

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(図4)。また、この増殖抑制作用は低濃度

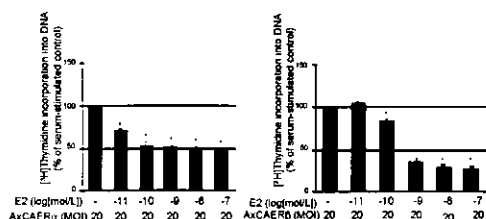


図4. CF増殖に対するERサブタイプ過剰発現の効果
AxCAER α (A) もしくはAxCAER β (B) を感染させたラットCFを、表示したE2存在下で5% DCC-FBSにより増殖させ、³H]thymidineの取り込みを測定した。
*p<0.05 vs. E2(-)

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へ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。

(3) 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1)。年齢、

表1. 日常生活機能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±SD (Range)	73±27 (5-100)	2.1±2.0 (0-5)	18±7 (2-29)	6.3±3.1 (1-13)	8.8±1.8 (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HDSR($\beta=0.403$, $p=0.03$) 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。

D. 考察

(1) VSMC および 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 サブタイプ間でのような差異があるのでしょうか？また、VSMC と CF で結果が異なる理由は何でしょうか？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。

(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

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、従来の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。

E. 結論

血管平滑筋細胞では ER β が、心筋線維芽細胞では ER α 、ER β 両方のサブタイプがエストロゲンの増殖抑制作用を媒介する。また、高齢男性では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。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

【英文原著】

1. 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
2. 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
 3. Eto M, Toba K, Akishita M, Kozaki K, Watanabe T, Kim S, Hashimoto M, Sudoh N, Yoshizumi M, Ouchi Y: Reduced endothelial vasomotor function and enhanced neointimal formation after vascular injury in a rat model of blood pressure lability. *Hypertens Res* 26, 991-998, 2003
 4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. 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
2. 学会発表
- 【国内学会】
1. 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）
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

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

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その応用

分担研究者 堺 隆一

国立がんセンター研究所 細胞増殖因子研究部部长

【研究要旨】

ステロイドホルモンは多くの組織で多様な生理作用を持つことがわかっており、その機序としては主として核内で受容体と結合して転写制御に関わる genomic な作用を中心に研究が進められてきたが、ここ数年来、血管細胞、神経細胞、骨芽細胞、乳癌細胞など多種の細胞で、シグナル伝達に関わる分子群に細胞膜や細胞質で直接働きかけ、短時間でその効果を表す non-genomic な作用の存在が示唆されてきている。本研究ではこれらの non-genomic な作用がどのような分子を介して、どのような生理機能を、どの程度制御しているのかを明らかにすることを目的として、細胞膜で発現させたステロイド受容体のリン酸化、複合体形成の解析や、ステロイド刺激による細胞内シグナル伝達系への影響の解析を行い、そのような新規のステロイド作用に関する情報を得ようとするものである。脳・血管・骨等の組織におけるステロイドの量的変化と細胞老化とのかかわりを、non-genomic 作用からも理解することにより、そのシグナル経路などを標的とした新しい治療薬の開発にもつながるものと考えられる。

A. 研究目的

哺乳類のステロイドホルモンは様々な生理活性を有しているが、その本体は低分子量の脂溶性分子である。疎水性のホルモン分子は標的細胞の細胞膜を通過した後、特異的な受容体蛋白質と結合し、DNA と結合能を獲得して、核内に蓄積する。エストロゲンでは α 型レセプター (ER α) と β 型レセプター (ER β) が組織特異的に準備されており、エストロゲンと結合したレセプターによる核内転写活性の変化が、その主たる生理作用をもたらすと長年考えられてきた。このいわゆる classical な作用は、エフェクター蛋白質の発現レベルでの調節を介するため、効果を現すまで数十分から数時間かかると

考えられる (図1)。ところが、ステロイドホルモンには、これより遥かに短い時間経過で観察される生理作用も存在することが以前より知られており、転写因子としての働きを介さず、細胞質内でのシグナル伝達を介して、即時型反応を引き起こす non-genomic な作用と呼んで区別されてきたが、その詳細については全くわからなかった。この数年来の研究により、細胞内シグナル伝達とエストロゲン即時反応をつなぐデータが相次いで紹介された。神経細胞、骨芽細胞、卵巣細胞、乳癌細胞など多くの細胞では、エストロゲンの刺激後、すぐに増殖因子のシグナル伝達に関わる Ras-Raf-MAP キナーゼ系のシグナル伝達経路が活性化するこ

とが見出された。また血管上皮細胞ではエストロゲンが数分間で、Ras-MAP キナーゼと PI3 キナーゼ-AKT 経路を活性化し、血管内皮細胞性 NO 合成酵素 (eNOS) 活性を上げることにより NO 産生を促し、血管に対して生理的な保護作用をもたらすことがわかったが、これにはエストロゲン受容体がシグナル伝達分子として関わっていることが示唆された。

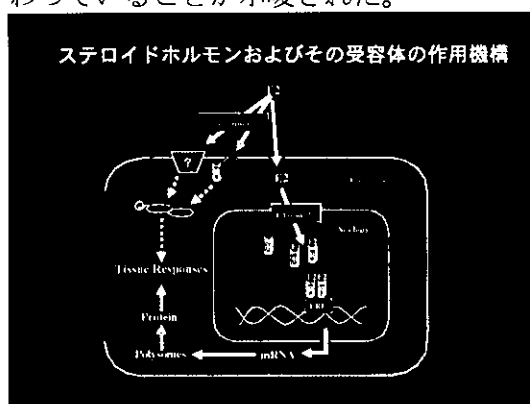


図 1

以上のようにエストロゲンは核外に微量に存在するエストロゲン受容体を介して、あるいは未知の別の受容体分子を介してその non-genomic なシグナルを伝えると考えられているが (図 1)、受容体を介した non-genomic 作用の解析が特に成果を上げつつある。最近ではステロイドホルモン受容体は Src キナーゼと相互作用して、Src を活性化しその結果として Ras や下流の Erk-2 の活性化と細胞の増殖亢進をもたらすという報告や、アダプター分子 Shc との直接結合によりその下流の Ras-MAPK 経路のシグナルを ON にする主張するグループもある。Kousteni らは、卵巣除去手術や精巣除去手術を行ったマウスで骨芽細胞のアポトーシスが著明に増加する現象を解析し、エストロゲン受容体やアンドロゲン受容体がリガンド依存性に Src/Shc/Erk の活性化を引き起こし、これらの細胞のアポトーシスを誘導する non-genomic な作用を提唱している。以上のようにこれまで得られたデータを統合すると、細胞膜から核につな

がるユニークなステロイド特異的シグナル伝達の存在を示唆するが、情報はあくまで断片的であり、それぞれのデータはまだ相容れない部分も多い。

本研究はここ 2~3 年で急速にデータが集まりつつある、ステロイド刺激による細胞膜及び細胞質の蛋白質群を介したシグナル伝達に焦点を当て、ステロイドが種々の生理機能を発揮するにあたって、核外においてどのような複合体を介したシグナルがどのような機序で形成されるのかを明らかにすることを目的とする。そのために老化の引き金として重要性が示されているエストロゲン及びエストロゲン受容体のシグナルに的を絞ったり、細胞内局在や結合能に影響を与える受容体の変異体などを用いつつ研究を行う。細胞としてはモデル系として研究が進んでおり材料の調整のしやすい腫瘍細胞で系を立ち上げるが、最終的には老化における重要性に鑑み、神経細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞・破骨細胞などを用いて、これらの細胞に対するエストロゲンの保護作用が、細胞内シグナル伝達によって、どのような繊細な調節を受けているのかを明らかにすることを目的とする。これらの細胞内シグナル伝達経路を明らかにすることができれば、それを標的として新しい作用機序の老化治療薬の開発につながる可能性があると考えられる。

B. 研究方法

図 2 に示す通り、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する。

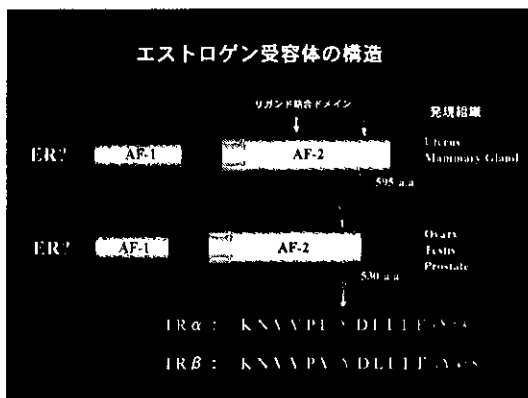


図 2

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 (図 2) 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結合のコントロールとして、この部位をフェニル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する。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する。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する。AF-2 についてはその結合がチロシンリン酸化依存性であるかどうかを、537F 変異体と比較することにより明らかにする。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する。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る。

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開始する。

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る。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する。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する。

C. 研究結果

図 3 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。



図 3

また図 4 に示すように、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。

我々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。

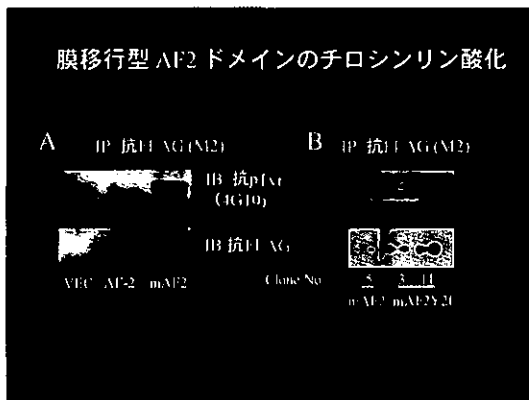


図 4

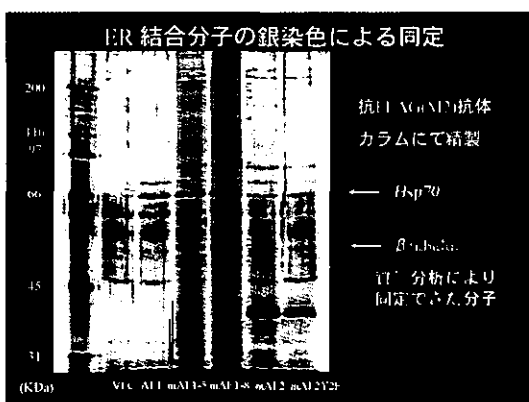


図 5

図 5 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。図 6 に示すように特異的抗体を用いたウエスタンブロッティングで 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。

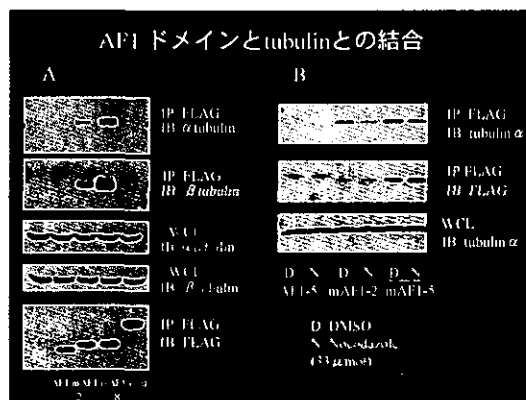


図 6

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。

D. 考察

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のが、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。

E. 結論

ステロイドホルモンの non-genomic な作用についての情報はここ数年の間で驚くほど蓄積されてきているが、その分子メカニズムの詳細については本研究を含めた今後の研究に期待される部分が多い。また情報のみが先行して、個々の報告の一貫性や再現性に問題が残るケースも残念ながら多い。ステロイドの多彩な生理

機能について深く理解するためには、立ち遅れてきたこの分野の研究が今すぐに求められているといえるが、むしろ立ち遅れているからこそ、しっかりしたデータと分子機構に基づいた情報を発信していく必要がある。エストロゲン受容体と細胞骨格や膜蛋白質との結合は、細胞の接着、運動性など今までスポットを浴びてこなかった分野におけるエストロゲンの役割を照らし出す可能性もあり、老化という生命現象とエストロゲンとのつながりを考える上で新しい切り口を与える可能性がある。またエストロゲンの多種の臓器におけるそれぞれの作用の調節機構をシグナル伝達の立場から正確に理解することにより、エストロゲン補充療法における造腫瘍効果などの副作用を切り離した、有効な治療法の開発などにもつながるものと考えられる。具体的には特定のシグナル伝達分子間の結合を阻害する分子の設計により、単一のシグナル経路のみのブロックする可能性も生まれ、エストロゲンのアンタゴニストや受容体の機能阻害などよりも細かい調節薬を設計できる可能性もある。特に痴呆、動脈硬化、骨粗鬆症などの症状に対してどのような機序でエストロゲンが予防的に働き得るかを新しい方向から解明を目指すことにより、これらの老化に伴う病態を完全に理解し、新しい治療法の開発の可能性を生むものと考えられる。

F. 発表

1. 論文発表

1. Tanaka M, Ohashi R, Nakamura R, Shinmura K, Kamo T, Sakai R, Sugimura H: Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2. *EMBO J*, 2004, in press
2. 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

2. 学会発表

【国際学会】

1. 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)
2. 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)
3. 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 (2004.1.25-29)

【国内学会】

1. 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)
2. 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)
3. 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)

厚生労働科学研究費（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 池田和博
埼玉医科大学ゲノム医学研究センター遺伝子情報制御部門助手

【研究要旨】

ステロイドホルモンであるエストロゲンは骨粗鬆症、動脈硬化、心疾患、痴呆などの老化に伴う疾患に対して予防、治療効果を有しているが、その作用は転写因子であるエストロゲン受容体（ER）を介して発揮される。ER α の118番目のセリン残基（S118）のリン酸化は細胞増殖因子とエストロゲンの2つの独立した経路によって行われ、ERの転写活性化に関わっている。酵母 two-hybrid スクリーニング法を用いて、ERと結合する因子としてPP5 (protein phosphatase 5)を単離した。GST pull-down、哺乳類 two-hybrid アッセイ、免疫沈降法を用いてこれら両者の結合様式を解析したところ、PP5のTPRドメインとERのEドメイン前半領域がその結合に携わることを見いだした。PP5はエストロゲンおよびEGF刺激によるER α S118のリン酸化を抑制することをリン酸化ER α S118に特異的な抗体を用いて証明し、同時にERの転写活性を抑制することを明らかにした。さらに、エストロゲン標的遺伝子であるpS2、c-Myc、CycD1のエストロゲン応答性の発現をPP5が減少させることをノーザンブロット法にて示した。本研究において、ERの脱リン酸化に関わり転写活性を負に制御するPP5を明らかにできたことは、老年病に深く関わるエストロゲンの作用メカニズムを解明する上で、新たな分子標的としてのPP5の可能性を示唆すると考えられた。

A. 研究目的

ステロイドホルモンであるエストロゲンは、女性のライフサイクルにおいて重要な役割を担っているが、老化に伴う卵巣機能の低下（閉経）によりその産生量は低下する。このエストロゲンの減少は閉経後の骨粗鬆症、動脈硬化、心疾患などの発症頻度を上昇させると考えられている。実際、エストロゲン剤を用いた補充療法により特に閉経後骨粗鬆症の危険率は減少することが知られている。このようにエストロゲンは老化に伴う種々の

疾患に影響を及ぼすが、一方で乳癌や子宮癌においては増殖促進作用を有することも明らかになっており、組織特異的なエストロゲン作用機構の解明とそれに基づく作動薬の開発が望まれている。

エストロゲンは核に存在するリガンド依存性の転写因子である二つのエストロゲン受容体（ER α 、ER β ）に結合して活性化し、その標的遺伝子の発現量を直接制御することによりその機能を発揮する。ERには2つの転写活性化領域が存在している。1つはエストロゲンと結合する

ことにより活性化される AF-2 と呼ばれる領域で、転写共役因子であるコアクチベーターと相互作用し、リガンド依存性の転写活性化を担っている。もう一つは恒常的な転写活性化能を有する AF-1 と呼ばれる領域である。ER の転写活性化にはリン酸化制御も重要な働きを担っており、ER α の AF-1 には ER の主要なリン酸化部位である 118 番目のセリン残基が存在している。このリン酸化は EGF などの細胞増殖因子刺激による MAPK を介して行われ、また同時にエストロゲン刺激によって基本転写因子の 1 つである CDK7 を介して行われ、細胞増殖因子とリガンドによる ER 転写制御のクロストークの場としても重要な機能を担っている。このような ER の転写調節機構を明らかにすることはエストロゲンの老化に伴う疾患における作用メカニズムを明らかにし、新たな治療や予防法の開発に寄与すると考えられた。これらのエストロゲン標的遺伝子の解析を通じて痴呆、動脈硬化、骨粗鬆症を始めとする老年病におけるエストロゲンの特異的作用機構を解明し、これらのエストロゲン標的遺伝子の老年病の予防や治療における新たな標的分子としての有用性を探ることを目的とする。

B. 研究方法

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エ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。

C. 研究結果

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 (図 1)。また、哺乳類細胞を

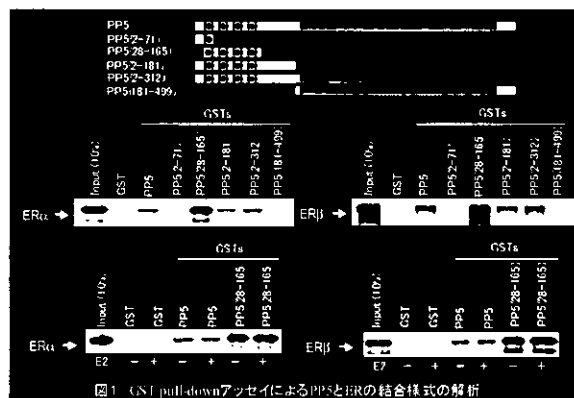


図1 GST pull-downアッセイによるPP5とERの結合様式の解析

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 (図 2、図 3)。また、ER のエスト

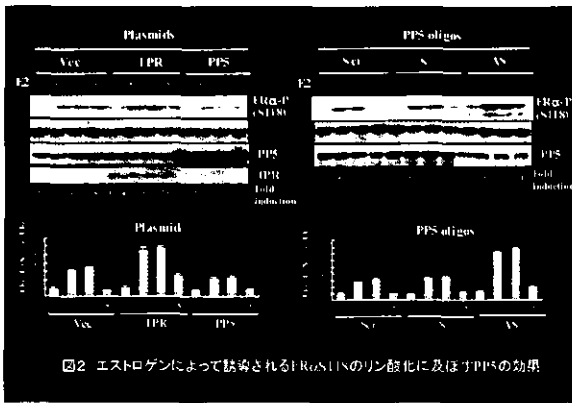


図2 エストロゲンによって誘導されるER α S118のリン酸化に及ぼすPP5の効果

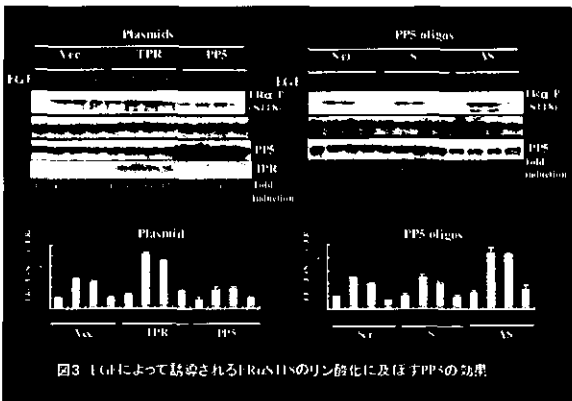


図3 EGFによって誘導されるER α S118のリン酸化に及ぼすPP5の効果

ロゲン依存性の転写活性化に及ぼす PP5 の影響をルシ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 4)。この時、ER α S118 をアラニン(S118A)またはグルタミン酸(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

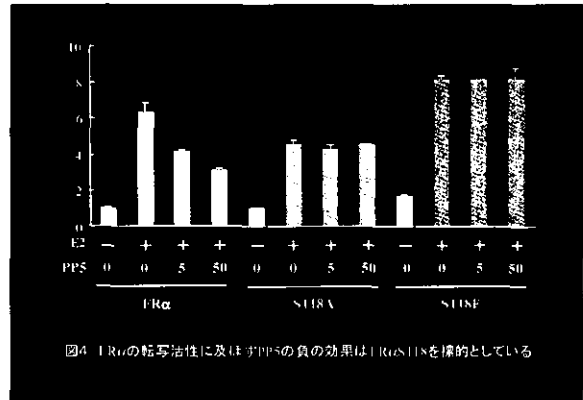


図4 ER α の転写活性に及ぼすPP5の負の効果はER α S118を標的としている

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 (図 5)。

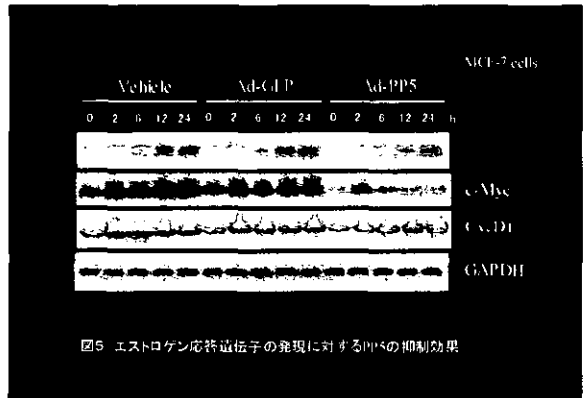


図5 エストロゲン応答遺伝子の発現に対するPP5の抑制効果

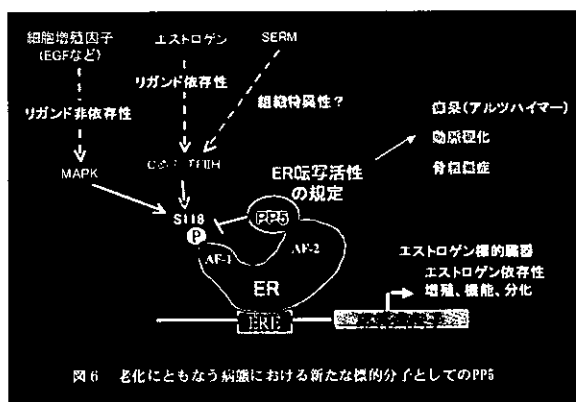
D. 考察

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 6)。



E. 結論

ER に相互作用する因子として脱リン酸

化酵素である PP5 を同定した。PP5 は細胞増殖因子とエストロゲンによって誘導されるリン酸化 ER α S118 の脱リン酸化に関与し、転写活性を負に制御することを示すことができたことから、これまで明らかではなかった ER の脱リン酸化制御の一端を解明することができた。このことは、老化に伴う病態におけるエストロゲンの作用を解明する上で、新たな分子標的としての PP5 の可能性を示唆することができると考えられた。

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. 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.
3. 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
4. Kayama F, Ikeda K, Arao Y, Otsuka H, Nomoto S, Horiguchi H: Mechanisms of action and physiological functions of naturally occurring and man-made xenoestrogens. *J UOEH* 25, 161-167, 2003

2. 学会発表

【国際学会】

1. 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)

【国内学会】

1. 池田和博、井上聡：エストロゲンシグナルの負の調節因子 (2003.3.14-15) 第2回ステロイドホルモンを考える会 (東京)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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 DRE1 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)
7. 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)

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

エストロゲン受容体を介した細胞保護作用に対するレドックス制御分子の意義

分担研究者 近藤宇史

長崎大学医歯薬総合大学院医学研究科附属原爆後障害医療研究施設
放射線障害研究部門分子情報制御研究分野教授

【研究要旨】

レドックス研究は情報伝達キナーゼや転写因子の SH 基修飾を介して活性を制御するもので、ステロイドホルモン作用の分子標的を検討する上で重要である。本研究は、エストロゲン受容体シグナルの制御に及ぼすレドックスの意義を明らかにすることを目的とする。実験は、グルタレドキシシン（GRX）遺伝子を高発現させたラット心筋細胞株（H9c2-GRX）を樹立し使用した。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 時間処理をした後に生存細胞を測定すると、コントロールに比べて H9c2-GRX では酸化ストレスで死亡する細胞が著明に減少した。これらのホルモンが示す細胞保護作用に、レドックスを介して、抗アポトーシス作用を示す Akt 活性の上昇や、抗酸化分子グルタチオンの合成酵素 GCS の発現調節が関与することが明らかとなった。ここれらの結果はステロイドホルモンシグナルの抗老化作用の機序解明に寄与するものである。ホルモン作用を制御する新しい標的分子の検索に貢献すると考えられる。

A. 研究目的

心疾患の頻度が女性で低く、閉経後に高くなることはよく知られている。これは、ステロイドホルモンの中で特にエストロゲンが心筋細胞の活性酸素による障害を防御することが一因であると考えられてきた。最近エストロゲンが抗酸化酵素（Persky et al.）やカリウムチャンネル（Ranki et al.）の遺伝子発現を上昇させることが報告されているが、その詳細な機構はまだ明らかではない点が多い。生体内でグルタチオンなどの抗酸化分子とその関連酵素は活性酸素を消去することによって細胞保護作用を示すのみならず、レドックス（酸化・還元）の調節を介して細胞内シグナルや転写因子の活性を調

節することによって細胞機能を調節する。そこで、本研究は、エストロゲン受容体シグナルの制御に及ぼすレドックスの意義を明らかにすることを目的とする。レドックスは情報伝達に働くキナーゼや転写因子の活性中心に存在する SH 基をグルタチオンや NO 分子が修飾することによってそれらの活性を制御するもので、この機構を明らかにすることは、ステロイドホルモン作用の分子標的を検討する上で極めて重要な課題である。

B. 研究方法

1) コントロールとしてラット心筋細胞株 H9c2 を用いる。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する。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。

C. 研究結果

- 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 (Fig. 1) Hoechst 染色法 (Fig. 2) 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 (Fig. 3)、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 (Fig. 4)、ホルモンの抗アポトーシス作用の重要な一要因であることが推測された。

図1 H9c2 細胞に終濃度 100nM のエストラジオール、80μM のコルチゾールをそれぞれ添加し 24 時間培養を行った。次いで未処理の細胞をコントロールとし、それぞれに終濃度 100μM となるよう過酸化水素を添加した。添加 4 時間後に細胞を集め MTT 法により細胞の生存率を測定した。

Fig. 1 Effect of hormones on the cell survival of oxidative stress exposed rat cardiomyocytes.

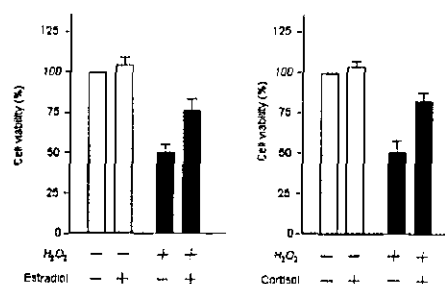


図2 図1と同条件で培養し処理した細胞にヘキスト 33342 を添加し核染色を行った。次に蛍光顕微鏡で細胞の核を観察しアポトーシスの検討を行った。

Fig. 2

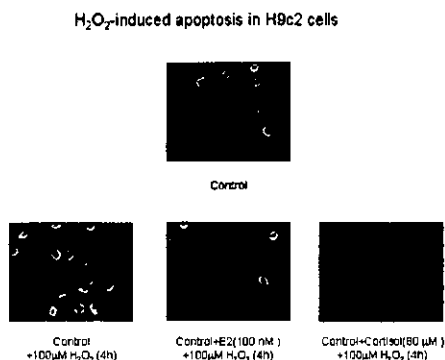


図3 H9c2 細胞に終濃度 100nM のエストラジオール、80µM のコルチゾールをそれぞれ添加し 24 時間培養を行った。未処理の細胞をコントロールとした。各細胞をハーベストし酵素リサイクリング法を用いてグルタチオン含量を測定した。

Fig. 3

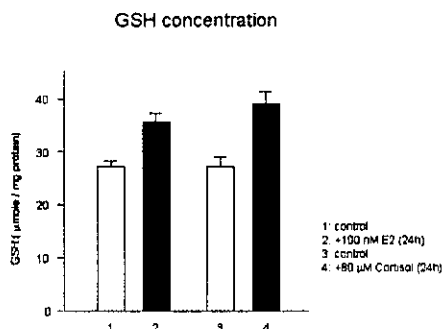
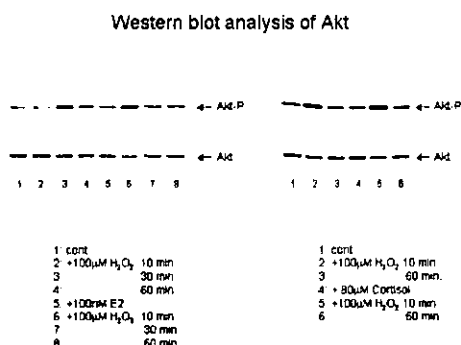


図4 図1と同条件で行った。過酸化水素添加後 10, 30, 60 分で細胞をハーベストしウエスタンブロット法を用いて Akt のリン酸化を測定した。

Fig. 4



D. 考察

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。

E. 結論

1) 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、抗アポトーシス作用を示す Akt 活性の上昇や、抗

酸化分子グルタチオンの合成酵素 GCS の発現調節が関与することが始めて明らかとなった。

- 2) エストラジオールやグルココルチコイドが細胞の機能を調節する因子であるレドックス関連因子にも働く可能性が示唆された。
- 3) これらの結果はステロイドホルモンシグナルの抗老化作用の機序解明に寄与するものである。ホルモン作用を制御する新しい標的分子の検索に貢献すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

【英文原著】

1. 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
2. Muroya T, Ihara Y, Ikeda S, Yasuoka C, Miyahara Y, Urata Y, Kondo T, Kohno S: Oxidative modulation of NF- κ beta Signaling by oxidized low-density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 309, 900-905, 2003
3. Muta K, Masuzaki H, Urata Y, Goto S, Ishimaru, T, Kondo T: Gene expression of nitric oxide synthase and heme oxygenase in placental villi during pregnancy with and without intrauterine growth restriction. *J Clin Biochem Nutr* 32, 11-21, 2004
4. Mitsuta K, Matsuse H, Fukushima C, Kawano T, Tomari S, Obase Y, Goto S, Urata Y, Shimada T, Kondo T, Kohno S: Production of TNF-alpha by peripheral blood mononuclear cells through activation of nuclear factor κ B by specific allergen stimulation in patients with atopic asthma. *Allergy Asthma Proc* 24, 19-26, 2003
5. Atarashi R, Nishida N, Shigematsu K, Goto S, Kondo T, Sakaguchi S: Deletion of

N-terminal residues 23-88 from prion protein (PrP) abrogates the potential to rescue PrP-like protein/Doppel-induced neurodegeneration. *J Biol Chem* 278, 28944-28949, 2003

6. Okuno S, Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Tamba M, Sohda S, Hamada H, Yoshikawa H, Kondo T, Bannai S: Role of cystine transport in intracellular glutathione level and cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. *British J Cancer* 88, 951-956, 2003
7. Shimizu K, Naito S, Urata Y, Takamiyagi A, Bae SJ, Ogawa F, Kondo T, Katayama I: The induction of heme oxygenase-1 by exogenous nitric oxide in ex vivo normal human skin. *J Dermatol* 30, 17-25, 2003
8. Ohira A, Tanito M, Kaidzu S, Kondo T: Glutathione peroxidase induced in rat retinas to counteract photic injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 1230-1236, 2003

2. 学会発表

【国際学会】

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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. 近藤宇史：[シンポジウム]核内核酸化機構と癌薬剤耐性 (2003.5.17-18) 第 89 回財団法人基礎腫瘍学研究会 (札幌)
2. 近藤宇史：放射線が誘導する細胞の分化増殖を制御する遺伝子群の検討 (2003.6.1) 第 44 回原子爆弾後障害研究会 (広島)
3. 近藤宇史：[シンポジウム]グルタチオン関連酵素の細胞内局在とアポトーシスシグナルに及ぼす影響 (2003.7.22) 第 5 回 21 世紀 COE プログラム (長崎)
4. 近藤宇史：[特別講演] グルタチオン関連酵素の細胞内局在とアポトーシスシグナルに及ぼす影響の検討 (2003.7.28-31) メディカルサイエンスの最前線 (北大) (札幌)
5. 近藤宇史：[特別講演]慢性酸化ストレスによる血管マクロファージ機能の変化 (2003.7.28-31) メディカルサイエンスの最前線 (北大) (札幌)
6. 近藤宇史：[特別講演]ハンマーヘッドリボザイムによるグルタチオン合成遺伝子の制御と多剤耐性がんの克服 (2003.7.28-31) メディカルサイエンスの最前線 (北大) (札幌)
7. 近藤宇史：[特別講演]小胞体分子シャペロンによる心筋細胞分化とアポトーシスの制御 (2003.7.28-31) メディカルサイエンスの最前線 (北大) (札幌)
8. 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)
9. 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)
10. 近藤宇史：長時間の酸化 LDL の暴露によるマクロファージの機能低下 (2003.9.27-28) 第 35 回日本動脈硬化学会総会 (京都)
11. 近藤宇史：ヒト動脈硬化病変における酸化ストレスマーカーの測定と評価 ヒト動脈硬化病変における酸化ストレスマーカーの測定と評価 (2003.9.27-28) 第 35 回日本動脈硬化学会総会 (京都)
12. 近藤宇史：Impairment of the activity of transcription factor by oxidized LDL in macrophages (2003.9.28-10.2) 国際動脈硬化学会 (京都)
13. 近藤宇史：clinical evaluation of oxidative stress in cardiovascular disease (2003.9.28-10.2) 国際動脈硬化学会 (京都)
14. 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)
15. 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)
16. 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)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 武山健一
東京大学分子細胞生物学研究所助手

【研究要旨】

性ステロイドホルモン作用機構を分子および個体レベルで評価・解析するため、性ステロイドホルモンレセプター(ER α 、AR)転写共役因子群ならびにアンドロゲン依存的に発症する球脊髄性筋萎縮症の神経変性制御因子群に着目した分子遺伝学的機能解析を試みた。ER α およびARの転写共役因子群と示唆されるヒストン修飾やRNA結合因子と機能が予想される複数遺伝子の同定に成功した。またポリグルタミン伸長異常ARが示す神経変性を指標とした神経変性制御因子の遺伝学的探索からアンドロゲン依存的相互作用因子の取得に成功した。その結果、ヒストン修飾を伴うクロマチン構造変換制御の機能破綻による神経変性機構が存在することが示唆された。

A. 研究目的

老化の促進や老年性病態惹起の主要因の一つには遺伝子発現機構の衰退や破綻、それに伴う細胞機能の衰退があげられる。中でも高齢化に伴う性ステロイドホルモンの減少は老年病進行を促すが、これは性ステロイドホルモンが様々な組織にて遺伝子発現を厳密に制御し、多彩な生理作用を発揮していることに起因すると考えられている。従って、性ステロイドホルモン作用機序の分子レベルの解明は老年病の予防・治療法開発に非常に重要であると考えられる。

性ステロイドホルモンであるエストロゲンおよびアンドロゲンは、リガンド依存的に標的遺伝子を発現制御する転写制御因子である核内レセプター[エストロゲンレセプター(ER α , β)およびアンドロゲンレセプター(AR)]を介し時期や組織特異的に生理作用を表している。これらレセプターの転写制御メカニズムは種々の

転写共役因子複合体群とのリガンド依存的な相互作用により、ヒストン修飾を主とする染色体構造変換により厳密に制御され発揮すると考えられている。すなわちステロイドホルモン作用は時期や組織特異的な転写共役因子複合体群の機能および選択性により染色体構造変化を介した特異的標的遺伝子の転写制御により表れると考えられる。従ってステロイドホルモン生理作用を理解する上で染色体構造変換を介する核内レセプター転写共役因子複合体群の探索・性状解析は必須と考えられる。

一方これら核内レセプター遺伝子変異は数多くの遺伝病をもたらすことが知られている。これら遺伝病は性ステロイドシグナルが破綻した表現系を呈しており、核内レセプターの高次生命機能を知る上で重要な手掛かりとなっている。中でもAR遺伝子変異による遺伝病の一つにグルタミンリピート伸長異常による遺伝病、