

用量依存性に細胞増殖が抑制されTGF- β 感受性の回復を認めた(Fig. 5)。

D. 考察

副腎皮質腫瘍におけるTGF- β 情報伝達系の異常を検討するため、アルドステロン産生副腎皮質腺腫、副腎皮質癌組織およびSW-13における、TGF- β 1、TGF- β RI、TGF- β RII mRNAの発現解析をおこなった。良性の副腎皮質腺腫では、TGF- β 1、TGF- β RI、TGF- β RII mRNAを発現しているのに対し、悪性の副腎皮質癌組織およびSW-13ではTGF- β 1、TGF- β RIの発現を認めるが、TGF- β RII mRNAの発現は、良性腺腫に比べ副腎皮質癌組織で16%、SW-13で0.6%と顕著に低下し、これらの副腎皮質癌ではTGF- β RII mRNAの発現低下に基づくTGF- β 情報伝達系の異常が存在すると考えられた。さらにSW-13のTGF- β RII強制発現系を作製し、TGF- β 感受性の回復について検討をおこなったところTGF- β RII強制発現系ではTGF- β 1の添加により細胞増殖は抑制されTGF- β 1への感受性の回復を認めた。本研究において、ヒト副腎皮質癌組織およびSW-13におけるTGF- β RII mRNA発現低下は、TGF- β 1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が示唆された。

TGF- β の情報伝達にはセリン/スレオニン活性をもつTGF- β RIおよびTGF- β RIIが不可欠である。TGF- β RIIは単独でTGF- β 1と結合するが、TGF- β RIのみではTGF- β 1に結合せず、TGF- β RIIの共存下ではじめてTGF- β 1に結合が可能となる。TGF- β 分子がTGF- β RIIに結合するとつづいてTGF- β RIが結合し、ヘテロダイマーを形成することにより、TGF- β RIIによるTGF- β RIのリン酸化が行なわれる。リン酸化したTGF- β RIは、自身の持つキナーゼが活性化され下流のシグナルであるSmad分子をリン酸化し、シグナルを核内に伝え、遺伝子発現の

制御を行なう。Smadのシグナルは、p15^{INK4B}、p21^{Cip1}やp27^{Kip1}といったサイクリン依存性キナーゼインヒビターの発現を促進する。これにより細胞周期のG₁期からS期への移行に関与するRBタンパク質のリン酸化を阻止し、細胞周期の停止をもたらす。TGF- β 情報伝達経路は細胞増殖抑制経路であり、細胞がTGF- β 抵抗性を獲得すると自律性に増殖し、細胞の癌化や悪性化に寄与すると考えられている。TGF- β 抵抗性獲得の機序のひとつにTGF- β RIIの異常があげられ、胃癌や大腸癌、乳癌、肝細胞癌、膵臓癌、甲状腺癌、子宮内膜癌といった全身のあらゆる臓器の悪性腫瘍でTGF- β RII遺伝子変異やTGF- β RII mRNA発現の低下が報告されている。

副腎皮質におけるTGF- β 情報伝達系の役割はヒトを含め様々な動物で研究されている。正常副腎皮質細胞では、TGF- β 受容体が発現していてTGF- β 1がautocrineあるいはparacrineで作用し、細胞増殖の調節やステロイドホルモン合成等に関与していると考えられている。副腎皮質腫瘍のうち、良性副腎皮質腺腫ではTGF- β 1、TGF- β RIおよびTGF- β RII mRNAの発現を認めたとの報告や、免疫組織学的にステロイドホルモン産生細胞に優位なTGF- β 1の発現を認めステロイドホルモン合成系への関与が示唆された等の報告がある。一方、ヒト副腎癌組織においては、TGF- β RII mRNA発現低下や、免疫組織学的検討により副腎皮質癌細胞でのTGF- β 1の発現低下が報告され、TGF- β 情報伝達系の異常によるTGF- β の細胞増殖抑制作用の低下と癌化との関連が指摘されてきた。

本研究において、副腎皮質腺腫組織ではTGF- β RII mRNAの発現が見られたが、副腎皮質癌組織および副腎皮質癌由来細胞株SW-13ではTGF- β RII mRNA発現の低下が認められた。さらに、SW-13はTGF- β RIIタン

パクの発現も低下しておりTGF- β 1投与による細胞増殖抑制作用に抵抗性を示した。このことからSW-13におけるTGF- β 抵抗性はTGF- β RII mRNAおよびタンパクの発現低下によるものと考えられた。今回検討した全ての副腎皮質腫瘍およびSW-13でTGF- β 1 mRNAの発現が確認されており、これらの副腎皮質細胞ではTGF- β 1はautocrineとして作用している可能性が考えられる。正常副腎皮質や副腎皮質過形成および良性腫瘍ではTGF- β RIおよびTGF- β RIIが発現していることが報告されており、TGF- β の情報伝達経路が正常に保たれ、paracrineあるいは副腎皮質細胞からautocrineされるTGF- β 1の刺激により細胞増殖は抑制されていると考えられる。しかし、副腎皮質癌では何らかの原因によりTGF- β RII mRNA発現が低下することでTGF- β のシグナルが正常に作用しなくなりparacrineあるいはautocrineされたTGF- β 1による細胞増殖抑制に抵抗性となる。その結果、腫瘍細胞の増殖が活発となり腫瘍の悪性転化を促すと考えられた。このことより、ヒト副腎皮質癌組織およびSW-13におけるTGF- β RII mRNA発現低下は、TGF- β 抵抗性に基づく副腎皮質癌の発生や悪性転化に関与していることが示唆された。

近年、画像診断の進歩に伴い副腎皮質腫瘍が発見される頻度が高くなっており、経過観察可能な良性の副腎皮質腫瘍と、早期診断に基づく外科的治療が必須の悪性の副腎皮質癌とを鑑別することが極めて重要となっている。これまでに副腎皮質癌のマーカーがいくつか検討されており、TGF- β RII発現低下が診断マーカーとして有効かを検討することは興味深いと思われる。

また、TGF- β RII発現の低下した乳癌細胞や胃癌細胞にTGF- β RII遺伝子をトランスフェクションしてTGF- β RIIの発現を回復させることによりTGF- β 1感受性が回復

し、悪性度が軽減することが報告されている。SW-13のTGF- β RII強制発現系ではTGF- β 1の添加により細胞増殖は抑制されTGF- β 1の増殖抑制作用への感受性の回復を認めることを示しており、今後、腫瘍形成実験などによりTGF- β RII強制発現がSW-13の腫瘍形成を抑制し悪性度を軽減するか検討していく必要がある。長年にわたり有効な副腎皮質癌の治療法が見出されてこなかったが、今回副腎皮質癌におけるTGF- β RII発現低下と癌化との関連が示され、遺伝子治療によるTGF- β RIIの発現回復が副腎皮質癌の治療として有効となる可能性が示唆された。

E. 結論

ヒト副腎皮質癌組織およびSW-13においてTGF- β RII mRNAの発現低下が認められ、SW-13はTGF- β 1による増殖抑制効果に抵抗性を示した。SW-13はTGF- β RII発現回復によりTGF- β 感受性を回復し細胞増殖は抑制された。TGF- β RII発現低下によるTGF- β 抵抗性は、副腎皮質癌における癌の発生や悪性化に関与することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 馬目 聖子：副腎皮質腫瘍におけるTGF- β 1、TGF-RI型受容体、TGF-RII型受容体 mRNAの発現およびゲノムDNAについての検討、東邦医学会雑誌 45: 37-42, 1998。
- 2) 山本 奈津子、ヒト副腎皮質癌細胞株SW-13におけるTransforming Growth Factor β Type II Receptor mRNA発現低下とその機序に関する研究、東邦医学会雑誌 49: 336-346, 2002。
- 3) Matoba H., Sugano S., Yamaguchi N., Miyachi Y.: Expression of Transforming Growth Factor-b1 and Transforming Growth Factor-b Type-II Receptor mRNA in Papillary Thyroid Carcinoma. Horm Metab Res 30: 624-628, 1998.

2. 学会発表

1) 75回内分泌学会総会(大阪、2002)、ヒト副腎皮質癌細胞株SW-13におけるTransforming Growth Factor β (TGF β)抵抗性についての検討。

2) 79th Annual Meeting of American Endocrine Society (Minneapolis, 1997) Reduced expression of the type II receptor mRNA for transforming growth factor b in adrenocortical carcinoma.

Matsumoto M., Matoba H., Ogome C., Hiroi N., Yakusiji F., Tsuboi K., Miyachi Y.

3) 11th International Congress of Endocrinology (Sydney, 2000) EXPRESSION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR b1 AND TRANSFORMING GROWTH FACTOR b TYPE I AND TYPE II RECEPTOR mRNA IN ADRENOCORTICAL TISSUES AND CELL LINES.

Yamamoto N., Matsumoto M., Yoshida C., Matoba H., Sugano S., Miyachi Y.

4) 84th Annual Meeting of American Endocrine Society (San Francisco, 2002) Diminished Expression of Transforming Growth Factor b (TGF -b) Receptor Type II in the Human Adrenocortical Carcinoma Cell Line, SW-13.

Natsuko Yamamoto, Minako Manome, Tadahiro Nakamura, Yukitaka Miyachi.

5) ICHS&ICHC (Fukuoka, 2002) TGF-b Type II Receptor in the Human Adrenocortical Carcinoma Cell line, SW-13.

Natsuko Yamamoto, Minako Manome, Kaoru Nagasawa, Yukitaka Miyachi.

G. 知的所有権の取得状況

特記事項なし



Fig. 1a

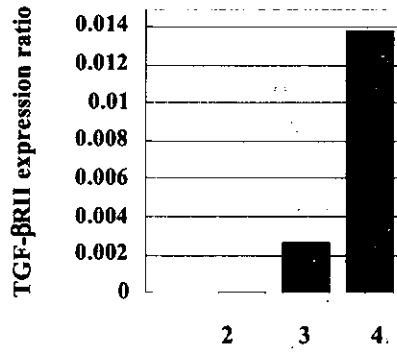


Fig. 1b

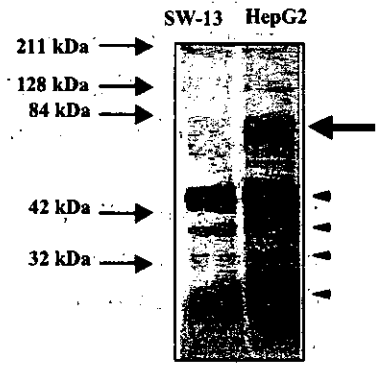


Fig. 2

Fig. 1 RT-PCR analysis (a) and Real-Time RT-PCR analysis (b)

Total RNA samples were prepared from HepG2 (1), SW-13 (2), adrenocortical carcinoma (3), aldosterone producing adenoma (4) and subjected to RT-PCR reactions using gene specific primers. GAPDH primers were used to amplify cDNA of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, which serves as an internal quantitative and reaction control.

(1a) RT-PCR analysis of TGF-β1, GF-βRI, TGF-RII mRNA expression RT-PCR product of TGF-β1 (540bp), TGF-βRI (1743bp), TGF-βRII (1743bp) and GAPDH (984bp).

(1b) Real-Time RT-PCR analysis of TGF-βRII mRNA expression

TβRII mRNA expression are determined as TGF-βRII mRNA/GAPDH mRNA ratio.

Fig. 2 Expression of TGF-βRII protein in SW-13 Immunoprecipitation followed by Western blot analysis with anti-human TGF-βRII rabbit antibody shows that expression of the TGF-βRII protein was diminished in SW-13 cells, in agreement with the expression of its mRNA. The Wide arrow indicates the 70kDa TGF-βRII protein. Thin arrows indicate the positions of molecular weights 211, 128, 84, 42 and 32 kDa. Arrow heads indicate non specific proteins.

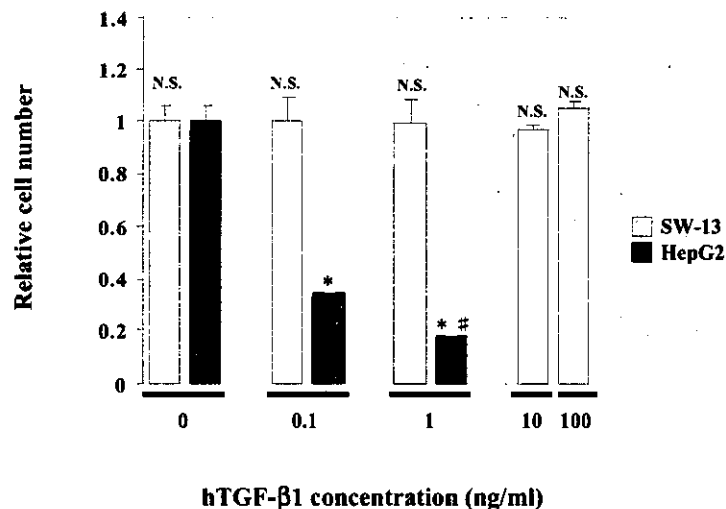


Fig. 3 TGF-β1 insensitivity of SW-13

SW-13 (1.5×10^4 cell/well) and HepG2 (1.5×10^4 cell/well) were plated in 24 well culture plates. Cells in triplicate were exposed to increasing doses of hTGF-β1 (0-100ng/ml). After 7 days of incubation, cell numbers in triplicate wells were determined using a hemocytometer. The vertical axis indicates the ratio of live cells to control cells, which were cultured without hTGF-β1. The mean (n=3)+S.D. ratio is plotted. * $p < 0.0001$ (vs HepG2 without hTGF-β1, LSD method), # $p < 0.05$ (vs HepG2 with 0.1ng/ml hTGF-β1, LSD method), N.S.=not significant (among SW-13-group by one-way ANOVA)

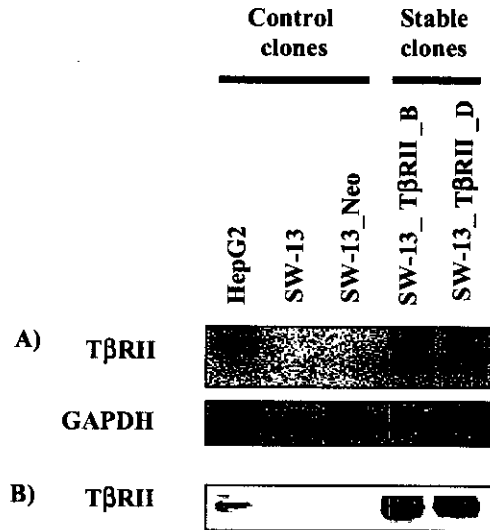


Fig. 4 Expression of TGF-βRII mRNA and protein in SW-13 transfectants

Fig. 4. A, Expression of TGF-βRII mRNA in SW-13 transfectants SW-13 was stably transfected with TGF-βRII expression plasmids and selected with Geneticin. The stable clones were compared to untransfected SW-13 and transfection-control SW-13-neo for TGF-βRII mRNA levels with Northern blot analysis. Two clones designated SW-13-TβRII-B and SW-13-TβRII-D, respectively, were obtained which expressed transfected TGF-βRII mRNA. GAPDH levels were used to verify equal sample loading and HepG2 were used as TGF-βRII mRNA positive control.

Fig. 4. B, Expression of TGF-βRII protein in SW-13 TGF-βRII transfectants The whole cell lysates of SW-13, SW-13-neo clone, SW-13-TβRII-B and SW-13-TβRII-D clones were electrophoresed in 10%SDS-PAGE. Western blot analysis of the whole cell lysates with anti-human TGF-βRII antibody shows that expression of TGF-βRII protein corresponds with the expression of its mRNA.

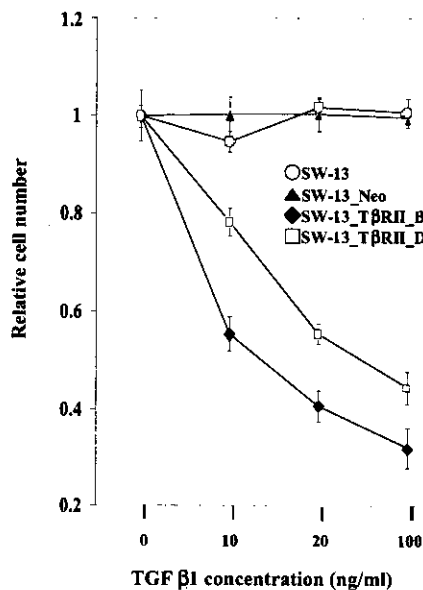


Fig. 5 Growth inhibition of TGF-βRII transfectant by TGF-β1 Un-transfected SW-13 and SW-13-neo clone, and the two TGF-βRII transfectants SW-13-TβRII-B and SW-13-TβRII-D) were plated in 6 well plates at 5×10 cells per well in the presence of various concentration of TGF-β1 (0-100ng/ml). After 10 days of incubation cell numbers were determined. Each points is the mean ±S.D. (n=3). Un-transfected SW-13 and transfection control SW-13-neo were insensitive to the treatment of TGF-β1. In contrast, the addition of TGF-β1 inhibited the proliferation of the SW-13-TβRII-B and SW-13-TβRII-D in dose-dependent manner.

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

笹野 公伸、吉川 陽介、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NGFI-B(NR4A1)、NURR1(NR4A2)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。しかし副腎ホルモン産生異常症を含む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。

そこで本研究では、上記の事を明らかにする目的で手術、剖検などから得た種々の発達段階のヒト正常副腎皮質並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解析した。Nurr1は胎児副腎では週数に関係なく成人層で強く発現し、胎児層でもわずかに認められた。生後の胎児層でも同様の所見であった。成人副腎は球状層で著名な発現が認められ、束状層でも一部で発現しているのが認められたが網状層ではほとんど認められなかった。この正常副腎皮質内の分布様式は年齢、性別に関わらず一定であった。これに対してNGFI-Bは胎児副腎では週数に関係なく成人層で強く発現し、胎児層でもわずかに認められた。生後の胎児層でも同様の所見であった。成人副腎では球状層を中心に発現していた。一方副腎ホルモン産生異常症においては、Nurr1はaldosteromaの腫瘍細胞で強く発現していたが、Cushing's adenomaではあまり発現してはならず、副腎皮質癌では更にその発現は低下していた。これに対してNGFI-BはaldosteromaとCushing's adenomaではほぼ同等に発現しておったが、副腎皮質癌では極めてその発現は低下していた。一方副腎皮質腺腫の付随副腎ではNurr1、NGFI-Bとも腺腫に由来する副腎皮質ホルモン産生異常症の種類に関わらず正常副腎と同様の発現動態を示した。

このようにNGFI-B、Nurr-1はヒト正常副腎皮質並びに副腎皮質ホルモン産生異常症などで特異的な発現動態を示していた。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Nurr-1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。

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。ACTH、アンギオテンシン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。すなわ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。ヒト副腎皮質におけるアルドステロン合成はhCYP11B2(アルドステロン合成酵素)の発現動態によって大きく影響を受ける事が知られている。この酵素は球状層に特異的に発現することから、その発現制御にはこの遺伝子の上流にある特異的なプロモーター領域に結合するenhancerあるいはrepressor蛋白の関与が考えられる。Ad4BPはhCYP11B2の発現を亢進させない事が知られているし、他の副腎皮質ホルモン合成酵素の発現を制御すると考えられている核内受容体もhCYP11B2との関連性は明らかではない。近年nuclear orphan receptorの中でNGFIB(nerve growth factor-induced clone B) familyが副腎皮質ホルモン合成の制御との関連で注目を集めてきている。このNGFIB familyにはNGFIB(NR4A1)、Nurr1(Nur-related factor 1, NR4A2)とNor1(neuron-derived orphan receptor 1, NR4A3)があげられる。これら3つの核内受容体はいずれもNGFIB Response Element(NBRE)と呼ばれるconsensus sequence(AAAGGTCA)に結合して、種々の遺伝子発現を制御する事が示されている。今回我々はこれらのNGFIB familyの中でもNurr1、NGFIBの2つの発現動態を様々な発達段階のヒト正常副腎皮質並びに副腎皮質ホルモン産生腫瘍異常症で検討し、これらの核内受容体蛋白のヒト副腎皮質ホルモン産生異常症における生物学的意義を考察した。

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25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。すなわち胎児副腎5例(11-36週)、成人正常副腎20例(1日から68歳)、副腎皮質腫瘍32例(Cushing腺腫8例、Primary aldosteronism(PA):8例、非機能性腺腫8例、副腎皮質癌8例)である。なお本研究計画は東北大学倫理委員会の承認を得て施行している。

2. 方法

1次抗体としてはNurr1はRabbit polyclonal antibody(sc-991)でSanta Cruz Biotechnologyから購入した。NGFI-BはRabbit polyclonal antibody(1600045)でGeneka Biotechnology Incから購入した。双方ともにHistofine kitを用いたAvidin Biotin Complex法を免疫染色には用いて抗原賦活としてAutoclave処理を行った。1次抗体の倍率としてNurr1はX1,800、NGFI-BはX400である。免疫組織化学の評価としては陽性細胞の数的ならびに量的評価を同時に施行する事が出来るH-scoreを用いた。強陽性X2、弱陽性X1、陰性X0、0-200点で結果を評価した。

C. 研究結果

1. ヒト正常副腎の発達段階におけるNGFIBとNurrの発現動態

結果を表1ならびに図1にまとめる。

Nurr1は胎児副腎では週数に関係なく成人層で強く発現しており、胎児層ではわずかに発現が認められるにすぎない(図1A)。生後すぐの胎児層が維持されている副腎でも、この副腎内のNurr1の発現動態に変化はない。しか

し胎児副腎が退縮してくると成人副腎の中ではNurr1は球状層で極めて顕著な発現が認められ始めた。束状層の皮質細胞でも一部では陽性所見が認められるが、網状層ではまったく核にNurr-1の発現は認められない。又この副腎皮質内分布動態は加齢に関わらず不変である(図1 B、C)。

これに対してNGFI-Bは胎児副腎では週数に関係なく成人層で著名な発現が認められており、胎児層でもわずかながら陽性細胞が認められる(図1 D)。生後すぐの胎児層が維持されている副腎でも、この副腎内のNGFIBの発現動態に変化はない。胎児層が退縮した後では球状層で著名な発現が認められ、Nurr-1同様に網状層ではほとんどその発現は認められない。束状層においてはNGFIBは、初めはほぼ陰性であるが(図1 E)加齢とともに陽性となる皮質細胞が増加し始め、成人ではほぼ球状層に近い発現量が認められるようになる(図1 F)。

2. 副腎皮質腫瘍

結果は表2並びに図2にまとめる。

Nurr1はaldosteromaでは腫瘍細胞で著名な発現が認められた。(図2 A)。

Cushing's adenomaではNurr-1の発現は低く(図2 B)、副腎皮質癌ではその発現動態は極めて低かった。これに対して非機能性腺腫ではaldosteronomaとNurr-1の発現動態に有意の差異は認められなかった。

一方NGFI-BはaldosteromaとCushing's adenoma、非機能性腺腫ではほぼ同等に発現していた(図2 C、D)。しかしNGFIBは副腎皮質癌では顕著に低下していた。

3. 副腎皮質腫瘍の付随副腎

結果は表3並びに図3にまとめる。

副腎ホルモン産生腫瘍異常症を伴う副腎腫瘍の付随副腎皮質は特有のステロイド合成酵素の発現動態を示す。今回の検討ではNurr1、NGFI-Bとも正常副腎皮質とまったく同様の発現動態を示していた。

D. 考察

ヒト副腎皮質は成長の過程でホルモン合成動態が変化する事が知られている。今回の検討では副腎皮質ホルモン合成酵素の発現制御に関係があるとも考えられている2つのnuclear orphan receptorであるNurr1、NGFI-Bとも胎児層ではほとんど発現はしておらず、成人層で著名に発現していた。これらの核内受容体は層に特異的に発現しており、副腎皮質特に、球状層や束状層でのステロイド合成を制御している可能性が示唆された。これらのnuclear orphan receptorの内でもNurr1はCYP11B2、NGFI-BはCYP11B2、P450c21、3beta-HSD等の制御に従事している事が種々の*in vitro*の実験の結果から示唆されている。

ヒト副腎の場合胎児副腎永久層においての副腎皮質ホルモン合成酵素の発現は22週以降で通常認められるが、Nurr-1、NGFIBの方はAd4BP同様にこれらの合成酵素の発現に先行して認められた。この事はこれら2つの受容体を介するシグナルが成人層での副腎皮質ホルモン合成に極めて重要な役割を果たしている可能性を示唆している。特にNurr-1は球状層に特異的に発現する傾向が強く、hCYP2を介するアルドステロン合成との関係が考えられた。この点でNurr-1はアルドステロン合成と密接な関係が示された初めての転写制御因子である事が考えられた。全身組

織ではNGFIBは主に中枢神経系、胸腺、骨格筋などで比較的広範に認められる事が報告されているが、Nurr-1の方は中枢神経系に限局して発現している事が示されており、ドーパミン神経の分化、発達などに関連している事が示唆されている。このような事から今後ヒト副腎皮質、特に球状層においてのアルドステロン合成とこれらの核内受容体の発現動態との関連性を更に詳細に検討していく事が望まれる。

副腎皮質腫瘍は正常副腎皮質と異なるステロイド合成酵素の発現パターンが認められ、この異なる発現パターンが副腎皮質ホルモン産生異常症の病態の重要な背景になっている可能性がある。Nurr1は正常副腎皮質では球状層での発現が極めて顕著であり、アルドステロン合成動態と密接な関連が示唆された。副腎皮質腺腫における発現動態もアルドステロン過剰症であるaldosteronomaでCushing adenomaよりも著明に発現していて、正常における分布動態と一致した。一方NGFI-Bは正常副腎皮質ではNurr-1と比較すると球状層での発現の特異性は認められないが、副腎皮質腺腫でもaldosteronomaとCushing adnomaとの間に有意の発現動態の差異はなかった。しかし非機能性副腎皮質腺腫ではNurr-1の発現動態でaldosteronomaとの間に有意差はなく、副腎皮質腫瘍でのステロイド合成動態とこれらの核内受容体蛋白との関係の詳細は今後の検討が必要であると考えられた。一方副腎皮質癌になるとNurr-1、NGFI-B共に腺腫と比較すると著明な発現の低下が認められ、副腎皮質癌でも殆どその発現動態が変化しないAd4BP/SF-1とは明らかに異なる結果を示した。この事はNurr1、NGFI-Bと

も副腎皮質細胞の悪性化に伴いその発現が低下する事を示唆しており、胎児性副腎で発現が低い事や、NGFI-Bの場合束状層の発現動態が発達と共に増加していく事などからも副腎皮質細胞の細胞分化との関連性も否定出来ない所見となっている。

副腎ホルモン産生異常症を呈する副腎皮質腺腫の付随副腎は腫瘍細胞が合成、分泌するステロイドホルモンの種類、量によって形態学的にも、ホルモン合成の点からも特徴的な変化を示す事が知られている。例えばクッシング症候群を呈する副腎皮質腺腫の付随副腎ではHPA axisが抑制される為に付随副腎の束状層、網状層は形態学的に畏縮を示し、ステロイド合成酵素の発現も低下する。又aldosteronomaの付随副腎皮質では球状層が形態学的には過形成を示すが、アルドステロン合成に関与する酵素の過剰発現は認められない。しかし今回の検討からNurr1、NGFI-Bともs副腎皮質腺腫の付随副腎では副腎皮質ホルモン合成の程度他に関係なくほとんどすべての皮質細胞で正常副腎同様に発現している事が認められた。この所見はAd4BPの発現動態と一致するものであった。この生物学的意義の解明には今後の検討が必要であると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Omura M., Sasano H., Fujiwara T., Yamaguchi K., Nishikawa T.: Unique cases of unilateral hyperaldosteronemia due to multiple adrenocortical micronodules, which can only be detected by selective adrenal venous sampling.: *Metabolism* 51: 350-355, 2002.
- 2) Sasano H., Suzuki T., Moriya T.: Dis-

- cerning malignancy in resected adrenocortical neoplasms. : *Endocrine Pathology* 12: 397-406, 2001.
- 3) Yang S., Fang Z., Suzuki T., Sasano H., Zhou J., Gurates B., Tamura M., Ferrer K., Bulun S. : Regulation of Aromatase P450 Expression in Endometriotic and Endometrial Stromal Cells by CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBPs): Decreased C/EBPbeta in Endometriosis Is Associated with Overexpression of Aromatase. : *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 2336-2345, 2002.
- 4) Yamahara K., Itoh H., Yamamoto A., Sasano H., Masatsugu K., Sawada N., Fukunaga Y., Sakaguchi S., Sone M., Yurugi T., Nakao K. : New diagnostic procedure for primary aldosteronism: adrenal venous sampling under adrenocorticotropic hormone and angiotensin II receptor blocker--application to a case of bilateral multiple adrenal microadenomas. : *Hypertension* 25: 145-152, 2002.
- 5) Kageyama Y., Ishizaka K., Iwashina M., Sasano H., Kihara K. : A case of ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia successfully treated by subtotal resection of the adrenal glands: four-year follow-up. : *Endocrine Journal* 49: 227-229, 2002.
- 6) Ito K., Suzuki T., Akahira J., Moriya T., Kaneko C., Utsunomiya H., Yaegashi N., Okamura K., Sasano H. : Expression of androgen receptor and 5alpha-reductases in the human normal endometrium and its disorders. : *International Journal of Gynecological Cancer* 10: 99: 652-657, 2002.
- 7) Horma W., Shimada M., Sasano H., Ozawa S., Miyata M., Nagata K., Ikeda T., Yamazoe Y. : Phenol Sulfotransferase, ST1A3, as the Main Enzyme Catalyzing Sulfation of Troglitazone in Human Liver. : *Drug metabolism and disposition* 30: 944-952, 2002.
- 8) Takahashi K., Totsune K., Murakami O., Sone M., Noshiro T., Hayashi Y., Sasano H., Shibahara S. : Expression of prolactin-releasing peptide and its receptor in the human adrenal glands and tumor tissues of adrenocortical tumors, pheochromocytomas and neuroblastomas. : *Peptides* 23: 1135-1140, 2002.
- 9) Rainey WE., Carr BR., Sasano H., Suzuki T., Mason JI. : Dissecting human adrenal androgen production. : *Trends in Endocrinology and Metabolism* 13: 234-239, 2002.
- 10) Akahira J., Suzuki T., Ito K., Kaneko C., Darnel AD., Moriya T., Okamura K., Yaegashi N., Sasano H. : Differential expression of progesterone receptor isoforms a and B in the normal ovary, and in benign, borderline, and malignant ovarian tumors. : *Japanese Journal of Cancer Research* 93: 807-815, 2002.
- 11) Sasano H., Suzuki T., Irle J., Kawal K., Alba M., McNicol AM, Takami H. : Adrenal cortical diseases: international case conference. : *Endocrine Pathology* 13: 141-148, 2002.
- 12) Gurates B., Sebastian S., Yang S., Zhou J., Tamura M., Fang Z., Suzuki T., Sasano H., Bulun SE. : WT1 and DAX-1 inhibit aromatase P450 expression in human endometrial and endometriotic stromal cells. : *J Clin Endocrinol Metab.* 87: 4369-4377, 2002.
- 13) Yamakita N., Murai T., Miyamoto K., Matsunami H., Ikeda T., Sasano H., Mune T., Yasuda K. : Variant of pre-clinical Cushing's syndrome: hypertension and hypokalemia associated with normoreninemic normoaldosteronism. : *Hypertens Res.* 25: 623-630, 2002.
- 14) Inoue T., Akahira JI., Suzuki T., Darnel AD., Kaneko C., Takahashi K., Hatori M., Shirane R., Kumabe T., Kurokawa Y., Satomi S., Sasano H. : Progesterone Production and Actions in

the Human Central Nervous System and Neurogenic Tumors.: J Clin Endocrinol Metab. 87: 5325-5331, 2002.

15) Miki Y., Nakata T., Suzuki T., Darnel AD., Moriya T., Kaneko C., Hidaka K., Shiotsu Y., Kusaka H., Sasano H.: Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues.: J Clin Endocrinol Metab. 87: 5760-5768, 2002.

16) Ioka RX., Kang MJ., Kamiyama S., Kim DH., Magoori K., Kamataki A., Ito Y., Takei YA., Sasaki M., Suzuki T., Sasano H., Takahashi S., Sakai J., Fujino T., Yamamoto TT.: Expression cloning and characterization of a novel GPI-anchored HDL binding protein, GPI-HBP1.: J Biol Chem. 2002, Dec 20.

17) Suzuki T., Murry BA., Darnel AD., Sasano H.: Progesterone metabolism in human leukemic monoblast U937 cells.: Endocr J. 49: 539-546, 2002.

18) Mune T., Morita H., Suzuki T., Takahashi Y., Isomura Y., Tanahashi T., Daido H., Yamakita N., Deguchi T., Sasano H., Yasuda K., White PC.: Role of local 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD11B2) expression in determining the phenotype of adrenal adenomas.: Endocr Res. 28:751-752 2002.

2. 学会発表

1) Recent Update of Histopathology of Adrenocortical Incidentaloma-Changes in the Concept.: Hironobu Sasano, NIH State-of-the-Science Conference on Management of the Clinically Inapparent.: Adrenal Mass ("Incidentaloma") February 4-6, 2002.

2) MINERALOCORTICOID: RECEPTOR, TYPE1 AND2 11BETA- HUDROXYSTEROID DEHYDROGENASE ANDTYPE3 COLLAGEN IN HUMAN AND SHR RAT HEART.: Akinobu Konishi, Takashi Suzuki, Yasuhiro Miki, Andrew. D. Darnel, Takuya mariya, Koichi Tabayashi and Hironobu Sasano., TWENTY-EIGHTH INTERNATIONAL ALDOSTERONE CONFERENCE SAN

FRANCISCO, CA JUNE 17-18, 2002.

3) Regulation of 11B-Hydroxysteroid Dehydrogenase (11B-HSD) in the Early Gestational Fetal Lung-Possible Impact on Lung Devdlopment?: Andrew D. Darnel, Takasi Suzuki, Hideaki Nakajuma, Akinobu Konisi, Chika Kaneko, Junji Takeama, Hironobu Sasano., International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer.: JPN Oct 21-25, 2002.

4) DAX-1, WT1, COUP-TF II and Ad4BP International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer.: Yoko Sato, Takasi Suzuki, Kumiko Hidaka, Hiroshi Sato, Sadayoshi Ito, Hironobu Sasano., International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer.: JPN Oct 21-25, 2002.

5) Steroid Xenobiotic Receptor and Cytochrome P450 3A subfamily in Human Adult and Fetal Tissues: Yasuhiko Miki, Takashi Suzuki, Chika Tazawa, Bruce Blummeberg, Hironobu Sasano., International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer.: JPN Oct 21-25, 2002.

図 1

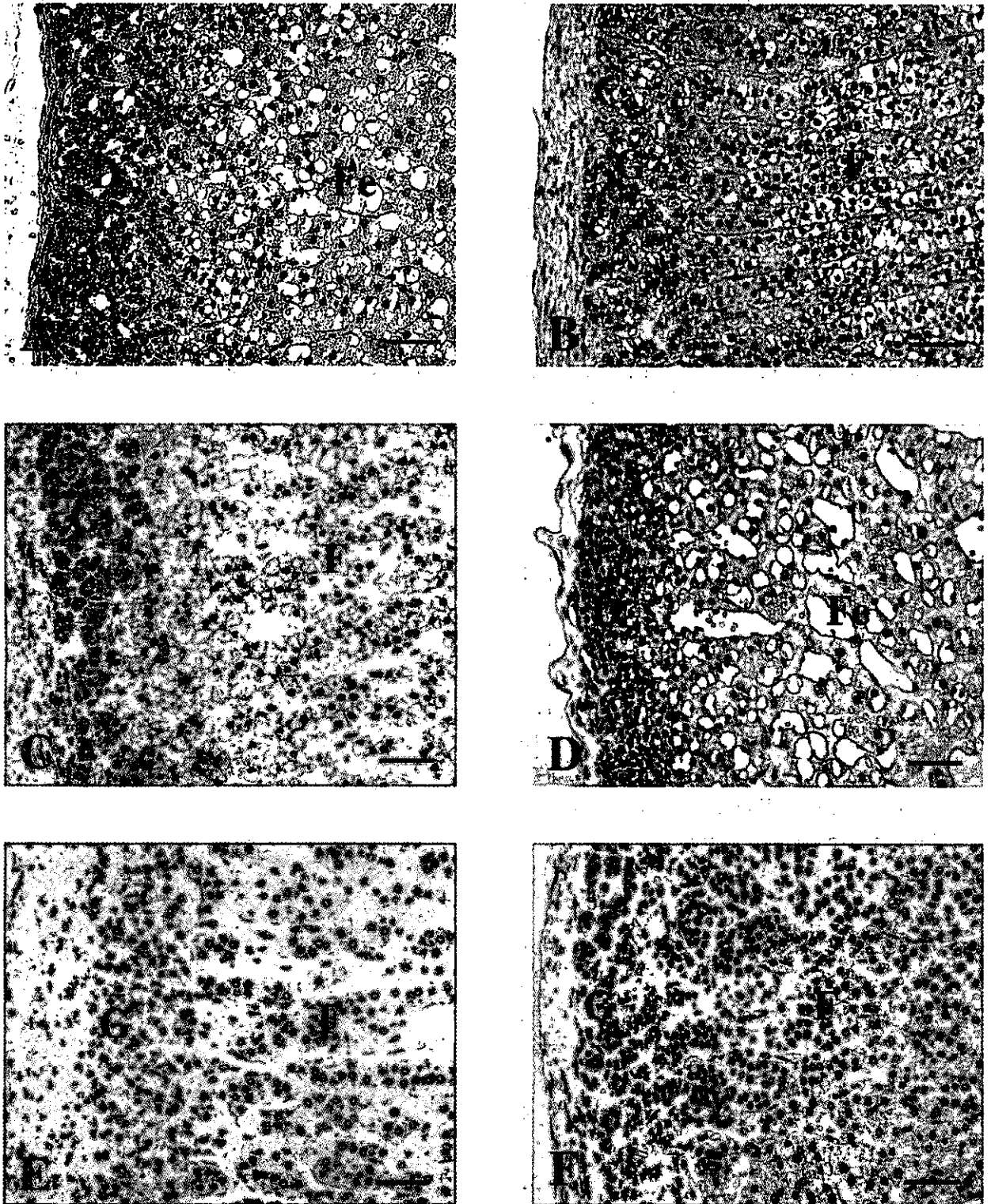


図1 正常副腎におけるNurrl (A-C)、NGFI-B (D-F)の免疫組織化学の結果
 A: 胎生19週、B: 5歳、C: 49歳。D: 胎生14週、E: 2歳、F: 27歳。
 D: definitive zone (成人層), Fe; fetal zone (胎児層), G: zona glomerulosa (球状層), F; Zona fasciculata (束状層). Bar=50 um.

図 2

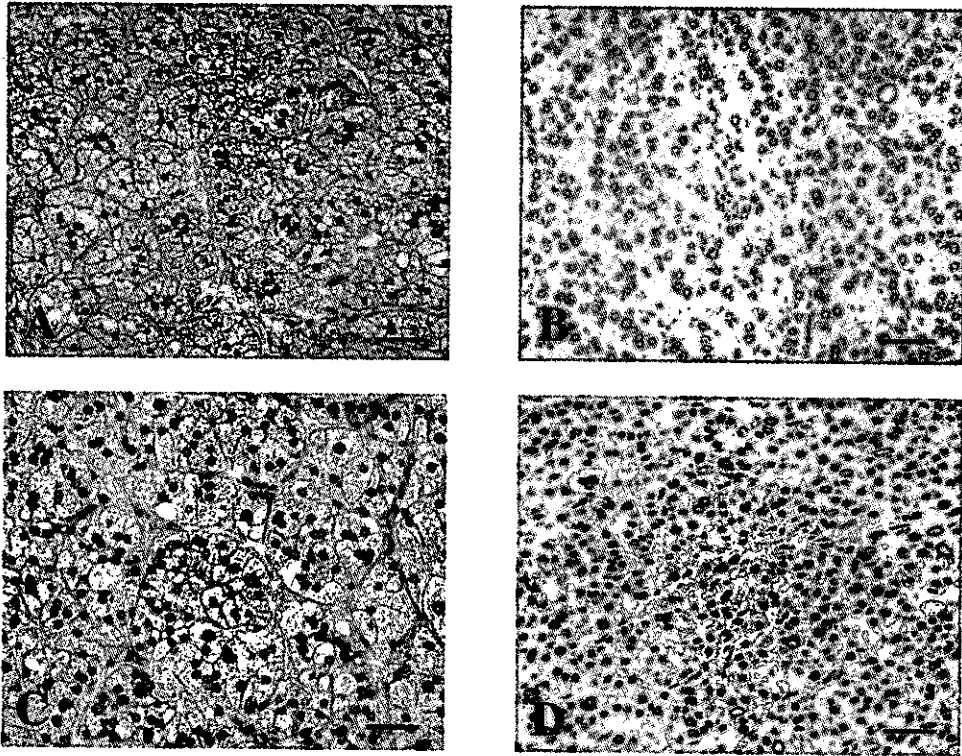


図 3

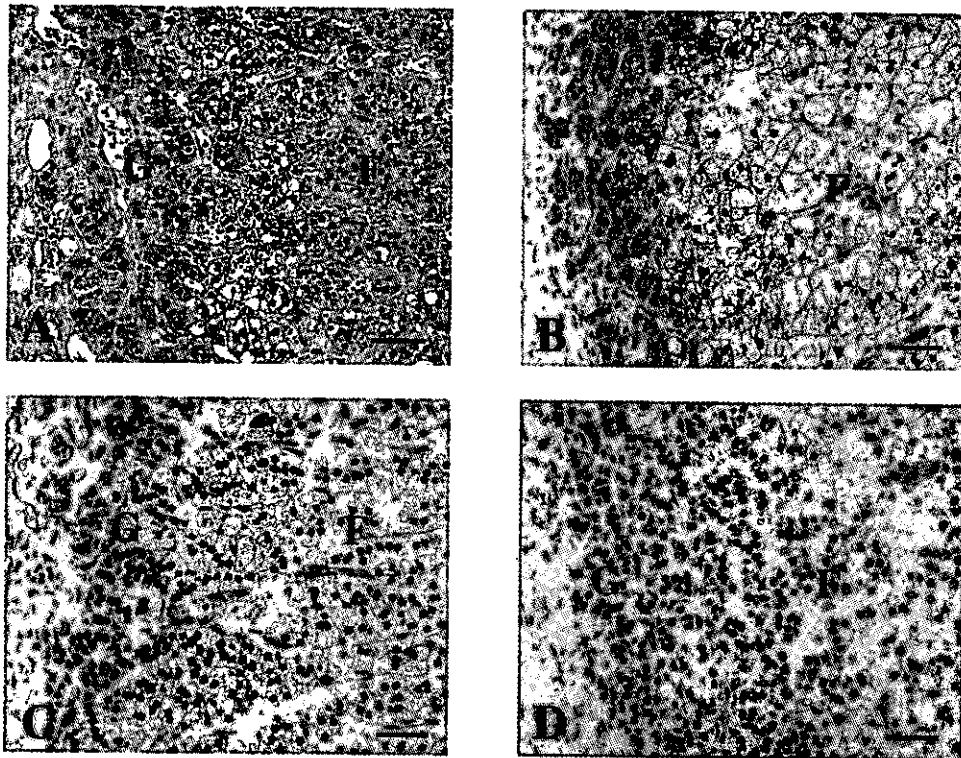


図 2 副腎腫瘍におけるNurrl (A,B)、NGFI-B (C,D)の免疫組織化学の結果

A: aldosteronoma, B: Cushing's adenoma, C: aldosteronoma, D: Cushing's adenoma
B, Dは同一症例である。Bar=50 um.

図 3 副腎皮質腫瘍の付随副腎におけるNurrl (A,B)、NGFI-B (C,D)の免疫組織化学の結果

A: aldosteronoma, B: Cushing's adenoma, C: aldosteronoma D: Cushing's adenoma.
各々図 2 で示した副腎皮質腺腫と同一症例である。Bar=50 um.

血管細胞における Serum- and Glucocorticoid-regulated Kinase の活性制御

高橋 克敏、劉 静、本清 雅子、安東 克之、藤田 敏郎
東京大学大学院医学研究科内科

研究要旨

鉍質コルチコイドの非古典的標的組織である血管平滑筋細胞におけるSerum- and Glucocorticoid-regulated Kinase(SGK)の活性制御について検討した。ラット大動脈由来培養平滑筋細胞(VSMC)において、外因性に発現したSGKはAngiotensin II (Ang II)により濃度依存性に活性化されたが、Aldosterone(ALDO)では活性化されなかった。SGKのセリン422アラニン変異体がAng IIにより活性化されなかったことから、セリン422リン酸化はAng IIによる活性化に必須であることが示唆された。さらに、VSMCの内因性SGKについても、Ang IIはセリン422リン酸化したが、ALDOはリン酸化しなかった。このAng IIによるリン酸化は転写阻害剤actinomycin D前処理では減弱せず、phosphatidylinositide 3-kinase(PI3-K)阻害薬の前処理で抑制された。昨年度の検討結果と今回の結果を総合すると、鉍質コルチコイドの非古典的標的であるVSMCでは、SGKはALDOにより発現誘導され、Ang IIによりPI3-K依存性セリン422リン酸化を介して活性化されることが明らかになった。

A. 研究目的

鉍質コルチコイドの代表的作用である腎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)の制御が関与する。近年、鉍質コルチコイドにより誘導されたSGKによるENaC制御がNa再吸収早期相における分子基盤たることが示唆され^{1, 2, 3)}、Nedd4-2を介する詳細な分子機構も報告されている^{4, 5)}。SGKは1993年にクローニングされ、Akt/PKBと最も高い相同性を有するセリン-スレオニンリン酸化酵素で⁶⁾、その特徴の一つは発現量とリン酸化の両面によって制御がなされる点であると考えられる。

さて、近年問題となっている鉍質コルチコイド高血圧による心臓血管系合併症の病態の理解という観点から、我々は心血管系制御に重要な役割を果たすAkt/PKB^{7, 8)}と類似性を有するSGKの心臓血管系における制御と役割に着目し、本研究班の昨年度分担研究で、鉍質コルチコイドの非古典的標的

組織におけるSGKの発現調節について報告した⁹⁾。そこで、本年度は、昨年度と同様に非古典的標的組織である血管細胞において、特にAng IIとALDOによるSGKの活性制御について内因性SGKの制御も含めて検討した。

B. 研究方法

1. 血管細胞における外因性SGK活性制御

鉍質コルチコイドの非古典的標的組織由来細胞として、8週齢雄性Sprague Dawleyラット胸部大動脈より explant法で採取したVSMCを通常の培養条件で実験に用いた。VSMCに導入した遺伝子はhuman SGK1遺伝子(N末端にglutathione S-transferase(GST)とHA-tagを結合したSGK融合タンパク遺伝子¹⁰⁾)で、subconfluentな細胞に、10cm培養デッシュ1枚当たり野生型ないしセリン422アラニン変異型plasmidを

各々10ugずつLipofectAMINE (Life Technologies社)を用いたりポフェクション法で導入し、一過性に過剰発現した。リポフェクション終了後、24時間増殖培地に変えた後に60mmデッシュに継代、さらに血清除去後、種々の処理後に、細胞抽出液からglutathione sepharose(GS)ビーズで外因性に発現したSGKをpull down回収した。(a)抗HA抗体を用いたウエスタン解析で、SGK発現を確認し、(b)抗Akt抗体を用いたウエスタン解析で、回収物にAktの混入がないことを確認し、(c)Histone H2Bを基質にしたin vitro kinase assayで回収物のSGK活性を測定した。測定結果は刺激前の基礎値に対するfold activationとして比較検討した。

2. 血管細胞における内因性SGK活性制御
VSMCにおける内因性SGKの活性制御に関しても、上記と同様の培養条件で、種々の処理後に、細胞抽出液をSDS-PAGEに供し、セリン422磷酸化SGK抗体(Santa Cruz社)を用いたウエスタン解析を行なった。

(倫理面への配慮)

実験における動物屠殺は麻酔下で苦痛を最小限にして行った。

C. 研究結果

1. 血管細胞における外因性SGK活性制御
- a. SGK発現の確認

抗HA抗体を用いたウエスタン解析により、細胞粗抽出液からGSビーズでpull downした回収物には特異的バンドが見られ、GST-HA-SGK1が外因性にVSMCに発現したことが確認された(図1)。

- b. SGK回収の特異性

SGKとAktは基質特異性が類似し¹¹⁾、

今回の酵素活性測定法にはAktに由来する活性が混入する余地がある。この可能性を除外するため、pull down回収物(60mm培養デッシュ1枚より回収)と回収前の細胞粗抽出液(60mm培養デッシュ25分の1枚分)を用いて、SDS-PAGE後に抗Akt抗体を用いたウエスタン解析を行った。pull down回収物にはAktの混入が全くないことが確認され(図2)、今回の測定系におけるAkt混入の可能性は否定された。

- c. 外因性SGKの磷酸化活性

(a)(b)でVSMCにおける特異的発現と回収が確認された外因性SGK活性をほぼ既報に準じ¹⁰⁾(基質のみHistone H2Bに変更)、in vitro kinase assayでSGK磷酸化活性を測定した。まず、野生型SGKを発現し活性変化の時間経過を観察した所、Ang II ($10^{-6}M$)刺激によりSGK活性は時間依存性に上昇し、刺激5~10分後に刺激前の基礎値の約6倍に達し、その後徐々に低下した。刺激後10分の時点で、Ang II $10^{-6}M$ による約6倍をピークに濃度依存性にSGK活性が上昇したが、セリン422アラニン変異型SGKではAng IIによる活性化はごく軽微しかみられなかった(図3)。すなわち、Ang IIによるSGK活性化にはセリン422の存在が重要であることが示唆された。一方、ALDO($10^{-7}M$)刺激についても検討したが、外因性SGK活性の有意な上昇はみられなかった。

2. 血管細胞における内因性SGK活性制御

我々は昨年度分担研究で、今回用いたVSMCでは、内因性SGK遺伝子がALDO刺激によりHSP90依存性に鉍質コルチコイド受容体を介して発現誘導されることを明らかにしたため、内因性SGKの磷酸化に関しても今回検討を加えた。VSMC処理後に細胞粗抽出液を準備

し、SDS-PAGEに供した後に燐酸化セリン422 SGK抗体を用いたウエスタン解析を行なった。Ang II 10^{-10} Mより濃度依存性に内因性SGKのセリン422燐酸化が観察され、さらに異なる2種類のAT1受容体拮抗薬の前処置によって燐酸化が抑制された。従って、Ang IIはAT1受容体を介してSGKを活性化することが示唆された。また、Ang IIによる内因性SGK燐酸化は刺激後10分ないし15分がピークで、刺激後60分には燐酸化が低下した。

一方、ALDO (10^{-7} M)による内因性SGK燐酸化の有無についても検討した。通常の培養条件に加えて、フェノールレッドを含まない培地と脂肪除去血清を用いた実験条件下で、刺激後1、3、10、30、60分の時間経過を検討したが、内因性SGKセリン422燐酸化レベルは、対照であるDMSO含有培地によるレベルと同等であった。従って、外因性SGKの結果と同様に、ALDOが内因性SGK燐酸化を促進するとの結果は得られなかった。SGKは発現と燐酸化の両面で制御されうるという特徴を有する。そこで、Ang IIによるSGK燐酸化促進におけるSGK発現誘導の役割を明らかにするために内因性SGK燐酸化レベル制御に及ぼす転写阻害剤Actinomycin D前処置 (5ug/ml)の効果を検討した。Actinomycin D前処置によって、Ang IIによる内因性SGK燐酸化は抑制されず、むしろ増強する傾向すら見られたことから(図4)、Ang IIによりSGK発現が誘導され、SGK分子絶対数が増加し、これによって燐酸化分子数が増えていることは否定的である。すなわち、Ang IIによる内因性SGK燐酸化レベル上昇はpost-transcriptionalレベルの制御機構によることが明らかになっ

た。

一方、SGK燐酸化の上流シグナルと報告されているPI3-K⁽¹²⁾の関与を探るため、PI3-K阻害薬wortmanninおよびLY294002前処置の効果を検討した。これらは共に濃度依存性にAng II依存性SGKセリン422燐酸化を抑制した(図5)。従って、VSMCにおけるAng IIによるSGK燐酸化にもPI3-K活性が必須であることが明らかになった。

D. 考察

今回の我々の検討により、鉍質コルチコイドの非古典的標的組織由来細胞であるVSMCにおいて、Ang IIが内因性SGKを活性化することが初めて明らかになった。一方、ALDOによっては明らかなSGKの活性化は観察されなかった。

近年、ALDOの細胞内情報伝達に関しては、古典的なMRを介する経路に加えてnon-genomic経路の存在や様々な情報伝達分子の動員が報告されている。今回我々が用いたラットVSMCでも、ALDO刺激によるIP3産生や細胞内Ca上昇が報告されている⁽¹³⁾。我々はカルシウムの細胞内流入がこの細胞において内因性SGKセリン422燐酸化レベルを上昇させることを観察していることから(未発表)、ALDO単独刺激が内因性SGKを燐酸化する可能性を考えたが、実際の検討ではこれを支持する結果は得られなかった。最近の報告では、詳細な機序は不明ながらEGF受容体過剰発現COS7細胞のERK MAPKに対して、ALDOは単独では活性化しないが、EGFによるERK活性化をsrc依存性に増強することも生化学的検討で示されている⁽¹⁴⁾。我々が今回用いたラットVSMCでは、Ang IIが内因性EGF受容体をtransactivateしERK MAPKを活性化することが報告され、我々もそれを追試しており、内因性EGF受容体がVSMC機能制御に何らかの役割を果たす可能

性が考えられる。さらに、我々は、この細胞でEGF刺激がSGK磷酸化を促進することも観察していることから(未発表)、Ang IIとEGFがVSMCにおいて惹起するERKおよびSGKシグナルが、ALDOによって各々影響されるか否かは興味を持たれる点である。

SGKの生体における役割に関しては、ヒト双生児における検討でSGK1遺伝子と血圧値に相関があることから血圧制御にSGKが関与する可能性が最近指摘され¹⁵⁾、SGK1ノックアウトマウスにおいては塩分制限時のNa保持機能の障害が報告されたが¹⁶⁾、SGKの心血管系制御における役割は現時点では殆ど明らかではない。今回我々が得た結果は、昨年度分担研究で我々が明らかにしたALDOが内因性SGKを発現亢進させ、Ang IIにその作用がないこととは対照的であった。すなわち、VSMCにおいてSGKはALDOによる誘導とAng IIによる活性化という異なる機構による制御を受けることが明らかになった。ペプチドホルモンとステロイドホルモンであるALDOの両者による制御という観点からは、インスリンとALDOが、独立して、しかも相乗的にNa再吸収を惹起する現象が鉍質コルチコイドの古典的標的細胞であるA6細胞において以前に示されていたが¹⁷⁾、この現象がPI3-K依存性にSGKによって仲介されることが最近明らかにされている¹⁸⁾。我々の検討結果は、鉍質コルチコイドの非古典的標的細胞であるVSMCにも内因性SGKが存在し、Ang IIとALDOによって各々特異的な制御を受けうることを示唆するものである。従って、A6細胞と同様にこの細胞においても、Ang IIとALDOがSGK分子を介して何らかの細胞機能を相乗的に制御する可能性を示唆するものであり、この点については今後も引き続き検討が必要であると思われる。

E. 結論

鉍質コルチコイドの非古典的標的組織由来細胞であるVSMCにおいて、Ang IIはAT1受容体を介してPI3-K依存性にセリン422磷酸化し、SGK活性を亢進させることが明らかになった。一方、ALDOがこの細胞でSGK酵素活性を亢進させることは示唆されなかった。

F. 参考文献

- 1) Chen SY., Bhargava A., Mastroberardino L., Meijer OC., Wang J., Buse P., Firestone GL., Verrey F., Pearce D.: Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. : Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96: 2514-9.
- 2) Naray-Fejes-Toth A., Canessa C., Cleveland ES., Aldrich G., Fejes-Toth G.: Sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial na⁺ channels. : J Biol Chem. 1999; 274: 16973-8.
- 3) Alvarez de la Rosa D., Zhang P., Naray-Fejes-Toth A., Fejes-Toth G., Canessa CM.: The serum and glucocorticoid kinase sgk increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of Xenopus oocytes. : J Biol Chem. 1999; 274: 37834-9.
- 4) Debonneville C., Flores SY., Kamynina E., Plant PJ., Tauxe C., Thomas MA., Munster C., Chraïbi A., Pratt JH., Horisberger JD., Pearce D., Loffing J., Staub O.: Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na⁽⁺⁾ channel cell surface expression. : EMBO J. 2001; 20: 7052-9.
- 5) Snyder PM., Olson DR., Thomas BC.: Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na⁺ channel. : J Biol Chem. 2002; 277: 5-8.
- 6) Webster MK., Goya L., Ge Y., Maiyar AC., Firestone GL.: Characterization of

- sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol.* 1993; 13: 2031-40.
- 7) Kureishi Y., Luo Z., Shiojima I., Bialik A., Fulton D., Lefer DJ., Sessa WC., Walsh K.: The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat. Med.* 2000; 6: 1004-10.
- 8) Luo Z., Fujio Y., Kureishi Y., Rudic RD., Daumerie G., Fulton D., Sessa WC., Walsh K.: Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide-dependent vasomotor activity in vivo. *J Clin Invest.* 2000; 106: 493-9.
- 9) 高橋克敏、安東克之、藤田敏郎：鉱質コルチコイド高血圧の臓器障害に関する総合的研究。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平成11～13年度総合報告書、87～92頁、主任研究者 宮地幸隆、平成14年3月。
- 10) Kobayashi T., Cohen P.: Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositol 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J.* 1999; 339: 319-28.
- 11) Brunet A., Park J., Tran H., Hu LS., Hemmings BA., Greenberg ME.: Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol.* 2001; 21: 952-65.
- 12) Park J., Leong ML., Buse P., Maiyar AC., Firestone GL., Hemmings BA.: Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J.* 1999; 18: 3024-33.
- 13) Wehling M., Neylon CB., Fullerton M., Bobik A., Funder JW.: Nongenomic effects of aldosterone on intracellular Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1995; 76: 973-9.
- 14) Krug AW., Schuster C., Gassner B., Freudinger R., Mildenerger S., Troppmair J., Gekle M.: Human epidermal growth factor receptor-1 expression renders Chinese hamster ovary cells sensitive to alternative aldosterone signaling. *J Biol Chem.* 2002; 277: 45892-7.
- 15) Busjahn A., Aydin A., Uhlmann R., Krasko C., Bähring S., Szelestei T., Feng Y., Dahm S., Sharma AM., Luft FC., Lang F.: Serum- and glucocorticoid-regulated kinase (SGK1) gene and blood pressure. *Hypertension.* 2002; 40: 256-60.
- 16) Wulff P., Vallon V., Huang DY., Volkl H., Yu F., Richter K., Jansen M., Schlunz M., Klingel K., Loffing J., Kauselmann G., Bosl MR., Lang F., Kuhl D.: Impaired renal Na⁽⁺⁾ retention in the sgk1-knock-out mouse. *J Clin Invest.* 2002; 110: 1263-8.
- 17) Blazer-Yost BL., Liu X., Helman SI.: Hormonal regulation of ENaCs: insulin and aldosterone. *Am J Physiol* 1998; 274: C1373-9.
- 18) Wang J., Barbry P., Maiyar AC., Rozansky DJ., Bhargava A., Leong M., Firestone GL., Pearce D.: SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001; 280: F303-13.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

H. 謝辞

Human SGK1遺伝子を供与頂いた英国MRC研究所P. Cohen博士に感謝致します。

图1. Expression of GST-HA-SGK_{wt}

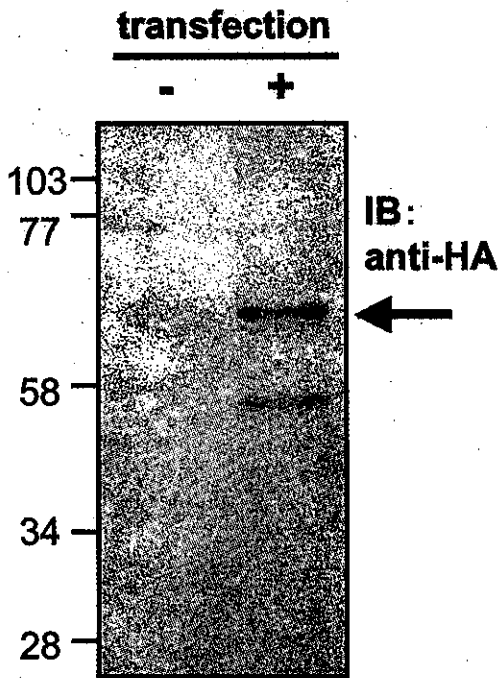


图2. Specificity of SGK Assay

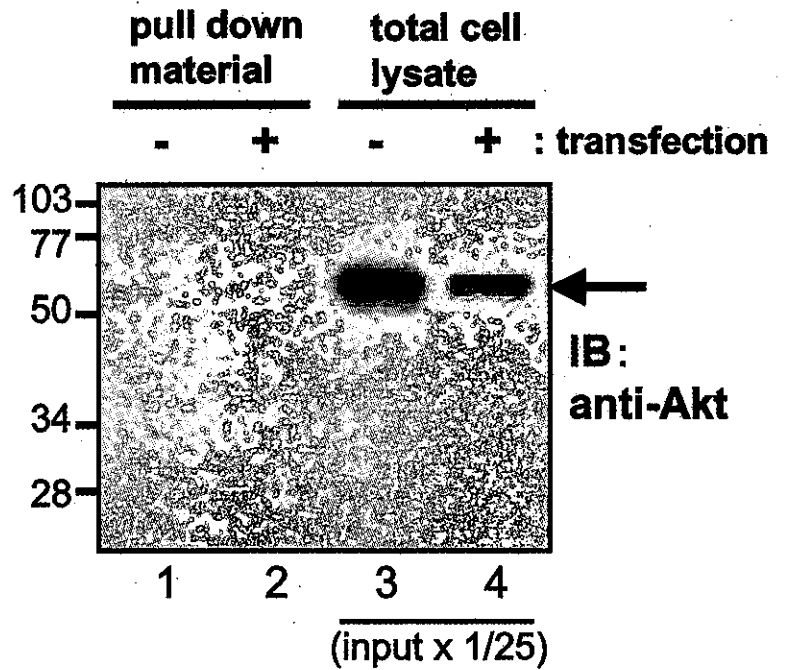


图3. Ang II-Induced SGK Activity in VSMCs

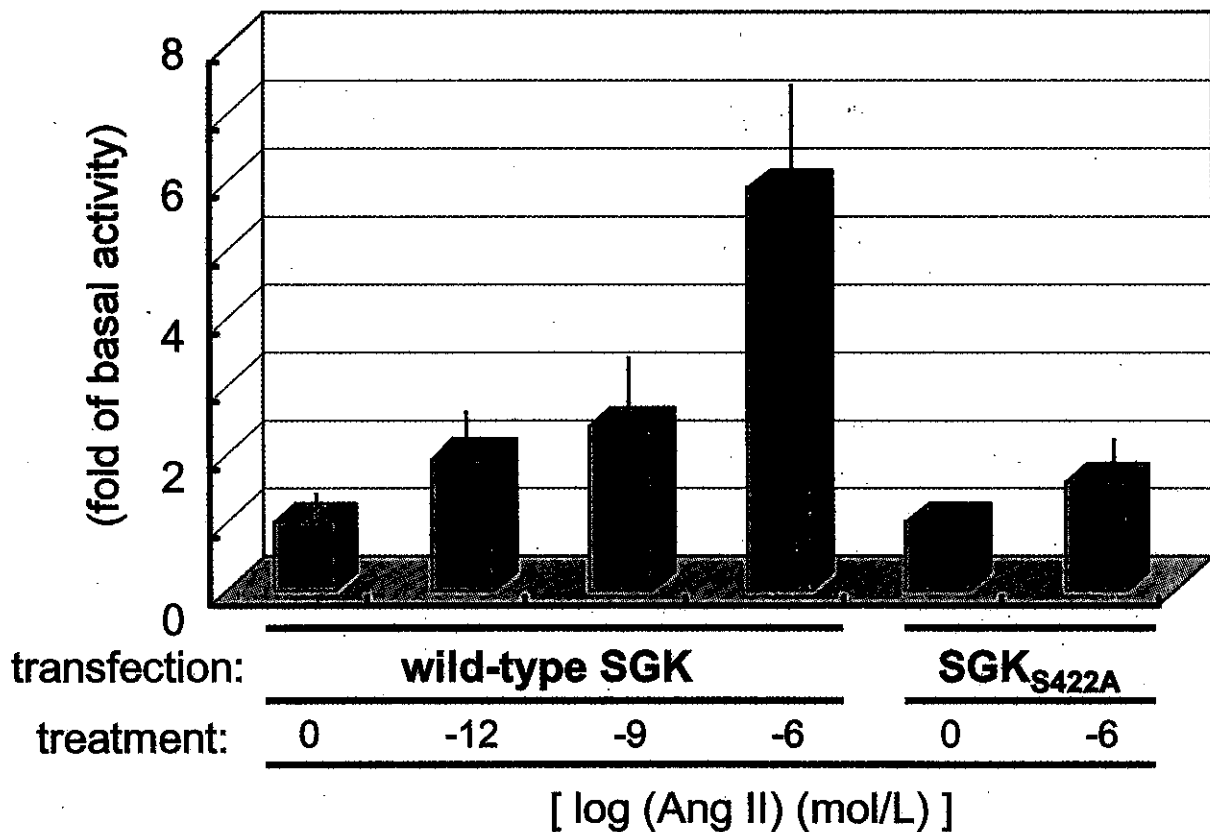


Fig. 4. Ang II-Induced Phosphorylation of SGK at S422

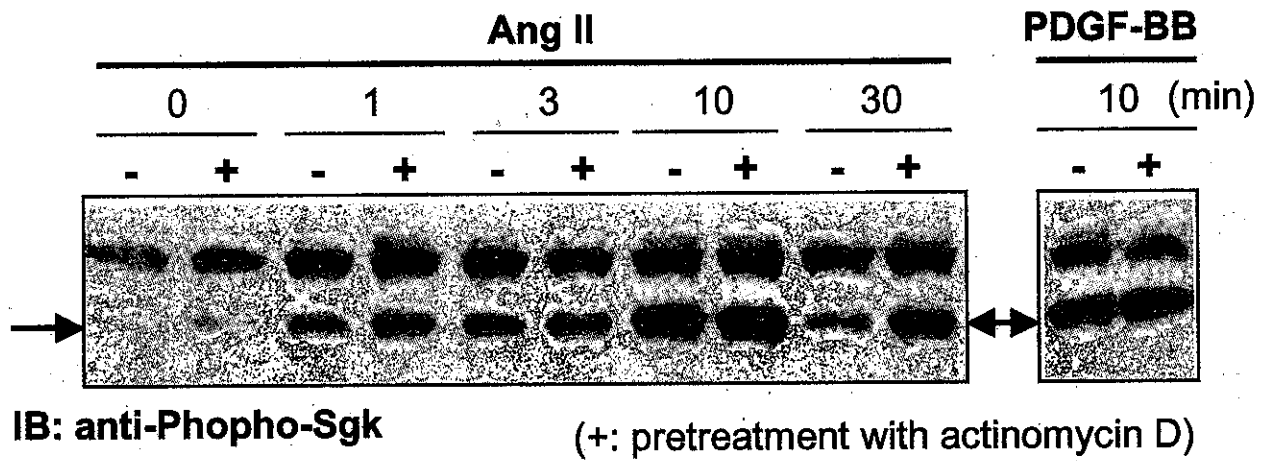


Fig. 5. Ang II-Induced Phosphorylation of SGK Depends on PI3-K Activity

