

が神経変性を促進あるいは抑制することを見出した。中でもユビキチン化およびヒストン修飾に關与する遺伝子欠失変異体が大半を占めていることを見出した。またヒストンメチル化修飾因子 Ash1 機能欠失変異体では神経変性が顕著に改善した。Ash1 は PHD finger、Bromo domain、SET domain をもつヒストンメチル化修飾酵素でヒストン H3 の K4 と K9 およびヒストン H4 の 20 をメチル化し転写を活性化することが知られている。そこで Ash1 と AR の直接的相互作用を確認するため、GST pull-down アッセイを行った。その結果、Ash1 がリガンド依存的にポリグルタミン伸長異常型 AR と結合することを見出した。

(11) 脳におけるエストロゲンの non-genomic 作用

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抗リン酸化抗体を用いて検討した結果、IGF-1 受容体はエストロゲン添加後 15 分程でリン酸化されることが明らかとなった。このリン酸化反応は IGF-1 添加時に比較すると 5 分の 1 程度であった。リン酸化反応が時間スケールでなく、分のオーダーで起こることから ER α の転写による 2 次的機能ではなく、ER α の細胞質での 1 次機能であることが予想された。

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。その結果、MAP キナーゼ、Akt とともにエストロゲン添加後 15~30 分程度でリン酸化され活性化されることが明らかとなった。両者のリン酸化の度合いは、IGF-1 で刺激したときと比較して低いことが示された。

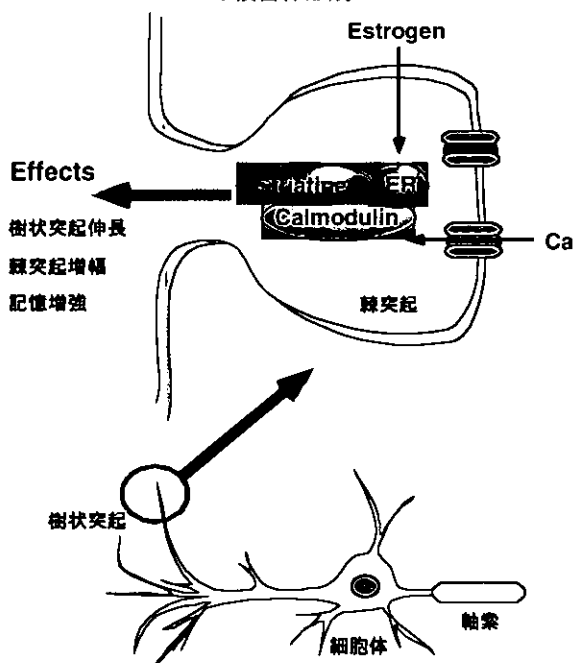
IGF-1 受容体がエストロゲン刺激によ

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こることから、この過程には細胞質に存在する ER α が關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。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ところ、エストロゲン刺激前はほとんどすべての ER α が核内に存在し、刺激によって数%が膜へと移行することが明らかとなった。この結果と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 細胞を用いて、IGF-1 受容体と ER α がエストロゲン依存的に結合するか否かを免疫共沈降法により検討した。その結果、やはりエストロゲン刺激 15 分後ほどで ER α と IGF-1 受容体が相互作用を示すことが明らかとなった。この相互作用は、一時的なものであり、30 分後には両者の結合は認められなくなった。

これらの結果は、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ことを示している。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による MAP キナーゼ、Akt のリン酸化状態を検討した。驚いたことに R+、R-どちらの細胞株においても MAP キナーゼ、Akt の活性化が認められた。この結果は、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を示唆している。そこで、大腸菌を用いて GST 融合 ER α 蛋白質を大量に調整し、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。この方法を用い、ER α の結合蛋白質を検索したところ、カルモジュリンとストリアチンがエストロゲン依存的に ER α に結合することが明らかとなった (図 11)。カルモジュリンはカルシウムと結合し、CaMKII などの活性化を引き起こすことが知られているが、その機能の詳細は長年の研究にも関わらず未だ不明である。一方、ストリアチンは脳に高発現しておりカルモジュリンを制御することによって樹状突起の伸長に関与することが報告されている。今後これらの因子と ER α との相関を解析する予定である。

図 11 ER α とカルモジュリン、ストリアチンとの複合体形成

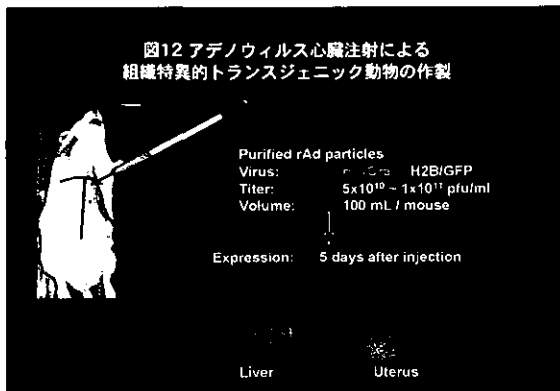


(12) 老化と老年病の疾患モデル動物の開発

本研究では、caER α および caER β の cTg マウスの作製にそれぞれ成功し、少なくともこれらの cTg マウスの数ライン

の種々の臓器でレポーター遺伝子を発現していることが確かめられ、これらのレポーター遺伝子の発現は個体でリガンド非依存型エストロゲンレセプターを過剰発現させることが可能なことを示唆した。また、Cre を発現可能な組換えアデノウイルスを cTg 由来の F1 マウス尾部の初代繊維芽細胞に感染させ、*in vitro* において外来性 caER α および caER β 遺伝子が発現していることを確認した。

さらに *in vivo* においては、先ずコントロールウイルスとしてレポーター遺伝子 (Histon 2B に GFP を融合させた遺伝子) を持つ組換えアデノウイルスを個体に直接心臓から接種することにより、*in vivo* で Cre を発現させることが可能かどうか検討した結果、高濃度に精製したウイルスを接種することによりレポーター遺伝子の発現を蛍光実体顕微鏡で確認できた。つまり、高濃度に精製した Cre を発現する組換えアデノウイルスを心臓より直接接種することにより、部分的ではあるがコンディショナルに個体において目的遺伝子を過剰発現させる系が可能と示唆された。実際に、成熟雌の cTg (caER α) の心臓から高濃度の Cre 発現ウイルスを接種し、2 週間後にエストロゲンシグナルの標的臓器である卵巣において異所性の外来性 caER α のシグナルを ISH 法により RNA レベルで確認すると共に、異所的な内在性の ER α および ER β シグナルの発現を確認した。Cre を処理した卵巣において、部分的に外来性の caER α の発現が確認でき、これらの卵巣では黄体様の組織構造および発達した卵胞の減少が観察され、外来性の caER α の発現する部分において ER の下流応答遺伝子と知られている EBAG9、および Efp の異所的な発現を確認した。これらの Cre 処理後の cTg マウスの卵巣を詳細に解析した結果、内在性 ER α 、ER β 、EBAG9、および Efp が本来発現する部位で発現するのみでなく、外来性の caER α の発現



が強い黄体様組織で異所的な発現が見られた。

さらに、この外来性の $caER\alpha$ の発現が強い黄体様の組織で、黄体機能の作用が存在するか検討するために、エストロゲンの下流応答遺伝子として知られるプロゲステロンレセプター (PR) が発現しているか検討した結果、外来性の $caER\alpha$ の発現により下流応答遺伝子として知られる PR の発現を同じ黄体様組織において観察した。

一方、前述で挙げた *in vivo* においてコンディショナルに目的の遺伝子を発現させるために Cre を発現できる組換えアデノウイルスを利用した方法について検討した結果、肝臓、肺等には導入効率が良いが特異性がなく、他の標的臓器に特異性を持って効率的に発現させるためには、組換えアデノウイルスを利用する系には短所があることが示唆された。それ故、より特異性が高く効率の良い方法を検討するために、組織特異的なプロモーターに Cre を発現できる遺伝子改変マウスについても作製中である。

エストロゲンの下流応答遺伝子群に関しても、既に 2 つの遺伝子を同定し遺伝子改変マウスの作製を行っており、それらの老年病の疾患モデル動物として吟味・検討している。

D. 考察

(1) エストロゲン応答遺伝子 Efp の機能検索

エストロゲンは骨以外では乳腺や子宮上皮といった標的臓器の細胞増殖を強く誘導することが示されており発癌ならびに癌進展のイニシエーターとして考えられている。この分子機構においてはエストロゲン受容体(ER)を介したシグナル応答が中心的な役割をはたしている。ER 応答部位をその遺伝子の転写活性領域に有し、エストロゲンにより発現制御が行われるエストロゲン応答遺伝子は ER シグナルの最終段階として作用する。我々は今までに新規エストロゲン応答遺伝子として Efp を単離し、Efp が蛋白分解酵素であるユビキチンリガーゼとして機能し、乳癌細胞の増殖や進展において中心的な役割を果たしていることを示した (Urano et al., *Nature* 2002)。Efp はその N 末端より RING フィンガー、B-box、Coiled-coil ドメインを有している。このことは Efp が蛋白-蛋白相互作用を介した機能を有していることを示唆させる。したがって、Efp 結合蛋白を同定することは乳癌ならびにエストロゲン標的臓器における細胞内シグナル伝達の解明とその臨床応用へ役立つことが期待される。そこで今回、研究者は 2 ハイブリッド法を用いてヒト Efp を bait として Efp 結合蛋白を探索し、本探索より Efp そのものが結合蛋白として同定された。さらに細胞内に異なる 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。この複合体形成作用を利用して、RING フィンガーを欠落させた Efp を過剰発現させることで内在性の Efp と複合体形成を行い、ドミナントネガティブ効果により、乳癌細胞の増殖抑制を誘導することを示した。この分子標的とその制御は最近閉経後女性で患者数の増加している乳癌や、高齢者のホルモン依存性癌への新しい臨床応用を可能にするものと考えられる。また Efp の複合体形成を阻害することは Efp の機能を阻害できることが示

された。研究者らは骨芽細胞においても Efp が発現すること、ならびに乳癌細胞と同様にエストロゲン添加によりその発現が誘導されることを示している(Inoue et al., *Biochem Biophys Res Commun* 1999)。したがって今回作成した RING フィンガーを欠落させたアデノウイルス Efp を骨芽細胞に過剰発現させて内在性の Efp の機能を低下させた時の骨芽細胞の機能の変化を検討することでエストロゲン応答遺伝子である Efp の骨芽細胞における役割を明らかにできる可能性があり、閉経後骨粗鬆症の病態の解明から治療への応用をめざすためにも有用と考えられる。

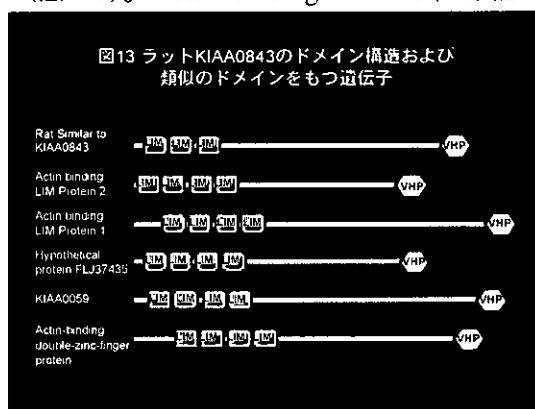
(2) エストロゲン応答遺伝子 $ERR\alpha$ の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響ならびに骨芽細胞分化における発現変化に関する検討

今回、骨における ER 応答遺伝子として $ERR\alpha$ に注目し、その遺伝子多型が骨量と相関を有することならびに骨芽細胞の分化後期において $ER\alpha$ や $ER\beta$ の発現上昇と一致してその発現が上昇することを示した。 $ERR\alpha$ は、ER と同じく核内レセプター的一种であるが、そのリガンドは不明である。エストロゲンとの結合能は持たないが、ER 応答配列との結合能を有し、転写制御因子としてはたらく。 $ERR\alpha$ は骨芽細胞においてその分化後期に発現上昇することや、骨基質タンパクの1つである Osteopontin の産生を促進し、骨形成に関わることが示唆されていることから、骨芽細胞分化後期における ER シグナルによる骨芽細胞成熟に大きく関与している可能性がある。今後、エストロゲンによる骨芽細胞作用のメディエーターとして $ERR\alpha$ が骨形成にあたる影響に関して遺伝子の過剰発現や siRNA をもちいたノックダウン等の解析により明らかにしていく。

(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

本研究で、骨芽細胞における新規のエストロゲン応答遺伝子として、Keratin 19、KIAA0843、Tissue Transglutaminase が同定された。Keratin 19 は、中間径フィラメントの一種で、骨芽細胞骨格に対する影響が示唆される。また、KIAA0843 protein は、LIM ドメインと、F-actin との結合能をもつと考えられる VHP ドメインを有しており、actin binding LIM と似通った構造をしていることが認められた(図 13)。Actin binding LIM は、神経の



軸索伸長の誘導に必要な因子であることが報告されている。この actin binding LIM と相同性の高い KIAA0843 が骨芽細胞において果たす役割に関し、特に細胞形態の維持や変化に対する役割に対して注目し、機能解析を行っている。

Tissue Transglutaminase は、基質となるタンパクのグルタミン残基とリシン残基との架橋結合を触媒する酵素であり、これ以外にも細胞接着や、細胞内シグナル伝達に関与するという働きも有する。骨芽細胞においては Osteopontin、Bone Sialoprotein、Osteonectin、 α 2-HS-glycoprotein といった非コラーゲン性タンパクを基質とすることが報告されており、骨基質タンパクの架橋による石灰化誘導に関わることが示唆される。これらをあわせ考えると、エストロゲンが骨芽細胞において Tissue Transglutaminase の発現を誘導し、細胞外骨基質タンパクの架橋とその後の石灰化促進に関わるという新

しい骨芽細胞におけるエストロゲン作用機序が考えられる。今後、Tissue Transglutaminase の骨芽細胞における生理的な役割に関して *in vitro* ならびにモデル動物を用いて検討していく。

(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

ビタミン D 応答遺伝子である p57^{Kip2} に関しては、今回 gain of function の系を用いてその下流遺伝子を検討した。その解析により、p57^{Kip2} 過剰発現骨芽細胞株では発現が増加する遺伝子として Osteopontin が同定された。Osteopontin は前述したように骨芽細胞から分泌される蛋白であり骨形成に大きく関与する因子である。p57^{Kip2}、オステオポンチンはともにビタミン D3 により発現誘導される遺伝子であることから、今回の結果はビタミン D3 による骨形成シグナルにおいて Osteopontin の発現制御は p57^{Kip2} を介して行われることが示された。今後、ビタミン D レセプター、p57^{Kip2}、Osteopontin ノックアウトマウス由来の骨芽細胞由来の RNA、タンパクを用いてビタミン D3/p57^{Kip2} /Osteopontin を介した骨形成シグナルに関する詳細を明らかにすることによりビタミン D シグナルの新たな下流シグナルが明らかとなることが期待される。

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

本研究では、いずれの ER サブタイプが VSMC および CF の増殖抑制作用に関与しているかを明らかにする目的で ER α および ER β を組み込んだアデノウイルスを作製した。非感染の VSMC および CF ではエストロゲン添加によりエストロゲン応答配列の転写が活性化し、増殖抑制作用を示した。VSMC に ER α あるいは ER β を過剰発現させると、それぞれ

転写活性の増加を認めたが、VSMC 増殖抑制作用は ER α ではなく ER β においてリガンド依存性に増強した。一方 CF では、両サブタイプともに過剰発現により転写活性、増殖抑制効果は増強された。

以前のわれわれの報告や他の施設からの報告において、エストロゲンは VSMC および CF の増殖を抑制することがすでに明らかになっている。また、ER アンタゴニストである ICI182,780 あるいはタモキシフェンがエストロゲンの増殖抑制作用に拮抗することが報告されており、エストロゲンの VSMC および CF 増殖抑制作用は ER を介することを示唆する。しかし、これらの阻害剤は ER サブタイプの選択性はなく、さらにタモキシフェンは臓器によってアゴニスト作用を有する。したがって、本研究によって、VSMC では ER β が、CF では ER α 、ER β の両者が増殖抑制を介することが初めて明らかになった。それではエストロゲンの増殖抑制作用において ER サブタイプ間でどのような差異があるのだろうか？また、VSMC と CF で結果が異なる理由は何だろうか？リガンド結合能の違い、下流のエストロゲン応答遺伝子あるいは応答シグナルの違い、ER に結合する共役因子の違いなどが可能性として挙げられる。本研究では ER の転写活性がサブタイプ間でほぼ同等であり、細胞増殖抑制作用におけるサブタイプ間の相違は応答遺伝子の発現、共役因子の結合の相違によるのかもしれない。エストロゲンによる増殖抑制作用に関連する細胞内シグナル伝達経路としては MAPK 活性の抑制、MAPK ホスファターゼ-1 の発現およびチロシンホスファターゼの活性の上昇、cyclic AMP-アデノシン経路を介するなど、いくつかの研究から明らかにされている。これらの点は本研究からは明らかでなく、今後の検討課題である。また、今回の研究は培養細胞レベルの検討であり、臨床研究へフィードバックするためには少な

くとも動物実験により心血管病変形成に対する作用を検討する必要がある。この点は、臨床用量の10分の1程度の低用量エストロゲンでラット頸動脈内膜肥厚が抑制されることを確認しており、今後ERサブタイプとの関係を検討したい。

(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

臨床研究により、血中テストステロン濃度の低下が虚弱高齢男性の全般的日常生活機能障害と関連することを見出した。これまでに、テストステロン濃度の低下が虚弱高齢男性の移乗、食事に関するADLと関係するという報告、地域在住高齢者で認知機能と関係するという報告があるが、いわゆる総合機能評価の手法による研究は本研究が初めてである。高齢者における日常生活機能の低下には様々な原因があるが、脳虚血病変による痴呆や運動麻痺、失調、冠動脈疾患による心機能低下、閉塞性動脈硬化症による歩行障害など動脈硬化を背景とするものが多い。したがって、今回の結果はテストステロンと動脈硬化との関係を直接みたものではないが、従来報告にあるようなテストステロン低下と関連した動脈硬化が日常生活機能障害の要因となっている可能性も示唆される。今後は、高齢男性においてテストステロン濃度と動脈硬化との関係を直接検討していくとともに、全般的な日常生活機能改善効果を目的としたテストステロン補充療法の模索を行う必要がある。

(7) エストロゲンの non-genomic 作用

本研究は、2000年以降、相次いで発表されたエストロゲン受容体と細胞内シグナル伝達系との直接のクロストークのモデルに基づき、その種々の臓器における生理作用を明らかにする目的で推進してきているが、現時点での一番大きな問題点は、発表されている non-genomic な反応と全く同じ細胞や培養条件、刺激方法を用いても、例えばエストロゲン刺激に

よる MAP キナーゼの活性化などはごくごく僅かしか観察されず、論文のような顕著な変化が起きないということである。今に至るまでこの問題は解決せず、このことがこの研究が初年度から手間取る大きな要因となった。同時に内在性のエストロゲン受容体をきれいに描出できる抗体がなく、ほとんどの実験が外からタグを付加して発現させた受容体の挙動を観察するものとなってしまったのも残念である。チロシン 537 のリン酸化に関してもリガンド刺激の有無によるリン酸化の程度の差が認められれば、まさにリガンドの下流の直接のシグナル伝達経路として興味深い。現在のところ恒常的チロシンリン酸化のようなので non-genomic なシグナルの調節部位としての役割は少ない可能性がある。

それでもこの方法によって同定されたチューブリンは、膜局在タイプの AF-1 にのみ結合するという特異性から、その機能に興味を持たれる。微小管の機能におけるエストロゲン受容体の役割という方向で生理的意義を探っていきたい。またこれから AF-2 のチロシンリン酸化部位に結合する蛋白質など膜内複合体構成成分が微量なものに至るまで明らかになれば、自ずと受容体の膜における役割についても浮き彫りになるものと期待される。

またここ数年の質量分析技術の進歩によって、蛋白質複合体解析が今までより遙かに微量の蛋白質で行えるようになったが、それでもまだ細胞内シグナル伝達分子のように絶対量が少ない蛋白質群にとっては、非常に多くの材料からスタートする必要があるということである。そのこともありとりあえず non-genomic 作用が多くグループにより示されている MCF-7 細胞の大量培養から幾つかの相互作用する分子を同定することができつつあるが、今後神経細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞などからこのような複合体解析

に進もうとすると、蛋白質精製のスケールアップが必要となり、多大な時間と労力を要すると考えられる。現在環流法を用いた上記細胞の立体培養と、それによる蛋白質サンプルを大量に調整する条件を検討することや、正常細胞に近い不死化細胞株を利用することも避けられないものと考えられる。

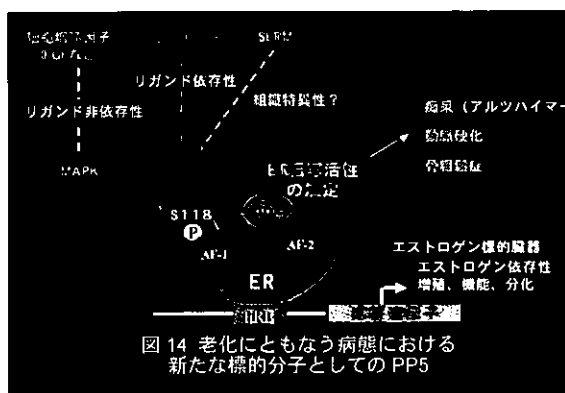
(8) エストロゲン受容体の負の調節因子

ER の転写活性の制御にリン酸化が重要な働きを担っているおり、中でも AF-1 に存在する ER α S118 のリン酸化は ER α の主要なリン酸化部位であることが知られている。ER α S118 のリン酸化は EGF などの細胞増殖因子によって活性化される MAPK を介して誘導されることが知られており、特にホルモン非依存性の ER の活性化 (ER の AF-1 の活性化) に重要な機能を有していると考えられている。また、ER α S118 のリン酸化はエストロゲン刺激によって CDK7 を介しても起こり、細胞増殖因子とエストロゲンシグナルのクロストークの場としても重要な役割を担っていると考えられている。しかしながら ER α S118 の脱リン酸化の機構についてはほとんど知られていなかった。本研究により、ER α S118 の脱リン酸化酵素として PP5 を同定し、PP5 は ER の転写活性を負に制御していることが示された。PP5 を細胞内で過剰発現させると細胞増殖因子とエストロゲンの双方の刺激による ER α S118 のリン酸化をともに抑制することから、PP5 は ER の脱リン酸化を通じて ER の転写活性化能を低く規定していることが考えられた。

抗エストロゲン剤として開発されたタモキシフェンは、乳腺に対してはアンタゴニストとして働き、乳癌の治療に使用されているが、一方でタモキシフェンは子宮内膜に対してはアゴニスト作用を有し、子宮内膜癌の危険率を上昇させることが知られている。タモキシフェンのこのような組織特異的な作用は ER の AF-2

の活性を阻害するが、AF-1 の活性は阻害しないことに依ることが示唆されている。タモキシフェンによって ER α S118 のリン酸化が誘導されることが観察されており、抗エストロゲン剤の組織特異的な作用を PP5 が制御している可能性が考えられた。

エストロゲンは痴呆、動脈硬化、骨粗鬆症などの老化に伴う病態と深く関わっていることが知られており、その作用を媒介する ER の PP5 による脱リン酸化制御機構の解明は老年病における新たな予防、治療法に繋がる可能性が示唆された (図 14)。



(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) ホルモンのうち、エストラジオールのみならず膠原病や呼吸器アレルギー疾患などで頻用されているグルココルチコイドについて、どのような機序で心血管保護作用を示すのかを明らかにする手法を発見した。エストラジオールの抗酸化ストレスを消去する作用の機序が解明される。即ち、酸化ストレスで引き起こされるアポトーシスシグナルに作用する機構に、抗アポトーシス作用を示す Akt 活性に及ぼす影響が明らかとなった。細胞内シグナル伝達に関して今後さらに詳細な検討が必要である。

2) エストラジオールやグルココルチコイドが示す細胞保護作用に、抗酸化物質の中心をなすグルタチオンの合成酵素

(gamma-glutamylcysteine synthetase, GCS) 発現上昇が関与していることを明らかにした。今後 GCS などの抗酸化分子の遺伝子発現にどのように働くかを明らかにする必要がある。

3) 細胞障害防御作用を制御する細胞内小器官（ミトコンドリア、小胞体、核）それぞれに特異的に局在しているレドックス調節因子の役割を明らかにすることが必要である。

4) 本研究で明らかにされた結果は、ホルモン標的因子を分子標的とした血管の老化に対する分子標的治療法の開発の基礎研究を展開するものとなると考えられる。

細胞の機能を調節する因子であるレドックス関連因子がエストラジオールやグルココルチコイドによる細胞内シグナルにどのように活性化するかを知ることが可能となった。

(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

本研究はショウジョウバエの分子遺伝学を駆使した解析系を構築し、機能遺伝子を同定・性状解析した。現在ヒトとショウジョウバエの機能遺伝子は解読済みであり、その構造・機能ともに高く保存されていることが判明している。従ってショウジョウバエ中で機能するヒト ER α および AR は性ステロイドホルモン作用機構を分子遺伝学的に解析できるツールとなり、標的遺伝子のクロマチン構造を考慮した解析系には格好のモデル個体と言える。既知転写共役因子でありヒストンアセチル化修飾し転写を活性化すると考えられてきた CBP がヘテロクロマチン上で抑制的に働く知見は初めての報告であり、今後どのような転写抑制機構で機能するか、ヒストン修飾を介した詳細な転写制御解析を進展させる予定である。

また今回新たに取得した転写共役因子と示唆された SPOP および p100 は核内レセプターを通じて制御機構の報告はな

く、ヒストン修飾や RNA 結合機能性や、他のシグナル(TRAF, STAT6)へのクロストークにも関与する可能性が示唆された。

一方、これら個体における評価系と同時に *in vitro* 系での評価も必須と考える。現在ショウジョウバエ卵母細胞より核抽出画分を調整し、裸の DNA に対しヒストンを巻いたクロマチン再構築系での *in vitro* 転写系の確立を試みている。ショウジョウバエ卵母細胞の核抽出画分はクロマチンを再構築する活性が高く、ヒストン修飾の位置特異性を決定づける最適なツールとなっている。ショウジョウバエ卵母細胞抽出画分によるクロマチン再構築系は確立済みであり、クロマチン再構築したレポーター遺伝子からの *in vitro* 転写系を検討している。ヒストン修飾の特異性を示す因子は単一分子ではなく複合体形成で機能すると推測され、取得因子を Bait とした相互作用分子のタンパク複合体精製は必須と考える。当該研究室ではタンパク複合体精製法は確立済みであり、複合体構成因子個々の染色体構造調節機能への相互作用の検討も重要な課題と考える。

神経変性制御遺伝子の同定により、神経変性機構の一端がクロマチン構造変換を伴う転写制御機能の破綻、染色体 DNA 構造変換維持機能の衰退が考えられた。これまでヒストン脱アセチル化活性やアセチル化活性は神経変性制御に拘わることは報告されていたが、本研究結果から、ヒストン修飾のみならずクロマチン構造変換も非常に重要であることが判明した。現在この神経変性疾患は治療法がないばかりか加齢に伴い充進し最終的に致死となる難病であることから、これら破綻機構の解析は神経変性発症抑制や治療に大きく貢献できると期待する。

(11) 脳におけるエストロゲンの non-genomic 作用

エストロゲンが細胞質に存在する ER α と IGF-1 受容体との相互作用を誘導し、

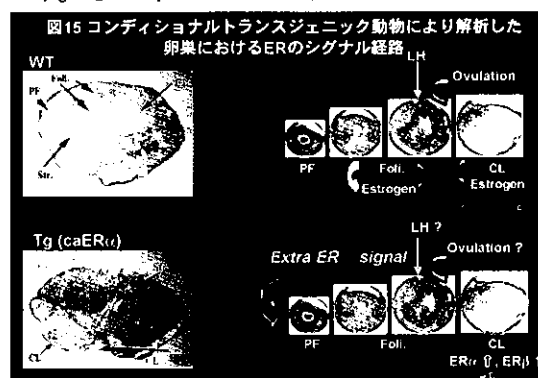
IGF-1 受容体のリン酸化、引いては MAP キナーゼ、Akt の活性化を引き起こすことを示した。エストロゲン依存的な MAP キナーゼおよび Akt の活性化には、必ずしも IGF-1 受容体は必要ないことから、そのほかの因子が ER α と細胞質で相互作用し、MAP キナーゼと Akt pathway の活性化を行っているものと考えられた。

GST-ER α カラムを作製して ER α にエストロゲン依存的に結合する細胞質蛋白質を精製・同定したところ、カルモジュリンとストリアチンが得られた。カルモジュリンは細胞内のカルシウム・モジュレーターであり、カルシウムと結合して CaMKII などを活性化し細胞増殖、樹状突起伸長など様々な過程に関与することが報告されている。しかしながら、その分子機構の詳細は明らかになっていない。ストリアチンは脳において豊富に存在し、神経突起終末にカルモジュリンと結合して存在することが報告されている。ER α も樹状突起の棘突起部位に局在すること、エストロゲンが樹状突起の伸長に関与することから、ER α 、カルモジュリン、ストリアチンは複合体を形成してエストロゲン依存的な樹状突起伸長に関与しているものと考えられる。今後、エストロゲン依存的に3者の複合体が形成されるか、ER α の結合によってカルシウム非存在下でもカルモジュリンの活性化が起こるのか、ストリアチンの役割は何かなどの疑問を解明し、樹状突起伸長での ER α の機能と機構および老化にともなう変化について解析を進めたい。

(12) 老化と老年病の疾患モデル動物の開発

エストロゲンと卵巣機能に関しては、女性の二次成長に伴い卵巣が発達し、性周期により他のホルモンと厳密にお互いに制御することにより、女性生殖を維持していることが知られている。また、卵巣は生体におけるエストロゲンを分泌する主要な臓器であり、そのステロイドレ

セプターである ER α および ER β の発現が報告されており、妊娠期に劇的に変化をとまなう子宮および乳腺が近接して存在する代表的な標的臓器として考えられる。とりわけ老年病との関連について考えると、女性の閉経後における生体変化は極めて重要な問題であり、骨粗鬆症、ホルモン依存性ガン等と深く関連することが示唆されている。本研究により、エストロゲンシグナルが卵巣機能の黄体化作用に関与することが示唆され、下流応答遺伝子の1つである PR の発現を制御していることが推測される。1つのモデルとして、卵巣においてエストロゲンシグナルがプロゲステロンシグナルを階層的に制御する可能性を示唆している(図15)。また、エストロゲンレセプターの



下流応答遺伝子である EBAG9、および Efp についても、生体内で過剰な ER α シグナル付加することにより転写を上昇させることが示唆された。とりわけ、Efp は乳癌の細胞増殖における重要な因子であることを研究代表者および分担者により既に報告しており、ガンとの関連について生体内での作用メカニズムを解明することは重要と考えられる。

これらの研究を発展させるためには、個々の標的臓器・疾患に焦点を絞り、疾患モデルマウスを応用して本来エストロゲンが持つ生体作用を明確にし、ステロイドシグナルの減衰・破綻による病態メカニズムを理解することにより、新しい老年病の予防・治療法の開発を行うのに必須と考えられる。

E. 結論

本研究では、発表業績に示すように、主任研究者は骨と脳、生殖系におけるエストロゲンの標的因子を複数のアプローチによって明らかにし、抗老化・老年病治療と診断の分子標的としての役割を示した。秋下は、動脈硬化における性ステロイドの予防・保護作用を研究し、エストロゲンの心血管への抗老化作用は ER α/β を介することを示し、またアンドロゲンの血管と脳における臓器特異的作用を臨床研究と動物モデルを用いて明らかにし、新しい治療法への応用の可能性を示唆した。堺は、脳研究、細胞内シグナル伝達の最先端の研究から、エストロゲンの non-genomic action を分離し、細胞における新しいステロイドシグナル経路を見出した。池田は、ゲノム医学を応用し、ステロイド受容体研究の分野において、新規共役因子としての脱リン酸化酵素の役割を明らかにした。近藤は、心血管系老化におけるレドックス制御に Akt が関与することを示し、その研究をグルココルチコイドに発展させている。武山は、エストロゲンとアンドロゲン受容体の新しい転写調節機構を明らかにする一方、神経変性疾患の病態モデルを開発し、アンドロゲン誘導体を用いてその治療法の開発を進めている。柳澤は、ステロイド受容体の新しい共役因子を同定し内外の高い評価を受けるとともに、エストロゲンの脳保護作用において、老化と関連の深い IGF 経路とクロストークする non-genomic action を見出し、新しいシグナル経路を明らかにしている。津久井は、発生工学を応用して、トランスジェニックマウス、ノックアウトマウスによる老化、老年病疾患モデルマウスを開発し、ウイルスベクターによる遺伝子治療、再生医学への応用をめざしている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kato S, Muramatsu M Inoue S: Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol*, 2004, in press
2. Horie K, Urano T, Ikeda K, Inoue S: Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 101-104, 2003
3. Takahashi S, Urano T, Tsuchiya F, Fujimura T, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S: EBAG9/RCAS1 expression and its prognostic significance in prostatic cancer. *Int J Cancer* 106, 310-315, 2003
4. Tsurusaki T, Aoki D, Kanetake H, Inoue S, Muramatsu M, Hishikawa Y, Koji T: Zone-dependent expression of estrogen receptor alpha and beta in human benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 1333-1340, 2003
5. Aoki T, Inoue S, Imamura H, Fukushima J, Takahashi S, Urano T, Hasegawa K, Ogushi T, Ouchi Y, Makuuchi M: EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma: Correlation with tumour dedifferentiation and proliferation. *Eur J Cancer* 39, 1552-1561, 2003
6. Inoue H, Shimizu I, Lu G, Itonaga M, Cui X, Okamura Y, Shono M, Honda H, Inoue S, Muramatsu M, Ito S: Idoxifene and estradiol enhance antipoptotic activity through estrogen receptor-beta in cultured rat hepatocytes. *Dig Dis Sci* 48, 570-580, 2003
7. Horie K, Urano T, Inoue S: Efp as a new molecular target for breast cancer therapy. *Anticancer Drugs* 14, 1-2, 2003
8. Okada A, Ohta Y, Inoue S, Hiroi H, Muramatsu M, Iguchi T: Expression of

- estrogen, progesterone and androgen receptors in the oviduct of developing, cycling and pre-implantation rats. *J Mol Endocrinol* 30, 301-315, 2003
9. Kawabata W, Suzuki T, Moriya T, Fujimori K, Naganuma H, Inoue S, Kinouchi Y, Kameyama K, Takami H, Shimosegawa T, Sasano H: Estrogen receptor (alpha and beta) and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 thyroid disorders. *Modern Pathology* 16, 437-444, 2003
 10. Tabb MM, Sun A, Zhou C, Grun F, Errandi JL, Romero KM, Pham H, Inoue S, Mallick S, Lin M, Forman BM, Blumberg B: Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor, SXR. *J Biol Chem* 278, 43919-43917, 2003
 11. Ezura Y, Nakajima T, Kajita M, Ishida R, Inoue S, Yoshida H, Suzuki T, Shiraki M, Hosoi T, Orimo H, Emi M: Association of molecular variants, haplotypes, and linkage disequilibrium within the human vitamin D-binding protein (DBP) gene with postmenopausal bone mineral density. *J Bone Miner Res* 18, 1642-1649, 2003
 12. Iwasaki H, Emi M, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Kodaira M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Swensen J, Orimo H: Association of a Trp16Ser variation in the gonadotropin releasing hormone (GnRH) signal peptide with bone mineral density, revealed by SNP-dependent PCR (Sd-PCR) Typing. *Bone* 32, 185-190, 2003
 13. Hoshino S, Hosoi T, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Association of Tumor Necrosis Factor 1 (TNFR1) gene polymorphism with bone mineral density. *Geriatric Gerontol Int* 3, 101-105, 2003
 14. Urano T, Shiraki M, Ezura Y, Fujita M, Sekine E, Hoshino S, Hosoi T, Orimo H, Emi M, Ouchi Y, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. *J Bone Miner Metab*, 2004, in press
 15. Kobayashi K, Akishita M, Machida A, Sonohara K, Ohni M, Toba K: Correlation between pulse wave velocity and cognitive function in non-vascular dementia. *J Am Geriatr Soc*, 2004, in press
 16. Kobayashi K, Akishita M, Yu W, Hashimoto M, Ohni M, Toba K: Interrelationship between non-invasive measurements of atherosclerosis; flow-mediated dilation of brachial artery, carotid intima-media thickness and pulse wave velocity. *Atherosclerosis*, 2004, in press
 17. Watanabe T, Akishita M, He H, Miyahara Y, Nagano K, Nakaoka T, Yamashita N, Kozaki K, Ouchi Y: 17beta-Estradiol inhibits cardiac fibroblast growth through both subtypes of estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 454-459, 2003
 18. Watanabe T, Akishita M, Nakaoka T, Kozaki K, Miyahara Y, He H, Ohike Y, Ogita T, Inoue S, Muramatsu M, Yamashita N, Ouchi Y: Estrogen receptor beta mediates the inhibitory effect of estradiol on vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res* 59, 734-744, 2003
 19. Nakamura T, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Orimo H, Ouchi Y: Influence of sex and estrogen on vitamin D-induced arterial calcification in rats. *Geriatr Gerontol Int* 3, 145-149, 2003
 20. Akishita M, Yamada S, Nishiya H, Sonohara K, Ohni M, Toba K: Testosterone and comprehensive geriatric assessment in frail elderly men. *J Am Geriatr Soc* 51, 1324-1326, 2003
 21. Huang J, Asawa T, Takato T, Sakai R:

- Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma *J Biol Chem* 278, 48367-48376, 2003
22. Ikeda K, Inoue S, Muramatsu M: RING finger-B box-coiled coil (RBCC) proteins as ubiquitin ligase in the control of protein degradation and gene regulation. *Zinc finger proteins: from atomic contact to cellular function* (Edited by Iuchi S and Kuldell N) Landes Bioscience, Georgetown, in press
23. Murata H, Ihara Y, Nakamura H, Yodoi J, Sumikawa K, Kondo T: Glutaredoxin exerts anti-apoptotic effect by regulating redox state of Akt. *J Biol Chem* 278, 50226-50233, 2003
24. Murayama A, Kim M, Yanagisawa J, Takeyama K, Kato S: Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J*, 2004, in press
25. Matsumoto T, Takeyama K, Sato T, Kato S: Androgen receptor functions from reverse genetics models. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 95-99, 2003
26. Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Yanagisawa J, Chambon P, Fujii-Kuriyama Y, Kato S: Activation of estrogen signaling by dioxin-induced association AhR with ER. *Nature* 423, 545-550, 2003
27. Fujita T, Kobayashi Y, Wada O, Tateishi Y, Kitada L, Yamamoto Y, Takashima H, Murayama A, Yano T, Baba T, Kato S, Kawabe YI, Yanagisawa J: Full activation of estrogen receptor alpha (ER alpha) activation function-1 (AF-1) induces proliferation of breast cancer cells. *J Biol Chem* 278, 26704-26714, 2003
28. Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Mezaki Y, Uematsu Y, Matsui D, Ogawa S, Unno K, Okubo M, Tokita A, Nakagawa T, Ito T, Ishimi Y, Nagasawa H, Matsumoto T, Yanagisawa J, Kato S: The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome. *Cell* 113, 905-917, 2003
29. Fukuda A, Tokonabe S, Hamada M, Matsumoto M, Tsukui T, Nogi Y, Hisatake K: Alleviation of PC4-mediated transcriptional repression by the ERCC3 helicase activity of general transcription factor TFIIF. *J Biol Chem* 278, 14827-14831, 2003
2. 学会発表
【国際学会】
1. Inoue S: [Invited Seminar] The role of 14-3-3sigma proteolysis in breast cancer growth. Biology of 14-3-3 Proteins. Gordon Research Conference, Ventura, CA, USA (2004.2.22-27)
2. Inoue S: [Workshop] Estrogen responsive genes and breast tumors. The US-Japan Workshop on "The Role of Nuclear Receptors in Carcinogenesis", Maui, HA, USA (2004.3.21-23)
3. Fujita M, Urano T, Horie K, Ikeda K, Tsukui T, Fukuoka H, Tsutsumi O, Ouchi Y, Inoue S: Estrogen activates cyclin-dependent kinases 4 and 6 through induction of cyclin D. International Bone and Mineral Society 2003, Osaka (2003.6.3-7)
4. Ishida R, Sudo Y, Ezura Y, Yoshida H, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Ito H, Emi M: Association of Molecular Variants, Haplotypes, and Linkage Disequilibrium within the Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor-Interacting Protein (I-TRAF) Gene with Adult Bone Mineral Density. American Society of Bone and Mineral Research 25th Annual Meeting, Minneapolis, Minnesota, USA (2003.9.19-23)

5. Urano T, Fujita M, Shiraki M, Hoshino S, Ouchi Y, Inoue S: Association of polymorphisms in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, Tokyo (2003.11.25-27)
 6. Hoshino S, Inoue S, Ouchi Y: Monitoring bone resorption by serum type I collagen N-telopeptides (NTX) predicts change of bone mineral density in postmenopausal Japanese women. 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, Tokyo (2003.11.25-27)
 7. Sakai R, Miyake I, Hakomori Y, Asawa T: Activation of the anaplastic lymphoma kinase in Neuroblastoma cells. German-Japanese Cancer Workshop on modification of signaling cascades in cancer, Tokyo (2003.1.8-11)
 8. Sakai R: "Roles of Src-binding molecules in the control of cancer progression" The eighteenth workshop on France-Japan cooperative cancer research program, Osaka (2003.10.28-11.1)
 9. Tanaka M, Kamata R, Sakai R: Involvement of Eph receptor tyrosine kinase and ephrin ligand in the regulation of cell-to-cell adhesion by interaction with claudins. 6th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, Waikoloa, Hawaii, USA (2004.1.25-28)
 10. Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie K, Usui T, Muramatsu M, Inoue S: Negative regulation of transcription activity of estrogen receptor by protein phosphatase 5. Keystone Symposia, Keystone, CO, USA (2004.2.28-3.4)
 11. Kondo T: Protective role of glutaredoxin on oxidative stress-induced cell death in cardiac H9c2 cells. SFRBM's 10th Annual Meeting, Seattle, Canada (2003.9.20-24)
 12. Kondo T: Protective role of glutaredoxin on oxidative stress – induced cell death in cardiac H9c2 cells. 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, Tokyo (2003.11.25-27)
 13. Kondo T: Impairment of the activity of transcription factor by oxidized LDL in macrophages. The 13th International symposium on atherosclerosis society, Kyoto (2003.9.28-10.2)
 14. Kondo T: Clinical evaluation of oxidative stress in cardiovascular disease. The 13th International symposium on atherosclerosis society, Kyoto (2003.9.28-10.2)
- 【国内学会】
1. 井上聡：[シンポジウム]エストロゲンの作用の分子機序と骨代謝、脳機能における役割 (2003.4.1) 第100回日本内科学会 (福岡)
 2. 井上聡：[シンポジウム]標的遺伝子から見たエストロゲン作用メカニズム (2003.4.4-6) 第26回日本医学会総会 (福岡)
 3. 井上聡[サテライトシンポジウム]女性ホルモンとその応答遺伝子の作用メカニズム (2003.5.9-11)第76回日本内分泌学会 (横浜)
 4. 井上聡[パネルディスカッション]ゲノムと骨：エストロゲンシグナル (2003.7.3-5) 第23回日本骨形態計測学会 (東京)
 5. 井上聡：[シンポジウム]男性ホルモンと骨－女性ホルモン受容体遺伝子改変動物の骨における雌雄差－ (2003.10.10) 第5回日本骨粗鬆症学会 (福岡)
 6. 井上聡：[シンポジウム]エストロゲン受容体標的因子の同定とその機能 (2003.12.10-13) 第26回日本分子生物学会 (神戸)
 7. 井上聡：[シンポジウム]核内情報受容から遺伝子発現への機構-病態とその

- 治療の分子レベルでのアプローチ：エストロゲン受容体応答遺伝子の病態と治療標的における役割 (2004.3.29-31) 日本薬学会第 124 年会 (大阪)
8. 浦野友彦、星野眞二郎、白木正孝、江面陽一、江見充、細井孝之、大内尉義、井上聡：骨粗鬆症における LRP5 遺伝子多型の関与 (2003.6.18-20) 第 45 回日本老年医学会学術集会 (名古屋)
 9. 星野眞二郎、井上聡、大内尉義：血中ならびに尿中 I 型コラーゲン N-telopeptide (NTx) の骨代謝マーカーとしての有用性に関する検討 (2003.6.18-20) 第 45 回日本老年医学会学術集会 (名古屋)
 10. 保母るつ子、池田和博、竹田省、井上聡：エストロゲンによって誘導される Cytochrome c oxidase subunit 7a related polypeptide (COX7RP) の発現機能解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
 11. 藤田雅代、浦野友彦、堀江公仁子、池田和博、津久井通、大内尉義、井上聡：骨芽細胞におけるエストロゲンの分子標的の探索と機能解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
 12. 市川智恵、堀江公仁子、津久井通、堺隆一、井上聡：プロテオーム解析による骨芽細胞様細胞におけるビタミン K 分子標的の同定 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
 13. 大羽沙弥佳、津久井通、今澤由起子、池田和博、堀江公仁子、久武幸司、禾泰壽、村松正實、井上聡：ER α および ER β の生体内 Gain of function による生殖機能の解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
 14. 秋下雅弘：[シンポジウム]生活習慣病に及ぼすテストステロンの影響。性ホルモンと生活習慣病：基礎と臨床 (2003.5.9) 日本内分泌学会総会 (横浜)
 15. 黄錦鴻、浅輪珠恵、高戸毅、堺隆一：マウス高転移性メラノーマ細胞の細胞運動における Fyn と cortactin の協調的役割 (2003.9.25-27) 第 62 回日本癌学会総会 (名古屋)
 16. 東浩太郎、堀江公仁子、井上聡、大内尉義、堺隆一：細胞膜近傍におけるエストロゲン受容体 α の機能解析 (2003.9.25-27) 第 62 回日本癌学会総会 (名古屋)
 17. 田中正光、鎌田礼子、堺隆一：Eph 受容体/Ephrin による細胞接着制御の解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
 18. 池田和博、菱沼俊樹、津久井通、村松正實、井上聡：ラット脳におけるエストロゲン標的遺伝子の網羅的探索 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
 19. 野本 聡、池田和博、趙建宏、香山不二雄：ラットの子宮において DREI という仮想的なアクチン結合タンパク質の mRNA のエストロゲンを介した不安定性 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
 20. 池田和博：脱リン酸化によるエストロゲン受容体転写活性の負の制御 (2004.1.15-17) 第 3 回転写研究会 (つくば)
 21. 近藤宇史：[特別講演] 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臨床応用 (2003.8.2) 第 3 回血管老化研究会 (大分市)
 22. 近藤宇史：[シンポジウム講演]Role of intranuclear translocation of glutathione S-transferase in the acquisition of cancer cells to drug-resistance (2003.8.20-22) 国際レドックスシンポジウム (札幌)
 23. 近藤宇史：婦人科癌における GST π の核内局在の関連 (2003.9.25) 第 62 回日本癌学会 (名古屋)
 24. 近藤宇史：Mitochondria-mediated

- caspase-independent apoptosis induced by doxorubicin in human lung cancer cells (2003.10.15-18) 第 76 回日本生化学会 (東京)
25. 近藤宇史: Melatonin inhibits VEGF gene expression by Doxorubicin (2003.10.15-18) 第 76 回日本生化学会 (東京)
26. 武山健一、大竹史明、加藤茂明 : [シンポジウム] (2003.10.15-18) 第 76 回日本生化学会 (横浜)
27. 柳澤純 : [シンポジウム] ユビキチン・ネットワークによる核内レセプターの制御(2003.12.12) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
28. 川辺洋一、柳澤純 : [シンポジウム]
- エストロゲンレセプター (ER α) の制御機構(2003.12.11) 第 26 回日本分子生物学会 (神戸)
29. 津久井通、今澤由紀子、大羽沙弥佳、浦野友彦、藤田雅代、佐藤美幸、村松正實、井上聡 : BGP コンディショナルトランスジェニックマウスにおける骨代謝の解析 (2003.12.10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)
30. 津久井通、井上聡 : BGP コンディショナルトランスジェニックマウスにおける骨代謝の解析 (2004.2.14) 第 7 回 Vitamin K & Bone 研究会 (東京)

分 担 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）
分担研究報告書

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

分担研究者 秋下雅弘
杏林大学医学部高齢医学助教授

【研究要旨】

エストロゲンの血管平滑筋細胞増殖抑制作用に ER α 、ER β のどちらが関与するかについて、アデノウイルスベクターを用いた ER サブタイプの発現実験により検討した。ラットおよびヒト VSMC に対する ER β の過剰発現はエストロゲンに対する VSMC 増殖抑制反応を著明に増強したが、ER α の過剰発現は影響しなかった。一方、ラット新生仔心筋線維芽細胞を用いた実験では、ER α 、ER β 共にエストロゲンの増殖抑制作用を増強したことから、ER サブタイプの増殖への影響は組織・細胞で異なることがわかった。さらに、虚弱高齢男性を対象とした横断研究では、テストステロン濃度は日常生活活動度、認知機能、意欲と有意な相関を示し、テストステロンの低下が日常生活機能の全般的低下に関係することがわかった。

A. 研究目的

動脈硬化性疾患の発症頻度には明らかな性差が存在し、その主因はエストロゲンの血管保護作用であるとされる。エストロゲンの血管への作用の多くは、エストロゲン受容体 (ER) を介したものと考えられ、実際血管構成細胞である血管平滑筋細胞、内皮細胞には ER の遺伝子、蛋白が発現している。1996年、新しい ER サブタイプ遺伝子がクローニングされ ER β と命名されたが、ER β のエストロゲンとの結合性は従来型の ER α と同等であるが、組織分布と転写制御に異なる点があり、エストロゲンに対する反応性の相違がこれら 2 種類の ER で説明できる可能性がある。また、正常血管組織における ER α 、 β の発現と、血管傷害後の修復過程である血管リモデリングにおけるそれらの発現には相違があり、その

ことが血管病変の形成に関与している可能性がある。しかし、動脈硬化、冠動脈形成術後再狭窄など血管病変の発症進展における ER サブタイプの意義は殆ど解明されていない。これまでに、エストロゲンが血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) および心筋線維芽細胞 (cardiac fibroblasts, CF) の増殖を抑制し、エストロゲンによる心血管病変抑制作用に関与するとの結果が我々もしくは他のグループから報告されているが、いずれの ER サブタイプがそれらの作用を媒介するのかは不明であった。そこで今年度は、エストロゲンによる VSMC および CF 増殖調節における ER サブタイプの意義を明らかにすることを目的として、アデノウイルスベクターを用いた過剰発現実験による検討を行った。

本研究ではさらに、男性ホルモンであ

るテストステロンの動脈硬化における意義を検討することを目的とした。従来、エストロゲンの抗動脈硬化作用に対してテストステロンは動脈硬化促進的に働くと考えられてきた。実際、筋肉増強目的など健常人におけるテストステロン服用はアンドロゲン過剰状態を作り出し、循環・代謝異常を来す。しかし最近では、高齢男性におけるテストステロン濃度の低下が動脈硬化性疾患の危険因子であることを示唆する報告が多くみられるようになり、動脈硬化に関連して脳機能をはじめとする諸機能が低下するとされる。そこで今年度は予備的検討として、日常生活機能の軽度低下した高齢男性を対象として血中テストステロン濃度と日常生活機能との関連について検討を行った。

B. 研究方法

(1) SMC および CF 増殖における ER サブタイプの役割

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 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 -アクト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。

(2) 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

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 ± 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。

(3) 倫理面への配慮

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。

C. 研究結果

(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。ノーザンおよびウェ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。図 1 および図 2 に示したように、AxCAER α を感染させた VSMC で

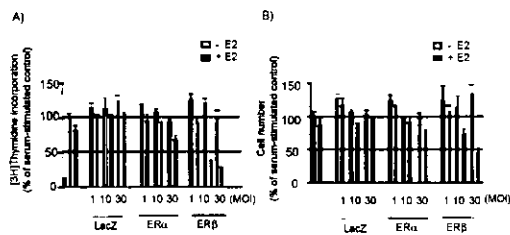


図1. VSMC増殖に対するERサブタイプ過剰発現の効果

3種類のアデノウイルスベクター (AxCALacZ, AxCAER α , AxCAER β) を感染させたラットVSMCを、E2 100 nmol/L 存在下もしくは非存在下で、5% DCC-FBS により増殖させ、³Hthymidine の取り込み (A) および細胞数 (B) を測定した。

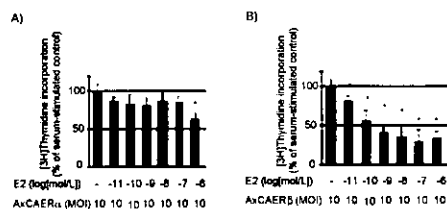


図2. VSMC増殖に対するERサブタイプ過剰発現の効果；E2の濃度依存性

AxCAER α (A) もしくはAxCAER β (B) を感染させたラットVSMCを、表示したE2存在下で5% DCC-FBS により増殖させ、³Hthymidine の取り込みを測定した。^{*}p<0.05 vs E2 (-)

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 (図1、図2)。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 (図1)。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 (図2)。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 (図2)。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 (図3)。VSMC 増殖抑

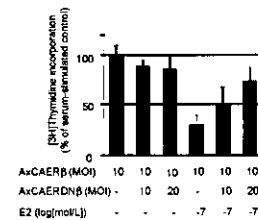


図3. ER β に対するドミナントネガティブERの拮抗作用

ラットVSMCにAxCAER β 単独感染もしくはAxCAERDN β の共感染によりドミナントネガティブERを発現させ、E2 100 nmol/L 存在下もしくは非存在下で³Hthymidine の取り込みを測定した。

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確認した。

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 へ 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、AxCAERDN 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