

20020699

厚生労働科学研究費補助金

(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14年度研究報告書

平成15年3月

主任研究者 宮地 幸隆  
名和田 新

## はじめに

厚生労働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、平成11年度より通算4年度目を迎え、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13人とから構成されています。平成14年12月13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)副腎腫瘍において悪性化や自律的ホルモン産生獲得機序の一部を解明し、副腎腫瘍の新たな治療法の可能性を発見でき、副腎偶発腫の長期疫学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できた。

(2)先天性副腎低形成症について、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)副腎性血圧異常症のうち、原発性アルドステロン症は本態性高血圧症と診断された中に数%存在するといわれているが、新しい診断法やアルドステロン産生機序について新知見が得られた。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、治療を考える上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を来たす原因の解明を目指し、グルココルチコイドレセプターのリガンド結合領域の構造と機能について検討を行った。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。

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心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12月20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	
<b>分担研究報告</b>	
<b>(1) グルココルチコイド</b>	
1. ステロイドホルモンによる炎症性遺伝子発現制御機構に関する研究 .....	5
大阪大学大学院医学系研究科 笠山 宗正	
2. アンジオテンシンⅡ受容体の発現に対する糖質コルチコイドの影響 .....	10
福井医科大学第三内科 宮森 勇	
3. グルココルチコイドによるT細胞アポトーシスにおける MAPキナーゼとのクロストークに関する研究 .....	13
九州大学大学院医学研究院病態制御内科 名和田 新	
<b>(2) ステロイドホルモン受容体</b>	
4. ステロイドホルモンレセプターの転写制御メカニズムの解明 .....	19
東京大学分子細胞生物学研究所 加藤 茂明	
5. グルココルチコイド受容体(GR)による 転写活性化に対するTobタンパク質の作用の解析 .....	24
九州大学大学院医学研究院老年医学 高柳 涼一	
6. SWI/SNFクロマチン構造変換因子の視点に立った、 ステロイドホルモンの生理作用と副腎皮質上皮癌の解析 .....	27
東京大学医科学研究所 伊庭 英夫	
7. グルココルチコイドレセプターのリガンド結合領域の 多様な調節機構に関する研究 .....	31
東京大学医科学研究所先端医療研究センター 田中 廣壽	
<b>(3) 11<math>\beta</math>-HSDおよびDHEA</b>	
8. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1遺伝子の プロモーター活性に及ぼす転写共役因子の解明 .....	39
浜松医科大学小児科 大関 武彦	
9. 11 $\beta$ HSDタイプ2 遺伝子のCAリピート多型と電解質・糖代謝との関連 .....	44
岐阜大学第三内科 安田 圭吾	
10. Dehydroepiandrosterone(DHEA)のアポトーシス抑制効果 .....	53
横浜市立大学医学部第三内科 関原 久彦	

#### (4) 副腎腫瘍および副腎性高血圧

11. 原発性アルドステロン症の新しいスクリーニング法の検討 ..... 59  
京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学 伊藤 裕
12. 副腎腫瘍に対する外科的治療  
—内視鏡下副腎摘除術における到達法の選択— ..... 66  
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
13. ヒト副腎皮質癌細胞株SW-13における  
TGF- $\beta$  type II receptor mRNA発現低下 ..... 68  
東邦大学医学部第一内科 宮地 幸隆
14. ヒト副腎ならびに副腎皮質ホルモン産生異常症における  
核内受容体Nurr1、NGFI-B発現の免疫組織化学的検討 ..... 76  
東北大学大学院医学研究科医科学専攻病理学講座 笹野 公伸
15. 血管細胞におけるSerum- and Glucocorticoid-regulated Kinaseの活性制御 .. 84  
東京大学大学院医学研究科内科 藤田 敏郎

#### (5) 副腎の発生分化および遺伝子

16. 副腎皮質分化の分子メカニズムに関する研究 ..... 91  
岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 諸橋 憲一郎
17. 副腎皮質内層特異抗原(IZA)のステロイド産生に及ぼす影響 ..... 95  
大阪大学大学院生命機能研究科 岡本 光弘
18. 副腎外組織でのステロイド産生能の検討 ..... 101  
横浜労災病院内分泌・代謝内科 西川 哲男
19. 核内受容体COUP-TFによる転写制御機構：新規転写共役因子からの検討 ..... 109  
慶應義塾大学医学部内科 猿田 享男
20. Forkhead transcription factor Foxo1の副腎および性腺における  
発現・機能に関する研究 ..... 115  
旭川医科大学小児科 藤枝 憲二
21. HDL受容体CLA-1の遺伝子発現抑制による  
副腎ホルモン産生および細胞増殖に与える影響について ..... 119  
香川医科大学第一内科 村尾 孝児
- 副腎偶発腫の長期疫学調査集計報告 ..... 124  
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 ..... 143

# 総括研究報告

# 総括研究報告

## 1. 研究目標

厚生労働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期初年度(通算4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、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、COUP-TF 1、DAX-1などの核内オーファンレセプター、コレステロールを副腎に取り込むHDL受容体遺伝子CLA-1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する。癌化のメカニズムについては癌抑制遺伝子、細胞増殖抑制遺伝子、アポトーシス関連遺伝子などについて研究する。以上より得られた基礎的な所見を予後の極めて悪い副腎癌の早期診断および治療への応用を検討していく。副腎偶発腫の疫学的長期予後調査をさらに継続して行い、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prospectiveな調査を継続する。

(2) 先天性副腎低形成症：副腎の発生分化はAd4BP/SF-1、DAX-1などの転写調節因子が発現し、遺伝子が活性化される必要がある。先天性副腎低形成症家系のDAX-1の遺伝子異常を明らかにし、DAX-1はAd4BP/SF-1を抑制していることを示したが、Ad4BP/SF-1のプロモーターの解析、DAX-1異常症による先天性副腎低形成にしばしば合併する性腺障害の解明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：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ているが、ACTH連続負荷・アンジオテンシン受容体拮抗薬投与下での副腎静脈サンプリングによる隠れた原発性アルドステロン症を発見するための新しい診断法を臨床応用し、その有用性を検討し、さらに簡便な診断法を確立する。副腎性血圧異常症におけるミネラルコルチコイドレセプターや11 $\beta$ HSD2遺伝子変異などを明らかにする。基礎的な研究としてミネラルコルチコイドレセプターの活性化とリガンド選択的作用機構、ミネラルコルチコイド食塩誘発性の高血圧発症の機序を検討する。

(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病態解明のため、グルココルチコイドレセプターとその転写調節因子およびcofactorの異常、グルココルチコイドレセプターと転写調節因子AP-1との相互作用、グルココルチコイド抵抗性の機序、グルココルチコイドによる炎症性遺伝子発現制御機構などを検討し、新しい観点からのグルココルチコイド療法を開発する。

## 2. 研究成果

副腎ホルモン産生異常に関する研究班の平成14年度の研究報告会を平成14年12月13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

副腎腫瘍において、核内受容体COUP-TFがステロイド合成酵素の遺伝子転写調節において重要な役割を果たしていることを明らかにし、副腎腫瘍cDNAライブラリーよりCOUP-TFI結合蛋白としてUbc9を同定した。またUbc9はCOUP-TFIの新規転写共役因子であり、プロモーター依存性にcoactivatorまたはcorepressorのbifunctionalな機能を有することを明らかにした(猿田)。

ヒトHDL受容体CLA-1に変異を導入したDecoy CLA-1を作成し、副腎細胞におけるステロイドホルモン合成抑制および細胞増殖の抑制、アポトーシス促進作用を示した。このDecoy CLA-1を利用することにより、ステロイドホルモンを過剰に分泌する副腎腫瘍の新たな治療法につながることを示した(村尾)。

癌化のメカニズムについて、ヒト副腎皮質癌組織におけるTGF $\beta$  II型受容体の発現低下がTGF $\beta$  I抵抗性に基づく副腎皮質癌発生に深く関与していることを示した(宮地)。

副腎皮質癌細胞株SW13はBRG1、Brm両触媒サブユニットを欠くために、この複合体が機能を失っていると考えられてきたが、実際には正常なBRG1、Brm遺伝子を保持し、しかもこの両遺伝子を恒常的に転写していることが示された(伊庭)。

副腎皮質の内層に特異的に発現する抗原であるIZAは、プロゲステロンの21-水酸化活性速度を著明に亢進させることを明らかにした(岡本)。

ヒト培養T細胞において、抗糖尿病作用・抗動脈硬化作用・抗腫瘍作用などを有する副腎アンドロゲンであるDehydroepiandrosterone(DHEA)はアポトーシスに抑制的に働くことを示した(関原)。

内視鏡下副腎摘除術における到達法を検討したところ、右側症例には経腹膜前方到達法を、左症例には後腹膜側方または経腹膜側方到達法の選択が良いことを明らかにした(奥山)。

副腎偶発腫についての長期疫学調査の集計では、第3年度までに2864例の報告があり、ホルモン非産生腺腫が51%で、副腎癌は1.4%であった。副腎癌の大きさのカットオフ値4.8cmを明らかにした(宮地)。

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し、副腎腫瘍の新たな治療法の可能性を発見でき、副腎偶発腫の長期疫学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

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。昨年度までの研究成果で、DAX-1は副腎の発生・分化に関与するAd4BP/SF-1を抑制していることを示した。

生殖腺の性分化に深く関与する因子であるポリコム遺伝子M33は、このAd4B/SF-1遺伝子の遺伝子発現を制御していることを示した(諸橋)。

細胞の分化や増殖に関与し、そのほか代謝や蛋白合成、遺伝子発現にも関与すると考えられているforkhead型転写因子Foxo 1のステロイド産生組織における検討で、

副腎・性腺における発現を確認し、さらに発現部位として、副腎髄質及び副腎皮質球状層を確認した(藤枝)。

先天性副腎低形成について、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

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ているが、原発性アルドステロン症が疑われた時に原因の鑑別(主にアルドステロン産生腺腫と特発性アルドステロン症の鑑別)として、低侵襲かつ簡便な方法を検討した。その結果、rapid ACTH負荷試験での120分値の血漿アルドステロン濃度(PAC)、デキサメサゾン投与下アンジオテンシンⅡ(AⅡ)負荷試験で、AⅡ1ng/kg/min投与時のPACがその鑑別診断に有用であることが示唆された(伊藤)。

核内蛋白NGFIB(nerve growth factor-induced clone B)とNurr1(Nur-related factor 1)は副腎皮質球状層でのアルドステロン合成特にCYP11B2(アルドステロン合成酵素)の発現を制御している可能性がin vitroの検討で示唆されている。しかし、ヒト副腎における発現動態、生物学的意義は明らかではないため、免疫組織化学的に検討したところ、これら2つの核内蛋白はヒト副腎皮質ホルモン産生を制御している可能性が高く、特にNurr1は鉱質コルチコイド産生を制御する初めての核内受容体である可能性が示唆された(笹野)。

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を目指し、生化学的手法による核内受容体の転写共役因子複合体同定法により、RHA/CBP複合体がリガンド選択的にMRのN端側AB領域に結合し転写を制御することが明らかにされた(加藤)。

11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2(11 $\beta$ -HSD2)はミネラルコルチコイド作用を修飾する重要なpre-receptor機構であるが、11 $\beta$ -HSD2第1イントロン内のCAリピート多型と高血圧や2型糖尿病との関連分析を行ったところ、遺伝的な11 $\beta$ -HSD2活性の低下による血中或いは一部組織内でのglucocorticoid availabilityの変化が2型糖尿病の発症に影響する可能性が示唆された。また、高血圧との関連は認められなかった(安田)。

鉱質コルチコイドの非古典的標識であるラット大動脈由来培養平滑筋細胞(VSMC)では、Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase(SGK)はアルドステロンにより発現誘導され、アンジオテンシンⅡによりPI3-K依存性セリン422燐酸化を介して活性化されうることを明らかにした(藤田)。

ヒトの腎メサングウム初代培養細胞を用いてアルドステロンの局所産生能について、検討を行ったところ、ヒトのメサングウム細胞はアルドステロン産生臓器であり尚且つ、LDLが主要な産生調節因子であることを明らかにした(西川)。

グルココルチコイドのアンジオテンシンⅡタイプ1受容体発現機序を明らかにするため、培養ヒト大動脈平滑筋細胞を用いて検討したところ、グルココルチコイドは血管平滑筋細胞において、グルココルチコイド受容体を介してアンジオテンシンⅡタイプ1・タイプ2受容体の発現を調節していることが考えられ、グルココルチコイド induced hypertensionはアンジオテンシンⅡタイプ1受容体のupregulateによるも



のと推定された(宮森)。

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る、治療を考える上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

副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイド、ミネラルコルチコイドは各々のレセプターであるグルココルチコイドレセプター、ミネラルコルチコイドレセプターに結合しその作用を発現させるが、両ホルモンの作用にはredundancyが存在する。合成グルココルチコイドであるコルチバゾールは、ミネラルコルチコイドレセプターとは結合せず、グルココルチコイドレセプターにきわめて特異的リガンドである。グルココルチコイドレセプターのリガンド結合領域の構造と機能に与えるリガンドの影響を検討した結果、コルチバゾールは他のアゴニストとは異なった様式でかかる領域に結合することが推定された(田中)。

グルココルチコイドによるT細胞アポトーシスにおけるMAPキナーゼとのクロストークを検討したところ、グルココルチコイド抵抗性の機序の1つとしてERKの過剰な活性化が関与することが示された(名和田)。

ステロイドホルモンによる炎症性遺伝子発現制御機構について検討したところ、グルココルチコイドレセプター高発現血管内皮細胞ではデキサメサゾンによる炎症性遺伝子VCAM-1の転写抑制が確認され、グルココルチコイドレセプターとPPAR $\alpha$ の間に認められた標的遺伝子の転写抑制の特異性は受容体の発現量に依存的であることを明らかにした(笠山)。

グルココルチコイド代謝のキーエンザイムである11 $\beta$ HSD type 1遺伝子のプロモーター活性に及ぼす転写共役遺伝子の解明を行ったところ、様々な転写共役因子が11 $\beta$ HSD type 1遺伝子のプロモーター活性に作用しグルココルチコイド代謝に関与していることが示唆された。特に脂肪細胞の分化において重要な役割を果たすC/EBPファミリーが11 $\beta$ HSD type 1遺伝子のプロモーター活性調節の主要因子であることが明らかにされた(大関)。

骨形成に深く関与しているTobタンパク質は細胞増殖抑制活性があり、核内受容体のコアクチベータに共通のLXXLLモチーフを有している。このTobタンパク質のグルココルチコイドレセプターの転写活性化に対する影響を、骨芽細胞においてルシフェラーゼ活性を指標に検討したところ、量依存的にリガンド依存性のグルココルチコイドレセプターの転写活性化を抑制した。Tobタンパク質は骨芽細胞や免疫系細胞においてステロイドホルモンの作用を制御している可能性を示した(高柳)。

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た。

# 分担研究報告

## (1) グルココルチコイド

# ステロイドホルモンによる炎症性遺伝子発現制御機構に関する研究

笠山 宗正、許 欣、大月 道夫、紅林 昌吾  
大阪大学大学院医学系研究科 分子病態内科学講座

## 研究要旨

血管内皮細胞における炎症性遺伝子VCAM-1とIL-6をターゲットとして、核受容体によるこれら遺伝子の発現調節について解析した。デキサメサゾン(Dex)はTNF $\alpha$ 誘導性のIL-6発現を遺伝子の転写レベルで抑制したが、VCAM-1発現に対しては抑制作用を示さなかった。一方、PPAR $\alpha$ の特異的リガンドであるフェノフィブラート(Feno)は両遺伝子の発現を転写レベルで抑制した。この抑制は、NF- $\kappa$ Bの標的遺伝子への結合に対する抑制と一致していた。以上の結果は、NF- $\kappa$ Bによる炎症性遺伝子発現に対する抑制作用が、VCAM-1とIL-6の標的遺伝子によってGRとPPAR $\alpha$ とで異なることを示す成績であった。しかし、GR高発現血管内皮細胞ではDexによるVCAM-1遺伝子の転写抑制が確認されたことから、GRとPPAR $\alpha$ の間に認められた標的遺伝子の転写抑制の特異性は受容体の発現量に依存的であることが判明した。

## A. 研究目的

グルココルチコイド(GC)産生低下症ではストレスや炎症に対する防御反応の低下が認められる一方、GC産生過剰症では炎症反応がマスクされる。これはGCの炎症性遺伝子発現抑制によるものである。一般に、抗炎症作用を発揮するGCの濃度は代謝作用に要する濃度より高濃度であり、これがGCの副作用の原因となっている。我々は、血管内皮細胞の接着分子VCAM-1の発現に対してプロゲステロンが抑制作用を示すこと、そしてこの抑制は $10^{-7}$ Mよりも $10^{-5}$ Mの高濃度でより強力に認められること、また同じプロゲステロン受容体(PR)のアゴニストであるメドロキシプロゲステロン(MPA)はVCAM-1発現を抑制しないこと、を報告した(Otsuki et al., ATVB, 2001)。すなわち、VCAM-1遺伝子の転写抑制に係る核受容体リガンドの濃度依存性やリガンドの特異性が、PRの古典的標的細胞における標的遺伝子の転写促進と異なることが示された。このことは、臨床的には、核受容体リガンド

の抗炎症作用と副作用を示す用量の乖離やステロイドパルス療法メカニズムを考えるうえで興味深い現象と思われた。我々は、このような特異性が、標的遺伝子のプロモーター構造の微細な差異によって、また核受容体-転写因子間相互作用に関与する転写共役因子の特異性によってもたらされる、との仮説を立てた。本研究では、ステロイドホルモンによる炎症性遺伝子発現制御における標的遺伝子特異性・核受容体特異性を解明し、GC産生異常症の臨床症状の改善と共に、副作用の少ないステロイド系抗炎症薬の開発につなげたい。

## B. 研究方法

HUVECにおけるIL-6産生とVCAM-1発現を各々ELISAとwhole cell ELISA、およびノーザン解析により測定した。IL-6またはVCAM-1遺伝子プロモーター領域を含むレポーター遺伝子をBAECに導入し、TNF $\alpha$ 刺激時のプロモーター活性に及ぼすGC受容体(GR)およびPPAR $\alpha$ の作用についての検討を

行った。また、GRまたはPPAR $\alpha$ 発現ベクターを導入したBAECを用いて同様にレポーターアッセイを行った。TNF $\alpha$ 刺激時のNF- $\kappa$ Bの活性化に対するこれら核受容体の作用は、ゲルシフト解析・p65の核内移行を指標として解析した。さらに、PPAR $\alpha$ によるこれら炎症性遺伝子の発現抑制に対する抗グルココルチコイド薬RU486の作用を解析した。PPAR $\alpha$ の細胞内局在は免疫染色法にて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は試験管内実験および培養細胞を用いて実施したものであり、倫理面の問題は無いと考える。

## C. 研究成果

### 1. 血管内皮細胞のIL-6遺伝子・VCAM-1遺伝子発現に対するGRとPPAR $\alpha$ の作用

Dexは、HUVECにおいてTNF $\alpha$ によって誘導されるIL-6産生を抑制したが、VCAM-1発現の増加を抑制しなかった。一方、FenoはIL-6産生およびVCAM-1発現の両者に対して抑制作用を示した。BAECにレポーター遺伝子を導入したレポーターアッセイにおいても、DexはIL-6遺伝子のプロモーター活性のみを抑制し、FenoはIL-6、VCAM-1両遺伝子のプロモーター活性を抑制した。ゲルシフト解析では、DexはIL-6遺伝子プロモーター領域へのNF- $\kappa$ Bの結合を抑制したがVCAM-1遺伝子プロモーター領域へのNF- $\kappa$ Bの結合を抑制せず、Fenoは両遺伝子のプロモーター領域へのNF- $\kappa$ Bの結合を抑制した。しかし、DexもFenoもTNF $\alpha$ 刺激時のNF- $\kappa$ B p65の核内移行を阻害しなかった。

### 2. 血管内皮細胞のIL-6遺伝子・VCAM-1遺伝子発現に対するGR発現量の効果

BAECにGR発現ベクターを導入し、GR高発現細胞とGR低発現細胞における

IL-6遺伝子・VCAM-1遺伝子プロモーター活性に及ぼすDexの作用を比較した。GR低発現細胞では、DexはIL-6遺伝子のプロモーター活性のみを抑制したが、GR高発現細胞では、DexはIL-6遺伝子とVCAM-1遺伝子の両者のプロモーター活性に対して抑制作用を示した。

### 3. PPAR $\alpha$ の炎症性遺伝子発現抑制作用に及ぼすRU486の作用

RU486は、TNF $\alpha$ 誘導性IL-6発現に対するFenoの抑制作用を、蛋白レベルおよび遺伝子の転写レベルで阻害した。HUVECにおけるPPAR $\alpha$ の免疫染色の結果から、RU486はPPAR $\alpha$ のリガンド依存性核内移行を阻害することにより拮抗作用を示すことが判明した。

## D. 考察

GRをはじめとする核受容体は、古典的には、標的遺伝子のプロモーター領域に存在する受容体結合領域に結合した後その遺伝子の転写を促進(trans-activation)すると考えられてきた。一方、これまでの検討では、これら核受容体による炎症性遺伝子の転写抑制(trans-repression)作用は、NF- $\kappa$ BやAP-1などの他の転写因子の活性を抑制することによって担われることが明らかにされている。本研究では、GRとPPAR $\alpha$ のIL-6およびVCAM-1遺伝子発現制御の差異について検討を行った。その結果、①これら標的遺伝子の発現抑制作用に核受容体の特異性が認められること、②そして、その特異性は核受容体の量依存的に認められること、を明らかにした。これまでに、炎症性分子の遺伝子発現抑制に対する核受容体の特異性とその機構を明らかにした報告は皆無であり、その点で本研究は独創的であると考えられた。また、③従来から抗グルココルチコイド作用を示すとされている

RU486が、PPAR $\alpha$ のリガンド依存性核内移行を阻害するという新たな分子機構によりアンタゴニストとしての作用を発揮することを見出した。

このように、核受容体による炎症性遺伝子の発現制御機構において、標的遺伝子特異性・核受容体特異性・核受容体の量依存性が存在することを応用することにより、また核受容体アンタゴニストの新たな分子機構を解明することにより、標的細胞特異的・標的遺伝子特異的な副作用の少ない抗炎症薬や抗炎症薬の副作用阻害薬の開発を目指したいと考えている。

## E. 結論

GRとPPAR $\alpha$ は血管内皮細胞においていずれも抗炎症的に作用するが、その作用にはIL-6遺伝子とVCAM-1遺伝子とで特異性があり、GRによるVCAM-1遺伝子の転写抑制にはIL-6遺伝子の転写抑制に比較してより高濃度のGR量が必要である。また、RU486はPPAR $\alpha$ の抗炎症作用に対してアンタゴニスト作用を示す。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Xu, X., Otsuki, M., Sumitani, S., Saito, H., Kouhara, H., and Kasayama, S.: RU486 antagonizes the inhibitory effect of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  on interleukin-6 production in vascular endothelial cells. *J Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 81: 141-146, 2002.
- 2) Yamamoto, H., Kurebayashi, S., Hirose, T., Kouhara, H., and Kasayama, S.: Reduced IRS-2 and GLUT4 expression in PPAR $\gamma$ 2-induced adipocytes derived from C/EBP $\beta$  and C/EBP $\delta$ -deficient mouse

embryonic fibroblasts. *J. Cell Sci.*, 115: 3601-3607, 2002.

- 3) Sumitani, S., Goya, K., Testa, J. R., Kouhara, H., and Kasayama, S.: Akt1 and Akt2 differently regulate muscle creatine kinase and myogenin gene transcription in insulin-induced differentiation of C2C12 myoblasts. *Endocrinology*, 143: 820-828, 2002.

- 4) Kasayama, S., Tanaka, T., Hashimoto, K., Koga, M., Kawase, I.: Efficacy of glimepiride for the treatment of diabetes mellitus occurring during glucocorticoid therapy. *Diabetes Care*, 25: 2359-2360, 2002.

- 5) Hattori, T., Otsuki, M., Kajiwara, K. and Kasayama, S.: Impaired counterregulation to hypoglycemia in a patient with stress. *The Endocrinologist*, 12: 9-11, 2002.

- 6) Saitoh, Y., Nakajima, H., Kasayama, S., Matsuzawa, Y. and Yoshimine, T.: Radiosurgery for acromegaly. *Recent Res. Devel. Endocrinol.*, 3: 1-10, 2002.

- 7) Suido, H., Tanaka, T., Tabei, T., Takeuchi, A., Okita, M., Kishimoto, T., Kasayama, S., and Higashino, K.: A mixed green vegetable and fruit beverage decreased the serum level of low-density lipoprotein cholesterol in hypercholesterolemic patients. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 3346-3350, 2002.

- 8) Asanuma, N., Kitamura, T., Xu, X., Sumitani, S., Saito, H., Kasayama, S., Kouhara, H., and Kawase, I.: New analytical method for pancreas and liver regeneration: Normalization of streptozotocin-induced hyperglycemia by retrograde injection of insulin producing cells. *Endocrine J.*, 49: 449-457, 2002.

- 9) Goya, K., Otsuki, M., Xu, X., and Kasayama, S.: Effects of the prostaglandin I<sub>2</sub> analogue beraprost sodium on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human vascular endot-

helial cells and circulating VCAM-1 level in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 52: 192-198, 2003.

## 2. 学会発表

- 1) 斎藤博、丹治有希子、大場雄一郎、幸原晴彦、笠山宗正、川瀬一郎：副腎腺腫摘出後に腎不全を来した原発性アルドステロン症の一例。第12回臨床内分泌代謝Update、2002年、大阪市。
- 2) 浅沼伸行、北村哲宏、住谷哲、斎藤博、笠山宗正、幸原晴彦、川瀬一郎：新しい膵島移植法の開発。第45回日本糖尿病学会年次学術集会、2002年、東京都。
- 3) 許欣、大月道夫、斎藤博、住谷哲、山本浩靖、浅沼伸行、幸原晴彦、笠山宗正、川瀬一郎：血管内皮細胞におけるPPAR $\alpha$ の接着分子・サイトカイン発現抑制作用とその分子機構。第45回日本糖尿病学会年次学術集会、2002年、東京都。
- 4) 合屋佳世子、住谷哲、斎藤博、幸原晴彦、笠山宗正、川瀬一郎：血管内皮細胞由来NO合成酵素(eNOS)の発現に及ぼすチアゾリジン誘導体の効果。第45回日本糖尿病学会年次学術集会、2002年、東京都。
- 5) 山本浩靖、住谷哲、斎藤博、幸原晴彦、笠山宗正、川瀬一郎、高木美紀：糖尿病性多発神経障害を有する患者の自覚症状についての検討。第45回日本糖尿病学会年次学術集会、2002年、東京都。
- 6) 大月道夫、許欣、住谷哲、斎藤博、幸原晴彦、笠山宗正、川瀬一郎：RU486はPPAR $\alpha$ のIL-6発現抑制作用のアンタゴニストである。第75回日本内分泌学会学術総会、2002年、大阪市。
- 7) 北村哲宏、向内千佳、住谷哲、斎藤博、笠山宗正、幸原晴彦、川瀬一郎：抗てんかん薬によるSIADHを新しい診断法にて除外し得た低Na血症の一例。第75回日本内分泌学会学術総会、2002年、大阪市。
- 8) 許欽、斎藤博、山本浩靖、住谷哲、幸原晴彦、笠山宗正、川瀬一郎：エストロゲンレセプターによる血管内皮細胞の炎症性遺伝子発現抑制に及ぼすエストロゲンレセプター(ER)量の影響。第75回日本内分泌学会学術総会、2002年、大阪市。
- 9) 稲葉真希子、斎藤博、住谷哲、幸原晴彦、笠山宗正、川瀬一郎：IGF-Iレセプターを介した筋細胞分化におけるSOCS1の役割。第75回日本内分泌学会学術総会、2002年、大阪市。
- 10) 浅沼伸行、北村哲宏、住谷哲、斎藤博、笠山宗正、幸原晴彦、川瀬一郎：新しい膵島移植法の開発。第75回日本内分泌学会学術総会、2002年、大阪市。
- 11) 住谷哲、山本浩靖、斎藤博、幸原晴彦、笠山宗正、川瀬一郎：中枢性尿崩症と下垂体前葉機能低下症を合併したMikulicz症候群の一例。第75回日本内分泌学会学術総会、2002年、大阪市。
- 12) 合屋佳世子、住谷哲、斎藤博、幸原晴彦、笠山宗正、川瀬一郎：血管内皮細胞由来NO合成酵素(eNOS)の発現に及ぼすプロゲステロンとメドロキシプロゲステロンの効果。第75回日本内分泌学会学術総会、2002年、大阪市。
- 13) 山口徹、山本浩靖、住谷哲、北村哲宏、斎藤博、幸原晴彦、笠山宗正、川瀬一郎、松宮清美、奥山明彦、古山将康、村田雄二：卵巣癌および結腸癌を合併したMEN2Aの1例。第75回日本内分泌学会学術総会、2002年、大阪市。
- 14) 斎藤博、塩田敦、稲葉真希子、石原正浩、住谷哲、幸原晴彦、笠山宗正、川瀬一郎：低身長、耳介低位、性腺発育不全および副甲状腺機能低下症を合併した一例。第75回日本内分泌学会学術総会、2002年、大阪市。
- 15) Xu, X., Kasayama, S., Yamamoto, H., Kurebayashi, S., Saito, H., Kouhara, H., Kawase, I.: Amounts of estrogen receptor (ER) and CREB-binding protein (CBP) determine the dose-responsive curve of the ER ligand for transrepression of VCAM-1 gene. 11<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and 7<sup>th</sup> International Congress on Hormones and Cancer, 2002, Fukuoka.
- 16) Yamamoto, H., Kasayama, S., Fujita, M., Fujita, K., Morimoto, Y., Kawase,

I.: Ethidronate disodium improves reduced bone mineral density in postmenopausal asthmatic women treated with inhaled corticosteroids. 11<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and 7<sup>th</sup> International Congress on Hormones and Cancer, 2002, Fukuoka.

17) Goya, K., Sumitani, S., Kurebayashi, S., Yamamoto, H., Saito, H., Kouhara, H., Kasayama, S., Kawase, I.: Differential effects of progesterone and medroxyprogesterone acetate on endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) expression. 11<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and 7<sup>th</sup> International Congress on Hormones and Cancer, 2002, Fukuoka.

18) 山本浩靖、笠山宗正、川瀬一郎、藤田麻里、藤田きみえ、森本康彦、宮武明彦：吸入ステロイド薬治療中の閉経後女性気管支喘息患者の骨量減少に及ぼすエチドロネートの効果。第4回日本骨粗鬆症学会、2002年、東京都。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



# アンジオテンシン II 受容体の発現に対する糖質コルチコイドの影響 ：ヒト血管平滑筋細胞における検討

宮森 勇、谷口尚美、此下忠志、稲葉 聡  
福井医科大学第三内科

## 研究要旨

糖質コルチコイドは血管壁に局在するアンジオテンシン II (Ang II) の血管収縮作用を増強し昇圧に働くことが報告されている。しかしその分子機構に関しては未だ明かではない。本研究では主要な副腎ホルモンである糖質コルチコイドの血管作用を解明する目的で培養ヒト大動脈平滑筋細胞 (hSMCs) を用い Ang II 受容体 type 1、type 2 (AT1R, AT2R) への影響を検討した。hSMCs を  $1 \mu\text{mol/L}$  のデキサメサゾン (DX) 添加下で 0.5~24 h 培養後 AT1RmRNA は時間依存性に 1.7~15 倍に増加した。AT2RmRNA も同様に 1.5~11 倍に増加した。濃度依存性も観察され  $10^{-6} \sim 10^{-10} \text{M}$  で 13 倍増加した。これらの変化は糖質コルチコイド受容体拮抗剤である RU38468 で抑制された。以上の結果から糖質コルチコイドは血管平滑筋 Ang II 受容体発現を刺激することにより血管収縮を来すと考えられた。Ang II 受容体遺伝子の作用部位、他の血管作動性因子との相互作用に関しては今後検討予定である。

## A. 研究の目的

糖質コルチコイドの昇圧機序に関しては、これまで交感神経活性の亢進、レニン-アンジオテンシン系の賦活作用、プロスタグランジンや NO などの降圧系因子の抑制などさまざまな機序が想定されている。我々はコルチゾールのアンジオテンシン II 受容体への結合実験からコルチゾールがその発現を亢進することを報告してきた。今回、糖質コルチコイドの AT1 受容体発現機序を明らかにする目的で培養ヒト大動脈平滑筋細胞を用いて検討した。ヒト冠動脈平滑筋細胞にはアンジオテンシン II のタイプ 1 に特異的な受容体が存在することを示します。

コルチゾールのアンジオテンシン II 受容体への結合能にたいする効果を検討では  $10^{-6} \text{M}$  のコルチゾールによってアンジオテンシン II の受容体への結合は約 2 倍に増加していた。

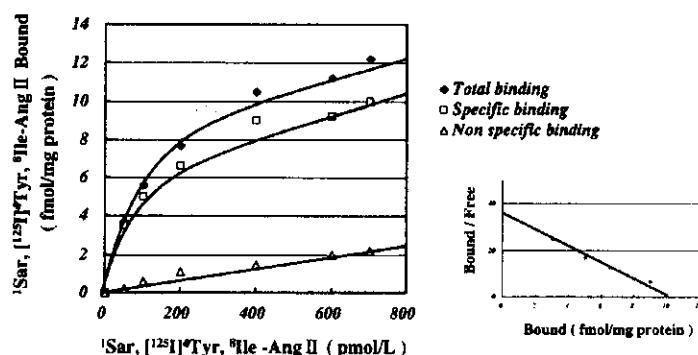


fig 1. Binding of  $^{125}\text{I}$ -Sar,  $^{125}\text{I}$ -Tyr,  $^8\text{Ile}$ -AngII to control hSMCs

また結合能はグルココルチコイド受容体拮抗剤である RU38486 添加により用量依存性に低下していた。

## B. 研究方法

6 世代目の培養ヒト大動脈血管平滑筋細胞を用いて検討した。24 時間無血清後に時間依存性をみるために  $10^{-6} \text{M}$  のデキサメサゾンを添加し 0.5、1、6、12、24、48 時間培養した。また濃度依存性をみるために、デ

キサメサゾン $10^{-10}$ ~ $10^{-6}$ Mを添加し24時間培養した。またデキサメサゾンの影響がグルココルチコイド受容体を介する反応であることを確認するために、培養ヒト大動脈血管平滑筋細胞に $10^{-5}$ Mのグルココルチコイド受容体拮抗剤であるRU38486を添加し検討した。アンジオテンシンIIタイプ1・タイプ2受容体mRNA発現量は定量的RT-PCR法にて評価した。

### C. 研究結果

まず、時間依存性について検討した。アンジオテンシンIIタイプ1受容体mRNA発現量は30分後には1.7倍に、24時間後には9倍に、48時間後は15倍に発現量が増加し、時間依存性を示した。

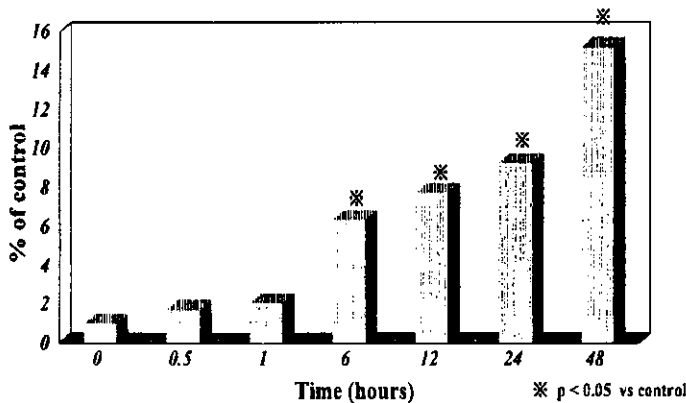


Fig 3. Effect of DX on time course of ATR type1 mRNA expression in hSMCs

また、タイプ2受容体も30分後には1.5倍に、24時間後には6倍に、48時間後には11倍に発現量が増加していた。

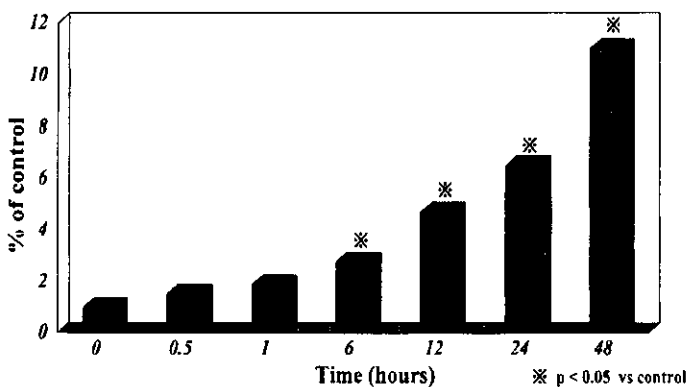


Fig 4. Effect of DX on time course of ATR type2 mRNA expression in hSMCs

次に濃度依存性について検討した。アンジオテンシンIIタイプ1受容体mRNA発現量はcontrolと比較し $10^{-6}$ Mのデキサメサゾン添加にて13倍に増加し、濃度依存性を示した。

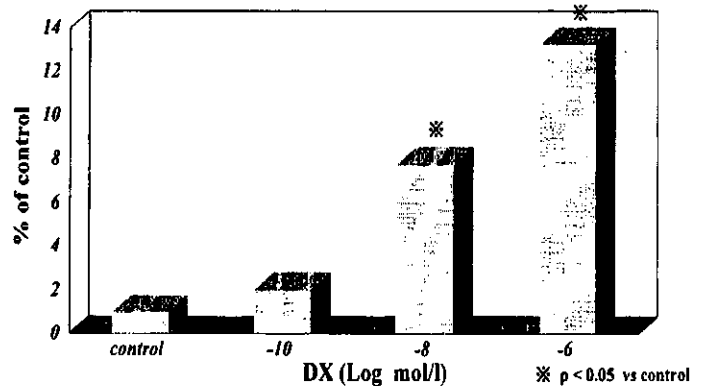


Fig 5. Effect of DX on ATR type1 mRNA expression in hSMCs

同様にタイプ2受容体においても $10^{-6}$ Mのデキサメサゾン添加にて11倍に増加していた。

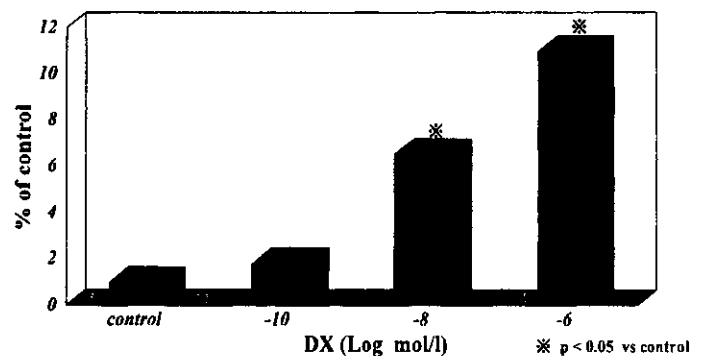


Fig 6. Effect of DX on ATR type2 mRNA expression in hSMCs

デキサメサゾンによるアンジオテンシンIIタイプ1・タイプ2受容体のmRNA発現は完全にグルココルチコイド受容体拮抗薬であるRU38486によって抑制され、デキサメサゾンの作用はグルココルチコイド受容体を介していることが示された。

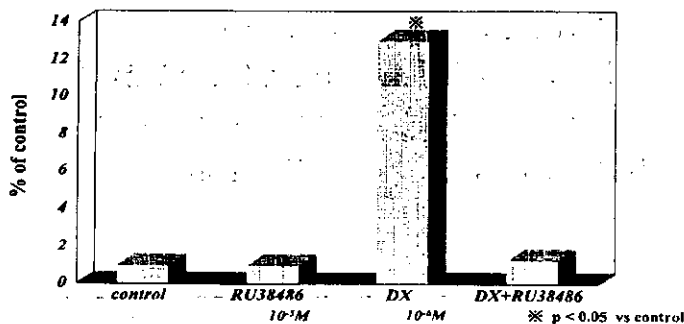


Fig 7. Effect of RU38486 on DX induced increase of ATR type1 mRNA expression

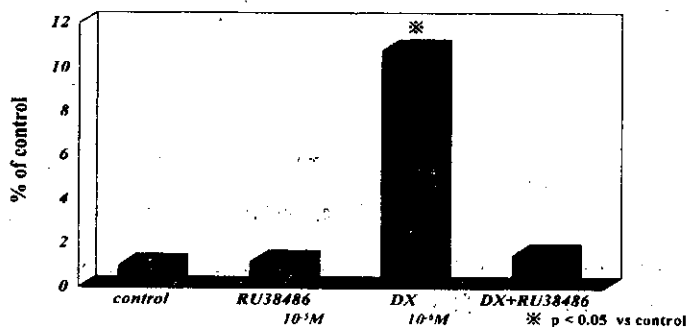


Fig 8. Effect of RU38486 on DX induced increase of ATR type2 mRNA expression

#### D. 考察および結論

グルココルチコイドは血管平滑筋細胞においてグルココルチコイド受容体を介してアンジオテンシンIIタイプ1・タイプ2受容体の発現を調節していると考えられ、グルココルチコイドinduced hypertensionはアンジオテンシンIIタイプ1受容体のupregulateによるものと思われた。しかし、グルココルチコイドによるアンジオテンシンIIタイプ2受容体の発現が増加することについては不明のままである。今後、更なる検討が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Mizuno, S., Demura, Y., Ameshima, S., Okamura, S., Ishizaki, T., Miyamori, I.: Alkalosis stimulates endothelial nitric oxide synthase in cultured human pulmonary arterial endothelial cells. American Journal of Physiology, 283: L113-L119, 2002.

2) Konoshita, T., Kurokawa, M., Wakahara, S., Taniguchi, N., Inaba, S., Pinet, E., Corvoi, P.: Genetic variants of human renin gene, expression and plasma renin activity. J. Hypertension, 20: S44, 2002.

3) Miyamori, I.: Mechanism of hypertension in cushing's syndrome: possible role of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in kidneys and vascular cells. Internal Medicine, 41(4): 249-250, 2002.

4) Hatakeyama, H., Nishizawa, M., Nakagawa, A., Nakano, S., Kigoshi, T., Miyamori, I.: Thrombospondin expression in aldosterone-producing adenomas. Hypertens. Res. 25(4): 523-527, 2002.

5) 宮森 勇: 急性副腎不全. 新臨床内科学: 1129-1130, 2002.

6) 宮森 勇: アルドステロン拮抗薬と高血圧合併症. Pharma Medica, 20(9): 57-61, 2002.

7) 宮森 勇: アルドステロンの新世紀—心血管リスクホルモンとしてのアルドステロン—. 医学のあゆみ, 202(9): 513-516, 2002.

8) 宮森 勇: 心不全におけるアルドステロンとその受容体. Medical Tribune, 35(33): 17-78, 2002.

9) 宮森 勇: 心血管系リスクホルモンとしてのアルドステロン. 血圧, 9(1): 98-101, 2002.

10) 宮森 勇: アルドステロン産生・分泌の制御. 腎と透析, 52(1): 53-58, 2002.

11) 宮森 勇: アルドステロンの新世紀. 医学のあゆみ, 202(9): 513-516, 2002.

12) 宮森 勇, 関原久彦, 成瀬光栄: エプレレノン臨床応用までの軌跡. 血圧, 9(8): 825-832, 2002.

13) 宮森 勇: アルドステロン拮抗薬と高血圧合併症. Pharma. Medica, 20(9): 57-61, 2002.

# グルココルチコイドによるT細胞アポトーシスにおける MAPキナーゼとのクロストークに関する研究

名和田 新、岡部 泰二郎、野村 政壽、後藤 公宣、柳瀬 敏彦  
九州大学大学院医学研究院病態制御内科

## 研究要旨

グルココルチコイドによるT細胞アポトーシスにおけるMAPキナーゼとのクロストークを検討した。抑制剤を用いた検討より、グルココルチコイドによるT細胞アポトーシスに対して、ERKは促進的に、P38は抑制的に作用することが示唆された。また、グルココルチコイド抵抗性株においても、ERKを抑制すると抵抗性が解除されることがわかり、このことはグルココルチコイド抵抗性の機序のひとつとしてERKの過剰な活性化が関与することが考えられるだけでなく、治療を考えた場合大変興味深い。

## A. 研究目的

グルココルチコイドに対する感受性は人それぞれにより異なっており何がそれを規定しているのかは不明な部分が多い。グルココルチコイドと他の情報伝達系のクロストークを明らかにすることはそのことに何らかの手がかりを与える可能性がある。

そこで我々は今回ヒトT細胞を用いて、グルココルチコイドとMAPキナーゼのクロストークについて検討した。

## B. 研究方法

ヒトT細胞株CCRF-CEMを用いてデキサメサゾンによりアポトーシスを誘導した。MAPキナーゼとのクロストークはインヒビターを用いて検討した。ERK経路のインヒビターとしてU0126を、P38経路のインヒビターとしてSB203580を用いた。アポトーシスの検出はミトコンドリア膜電位、カスパーゼ-3様活性、DNAの分解、クロマチン凝縮、ホスファチジルセリンの細胞外表出を検出した。

1. ミトコンドリア膜電位はDiOC6(3)処理後フローサイトメトリーにて検出した。

2. カスパーゼ-3様活性はPhiPhiLuxキットを用いてフローサイトメトリーにて検出した。

3. DNAの分解はヨウ化プロピジウム処理後細胞周期解析を行い、いわゆるsubG0/G1分画として検出した。

4. クロマチン凝縮はヘキスト33342にて処理後蛍光顕微鏡にて観察した。

5. ホスファチジルセリンの細胞外表出はアネキシンVの結合をフローサイトメトリーにて検出した。

6. ウェスタンブロット解析は定法にて行った。

## C. 研究結果

ヒトT細胞株CCRF-CEMよりグルココルチコイド感受性株CC7および抵抗性株CC3を分離した。CC7ではグルココルチコイドによりアポトーシスが誘導されるが、CC3では全くアポトーシスが誘導されない(図1)。

CC7においてグルココルチコイドによるミトコンドリア膜電位の低下、カスパーゼ-3様活性の増加、DNAの分解の増加、クロマチン凝縮の誘導、ホスファチジルセリ