

精製した。得られたRNA 1 mg から Reverse transcription kit (Gibco - BRL, Grand Island, NY) にて cDNA を合成した。アルドステロン受容体 (MR)、アルドステロン合成酵素 (CYP11 β 2) の発現を PCR にて比較検討した。右房より採取した血液を用い血清中 Na、K、アルドステロンの濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

すべてのラットは、福井医科大学動物実験指針に基づいて扱った。

C. 研究結果

実験開始 5 週目まで体重は両群間とも増加したが、8 週目には DS 群が有意に低下していた。(図 1)

5 週目に DS 群で収縮期血圧が 200mmHg を超え、DS 群に遅れて DS-Ep 群で 8 週目に収縮期血圧が 200mmHg を超えた。心拍数については両群間に有

意差はなかった。(図 1)左室拡張末期径、左室収縮末期径、心室中隔壁厚、左室後壁厚は両群とも増大したが有意差はなかった。% FS については観察期間中正常に保たれていた。(図 2)左室重量体重比は両群とも増加したが DS 群で有意に高かった (DS 群 5.93 ± 0.15 vs DS-Ep 群 4.30 ± 0.32 , $p = 0.025$)。 (図 3) 血清 Na 濃度は有意差はなかったが、血清 K 濃度は DS-Ep 群が有意に高値であった。

(図 4) 血清アルドステロン濃度も観察期間中有意差を認めなかった。(図 5) RT-PCR にて CYP11 β 2mRNA の発現は両群とも変化しなかったが、vmRNA の発現は DS 群で有意に高値であった。

(図 6, 7)

Kaplan-Meier による累積生存率は DS-Ep 群で有意に高かった (Logrank : $p < 0.0001$)。 (図 8)

図 1

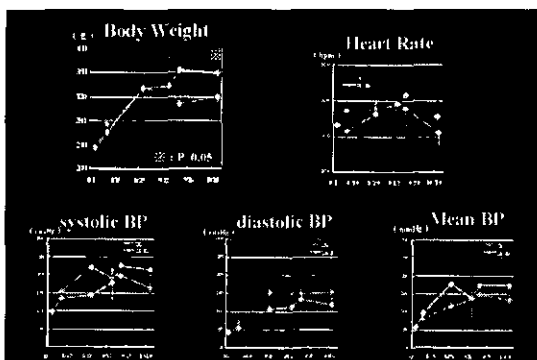


図 2

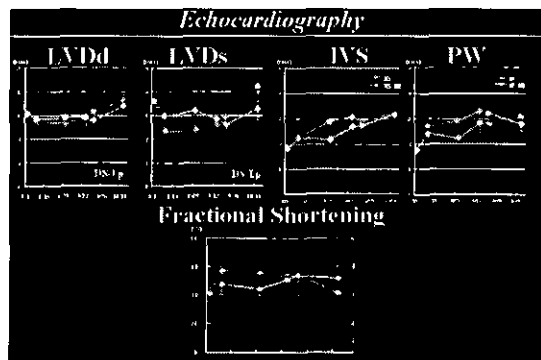


図 3

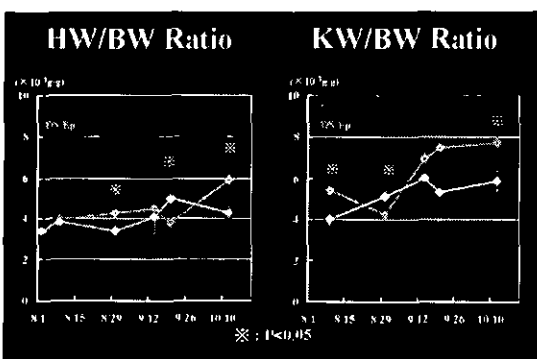


図 4

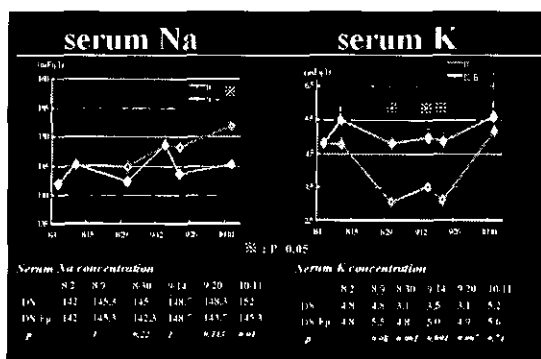


図 5

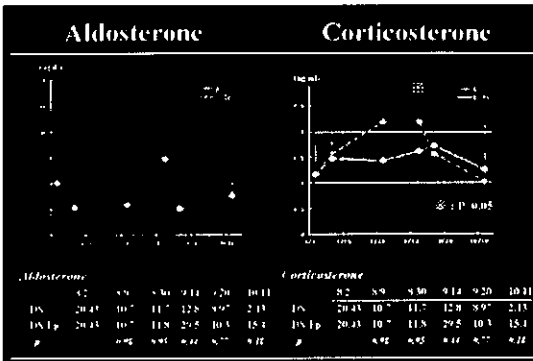


図 6

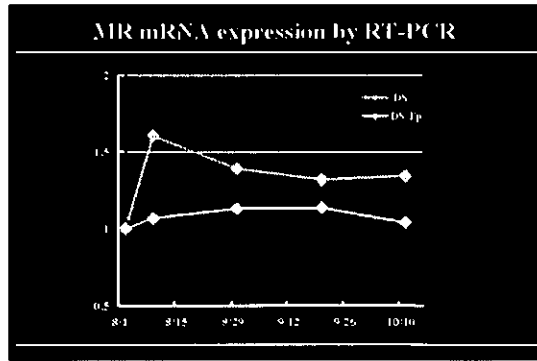


図 7

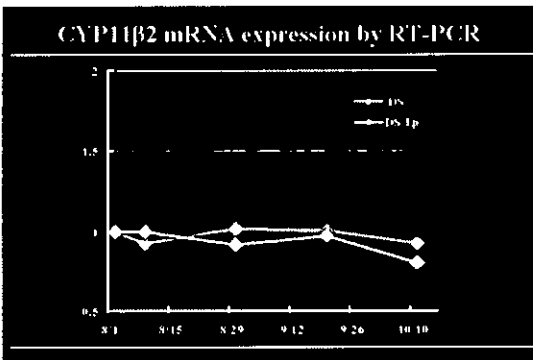
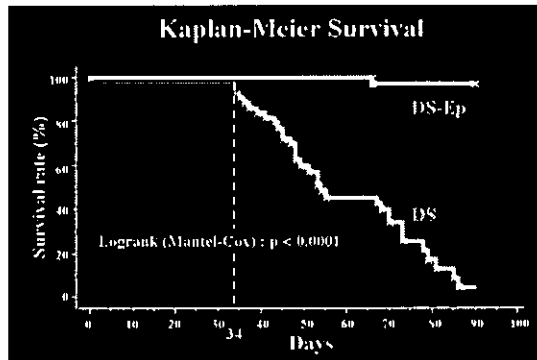


図 8



D. 考察

選択的抗アルドステロン剤（エプレレノン）は、食塩感受性ダールラットの心不全での生存率を改善し、心不全の進展が抑制された。遺伝子解析により心臓局所のアルドステロン受容体のアップレギュレーションが抑制されており、心不全の発症に心臓局所のアルドステロン受容体のアップレギュレーションが関与する事が示唆された。

E. 結論

選択的抗アルドステロン剤（エプレレノン）は、食塩感受性ダールラットの心不全での生存率を改善し、心不全の進展が抑制された。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

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 なし
3. その他

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 —

高橋克敏、本清雅子、劉静、安東克之、藤田敏郎

東京大学大学院医学研究科内科

研究要旨

鉍質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 (DOCA-salt 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 (VSMC) に対するカリウム欠乏の直接効果を検討した。DOCA-salt ラット大動脈では酸化ストレス産生が亢進し、食事性カリウム負荷は血管酸化ストレスを軽減したが、この効果は superoxide dismutase (SOD) 阻害剤により消失した。一方、VSMC では、直接的カリウム欠乏が血管酸化ストレス抑制系の鍵となる総 SOD 活性を低下させ、SOD family のうち EC-SOD と Mn-SOD の特異的発現低下を伴った。EC-SOD 発現低下の機序は、転写や蛋白分解でなく、EC-SOD mRNA 翻訳レベルにあることが明らかとなった。以上より、鉍質コルチコイド高血圧では、カリウム欠乏が翻訳レベルで 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が新たに示唆された。

A. 研究目的

原発性アルドステロン症 (PA) は臓器障害を伴いやすく、早期診断と治療の重要性が指摘されているが¹⁾、その機序は十分には明らかでない。PA を代表とする鉍質コルチコイド高血圧では、生体のナトリウム貯留とカリウム欠乏を生じ²⁾、後者は低 K 血症として診断の契機となるだけでなく病態形成にも預かりうる。カリウム摂取量と高血圧や心血管事故の負の関係は以前から指摘され、一般に食事性カリウム摂取は良い影響を及ぼすとされている³⁾。最近でも、収縮期高血圧患者における少量サイアザイド利尿薬の効果を検証した SHEP 研究のサブ解析において、低 K 血症を呈する患者群では予後が改善しないと報告されている⁴⁾。さらに、高齢者の前向き研究でもカリウム摂取不足群の脳血管障害発症が多いことが報告され⁵⁾、カリウム欠乏自体が心血管事故や臓器障害の原因となる可能性

が考えられる。

我々はカリウム自体の病態形成への関与に着目し、平成12年度の本研究班分担研究において、DOCA 食塩高血圧モデルでは食事性カリウムが血圧値とは無関係に臓器保護作用や酸化ストレス減弱作用を有することを見出した⁶⁾。しかし、培養細胞における急性実験では、カリウム変化は酸化ストレス変化を惹起せず、食事性カリウムによる (血圧非依存性の) 酸化ストレス軽減の機序は明らかではなかった。そこで、鉍質コルチコイド高血圧モデルの血管病態を明らかにすることを目的に、今回は血管酸化ストレス制御系 SOD family に及ぼすカリウムの影響につき、その分子機構を含めて新たに検討した。

B. 研究方法

(1) 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：

平成12年度分担研究と同様の方法で、(A)対照ラット、(B)DOCA 食塩高血圧ラット (8% NaCl 食)、(C)負荷 DOCA 食塩高血圧ラット (8% NaCl + 8% KCl 食) の3群を準備し、各々摘出大動脈標本を準備し化学蛍光法で大動脈酸化ストレス産生量 (ROS) を評価した⁷⁾。

(2) カリウム欠乏の平滑筋細胞 SOD family に対する直接作用：

培養 VSMC は Sprague - Dawley ラット胸部大動脈より explant 法で採取した。カリウム欠乏は、透析胎児ウシ血清と調整 DMEM 培地 (KCl を NaCl で置換) を用いて実施した。(2-1) VSMC 総 SOD 活性は modified NBT 法で測定した。

(2-2) SOD family (EC-SOD, Mn-SOD, Cu/Zn-SOD) 発現レベルは各特異抗体を用いてウエスタン解析した。(2-3) EC-SOD mRNA レベルは、AGPC 法で total RNA を抽出しマウス EC-SOD3 遺伝子をプローブとしたノザン解析で評価した。(2-4) EC-SOD 生合成は、カリウム欠乏後に TRAN35S-LABEL (ICN 社) で代謝ラベル⁸⁾ した VSMC から EC-SOD を免疫沈降し、沈降物を SDS-PAGE に 供 し Phosphorimager

(Molecular dynamics 社) で解析した。

(2-5) EC-SOD 分解は代謝ラベル後にカリウム欠乏を実施し、生合成解析と同様の方法で解析した。

(倫理面への配慮) 動物愛護に関して実験時の屠殺は麻酔下で苦痛を最小限にして行った。

C. 研究結果

(1) DOCA 食塩高血圧ラット血管酸化ストレスに対する食事性カリウムの効果 (Fig. 1)：

DOCA 食塩高血圧ラット大動脈では、化学蛍光法で検出した ROS 産生量は、

非刺激下で対照群の約2.4倍、PMA (300nM) 刺激後には対照群の1.8倍であった。一方、食事性カリウム負荷は DOCA 食塩高血圧ラット血管の ROS 産生亢進を軽減した。また、SOD 阻害剤 diethyldithiocarbamate (DDC) の前処置下では、食事性カリウム負荷によるこの血管 ROS 減弱作用は消失した。なお、NAD (P) H oxidase 等の flavoprotein 阻害剤である diphenyleneiodonium (DPI) 前処置後に3群の ROS は非刺激下でほぼ同等まで低下した。以上から、DOCA 食塩処理は血管における NAD (P) H oxidase 等の DPI 感受性分子に依存した ROS 産生系を亢進させ、食事性カリウム負荷は SOD 活性ないし SOD 発現の変化を介して DOCA 食塩高血圧の血管における ROS 産生亢進を軽減することが示唆された。

(2) 平滑筋細胞 SOD family に対するカリウム欠乏の直接作用 (Fig. 2, 3)：

(2-1) 直接的カリウム欠乏により24時間後に VSMC 総 SOD 活性が約30%低下した。(2-2) これと共に、細胞外カリウム濃度変化に応じて EC-SOD と Mn-SOD の蛋白発現量は低下したが、Cu/Zn-SOD の発現低下は見られなかった。(2-3) VSMC における EC-SOD mRNA は、直接的な細胞外カリウム濃度変化により低下しなかった。(2-4) EC-SOD 蛋白の生合成は細胞外カリウム濃度低下に応じて低下した。(2-5) カリウム欠乏は EC-SOD 蛋白分解を促進しなかった。以上より、VSMC では、直接的カリウム欠乏が SOD 活性低下を招き、その機序として、EC-SOD の翻訳制御を介した発現量低下が、これに預かることが示唆された。

D. 考察

今回の検討により、DOCA 食塩高血圧ラット血管における酸化ストレス産生亢進は食事性カリウム負荷により軽減し、その機序として血管の内因性 SOD 系が関与することが初めて示唆された。従来より、食事性カリウム摂取には脳血管障害予防などの心血管保護作用があり^{3) 5)}、血圧降下や ROS 軽減等がその機序として示唆されている。ROS に関しては、急性の直接のカリウム欠乏が内皮や血球由来細胞の ROS を増大させるとの報告⁹⁾や慢性的なカリウム欠乏食で大血管 ROS 産生が増大すると報告はあるが¹⁰⁾、分子機構はこれまで全く不明であった。

今回検討した動物モデルでは、食事性カリウムは血圧値を変えないため⁶⁾、食事性カリウム負荷は血圧とは独立した機序で大動脈 SOD 系を制御したと考えられる。さらに、銅キレート剤 DDC¹¹⁾ が、食事性カリウム負荷の大動脈 ROS 軽減効果を打ち消したことから、SOD family のうち銅イオン依存性の Cu/Zn-SOD と EC-SOD がこの点に寄与した可能性が高い。今回の動物モデルでは、食事性カリウム負荷は低カリウム血症を完全に阻止したことから、我々はカリウム代謝異常（カリウム欠乏）自体が臓器障害の病態形成に関与する可能性を想定し、培養 VSMC で直接のカリウム欠乏の SOD family への影響を検討した。その結果、直接のカリウム欠乏が VSMC における総 SOD 活性低下と、SOD family のうち EC-SOD と Mn-SOD の特異的発現低下を惹起することが明らかになった。最近、EC-SOD ノックアウトマウス大動脈で ROS 増大が報告されている¹²⁾。これは、カリウム欠乏自体が EC-SOD 発現低下を介して血管 ROS 増大を招くという、今回の結果から示唆される血管病態と矛

盾しない。

従来、直接のカリウム欠乏の VSMC に対する効果として、増殖抑制、遊走抑制、細胞死抑制などが報告されているが、SOD family に関する詳細な報告はない。さらに、今回の実験系では、EC-SOD 発現低下が翻訳レベルの制御であることも新たに示された。これは、鉍質コルチコイド高血圧の血管病態が翻訳病¹³⁾の側面を有することを意味する。カリウム欠乏が VSMC の蛋白翻訳機構において如何なる影響を及ぼすのか、すなわち、ペプチド合成の開始や伸張、さらに各制御系の具体的な作用点は現時点で明らかでなく、今後の検討課題である。また、ヒト PA 等におけるこの病態の確認も必要である。

診断技術の進歩により、副腎微小腺腫による軽症かつ正常 K 血症を呈する PA が近年ますます診断されている。「PA の予後が良くない」との冒頭の見解は、従来から診断されている典型的 PA についての臨床研究に基づくものと理解される。従って現時点では、厳密な意味で、軽症の PA の予後や臓器障害の頻度は必ずしも明らかではない。動物モデル等を用いた今回の結果は、カリウム欠乏が血管病態に預かる可能性を示すのみならず、カリウム欠乏の程度が血管病態の程度を規定することも示唆する。従って、軽症かつ正常 K 血症を呈する PA の予後や臓器障害に関する臨床研究の必要性を再認識させる結果とも言えよう。

E. 結論

鉍質コルチコイド高血圧による臓器障害の病態解明のため、血管 ROS 制御系につき検討した。DOCA-salt ラット血管では SOD family が食事性カリウム負荷による ROS 軽減作用を担うことが示

唆された。培養 VSMC では直接的カリウム欠乏が SOD 活性を低下させ、翻訳制御による EC-SOD 低下がこれに寄与することが示唆された。以上より、鉍質コルチコイド高血圧ではカリウム欠乏を介して ROS 増大という血管病態が生じる可能性がある。

G. 知的所有権の取得状況

特になし

H. 謝辞

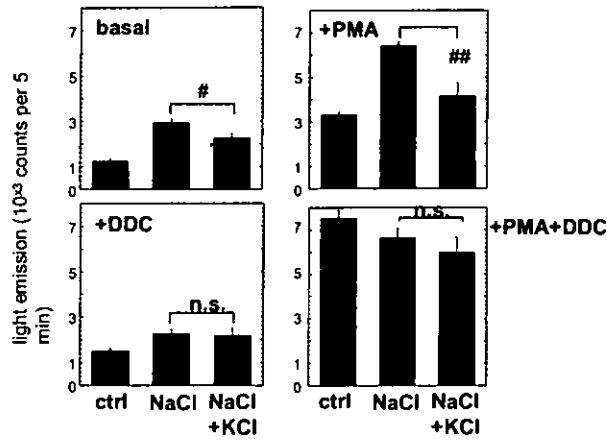
マウス EC-SOD 3 遺伝子を供与頂いた大河原知水博士 (兵庫医科大学)、EC-SOD 抗体を供与頂いた Jean Willems 博士 (Katholieke Universiteit, Belgium) と James D. Crapo 博士 (National Jewish Medical and Research Center, U.S. A.) に深謝致します。

F. 参考文献

- 1) 高血圧治療ガイドライン2000年版。日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会。2000年6月。p75.
- 2) Weinberger MH, Grim CE, Hollifield JW, Kem DC, Ganguly A, Kramer NJ, Yune HY, Wellman H, Donohue JP. Primary aldosteronism: diagnosis, localization, and treatment. *Ann Intern Med.* 1979;90:386-395.
- 3) He FJ, MacGregor GA. Beneficial effects of potassium. *B M J.* 2001;323:497-501.
- 4) Franse LV, Pahor M, Di Bari M, Somes GW, Cushman WC, Applegate WB. Hypokalemia associated with diuretic use and cardiovascular events in the Systolic Hypertension in the Elderly Program. *Hypertension.* 2000 ; 35 : 1025-1030.
- 5) Green DM, Ropper AH, Kronmal RA, Psaty BM, Burke GL ; Cardiovascular Health Study. Serum potassium level and dietary potassium intake as risk factors for stroke. *Neurology.* 2002 ; 59 : 314-320.

- 6) 高橋克敏、安東克之、藤田敏郎。厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業) 副腎ホルモン産生異常に関する研究班、平成12年度研究報告書、平成13年3月。副腎性高血圧における食事性カリウムの効果。p38-42.
- 7) Kawai J, Ando K, Tojo A, Shimosawa T, Takahashi K, Onozato ML, Yamasaki M, Ogita T, Nakaoka T, Fujita T. Endogenous Adrenomedullin Protects Against Vascular Response to Injury in Mice. *Circulation.* 2004. in press.
- 8) Takahashi K, Yonezawa K, Nishimoto I. Insulin-like Growth Factor I Receptor Activated by a Transmembrane Mutation. *J Biol Chem,* 1995 ; 270 : 19041-19045.
- 9) RD McCabe, MA Bakarich, K Srivastava, and DB Young. Potassium inhibits free radical formation. *Hypertension,* 1994 ; 24 : 77-82.
- 10) BC Yang, DY Li, YF Weng, J Lynch, CS Wingo, and JL Mehta. Increased superoxide anion generation and altered vasoreactivity in rabbits on low-potassium diet. *Am J Physiol,* 1998 ; 274 : H1955-H1961.
- 11) Heikkila RE, Cabbat FS, Cohen G. In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate. *J Biol Chem.* 1976 ; 251 : 2182-2185.
- 12) Jung O, Marklund SL, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability : in vivo and ex vivo evidence from ecSOD-deficient mice. *Circ Res.* 2003 ; 93 : 622-629.
- 13) Griffin E, Re A, Hamel N, Fu C, Bush H, McCaffrey T, Asch AS. A link between diabetes and atherosclerosis : Glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. *Nat Med.* 2001 ; 7 : 840-846.

Fig.1 Effect of Dietary KCl Loading on Vascular ROS levels in DOCA-salt rats



化学発光法により抽出大動脈のROS量を計測。# p<0.05, ## p<0.01

Fig.2 Direct Effect of [K]_o on SODs in VSMC

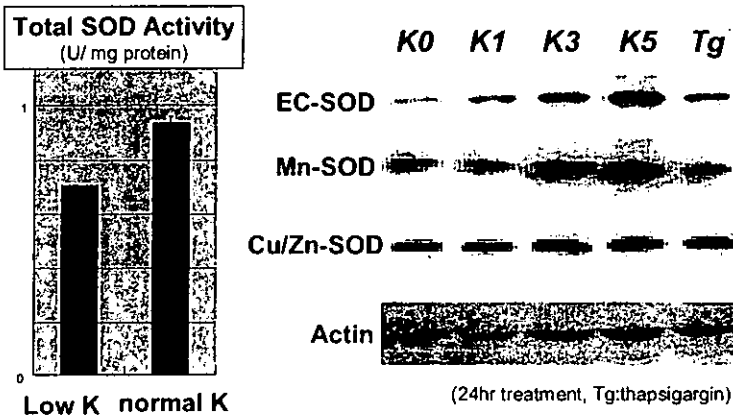
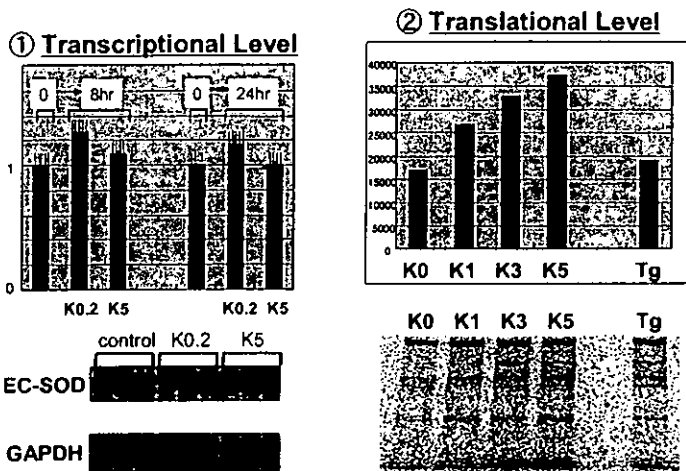


Fig.3 Direct Effect of [K]_o on EC-SOD



(4)副腎腫瘍、DHEA

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

伊庭 英夫

東京大学・医科学研究所・感染免疫大部門

研究要旨

エストロゲン受容体 (ER) と AP-1 (Fos/Jun ダイマーから構成される) の相互作用の分子機構を解析するために両転写因子の転写活性化に共通して必要とされる SWI/SNF クロマチン構造変換因子に注目して追求した。その結果この複合体を構成するサブユニットの 1 つ BAF60a が c-Fos/c-Jun ダイマーはもとより、ER α 、ER β と結合しうることが証明された。こうした結合は非競合的であり、こうした構造的な相互作用を介して両転写因子間の cross-talk がうまれエストロゲンの生理作用の多様性に貢献しているものと考えられた。またこの研究の過程で、副腎上皮癌由来細胞株の 1 つ、SW13 株で SWI/SNF 複合体の触媒サブユニット BRG1, Brm の発現の on/off が、エピジェネティカルに変換するという現象を見出し、これを追求して BRG1 遺伝子、Brm 遺伝子ともに癌抑制遺伝子であることまたその発現誘導をヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤で誘導できることを示した。

A. 研究目的

転写制御因子 AP-1 とエストロゲンレセプター (ER) の相互作用については、これまでその現象については長く報告されながら、その分子機構はまだ明らかにされていない。我々は、これまでの研究からクロマチン構造変換因子、SWI/SNF 複合体が AP-1 の転写活性化因子の決定因子となっていることを示した。また米国で ER による転写活性化に SWI/SNF 複合体が必要とされることが報じられていたことから、本研究では AP-1、ER 両者の転写活性化に共通して関与するこの複合体に注目して両者の相互作用の様式を解析し、ステロイドの生理作用の多様性の解明をめざしたい。

また SWI/SNF 複合体には ATPase をもつ触媒サブユニットとして BRG-1 と Brm があるが、各複合体はこの一方のみを一分子のみ有し、両者を持つことはない。副腎皮質上皮癌細胞株 SW13 におい

て、触媒サブユニットである BRG-1 と Brm の両者を発現しないために機能的な SWI/SNF 複合体を欠失すると報じられていた。しかしこの研究の過程で我々は、この細胞株には報告どおりこの複合体を欠失するサブタイプである SW13 (vim-) と、BRG-1 と Brm を発現して機能的な複合体を有する SW13 (vim+) の 2 つのサブタイプが混在し、かつそれらは end-point-dilution により分離可能であることを示した。そこで本研究ではこの細胞株が示す特異なエピジェネティカルな形質転換の分子基盤の解明も同時に推進することとし、その発癌における意義やエピジェネティカルな変換を誘導する薬剤による発癌抑制法を検討することとした。

B. 研究方法

1) クロマチン構造変換因子 SWI/SNF 複合体の 1 つのサブユニットである

BAF60aがc-Fos/c-Junダイマーを結合するのみならず、ER α 、 β とどのような相互作用をするかを精査する。特にリガンドであるEstrogenの存在が、この結合性にどのように影響を与えるのかin vitroの実験で明らかにすると共に、in vivoにおける複合体の存在様式を追求する。

2) 副腎皮質上皮癌細胞SW13が、SWI/SNF複合体の触媒サブユニットの発現をどのようにスイッチすることにより形質転換が生じるのか、その分子機構を転写レベル、後転写レベル (post-transcription level) に分けて解析すると共に、epigeneticalな変換を人工的に薬剤によって誘導できるか、そしてそれが発癌の抑制へと結びつくのかについても充分解析する。

C. 研究結果

1. ERとAP-1間の相互作用を支える分子機構

ER α はin vitroにおいてBAF60aとエストロゲン (E2) 依存的に結合しER β は非依存的に結合する。ER α のAF-2領域はE2に依存して安定にBAF60aと結合するのに十分であり、またBAF60ファミリーの別の構成因子であるBAF60bもBAF60aに比べ、弱いながらも同様の結合を示した。これらのことから、E2存在下でのER α によるSWI/SNF複合体の動員にBAF60との結合が重要であると考えられた。

これまでに、ER α はAP-1結合配列を介した転写活性化をE2依存的に促進することが分かっている。ER α 、c-Fos/c-Junが競合することなく同時にBAF60aに結合できるか否かを調べたところ、ER α と結合したBAF60aに対してc-Fos/c-Junヘテロダイマーは結合可能

であった。このことからER α とAP-1の間で見られる機能的相互作用がBAF60aを介しているものであることが示唆された。

2. SW13細胞株が示すエピゲネティカルな変換とその発癌における意義

(2-1) SW13細胞株中には機能的なBRG1とBrm遺伝子はともに存在していて、しかも両者は高いレベルで常に転写を受けていることがrun-on transcription assayによりわかった。さらに、この細胞株中には、両遺伝子が転写後に抑制を受けてそのmRNAを全く生成しないSW13 (vim-)と、そうした抑制を受けずにmRNAを生成できるSW13 (vim+)の2つの細胞のサブタイプに限界希釈法で分離可能であることが示された。

(2-2) SW13 (vim-)細胞はレトロウイルスの激しいジーンサイレンシングを誘導する。AP-1による転写活性化にはSWI/SNF複合体が必須であるという我々の成績から予想されるとおり、このSW13 (vim-)細胞はvimentin遺伝子をはじめとした多くのAP-1の制御下にある遺伝子群 (CD44, collagenase, c-met等)の発現能を欠いている。一方のSW13 (vim+)ではレトロウイルスの発現は維持され、同時にAP-1の遺伝子群の発現もよく支持されている。こうしたサブタイプ間の変換が自発的に起こる可能性を追求したが、天然での変換はこれまでのところ観察されていない。epigeneticalな変換を誘導しうる試薬を検索したところ、トリコスタチンA, Chap31等のHDAC阻害剤の一過的な処理でSW13 (vim-)細胞はSW13 (vim+)に類似した細胞へと極めて高い効率で安定して変換しうることを示された。

(2-3) SW13(vim-)に外来性の Brm や BRG1 遺伝子を導入するとその足場非依存性増殖能が1/10以下に低下した。このことは両遺伝子が癌抑制遺伝子であることを示している。また SW13(vim-)を HDAC 阻害剤で3日間処理すると、その後は薬剤の非依存下で足場非依存性増殖能が1/100になることも示された。

D. 考察

BAF60a と c-Fos/c-Jun ダイマー、ER α の3者が、複合体を形成することを *in vitro* 実験で示したが、今後細胞内での SWI/SNF 複合体で、これらがどのように相互作用を發揮するのか、最新のプロテオミックスを使って解析する必要がある。また SW13細胞株で見られる特異な Brm と BRG1 の発現制御機構については、他の細胞株についても検証してその普遍性を追求すると共に、post-transcription レベルでの制御の分子機構を解明し、発癌抑制の方法論へと結びつけたい。

E. 結論

エストロゲン受容体 (ER) と AP-1 (Fos/Jun ダイマーから構成される) の相互作用の分子機構を解析するために両転写因子の転写活性化に共通して必要とされる SWI/SNF クロマチン構造変換因子に注目して追求した。その結果この複合体を構成するサブユニットの1つ BAF60a が c-Fos/c-Jun ダイマーはもとより、ER α 、ER β と結合しうることが証明された。こうした結合は非競合的であり、こうした構造的な相互作用を介して両転写因子間の cross-talk がうまれエストロゲンの生理作用の多様性に貢献しているものと考えられた。またこの研究の過程で、副腎上皮癌由来細胞株の1つ、SW13株で SWI/SNF 複合体の触媒サブ

ユニット BRG1、Brm の発現の on off が、エピジェネティカルに変換するという現象を見出し、これを追求して BRG1 遺伝子、Brm 遺伝子ともに癌抑制遺伝子であることまたその発現誘導をヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤で誘導できることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shimizu, Y., Yamamichi, N., Saitoh, K., Watanabe, A., Ito, T., Nishina, M., Mizutani, M., Yahagi, N., Suzuki, T., Sasakawa, C., Yasugi, S., Ichinose, M. and Iba, H. Kinetics of v-src-induced epithelial-mesenchymal transition in developing glandular stomach. *Oncogene*. 22 : 884-893 (2003)

Kameda, T., Nakata, A., Mizutani, T., Terada, K., Iba, H. and Sugiyama, T. Analysis of the cellular heterogeneity in the basal layer of mouse ear epidermis: an approach from partial decomposition *in vitro* and retroviral cell marking *in vivo*. *Exp Cell Res*. 283 : 167-183 (2003)

Yamamichi-Nishina, M., Ito, T., Mizutani, T., Yamamichi, N., Watanabe, H. and Iba, H. SW13 cells can transition between two distinct subtypes by switching expression of BRG1 and Brm genes at the post-transcriptional level. *J. Biol. Chem*. 278 : 7422-7430 (2003)

Iba, H., Mizutani, T. and Ito, T. SWI/SNF chromatin remodeling complex and retroviral gene silencing. *Reviews in Medical Virology*. 13 : 99-110 (2003)

Fukuda, k., Kameda, T., Saitoh, K., Iba, H. and yasugi, S. Down-regulation of endodermal Shh is required for gland formation in chicken stomach. *Mechanism of Development*. 120 : 801-809 (2003)

Joo, A., Aburatani, H., Morii, E., Iba, H.

and Yoshimura, A. STAT3 and MITF cooperatively induce cellular transformation through upregulation of c-fos expression. Oncogene. in press

2. 学会発表

1) Hideo Iba, The Awaji International Forum on Infection and Immunity August 25-28, 2003. (Awaji Island, Japan)
Retroviral gene silencing and SWI/SNF complex.

2) Hideo Iba, 第9回日独癌会議 9th Japanese-German Workshop September 18-20, 2003. (Essen, Germany)
Retrovirus gene silencing and cellular memory.

3) Hideo Iba, 16th IGB Meeting; Molecular Biology, Genetics and Pathology of AP-1 Transcription Factors. October 11-14, 2003. (Capri, Italy)
SWI/SNF chromatin remodeling complex as a determinant of AP-1 transactivating activity.

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—

上芝 元、山本奈津子、一城貴政、土田恭代、石川真由美、廣井直樹、
下条正子、坪井久美子
東邦大学医学部内科学糖尿病・代謝・内分泌科

A. 研究目的

超音波、CT 及び MRI の画像診断の進歩と普及により、副腎偶発腫の頻度が増加していると考えられるが、副腎偶発腫から臨床的に副腎皮質非機能性腺腫と診断された症例について、ハイブリットステロイドである18-hydroxycortisol (18-OHF) 及び18-oxocortisol (18-OXOF) の産生を検討した。また18-OHF 及び18-OXOF が高値を示す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 (APA) と比較検討した。

B. 研究方法

副腎皮質非機能性腺腫20例 (男性11例、女性9例、平均年齢58.5歳) を対象とし、尿中及び血中の18-OHF 及び18-OXOF を既報のRIA (Scand J Clin Lab Invest 57: 395-399, 1997) で測定した。尿0.5ml 又は血清0.2ml にクエン酸緩衝液を入れ、酢酸エチルで抽出した。有機層のみを取り出し、蒸発乾固させ、40% メタノールで再溶解し、高速液体クロマトグラフィーにて、18-OHF 及び18-OXOF の分画を採取した。それらをRIAにて定量した。今回の対象症例は、臨床的に診断されたものである (施行された検査としては、血中ACTH、Cortisol、Aldosterone 及び血漿レニン活性の基礎値、Cortisol の日内変動、¹³¹I-アドステロール副腎シンチなどである)。正常対照群として、健康成人15例 (男性7例、女性8例、平均年齢57.7歳) の値

を用いた。APA は11例 (男性5例、女性6例、平均年齢43.5歳) である。

(倫理面への配慮)

対象者に対してインフォームドコンセントを得て研究を施行した。

C. 研究結果

副腎皮質非機能性腺腫3例で正常対照群の平均値 (尿中18-OHF 64.9ng/day、血中18-OHF 0.98ng/ml、尿中18-OXOF 1.40ng/day、血中18-OXOF 0.060 ng/ml) より2-3倍の高値を示した (図1-4)。APA 群の平均値は、正常対照群の平均値の4-6倍の高値を示した (図1-4)。

D. 考察

副腎偶発腫から臨床的に副腎皮質非機能性腺腫と診断された20症例の中で、3症例において18-OHF 及び18-OXOF の産生が亢進していた。3症例をみると、年齢48-55歳で男性2例、女性1例、BMIは24-25で著明な肥満は認められなかった。高血圧は1例 (表のNo.2) で、降圧薬でコントロールされている。血清K、血中ACTH、Cortisol、Aldosterone 及び血漿レニン活性でも、他の症例と異なった特徴は認められなかった。腫瘍の大きさは19-25mmであった。18-OHF 及び18-OXOF が高値を示していない症例との臨床的な違いは、現時点では明らかではない。ホルモン産生の点からみると、非機能性腺腫と異なっている可能性が考

えられた。特に高血圧を呈している症例については、将来 APA となることも、考慮しておかなければならないと考えられた。

E. 結論

副腎偶発腫で非機能性腺腫と考えられた症例でも、一部にはハイブリッドステロイド産生能からみると、アルドステロン産生腺腫に移行する可能性を持っていることが推定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ueshiba H, Miyachi Y: Effect of doxazosin on insulin resistance in hypertensive patients with obesity. *Hormone and Metabolic Research* 35 (9): 532-536, 2003
- 2) 田部田 功、上芝 元、一城貴政、廣井直樹、薬師寺史厚、下条正子、坪井久美子、宮地幸隆: 白衣性高血圧患者の CRH 負荷テストにおける過敏反応. *ACTH RELATED PEPTIDES* 13: 237-241, 2003
- 3) 上芝 元、清水雄介、一城貴政、土田恭代、石川真由美、薬師寺史厚、廣井直樹、下条正子、坪井久美子、宮地幸隆: 2型糖尿病における 17, 20-lyase 活性の低下. *ホルモンと臨床* (春季増刊号: ステロイドホルモン研究の進歩2002) 51: 68-76, 2003
- 4) 一城貴政、薬師寺史厚、上芝 元、宮地幸隆: 日本における副腎偶発腫の疫学調査. 一2年間の調査結果報告—ホルモンと臨床 (春季増刊号: ステロイドホルモン研究の進歩2002) 51: 147-154, 2003
- 5) 上芝 元: 肝臓における 11 β HSD. *ホルモンと臨床* 51 (7): 611-614, 2003
- 6) 上芝 元: 高脂血症における HMG-CoA 還元酵素阻害薬アトルバスタチンのステロイドホルモンに対する影響. *Progress in Medicine* 23 (9): 2389-2393, 2003
- 7) 木内俊介、石川真由美、下条正子、山本奈津子、上芝 元、笹野公伸、宮地幸隆: Paraganglioma を疑う腹腔内腫瘍により副腎不全をきたした一例. *日本内分泌学会誌* 79 Suppl. Sep: 73-75, 2003

8) 一城貴政、山本奈津子、薬師寺史厚、上芝 元、宮地幸隆: 副腎偶発腫の長期疫学調査集計報告. 厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 副腎ホルモン産生異常に関する研究班 平成14年度研究報告書: 124-129, 2003

2. 学会発表

- 1) ワークショップ○上芝 元、一城貴政、土田恭代、石川真由美、廣井直樹、下条正子、坪井久美子: 副腎偶発腫の副腎皮質非機能性腺腫における 18-hydroxycortisol, 18-oxocortisol の検討. 第11回日本ステロイドホルモン学会, 岐阜, 2003, 11
- 2) ○ Ueshiba H, Miyachi Y: Effect of doxazosin on insulin resistance in hypertensive patients with obesity. 12th European Congress on Obesity, Helsinki, 2003, 5
- 3) ○上芝 元、坪井久美子、宮地幸隆: アンジオテンシン変換酵素阻害薬ペリンドプリルのインスリン抵抗性改善作用. 第100回日本内科学会, 福岡, 2003, 4
- 4) ○上芝 元、山本奈津子、長澤薫、一城貴政、土田恭代、石川真由美、清水雄介、廣井直樹、下条正子、坪井久美子、宮地幸隆: 生活習慣病と DHEA. 第76回日本内分泌学会学術総会, 横浜, 2003, 5
- 5) ○上芝 元、清水雄介、坪井久美子、宮地幸隆: 1型糖尿病におけるステロイドホルモン合成酵素活性の検討. 第46回日本糖尿病学会, 富山, 2003, 5
- 6) ○上芝 元、山本奈津子、長澤薫、一城貴政、土田恭代、石川真由美、清水雄介、廣井直樹、下条正子、坪井久美子、宮地幸隆: 生活習慣病と DHEA の検討. 第3回日本抗加齢医学会, 東京, 2003, 6

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表 18-OHF、18-OXOFが高値を示した症例

No	年齢	性	BMI	血圧	血清 Na/K	血中 ACTH/F	血中 Ald/PRA	血中18-OHF/ 18-OXOF	尿中18-OHF/ 18-OXOF	腫瘍
1	52	男	24.8	132/72	138/3.9	24.5/9.8	83.5/0.91	2.9/0.17	192/4.2	右・25mm
2	55	男	25.2	138/80	140/3.8	32.4/8.9	72.4/0.72	2.6/0.15	181/3.5	左・19mm
3	48	女	24.3	130/72	139/4.0	29.3/9.2	65.3/0.81	2.5/0.13	134/3.4	右・22mm

Na/K: mEq/l, ACTH: pg/ml, F: μ g/dl, Ald: pg/ml, PRA: ng/ml/hr,
血中18-OHF & 18-OXOF: ng/ml, 尿中18-OHF & 18-OXOF: ng/day

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

関原久彦

横浜市立大学第三内科

研究要旨

【目的】 dehydroepiandrosterone (DHEA) と dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) の血清濃度は心血管疾患の死亡率と逆相関することが報告されており、心臓のコラーゲン濃度が加齢とともに増加することも報告されていることから、加齢に伴う心筋の線維化と DHEA の関連を調べるため、ラット心線維芽細胞においてコラーゲンタイプ I 発現に対する DHEA の影響を検討した。

【方法】 生後 0 日のラットの心臓より線維芽細胞を培養し、DHEA 10^{-7} M、 10^{-6} M を暴露後、プロコラーゲンタイプ I ($\alpha 1$) の mRNA 発現量、プロコラーゲンタイプ I の蛋白質発現量を測定した。

【結果】 DHEA (10^{-7} M と 10^{-6} M) 暴露 24 時間後のプロコラーゲンタイプ I ($\alpha 1$) mRNA の発現はそれぞれ対照群と比較し $55.4 \pm 7.3\%$ ($n = 5$, $P = 0.018$ vs. control)、 $47.5 \pm 9.3\%$ ($n = 5$, $P = 0.008$ vs. control) と濃度依存的に減少していた。DHEA (10^{-7} M と 10^{-6} M) 暴露 72 時間後の培地中のプロコラーゲンタイプ I の分泌はそれぞれ対照群と比較し $105.0 \pm 18.1\%$ ($n = 6$, $P = 0.7861$ vs. control)、 $62.3 \pm 3.8\%$ ($n = 6$, $P = 0.0016$ vs. control) であり、DHEA 10^{-6} M にて有意に減少を認めた。細胞内プロコラーゲンタイプ I の合成は DHEA 10^{-6} M にて対照群と比較し $69.9 \pm 3.3\%$ ($n = 6$, $P = 0.0005$ vs. control) であり、有意に減少を認めた。

【結語】 DHEA は心線維芽細胞において、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 の発現と、蛋白質の合成および分泌を抑制することが確認された。DHEA には心臓の線維化を抑制する作用があることが示唆された。

A. 研究目的

dehydroepiandrosterone (DHEA) と dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) はもっとも豊富な副腎由来のホルモンであり、それぞれ血清濃度は 10^{-8} と 10^{-6} M 程度となっている。血清濃度は 25 歳から 30 歳でピークに達し、その後加齢に伴い徐々に減少し 60 歳にはピークの 5% から 10% に低下することが知られている。DHEA、DHEAS の年齢による減少は動脈硬化、肥満、糖尿病、老化、発癌、心血管系疾患などに関係があると報告されている。

心臓の線維芽細胞は心筋層に存在し、細胞外器質の蓄積を主に行っている。心臓の細胞外器質にはフィブロネクチン、ビトロネクチン、コラーゲンタイプ I、III、V、コラーゲナーゼなどの構造蛋白と接着蛋白が含まれている。心臓でコラーゲンタイプ I は新規に分泌されたコラーゲンの 80% を占め、コラーゲンタイプ III はそのうちの 20% である。多くの組織で加齢とともにコラーゲンのクロスリンクとコラーゲン濃度は増加することが報告されており、心臓のコラーゲン濃度も加齢とともに増加することが報告されてい

る。心臓の病的負荷は細胞外器質の過剰な蓄積と関係しており、心臓の線維化は三大慢性心血管疾患（高血圧、心不全、心筋梗塞）による死亡と障害の原因となることが報告されている。DHEAとDHEASの心血管系疾患に対する保護作用は多く報告されており、慢性心不全患者の血清DHEA濃度は減少していることや、慢性心不全の重症度はDHEASが低いほど重症となっていることなどが挙げられる。今回我々は、心線維芽細胞のプロコラーゲンタイプI発現に対するDHEAの作用を検討した。

B. 研究方法

1. DHEA

DHEAはSigmaより購入した。99.5%のエタノールに溶解し、心線維芽細胞の培養に対し 10^{-7} Mと 10^{-6} Mの濃度を用いた。対照群に対してもDHEA投与群と同量のエタノールを添加した。

2. 心線維芽細胞の培養

生後0日のSprague Dawley(SD)ラットの心臓よりGroheらとSimpsonらの方法により線維芽細胞を取り出した。線維芽細胞はペニシリン-ストレプトマイシン（最終濃度それぞれ50U/ml、 0.05μ g/ml）、10%ウシ胎児血清（FBS）を含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）で、 37°C 、5% CO_2 の条件で培養した。2代目継代に培養し、コンフルエントになった後、FBS中に含まれるホルモンの影響を除くため24時間チャコール処理した血清で培養し、DHEA 10^{-7} M、 10^{-6} Mを24時間暴露し、ノーザンハイブリダイゼーションに使用した。ウエスタンブロットに対しては同様にチャコール処理した血清で24時間培養した後、アスコルビン酸2ホスフェイト50

$\mu\text{g/ml}$ を添加しDHEA 10^{-7} M、 10^{-6} Mを72時間暴露した細胞を用いた。

3. RNAの抽出

ノーザンハイブリダイゼーションのためのRNAはIsogen（ニッポンジーン）を使用し抽出した。RNAの濃度は260nmの吸光度にてgene quant pro（Amersham）を用いて定量した。

4. ノーザンハイブリダイゼーション

抽出したRNA $8\mu\text{g}$ をそれぞれアガロースゲルにて電気泳動し、ナイロンメンブレン（イモビロン-Ny+、Millipore）に転写した。そのメンブレンを0.05N水酸化ナトリウムにて固定した。 ^{32}P で標識されたプロコラーゲンタイプ（ $\alpha 1$ ）のcDNAおよび内部標準として用いた18s ribosomal RNAのcDNAをプローブとしてハイブリダイゼーションし、イメージングプレートに感光させた。イメージングプレートスキャナーBAS2500（富士フイルム）にてそれぞれのバンドの放射活性を解析した。その際に、内部標準として用いた18s ribosomal proteinでプロコラーゲンタイプI（ $\alpha 1$ ）mRNAの発現を補正し解析した。なお同一のメンブレンより前回のプローブを剥がし、新たなプローブをハイブリダイゼーションさせ使用した。

5. ウエスタンブロットティング

Triton X-100 Tris HCl、pH 7.6を用いて細胞より蛋白を抽出した。蛋白は3分間、 95°C で加熱した後、7.5%ポリアクリルアミドSDS-PAGEゲルに電気泳動され、ニトロセルロースメンブレン（Hybond-P、Amersham Biosciences）に転写された。メンブレンは10 mM Tris-HClと150 mM NaCl（pH7.4）と

0.1% Tween 20 (TTBS) を溶媒とした 5% のノンファットドライミルクで1.5 時間、ブロッキングした後、抗プロコラーゲンタイプI抗体 (1:1000) (Santa Cruz) で1時間、反応させた。3回メンブレンを洗浄後、二次抗体で1時間反応させ、ECL plus western blotting detection agent (Amersham Biosciences) を用いて発光させ、ルミノイメージングアナライザー (FAS-1000、TOYOBO) と Gel pro analyzer 3.1 (TOYOBO) にて蛋白量を解析した。

6. 統計的処理

測定値は平均値±標準誤差であらわした。有意差検定は Stat View ver. 5.0 (Windows) を用い、スチューデントの t 検定を用い、 $P < 0.05$ をもって統計的有意差ありとした。

7. 倫理面への配慮

マウスから線維芽細胞を採取する際には、十分な麻酔下でマウスの処置を行い、マウスに苦痛を与えないよう配慮した。

C. 結果

1. DHEA のプロコラーゲンタイプ I ($\alpha 1$) mRNA 発現に対する効果

DHEA (10^{-7} M と 10^{-6} M) 暴露24時間後のプロコラーゲンタイプ I ($\alpha 1$) mRNA の発現はそれぞれ対照群と比較し、 $55.4 \pm 7.3\%$ ($n = 5$ 、 $P = 0.018$ vs. control)、 $47.5 \pm 9.3\%$ ($n = 5$ 、 $P = 0.008$ vs control) と濃度依存的に減少していた (図1)。

2. 心線維芽細胞における DHEA 暴露によるプロコラーゲンタイプ I の蛋白分泌の経時的変化

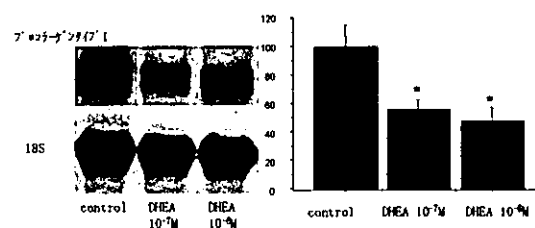


図1. 新生児ラット由来心線維芽細胞のプロコラーゲンタイプ I mRNA 発現量の比較

対照群と DHEA 10^{-6} M 群を 0、6、12、24、72 時間で比較した。24 時間後にて対照群 1317.8 ± 126.1 (optical density) に対し、DHEA 10^{-6} M 群 606.2 ± 178.9 (optical density) ($n = 4$ 、 $P = 0.0175$) であり、72 時間後にて対照群 1708.8 ± 71.1 (optical density) に対し DHEA 10^{-6} M 群 1013.9 ± 100.4 (optical density) ($n = 4$ 、 $P = 0.013$) であった。24 時間と 72 時間で対照群と DHEA 10^{-6} M 群に有意差が認められた (図2)。

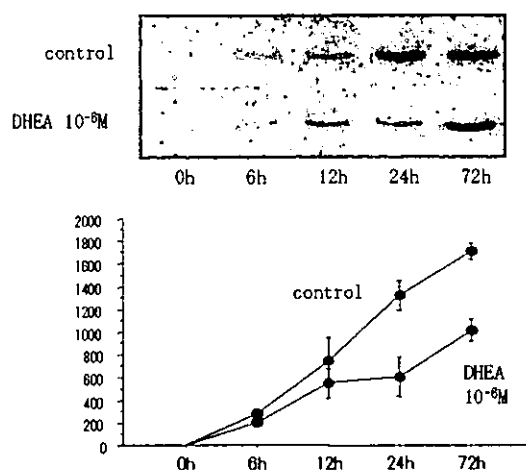


図2. 新生児ラット由来心線維芽細胞のプロコラーゲンタイプ I 蛋白発現の経時変化

3. DHEA のプロコラーゲンタイプ I 分泌に対する効果

DHEA (10^{-7} M と 10^{-6} M) 暴露72時間後の培地中のプロコラーゲンタイプ I の分泌はそれぞれ対照群と比較し $105.0 \pm 18.1\%$ ($n = 6$ 、 $P = 0.7861$ vs. control)、 $62.3 \pm 3.8\%$ ($n = 6$ 、 $P = 0.0016$ vs. control) であり、DHEA 10^{-6} M にて有

意に減少を認めた (図3)。

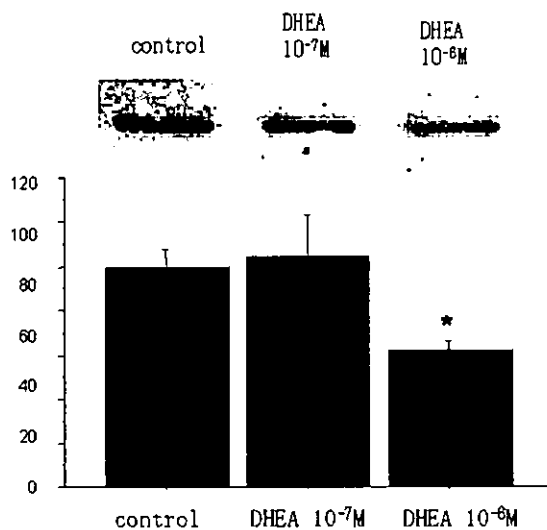


図3. 新生児ラット由来心線維芽細胞培養液中のプロコラーゲンタイプI含量の比較

4. DHEAの細胞内抽出液中のプロコラーゲンタイプI発現に対する効果

培地中のプロコラーゲンタイプIはDHEA 10⁻⁶ Mで有意な減少を認めたため細胞中の暴露72時間後のプロコラーゲンタイプIの合成を検討した。細胞内プロコラーゲンタイプIの分泌は対照群と比較し69.9±3.3% (n=6, P=0.0005 vs. control) であり、DHEA 10⁻⁶ Mにて有意に減少を認めた (図4)。

D. 考察

DHEASは全ての細胞に存在するステロイドサルファターゼにより、活性型と考えられるDHEAに変換されるが、DHEAのターンオーバーは極めて速い、そのため多くの臨床研究ではDHEASを測定している。しかし、DHEAは極めて生物学的活性豊富なホルモンである。そのため本研究ではDHEAの心線維芽細胞に対する効果を検討した。

心臓のポンプとしての機能は主に心筋細胞に基づいているが、その構造と機能の統合は大半を線維芽細胞が担っている。実際、線維芽細胞は心臓で主たる細胞で

あり、コラーゲンを主とする細胞外器質の蓄積を行っている。心臓の線維芽細胞はフィブロネクチン、ビトロネクチン、コラーゲンタイプI、III、V、コラゲナーゼなどの細胞外器質を形成する蛋白を合成している。心臓ではコラーゲンタイプIはプロコラーゲンとして分泌され、新規に分泌されたコラーゲンの80%を占める。そのため、我々は心筋間質のコラーゲン代謝を最も反映すると考えられる細胞と培養液中のプロコラーゲンタイプIを測定した。

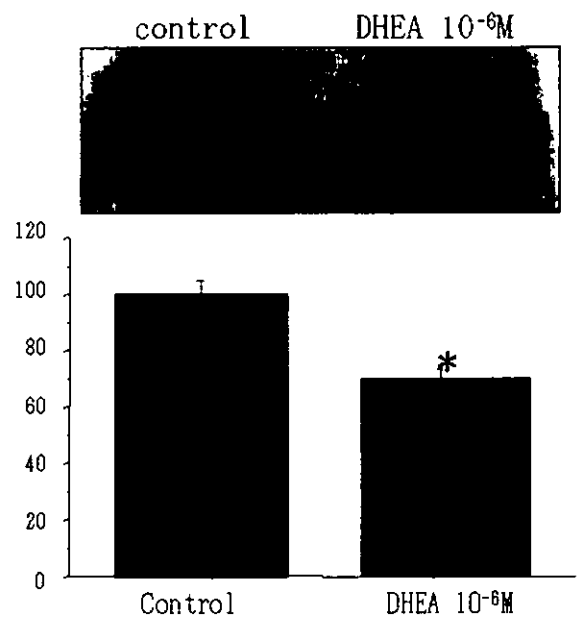


図4. 新生児ラット由来心線維芽細胞抽出液中のプロコラーゲンタイプI

ヒトとラットにおいて加齢により心臓のコラーゲンの量が増加し、密度と太さにおいてコラーゲンタイプIが増加すると報告されている。心筋細胞に細胞死が生じた場合、心筋細胞は分裂後期の細胞で再生しないため、失われた心筋細胞の場所を補うためコラーゲンが蓄積するということが報告されている。また、老化によりコラーゲンの退縮が減少することも報告されている。しかし詳しい機序はまだあまりわかっておらず、加齢によるDHEAの減少が心臓の線維化に影響を及ぼしていることが予想される。