

20030786

厚生労働省科学研究費補助金

(難治性疾患克服研究事業)

副腎ホルモン産生異常に関する研究班

Health and Labour Sciences Research Grants (Research on Measures for Intractable Diseases)

“Disorders of adrenal hormones” Research Committee, Japan 2003

平成15年度研究報告書

平成16年 3月

主任研究者 名和田 新

はじめに

厚生労働省科学研究費補助金による特定疾患対策研究事業の「副腎ホルモン産生異常に関する研究」班は、主任研究者として宮地幸隆教授のもとで、平成11年より平成13年の3年間の第一期を終え、その実績は班員の先生方の御尽力により高く評価され、平成14年より3年間の第二期が宮地幸隆教授のもとで引き続きスタートしました。

しかし宮地教授は平成15年1月23日、突然病気で御逝去され、私達は晴天の霹靂で断腸の思いでありました。今迄の先生の御指導に心より感謝しご冥福をお祈りしました。

宮地教授の前任の主任研究者を務めていました事より、私が残りの2年間で主任研究者として、研究を継続して行く事になりました。宮地教授の方向に沿って研究を進めさせていただきました。

(1)先天性副腎低形成症(先天性アジソン病)(2)ステロイドホルモン不応症(3)副腎腫瘍(4)副腎性血圧異常症の4つを研究対象として、この領域を専門に活躍されている分担研究者7人と研究協力者13人に新たにお問い合わせしました。

平成16年1月30日(金)に「副腎ホルモン産生異常に関する研究」班の研究報告会を東京で開催しました。

1. 先天性副腎過形成(副腎酵素欠損症)、先天性副腎低形成症

Ad4BP/SF-1、Dax-1をはじめCOUP-TF、Foxo 1などの転写因子、プロテインキナーゼ SIK、層特異的な発想パターンを示す IZA、ZOGなどが、副腎の発生、分化、層構造形成、ステロイドホルモン合成酵素遺伝子発現において果たす役割を解明しました。

2. ステロイドホルモン不応症

グルココルチコイドレセプター(GR)と転写共役因子、クロマチン構造変換因子 SWI/SNF などとの相互作用、GR β の意義、GR の転写活性化能と転写制御機能の分離を明らかにしました。

3. 副腎腫瘍

副腎偶発腫の疫学的長期予後調査に関して、頻度、病因、腫瘍の大きさやホルモン分泌能の変動等について prospective な調査を継続しました。

核内レセプター Ad4BP/SF-1 および COUP-TF、ならびにそれらと相互作用する SUMO 化酵素である Ubc 9 および PIAS-1、HDL 受容体 CLA-1、ステロイド合成酵素遺伝子の異常について検討しました。

4. 副腎性高血圧

原発性アルドステロン症の診断における内分泌学的負荷試験および副腎静脈サンプリングの意義の再検討、ミネラルコルチコイドレセプター(MR)の転写因子としての性状および共役する補助因子群の検索、ミネラルコルチコイド高血圧におけるカリウムと臓器障害、11 β HSDtype 1 および type 2、うっ血性心不全における MR の関与と抗アルドステロン剤の有効性を検討しました。

以上本研究班で対象とした疾患の病因の解明、診断法や治療法の発展、副腎ホルモ

ンの合成および作用について分子生物学的研究から臨床的研究により多くの成果をあげました。

なお来年度は第二期の最後の年になります。今後共この班が発展するため、中間評価にありましたように、これまでの成果にもとづき、遺伝子操作マウスを含め動物モデルを導入し、病態の解明と治療法の開発を行い EBM を目指して頂きたいと思えます。本研究班の目標に向かって御尽力頂きました分担研究者および研究協力者の方々に心から感謝致しますと共に、多くの御助言を頂きました厚生労働省健康局疾病対策課の方々に厚く御礼申し上げます。

平成16年3月1日

主任研究者 名和田 新

目 次

総括研究報告

主任研究者 名和田 新 1

分担研究報告

(1) 副腎発生・分化、ステロイド合成酵素

1. 副腎皮質の発生初期過程に関する解析 7
岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 諸橋憲一郎
2. Forkhead transcription factor Foxo 1 の
副腎および性腺における発現・機能に関する研究 11
旭川医科大学小児科 藤枝 憲二、向井 徳男
3. 塩誘導性キナーゼ (SIK) による cAMP 依存的遺伝子の発現制御 16
大阪大学大学院生命機能研究科細胞ネットワーク研究室 岡本 光弘
4. PKA による Ad4BP/SF-1 の転写活性化機構 21
九州大学病態制御内科 (第三内科)
柳瀬 敏彦、范 呉強、野村 政壽、
岡部泰二郎、後藤 公宣、名和田 新
5. 副腎低形成における HDL 受容体 CLA-1 の役割に関する研究 29
香川大学医学部第一内科 村尾 孝児、井町 仁美、曹 聞銘、
郁 暁、高原 二郎、石田 俊彦

(2) 原発性アルドステロン症

6. アルドステロン産生における
COUP-TF および SF-1/Ad4BP の機能解析 35
慶應義塾大学保健管理センター、同医学部内科、
横浜市立大学大学院医学研究科微細形態学
柴田 洋孝、栗原 勲、小林佐紀子、須田 徳子、
横田 健一、池田やよい、齋藤 郁夫、猿田 享男
7. アルドステロン産生腺腫での非腫瘍側正常副腎からの
アルドステロン分泌動態に関する研究 43
横浜労災病院内科、社会保険中央総合病院内科糖尿病内分泌科
西川 哲男、大村 昌夫、齋藤 淳、祖山 暁子、伊藤 浩子
8. 内分泌学的負荷試験によるアルドステロン産生腺腫と
特発性アルドステロン症の鑑別に関する研究 48
京都大学内分泌代謝内科
宮下 和季、伊藤 裕、山原 研一、政次 健、
曾根 正勝、小林 (万木) 貴美、朴 貴典、中尾 一和

9. 原発性アルドステロン症に対する臨床的検討 52
大阪大学大学院医学系研究科臓器制御医学 器官制御外科学(泌尿器科学)
辻畑 正雄、吉村 一宏、奥山 明彦

10. CYP11B2 の遺伝型～表現型相関：
正常副腎・原発性アルドステロン症における検討 58
岐阜大学医学部内分泌代謝病態学分野
宗 友厚、諏訪 哲也、武田 純

(3) ミネラルコルチコイド、MR

11. ステロイドホルモンレセプターの
転写制御メカニズムの解明に関する研究 67
東京大学分子細胞生物学研究所 加藤 茂明
12. 選択的アルドステロン受容体拮抗薬
(エプレレノン) の心血管作用に関する研究 71
福井大学医学部第三内科 宮森 勇
13. カリウム代謝異常による新たな血管障害
— 鉍質コルチコイド高血圧モデルからの展開 — 74
東京大学大学院医学研究科内科
高橋 克敏、本清 雅子、劉 静、安東 克之、藤田 敏郎

(4) 副腎腫瘍、DHEA

14. SWI/SNF クロマチン構造変換因子の視点に立った、
ステロイドホルモンの生理作用と副腎皮質上皮癌に関する研究 79
東京大学・医科学研究所・感染免疫大部門 伊庭 英夫
15. 副腎皮質非機能性腺腫における18-hydroxycortisol、18-oxocortisol の検討
— 原発性アルドステロン症との比較 — 83
東邦大学医学部内科学糖尿病・代謝・内分泌科
上芝 元、山本奈津子、一条 貴政、土田 恭代、
石川真由美、廣井 直樹、下条 正子、坪井久美子
16. ラット心線維芽細胞における I 型プロコラーゲン発現に対する
dehydroepiandrosterone (DHEA) の影響 87
横浜市立大学第三内科 関原 久彦

(5) グルココルチコイド、GR、グルココルチコイド抵抗症

17. ヒト腎臓ならびに糸球体腎疾患における
GR α 、GR β 発現の免疫組織化学的検討 93
東北大学大学院医学研究科医科学専攻病理学講座病理診断学分野
笹野 公伸、佐藤 容子、鈴木 貴
18. 少量のグルココルチコイドによる抗炎症作用の発揮の試み 100
大阪大学大学院医学系研究科 分子病態内科学講座
紅林 昌吾、許 欣、大月 道夫、笠山 宗正

19. グルココルチコイド作用発現機構の解明	104
東京大学医科学研究所先端医療研究センター免疫病態分野 東京大学医科学研究所附属病院内科 田中 廣壽、吉川 賢忠	
20. 骨芽細胞における グルココルチコイド受容体 (GR) と Runx 2 の相互作用	109
九州大学医学研究院老年医学 高柳 涼一	
21. グルココルチコイド抵抗性の発症に関する 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase の作用についての検討	112
浜松医科大学小児科 エディンバラ大学分子内分泌学* 大関 武彦、中川 祐一、李 仁善、藤澤 泰子、 齋 秀二、中西 俊樹、JR Seckl *	
(6) 副腎偶発腫瘍全国調査	
22. 副腎偶発腫の全国調査報告	117
東邦大学医学部内科学糖尿病・代謝・内分泌科 上芝 元、一条 貴政、山本奈津子	
研究成果の刊行に関する一覧表	121
研究班構成員名簿	131

総括研究報告

総括研究報告

主任研究者 名和田 新

九州大学大学院医学研究院病態制御内科

1. 研究目標

厚生労働省科学研究費補助金による特定疾患対策研究事業は事業の組替により難治性疾患克服研究事業と名前が変更されたが、副腎ホルモン産生異常に関する研究班では本年度も多くの立派な研究成果を得ることができた。当研究班では、先天性副腎過形成（副腎酵素欠損症）、先天性副腎低形成、ステロイドホルモン不応症、副腎腫瘍、副腎性高血圧などの副腎ホルモン産生異常症において、分子生物学的および発生工学的な手法を駆使して病態を明らかにし、それに基づいて診断法と治療法を開発することを研究目標とした。

1) 先天性副腎過形成（副腎酵素欠損症）、先天性副腎低形成

Ad4BP/SF-1、Dax-1をはじめ COUP-TF、Foxo 1 などの転写因子、プロテインキナーゼ SIK、層特異的な発現パターンを示す IZA、ZOG などが、副腎の発生、分化、層構造形成、ステロイドホルモン合成酵素遺伝子発現において果たす役割を解明し、副腎再生ならびに副腎の遺伝子治療のための基礎的なデータを得る。

2) ステロイドホルモン不応症

グルココルチコイドレセプター（GR）と転写共役因子、クロマチン構造変換因子 SWI/SNF などの相互作用、GR β の意義、GR の転写活性化能と転写抑制能の分離、等の解析を行い、ステロイドホルモン不応症に加えて、臨床の場で大きな問題であるグルココルチコイド耐性の克服を目指す。

3) 副腎腫瘍

副腎偶発腫の疫学的長期予後調査に関して、頻度、病因、腫瘍の大きさやホルモン分泌能の変動等について prospective な調査を継続し、副腎偶発腫の診療指針の確立を目指す。また、副腎腫瘍の自律的ホルモン産生機構の獲得に関しては、核内レセプター Ad4BP/SF-1 および COUP-TF、ならびにそれらと相互作用する SUMO 化酵素である Ubc 9 および PIAS-1、HDL 受容体 CLA-1、ステロイド合成酵素遺伝子の異常について検討する。さらに、副腎癌細胞におけるホルモン産生、細胞増殖とクロマチン構造変換因子 SWI/SNF の関係について解析し、副腎癌の治療への可能性について検討する。

4) 副腎性高血圧

原発性アルドステロン症は以前考えられていたよりも頻度の多い疾患であり、全高血圧の数%をしめると考えられるようになってきた。さらにアルドステロンはうっ血性心不全をはじめとする心、血管障害により臓器障害の病態形成に深く関与することが明らかになってきた。さらに、偽性アルドステロン症、偽性低アルドステロン症といったミネラルコルチコイドの関与する疾患の病態は不明な部分が多い。本研究では、原発性アルドステロン症の診断における内分泌学的負荷試験および副腎静脈サンプリングの意義の再検討、ミネラルコルチコイドレセプター（MR）の転写因子としての

性状及び共役する補助因子群の検索、ミネラルコルチコイド高血圧におけるカリウムと臓器障害、11 β HSD type 1 および type 2、うっ血性心不全における MR の関与と抗アルドステロン剤の有効性の検討を行う。

2. 研究成果

当研究班の平成15年度の研究報告会を平成16年1月30日、東京において開催し、分担研究者ならびに研究協力者の研究成果について発表を行った。以下、研究成果の概要について述べる。

1) 先天性副腎過形成（副腎酵素欠損症）、先天性副腎低形成

Ad4BP/SF-1 遺伝子の胎生副腎特異的な発現を制御するエンハンサーについてさらに詳しく解析し、Ad 4 BP/SF-1 結合部位を4カ所同定し、Ad4BP/SF-1 遺伝子の autoregulation の機構を明らかにした。また、同エンハンサーの活性に必須な160bpのコア領域を同定した（諸橋）。

PKAによるAd4BP/SF-1の活性化について、Dax-1がAd4BP/SF-1から解離し、GCN5/TRRAP等のcoactivatorがリクルートされることを、共焦点レーザー顕微鏡、FRAP技術を用いて明らかにした（名和田）。

ステロイドホルモン産生シグナルの初期段階を制御するSIKの作用点が、ACTH-cAMP-PKA-CREB-転写活性化というシグナル伝達の最終過程、つまり遺伝子プロモーターにあるCREにCREBが結合して転写開始複合体が作動する点であることを、ヒトStAR遺伝子プロモーターを用いて明らかにした（岡本）。

インスリンの情報伝達系の下流にあるFoxo1について、副腎での発現を調べたところ、副腎皮質の球状層および副腎髄質において発現が認められる事を明らかにした（藤枝）。

アルドステロン合成酵素P450aldo (CYP11B2)の発現はCOUP-TF Iにより活性化され、その際Ubc9およびPIAS1がcoactivatorとして機能することを明らかにした（猿田）。

今回明らかにしたAd4BP/SF-1の発現、活性化のメカニズムは、副腎再生、副腎の遺伝子治療のための基礎的なデータとなるものである。先天性副腎過形成の原因遺伝子の1つであるStAR遺伝子の発現が、ステロイドホルモン産生シグナルの初期段階を制御するSIKにより負に調節されることが明らかになり、SIKがStAR遺伝子の発現を増強させるための治療標的分子になりうる可能性がある。

2) グルココルチコイド不応症

GR特異的リガンドのプロトタイプであるコルチバゾールは、デキサメタゾンと異なり、AF-2活性を欠失させた変異GRのAF-1依存性の転写活性を誘導することを明らかにし、コンピューターを用いた3次元立体構造解析によりその作用モデルを提唱した（田中）。

共焦点レーザー顕微鏡を用いたリアルタイム画像解析法により、GR、AR、ERとRunx2タンパク質が相互作用することを明らかにした（高柳）。

クロマチン構造変換因子SWI/SNF複合体のサブユニットの1つBAF60aが、ステロイド受容体(ER α 、ER β)およびAP-1と結合することを明らかにした（伊庭）。

ステロイド治療の奏功しにくい難治性ネフローゼ症候群を呈する頻度の多い巣状糸球体硬化症において、GR β の発現が有意に高いことを明らかにした（笹野）。

グルココルチコイドの転写抑制能について、血管内皮細胞の炎症性遺伝子（IL-6、VCAM-1）発現が、GR および転写共役因子 CBP の発現量を増加させることによって、少量のグルココルチコイドにより十分な発現抑制が惹起されることを明らかにした（笠山）。

11 β -HSD type 1 遺伝子のノックアウトマウスはグルココルチコイド受容体遺伝子のノックアウトマウスと同様の所見を認め、11 β -HSD type 1 の活性低下によりグルココルチコイド抵抗性が発症することが示唆された（大関）。

副作用のないグルココルチコイド療法のためには、GR 特異性の向上とグルココルチコイド投与量を必要最小限にすることが重要である。今回提唱した、コンピューターを用いた3次元立体構造解析によるGR活性化モデルは、GR超選択的なりガンドの開発につながる。また、GR および転写共役因子 CBP の発現量を増加させることにより、グルココルチコイドの投与量を減少させることができる可能性を示した。11 β -HSD type 1 の活性低下がグルココルチコイド抵抗性に関与する病態をさらに明らかにする試みが重要である。ステロイド治療の奏功しにくい難治性ネフローゼ症候群を呈する巣状糸球体硬化症において、GR β を標的としたグルココルチコイド抵抗性の克服への試みの有用性が明らかになった。

3) 副腎腫瘍

当研究班では、大学病院を含む計1014の病院に調査票を送付し、4年間の継続的な疫学調査を施行し、副腎偶発腫の診療指針の確立を目指してきた。今回の平成11年度から平成14年度までの4年間に報告を受けた3239例の検討では、副腎偶発腫の病因別頻度はホルモン非産生腺腫が51.0%と半数以上を占め、Preclinical Cushing 症候群を含むコルチゾール産生腺腫が11.7%、褐色細胞種が8.7%、アルドステロン産生腺腫が4.3%、副腎癌が45例で1.4%であった。副腎癌を副腎偶発腫から鑑別するため、様々な腫瘍径カットオフ値での感度と特異度を検討したところ、これら感度と特異度を表す曲線は腫瘍径が4.4cmの点で交差した。したがって、腫瘍径により副腎腫瘍の良悪性の鑑別を行うためのカットオフ値は4.5cmと考えられた。また、1年以上の経過観察（平均2.7年）があった889例について腫瘍径の変化を検討したところ、ホルモン非産生腺腫の4割が大きさに変化はなかったが、4割近くが増大傾向を示した（上芝）。

コレステロールを副腎への取り込むHDL受容体遺伝子CLA-1に変異を導入したDecoy CLA-1を副腎細胞で発現させると、増殖抑制とアポトーシス促進作用を示した（村尾）。

副腎皮質上皮癌細胞株SW13を用いた検討から、ステロイド受容体を含む多くの転写因子ならびに転写共役因子の、プロモーターへの結合を制御するクロマチン構造変換因子SWI/SNFの触媒サブユニットであるBRG-1、Brmが、癌抑制遺伝子である可能性、およびBRG-1、Brmの発現がエピジェネティカルな発現調節を受けることを示した（伊庭）。

3239例の副腎偶発腫の疫学的長期予後調査により明らかになった病因別頻度、副腎癌を副腎偶発腫から鑑別するためのカットオフ値、腫瘍径の変化、等の結果は、副腎

偶発腫の診療指針の確立に寄与するものである。クロマチン構造変換因子 SWI/SNF の触媒サブユニットである BRG-1、Brm の活性化が副腎癌の治療に役立つ可能性を示した。

4) 副腎性高血圧

原発性アルドステロン症と診断された患者群において、アルドステロン産生腺腫と特発性アルドステロン症を鑑別するためには、カプトリル負荷試験ならびに 1 mg デキサメサゾン抑制下アンジオテンシン II 負荷試験の有用性が高く、正診率 90% を超えるカットオフ値の設定が可能であった (伊藤)。

原発性アルドステロン症の診断には ACTH 負荷副腎静脈採血が有用であるが、アルドステロン産生腺腫確診例 55 例において、ACTH 負荷後の健側副腎からのアルドステロン分泌能が、術前の原発性アルドステロン症の重症度の判定と術後の血圧正常化の予測因子になりうることを明らかにした (西川)。

アルドステロン産生腺腫による原発性アルドステロン症の手術例 63 例について、開腹手術と鏡視下手術を比較検討したところ、鏡視下手術が侵襲性、安全性ともにすぐれていることを明らかにした (奥山)。

RHA/CBP 複合体がリガンド選択的にミネラルコルチコイド受容体 (MR) の AF-1 領域に結合して、転写制御することを明らかにした。また、同じくステロイド受容体であるビタミン D 受容体に結合する新規転写修飾因子複合体 WINAC を同定し、この複合体が ATP 依存的なクロマチン構造変換活性をもっていることを明らかにした (加藤)。

ミネラルコルチコイド高血圧の臓器障害の病態解明を目的に、DOCA 食塩高血圧ラット血管機能に対する食事性カリウムの効果と血管平滑筋細胞に対するカリウム欠乏の直接効果を検討した。その結果、ミネラルコルチコイド高血圧では、カリウム欠乏が翻訳レベルで superoxide dismutase (SOD) 活性低下を惹起し、これにより酸化ストレス亢進の血管病態が生じる可能性を示唆した (藤田)。

うっ血性心不全の動物モデルである Dahl SS ラットを 8% 高食塩水で飼育し、経時的に心エコーにより心機能、左室重量を測定後、心筋内 MR、11 β HSD2、P450aldo 遺伝子発現量を Taq-Man PCR 法により定量、群間比較し、特異性の高い抗アルドステロン剤であるエプレレノンの効果について検討した。その結果、エプレレノンはうっ血性心不全による死亡率を低下させることがわかった。また、心不全では心筋内 MR の遺伝子発現が増強していたが、エプレレノン投与にて有意に抑制されることがわかった (宮森)。

アルドステロン合成酵素 P450aldo (CYP11B2) 遺伝子第 3 エクソン内の K173R 多型が同遺伝子の発現、アルドステロンの合成、分泌と相関するかどうかを正常副腎およびアルドステロン産生腺腫の組織を用いて検討した。その結果、正常副腎における同遺伝子の発現量およびアルドステロン産生腺腫におけるアルドステロン分泌量が KK 型の場合に有意に高いことがわかった (武田)。

アルドステロン産生腺腫において高値を示すといわれている 18-hydroxycortisol (18-OHF) および 18-oxocortisol (18-oxoF) の発現を、20 例の副腎皮質非機能腺腫において検討したところ、3 例が高値を示した。この 3 例は将来アルドステロン産生腺腫

になる可能性を考慮しておく必要がある（上芝）。

DEHA は心線維芽細胞におけるコラーゲンタイプ I の前駆体であるプロコラーゲンタイプ I の mRNA の発現、蛋白合成、分泌を抑制することにより、心臓線維化を抑制することが示唆された（関原）。

MR の転写活性を調節する coactivator はアルドステロン作用の抑制を目指した創薬の標的分子になりうる。原発性アルドステロン症の診断におけるカプトリル負荷試験、1 mg デキサメサゾン抑制下アンジオテンシン II 負荷試験ならびに ACTH 負荷副腎静脈採血の有用性がさらに明らかになった。ミネラルコルチコイド高血圧での血管病態、うっ血性心不全の病態について今回得られた知見は、血管合併症予防におけるカリウムの補正の重要性、うっ血性心不全における選択的抗アルドステロン剤の有用性を示唆するものである。アルドステロン合成酵素遺伝子の多型が同遺伝子の発現、アルドステロンの合成、分泌と相関することは、ミネラルコルチコイド高血圧治療におけるテーラーメイド医療につながる可能性がある。

分担研究報告

(1) 副腎発生・分化、ステロイド合成酵素

副腎皮質の発生初期過程に関する解析

諸橋 憲一郎

岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所

発生生物学研究系 細胞分化研究部門 教授

研究要旨

副腎は生殖腺と同様にステロイドホルモン産生能を有する組織であり、初期発生を調べると生殖腺と極めて密接な関係にあることが明らかとなった。我々が注目した Ad4BP/SF-1 遺伝子は発生初期から両組織に発現するのみならず、視床下部や脳下垂体などの生殖活動に重要な組織にも発現する。更に、この遺伝子の破壊マウスでは副腎と生殖腺が形成されないことから、本遺伝子がこれらの組織形成や生殖腺の性分化過程で重要な役割を担っていることが明らかになった。そこで、Ad4BP/SF-1 がいかなるメカニズムのもとに、それらの組織に発現するのかをトランスジェニックマウスの手法を通じて解析した。

A. 研究目的

Ad4BP/SF-1 遺伝子の副腎皮質特異的発現を調節するエンハンサー領域を同定し、この領域を通じた発現制御の実体を明らかにすることを目的とする。このことは副腎皮質の分化メカニズムを明らかにするものであり、同時に副腎皮質と生殖腺の発生過程における差異を分子レベルで理解するためには不可欠である。

B. 研究方法

Ad4BP/SF-1 遺伝子を含む DNA をトランスジェニックマウス用に作製したコスミドベクターに挿入した。これらのコスミドを用いてトランスジェニックマウスを作製することで、それぞれの DNA 断片による転写活性を調べた。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究成果

本研究では、マウスゲノムライブラリーより Ad4BP/SF-1 遺伝子を含むゲノム DNA 領域を BAC、またはコスミドクローンとして単離した。これらに lacZ をレポーターとして挿入し、トランスジェニックマウスを作製したところ、内在性の Ad4BP/SF-1 の発現を再現するトランスジェニックマウスが得られた。また、種々の欠失コンストラクトを用いて、副腎、視床下部や脳下垂体に特異的発現を誘導するエンハンサーを同定した。同定したエンハンサーのうちの副腎特異的なエンハンサーを最初に詳細に解析した。そのために、トランスジェニックマウスラインを作成し、発生にともなう lacZ の発現の変動を調べた。X-gal 染色による lacZ の活性は胎仔 9.5 日齢にはじめて観察された。この発現は生後まで続いたが、副腎皮質と髄質の間の層にしか見られなかった。さらに、雄では生後 35 日に発現消失することから、胎仔副腎 (X-zone) と呼ばれる層に特異的なエンハンサーであることが明らかになった。

次いで、副腎エンハンサーではどのような調節機構が働くのかを DNA 配列をもとに予測した。エンハンサー中に4つの Ad4BP/SF-1 の結合部位が確認された。Ad4BP/SF-1 は転写因子であるため、自己調節の可能性が有る。これを検討するために、これらの配列に変異を導入してトランスジェニックマウスを作製した。副腎形成の初期（胎仔11.5日齢）の副腎における lacZ の発現には影響がないが、胎仔17.5日齢の副腎ではその発現が消失した。このことから、副腎エンハンサー機能の発現開始には Ad4BP/SF-1 は関与しないが、発現を維持するためには Ad4BP/SF-1 が必要であり、Ad4BP 遺伝子が auto-regulation を受けることが明らかになった。また、エンハンサーの機能発現の開始機構を調べるために、種々の欠失コンストラクトを用いてアッセイしたところ、最も重要な約160bp のコア配列が存在することが判った。また、コア配列中の保存された配列に変異を導入すると、エンハンサー機能が消失することから、それらの配列がエンハンサーの機能発現の開始に重要な役割を担うことが示された。以上の結果より、このエンハンサーの機能発現は、イニシエーションとメンテナンスの2つのステップから構成されることが明らかになった。

D. 考察

従来から指摘されているように、胎仔副腎と成人副腎ではその構造や機能が異なることが知られている。しかしながら、両者を構成する細胞の起源は明らかではなかった。この研究では Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現が胎仔副腎と成人副腎では異なる領域によって制御されること、すなわち異なる制御機構のもとに調節され

ることを示した。このことは、胎仔副腎と成人副腎が異なる刺激のもとに構築されることを示唆するものであり、その異なる構築機構にはじめて分子基盤を与えるものであった。分子機構の詳細な解析は胎仔副腎と成人副腎の形成過程を理解する上で、今後の重要な課題である。

E. 結論

Ad4BP/SF-1 遺伝子のイントロン内に胎仔副腎皮質特異的発現を制御するエンハンサーを同定した。このエンハンサー領域には Ad4BP/SF-1 自身が結合する配列が存在し、本遺伝子の制御は自己制御を受けることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) LXXLL motifs in Dax -1 have target specificity for the orphan receptors Ad4BP/SF - 1 and LRH -1.

Taiga Suzuki, Megumi Kasahara, Hidefumi Yoshioka, Ken-ichirou Morohashi, Kazuhiko Umesono
Mol. Cell. Biol. 23, 238-249, 2003

2) Dax 1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation

Joshua J. Meeks, Susan E. Crawford, Theron A. Russell, Ken-ichiro Morohashi, Blanche Capel, Jeffrey Weiss, and J. Larry Jameson.
Development 130, 1029-1036, 2003

3) Dax - 1 gene transcription is regulated by Wnt4 in the female developing gonad.

Hirofumi Mizusaki, Ken Kawabe, Tokuo Mukai, Etsuko Ariyoshi, Megumi Kasahara, Hidefumi Yoshioka, Amanda Swain, and Ken-ichirou Morohashi
Mol. Endocrinol. 17, 507-519, 2003

4) NR boxes of Dax - 1 participate both in Ad4BP/SF -1 dependent nuclear import and in cytoplasmic retention of Dax -1.

Kaname Kawajiri, Togo Ikuta, Taiga Suzuki, Masatomo Kusaka, Junko Watanabe, Masami Muramatsu, Kennji Fujieda, Masayoshi Tachibana & Ken-ichirou Morohashi
Mol. Endocrinol. 17, 994-1004, 2003

5) Assessment of in vivo action of estrogen using aromatase - knockout mice which carry an estrogen-inducible enhanced green fluorescent protein gene.

Katsumi Toda, Yasushi Okada, Mohamad Zubair, Ken-ichirou Morohashi, Toshiji Saibara, & Teruhiko Okada
Endocrinol. 2003

6) Mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation

Mitsuhiro Kato, Soma Das, Kristin Petras, Kunio Kitamura, Ken-ichirou Morohashi, Diane N. Abuelo, Mason Barr, Dominique Bonneau, Angela Brady, Nancy J. Carpenter, Francesco Frisone, Takayuki Fukuda, Renzo Guerrini, Eri Iida, Masayuki Itoh, Amy Feldman Lewanda, Yukiko Nanba, Akira Oka, Virginia K. Proud, Karen L. Russel, Pascale Saugier-Weber, Susan L. Schelley, Angelo Selicorni, Rachel Shaner, Margherita Silengo, Fiona Stewart, Noriyuki Sugiyama, Jun Toyama, Annick Toutain, Ana Lía Vargas, Masako Yanazawa, Elaine H. Zackai and William B. Dobyns
Human Mutation 23, 147-159, 2004

7) Loss of PGC-specific expression of the orphan nuclear receptor ERR - β results in regulation of germ cell number in mouse embryos.

Kanae Mitsunaga, Kimi Araki, Hirofumi Mizusaki, Ken-ichirou Morohashi, Hyoko Haruna, Naomi, Nakagata, Vincent Giguere, Ken-ichi Yamamura, and Kuniya Abe
In press

2. 学会発表

(招待講演)

1) 第26回日本医学会総会(福岡)シンポジウム

生殖腺・副腎の発生分化メカニズム

諸橋憲一郎

内分泌攪乱物質の生体内作用に発現における Ah レセプターの役割、藤井義明、三村純正、馬場嵩、沼山恵子、山本雅之、諸橋憲一郎

2) 第76回日本生化学会(横浜)シンポジウム

Mesonephric Fgf9 is the Initiation Signal for Gonad Formation in Chick

Hidefumi Yoshioka, Yoshiyasu Ishimaru, Noriyuki Sugiyama, Megumi Kasahara, Ken-ichirou Morohashi

Molecular Mechanisms underlying Gonad Differentiation

Ken-ichirou Morohashi, Zubair Mohamad, Hirofumi Mizusaki, Kusaka Masatomo, Noriyuki Sugiyama, Hidefumi Yoshioka, Hidesato Ogawa, Yuko Katoh-Fukui

3) 第11回日本ステロイドホルモン学会シンポジウム(岐阜)

生殖腺形成における Ad4BP/SF-1 と Emx 2 の遺伝的相互作用の解析

杉山紀之、日下雅友、福井由宇子、諸橋憲一郎

ステロイドホルモン産生酵素の転写制御因子 Ad4BP/SF-1 の翻訳後修飾の同定と解析
土屋恵、小松朋子、小川英知、諸橋憲一郎

4) 慶応医学賞記念シンポジウム(東京)
Sex Differentiation of the Gonads-implication of nuclear receptor

諸橋 憲一郎

5) 第26回日本分子生物学会(神戸)シンポジウム

生殖腺の性分化過程における核内レセプターの転写調節機構

小川英知、小松朋子、土屋恵、水崎博文、鈴木大河、諸橋憲一郎

哺乳類生殖腺の性分化と転写調節

諸橋憲一郎、杉山紀之、日下雅友、水崎博文、鈴木大河、小川英知、吉岡秀文、福井由宇子

鳥類卵巣の左右非対称形成におけるレチノイン酸シグナルの関与
石丸善康、吉岡秀文、諸橋憲一郎

6) The 2nd international nuclear receptor meeting in Japan, Osaka Molecular Mechanisms underlying steroidogenic tissue differentiation
Morohashi K., Zubair M., Mizusaki H., Suzuki T., Sugiyama N., Yoshioka H., Katoh-Fukui Y. Workshop on Molecular Steroidogenesis (IV), United Kingdom

7) Mesonephric FGF9 is the initiation signal for gonad formation in chick
H Yoshioka, Y Ishimaru, N Sugiyama, M Kasahara, K Morohashi

8) 13th International Conference on CYTOCHROMES P450 Biochemistry, Biophysics and Drug Metabolism, Austria Molecular Mechanisms of Transactivation by AH Receptor for the Target Gene Expression
Y Fujii-Kuriyama, J Mimura, H Motohashi, M. Yamamoto, F Ohtake, S Kato, K Numayama-Tsuruta, K Sogawa, T Baba, K Morohashi

9) The 3rd Meeting on Pathology of Genetically Engineered Mice (Kumamoto) Molecular Mechanisms Underlying Gonad Differentiation
Morohashi K, Zubair M, Shima Y, Mizusaki H, Sugiyama N, Ishimaru Y, Yoshioka H, Katoh-Fukui Y

(一般演題)

1) The Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, Hawaii
FGF and WNT signals are required for the mesonephric tubulogenesis and initiation of gonadal organogenesis.
H Yoshioka, Y Ishimaru, N Sugiyama, N Tsunekawa, T Noce, M Kasahara, K Morohashi
Dax -1 gene transcription is regulated by Wnt4 in the female developing gonad.
H Mizusaki, K Kawabe, T Mukai, E

Ariyoshi, M Kasahara, H Yoshioka, A Swain, K Morohashi
Genetic interaction between M33 and Ad4BP/SF -1 in the adrenal, splenic and gonadal development.

Y Katoh-Fukui, Y Handa, A Owaki, M Kusaka, K Morohashi
Functional analysis of Arx in male gonad and mutational analysis of the ARX gene in XLAG patients

N Sugiyama, T Fukuda, M Kusaka, T Ogata, I Kondo, M Kato, WB Dbyns, K Kitamura, K Morohashi

2) 第36回日本発生生物学会
生殖腺におけるマウス Arx 遺伝子の発現と機能解析 杉山紀之、日下雅友、北村邦夫、諸橋憲一郎
生殖腺形成におけるレチノイン酸シグナルの関与 石丸善康、杉山紀之、笠原恵、諸橋憲一郎、吉岡秀文

3) 第26回日本分子生物学会
AhR の卵巣における機能と内分泌かく乱作用メカニズム 馬場嵩、三村純正、山本雅之、諸橋憲一郎、藤井義明
Ad4BP/SF - 1 の SUMO 化による協調的な転写活性化の制御 小松朋子、水崎博文、向井徳男、小川英知、白川昌弘、畠山鎮次、山中敬一、山本英樹、菊池章、諸橋憲一郎
生殖腺形成における Ad4BP/SF - 1 と Emx 2 の遺伝的相互作用の解析 杉山紀之、日下雅友、福井由宇子、諸橋憲一郎
マウス Ad4BP/SF - 1 の視床下部腹内側核、及び脳下垂体特異的エンハンサーの解析 嶋雄一、Mohamad Zubair、岡早苗、篠原結子、鈴木大河、諸橋憲一郎
マウス Ad4BP/SF - 1 の副腎特異的エンハンサーにおける自己調節 Mohamad Zubair、岡早苗、河和寛恵、Fatchiyah、石原悟、諸橋憲一郎

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Forkhead transcription factor Foxo 1 の 副腎および性腺における発現・機能に関する研究

藤枝 憲二、向井 徳男
旭川医科大学小児科

研究要旨

Forkhead transcription factor Foxo 1 は *C. elegans* におけるインスリンシグナル伝達経路と相同である DAF-2 経路の抑制性調節因子である DAF-16 の哺乳類での相同遺伝子である。その作用としては細胞の分化や増殖に関与すると報告されており、そのほか代謝やタンパク合成、遺伝子発現などにも関与すると考えられている。Foxo 1 のマウスにおける発現に関しては脳・心臓・肝臓・腎臓・筋・膵臓・卵巣で発現していることが既に確認されている。加えて、GST プルダウンアッセイの結果からエストロゲン受容体とエストロゲン依存的に結合することが報告されている。

今回我々は Foxo 1 のステロイド産生組織における発現およびその機能を明らかにすることを目的に、まずはその発現の有無を検討した。その結果、成獣マウスの副腎・性腺における発現を RT-PCR により確認することができた。そこでマウスの発生段階に応じた発現量の変化を検討したところ、生後になって性腺における発現量に性差が存在し、卵巣での発現が増加することが確認された。また、成獣マウス副腎における Foxo 1 の発現部位を *in situ hybridization* 法により検討したところ、副腎髄質および副腎皮質球状層において発現が確認された。今後はこれらステロイド産生組織における Foxo 1 の機能解明を追求していきたい。

A. 研究目的

forkhead 型転写因子 (または winged helix 転写因子) ファミリーの一員である Foxo 1 (Fkhr) は *C. elegans* におけるインスリンシグナル伝達経路と相同である DAF-2 経路の抑制性調節因子である DAF-16 の哺乳類での相同遺伝子である。forkhead 型転写因子の作用としては細胞の分化や増殖に関与すると報告されており、そのほか代謝やタンパク合成、遺伝子発現などにも関与すると考えられている。さらに、Foxo 1 はインスリン・IGF-1 により phosphatidylinositol-3 (PI 3) kinase 依存的に Akt/PKB によりリン酸化され、核内から細胞質へ移行し、その転写活性を失うことも報告されている。

Foxo 1 のマウスにおける発現に関してはこれまでもいくつか報告があり、脳・心臓・肝臓・腎臓・筋・膵臓・卵巣で発現していることが確認されている。加えて、GST プルダウンアッセイの結果からエストロゲン受容体とエストロゲン依存的に結合することが報告されている。

また、Foxo 1 のノックアウトマウスは胎生致死となることから、その生体内機能に関しては限られた報告しかないのが現状である。

今回我々はステロイド産生組織である副腎および性腺における Foxo 1 の機能を解明することを目的に、これらステロイド産生組織における Foxo 1 の発現を検討した。

B. 研究方法

1. real-time RT-PCR

胎齢18.5日、日齢1、7、14、28、70のマウスから摘出し、冷凍保存した副腎および性腺から total RNA を抽出した。1 μ g の total RNA をテンプレートとして LigutCycler - RNA Amplification Kit SYBR Green I (Roche) を用いて LightCycler System により定量的 RT-PCR を行った。Foxo 1 増幅にはイントロンを挟むように設計したプライマーを使用した (図 1)。内部標準として GAPDH についても同様の方法で RT-PCR を行った。

2. in situ hybridization

成獣マウスから摘出した副腎を凍結切片にし組織標本を作製した。

Foxo 1 の mRNA に対する DIG ラベル RNA プローブを作製し、in situ hybridization を行った。

(倫理面への配慮)

用いた実験動物は必要最小限に留めるよう配慮し、解剖を行うに当たっては苦痛を最小限にするため麻酔後に実施し、動物愛護の精神に反することのないように注意を払った。

C. 研究結果

1. RT-PCR (図 2、図 3、図 4)

マウス性腺における Foxo 1 mRNA の発現は E18.5 から微量ながら認められた。生後の発現量は精巣では胎児期よりも増加するものの、加齢に伴う変化は少なかった。一方、卵巣においては発現量が増加し、特に 2 週齢以降に著増することが解った (図 2)。FSH 投与により Foxo 1 の発現が up-regulate されるとの報告があり、矛盾しない結果といえる。しかし、メス個体の性周期に応じた発現量の変化に関しては今後の検討課題とい

えよう。

また、副腎における発現に関しては生後はほとんど性差は見られず、発現量の変化もあまり認められなかった (図 3)。胎児副腎での発現に関して今後検討の予定である。

図 4 からわかるようにステロイド産生組織における Foxo 1 の発現は成獣卵巣での発現量がその他の組織に比して多いことが解った。

2. in situ hybridization (図 5)

成獣マウス副腎における Foxo 1 の発現部位を同定するために in situ hybridization を行った。その結果副腎髄質および副腎皮質球状層において Foxo 1 の mRNA が発現していることが示された。

D. 考察

マウス Foxo 1 は性腺においては胎児期から、副腎においては少なくとも生後まもなくから発現していることが明らかとなった。このことから、これらの組織においても何らかの生理的作用を有しているものと推測される。中でも副腎において発現している領域が髄質と皮質球状層であることから、カテコラミンあるいは鉱質コルチコイドの産生に関与する可能性が示唆される。さらには、これらを通じて血圧調節に影響を及ぼしている可能性も考えられる。

また、性腺における発現に関しては興味深いことに性差が存在し、2 週齢以降に顕著となる。ゴナドトロピンによる発現調節の可能性が示唆されているが、発現量の性差に関するメカニズムについては全く不明であり、今後の検討課題といえよう。さらに性腺の組織内発現領域についても今後検討を加えることで、性腺における機能の解明を目指していきたい。