

(5)副腎の発生分化および遺伝子

副腎皮質分化の分子メカニズムに関する研究

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

ポリコム遺伝子M33はその遺伝子破壊マウスの解析から、生殖腺の性分化に深く関与する因子であることが知られていた。本研究ではM33遺伝子破壊マウスの表現型を詳細に検討したところ、生殖腺以外に副腎と脾臓に異常が認められた。これらの異常はAd4BP/SF-1遺伝子破壊マウスの表現型と極めて高い類似性を示したため、M33遺伝子破壊マウスの副腎と脾臓におけるAd4BP/SF-1遺伝子の転写産物を定量したところ、両組織においてAd4BP/SF-1の発減量が減少していた。これらの結果はM33がAd4BP/SF-1遺伝子の遺伝子発現を制御していることを示唆するものであった。

A. 研究目的

副腎皮質の発生・分化を支える遺伝学的基盤を明らかにすることを通じ、副腎皮質に異常をきたす疾患の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。特に、核内受容体型転写因子Ad4BP/SF-1とポリコム遺伝子M33に付いて、その遺伝子破壊マウスの解析を進めることで、これらの因子の関与を分子レベルで明らかにすることを目的に以下の実験を行なった。

B. 研究方法

Ad4BP/SF-1遺伝子破壊マウスとM33遺伝子破壊マウス、及びこれらのヘテロ変異型マウスを作成した。遺伝的背景が表現型に与える影響を考慮し、129JとC57BL/6の両方で遺伝的背景を統一したマウスラインを作成した。これらのマウス胎仔から副腎を調製し、その形態的差異や各種マーカー遺伝子の発現を組織化学的手法や免疫組織化学的手法を用いて検討した。また、発現量の検討には抗体を用いたウエスタンブロッティング法と定量的RT-PCR法をもちいた。

(倫理面への配慮)

本実験には遺伝子破壊マウスを用いるが、全ての動物実験は岡崎国立共同研究機構動物実験指針に従って行なわれた。なお本研究は岡崎国立共同研究機構実験動物委員会の承認を得たものである。

C. 研究成果

遺伝子破壊マウスを用いた研究から、Ad4BP/SF-1遺伝子が副腎皮質の発生に不可欠であること、またAd4BP/SF-1遺伝子の一方のみが破壊されたヘテロ型においても副腎皮質の形成が不完全であることが明らかにされている。一方、ポリコム遺伝子M33は、その遺伝子破壊マウスに生殖腺の性転換や発生遅延が認められることから、Ad4BP/SF-1との関連が指摘されてきた。そこで、本研究ではM33遺伝子破壊マウス副腎皮質の形成過程を組織レベルで詳細に検討した。

M33遺伝子破壊マウス(M33^{-/-})の副腎皮質においても、Ad4BP/SF-1遺伝子のヘテロ破壊型マウス(Ad4BP^{+/-})に見られたものと

類似の異常(副腎の小型化)が認められた。このことはこれらの遺伝子が遺伝学的相互作用を通じ、副腎皮質の形成過程において機能することを推測させるものであった。そこで、M33遺伝子破壊マウスにおける副腎低形成がAd4BP/SF-1発現の低下による可能性を検討するために、Ad4BP/SF-1発現の発現量をウエスタンブロッティング法とRT-PCR法を用いて調べた。興味深いことに、M33遺伝子破壊マウスの副腎におけるAd4BP/SF-1発現の発現量は正常と比較するとおよそ半分に低下していることが分かった。同様にmRNAの低下も定量的RT-PCR法を用いた解析から確認された。

次にAd4BP/SF-1遺伝子破壊マウスとM33遺伝子破壊マウスの間で、これら2つの遺伝子について2遺伝子ヘテロ破壊型マウス(M33+/-; Ad4BP+/-)を作製し、遺伝子量が副腎皮質形成に与える影響を調べた。M33遺伝子破壊マウス(M33+/-)では正常な大きさの副腎が形成されるが、Ad4BP/SF-1遺伝子のヘテロ破壊型マウス(Ad4BP+/-)では、野生型に比べ副腎の大きさが低下する。興味深いことに、2遺伝子ヘテロ破壊型マウス(M33+/-; Ad4BP+/-)では、Ad4BP/SF-1遺伝子のヘテロ破壊型マウス(Ad4BP+/-)で見られた副腎より更に小型の副腎の形成が観察された。

D. 考察

Ad4BP/SF-1やDax-1は副腎皮質の形成にとって極めて重要な因子である。また、Ad4BP/SF-1遺伝子のヘテロ破壊型マウスに認められた副腎の小型化は、これらの因子の十分な発現量が副腎皮質の正常な形成にとって重要であることを示すものであると思われる。本研究ではM33遺伝子破壊マウスの副腎を解析したところ、副腎の小型化が認められた。そこで、M33遺伝子破壊マウスの副腎におけるAd4BP/SF-1の発現量を

検討したところ、およそ半分の量に減少していることが明らかになった。このことは、Ad4BP/SF-1遺伝子ヘテロ破壊型マウスにおける副腎が小型化することと極めてよい一致を示すものであると思われる。

これらの結果はAd4BP/SF-1遺伝子とM33遺伝子の間に遺伝子間相互作用の有無を示唆するものであったため、これら2つの遺伝子において、2遺伝子ヘテロ破壊型マウス(M33+/-; Ad4BP+/-)を作製したところ、期待通りに単一遺伝子のヘテロ破壊型マウスに見られた異常が増強された。このことは、これら2つの遺伝子間で遺伝子間相互作用の有無を示すものであり、同時にM33がAd4BP/SF-1遺伝子の発現を制御することを示すものであった。M33によるAd4BP/SF-1遺伝子の制御が直接的であるか、間接的であるかは本研究では明らかではないが、今後の重要な課題である。

E. 結論

M33遺伝子はAd4BP/SF-1の発現を調節することで、副腎の形成を調節する因子であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Activation of cAMP-dependent protein kinase increases the protein level of steroidogenic factor-1. : R. Asoy, G. Mellgren, K. Morohashi, and J. Lund. : *Endocrinol*, 143, 295-303, 2002.

2) Sox9 in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): evidence for diversified function of Sox9 in gonad differentiation. : H. Yokoi, T. Kobayashi, M. Tanaka, Y. Nagahama, Y. Wakamatsu, H. Takeda, K. Araki, K. Morohashi and K.

Ozato.: Mol. Reprod. Dev. 63, 5-16, 2002.

3) Sexually dimorphic expression of Dax-1 in the adrenal cortex.: T. Mukai, M. Kusaka, K. Kawabe, K. Goto, H. Nawata, K. Fujieda, K. Morohashi.: Genes Cells 7, 717-729, 2002.

4) Molecular cloning of DAX-1 and SHP cDNAs and their expression patterns in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*.: D. Wang, T. Kobayashi, B. Senthilkumaran, F. Sakai, C. C. Sudhakumari, T. Suzuki, M. Yoshikuni, M. Matsuda, K. Morohashi, and Y. Nagahama.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 297, 632-640, 2002.

5) Mutations of Arx/ARX cause abnormal migration and differentiation of GABAergic interneurons and abnormal development of testes in mice, and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans.: K. Kitamura, M. Yanazawa, N. Sugiyama, H. Miura, A. Iizuka-Kogo, M. Kusaka, R. Suzuki, Y. Kato-Fukui, K. Kamiirisa, K. Omichi, M. Kasahara, H. Yoshioka, T. Ogata, T. Fukuda, I. Kondo, M. Kato, W. B. Dobyns, M. Yokoyama and K. Morohashi.: Nature Genet. 32, 359-369, 2002.

6) LXXLL motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1.: T. Suzuki, M. Kasahara, H. Yoshioka, K. Morohashi, K. Umesono.: Mol. Cell. Biol. in press.

7) Dax1 is required for patterning of testis cords during gonadal differentiation.: J. J. Meeks, S. E. Crawford, T. A. Russell, K. Morohashi, B. Capel, J. Weiss, and J. L. Jameson.: Development 2003 in press.

8) Dax-1 gene transcription is regulated by Wnt4 in the female developing gonad.: H. Mizusaki, K. Kawabe, T. Mukai, E. Ariyoshi, M. Kasahara, H. Yoshioka, A. Swain, and K. Morohashi.: Mol. Endocrinol. 2003 in press.

2. 学会発表

1) Child Neurology Society 31st annual meeting. Genotype-phenotype analysis in patients with X-linked lissencephaly with abnormal genitalia (XLAG) and X-linked infantile spasms.: M. Kato, Y. Peng, K. Kitamura, K. Morohashi, S. Das, W. B. Dobyns.

2) American Society of Human Genetics 52nd annual meeting. ARX mutation in a familial lissencephaly with agenesis of corpus callosum.: T. Fukuda, J. Tohyama, H. Yamagata, K. Morohashi, K. Kitamura, and I. Kondo.

3) Genotype-phenotype analysis in patients with X-linked lissencephaly with abnormal genitalia (XLAG), X-linked infantile spasms and X-linked mental retardation.: M. Kato, Y. Peng, E. Kretzschmar, P. Chen, G. Raca, K. Kitamura, N. Sugiyama, T. Fukuda, K. Morohashi, S. Das, W. B. Dobyns.

4) The 11th International Congress on Hormonal Steroid/7th International Congress on Hormones and Cancer LXXLL motifs in Dax-1 have target specificity for orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1.: T. Suzuki, M. Kasahara, H. Yoshioka, K. Umesono, K. Morohashi.

5) Interaction of Wnt-4 signal with Ad4BP/SF-1 regulates transcription of the Dax-1 gene during gonad differentiation.: H. Mizusaki, K. Kawabe, T. Mukai, E. Ariyoshi, M. Kasahara, H. Yoshioka, A. Swain, K. Morohashi.

6) 第25回日本分子生物学会マウス雄胎生生殖腺におけるArxの機能とヒト遺伝病XLAGにおけるARX遺伝子の変異解析: 杉山紀之、福田雅之、日下雅友、北村邦夫、諸橋憲一郎。

7) マウス副腎および脾臓形成過程におけるマウスポリコーンM33の機能解析: 福井由宇子、半田康、大脇亜紀子、日下雅友、諸橋憲一郎。

8) Dax-1によるAd4BP/SF-1、LRH-1の活性調

節機構：鈴木大河、笠原恵、吉岡秀文、諸橋憲一郎。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

岡本 光弘

大阪大学大学院生命機能研究科細胞ネットワーク研究室

研究要旨

副腎皮質の内層に特異的に発現する抗原であるIZAの分子的本態を明らかにした。IZAはヘムを含有するタンパク質である。IZAの生理的機能を探索する目的で、IZAおよびステロイド合成酵素を細胞に導入して人工的な副腎皮質細胞を作った。この細胞にプロゲステロンを投与してプロゲステロンの代謝動態を検討したところ、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が分かった。これらの結果は、副腎皮質内でIZAがステロイド生合成の代謝経路の進行を調節する可能性を示唆している。

A. 研究目的

副腎皮質ステロイドホルモンの産生異常はステロイドを合成する酵素等の遺伝子異常やそれらの酵素の発現を直接制御する転写因子等の異常が原因であることが多くの症例から明らかにされている。一方、副腎皮質から分泌される3種のステロイドホルモン(アルドステロン、コルチゾルあるいはコルチコステロン、デヒドロエピアンドロステロン)はそれぞれ皮質の特異的な層で合成される。すなわちアルドステロンは球状層で、コルチゾルは束状層および網状層で、そしてデヒドロエピアンドロステロンは網状層で合成される。これら3種のステロイドはすべてコレステロールを出発物質として数種類のチトクロムP450と脱水素酵素の働きで合成される。つまり皮質の3層の細胞において発現しているP450などの酵素の組み合わせの違いと代謝経路を調節する因子の違いによって異なるステロイドが合成されると考えられる。すなわち副腎皮質の各層は類似のステロイド合成経路を発現しているが、個々の合成過程を特異的に制御する方法を組織分化の過程で獲得したと考えられる。これまでにステロイド合成の引き金となるシグナル伝達の研究は

多くなされてきたが、皮質の各層でステロイド合成経路を制御する因子については未解明である。

我々はこれまで厚生労働省科学研究費補助金(「副腎ホルモン産生異常に関する研究班」)の援助によって、副腎皮質の内層(束状層、網状層)でのみ特異的に発現する因子(内層特異的抗原: Inner Zone Antigen: IZA)のcDNAのクローニングに成功した(1)。本研究においてはIZAの副腎皮質における生理機能を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

COS細胞にIZAおよびステロイド産生に関わる各種のP450(CYP21、CYP11B1など)プラスミッドを導入した人工的副腎細胞を作り、この細胞におけるステロイド代謝過程を検討した。培養細胞の培地にプロゲステロンを加え一定時間後に培地を回収し、ステロイドを抽出する。各種ステロイドはHPLCで分離定量した。

C. 研究結果

1. IZAのクローニング

IZAは副腎皮質内層を特異的に識別

することができるモノクローナル抗体が認識する抗原として1980年代前半に報告された(図1)。その実体は不明であったが、我々はIZAタンパクおよびcDNAのクローニングに成功した(1)。IZAは分子量28kDaのタンパクである。IZAは既にタンパク構造が明らかにされている25-Dxまたは膜結合型プロゲステロン受容体と呼ばれるものと同じの分子であることが明らかとなった(2)。我々はIZAを大腸菌で発現させたところピンク色に着色していた。つまり色素分子を結合していると予想された。我々が発現させたIZAはプロゲステロン結合能をもたなかった。したがって我々はIZAの生理機能を改めて追求することにした。

2. IZAはヘム含有タンパクである

IZA遺伝子の塩基配列をデータベースで検索したところ、IZAとホモロジーをもつタンパクが存在することが示唆された(図2)。そこで、我々が副腎皮質で同定したIZAをIZA-1、類似の遺伝子産物をIZA-2と命名した。IZAがステロイドを結合するかも知れないと予想される領域はチトクロムb5のヘム結合領域に類似していることが示唆された。ただしチトクロムb5の場合ヘムに配位するためのアミノ酸残基として2つのヒスチジン残基が同定されているが、IZAのこの領域にはヒスチジンは存在しない。

IZAをGSTとの融合タンパクとして大腸菌発現系を利用して発現し精製した。精製段階でGST-IZAをグルタチオンカラム(図3)に結合させたところ、GST-IZAがピンク色に着色していた。精製したタンパクの可視領域吸収スペクトルを測定したところ、ヘムに類似したスペクトルが得られた。酸化型の

IZAのヘムは400nmに吸収極大を持ち、これをジチオナイトで還元すると420nmに吸収極大が移動する。還元型は550-600nmになだらかなピークを持つ。これらの性質はチトクロムb5のヘムの吸収スペクトルと類似しているが、細部は明らかに異なっている。これらの結果からIZAは酸化・還元に反応するヘムを含むが、それはチトクロムb5とは異なると結論した。

3. IZAはCYP21反応を活性化する

IZAは副腎皮質内層で特異的に発現する。そこでIZAのステロイド合成反応に及ぼす影響を検討することにした。COS細胞にIZAおよびステロイド産生に関わる各種のP450(CYP21、CYP11B1など)プラスミッドを導入した人工的副腎細胞を作成し、この細胞におけるステロイド代謝過程を検討した。上述の様にIZAには2つの遺伝子が存在すること、IZAが細胞内で2量体を形成すること(1)などを考慮して、IZAの発現ベクターとしてIZA-1とIZA-2の両方を組み込んだベクターを構築した(図4)。またCYP11B1発現ベクターはアドレノドキシニン(Adx)も組み込んだものとして設計した。

IZAがプロゲステロンレセプターであるとの報告もあることを考え、今回はステロイド基質としてプロゲステロンを用いた。CYP21とCYP11B1をCOS細胞で発現させ、プロゲステロンを基質として加えた場合、予想される代謝経路と産物を図4に示す。

100 μ Mのプロゲステロンからの主な代謝産物を図5に示す。DXはステロイド抽出効率の補正のために加えた内部標準のデキサメサゾンのピークである。プロゲステロンからの主な代謝産物はデオキシコルチコステロン(DOC)

であり、11あるいは18位が水酸化されたプロゲステロンがわずかながら検出された。最終産物として予想されるコルチコステロンや18水酸化DOCはほとんど検出されなかった。次にIZAを高発現させた場合、DOCの産生が特異的に上昇した。このことはIZAを高発現させたCOS細胞ではCYP21の反応が活性化されることを意味する。

D. 考察および結論

以上の結果からIZAは酸化・還元反応に関係するタンパクであることが予想された。またその副腎皮質における作用としてプロゲステロンのCYP21による21-水酸化反応の活性化が考えられる。COS細胞内でCYP11B1を発現させて11-水酸化反応を測定する実験系において100 μ Mのプロゲステロンは11-水酸化反応を強く阻害する。また生理的状态にあるラット副腎に存在するプロゲステロン濃度は10 μ M以下である。興味深いことにIZAによるCYP21反応の活性化現象はプロゲステロン30 μ M以上の高濃度で観察される。これらのことを考え合わせると、IZAは副腎皮質内層においてプロゲステロン濃度が上昇しないように働いている可能性がある。IZAと相互作用する分子を同定し、その作用機構を明らかにすることが今後の課題である。

参考文献

- 1) Raza FS., Takemori H., Tojo H., Okamoto M., Vinson GP.: Identification of the rat adrenal zona fasciculata/reticularis specific protein, inner zone antigen (IZAg), as the putative membrane progesterone receptor.: *Eur J Biochem.* 2001; 268: 2141-2147.
- 2) Falkenstein E., Meyer C., Eisen C., Scriba PC Wehling M.: Full length cDNA sequence of a progesterone membrane-

binding protein from porcine vascular smooth muscle cells.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996; 229, 86-89.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Doi, J., Takemori, H., Lin, X., Horike, N., Katoh, Y., and Okamoto, M. (2002) Salt-inducible kinase SIK represses PKA-mediated activation of human CYP11A promoter through the CREB's bZIP domain. *J. Biol. Chem.*, 277, 15629-15637.
- 2) Takemori, H., Katoh, Y., Horike, N., Doi, J., and Okamoto, M. (2002) ACTH-induced nucleocytoplasmic translocation of salt-inducible kinase; Implication in the protein kinase A-activated gene transcription in mouse adrenocortical tumor Cells. *J. Biol. Chem.* 277, 42334-42343.
- 3) Katoh, Y., Takemori, H., Doi, J., and Okamoto, M. (2002) Identification of the nuclear localization domain of salt-inducible kinase. *Endocr. Res.*, 28, 315-318.
- 4) Horike, N., Takemori, H., Katoh, Y., Doi, J., and Okamoto, M. (2002) Roles of several domains identified in the primary structure of salt-inducible kinase (SIK). *Endocr. Res.*, 28, 291-294.
- 5) Ito, M., Tchoua U., Okamoto, M., and Tojo, H. (2002) Purification and properties of a phospholipase A2/lipase preferring phosphatidic acid, bis (monoacylglycerol) phosphate, and monoacylglycerol from rat testis. *J. Biol. Chem.* 277, 43674-43681.

2. 学会発表

- 1) Okamoto, M. SIK: Mechanism underlying the repression of CYP11A gene transcription. 10th International Conference on the Adrenal Cortex. June 15-18, 2002, San Francisco, U.S.A.
- 2) Takemori, H.: New aspects of aldos-

- terone synthesis. International Congress on hormonal steroids and hormones and cancer. October 21-25, Fukuoka, Japan.
- 3) Min, L., Takemori, H., Doi, J., and Okamoto, M.: Isoforms of putative membrane progesterone receptor.: International Congress on hormonal steroids and hormones and cancer. October 21-25, Fukuoka, Japan.
- 4) Katoh, Y., Takemori, H., Doi, J., Okamoto, M.: Nucleocytoplasmic shuttling of salt-inducible kinase. International Congress on hormonal steroids and hormones and cancer. October 21-25, Fukuoka, Japan.
- 5) Horike, N., Takemori, H., Min, L.,

- Nonaka, Y., Okamoto, M.: SIK2, an isoform of salt-inducible kinase, regulates the cAMP-responsive element (CRE)-regulated gene expression in adipose tissue. International Congress on hormonal steroids and hormones and cancer. October 21-25, Fukuoka, Japan.
- 6) 堀家なな緒、竹森洋、岡本光弘：塩誘導性プロテインキナーゼ・アイソフォーム (SIK2) の発現および機能解析 第75回日本生化学会大会2002年10月14日-17日、京都。
- 7) 土居純子、竹森洋、加藤芳子、岡本光弘：塩誘導性プロテインキナーゼ (SIK) によるステロイド合成早期調節タンパク質 (StAR) 遺伝子抑制の分子機構 第75回日本生化学会大会2002年10月14日-17日、京都。

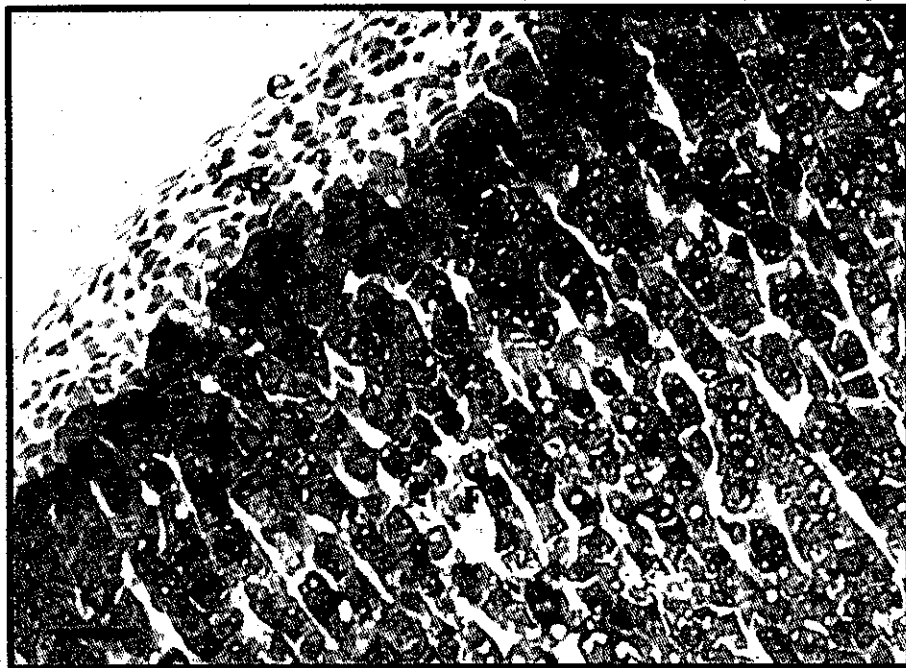


図1, 副腎皮質内層特異的抗原 (IZA) の発現
C : 皮膜、G : 球状層、F : 束状層

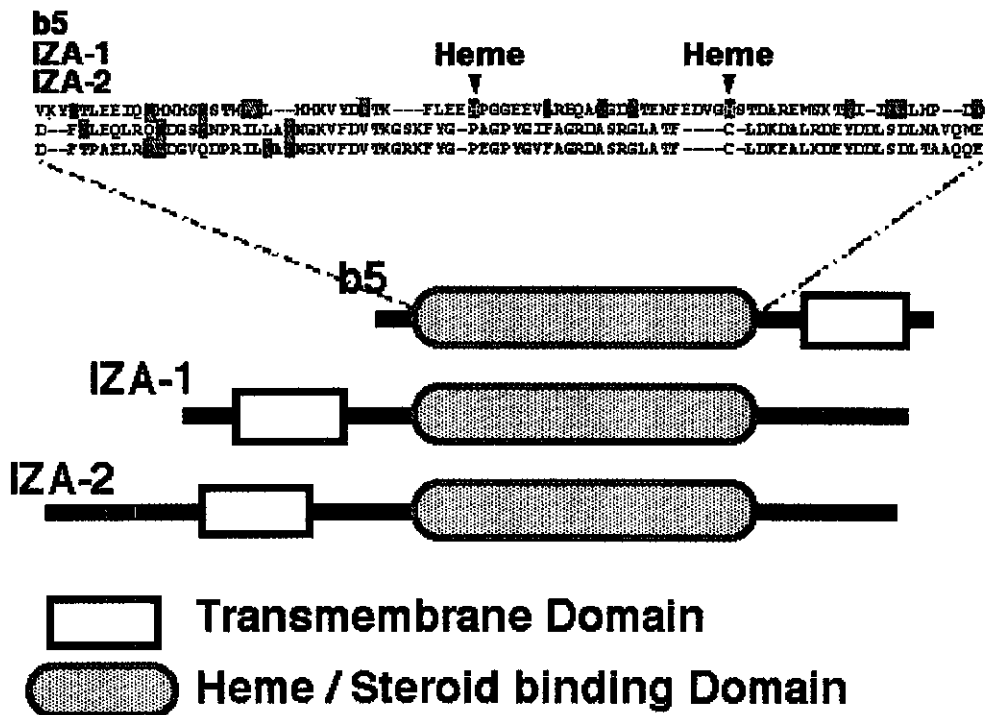


図2, チトクロムb5とIZA-1/IZA-2タンパクの構造比較
 四角: 疎水性領域、楕円: ヘム/予想されるステロイド結合領域

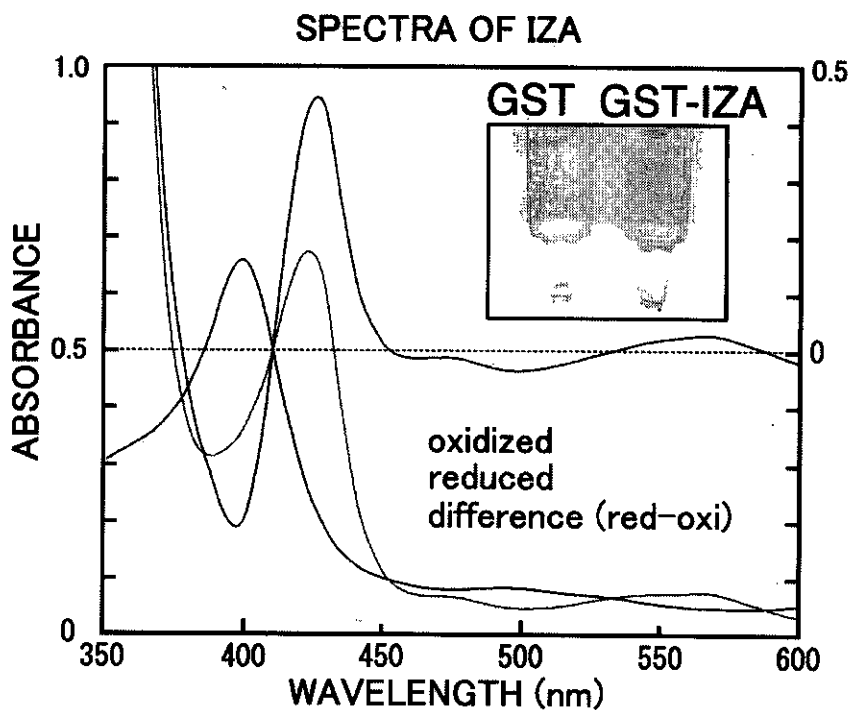


図3, IZAは色素を含有するタンパクである。
 大腸菌で発現させたGST結合IZA-1タンパクの吸収スペクトラム

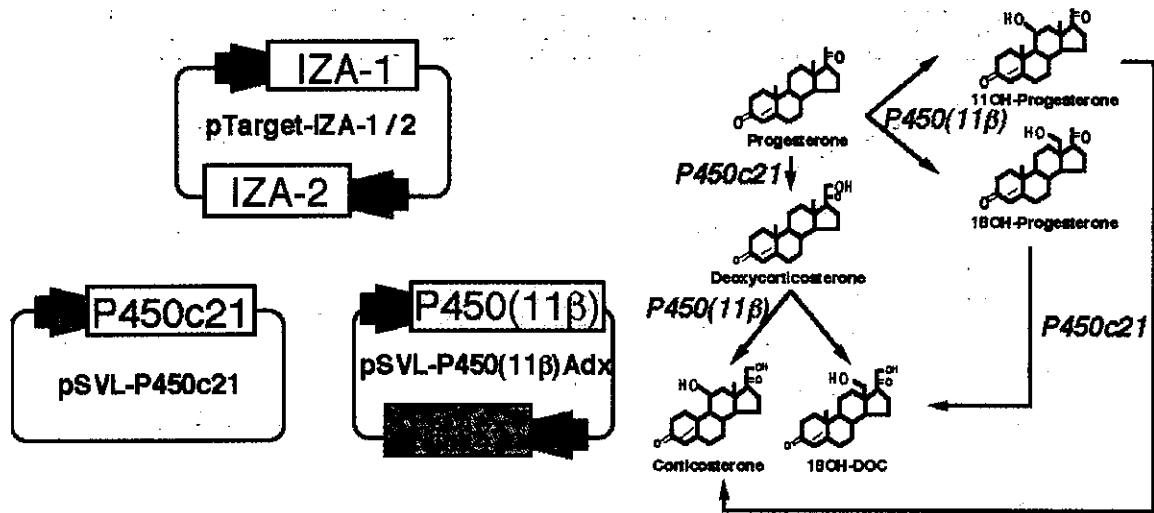


図4, COS細胞を利用したIZAのステロイド合成に及ぼす影響。
 左: 使用した発現ベクター、右: プロゲステロンからの代謝経路と代謝中間体

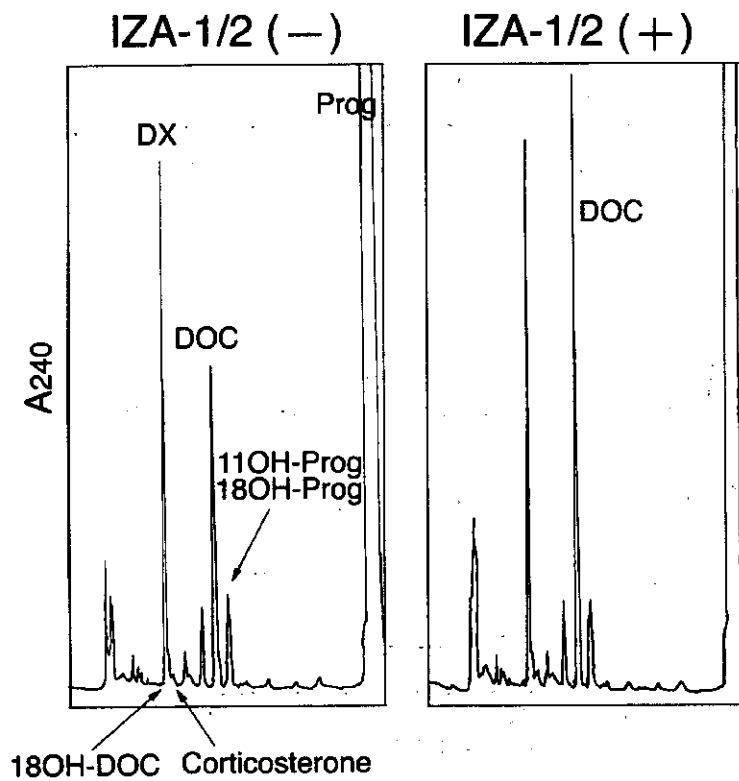


図5, IZA高発現によるDOC産生の亢進

副腎外組織でのステロイド産生能の検討

西川 哲男、齋藤 淳、末松 佐知子、祖山 暁子、伊藤 浩子
横浜労災病院内分泌・代謝内科

研究要旨

糖尿病・高脂血症患者では腎糸球体傷害や細小血管障害の進展にアルドステロンが重要な関与を行っている。そこで、我々は腎臓特にヒトのメサンギウムの初代培養細胞を用いてアルドステロンの局所産生能に関して検討を行った。メサンギウム細胞はプレグネノロン・アルドステロンの産生能を保持していることが判明した。両ステロイド共にLDL刺激下で著しい産生増加がみられ、アンジオテンシンIIはさらにその相乗効果を示した。ACTHおよび(Bu)₂cAMP添加ではプレグネノロン・アルドステロンの産生増加作用は認めなかった。また、免疫組織学的検討ではメサンギウム細胞にsteroidogenic enzymeであるP450sccと3 β -HSDの存在が確認され、LDL受容体, StAR, CYP11B2、P450scc及び3 β -HSDの各mRNAの存在も確認された。また、LDL添加刺激にてStARとP450scc mRNAの発現増加が見られた。これらの検討結果よりヒトのメサンギウム細胞はアルドステロン産生臓器であり尚且、LDLが主要な産生調節因子であると考えられた。以上よりヒト腎メサンギウム-内分泌系が糸球体局所のアルドステロン濃度をsystemic renin-angiotensin-aldosterone systemとは独立して調節すると考えられ、糸球体病変の発症・進展に関っているものと想像された。

A. 研究目的

1型・2型糖尿病の最重要な合併症は糖尿病性腎症で本邦の腎透析原因の最大原因である¹⁾。一方糖尿病性腎症の進展には全身のrenin-angiotensin-aldosterone axisの亢進が伴っていることが良く知られている^{2,3)}。事実、ACE inhibitorやARBが蛋白尿減少効果があり、さらにaldosterone receptor antagonistであるspironolactoneをACE inhibitorに併用するとより強い蛋白尿減少効果があると報告されている⁴⁾。古典的にはアルドステロンは副腎皮質球状層で合成されることは衆知の事実である⁵⁾。またアルドステロンはangiotensin II、ACTHおよび血清カリウムで増加反応を、dopamineやatrial natriuretic peptideが抑制反応を示すことも知られている⁶⁾。アルド

ステロンは血中から供給されるコレステロール例えばLDLにより合成される⁷⁾。そのコレステロールはStAR蛋白によりミトコンドリア内膜に転送される。ミトコンドリア内ではP450sccによりプレグネノロンが合成され、その後臙首合成酵素によりアルドステロンが最終的に産生される。Angiotensin IIはStARやP450scc.等の律速段階を活性化することも知られている。一方、最近では、副腎外組織例えば心筋や血管平滑筋でもアルドステロンを産生するものと考えられている⁸⁻¹²⁾。また、adrenalectomized ratにて対照群と同様に腎臓にてアルドステロンが検出される、あるいはex vivo rat kidneyの実験にて還流液中にアルドステロンの存在が確認されている^{13,14)}。こうした事実は糸球体局所でアルド

ステロンが産生され、糸球体病変の発症・進展に関っているものと想像されるが、これまでこのような報告はない。そこで我々は腎組織におけるアルドステロン局所産生能の有無を検討する目的で、ヒト腎組織のうちメサンギウム細胞を用いてプレグネノロン・アルドステロン産生ならびに各種steroidogenic enzymeの検討を行った。

B. 研究方法

Primary human mesangial cells(product code: cc-2559)はBio Whittaker, Inc.より入手し、5.5mM glucose, 5% fetal calf serum, 50 μ g/ml gentamicin sulfateおよび50ng/ml amphotericin-Bを含むMCDB131 medium中で培養し、4-7継代した後実験に用いた。なお、血管内皮・平滑筋細胞が混入していない事を確認して用いた。ステロイド産性能の検討では、1. プレグネノロン産生: adherent human mesangial cellを(5×10^5 cells/well) 2mlのKrebs-Ringer bicarbonate (KRB) buffer (20mM HEPES [pH 7.4], 1.3 mM CaCl_2 , 0.2% glucose and 0.1% BSA) (KRB-HEPES) 中で40 μ M trilostane存在下で15分preincubationしてから、LDL、angiotensin IIあるいはACTHを添加して48反応させ、メデイウム中のプレグネノロンを特異的なradioimmunoassay¹⁵⁾で測定した。2. アルドステロン産生: 最初はメサンギウム細胞培養液からステロイド抽出したのちGC/MS analysisを行いその存在を確認した。さらには、上記と同様の反応の後特異的radioimmunoassay kit (SPAC RIA kit, Daiichi Radio-isotope Co., Tokyo, Japan)にて測定を行った。3. 各種ステロイド産生酵素のmRNAの検討: ヒト・腎メサンギウム細胞をLDL添加・非添加群にて経時的に培養し、StARおよびP450scc mRNAの発現をRT-PCRを用いて比較検討した。

C. 研究結果

1. プレグネノロン産生

human mesangial cellの培養液中にradioimmunoassayで測定可能なプレグネノロンの存在が明らかである(図1)。更には40mg cholesterol/dl of LDLの添加によって著明な産生増加を見た。10⁻⁷M、angiotensin IIでは極くわずかな増加反応であったがLDLとともに添加すると相乗効果が示された(図1)。ACTHや(Bu)₂cAMP刺激では増加作用がなかった。

2. アルドステロン産生

GC/MS analysisで培養液を検討するとアルドステロンのhemiketal formは検出されずそのaldehyde formのみが認められた(図2、3)。LDL添加・非添加群で比較すると、48時間の培養にてLDL添加にて160pg/mlのアルドステロンが測定され、非添加群では80pg/mlであった。

3. StAR and P450scc mRNAs発現

40mg cholesterol/dl of LDL添加にてStAR及びP450scc mRNAsの増加を認め各々約118倍並びに1.25倍の増加反応があった(図4)。

D. 考案

本研究結果よりヒト・腎メサンギウム細胞はプレグネノロン・アルドステロンの産生能を持つ細胞であることが判明した。すなわち、3 β ヒドロキシステロイド脱水素酵素阻害剤であるトリロスタン存在下で反応すると、プレグネノロン以降の代謝を抑制し、プレグネノロンの合成能を直接判定できる。その結果、LDL添加で著明なその産生増加を認めた。すなわちステロイドの基質であるリポ蛋白のうちLDLを供給することでメサンギウムからのステロイド産生が開始すると考えられた。この事実は、

StAR並びにP450sccのmRNAsレベルでの検討からも明白であり、特にLDL刺激でStAR発現が著明で興味深い知見であった。なお、副腎の場合と異なりACTHやcyclic AMP添加ではプレグネノロンの増加は無くこれらの刺激因子ではメサンギウムのステロイド産生調節に関与してないものと考えられた。

次に、GC/MS analysisでメサンギウム培養液を検討するとアルドステロンの存在が確認され更にLDL刺激でアルドステロン産生増加を認めた。すなわち、この事実はメサンギウム細胞はステロイドジェニック組織である事を明確に示しており、特に電解質代謝や血圧調節するアルドステロンが腎局所で合成されるものと考えられた。auto/paracrine的に作用して腎組織特に糸球体に傷害をもたらす可能性が示唆された(16~19)。

E. 結論

メサンギウムは心筋・脳・血管平滑筋細胞と同様にアルドステロン産性能を持つsteroidogenic tissueと考えることが可能である^{8~12})。今後生理的・病的意義に関する詳細な検討が必要と思われた。

F. 文献

- 1) American Diabetes Association (2003) *Diabetes Care* 26 (suppl.1), s94-s98.
- 2) Burns, K.D. (2000) *Am. J. Kid. Dis.* 36, 449-467.
- 3) Sato, A., Hayashi, K., Naruse, M., and Saruta, T. (2003) *Hypertension* 41, 64-68.
- 4) Chyrosostomou, A., and Becker, G. (2001) *N. Engl. J. Med.* 345(12), 925-926.
- 5) Curnow, K.M., Tusie-Luna, M.T., Pascoe, L., Natarajan, R., Gu, J.L., Nadler, J.L., and White, P.C. (1991) *Mol. Endocrinol.* 5, 1513-1522.
- 6) Quinn, S. J., and Williams, G.H. (1992) in *The Adrenal Gland*, second edition (James, V.H.T., ed) pp. 159-189.
- 7) Leiterfsdorf, E., Stein O. and Stein Y. (1985) *Biochim. Biophys. Acta.* 835, 183-190.
- 8) Silvester, J.S., Heymes, C., Oubenaissa, A., Robert, V., Aupetit-Faisant, B., Carayon, A., Swynghedauw, B., and Delcayre, C. (1999) *Circulation* 99(20), 2694-2701.
- 9) Hatakeyama, H., Miyamori, I., Fujita, T., Takeda, Y., Takeda, R., and Yamamoto, H. (1994) *J. Biol. Chem.* 269 (39), 24316-24320.
- 10) Silvester, J.S., Robert, V., Heymes, C., Aupetit-Faisant, B., Mouas, C., Moalic, J.M., Swynghedauw, B., and Delcayre, C. (1998) *J. Biol. Chem.* 273 (9), 4883-4891.
- 11) Kayes-Wandover, K.M., and White, P.C. (2000) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85(7), 2519-2525.
- 12) Takeda, Y., Yoneda, T., Demura, M., Miyamori, I., and Mabuchi, H. (2000) *Endocrinology* 141(5), 1901-1904.
- 13) Martinez, D., Oestreicher, E., Roubansanthisuk, W., Yao, T., Ricchiuti, V., Williams, G., and Kifor, I. (2002) *J. Hypertens.* 20 (suppl.4) s115, Abstract #P0457.
- 14) Wu, O., Liang, X., Dai, Y., Liu, H., Zang, Y., Guo, Z., Zhang, R., Lai, W., Zhang, Y. and Liu, Y. (1999) *Chinese Med. J.* 112, 414-418.
- 15) Nishikawa, T., Noda, M., Tamura, Y., Yoshida, S., and Kato, I. (1993) *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 46(2), 203-208.
- 16) Hostetter, T.H., Rosenberg, M.E., Ibrahim, H.N., and Juknevicius, I. (2001) *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10, 105-110.
- 17) Greene, E., Kren, S., and Hostetter, T.H. (1996) *J. Clin. Invest.* 98, 1063-1068.
- 18) Berl, T., Katz, F.H., Henrich, W.L.,

de Torrente, A., and Schrier, R.W. (1978) *Kidney Int.* 14, 228-235.

19) Hene, R.J., Boer, P., Koomans, H.A., and Dorhout Mees, E.J. (1982) *Kidney Int.* 21, 98-101.

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 関原久彦、西川哲男、小島元子：【内分泌疾患診療マニュアル】 イラストでみる全身像、日本医師会雑誌2002；127(12)：S2-S3.

2) 小島元子、西川哲男：【内分泌疾患診療マニュアル】 写真でみる身体的特徴、日本医師会雑誌2002；127(12)：S4-S9.

3) 西川哲男、齋藤淳、祖山暁子、伊藤浩子、大村昌夫：原発性アルドステロン症の頻度と診断・治療、日内会誌2002；92(2)：208-12.

4) 西川哲男、齋藤淳、大村昌夫：副腎腫瘍と高血圧、臨床高血圧2002；8(5)：14-33.

5) 西川哲男：性腺疾患の診断、*Mebio* 2002；19(8)：71-78.

6) 西川哲男：【内分泌疾患診療マニュアル】 主要症候から診断へのアプローチ発熱、日本医師会雑誌2002；127(12)：S78-S79.

7) 西川哲男：【内分泌疾患診療マニュアル】 内分泌疾患のやさしいみかた 患者の訴えから内分泌疾患を見つけるヒント、日本医師会雑誌2002；127(12)：S32-S37.

8) 西川哲男：【内分泌疾患診療マニュアル】 内分泌疾患を理解するために ホルモンの作用機序、日本医師会雑誌2002；127(12)：S62-S65.

9) 西川哲男：【内分泌疾患診療マニュアル】 内分泌疾患の診断・治療 下垂体疾患 ACTH単独欠損症、日本医師会雑誌2002；127(12)：S212-S213.

10) 西川哲男、齋藤淳：【アルドステロン臓器障害における新たな展開】 抗アルドステロン薬の使用法、血圧2002；9(6)：625-629.

11) 西川哲男：【内分泌疾患診断 僅かな手がかりから隠された病態を診る】 性腺疾患の診断、*Mebio* 2002；19(8)：71-79.

12) 西川哲男、齋藤淳：【内分泌疾患の拾い上げとマネジメント】 内分泌疾患のマネジメント 専門医のマネジメントが望ましい疾患 二次性高血圧症 原発性アルドステロン症、*Medicina* 2002；39(8)：1334-1337.

13) 大村昌夫、山田佳彦、伊藤聡、笹野公伸、西川哲男、関原久彦：副腎重複病変の診断法と治療法についての検討、日本内分泌学会雑誌2002；78(Suppl)：70-72.

14) 大村昌夫、西川哲男：原発性アルドステロン症、*内科*2002；89(6)：1533-1536.

15) 大村昌夫、西川哲男：【EBMのための内科疾患データファイル 治療方針決定のために】 内分泌 原発性アルドステロン症、*内科*2002；89(6)：1533-1536.

16) 長沼廣、小島元子、西川哲男：【内分泌疾患診療マニュアル】 検査画像・病理像、日本医師会雑誌2002；127(12)：S10-S16.

17) Maezawa Y., Hirasawa A., Abe T., et al.: Successful treatment of listerial brain abscess: a case report and literature review. *Intern Med* 2002; 41(11): 1073-8.

18) Naya Y., Nagata M., Ichikawa T., et al.: Laparoscopic adrenalectomy: comparison of transperitoneal and retroperitoneal approaches. *BJU Int* 2002; 90(3): 199-204.

19) Nishikawa T.: Possible involvement of hypersecretion of progesterone from an adrenal adenoma without androgen excess in primary amenorrhea. *Intern Med* 2002; 41(11): 912.

20) Nishikawa T.: Does radiation therapy for brain tumor affect pituitary function, resulting in isolated ACTH deficiency? *Intern Med* 2002; 41(6): 417.

21) Nishikawa T., Saito J., Omura M.: Mini review: Surgical indications for adrenal incidentaloma. *Biomed Pharmacother* 2002; 56 Suppl 1: 145s-148s.

22) 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* 2002; 51(3): 350-5.

23) Williams GH, 宮森勇, 西川哲男, 藤田敏郎: 心血管リスクホルモンとしてのアルドステロン、*血管医学*2002; 3(2): 187-196.

24) 齋藤淳, 大村昌夫, 祖山暁子, 飯塚孝, 伊藤浩子, 西川哲男: 当院で経験したACTH単独欠損症8例の臨床像、*ACTH RELATED PEPTIDES vol 12. CRH・ACTH研究会*(編)、2002: 141-143.

25) 齋藤淳, 西川哲男: 【こんなとき先生ならどう対応しますか プライマリケア診療で困ったときに】 対応に苦慮する症候・疾患の診療のコツ プライマリケアにおける外来診療のコツ 内分泌 プライマリケアの場での甲状腺疾患診療のポイントについて教えてください、*治療*2002; 84(3月増刊): 769-773.

26) 齋藤淳: 【ステロイドホルモン研究の進歩】 副腎偶発腫の病理と内分泌機能、*内分泌・糖尿病科*2002; 15(3): 224-230.

27) 齋藤淳, 西川哲男: 副腎性高血圧症の頻度と病態、*内分泌・糖尿病科*2002; 15(6): 601-604.

28) 西川哲男: 副腎偶発腫瘍の精査目的で入院した84歳男性、専門医を目指すCASE METHOD APPROACH、*内分泌疾患3版*、肥塚直美(編)、東京: 日本医事新報社、2003: 202-213.

29) 大村昌夫, 西川哲男: 副腎皮質刺激ホルモン(ACTH). *臨床検査ガイド2003~2004* 和田攻, 大久保昭行, 矢崎義雄, 大内尉好(編)、東京: 文光堂、2003: 384-391.

2. 学会発表

1) 石川耕, 高野達朗, 祖山暁子, 齋藤淳, 伊藤浩子, 飯塚孝, 西川哲男, 辻裕之: 急速に腎機能が悪化した片腎2型糖尿病の一例、第39回日本糖尿病学会関東甲信越地方会、2002年1月26日(幕張).

2) 川勝千桂子, 高野達朗, 祖山暁子, 齋藤淳, 伊藤浩子, 飯塚孝, 西川哲男, 杉浦秀和, 辻裕之: 気腫性腎盂腎炎から急性腎不全、敗血症性ショックに陥った2型糖尿病

の一例、第39回日本糖尿病学会関東甲信越地方会、2002年1月26日(幕張).

3) 赤塚壮太郎, 齋藤淳, 角田幸雄, 河村俊治, 祖山暁子, 伊藤浩子, 西川哲男: 中毒性多結節性甲状腺腫と乳頭癌及び濾胞腺腫を合併した巨大甲状腺腫の一例、第18回甲状腺病態生理研究会、2002年1月26日(東京).

4) 赤塚壮太郎, 齋藤淳, 祖山暁子, 伊藤浩子, 飯塚孝, 西川哲男: 髄小脳変性症を合併したミトコンドリア糖尿病の一症例、第2回日本内分泌学会関東甲信越支部会、2002年2月15-16日(大宮).

5) 祖山暁子, 石川耕, 飯塚孝, 伊藤浩子, 齋藤淳, 笹野公伸, 西川哲男: 副腎偶発腫瘍切除2年後にCushing病を診断し得た一例、第12回臨床内分泌代謝、Update 2002年3月9-10日(大阪).

6) 高野達朗, 齋藤淳, 祖山暁子, 飯塚孝, 伊藤浩子, 西川哲男: 脊髄刺激療法後に尿崩症・リンパ球性漏斗神経葉炎を発症した一例、第12回臨床内分泌代謝、Update 2002年3月9-10日(大阪).

7) 川勝千桂子, 齋藤淳, 高野達朗, 祖山暁子, 飯塚孝, 伊藤浩子, 笹野公伸, 西川哲男: Preclinical Cushing症候群を呈した両側副腎偶発腫瘍の一例、第12回臨床内分泌代謝、Update 2002年3月9-10日(大阪).

8) 石川耕, 齋藤淳, 祖山暁子, 伊藤浩子, 大村昌夫, 西川哲男: 心血管合併症進展に及ぼすアルドステロンの影響、第99回日本内科学会講演会、2002年3月28-30日(名古屋).

9) 齋藤淳, 末松佐知子, 祖山暁子, 伊藤浩子, 西川哲男: ヒト副腎でのスフィンゴシン受容体を介するステロイド産生調節、第75回日本内分泌学会総会、2002年6月28-30日(大阪).

10) 西川哲男: 副腎性高血圧症の頻度とその病態、第75回日本内分泌学会総会、2002年6月28-30日(大阪).

11) 大村昌夫, 齋藤淳, 山田佳彦, 笹野公伸, 関原久彦, 西川哲男: 原発性アルドステロン症における責任病巣の確定診断法と手術適応に関する検討、第75回日本内分泌学会総会、2002年6月28-30日(大阪).

12) 西川哲男：微小副腎病変による原発性アルドステロン症、第75回日本内分泌学会総会、2002年6月28-30日(大阪)。

13) 高野達郎、有岡仁、阿部薫、西川哲男：同時性四重癌の疑われた一症例、第27回港北医学会、2002年9月7日(横浜)。

14) 玉地智宏、齋藤淳、祖山暁子、伊藤浩子、西川哲男、太枝徹：アルドステロン過剰分泌を呈した両側副腎過形成によるCushing症候群の一例、第45回臨床内分泌代謝研究会、2002年9月18日(東京)。

15) 齋藤淳、西川哲男：微小腺腫による原発性アルドステロン症の一例、第25回日本

高血圧学会総会、2002年10月11-13日(東京)。

16) 本城聡、玉地智宏、齋藤淳、祖山暁子、飯塚孝、伊藤浩子、西川哲男：14年間無症候にて経過し意識障害にて再発した尿素サイクル異常症の成人例、第503回日本内科学会関東地方会、2002年10月12日(東京)。

17) 河原哲也、玉地智宏、祖山暁子、齋藤淳、伊藤浩子、西川哲男：当院におけるTRAbの高感度測定法と従来法の比較 その臨床的意義、第30回内分泌代謝研究会、2002年12月7日(東京)。

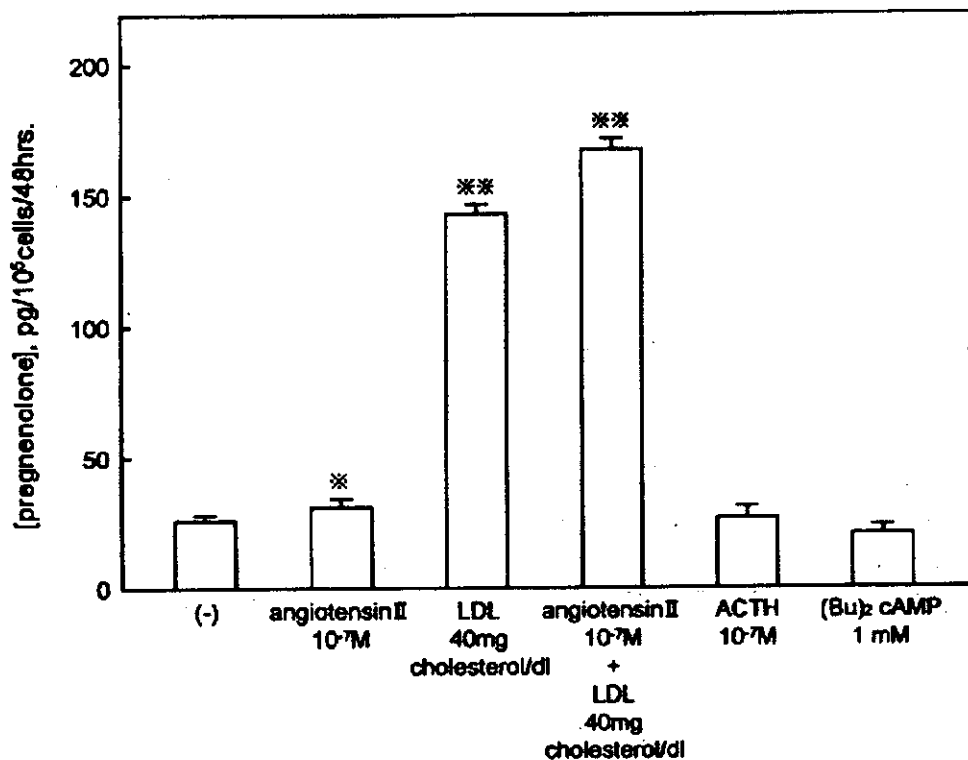


図1 ヒト・メサングウム細胞でのプレグネノロン産生能の検討

メサングウム細胞とともにangiotensin II(ang. II), LDL, ACTH並びに(Bu)₂cAMPを添加し48時間培養した。プレグネノロンは特異的抗体を用いたradioimmunoassayで測定した。結果はMean±SE. で記した。*p<0.01 vs. control(no additives), **p<0.001 vs. control (no additives)

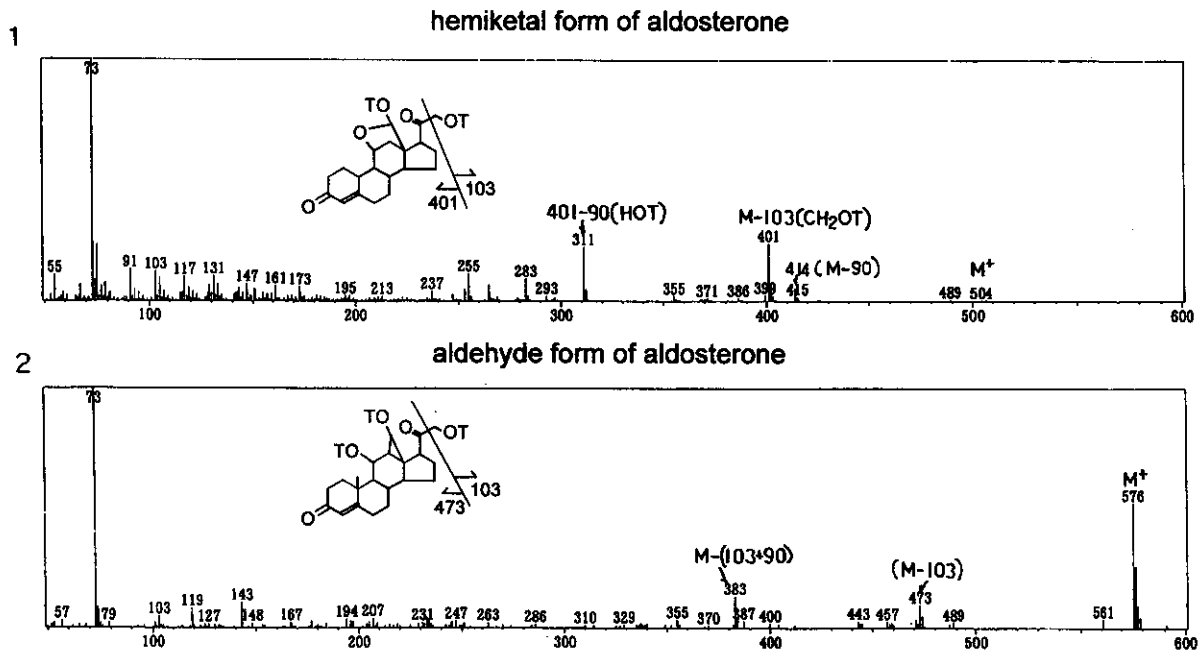


図2 標準アルドステロンサンプルをtrimethylsilyl-derivatizedした後のhemiketalとaldehyde型アルドステロンのMass spectraを示す

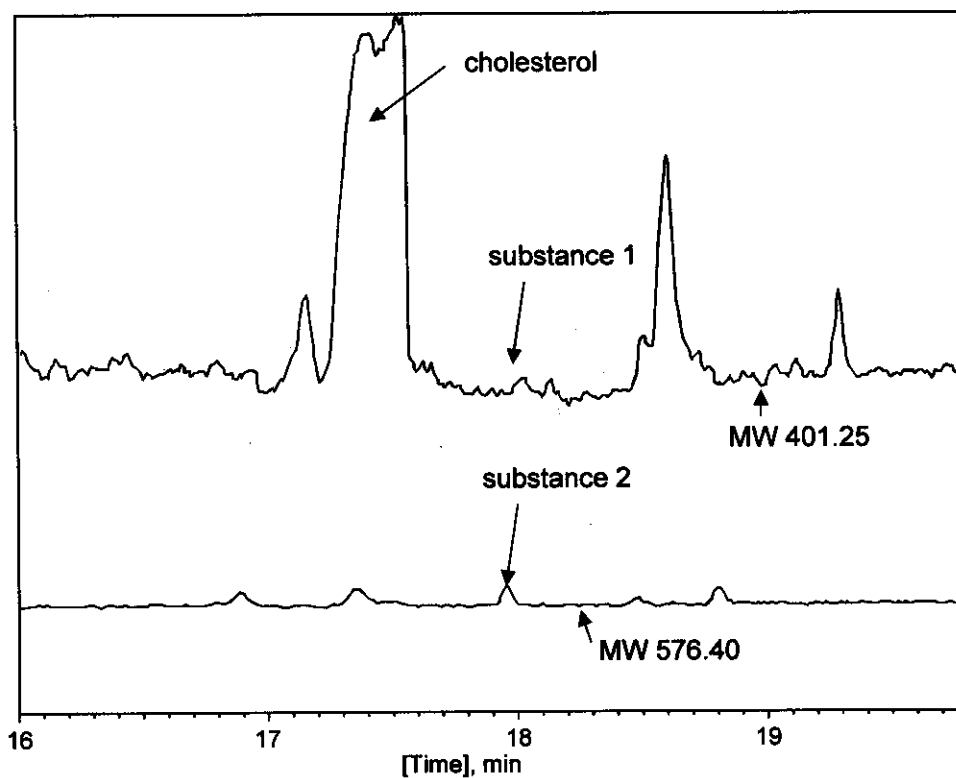


図3 ヒト・メサングウム細胞での48時間培養した後の培養液中アルドステロン産生hemiketal(substance 1)型およびaldehyde(substance 2)型の選択的ion mass chromatographyを示した。上段のhemiketal(substance 1)型は検出されなかった。

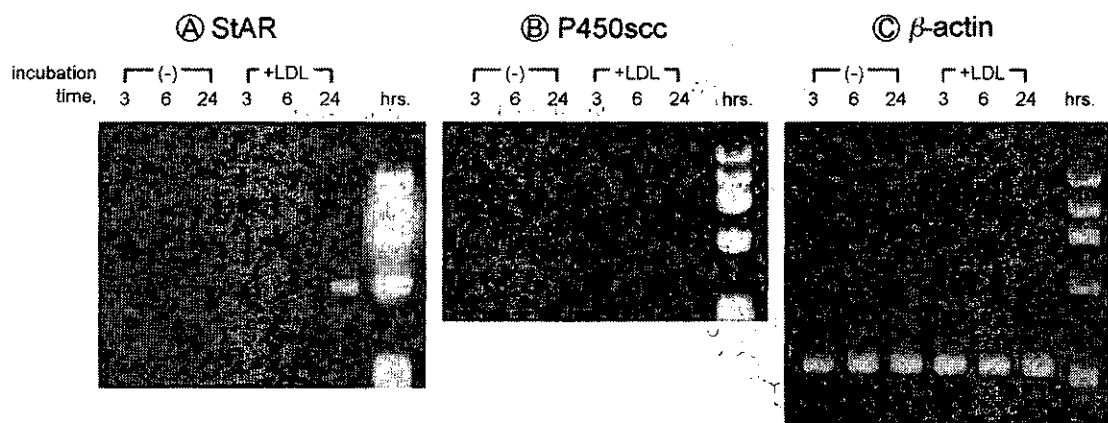


図4 StAR(A)およびP450scc(B)のmRNA発現の時間経過
メサングウム細胞と40mg cholesterol/dlのLDL存在・非存在下で経時的に反応させた。

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

柴田 洋孝、小林佐紀子、栗原 勲、横田 健一、齊藤 郁夫、猿田 享男
慶應義塾大学保健管理センター、同医学部内科

研究要旨

副腎皮質におけるステロイド産生は生体にとって不可欠であるが、副腎皮質腫瘍ではステロイド合成酵素の発現異常をきたすことにより高血圧や種々の代謝異常をきたす。我々は昨年度までの研究により、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昨年までの研究で明らかにしてきた。そこで、本年度はそのさらなる機序にせまるために副腎腫瘍cDNAライブラリーよりCOUP-TFI結合蛋白としてUbc9を同定した。Ubc9はCOUP-TFIによる転写抑制に関わるcorepressorとして機能することが明らかとなり、またその分子中に転写抑制ドメインを有していた。また、COUP-TFIは一般にはrepressorとして知られており、CYP17はnegativeに調節されるが、一方、Na⁺/H⁺-exchanger-1やNGFI-AなどはCOUP-TFIによりpositiveに調節されており、それらのプロモーターにおいてはUbc9がcoactivatorとしても機能することが明らかとなった。以上の結果より、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が明らかとなり、今後副腎皮質ステロイド産生への影響を検討していく予定である。

A. 研究目的

副腎皮質におけるステロイド産生は生体にとって不可欠であるが、副腎皮質腫瘍ではステロイド合成酵素の発現異常をきたすことにより、生活習慣病の基盤となる高血圧や種々の代謝異常をきたす。核内受容体COUP-TFs(chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors)は、副腎皮質ステロイド産生に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきたが、その機序を明らかにするために副腎腫瘍cDNAライブラリーよりCOUP-TFI-interacting proteinsのクローニングを行い、その標的分子の機能を解析することにより、ホルモン産生異常症の内科的治療法の確立を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

1. yeast two-hybrid systemによるCOUP-TFI-interacting proteinsのスクリーニング

COUP-TFI(amino acids 55-423)をGal4 DNA-binding domainとの融合蛋白として、一方副腎皮質腫瘍cDNA libraryをGal5 activation domainとの融合蛋白として酵母AH109 cellに発現させ、アミノ酸要求性を利用して蛋白-蛋白相互作用するクローンをスクリーニングする(MatchMaker version 3, Clontech社)。検出したクローンとの相互作用は、 β -galactosidase liquid assayにより定量的に評価する。

2. in vitro GST-pulldown assay

上記で検出したUbc9をGSTとの融合