

厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業

ステロイドシグナル経路を分子標的とした
新しい老年病の予防・治療法の開発

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 聡
平成16(2004)年4月

目 次

I.	総括研究報告 ステロイドシグナル経路を分子標的とした新しい老年病の 予防・治療法の開発 井上 聡 -----	I - 1
II.	分担研究報告 1. 血管の老化と動脈硬化におけるステロイド作用機構の解明と応用 秋下 雅弘 ----- 2. 脳、血管、骨の老化でのステロイド作用におけるシグナル伝達系 の役割の解明と応用 堺 隆一 ----- 3. 脳、血管、骨の老化におけるステロイド作用調節薬の作用機構の 解明と臨床応用 池田 和博 ----- 4. 心血管の老化でのステロイド作用におけるレドックス制御機構の 役割の解明とその応用 近藤 宇史 ----- 5. 老化と神経変性疾患におけるステロイド受容体転写調節機構の 解明とその応用 武山 健一 ----- 6. 脳の老化におけるステロイド受容体作用機構の解明とその応用 柳澤 純 ----- 7. 老化と老年病の疾患モデル動物の開発とその応用 津久井 通 -----	II - 1 II - 8 II - 14 II - 19 II - 24 II - 30 II - 35
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	III - 1
IV.	刊行物の別刷 -----	IV - 1

総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

ステロイドシグナル経路を分子標的とした
新しい老年病の予防、治療法の開発

主任研究者 井上 聡
東京大学医学部附属病院老年病科講師

【研究要旨】

高齢化社会の加速化に伴い、老化、老年病の予防、治療と健やかな加齢の実現が急務である。老化とともに体内で変化する大きな因子としてステロイドがあげられ、不足したステロイドを補うことにより老化を制御できる可能性から、本研究ではこの点に着目しステロイドの作用機構の解明とその老化、老年病予防、治療法の開発を目指す。特に、性ステロイドは生殖系の老化を決める大きな因子であるばかりでなく個体の老化、ならびに各臓器の老化（骨、血、脳の老化など）に深く関わっている。その作用経路としてステロイド受容体を介する機序が主なもので、それに加えて細胞膜や細胞内シグナル伝達系を介する non-genomic action も注目されている。本研究の目的は、ステロイド作用の調節、受容体機能、関連相互作用、共役因子、シグナル伝達、下流標的因子群の性状を分子レベルで解明し、ステロイドならびその受容体の、個体の老化、臓器の老化、老年病における役割を明らかにし、老化、老年病の新しい予防、治療法を開発することにある。老化、老年病の予防と治療を目指したステロイド作用機構に関する多面的研究は世界的にも日本においても少数に限られ、この分野の基礎から臨床医学に関与する申請者らが学際的な研究チームを形成し、独自に発見、開発した材料や手法、遺伝子改変技術、ゲノム医学、ゲノム創薬を応用して取り組む。特に当研究者らは、性ステロイド受容体と標的因子の同定、遺伝子改変動物の作製を推進しており、新規遺伝子・蛋白の単離、生化学的機能解析、ウイルスベクターとノックアウト・トランスジェニックマウスの作製解析、老年病の臨床医学に実績を持つ。各研究者はステロイドの臓器別作用と、注目を浴びつつも実体が不明な新規ステロイド作用経路の解明を分担し、主任研究者がそれらを総括する。本研究により申請者らが開発した genomic binding-site cloning 法やマイクロアレイ法、生化学的手法により新規ステロイド標的因子、共役因子、シグナル伝達因子、関連因子を探索・同定し、それら分子と新しいシグナル経路の機能解析を行い、老年病治療法開発のための分子標的としての可能性を示した。さらに、遺伝子改変動物、ウイルスベクターにより、老化・老年病モデル動物を創出し、抗老化、抗老年病の新しい診断・予防・治療法の開発、ゲノム創薬の可能性を探った。倫理面に配慮しつつ、老化と病的老化の本態を、ステロイド作用機序の観点から明らかにし、その老化制御作用を応用し老化、老年病の新たな創薬・治療法の開発により、国民の保健・健康・福祉を向上させ社会に貢献することを目指す。

分担研究者氏名：所属機関名及び所属機関における職名

秋下 雅弘

杏林大学

助教授

堺 隆一

国立がんセンター研究所

部長

池田 和博

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター

助手

近藤 宇史

長崎大学

教授

武山 健一

東京大学分子細胞生物学研究所

助手

柳澤 純

筑波大学

教授

津久井 通

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター

講師

A. 研究目的

高齢化社会の加速化に伴い、老化、老年病の予防、治療と健やかな加齢が社会的に強く求められている。老化とともに体内で変化する大きな因子としてステロイドがあげられ、特に不足したステロイドを補うことにより老化を制御できることが知られている。この方法を発展させ、健全な加齢を促し、抗老化、老年病予防、治療法の開発により、より豊かな長寿社会を実現できることが想定される。特に、性ステロイドは性分化、性機能の調節に必須であり、生殖系の老化を決める大きな因子であるばかりでなく個体の老化を制御する大きな要因でもあり、しかも各臓器の老化、すなわち骨代謝、血管細胞新生、脳代謝などの老化に随伴する生理現象にも深く関わっている。高齢者での

性ステロイドの低下、すなわち女性でのエストロゲン分泌低下、男性でのアンドロゲン分泌低下は、骨粗鬆症、動脈硬化症、アルツハイマー性痴呆をはじめとする老年病に密接に関与しており、その作用経路としてステロイド受容体を介する機序が主なものと考えられる。エストロゲンの受容体(ER)には従来知られているER α に加えて、新しい受容体ER β が発見され注目されている。アンドロゲンはそれによく似た構造を持つ受容体(AR)を介して働き、同じく老化と関連するグルココルチコイド受容体(GR)とともに、ステロイド受容体と総称される。老化における多彩なステロイド作用機序を知り、その抗老化作用、老年病における役割を明らかにするためには、各ステロイド受容体の組織特異的な発現と機能、情報伝達機構、ステロイド調節薬の作用機構の解明が不可欠である。本研究の狙いは、ステロイド作用の調節、受容体機能、関連相互作用、共役因子、シグナル伝達、下流標的因子群の性状を分子レベルで解明し、ステロイドならびその受容体の、個体の老化、臓器の老化、老年病における役割を明らかにし、老化、老年病の新しい予防、治療法を開発することにある。特に、未だ実体の明らかになっていない新たなステロイド作用経路を探索し、老化におけるステロイド作用機構の解明から、細胞増殖、分化制御、抗老化・老年病因子としての意義について明確にし、老化制御、老年病予防、治療法開発の新規標的とする。特に老化、老年病の新しい分子標的の探索・同定からその臨床応用を探る。本研究の意義は、これらステロイドの抗老化・老年病作用を分子レベルで明らかにし、病的老化に伴う老年病発症メカニズムの解明、新たな予防、治療法の開発、ゲノム創薬により、国民の保健・健康・福祉の向上を目指し、社会に貢献することにある。

B. 研究方法

(1) エストロゲン応答遺伝子 Efp の機能検索 (分担：井上)

mouse embryo、ヒト乳癌細胞株 MCF7、ヒト骨肉腫細胞株 MG63 由来の cDNA ライブラリーを用い Efp 全長を bait として Efp 結合蛋白をスクリーニングした。

Flag タグを付加した Efp、Myc タグを付加した Efp ならびに Efp の各ドメイン (RING ドメイン、B-Box-coiled-coil ドメイン、B-Box ドメイン、SPRY ドメイン) を 293T 細胞にリポフェクション法で一過性過剰発現を行い Efp とその全長ならびに各ドメインとの結合を免疫沈降法を用いて確認した。乳癌細胞株 MCF7 細胞に Flag タグを付加した Efp もしくは Myc タグを付加した RING ドメインを欠落した Efp をアデノウイルスを用いて過剰発現し、その時の両者の結合を免疫沈降法を用いて確認した。さらにその時の 14-3-3 σ の発現を Western blot 法により確認した。一方、乳癌細胞株 MCF7 細胞もしくは MDA-MB-231 細胞に Myc タグを付加した RING ドメインを欠落した Efp をアデノウイルスを用いて過剰発現したときの細胞周期の変化を FACS 解析を用いて行った。

(2) エストロゲン応答遺伝子 ERR α の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響ならびに骨芽細胞分化における発現変化に関する検討 (分担：井上)

ERR α の 3'下流領域における遺伝子多型に関して、Taqman PCR 法を用いて genotype の分類を行った。閉経後女性 372 人を対象として BMD との関連を検討した。

骨芽細胞は、10%FBS、50 mg/ml アスコルビン酸および 5 mM β -グリセロリン酸添加 α -MEM にて培養した。メディアウム交換を週二回のペースで行い、培養 2 日、4 日、6 日、16 日、19 日、24 日、30 日後に RNA を回収し、それぞれの時点での ER α 、ER β 、ERR α 、

アルカリホスファターゼ(ALP)遺伝子発現の変化を SYBR Green Real Time PCR 法にて解析した。

(3) エストロゲンによる骨形成制御機構に関する検討：骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の探索 (分担：井上)

エストロゲン応答遺伝子の探索は、以下の系を用いて行った。一つは、新生ラット頭蓋骨より採取した初代培養骨芽細胞を用い、活性型(constitutive active form)エストロゲンレセプター(ER) α 、 β それぞれをアデノウイルスを用いて過剰発現させ、感染後 12 時間、24 時間後の RNA を回収し、短期で発現が誘導されるエストロゲン応答遺伝子をマイクロアレイ法にて同定した。得られた遺伝子の実際の増加は、リアルタイム PCR 法で確認した。もう一つは、子宮頸癌由来細胞株である Hela に ER を恒常的に発現させた細胞を作製し、エストロゲン添加後 2 時間で発現誘導される遺伝子をマイクロアレイにてスクリーニング的に検索し、得られた遺伝子の中から骨芽細胞においてエストロゲンによる発現誘導を受けるものを選択した。

(4) ビタミン D3 応答遺伝子 p57^{Kip2} による骨形成制御機構に関する検討：p57^{Kip2} 過剰発現安定性形質発現骨芽細胞株を用いた p57^{Kip2} シグナル下流遺伝子の探索 (担当：井上)

ラット骨芽細胞様細胞株である UMR106 にリポフェクション法にて p57^{Kip2} 遺伝子を導入し G418 にて p57^{Kip2} 過剰を過剰発現した安定性形質発現株を作成した。Vector のみを導入した UMR106 をコントロールとし RNA を回収し、発現に差違のある遺伝子をマイクロアレイ法にて同定した。

(5) 血管平滑筋細胞(VSMC)および心筋線維芽細胞(CF)増殖における ER サブタイプの役割 (分担：秋下)

1) 細胞培養：ラット VSMC は酵素法により Wistar ラットの動脈から、ラット

CF は Wistar ラット胎仔心臓から従来の報告に従い得た。ヒト大動脈由来 VSMC は Clonetics 社より購入した。細胞は 10% ウシ胎児血清 (Intergen Co., Purchase, NY), 25mM HEPES (pH7.4) ペニシリン (100 U/ml), ストレプトマイシン (100 μ g/ml) を添加した Dulbecco's 変法 Eagle's 培地 (DMEM; Nikken Bio Medical Laboratory, Tokyo, Japan) にて、5% CO₂ インキュベーター内で 37°C で培養し、第 6-10 継代の細胞を使用した。また 17 β -estradiol (E2) を用いる実験では、dextran-coated charcoal にて処理しステロイドを除去した FBS (DCC-FBS) および弱いエストロゲン作用を有する phenol red を含まない DMEM (phenol red-free DMEM) を用いた。

2) ER を組み込んだアデノウイルスベクターの作成および細胞への感染: CMV-IE エンハンサー、ニワトリ β -アクチンプロモーターおよびヒト ER α 、ER β と ER β のドミナントネガティブ変異型を組み込んだ複製欠失型アデノウイルスベクターをアデノウイルス発現ベクターキット (Takara Shuzo Co. Kyoto, Japan) を用いて作成し、それぞれ以下、AxCAER α 、AxCAER β および AxCAERDN β と命名した。アデノウイルスの感染は、ウイルスをディッシュに応じた培養液量で 2 時間細胞に曝露させ、その後 phosphate-buffered saline (PBS) にて 1 回洗浄し培養液を交換後、各実験を行った。

3) RNA 単離、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) およびノーザンブロット法: total RNA を培養ラット VSMC、CF およびポジティブコントロールとしてラット卵巣から Isogen (和光純薬) を用いて調製した。total RNA の 1 μ g をランダムヘキサマーおよび MMLV 逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。そのうちの 50 ng を 0.5 U Taq ポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus), 0.4 μ mol/l 正および逆プライマーを加え、アニーリングの温度は

ER α では 55°C、ER β では 52°C で、それぞれ 35 サイクルで Perkin Elmer サーマルサイクラーを用いて増幅を行った。ネガティブコントロールは逆転写酵素を除いたサンプルとした。ER α および β のプライマー対は 277 塩基対 (bp) および 278 bp cDNA 断片を増幅するように設計した。ノーザンブロットでは、ランダムプライム法で標識した ³²P 標識ヒト ER α もしくは ER β プローブを用いた。

4) VSMC および CF の増殖: 増殖については、DNA 合成の指標としての [³H]-thymidine 取り込みと細胞数の算定により検討した。24-well プレート上に細胞を 70-90% コンフルエントまで培養し、phenol red-free RPMI1640 に置き換え、増殖停止させた。24 時間後、17 β -estradiol (E2; Sigma Aldrich) を含む 5% DCC-FBS で 24 時間刺激し、次いで [³H] thymidine 1 μ Ci/ml によるパルス標識を 3 時間行、取り込まれた [³H]-thymidine の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測した。6-well に細胞をまき、70-90% コンフルエントになるまで培養したところで phenol-red-free RPMI1640 に置き換え、24 時間増殖停止させた。5% DCC-FBS を含む phenol-red-free RPMI1640 に E2 または vehicle を添加したものに置き換え、さらに 48 時間培養した。細胞はトリプシン処理して懸濁させ、Coulter Counter を用いて細胞数をカウントした。

5) 遺伝子導入およびルシフェラーゼアッセイ: レポータープラスミドとして、ERE-TK-Luc レポータープラスミドおよびホタルルシフェラーゼレポーターベクターを使用した。VSMC もしくは CF へウイルス感染後、FuGENE6 (Roche) を用いて ERE-TK-Luc レポータープラスミドおよび pRL-SV40 コントロールプラスミドをプロトコールに従って細胞へ遺伝子導入を 24 時間 10% DMEM 中で行った。その後 PBS で培養液を洗浄し、続いて 1% phenol red-free RPMI1640 に交換し 24 時

間培養し、その後 E2 あるいは vehicle を含む 1% phenol red-free RPMI1640 に交換し 24 時間培養した。細胞を lysis buffer で溶かし回収し、プロトコールに従ってルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。

6) ウェスタンブロット法：VSMC もしくは CF を 10cm ディッシュ上にまきコンフルエント後、発現ウイルスベクターを感染させ、その後 PBS で洗浄し phenol red-free RPMI1640 で 24 時間培養した。RIPA バッファーに溶解させたサンプルは 12% SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロースメンブレンにブロットし、抗 ER α ポリクロナール抗体 (H-184, Santa Cruz) もしくは抗 ER β ポリクロナール抗体にて免疫ブロットを行い、ECL システム (Amersham) で検出した。

(6) 虚弱高齢男性における血中テストステロン濃度と日常生活機能 (秋下)

老人保健施設 (まほろばの郷、長野県塩尻市) に通所もしくは入所中の高齢男性 54 名 (70-95 歳、平均 82 \pm 6 (SD) 歳) を対象とした。悪性腫瘍、内分泌疾患、急性疾患、低栄養は除外した。一般血液検査に加え、血中総テストステロン、遊離テストステロン濃度を測定し、日常生活機能として基本的 ADL (Barthel Index)、手段的 ADL (Lawton & Brody)、認知機能 (改訂長谷川式, HDSR)、うつ (GDS)、意欲 (Vitality Index) との関係について解析した。尚、虚弱高齢男性を対象とした臨床研究は、杏林大学医の倫理委員会による承認を得て行った。

(7) エストロゲンの non-genomic 作用 (分担：堺)

エストロゲン受容体はその DNA 結合ドメインの両側に、比較的良く保存された 2 つの機能ドメイン AF-1 と AF-2 をもつ。膜移行したエストロゲン受容体の結合蛋白質を同定するためにこれらの AF-1 及び AF-2 ドメインを Flag タグと Src の膜移行シグナルを付加した形で発現ベ

クターによって当初は乳癌細胞株 MCF-7 細胞に発現させ、膜移行シグナルをつけないコントロールも含めて、各々複数の安定発現株を樹立した。

また AF-2 ドメインの C 末側、ER α では第 537 残基のチロシンはこれまでの報告で受容体のメインのチロシンリン酸化部位であることが示唆されるため、チロシンリン酸化状態やリン酸化依存的結合のコントロールとして、この部位をフェニアラニンに変えたコントロール (537F 変異体) も作成して、同様に発現細胞を調整した。AF-2 のチロシンリン酸化の状態を FLAG タグによる免疫沈降の後、抗リン酸化チロシン抗体にて確認した。また同じく FLAG による免疫沈降で、膜に局在させた AF-1 および AF-2 に特異的に結合する蛋白質群を検出し、可能な限り質量分析により同定した。AF-2 についてはその結合がチロシンリン酸化依存的であるかどうかを、537F 変異体と比較することにより明らかにした。同定された結合分子に関してはそれぞれの結合様式を明らかにした。具体的にはエストロゲン受容体の微細な変異体を作製し結合能を調べた。

更に神経細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞において、比較的大量の細胞を培養できるシステムを構築し、エストロゲン刺激による AF-2 のリン酸化や、エストロゲン受容体結合蛋白質群の解析を同様の手法により行う。

またエストロゲン刺激前後で Src ファミリーキナーゼの活性の変化や基質のリン酸化などを解析し、エストロゲン刺激により機能調節を受ける Src ファミリーキナーゼの有無について調べた。一方で AF-1 ないし AF-2 が欠損する変異型のエストロゲン受容体を膜特異的に過剰発現させることにより、それぞれの核外シグナルのみを止める dominant negative な効果をもたらす受容体蛋白質の発現ベクターを設計した。アデノウイルスベクター

を用いてこのような dominant negative 変異体を神経細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞などに発現させ、MAPK のリン酸化、NO 産生や破骨細胞機能の抑制などをマーカーにエストロゲンの生理作用がどのように修飾されるかについて解析した。

(8) エストロゲン受容体の負の調節因子 (分担：池田)

C 末端を欠きドミナントネガティブに ER の転写を抑制する ER β を用いて、酵母 two-hybrid スクリーニング法を行い、結合する因子をスクリーニングした。cDNA ライブラリーは内在性に ER α を発現しているヒト乳癌由来細胞株 MCF-7 をエストロゲン非存在下で培養したものより調整したものをを用いた。得られたクローンは PP5 (protein phosphatase 5) であったが、PP5 と ER α および ER β との結合様式を解析するため GST pull-down アッセイと哺乳類 two-hybrid アッセイ、培養細胞を用いた免疫沈降法によって解析した。PP5 の基質としての ER α の検討は ER α の 118 番目のセリン残基 (S118) のリン酸化に特異的な抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。すなわち、MCF-7 細胞を血清非存在下で培養することにより ER α のリン酸化レベルをバックグラウンドまで低下させ、そこへエストロゲンまたは EGF を添加し、その後の細胞抽出液を用いてセリン 118 番目のリン酸化レベルを検出した。また、PP5 の ER の転写活性に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイを用いて解析した。さらに、エストロゲン応答遺伝子のエストロゲン誘導性の発現における PP5 の影響を MCF-7 細胞にアデノウイルスベクターによって PP5 を過剰発現し、エストロゲンを添加後、total RNA を回収し、ノーザンブロットにて pS2、c-Myc、CycD1 遺伝子の発現量を定量した。

(9) エストロゲン受容体を介した心筋細胞保護作用におけるレドックス制御分子の役割 (分担：近藤)

1) コントロールとしてラット心筋細胞株 H9c2 を用いた。レドックスを制御するチオレドキシシンファミリーのグルタレドキシシン (GRX) 遺伝子を発現ベクターに結合させ導入した H9c2 細胞の GRX 高発現細胞株 (H9c2-GRX) を用いた。

2) エストラジオールを投与して細胞機能に及ぼす影響を検討した。即ち、過酸化水素による細胞障害を MTT アッセイ、DNA 障害を Tunnel 法で測定した。

3) エストラジオールが酸化ストレスによるアポトーシスを防御する機序を知る目的で、本ホルモンを投与して Bcl2 ファミリーや caspase などのアポトーシス関連因子の活性に及ぼす影響を免疫学的に測定した。

4) 最近当研究者らが GRX によって制御されることを明らかにした、アポトーシス制御因子である Akt 活性と Akt リン酸化を制御するプロテインフォスファターゼ (PP2A) 活性に焦点を当てて、エストラジオールによる抗アポトーシスの機構を明らかにする目的で検討した。

5) GRX の活性に必要なグルタチオンの濃度を酵素法で、その合成酵素 (GCS) の発現を Northern blot で測定し、それらに及ぼすエストラジオールの影響を検討した。

(10) ショウジョウバエを用いたエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体の機能解析 (分担：武山)

この項目においては、ショウジョウバエ分子遺伝学を用いた以下 4 つの独立した機能解析系を構築し遂行した。

1) ER α および AR 既知転写共役因子の分子遺伝学的相互作用解析

ER α 、AR ならびにこれらの変異体遺伝子をそれぞれ GAL4 応答遺伝子配列下流に構築したショウジョウバエを作出後、組織・時期特異的に発現する GAL4 系統と掛け合わせ特異的に発現させた。さらにこれらレセプターの認識応答配列 ARE と ERE の下流に構築した GFP を転写活

性評価のレポーターとなるトランスジェニックバエを作出した。最終的にこれら遺伝子を同一個体に導入し、全長ならびに AF-2 のリガンド依存的な転写活性を、AF-1 のリガンド非依存的な転写活性を検出した。これら転写活性は三齢幼虫種々器官や卵母細胞においてレセプター発現特異的に認められた。これらの結果はショウジョウバエ内在性転写共役因子がこれらレセプター転写活性を惹起すると予測された。そこで、既知ヒト転写共役因子のハエホモログ遺伝子欠損変異体 (CBP, p160, TRAP80, TRAP100) を用いて、転写活性を検討した。これらの解析系はヘテロ接合体であるため dsRNAi 法により同様に転写活性を確認した。

2) ER α および AR 新規転写共役因子の分子遺伝学的探索

ER α および AR 発現ショウジョウバエを用いた転写共役因子群の分子遺伝学的な探索は数千種におよぶ各種遺伝子変異型ショウジョウバエとの交配により核内レセプター転写活性の変動を指標に網羅的な探索を行った(図 1)。転写強弱を示したハエ変異体から変異遺伝子を同定した後、相同性の高いヒトホモログ遺伝子を単離した。単離した遺伝子は HEK293T 細胞において ER α および AR と同時に過剰発現させ、それぞれレセプターの転写活性をルシフェラーゼアッセイにより検討した。

3) 染色体構造変換を介した転写共役因子の機能解析系の構築

転写共役因子の染色体構造調節機能を指標に個体レベルで遺伝子同定する手法には、ショウジョウバエで唯一、ヘテロクロマチンおよびユークロマチン状態と転写頻度との相関関係を示す Position Effect Variegation (PEV) 解析が可能である。取得因子の機能には転写開始や終息因子をはじめ転写伸長、ヒストン修飾、クロマチンリモデリング等機能を単離できると推測される。ER α および AR 応答配列

を含む GFP レポーター遺伝子を様々な染色体領域に導入した。これらレポーター遺伝子がヘテロクロマチンおよびユークロマチンへ挿入したことを確認後、レセプターによる転写活性の変動を確認した。さらにこの条件下、既知転写共役因子変異体による転写活性の影響を検討し、転写開始の必要性を検討した。

4) アンドロゲン依存的神経変性発症の分子機構解明

アンドロゲン依存的に神経変性を誘導する SBMA モデルショウジョウバエ複眼での神経変性を指標に神経変性制御因子の探索、性状解析が可能となる(図 1)。また加齢に伴い変性状態が亢進する表現系は、老化による神経衰退機構を解明する手掛かりになると期待される。そこで約 1000 系統の遺伝子変異体と SBMA モデルショウジョウバエとを交配し、個眼細胞における神経変性を指標に遺伝子を検討した。単離した遺伝子は AR への特異性を検討するためポリグルタミン伸長異常した AR との直接的相互作用を確認した。

(11) 脳におけるエストロゲンの non-genomic 作用 (分担: 柳澤)

1) エストロゲンによる IGF-1 受容体の活性化

脳においてエストロゲンと増殖因子である IGF-1 の間に機能的相互作用が存在することが知られている。IGF-1 は細胞表面上の IGF-1 受容体に結合し、IGF-1 受容体のリン酸化を促す。そこで、エストロゲン依存的に IGF-1 受容体がリン酸化を受けるか否かを検討した。IGF-1 受容体と ER α をともに発現している MCF-7 細胞をエストロゲン(10^{-8} M)存在下と非存在下において培養し、回収した後ホモジナイザーで破碎することによって抽出液を作製した。この抽出液から抗 IGF-1 受容体抗体を用いて IGF-1 受容体を免疫沈降し、抗リン酸化抗体を用いてイムノブロットを行った。

2) エストロゲンによる MAP キナーゼと Akt の活性化

IGF1 受容体の下流には MAP キナーゼおよび Akt が存在し、IGF-1 受容体の活性化によって MAP キナーゼと Akt もリン酸化され活性化される。そこで、エストロゲンによる IGF-1 受容体のリン酸化にともない MAP キナーゼと Akt がリン酸化を受けるか否かを検討した。MCF-7 細胞をエストロゲン存在下、非存在下でそれぞれ培養し、細胞を回収後ホモジナイズにより破碎し、細胞抽出液を調整した。この細胞抽出液から MAP キナーゼ、Akt をそれぞれ特異的な抗体を用いて免疫沈降し、リン酸化抗体を用いてイムノブロットを行った。

3) 細胞質における ER α の局在

IGF-1 受容体がエストロゲン刺激によってリン酸化を受けること、エストロゲン依存的 IGF-1 受容体の活性化がエストロゲン添加後 15 分程度の短時間で起きることから、この過程には細胞質に存在する ER α が関与しているものと考えられる。そこで、エストロゲン添加時における ER α の細胞質での局在を検討した。

MCF-7 または HeLa 細胞に GFP と融合した ER α を発現させ、エストロゲン未添加の状態と添加後 15 分で細胞内の GFP-ER α の局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

4) IGF-1 受容体と ER α との相互作用の解析

ER α はエストロゲン添加後 15 分以内に細胞膜上に移動する。エストロゲン刺激後 15 分で IGF-1 受容体がリン酸化されることを考えあわせると、ER α はエストロゲン依存的に IGF-1 受容体と相互作用する可能性が考えられた。そこで、MCF-7 細胞にエストロゲンを添加し、細胞を回収後破碎して調整した細胞抽出液から抗 IGF-1 受容体抗体を用いて IGF-1 受容体を免疫沈降した。免疫沈降物を SDS-PAGE にて分離し膜にブロットした

後、抗 ER α 抗体で ER α を検出した。

5) IGF-1 受容体遺伝子欠損細胞に対するエストロゲンの作用

エストロゲンによる MAP キナーゼ、Akt の活性化は IGF-1 受容体を介しているものと考えられた。そこで、IGF-1 受容体遺伝子欠損マウスの線維芽細胞を株化した R-細胞を用い、エストロゲンへの応答性を検討した。IGF-1 受容体を発現している R+細胞と発現していない R-細胞をそれぞれ培養し、エストロゲンを添加後、細胞を回収・破碎し、抗 MAP キナーゼ抗体、抗 Akt 抗体を用いて MAP キナーゼ、Akt を免疫沈降した。沈降した MAP キナーゼ、Akt を抗リン酸化抗体を用いてブロッティングし、リン酸化状態を検討した。

6) エストロゲン依存的に ER α と相互作用する細胞質蛋白質因子の単離と同定

IGF-1 受容体の発現していない R-細胞においてもエストロゲン依存的な MAP キナーゼと Akt の活性化が認められたことから、IGF-1 受容体以外にも ER α と結合する膜局在蛋白質が存在する可能性が示唆された。そこで、大腸菌を用いて GST-ER α カラムを大量に調整し、GST-ER α カラムを作製した。このカラムにエストロゲン存在下または非存在下でマウス脳の細胞質および膜抽出画分をアプライし、エストロゲン依存的に結合した各分を SDS-PAGE にて分離した後、TOF-MS を用いた Mass fingerprinting によって同定した。

(12) 老化と老年病の疾患モデル動物の開発 (分担：津久井)

1) エストロゲングレシナルにおける生体作用機構

エストロゲンレセプターは 2 種類 (ER α および ER β) 存在し、その生理作用について類似・相違性について未だ明確な報告がなく、ER α と ER β がお互いにオートクライン的に発現量、またはダイマー形成により転写因子としての作用を

制御する可能性も考えられる。エストロゲン特異的シグナルを検討するには、KO マウスを検討することが重要と思われるが、より顕著に特異的なエストロゲンの生体作用を見るためにリガンド非依存型エストロゲンレセプター (caER α および caER β) のコンディショナルトランスジェニック (cTg) マウスおよび組織特異的プロモーター/Cre 作製・交配させることにより、標的臓器のみでリガンド非依存的に ER β シグナルのみを活性化することが可能である。さらに、ER α KO (ER β シグナルのみ存在) マウスを利用することにより、ER のシグナル特異性とその生体作用の特異性についても検討することが可能と考える。つまり、今まで不明瞭であった標的臓器での [1] エストロゲン (ステロイド) \Rightarrow [2] ER α /ER β の特異性およびその作用メカニズムについて詳細に検討し、エストロゲンシグナル経路の特異性について、生体内で生理作用および作用メカニズムについて検討をおこなう。

2) エストロゲン下流応答遺伝子の検索および発現プロファイリング

ER の下流応答遺伝子群について DNA マイクロアレイにおいて候補遺伝子群を既に得ており、これらの遺伝子群に関して再現性・エストロゲン応答性を検討するために、エストロゲン付加後に発現量の変化についてリアルタイム PCR 法により検討を行った。さらに、特にエストロゲン標的臓器を中心にマウス個体における組織切片で 3 次元的位置情報を検討するため、*in situ* hybridization (ISH) 法により発現プロファイルの検討を行う。これらの下流遺伝子群を吟味・検討しエストロゲン下流応答遺伝子群の遺伝子改変マウスの作製を行う。

3) 下流応答遺伝子群の生体作用、予防・診断・治療法への応用

1) で作製したエストロゲン下流応答遺伝子の遺伝子改変マウスに組織特異的

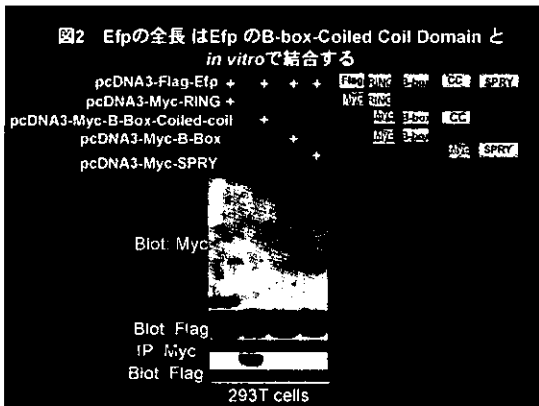
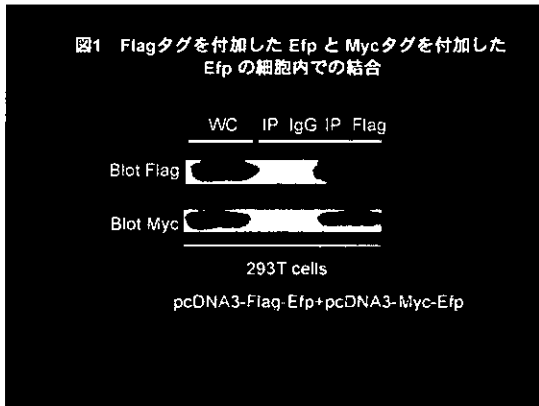
/Cre マウスを交配し、卵巣または精巣摘出を施し、性ステロイドホルモンの作用を排除して、これらの摘出処理にともなう生理作用および作用メカニズムについて検討を行う。また、下流応答遺伝子の生体生理作用およびリスクについて検討するために、受精卵 2 細胞後期から発現が知られている CAG (β -actin/CMV-IE) プロモーター/Cre マウスを交配して下流応答遺伝子が過剰発現される条件を実験系により作製し、下流応答遺伝子の生体での生理作用の解析、および副作用について評価する。また、これらのエストロゲン下流応答遺伝子が発現することにより引き起こされる生体作用について検討するとともに、他のステロイドホルモンシグナルとのクロストークについても併せて検討する。

以上、1)~3)へと段階的に研究計画を遂行し、本研究課題である老化と老年病の疾患モデル動物の開発とその応用について検討することにより、作用メカニズムが明確で非リガンド性物質であり、かつ副作用の少ないステロイドシグナル経路を分子標的とした新しい老年病の予防・治療法への応用できる因子の同定を目指し、研究を推進していく。

C. 研究結果

(1) エストロゲン応答遺伝子 Efp の機能検索

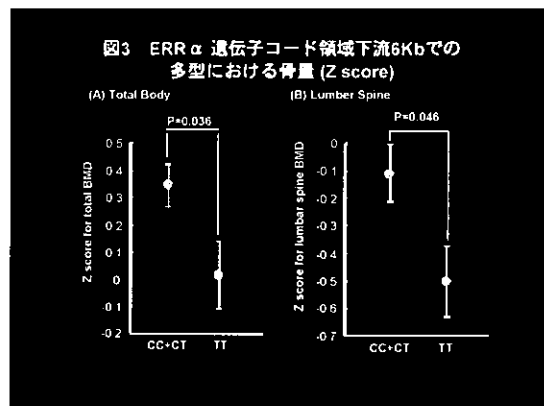
Efp 結合蛋白に関して 2 ハイブリッド法を用いて検討を行った結果多数のユビキチンと乳癌細胞株である MCF7 由来の cDNA ライブラリーから Efp そのものがクローニングされた。この結果を確認するため細胞内に異なる Tag を付加させた Efp を過剰発現させることにより Efp が 2 量体以上の複合体形成を行うことを証明した(図 1)。さらに Efp の各ドメインのみを発現させ Efp 全長との結合を検討したところ B-Box-Coiled-coil ドメインと



結合することが明らかとなった。(図2)。EfpはN末端に位置するRING fingerドメインを欠落させると蛋白分解酵素活性が消失することをすでに主任研究者らは明らかにしている(Urano et al., Nature 2002)。このRINGフィンガーを欠落させたEfpを過剰発現させると全長のEfpと複合体形成を行い、さらにEfpが行う14-3-3 σ の蛋白分解を抑制し、ドミナントネガティブ効果により、MCF7やMDA-MB-231といった乳癌細胞の増殖抑制を誘導することを示した。

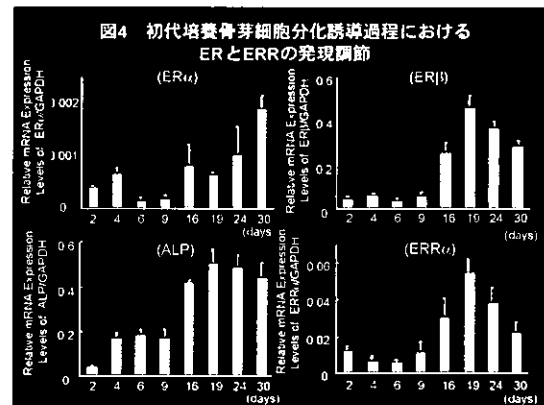
(2) エストロゲン応答遺伝子ERR α の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響ならびに骨芽細胞分化における発現変化に関する検討

Estrogen Receptor Related Receptor α (ERR α)の遺伝子コード領域の下流約6 kbに存在するSNPに関して、Cアレルを持つ群(CC+CT; n=240)では持たない群(TT; n=75)に比べ有意に骨密度が高いことを見出した(Total BMD Z score; 0.344 vs 0.014; p=0.036, Lumbar Spine BMD Z score;



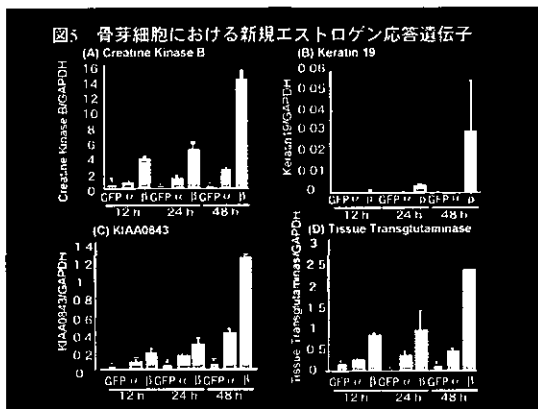
-0.108 vs -0.503; p=0.046) (図3)。

また初代培養骨芽細胞を用いてERR α のmRNAでの発現の変化をRT-PCRで検討したところERR α ならびにERR β の発現のピークと一致する培養開始後15-20日において発現のピークとなることが明らかとなった(図4)。



(3) エストロゲンによる骨形成制御機構に関する検討：骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の探索

骨芽細胞においてエストロゲンによる発現誘導をうける遺伝子として得られたのは、Creatine Kinase B、Keratin 19、Rat Similar to KIAA0843 protein、Tissue Transglutaminaseの4遺伝子であった。これらは、活性型ER α 、 β により、発現の増加が認められ、ER α 、 β 共通の応答遺伝子であることが示唆された(図5)。Creatine Kinase Bは、骨芽細胞においてエストロゲンにより発現制御を受けることが既に報告されている遺伝子であり、分化、増殖の際のエネルギー代謝に関与していることが示唆されるものである。



Keratin 19 および KIAA0843 protein は骨芽細胞での発現やエストロゲン応答の有無に関する過去の報告はなく、今回のことによって得られた新規の骨芽細胞でのエストロゲン応答遺伝子であった。Tissue Transglutaminase は、骨芽細胞で発現していることは報告されているが、骨芽細胞でエストロゲンにより発現が促進されることは、本研究により新たに見出された。

(4) ビタミン D3 応答遺伝子 $p57^{Kip2}$ による骨形成制御機構に関する検討

骨芽細胞様細胞株である UMR106 に $p57^{Kip2}$ を過剰発現させた安定性過剰発現株を作製した。RNA を採取し $p57^{Kip2}$ を過剰発現させたことにより発現増加 (表 1) ならびに減少が誘導される遺伝子 (表 2) をマイクロアレイ法を用いてリストアップした。

(5) 血管平滑筋細胞(VSMC)および心筋線維芽細胞(CF)増殖における ER サブタイプ役割

1) VSMC における ER サブタイプの増殖抑制作用

RT-PCR 法により、ラット VSMC で ER α および ER β の両サブタイプが内因性に発現していることを確認した。次に、ERE レポータープラスミドのルシフェラーゼ活性の内因性 ER による転写活性を、E2 の VSMC 増殖抑制作用については DNA 合成能をそれぞれ検討した。E2 は vehicle に比べ ERE レポータープラスミドのルシフェラーゼ活性を約 3 倍高め、そして VSMC の増殖を用量依存的に 10%

程度まで抑制した。

次に、アデノウイルスを用いて ER サブタイプを過剰発現して同様の実験を行った。ノーザンおよびウエスタンブロットでは、内因性の ER サブタイプ発現は検出できなかったのに対し、感染させた VSMC では MOI に依存して遺伝子およびタンパクの発現レベルが著明に増加した。AxCALacZ を VSMC に感染させると、DNA 合成は 30 MOI 以上では用量依存的に減少した。そこで、アデノウイルスが DNA 合成に影響しない 30 MOI 以下で検討を行った。AxCAER α を感染させた VSMC では DNA 合成の抑制作用は E2 の存在にかかわらず増強効果は 30 MOI でわずかに認める程度であった。対照的に、AxCAER β を感染させた VSMC では、5 MOI 以上では E2 の存在下で DNA 合成の抑制作用は増強し、10 MOI では約 50% 減少させた。これに並行して、48 時間 5% DCC-FBS で刺激した VSMC 細胞数の増加は、AxCAER β で感染させた VSMC では E2 の存在下で 10 および 30 MOI にて減少を認めたが、AxCALacZ または AxCAER α で感染させた VSMC においては減少を認めなかった。また、10 MOI の AxCAER β を感染させた VSMC では 0.01 nmol/L という低濃度の E2 においても、DNA 合成は有意に抑制された。一方、この作用は AxCAER α で感染させた VSMC ではほとんど認められなかった。さらに、AxCAER β を感染させた VSMC での抑制作用は AxCAERDN β の共感染で用量依存的に減弱した。VSMC 増殖抑制作用における ER α と ER β のヘテロ二量体化の効果を検討するために、AxCAER α 及び AxCAER β で感染した VSMC において thymidine の取り込みを測定したが、拮抗作用は認められなかった。同様にヒト VSMC を用いて行った増殖実験では、やはり AxCAER β を感染させた場合にのみ増殖抑制の増強効果を認めた。

表1 マイクロアレイ法により明らかになった

p57^{kip2} 過剰発現 UMR106 細胞で発現が増加する遺伝子

1041	86	12.088	CORS26	similar to Mouse collagenous repeat-containing sequence of 26kDa protein (CORS26) mRNA, complete cds.
1359	168	8.057	Mgst1	Rattus norvegicus microsomal glutathione S-transferase 1 (Mgst1), mRNA.
3602	484	7.437	Osteopontin	Rattus norvegicus secreted phosphoprotein 1 (Spp1), mRNA.
273	36	7.407	SOX2	similar to Protein:NP_035573 SRY-box containing gene 2
1325	238	5.55	CTGF	Rattus norvegicus connective tissue growth factor (Ctgf), mRNA
722	136	5.307	Serp1b7	Rattus norvegicus serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7 (Serp1b7), mRNA.
519	99	5.236	GB BE105480 	Rat H4 gene for somatic histone H4.
2429	478	5.077	GB NM_012940 	Rattus norvegicus Cytochrome P450 1b1 (Cyp1b1), mRNA.
411	86	4.738	GB NM_031689 	Rattus norvegicus crystallin, beta A4 (Cryba4), mRNA.
602	129	4.647	GB NM_153737 	Rattus norvegicus uterine sensitization-associated gene 1 protein (Usag1), mRNA.
1040	226	4.59	GB BQ190716 	similar to Protein:NP_032176 glypican 4 [Mus musculus], score=1.089e-14
251	55	4.509	GB BQ202074 	SPT2_MOUSE Kunitz-type protease inhibitor 2 precursor (Hepatocyte growth factor activator inhibitor), mRNA
1179	264	4.464	GB NM_144755 	Rattus norvegicus kinase (LOC246273), mRNA.
8131	1841	4.415	GAS5	Rattus norvegicus gas-5 growth arrest homolog non-translated mRNA sequence.
3528	802	4.395	Cryab	Rattus norvegicus Crystallin, alpha polypeptide 2 (Cryab), mRNA.
1922	443	4.339	GB Y10056 	Calgizzarin (Endothelial monocyte-activating polypeptide) (EMAP)
389	91	4.27	GB NM_053606 	Rattus norvegicus Matrix metalloproteinase 23 (Mmp23), mRNA.
6872	1698	4.046	GB NM_017139 	Rattus norvegicus preproenkephalin, related sequence (Penk-rs), mRNA.
508	131	3.879	GB NM_019153 	Rattus norvegicus fibulin 5 (Fbln5), mRNA.
4799	1267	3.786	GB BM392037 	similar to Mouse mRNA for ATFx, partial cds.
8093	2145	3.773	Fibronectin1	Rattus norvegicus Fibronectin 1 (Fn1), mRNA.
2457	653	3.758	GB B1287856 	similar to Mouse SNAG1 (Snag1) mRNA, complete cds.
9346	2512	3.72	GB NM_012904 	Rattus norvegicus Annexin 1 (p35) (Lipocortin 1) (Anx1), mRNA.
872	239	3.643	GB BF284799 	similar to Mouse epsilon-sarcoglycan mRNA, complete cds.
352	97	3.63	Cktsf1b1	Rattus norvegicus cysteine knot superfamily 1, BMP antagonist 1 (Cktsf1b1), mRNA.
476	132	3.597	GB AA892348 	Rat cytochrome P-450 isozyme 5 (P450 IVB2) mRNA, complete cds.
1802	508	3.546	GB BQ208680 	similar to mouse LIM and cysteine-rich domains 1, clone MGC:29184 IMAGE:5007525, mRNA, complete cds.
1102	313	3.516	Osteoactivin	Rattus norvegicus glycoprotein (transmembrane) nmb (Gpnm), mRNA.
4388	1256	3.491	GB NM_031549 	Rattus norvegicus Transgelin (Smooth muscle 22 protein) (Tagln), mRNA.
2216	644	3.44	GB NM_030847 	Rattus norvegicus epithelial membrane protein 3 (Emp3), mRNA.
2217	882	3.368	GB B1285124 	similar to C.longicaudatus genes for histones H2a.2 and H3.2.
698	210	3.317	Elfin	Rattus norvegicus PDZ and LIM domain 1 (elfin) (Pdlim1), mRNA.
353	107	3.3	GB NM_012598 	Rattus norvegicus Lipoprotein lipase (Lpl), mRNA.
145	44	3.231	Murf	similar to Mouse RING-finger protein MURF mRNA, complete cds.
2838	897	3.162	GB B1303648 	similar to Mouse lymphotoxin-beta receptor gene, putative promoter and exons 1,2,3,4,5 and 6, partial cds.
468	149	3.124	GB NM_019189 	Rattus norvegicus cartilage link protein 1 (Crtl1), mRNA.
3904	1253	3.114	GB NM_024403 	Rattus norvegicus activating transcription factor ATF-4 (Atf4), mRNA.
954	307	3.102	GB NM_017073 	Rattus norvegicus Glutamine synthetase (glutamate-ammonia ligase) (Glul), mRNA.
555	181	3.068	GB BE104224 	Rattus norvegicus alpha-mannosidase II mRNA, partial cds.
1743	574	3.036	GB NM_013413 	Rattus norvegicus Relaxin 1 (H1) (Rln1), mRNA.
1885	622	3.028	GB NM_030873 	Rattus norvegicus profilin II (Pfn2), mRNA.
877	290	3.021	GB NM_012679 	Rattus norvegicus Clusterin (Clu), mRNA.
2135	707	3.019	GB NM_024134 	Rattus norvegicus DNA-damage inducible transcript 3 (Ddit3), mRNA.
274	91	2.989	PP2C-beta	Rattus norvegicus similar to Protein phosphatase 2C beta isoform (PP2C-beta) (LOC292690), mRNA
2252	754	2.986	GB BM392398 	similar to Mouse lysosomal thiol reductase IP30 precursor, mRNA, partial cds.
388	130	2.978	MSX1	Rattus norvegicus homeo box, msh-like 1 (Msx1), mRNA.
6440	2165	2.974	GB BG665153 	similar to Mouse, calyculin binding protein, clone MGC:38013 IMAGE:5150537, mRNA.
2461	831	2.959	CD48	Rattus norvegicus CD48 antigen (Cd48), mRNA.
2625	890	2.948	GB BQ191871 	similar to Mouse mRNA for p50b (identical to LSP1 and pp52), complete cds.
2088	710	2.94	GB AW251358 	R.norvegicus mRNA for laminin gamma 1.
1247	427	2.915	GB B1303389 	similar to Mouse acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACACT) mRNA, complete cds.
8720	2999	2.907	GB NM_053576 	Rattus norvegicus hyaluronidase 2 (Hyal2), mRNA.
2803	968	2.894	GB AW251358 	R.norvegicus mRNA for laminin gamma 1.
411	143	2.871	GB BU759691 	Transmembrane 4 superfamily, member 1 (Tumor-associated antigen L6)
39682	13836	2.868	RAN	Rattus norvegicus RAN, member RAS oncogene family (Ran), mRNA.
1959	695	2.82	GB BG378761 	similar to Mouse arsenite inducible RNA associated protein (Airap) mRNA, complete cds.
1570	558	2.81	GB A1385133 	similar to Mouse h2-calponin cDNA.
9714	3462	2.806	GB NM_012857 	Rattus norvegicus Lysosomal associated membrane protein 1 (120 kDa) (Lamp1), mRNA.
18756	6774	2.769	GB NM_145878 	Rattus norvegicus fatty acid binding protein 5, epidermal (Fabp5), mRNA.
13620	5074	2.684	GB NM_031136 	Rattus norvegicus thymosin beta-4 (Tmsb4x), mRNA.
27669	10315	2.682	GB NM_013067 	Rattus norvegicus Ribophorin I (Rpn1), mRNA.
44447	16877	2.633	GB BQ207888 	similar to Translation of nuc
53023	21663	2.448	GB NM_053867 	Rattus norvegicus tumor protein, translationally-controlled 1 (Tpt1), mRNA.
39242	16142	2.431	GB BQ207888 	similar to Translation of nuc
14798	6214	2.381	GB A1412405 	similar to Translation of nuc
16870	7095	2.377	GB NM_053290 	Rattus norvegicus Phosphoglycerate mutase 1 (Pgam1), mRNA.
60037	25388	2.365	GB NM_022402 	Rattus norvegicus acidic ribosomal protein P0 (Arbp), mRNA.
14843	6340	2.341	GB NM_012992 	Rattus norvegicus Nucleoplasmin-related protein (Nuclear protein B23 (Npm1), mRNA.
11961	5142	2.326	GB NM_031114 	Rattus norvegicus S-100 related protein, clone 42C (S100A10), mRNA.
10850	4781	2.269	GB NM_031629 	Rattus norvegicus proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 4 (Psm4), mRNA.
16552	7384	2.242	GB NM_130401 	Rattus norvegicus membrane-associated protein 17 (Map17), mRNA.
34991	15629	2.239	GB NM_031687 	Rattus norvegicus ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 (Uba52), mRNA.
14200	6353	2.235	GB NM_022592 	Rattus norvegicus transketolase (Tkt), mRNA.
31665	14359	2.205	GB NM_031151 	Rattus norvegicus malate dehydrogenase mitochondrial (Mor1), mRNA.
17347	7946	2.183	GB NM_033235 	Rattus norvegicus Malate dehydrogenase-like enzyme (Mdh1), mRNA.
32890	15074	2.182	GB NM_012848 	Rattus norvegicus Ferritin subunit H (Fth1), mRNA.
16211	7753	2.091	GB NM_053800 	Rattus norvegicus thioredoxin (Txn), mRNA.
12350	6033	2.047	GB NM_019360 	Rattus norvegicus cytochrome oxidase subunit VIc (Cox6c), mRNA.
25524	12680	2.013	GB NM_022179 	Rattus norvegicus Hexokinase 3 (Hk3), mRNA.

表2 マイクロアレイ法により明らかになった
p57^{kip2} 過剰発現 UMR106 細胞で発現が減少する遺伝子

34	267	0.129	GB AA901064	similar to Protein:NP_083234 TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase II,
27	157	0.175	GB NM_031705	Rattus norvegicus dihydropyrimidinase (Dpys), mRNA.
342	1851	0.185	GB CB548005	similar to Translation of nuc
35	173	0.207	GB NM_130403	Rattus norvegicus protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14a (Ppp1r14a), mRNA
20	82	0.251	GB CB544605	Rattus norvegicus similar to mannosidase, beta A, lysosomal (LOC310864), mRNA
182	679	0.268	MTIE	Rat metallothionein-2 and metallothionein-1 genes, complete cds.
121	448	0.271	GB NM_017200	Rattus norvegicus tissue factor pathway inhibitor (Tfpi), mRNA.
33	112	0.293	GB BM385982	similar to Mouse, clone IMAGE:3498302, mRNA, partial cds.
48	165	0.293	GB NM_139326	Rattus norvegicus Proopiomelanocortin, beta (endorphin, beta) (Pome2), mRNA.
168	574	0.293	GB NM_172333	Rattus norvegicus collagen triple helix repeat containing 1 (Cthrc1), mRNA.
23	71	0.328	GB NM_022209	Rattus norvegicus BRbeta B-regulatory subunit of protein phosphatase 2A (LOC60660), mRNA.
19	58	0.33	GB NM_133562	Rattus norvegicus phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate 5-phosphatase, A (Pib5pa), mRNA.
1052	3139	0.335	GB NM_053605	Rattus norvegicus sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral (Smpd3), mRNA.
320	941	0.34	GB NM_030834	Rattus norvegicus monocarboxylate transporter (Mct3), mRNA.
60	177	0.343	GB NM_053704	Rattus norvegicus Bcl2-interacting killer-like (Biklk), mRNA.
23	65	0.356	GB BG665929	similar to small GTPase RAB6B
27	76	0.363	GB NM_032616	Rattus norvegicus liver-specific bHLH-Zip transcription factor 7 (Lisch7), mRNA.
124	338	0.367	GB BU758443	similar to Mouse, a disintegrin and metalloprotease domain 8, clone MGC:36123 IMAGE:5324943, mRNA, complete cds.
33	89	0.369	GB BF564580	unknown function
34	91	0.376	GB BI275705	Rat mRNA for glycerol 3-phosphate dehydrogenase, complete cds.
158	414	0.383	Trbm	Rattus norvegicus thrombomodulin
1285	3279	0.392	GB NM_053573	Rattus norvegicus olfactomedin related ER localized protein (Olfm1), mRNA.
26	66	0.394	Axl (receptor of GAS6)	A41527 protein-tyrosine kinase (EC 2.7.1.112) axl precursor
24	62	0.395	GB NM_017159	Rattus norvegicus histidine ammonia lyase (Hal), mRNA.
230	578	0.399	CD2	Rattus norvegicus OX-45 surface antigen, homolog to human T lymphocyte CD2 antigen (Cd2), mRNA.
96	238	0.405	GB AA893984	similar to Mouse CYFIP2 mRNA, complete cds.
214	524	0.408	GB AA964489	Rattus norvegicus C-CAM4 mRNA, complete cds.
34	83	0.415	GB BG376982	similar to Mouse Dp111 mRNA for polyposis locus protein 1-like 1 (TB2 protein-like 1), complete cds.
27	65	0.424	OPHN1	similar to Protein:NP_443208 oligophrenin 1, Rho-GTPase activating protein
95	219	0.434	GB NM_020074	Rattus norvegicus proteoglycan peptide core protein (Pgs), mRNA. AMGNNUC:ARG11-073480-CYA
26	60	0.437	GB CB544526	unknown function
453	1028	0.44	GB NM_053714	Rattus norvegicus progressive ankylosis (Ank), mRNA.
52	118	0.442	GB BF556399	similar to Unknown (protein for MGC:23936)
92	209	0.442	GB BF291027	similar to Mouse complement component C5D (pro-C5D) mRNA, complete cds.
27	62	0.444	GB CB548290	similar to Protein:NP_598895 RIKEN cDNA 2510002C16 [Mus musculus].
64	144	0.448	Neurturin	Neurturin precursor
34	76	0.45	GB NM_023969	Rattus norvegicus putative G protein-coupled receptor snGPCR32 (Edg7), mRNA.
172	382	0.451	GB A1575272	similar to Mouse chromosome 11a2 clone rp21-493n6 strain 129S6/SvEvTac, complete sequence.
26	57	0.453	GB CB545555	similar to Protein:NP_003655 adaptor-related protein complex 3, beta 1 subunit; beta3A-adaptin;
226	495	0.457	GB NM_053539	Rattus norvegicus isopentenyl-diphosphate delta isomerase (Idi1), mRNA.
182	393	0.464	GB A1172217	similar to evidence:NAS-hypothetical protein-putative
26	56	0.465	GB NM_053904	Rattus norvegicus 5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing) (Oplah), mRNA. AMGNNUC:ARG11-069169-CYA AMGNNUC:NM_053904 1 Rattus norvegicus 5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing) (Oplah), mRNA.
27	59	0.465	GB CB548459	similar to Protein:NP_613069 expressed sequence A1481216 [Mus musculus]. score=1.012e-35
27	59	0.465	GB NM_053912	Rattus norvegicus pleckstrin homology, Sec7 and coiled/coiled domains 3 (Pscd3), mRNA.
27	58	0.471	GB CB545510	similar to Protein:NP_033556 X-linked nuclear protein; alpha thalassemia/mental retardation syndrome (X-linked) [Mus musculus]. score=1.28e-29
26	55	0.477	Notch1	R.rattus mRNA homologue of Drosophila notch protein.
27	57	0.477	GB NM_053811	Rattus norvegicus solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator 2 (Slc9a3r2), mRNA.
67	141	0.477	GB CB545511	similar to Protein:NP_083001 RIKEN cDNA 4632417N05 [Mus musculus]. score=2.949e-49
41	86	0.481	GB NM_031027	Rattus norvegicus dihydropyrimidine dehydrogenase (Dpyd), mRNA.
26	54	0.483	GB NM_012844	Rattus norvegicus Epoxide hydrolase 1 (microsomal xenobiotic hydrolase) (Ephx1), mRNA.
38	79	0.486	GB NM_031648	Rattus norvegicus FXD domain-containing ion transport regulator 1 (Fxyd1), mRNA.
53	110	0.486	GB A1171466	unknown function
26	53	0.49	GB BF524977	unknown function
33	67	0.492	GB NM_053949	Rattus norvegicus potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2 (Kcnh2), mRNA.
31	64	0.493	GB NM_031686	Rattus norvegicus sodium channel, voltage-gated, type 6, alpha polypeptide (Scn6a), mRNA.
106	215	0.493	GB A1227731	unknown function
30	60	0.5	GB BI275669	similar to Mouse, clone MGC:35667 IMAGE:5323841, mRNA, complete cds.
30	60	0.5	GB CB544983	similar to Translation of nuc:BC030850_1 Mus musculus. Similar to unc-51-like kinase 1 (C. elegans), clone IMAGE:4165582, mRNA, partial cds. score=9.784e-45
30	60	0.5	Robo1	Rattus norvegicus roundabout homolog 1 (Drosophila) (Robo1), mRNA.
59	118	0.5	GB A1228076	similar to Mouse DNA sequence from clone RP23-22K4 on chromosome 2, complete sequence.

COS-7 細胞に非感染あるいは AxCALacZ を感染させた場合、ER の転写活性は E2 の添加によって変化しなかった。しかし、AxCAER α および AxCAER β を感染させると、E2 存在下で ER の転写活性は以前示した研究と同様に増加した。以上のことからアデノウイルスベクターにより過剰発現させた ER α または ER β は転写因子として機能することを確認した。そこで、同様に VSMC \rightarrow ER を過剰発現させたときに、転写活性を加算的に増加させるかどうかを検討した。その結果、10 MOI にて AxCAER α または AxCAER β を感染させた VSMC における転写活性は若干増加し、AxCADNER β の共感染にて活性はほぼ完全に消失した。

2) CF における ER サブタイプの増殖抑制作用

ラット CF における内因性の ER の発現を検討するために RT-PCR 法にて検討し、ER α および ER β ともに発現を認めた。次に、CF の細胞増殖に対する E2 の作用を検討するために DNA 合成を検討したところ、生理的濃度 (~ 100 nmol/L) の E2 は CF の増殖を最大で約 10% 抑制した。

AxCALacZ を 60 MOI 以上で感染させると MOI 依存性に DNA 合成を抑制させた。したがって、アデノウイルス自身による DNA 合成に対する影響を受けない 60 MOI 以下で DNA 合成を検討した。AxCALacZ を感染させた CF では E2 による DNA 合成の抑制作用に影響を与えなかった。一方、AxCAER α あるいは AxCAER β を 10 MOI 以上で感染させた CF において DNA 合成は有意に抑制され、その作用は MOI 依存적であり、効果は両サブタイプでほぼ同等であった。また、この増殖抑制作用は低濃度の E2 においても十分にみられた。ER サブタイプを過剰発現させた CF における抑制作用が実際に ER を介しているかを検討するために、AxCAER α あるいは AxCAER β と AxCADNER β を共感染させて検討を行っ

た。20 MOI の AxCAER α あるいは AxCAER β を単独で感染させた CF では約 50-70% の DNA 合成の抑制が認められたが、AxCADNER β の共感染によりその抑制作用は AxCADNER β の MOI 依存性に減少した。次に、CF \rightarrow ER を過剰発現させたときに、転写活性が増加するかどうかを検討した。20 MOI の AxCAER α または AxCAER β を感染させた CF における転写活性は 3 倍以上に増加し、AxCADNER β の共感染にて活性はほぼ完全に消失した。

(6) 虚弱高齢男性における血中テストステロン濃度と日常生活機能

総テストステロンおよび遊離テストステロン濃度は、GDS 以外の機能評価項目と有意な正相関を示した (表 3)。年齢、

表3 日常生活機能諸指標の分布および血中テストステロン濃度と各指標との単相関係数

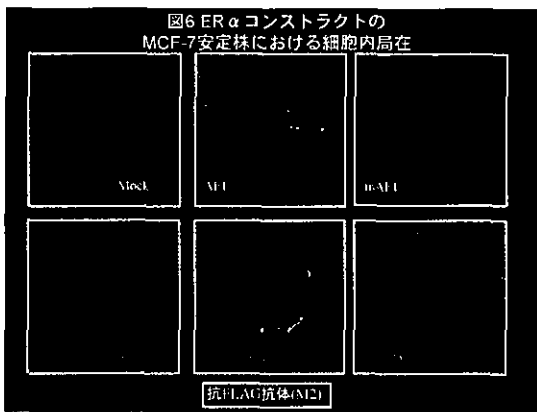
	Barthel Index	IADL	HDS-R	GDS	Vitality Index
Mean \pm SD	73 \pm 27	2.1 \pm 2.0	18 \pm 7	6.3 \pm 3.1	6.8 \pm 1.8
(Range)	(5-100)	(0-5)	(2-29)	(1-13)	(3-10)
総テストステロン	.422*	.279*	.344*	.077	.370**
遊離テストステロン	.369**	.390**	.512***	.164	.464***

基本的 ADL は Barthel Index により、手段的 ADL は Lawton and Brody's IADL により、認知機能は改訂長谷川式知能評価スケール (HDS-R) により、気分は Geriatric Depression Scale (GDS; 15 項目) により、意欲は Vitality Index により評価した。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

血清アルブミン、血清総コレステロールを独立変数に加えた重回帰分析でも、遊離テストステロン濃度は HDS-R ($\beta = 0.403$, $p = 0.03$) および Vitality Index ($\beta = 0.407$, $p = 0.02$) の有意な決定変数であった。なおこの集団では、総テストステロン、遊離テストステロンいずれも、年齢、Body Mass Index、ヘモグロビン、リンパ球数、血清アルブミン、総コレステロールとは相関しなかった。

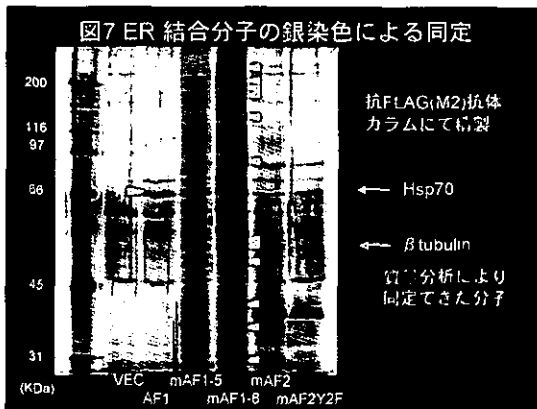
(7) エストロゲンの non-genomic 作用

図 6 に抗 FLAG 抗体による蛍光細胞染色の結果を示すが、AF-1 ドメインや AF-2 ドメインをそのまま発現させた MCF-7 細胞では、蛋白質発現は細胞質に見られるのに対し、膜局在シグナルを付加した



蛋白質は予想通り、膜に局在が移行していることが観察された。また AF-2 は膜移行させたときのみチロシンリン酸化を受けた。このリン酸化は 537 番のチロシンをフェニルアラニンに変えた変異体 537F ではほぼ消失したことから、この部位が膜におけるチロシンリン酸化部位の候補と考えられた。

当研究者らは大量培養した細胞溶出液から抗 Flag 抗体で結合蛋白質を精製した。図 7 に示す通り AF-1 ドメインに特



異的に結合する多くの蛋白質群が銀染色により観察されたのに対し、AF-2 ドメインと特異的に結合する蛋白質はこのスケールの精製では明確に検出はできなかった。AF-1 ドメインに特異的に結合する蛋白質群を質量分析により解析した結果、Hsp-70 と β チューブリンの同定に成功した。特異的抗体を用いたウエスタンブロットティングで AF-1 ドメインは膜に局在したときに限り β チューブリンと結合することが確認された。 α チューブ

リンも同様に膜に局在した AF-1 に特異的な結合が認められたが、そのようなチューブリンとの結合は、チューブリンの重合阻害剤であるノコダゾールによる処理で AF-1 ドメインとの結合が減弱することから、重合した微小管とエストロゲン受容体が AF-1 ドメインで結合することが示唆された。HSP70 との結合は AF-1 ドメイン特異的であったが膜局在との関連は認められず、恒常的結合ではないかと考えられた。これらの分子と AF-1 ドメインの結合の生理学的意味について現在解析中である。また今回検出できなかった AF-2 結合蛋白質や、量の少ない AF-1 結合蛋白質については、他の細胞由来の細胞溶出液からの精製を試みたり、精製のスケールを上げたりして同定を試みている。

一方で、既に報告されているエストロゲン刺激による内在性レセプターのリン酸化や、レセプターの膜局在、下流シグナルの活性化などは、いろいろ条件を変えて検討を繰り返しているものの、再現性良く検出することが現在までできていない。一つの工夫としてシグナル解析に最もよく用いられる乳癌細胞株 MCF7 をモデル系として、エストロゲンを長期にわたって枯渇させることにより内在性受容体の発現が数十倍にまで高くなった LTED (long term estrogen depletion) 細胞を樹立することに成功した。この細胞やエストロゲン受容体全体を過剰発現させた細胞を用いても、既に報告されているエストロゲン刺激による MAPK のリン酸化やエストロゲン受容体の細胞膜への移行は予想よりも弱いながらも確認することができた。ただしそのような non-genomic な反応は必ずしも毎回再現性良く見られるわけではなく、いくつかの論文で見られる顕著な反応を得られるような条件は最後まで見つからなかった。また Src ファミリーキナーゼの活性もエストロゲン刺激による短時間での変化は見

られず、Cas、パキシリンなど Src の基質蛋白質群のリン酸化状態もリガンドの有無で変化が認められなかった。同じリガンド刺激で ER α の Ser118 のリン酸化は著明に起こっていることから、リガンドによる genomic な反応に関しては十分に起こっており、刺激自体の問題はないものと考えられた。また MCF-7 の他に T47D,ZR75-1 などの乳癌細胞も試したが、これまでの所、再現性の高いリガンド依存性の即時性変化は認められていない。

(8) エストロゲン受容体の負の調節因子

酵母 two-hybrid スクリーニング法を用いて C 末端を欠くドミナントネガティブに転写を抑制する ER β に結合する因子をスクリーニングしたところ、Protein phosphatase 5 (PP5) を同定した。GST pull-down アッセイにより PP5 の N 末端に存在する TPR ドメインが ER と結合し、その際、PP5 と ER の結合はエストロゲンの存在によって影響されないことが明らかとなった。また、哺乳類細胞を用いた two-hybrid により、ER の E ドメイン前半領域がこれらの因子の相互作用に必要な領域であることを明らかにし、免疫沈降法を用いて内在性の PP5 と ER が MCF-7 細胞内で結合することを示した。MCF-7 細胞においては、エストロゲン処理後 30-60 分をピークとして、また EGF 処理によっては 5-10 分後をピークとして ER α S118 のリン酸化が観察されたが、PP5 を過剰発現するとエストロゲンならびに EGF 刺激による ER α S118 のリン酸化が抑制され、PP5 のアンチセンス DNA を用いて発現量を低下させると逆に ER α S118 のリン酸化は亢進することが確認された。また、ER のエストロゲン依存性の転写活性化に及ぼす PP5 の影響をリンフェラーゼアッセイを用いて検討した。その結果、PP5 を過剰発現すると ER を介する転写は抑制されることが明らかとなった (図 8)。この時、ER α S118 をアラニン (S118A) またはグルタミン酸

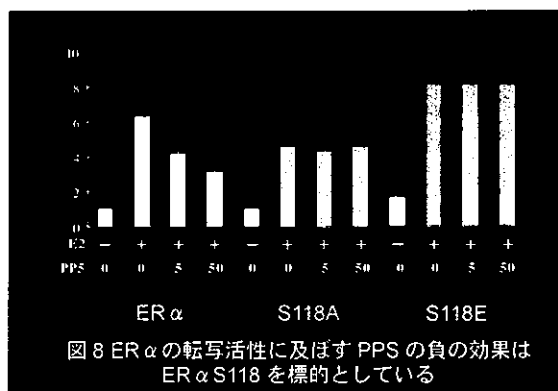


図 8 ER α の転写活性に及ぼす PP5 の負の効果は ER α S118 を標的としている

(S118E) に変異させた ER α では PP5 による転写抑制は起こらなかった。さらに、エストロゲン応答遺伝子である pS2、c-Myc、CycD1 のエストロゲン応答性の発現に対する PP5 の効果を検討したところ、MCF-7 細胞においては PP5 の過剰発現によりこれらのエストロゲン応答遺伝子 mRNA の発現は減少することが明らかになった。

(9) エストロゲン受容体を介した心筋細胞保護作用におけるレドックス制御分子の役割

1) H9c2. ラット心筋芽細胞を 100nM エストラジオール或いは 0.08mM コルチゾールを 24 時間投与した後に、0.1mM 過酸化水素で 4 時間処理をした。MTT アッセイ法、Hoechst 染色法で生存細胞を測定すると、コントロールに比べて酸化ストレスで死亡する細胞が著明に減少した。このことは、これらのホルモンが心筋芽細胞の酸化ストレスによるアポトーシスを保護する作用があることを示すものである。

2) これらのホルモンによって心筋芽細胞内のグルタチオン濃度が上昇しており、グルタチオン合成酵素の遺伝子発現が上昇していることが原因であると考えられた。

3) グルタチオンが細胞内酸化還元状態の調節を維持する上で重要であることから、このグルタチオンとグルタレドキシンで制御を受ける細胞内抗アポトーシスシグナルの重要な因子である Akt についての検討を行った。ホルモン前投与では、酸

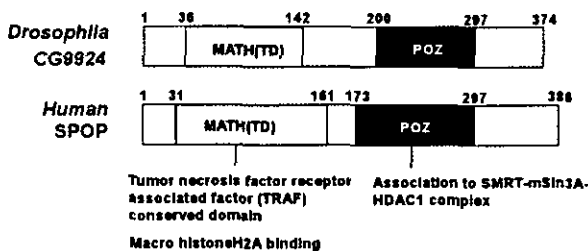
化ストレスに反応した Akt 活性が上昇しており、ホルモンの抗アポトーシス作用の機序の重要な一要因であることが推測された。

(10) ショウジョウバエを用いたエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体の機能解析

1) 発生時期や組織特異的に発現させた ER α 、AR はリガンド依存的に転写を亢進させた。次にリガンド非依存的な転写活性化領域(AF-1)およびリガンド依存的転写活性化領域(AF-2)の転写活性も哺乳動物細胞様の活性を持つことを確認した。そこでこれらレセプター転写活性を司るショウジョウバエ既知転写共役因子を検索した。既知転写共役因子のショウジョウバエホモログ CBP、p160 および TRAP80、100 の機能欠失変異体では著しく転写活性が抑制され、一方過剰発現変異体は転写を亢進させた。さらに卵母細胞において dsRNAi により転写活性が抑制されることを確認した。

2) ER α および AR 発現ショウジョウバエによる新規転写共役因子群の探索により、転写制御共役因子と示唆される遺伝子を複数同定した。中でも RNA binding protein は数多く同定された。一方、転写変動が顕著に認められた 1(3)s84507(CG9924) および 1(3)s23617(CG7008) に着目した (図 9)。CG9924 は MATH(TD) および BTB/POZ domain が保存された核内タンパクでヒト

図 9 CG9924 とヒト SPOP 遺伝子との比較

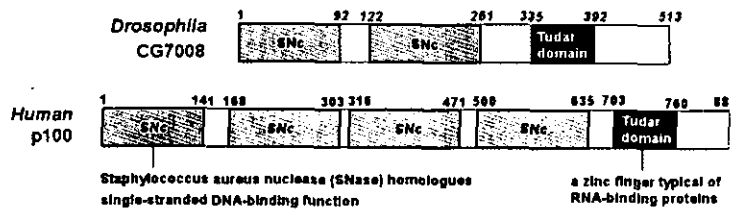


SPOP と高い相同性を示す。SPOP の MATH domain は TRAF-1,6 や TNFR と直接相互作用し、その下流のシグナルを制御している。一方、BTB/POZ domain は

SMRT-mSin3A-HDAC1 の複合体と相互作用し、X 染色体不活性化領域の標的となるヒストンの macroH2A1.2 とも結合し、転写抑制化制御に関与すると示唆されている。

CG7008 は SNe および Tudar domain が保存され、そのヒトホモログは p100 に相当する (図 10)。p100 は Tudar domain

図 10 CG7008 とヒト p100 遺伝子との比較



を介して RNA 結合タンパクへ相互作用し、RNA の transport や metabolism を制御する。また STAT6 の転写活性化共役因子として機能することが知られている。そこでこれら p100 および SPOP における転写活性を 293T 細胞でルシフェラーゼアッセイにて検討した。その結果、ER α AR の転写活性において p100 は転写抑制を示し、SPOP は転写増強が認められた。この結果からこれら分子が核内レセプター転写を制御する可能性が強く示唆された。

3) ER α および AR 応答配列を含む GFP レポーター遺伝子をヘテロクロマチンおよびユークロマチンへ挿入したショウジョウバエを作成した。その結果、それぞれレセプターによる転写活性はクロマチン状態により変動し、ヘテロクロマチン状況下では転写抑制され、ユークロマチン状況下では転写促進した。そこでこれら状況下における既知転写共役因子の機能解析を行った。その結果、CBP 変異体におけるヘテロクロマチン条件下での転写活性は増強した。すなわち CBP は標的遺伝子のクロマチン状態において異なる転写制御能を発揮することが示唆された。

4) アンドロゲン依存的神経変性制御因子を探索した結果、約 1200 line 中 73 lines