細胞 平滑筋細胞
腸管			表層上皮細胞 間質細胞 平滑筋細胞
肝臓			肝細胞 胆管上皮細胞 Sinusoid endothelium
膵臓			腺房細胞 Islet 導管上皮細胞
顎下腺			腺房細胞 導管上皮細胞 間質細胞
耳下腺			腺房細胞 導管上皮細胞 間質細胞
皮膚			扁平上皮細胞 汗腺 間質細胞 皮脂腺
心臓			心筋細胞
骨格筋			骨格筋細胞 間質細胞

表2 全身組織におけるWT-1の発現動態のまとめ

++:ほとんどの細胞で強陽性、+:一部の細胞で陽性かほとんどの細胞で弱陽性、+/-:一部の細胞で弱陽性、陰性