

Barrett-Connorらが、DHEASの心血管疾患に対する保護効果を報告して以来、DHEAまたはDHEASの心血管疾患に対する効果が多く報告されている。Ankerらは慢性心不全を持つ男性患者において血清DHEAのレベルが減少していると報告しており、Moriyamaらは血清DHEASのレベルと慢性心不全の重症度は相関していると報告している。そのためDHEA濃度と線維芽細胞のコラーゲンタイプI産生を検討したところ濃度依存的にコラーゲンタイプI産生は減少しており、DHEAが心臓において線維化を抑制することで心機能の低下を抑制していることが示唆される。

我々はin vivoでラットの心臓のプロコラーゲンタイプIとIIIのmRNAをRT-PCRにより測定したところ、DHEA投与ラットにおいてプロコラーゲン遺伝子の発現は減少していることを確認しており、DHEAには心臓の線維化を抑制する効果があると考察している。

線維芽細胞のプロコラーゲンタイプI発現は、1) p38を介した $\alpha 1 \beta 2$ インテグリンの刺激、2) p38を介したSp1/Sp3やSmad3などの転写因子の活性化、などによって調節されている。両者に共通のシグナルとしてp38の存在があげられるが、名和田らによってクローニングされた新規フォスファターゼ、DDSPはDHEAによって誘導され、p38を脱リン酸化することから、DHEAによる心線維芽細胞のプロコラーゲンタイプI発現抑制に深く関わっている可能性が考えられる(図5)。

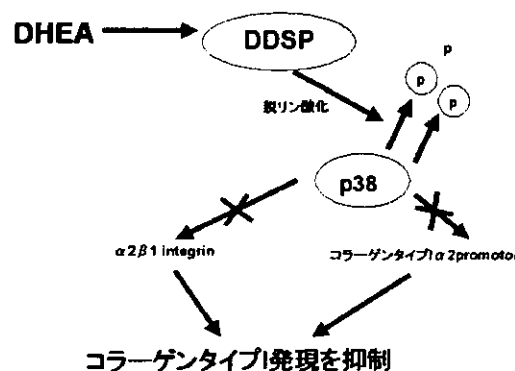


図5. DHEAによるコラーゲンタイプI発現に対する抑制機序の仮説

図5. DHEAによるコラーゲンタイプI発現に対する抑制機序の仮説

E. 結論

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、蛋白合成と分泌を抑制することが確認された。このことからDHEAは心臓の線維化を抑制する可能性があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
未発表

2. 学会発表

岩崎知之、向笠浩司、中村悟、山田佳彦、森保道、中島淳、関原久彦。ラット心線維芽細胞におけるcollagen type I発現に対するdehydroepiandrosterone (DHEA)の影響。第7回日本新血管内分泌学会総会(日本内分泌学会雑誌79巻2号 p523、2003. 9)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許、実用新案登録とも無し

(5) グルココルチコイド、GR、グルココルチコイド抵抗症

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

笹野公伸、佐藤容子、鈴木貴

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

研究要旨

Glucocorticoid receptor (GR) は、核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性転写因子であり、glucocorticoid の作用を発現する上で不可欠の分子である。近年 GR β が GR α の negative inhibitor であることが報告され、疾患の glucocorticoid 感受性に関与する可能性も示唆されている。ネフローゼ症候群を呈する糸球体腎疾患において臨床では glucocorticoid は有力な治療方法として使用されている。しかしステロイド治療の奏効しにくい難治性ネフローゼ症候群が存在し、ネフローゼ症候群患者の約10%を占める。そこで本研究では、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 (FGS) と膜性腎症 (MN) における GR α と GR β の発現を、正常ヒト腎と治療が奏効し易いといわれる微小変化型 (MCNS) とで免疫組織学的に比較検討した。その結果、糸球体構成細胞の陽性率において GR α の疾患差は認められず、GR β が FGS で有意に発現が高かった。よって FGS のステロイド抵抗性に GR β の発現が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

Glucocorticoid receptor (GR) は、核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性転写因子であり、glucocorticoid (GC) の作用を発現する上で不可欠の分子である。1985年に GR の cDNA が cloning された時点で GR α 、GR β の2つの isoform が存在することが推定されており、GR α は glucocorticoid responsive element (GRE) を有し GC の作用発現の主体であることはわかっていたが、GR β の作用については不明であった。GR β は ligand と結合せず、核内に存在するといわれており、ヒトにおける発現部位は心臓、大脳皮質、海馬、視床下部、下垂体、骨髄、胸腺、脾臓、リンパ球、肺、肝臓、腎臓、脂肪、骨格筋、胎盤 (mRNA)、大脳皮質、海馬、視床下部、下垂体、リンパ球、心臓、腎臓、肺、肝臓 (蛋白)

で報告がある。このように GR β は全身で広く分布を示すが、mRNA 定量では GR β は GR α に比して微量であり (肺 300:1、肝臓500:1、PBMCs600:1、下垂体30-40:1)、蛋白量の比較では種々の議論があり詳細は不明である。近年、GR β が GR α の negative inhibitor であることが報告され、細胞や疾患の glucocorticoid 感受性に関与する可能性も示唆されている。すなわち、ステロイド抵抗性の気管支喘息、潰瘍性大腸炎、白血病などで GR β の発現量の増加が報告されている。ネフローゼ症候群を呈する糸球体腎疾患において glucocorticoid は有力な治療方法として使用されている。しかし「種々の治療 (副腎皮質ステロイド薬と免疫抑制薬の併用は必須) を施行しても6ヶ月以上の治療期間に完全寛解ないし不完全寛解 I 型にいたらないもの」(厚生省調査班による) は難治性ネ

フローゼ症候群と定義され、ネフローゼ症候群患者の約10%を占める。そこで本研究では、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 (FGS) と膜性腎症 (MN) における GR α と GR β の発現を、正常ヒト腎と治療が奏効し易いといわれる微小変化型 (MCNS) とで免疫組織学的に比較検討した。

B. 研究方法

1. 検体

2000年-2002年に仙台社会保険病院腎センターにおいて施行された腎生検症例36例を検討した。症例の詳細は表1に記載する。標本は10%ホルマリン固定後、パラフィンブロックを作成し、病理学的検索はPAS染色で行った。これまでの研究でも用いられているように、顕微鏡的血尿のみで腎生検を受け、病理組織学的には形態的に異常がなく免疫グロブリンの沈着を認めない minor glomerular abnormalities (MGA) を正常腎として用いた。

2. 免疫組織化学

1次抗体は PA1-516 (GR α)、PA3-514 (GR β) を使用した。双方とも rabbit、polyclonal 抗体であり、Affinity Bioreagent 社より入手した。抗原不活化に autoclave を用い、Avidin-biotin complex 法を用いて DAB 発色を行った。また、それぞれに対応する抗原ペプチド (PEP-221, PEP-222) を同社より入手し、吸収試験を行った。

3. 細胞のカウントと統計処理

Labelling Index (LI) (%) = 陽性細胞数 / 総細胞数 (ここで総細胞数 = 糸球体構成細胞全部を指す) で陽性細胞率を算出し、統計処理は一元配置分散分析後、Scheffe's F test を行った。

倫理面への配慮

本研究計画は東北大学倫理委員会の承認 (2003-049) を得て施行している。

C. 研究結果

1. ヒト正常腎における GR α と GR β の発現

図1に正常腎 (MGA) における GR α (図1 A) と GR β (図1 C) の免疫染色の結果を提示する。双方ともに糸球体上皮細胞と糸球体内皮細胞に陽性細胞が多く、メサンギウム細胞には陰性細胞が多かった。吸収試験の結果は、非特異的染色を認めなかった (図1 B、1 C)。

2. 腎疾患における GR α と GR β の発現比較

図2に FGS、MCNS、MN における GR α と GR β の染色結果を示す。正常腎における染色傾向と大差ないように見受けられたが、細胞をカウントし、陽性細胞率 (LI) を算出したところ、表2のような結果が得られた。すなわち、GR α は正常腎と各疾患群間で有意差はなかったが、GR β の発現は FGS において他の群より有意に高かった。 ($p < 0.05$)

D. 考察

従来、糸球体疾患の多くが免疫機序により発症し、その進展に補体系、凝固系、種々の炎症のメディエーターが関与すると考えられてきた。そのため糸球体疾患の治療には GC が用いられ、ある程度の効果を挙げてきた。しかし近年、糸球体培養細胞を用いた検討では糸球体構成細胞に直接影響を及ぼし、細胞増殖や細胞外基質代謝を変化させることが明らかになってきた。これまでの研究でヒト正常腎臓において GR は遠位尿細管、集合管、上皮細胞と内皮細胞に強く発現が見られ、弱いメサンギウム細胞にも発現してい

ること、発現は核と細胞質両方に認められることが報告されており、GCが直接糸球体構成細胞に作用している可能性を示唆するが、GR α と β の発現を見た研究はなされていない。また、GC抵抗性のネフローゼ症候群患者の末梢血リンパ球で、GR β の mRNA 量が増加しているという報告があるが、疾患腎組織で GR α ・GR β の発現を比較した研究はされていない。従って本研究では、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 (FGS) と膜性腎症 (MN) における GR α と GR β の発現を、正常ヒト腎と治療が奏効し易いといわれる微小変化型 (MCNS) とで免疫組織学的に比較検討した。その結果、糸球体構成細胞の陽性率において GR α の疾患差は認められず、GR β が FGS で有意に発現が高かった。よって FGS のステロイド抵抗性に GR β の発現が関与している可能性が示唆された。しかし、陽性細胞の細胞の種類と同定と個々の糸球体構成細胞別の陽性細胞率の算出や、GC 使用の有無と GC への反応や尿蛋白、ネフローゼの有無など臨床所見との相関関係を調べる必要があり、今後の研究課題である。

E. 図の説明

図1 正常腎 (MGA) における GR α と GR β の発現

A : GR α 、B : GR α の吸収試験の結果、C : GR β 、

D : GR β の吸収試験の結果。(x400)

図2 腎疾患における GR α (A、C、E) と GR β (B、D、F) の発現

A, B : FGS、C, D : MCNS、E, F : MN。(x400)

F. 研究結果

1. 論文発表

- 1) Izumi M, Serizawa H, Iwaya K, Takeda K, Sasano H, Mukai K. A case of myxoid adrenocortical carcinoma with extensive lipomatous metaplasia. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 127 : 227-230. 2003
- 2) Suzuki S, Koyama K, Darnel A, Ishibashi H, Kobayashi S, Kubo H, Suzuki T, Sasano H, Krozowski ZS. Dexamethasone upregulates 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in BEAS-2 B cells. American journal of respiratory and critical care medicine. 167 : 1244-1249. 2003
- 3) Mune T, Morita H, Suzuki T, Takahashi Y, Isomura Y, Tanahashi T, Daido H, Yamakita N, Deguchi T, Sasano H, White PC, Yasuda K. Role of local 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in determining the phenotype of adrenal adenomas. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 88 : 864-870. 2003
- 4) Sato Y, Terada Y, Utsunomiya H, Koyanagi Y, Ito M, Miyoshi I, Suzuki T, Sasano H, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K. Immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in human follicle following xenotransplantation of the human ovarian cortex into NOD-SCID mice. Molecular reproduction and development. 65 : 67-72. 2003
- 5) Chai Z, Brereton P, Suzuki T, Sasano H, Obeyesekere V, Escher G, Saffery R, Fuller P, Enriquez C, Krozowski Z. 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type XI localizes to human steroidogenic cells. Endocrinology. 144 : 2084-2091. 2003
- 6) Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Takizawa T, Sunamori M, Handa M, Kondo T, Sasano H. Sex steroid hormone receptors in human thymoma. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 88 : 2309-2317. 2003

7) Kai K, Satoh N, Watanabe A, Shiraiwa K, Sasano H, Furuhashi K.
Case report of rat true hermaphroditism : colocalization of oocytes and granulosa and sertoli cells in the germinal cord. *Toxicologic pathology*. 31 : 290-294. 2003

8) Kawabata W, Suzuki T, Moriya T, Fujimori K, Naganuma H, Inoue S, Kinouchi Y, Kameyama K, Takami H, Shimosegawa T, Sasano H.
Estrogen Receptors (alpha and beta) and 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 and 2 in Thyroid Disorders: Possible In Situ Estrogen Synthesis and Actions. *Modern Pathology*. 16 : 437-444. 2003

9) Utsunomiya H, Suzuki T, Ito K, Moriya T, Konno R, Sato S, Yaegashi N, Okamura K, Sasano H
The correlation between the response to progestogen treatment and the expression of progesterone receptor B and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human endometrial carcinoma. *Clinical endocrinology*. 58 : 696-703. 2003

10) Suzuki T, Nakata T, Miki Y, Kaneko C, Moriya T, Ishida T, Akinaga S, Hirakawa H, Kimura M, Sasano H
Estrogen sulfotransferase and steroid sulfatase in human breast carcinoma. *Cancer Research*. 63 : 2762-2770. 2003

11) Fukushima A, Okada Y, Tanikawa T, Kawahara C, Misawa H, Kanda K, Morita E, Sasano H, Tanaka Y.
Virilizing adrenocortical adenoma with Cushing's syndrome, thyroid papillary carcinoma and hypergastrinemia in a middle - aged woman. *Endocrine Journal*. 50 : 179-187. 2003

12) Ishiguro H, Kato K, Kishimoto T, Nagai Y, Takahashi T, Sasano H, Ishikura H.
Expression of steroidogenic enzymes by luteinizing cells in the ovarian-type stroma of a mucin-producing cystic tumour of the pancreas. *Histopathology*. 43 : 97-98. 2003

13) Sato Y, Suzuki T, Hidaka K, Sato H, Ito K, Ito S, Sasano H.
Immunolocalization of nuclear transcription

factors, DAX-1 and COUP-TF II, in the normal human ovary : correlation with adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor-1 immunolocalization during the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 88 : 3415-3420. 2003

14) Kawamura M, Owada M, Ino J, Sugawara T, Nakano T, Mochizuki I, Sakuma T, Segawa T, Motegi I, Sasano H.
Effect of uni-adrenalectomy on blood pressure in a patient with excessive adrenal 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone production bilaterally. *Internal medicine*. 42 : 507-512. 2003

15) Kimura Y, Suzuki T, Kaneko C, Darnel A, Akahira J, Ebina M, Nukiwa T, Sasano H.
Expression of androgen receptor, and 5 α -reductase types 1 and 2 in early gestation fetal lung : A possible correlation with branching morphogenesis. *Clinical science (London, England)*. 105 : 709-713. 2003

16) Adachi J, Hirai Y, Terui K, Nakano T, Fukuda Y, Suda T, Sasano H.
A report of 7 cases of adrenal tumors secreting both cortisol and aldosterone. *Internal medicine*. 42 : 714-718. 2003

17) Konishi A, Tazawa C, Miki Y, Darnel AD, Suzuki T, Ohta Y, Suzuki T, Tabayashi K, Sasano H.
The possible roles of mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in cardiac fibrosis in the spontaneously hypertensive rat. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 85 : 439-442. 2003

18) Mori T, Murakami Y, Nishiki M, Koshimura K, Sasano H, Kato Y.
Expression of hypothalamic corticotropin-releasing hormone-like immunoreactivity in isolated ACTH deficiency : a report of an autopsied case. *Journal of Endocrinological Investigation*. 26 : 556-559. 2003

19) Nakamura Y, Miki Y, Suzuki T, Nakata T, Darnel AD, Moriya T, Tazawa C, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S,

- Yamada S, Sasano H.
Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in the atherosclerotic human aorta.
American Journal of Pathology. 163 : 1329-1339. 2003
- 20) Koshiyama H, Fujisawa T, Kuwamura N, Nakamura Y, Kanamori H, Oida E, Hara A, Suzuki T, Sasano H.
A case of normoreninemic aldosterone-producing adenoma associated with chronic renal failure: case report and literature review.
Endocrine. 21 : 221-226. 2003
- 21) Sugawara A, Takeuchi K, Suzuki T, Itoi K, Sasano H, Ito S.
A case of aldosterone-producing adrenocortical adenoma associated with a probable post-operative adrenal crisis: histopathological analyses of the adrenal gland.
Hypertension Research. 26 : 663-668. 2003
- 22) Ito A, Yamaguchi K, Tomita H, Suzuki T, Onogawa T, Sato T, Mizutamari H, Mikkaichi T, Nishio T, Suzuki T, Unno M, Sasano H, Abe T, Tamai M.
Distribution of rat organic anion transporting polypeptide-E (oatp-E) in the rat eye.
Investigative ophthalmology & visual science. 44 : 4877-4884. 2003
- 23) Suzuki S, Tsubochi H, Darnel A, Suzuki T, Sasano H, Krozowski ZS, Kondo T.
Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in alveolar epithelial cells in rats.
Endocrine Journal. 50 : 445-451. 2003
- 24) Abd-Elaziz M, Akahira J, Moriya T, Suzuki T, Yaegashi N, Sasano H.
Nuclear receptor DAX-1 in human common epithelial ovarian carcinoma: An independent prognostic factor of clinical outcome.
Cancer Science. 94 : 980-985. 2003
- 25) Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M.
The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters.
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 86 : 219-224. 2003
- 26) Sasano H, Edwards DP, Anderson TJ, Silverberg SG, Evans DB, Santen RJ, Ramage P, Simpson ER, Bhatnagar AS, Miller WR.
Validation of new aromatase monoclonal antibodies for immunohistochemistry: progress report.
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 86 : 239-244. 2003
- 27) Suzuki T, Miki Y, Nakata T, Shiotsu Y, Akinaga S, Inoue K, Ishida T, Kimura M, Moriya T, Sasano H.
Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in normal human tissue and breast carcinoma.
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 86 : 449-454. 2003
- 28) Nakata T, Takashima S, Shiotsu Y, Murakata C, Ishida H, Akinaga S, Li PK, Sasano H, Suzuki T, Saeki T.
Role of steroid sulfatase in local formation of estrogen in post-menopausal breast cancer patients.
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 86 : 455-460. 2003
- 29) Suzuki S, Tsubochi H, Ishibashi H, Suzuki T, Kondo T, Sasano H.
Increased expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome.
Pathology International. 53 : 751-756. 2003
- 30) Suzuki T, Moriya T, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H.
Intracrine mechanism of estrogen synthesis in breast cancer.
Biomedicine & Pharmacotherapy. 57 : 460-462. 2003
- 31) Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC, Rainey WE.
The Orphan Nuclear Receptors NURR 1 and NGFIB Regulate Adrenal Aldosterone Production.
Molecular Endocrinology 18 : 279-290. 2004
- 32) Tatsuno I, Uchida D, Tanaka T, Koide H, Shigeta A, Ichikawa T, Sasano H, Saito

Y. Vasopressin responsiveness of subclinical Cushing's syndrome due to ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia. Clinical Endocrinology (Oxf). 60 : 192-200. 2004

【表 1】 検討した症例の詳細

	MGA	FGS	MCNS	MN
症例数	5	8	6	17
年齢 (歳)	34.4±7.4	55.6±7.4	36.7±9.7	59.9±4.4
性別 (M/F)	3 / 2	6 / 2	4 / 2	10 / 7
観察糸球体数(個)	13.4±1.9	10.3±1.7	19.4±2.4	9.5±0.7

【表 2】 GR α と GR β の疾患別の発現 (LI ; labeling index) の比較

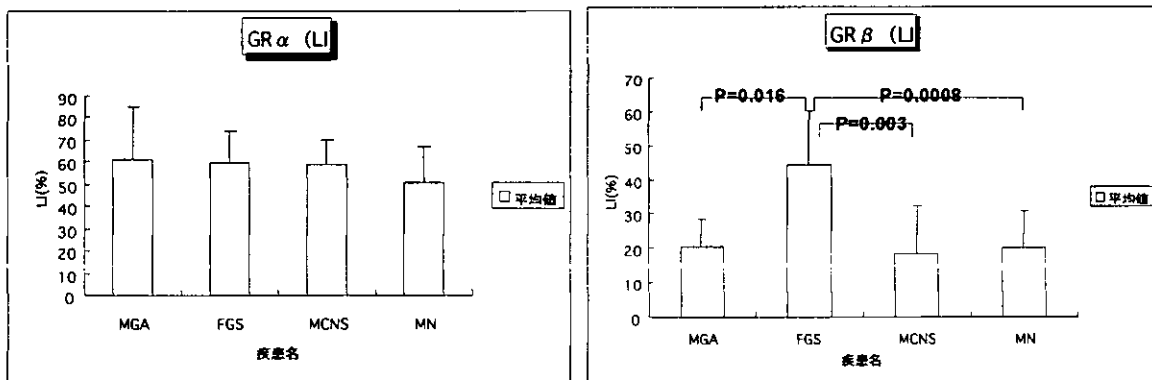


图 1

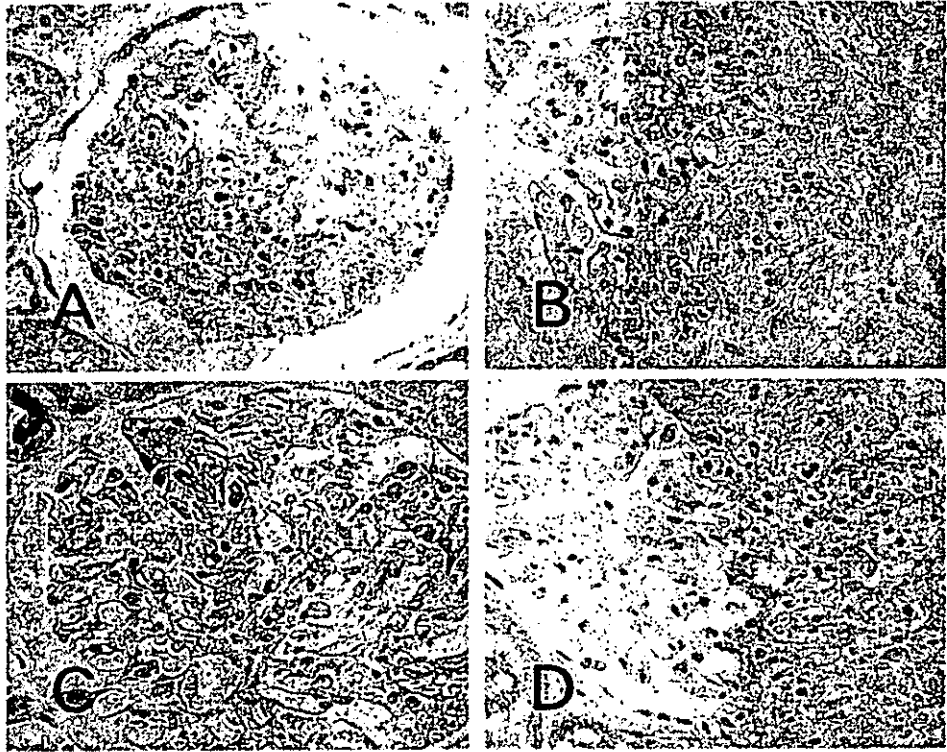
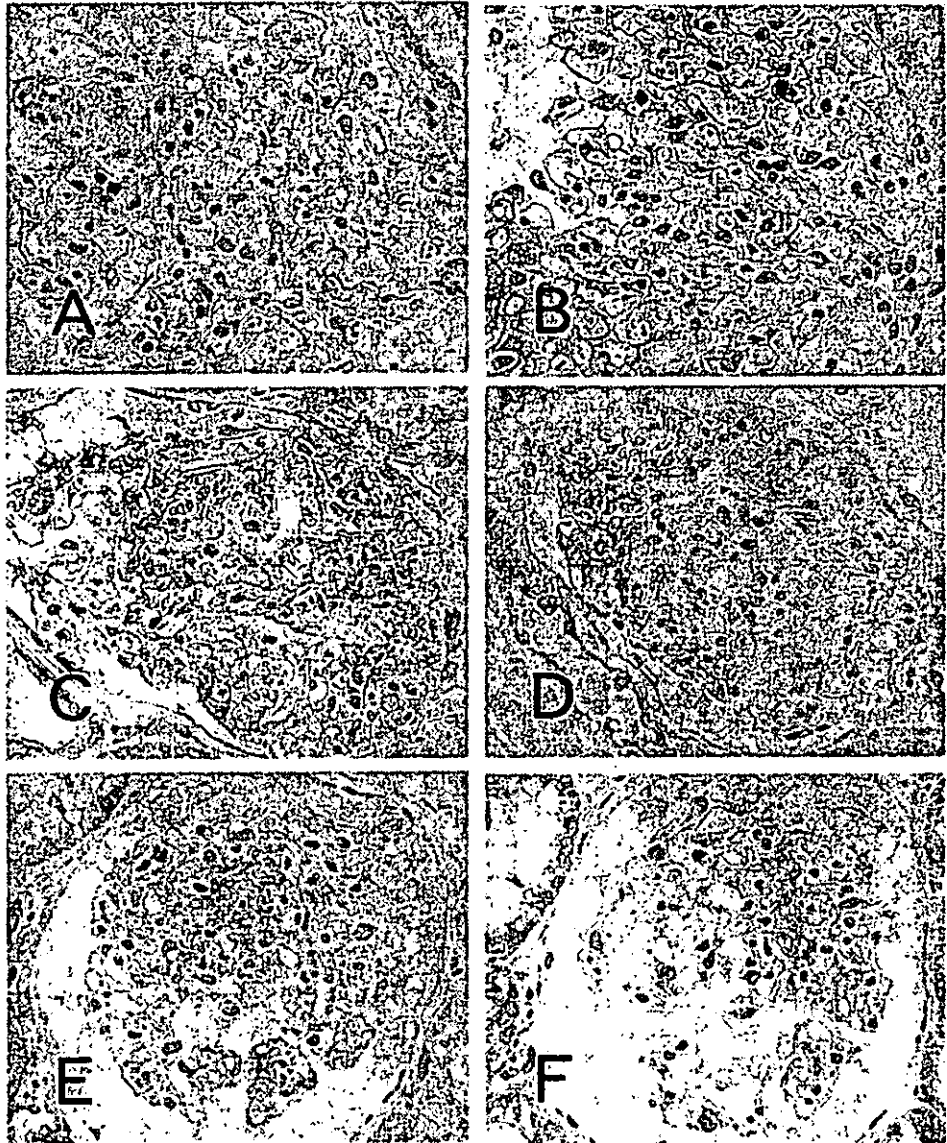


图 2



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

紅林 昌吾、許 欣、大月 道夫、笠山 宗正
大阪大学大学院医学系研究科 分子病態内科学講座

研究要旨

少量のグルココルチコイド薬により十分な抗炎症作用を発揮させることを目的として、血管内皮細胞における炎症性遺伝子 VCAM-1 と IL-6 をターゲットとして、核内受容体 (NR) によるこれら遺伝子の発現抑制を示すホルモン濃度に及ぼす NR の発現量の効果について解析した。デキサメサゾン (Dex) は TNF α 誘導性の IL-6 発現を遺伝子の転写レベルで抑制したが、VCAM-1 発現に対しては抑制作用を示さなかった。しかし、グルココルチコイド受容体 (GR) を高発現する血管内皮細胞では Dex による VCAM-1 遺伝子の転写抑制が認められた。さらに、NR 高発現血管内皮細胞では NR 低発現細胞に比べて、より少量のリガンドによる IL-6 遺伝子・VCAM-1 遺伝子の転写抑制が認められた。さらに、転写共役因子 CBP の過剰発現によっても、より少量のリガンドによって VCAM-1 遺伝子の転写抑制が可能であった。すなわち、核内受容体や転写共役因子の発現量を増加させることによって、炎症性遺伝子の転写抑制に必要なリガンドの用量を減少させ得ることが明らかとなった。

A. 研究目的

グルココルチコイド (GC) 薬は現在でもなお最も強力な抗炎症薬のひとつである。しかし、生体における GC の作用は多岐にわたっており、これが GC 薬の副作用として表現される。

大阪大学医学部附属病院全診療科の外来担当医師を対象に、経口 GC 薬の使用状況についてのアンケート調査を実施したところ、101名の医師が経口 GC 薬の投与を行っていることが判明した。経口 GC 薬の推定投与患者総数は2326名であり、このうち1960名 (89%) の患者が3ヶ月以上の投与を受けていることが明らかとなった。そして、GC 療法に発症し得る合併症のうち、糖尿病に関しては78%の医師が、また消化性潰瘍・感染症・骨粗鬆症・高血圧については各々 67%・65%・50%・12%の医師が注意して診療に当たっているのみであり、GC 療法の副作用に対して必ずしも適切な診療が実

施されていない実態が明らかとなった。

GC 薬の副作用を軽減するための試みとしては、気管支喘息に対する吸入ステロイド薬のように局所濃度を高めまた代謝により全身性の影響を少なくするという方法が開発されている。しかし、我々の検討 (Fujita et al., J. Bone Miner. Res., 16:782, 2001) でも、閉経後女性においては吸入ステロイド薬は骨代謝に悪影響を与えることが明らかとなっている。したがって現状では、GC 療法はその副作用に対するさまざまな副次的治療を必要とする点でやはり欠点の多い治療法である。このような観点から、副作用を引き起こさないステロイド療法の開発が望まれる。この目的を達成するための具体的方法としては、①少量の GC 薬で十分な抗炎症作用を発揮させるべく GC 薬の用量反応性を高める、② GC 受容体 (GR) 以外の (副作用を惹起させることなく) 他の核内受容体により抗炎症作

用を發揮させる、③副作用と抗炎症作用を分離させた選択的GRリガンド (selective GR modulator) の開発、などの方法が想定される。

GC薬の抗炎症作用のほとんどはGRによる炎症性遺伝子の転写抑制 (trans-repression 作用) を介した作用であり、GC薬の副作用の多くはGRによる標的遺伝子の転写促進 (trans-activation 作用) による作用であると考えられる。一般に、抗炎症作用を發揮するGCの用量は代謝作用に要する用量より多くを必要とするため、このことがGCの副作用をもたらす原因になると考えられる。本研究では、上記①の方法に着目し、核内受容体の trans-repression 作用と trans-activation 作用におけるリガンドの用量依存性の差異の分子メカニズムを解明し、ステロイド薬の用量反応性を促進させることにより少量のステロイド薬で強い抗炎症作用を發揮させる方法を開發することを目的とした。本研究の遂行により抗炎症作用におけるグルココルチコイド不応状態を改善し、さらには副作用のないステロイド療法の臨床応用を目指す。

B. 研究方法

血管内皮細胞において炎症性サイトカインの刺激によって発現が増加するIL-6とVCAM-1に対するGCの作用を、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いたELISAおよびwhole cell ELISAにより検討した。また、これら炎症性遺伝子の転写活性に対して抑制作用を示すステロイドホルモンの濃度に及ぼす核内受容体 (GR、エストロゲン受容体ER) の発現量の効果を、ウシ大動脈由来内皮細胞 (BAEC) にこれら遺伝子プロモーターを含むレポーター遺伝子と種々の濃度の受容体発現ベクターを導入しレポーター

解析を行った。

また、これら炎症性遺伝子の転写抑制作用における受容体リガンドの濃度に対して転写共役因子CBPの発現量がどのような効果を示すかについて、同様の方法により解析した。

さらに、これら炎症性遺伝子発現抑制における膜局在型ERの作用を明らかにする目的で、核局在シグナル欠失ERと膜局在型ERの作用について、同様にレポーター解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞を用いた実験および試験管内実験により実施したものであり、倫理面における問題はないと考える。

C. 研究成果

1. 血管内皮細胞のIL-6・VCAM-1発現に対するGCの作用とこれに及ぼすGR発現量の効果

高濃度 ($\geq 100\text{nM}$) のDexは、HUVECにおけるTNF α 誘導性IL-6産生を抑制した。一方、TNF α 誘導性のVCAM-1発現に対しては抑制作用を示さなかった。BAECに各々の遺伝子プロモーターを含むレポーター遺伝子を導入した実験においても、高濃度 ($\geq 100\text{nM}$) のDexはIL-6遺伝子のプロモーター活性を抑制したが、VCAM-1遺伝子のプロモーター活性を抑制しなかった。

しかし、高濃度のGR発現ベクターを導入したBAECにおいては、DexはTNF α によって誘導されるIL-6遺伝子のプロモーター活性のみならずVCAM-1遺伝子のプロモーター活性に対しても抑制作用を示した。

2. 血管内皮細胞のVCAM-1発現に対して抑制作用を示すステロイドホルモン濃度に及ぼす核内受容体と

CBP の発現量の効果

ER 発現ベクターを種々の濃度で導入して得られた ER 高発現 BAEC では、ER 低発現 BAEC に比して、より少量のリガンド (E_2) により $TNF\alpha$ 誘導性の IL-6・VCAM-1 遺伝子のプロモーター活性の抑制が認められた。

また、CBP 発現ベクターを導入した BAEC においても、より少量のリガンドで VCAM-1 遺伝子プロモーター活性の抑制が確認された。ノーザンブロットおよびウェスタンブロット解析により、CBP 発現ベクター導入 BAEC では ER mRNA と ER 蛋白発現量が増加していることが判明した。CBP 発現ベクター導入 BAEC では ER 遺伝子のプロモーター活性の増加が認められた。

3. 血管内皮細胞の VCAM-1 発現に対するステロイドホルモンの急性効果

VCAM-1 遺伝子のプロモーター活性に対する抑制作用は、細胞を $TNF\alpha$ で刺激する前の E_2 の前処理時間 0~24 時間のいずれにおいても確認された。前処理 0 時間では、前処理 24 時間に比べてより少量の E_2 による VCAM-1 遺伝子プロモーター活性の抑制が認められた。

VCAM-1 遺伝子発現抑制に対するステロイドホルモンの急性作用が、膜局在 NR を介して生じているか否かについて確認する目的で、核局在シグナル欠失 ER (HE241G) または膜局在型 ER (HE241G-mem) 発現ベクターを BAEC に導入した解析を行なった。その結果、いずれの変異型 ER 発現 BAEC では、 E_2 による VCAM-1 遺伝子プロモーター活性の抑制は認められなかった。

D. 考察

核内受容体による炎症性遺伝子の転写

抑制 (trans-repression) 作用は、核内受容体が $NF-\kappa B$ や AP-1 などの炎症性転写因子の活性を抑制することによって担われるとの説が有力である。しかしながら、これら炎症性遺伝子の転写抑制を発揮する核内受容体リガンドの用量を規定する因子については不明であった。

本研究で、GR または ER を種々のレベルで発現する培養血管内皮細胞を用いて、 $TNF\alpha$ により誘導される IL-6 および VCAM-1 遺伝子の発現を抑制するリガンドの濃度依存性についての解析を行った。その結果、① GR 低発現細胞では GR は IL-6 遺伝子のみを抑制するが、GR 高発現細胞では IL-6・VCAM-1 両遺伝子の発現を抑制すること、② ER 高発現細胞では、ER 低発現細胞に比べて、より少量のリガンドによる IL-6・VCAM-1 遺伝子の発現抑制が認められること、③ CBP 発現ベクター導入細胞においてもより少量のリガンドによる VCAM-1 遺伝子の発現抑制が認められ、これは ER 発現量の増加に基づくと考えられること、④ ER による VCAM-1 遺伝子の発現抑制は比較的短時間の作用として認められ、この場合少量のリガンドで作用し得ることを明らかにした。また、⑤ 比較的短時間に VCAM-1 遺伝子の発現抑制が認められる機構として、膜局在 ER を介した作用の可能性について検討を行ったが、その結果は否定的であった。

このように、核内受容体と転写共役因子の発現量が、核内受容体による炎症性遺伝子の発現抑制作用を発揮するリガンドの用量を規定することを初めて明らかにした。標的細胞における GR や転写共役因子の発現量を増加させる薬剤を開発することができれば、少量のグルココルチコイドで十分な抗炎症作用を発揮させる方法が可能となり、副作用のないステ

ロイド療法の実現も可能となるであろう。

E. 結論

核内受容体や転写共役因子の発現量を増加させることによって、IL-6 遺伝子と VCAM-1 遺伝子の転写抑制に必要なリガンドの用量を減少させ得ることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Goya, K., Otsuki, M., Xu, X., and Kasayama, S. :Effects of the prostaglandin I₂ analogue beraprost sodium on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human vascular endothelial cells and circulating VCAM-1 level in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 52 : 192-198, 2003.

Horike, N., Takemori, H., Katoh, Y., Doi, J., Min, L., Asano, T., Sun, X. J., Yamamoto, H., Kasayama, S., Muraoka, M., Nonaka, Y., and Okamoto, M. :Salt-inducible kinase-2: adipose-specific expression, phosphorylation of Ser794 in insulin receptor substrate-1, and activation in diabetic animals. *J. Biol. Chem.*, 278 : 18440-18447, 2003.

Goya, K., Kitamura, T., Inaba, M., Otsuki, H., Yamamoto, H., Kurebayashi, S., Sumitani, S., Saito, H., Kouhara, H., Kasayama, S., and Kawase, I. :Risk factors for asymptomatic atherosclerosis in Japanese type 2 diabetic patients without diabetic microvascular complications. *Metabolism*, 52 : 1302-1306, 2003.

Ruddy, M. J., Wong, G. C., Liu, X. K., Yamamoto, H., Kasayama, S., Kirkwood, K. L., and Gaffen, S. L. :Functional cooperation between interleukin-17 and TNF α is mediated by C/EBP family members. *J. Biol. Chem.*, 279 : 2559-2567, 2004.

Hashimoto, K., Kasayama, S., Yamamoto, H., Kurebayashi, S., Kawase, I., and Koga, M. :Strong association of C-reactive protein with body mass index and 2-hour post-challenge glucose in non-diabetic, non-smoker subjects without hypertension. *Diab. Med.*, in press, 2004.

Goya, K., Sumitani, S., Xu, X., Kitamura, T., Yamamoto, H., Kurebayashi, S., Saito, H., Kouhara, H., Kasayama, S. and Kawase, I. : Peroxisome proliferators-activated receptor α agonists increase nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, in press, 2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

グルココルチコイド作用発現機構の解明

田中 廣壽^{1,2}、吉川 賢忠^{1,2}

¹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

²東京大学医科学研究所附属病院 内科

研究要旨

副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイドはグルココルチコイドレセプター (GR) と結合して作用を発現する。合成グルココルチコイドであるコルチバゾール (CVZ) は GR にきわめて選択的に結合するのみならず、デキサメタゾンなどの従来のリガンドとは異なった様式で GR 機能を発現させる。AF-2 活性を欠失させた変異 GR を用いても CVZ は AF-1 依存性に転写活性を誘導する。他のステロイドレセプターの AF-1 とのキメラレセプターを用いた実験から、かかる CVZ の作用は LBD と AF-1 の相互作用によるものと考えられた。以上から、CVZ は特異な様式で GR を活性化すること、そして、GR の AF-1 機能もリガンドによって調節可能であることが示唆された。

A. 研究目的

副腎皮質において合成・分泌される内分泌ホルモンであるグルココルチコイドは炎症性疾患などの治療のために薬量が投与されることも多い。したがって、標的組織におけるグルココルチコイド作用機構を解明することは、内分泌ストレス応答系の理解のみならずグルココルチコイド薬の副作用防止にも貢献する。グルココルチコイドレセプター (GR) はグルココルチコイドと結合してその作用を標的組織において発現させる。ここで、従来のグルココルチコイドはミネラルコルチコイドレセプター (MR) にも、アルドステロンなどのミネラルコルチコイドは GR にも、各々結合することが知られている。また、グルココルチコイドを不活性化型に変換する 11β hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) の発現には組織差があり、グルココルチコイドとミネラルコルチコイド、そして GR と MR が組織によって巧妙に使い分けられていることが推察される。しかし、

その詳細な分子機構や生物学的意義に関しては不明な点が多い。

最近、アルドステロン-MR と心血管病変の関与が明らかになりつつある。すなわち、アルドステロンと心筋の線維化、心不全に対する抗アルドステロン薬の有効性、などが明らかにされ、アルドステロン作用のないグルココルチコイド薬開発の必要性が今一度クローズアップされている。

われわれは、本研究班において、すでにコルチバゾール (CVZ) は MR に作用することなく、きわめて GR に特異的なリガンドのプロトタイプであることを明らかにした。そこで、CVZ と GR のリガンド結合領域との相互作用を分子レベルで明らかにし、GR 超選択的グルココルチコイドの分子基盤を構築することを目的とする。

B. 研究方法

GR をはじめとした核内レセプターの細胞内局在は、免疫蛍光抗体法、green

fluorescent protein (GFP) 融合タンパク発現系を用いて検討した。GR の転写活性化作用は GRE 配列の下流にルシフェラーゼの cDNA を有するレポータープラスミドを用いたトランジェントトランスフェクションによって測定した。GR のタンパク分解酵素による限定分解は、試験管内で³⁵S 標識した GR をトリプシンによって消化後、SDS-PAGE によって解析した。GR のリガンド結合領域 (LBD) の立体構造解析には SYBYL 6.9 (Tripos, St. Louis, MO) を用い、Protein Data Bank の GR LBD (Ala-523 から Lys-777) の X 線結晶解析結果 (entry 1M2Z) をモデルとして使用した。

(倫理面への配慮)

本研究は試験管内実験および培養動物細胞を用いたものであり、その意味において倫理面への配慮は特に必要無いものと考えられる。なお、遺伝子組み換え実験に関して機関承認を得ていることを付記する。

C. 研究結果

CVZ と DEX を比較した場合、GR の LBD の構造には大きな違いはないものの、C 末端の12アミノ酸を欠失させた場合、両者の GR 機能に与える影響の違いが際立つことを見出した。すなわち、DEX の作用はかかるアミノ酸欠失によって消失するのに対して、CVZ は依然として各種 GR 機能を発現させる。そこで、東京医科歯科大学の山田幸子教授、山本恵子博士と共同研究を実施し、これらと GR LBD との相互作用をコンピュータを用いて推測した結果、CVZ と DEX では、LBD の構造には大きな相違はないが、いくつかのアミノ酸の側鎖の向き、水素結合の場所、などが異なることが判

明した(図1-3)。かかるC末端欠失変異体においても CVZ に特徴的な A 環のフェニルピラゾール基の部分が LBD のヘリックス3、5と強く結合するらしい。すなわち、GR の転写活性化作用に重要とされる C 末端の AF-2 ヘリックス非依存的に GR と結合するリガンドが存在する可能性が示されたといえる。また、17位の側鎖も両リガンドで異なっており、CVZ が MR と結合しない理由の一つであると推測された。これらの結果は、CVZ と GR LBD の解析から、GR 特異的かつ AF-2 ヘリックス非依存的に GR 機能を発現させるリガンドがデザインできることを示すものである。そこで、AF-2 の欠失により転写共役因子が LBD にリクルートされないことを確認した後(図4)、GR の他の部位、とくに AF-1 の活性に与えるこれらのリガンドの影響を検討した。その際、GR 発現プラスミドとして、GR AF-1 を除いたもの、他のステロイドレセプターの AF-1 にスイッチさせたもの、などを作成した(図5)。まず、GR Δ AF-1 に対して、CVZ と DEX の作用には大きな差はなかった。しかし、GR AF-1 を他のステロイドレセプターの AF-1 とスイッチさせたものに関しては、AF-1 活性の表出にある程度の選択性があることが判明した(図6)。

D. 考察

GR の LBD は各種リガンドと結合した後コンフォメーション変化を起こす。ヒト GR LBD (アミノ酸523-777、ただし、602番目のフェニルアラニンにセリンに変異させている) と DEX、coactivator である TIF 2 の複合体の立体構造は、多くの点で他の核内レセプターと類似している。まず、GR LBD は α ヘリックスと

β ストランドからなり、PRやARに類似の3層構造をとる。リガンド結合後、C末端のAF-2ヘリックスはヘリックス3、4、10に向かい合って配位する。ヘリックス8とヘリックス9の β ストランドは β シートを形成する。また、C末端の β ストランドはAF-2ヘリックス位置の安定化に参与しているようである。実際、GR LBDのC末端のアミノ酸を数個欠失させただけでもDEXによるGR依存性転写活性は大幅に低下する。しかし、ホモ2量体形成の様式、転写共役因子との相互作用部位が他のレセプターとは異なっている。また、リガンドを結合するポケット構造に関して、ヘリックス6と7の配置によって、ER、PR、ARなどにみられるステロイド骨格がはまり込むポケットとは異なり、横方向にのびており、その容積も約600Å³と比較的大きいと推定されている。これらの成果はGRのリガンド-レセプター関係の実体をビジュアルに表現しただけでなく、そのredundancyやspecificityを解析する上で大きな貢献をすることは疑いない。ここで、GR以外のステロイドレセプターにおいて、GRの602番目のアミノ酸（フェニルアラニン）に相当するアミノ酸はセリン、システイン、などの親水性アミノ酸であり、疎水性アミノ酸であるのは唯一GRのみである。かかる602番目がフェニルアラニンの野生型ではLBDの結晶化は困難であり、先の結晶化の仕事はすべてこのフェニルアラニンを親水性のセリンに置換したもので行われた。このフェニルアラニンはヘリックス5に含まれ、ある意味ではGR本来の特性を規定しているかもしれない。その他、GRのLBDは低酸素誘導性転写因子HIF-1 α や血管平滑筋の核タンパクであるHEXIM1などとも相互作用する点で際

立っている。このようなGR LBDの多彩な働きはそのリガンドによる立体構造変化の多様性を反映しているともいえ、その点からもLBDが創薬標的としてきわめて魅力的といえる。今回の研究により、GR特異的リガンドの分子基盤が明確になったとともに、リガンドによってAF-1機能もAF-2の構造変化を介して修飾しうることも明らかになった。今後、CVZをリードとして、理想的なGR作動薬開発を進展させたい。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Rika Ouchida, Masatoshi Kusuhashi, Noriaki Shimizu, Tetsuya Hisada, Yuichi Makino, Chikao Morimoto, Hiroshi Handa, Fumitaka Osuzu, and Hirotohi Tanaka. Suppression of NF κ B-dependent gene expression by a hexamethylene bisacetamide-inducible nuclear protein HEXIM1 in human vascular smooth muscle cells. *Genes to Cells.*, 2003; 8 (2): 95-107.

Ishii T, Ohnuma K, Murakami A, Takasawa N, Yamochi T, Iwata S, Uchiyama M, Dang NH, Tanaka H, Morimoto C. SS-A/Ro52, an autoantigen involved in CD28-mediated IL-2 production. *J Immunol.* 2003; 170 (7): 3653-61.

Role of the Glucocorticoid Receptor for Regulation of Hypoxia-dependent Gene Expression

Tsunenori Kodama, Noriaki Shimizu, Noritada Yoshikawa, Yuichi Makino, Rika Ouchida, Kensaku Okamoto, Tetsuya Hisada, Hiroshi Nakamura, Chikao Morimoto, and Hirotohi Tanaka *J. Biol. Chem.* 2003; 278 33384-33391

Miyake-Nishijima R, Iwata S, Saijo S, Kobayashi H, Kobayashi S, Souta-Kuribara A, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Ikeda E, Okada Y, Iwakura Y, Morimoto C.

Role of Crk-associated substrate lymphocyte type in the pathophysiology of rheumatoid arthritis in tax transgenic mice and in humans.

Arthritis Rheum. 2003 ; 48 (7) : 1890-900

Matsumoto M, Makino Y, Tanaka T, Tanaka H, Ishizaka N, Noiri E, Fujita T, Nangaku M.

Induction of renoprotective gene expression by cobalt ameliorates ischemic injury of the kidney in rats.

J Am Soc Nephrol. 2003 ; 14 (7) : 1825-32

M Nori, S Iwata, Y Munakata, H

Kobayashi, S Kobayashi, YUmezawa, O Hosono, H Kawasaki, NH Dang, H Tanaka, T Shiohara, C Morimoto

Ebastin inhibits T cell migration, production of Th 2-type cytokines and proinflammatory cytokines.

Clin Exp Allergy 2003 ; 33 (1) : 1-11

Yuichi Makino, Hiroshi Nakamura, Eiji Ikeda, Kei Ohnuma, Kenji Yamauchi, Yutaka Yabe, Lorenz Poellinger, Yasunori Okada, Chikao Morimoto, Hirotohi Tanaka.

Hypoxia-Inducible Factor Regulates Survival of Antigen Receptor-Driven T Cells. J. Immunol. 2003 ; 171 (12) : 6534-6540

H. 知的財産権の出願・登録状況

とくになし。

図 1

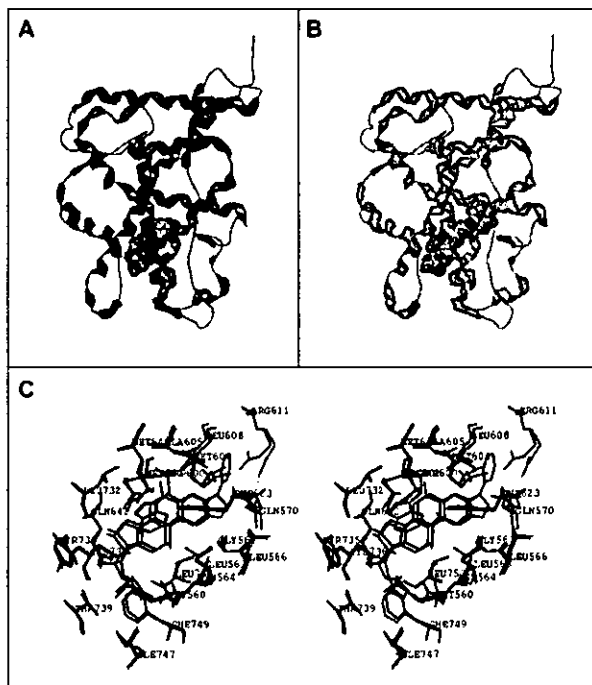
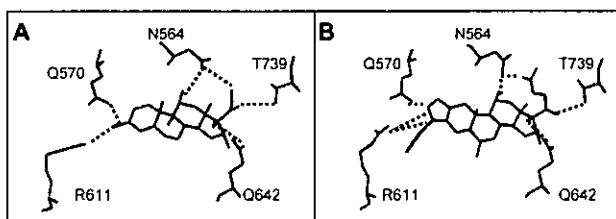
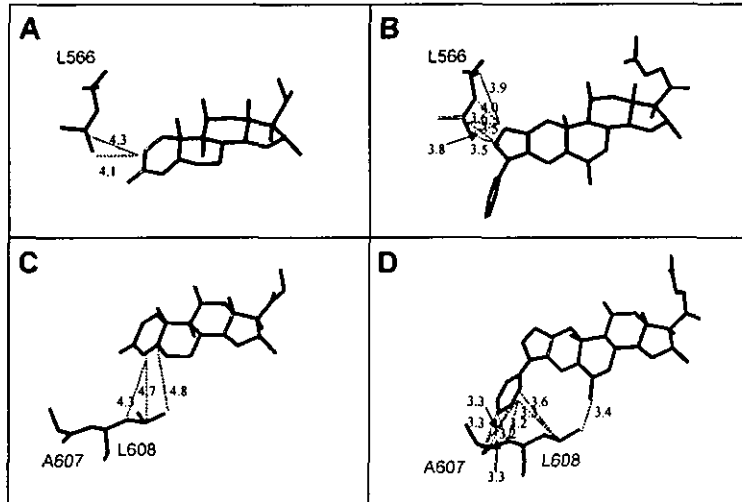


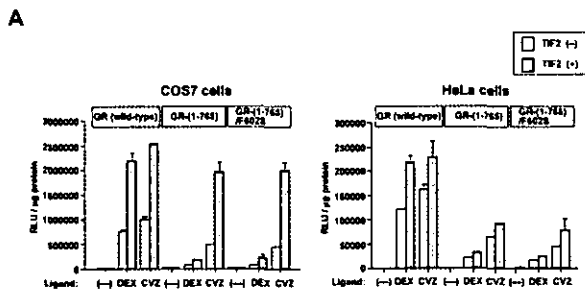
図 2



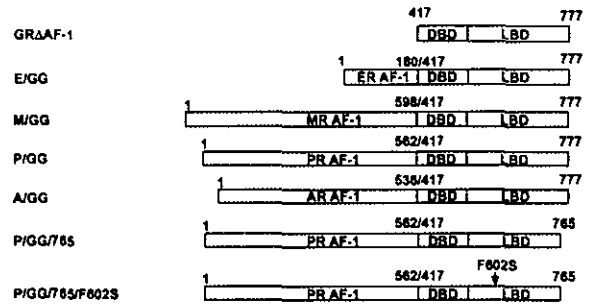
☒ 3



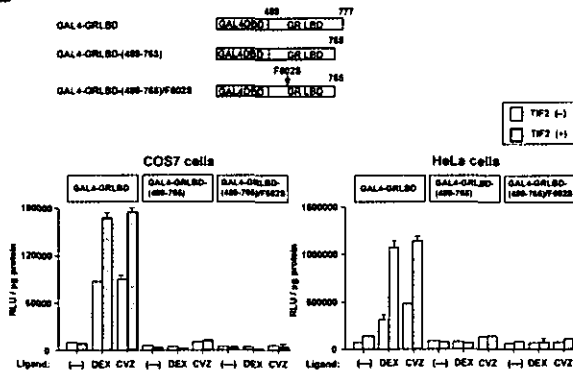
☒ 4



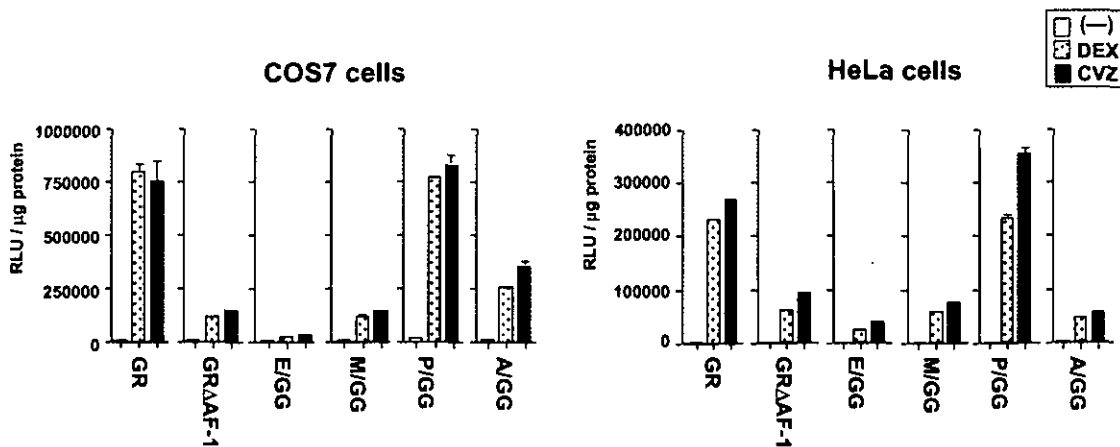
☒ 5



B



☒ 6



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

分担研究者 高柳涼一

九州大学医学研究院老年医学 教授

研究要旨

グルココルチコイドを初めとしてステロイドホルモンは直接的あるいは間接的に骨代謝調節に大きく関与している。我々はステロイドホルモンによる骨芽細胞機能調節の分子メカニズムを明らかにするために、骨芽細胞分化に必須な Runx2 タンパク質と GR、AR、ER との相互作用について解析した。骨芽細胞株において、Runx2 はこれら受容体を介する転写活性化を著明に抑制した。また GFP との融合タンパク質を作製して細胞内局在を調べたところ、ステロイドホルモン受容体と Runx2 はリガンド添加後に核内で共通の foci を形成することが明らかになった。以上の結果から、骨芽細胞においてステロイドホルモン受容体と Runx2 は機能的に密接に関連していると考えられる。

A. 研究目的

グルココルチコイド (GC) は、生理量では骨芽細胞の分化増殖に必要であるが、過剰量の投与では逆に骨芽細胞の分化増殖を抑制し、アポトーシスを促進することが知られており、これがステロイド骨粗鬆症の発症要因になると考えられている。

最近、ステロイドホルモン受容体を介する転写調節機構と他のシグナル伝達機構とのクロストークの重要性が報告されている。今回の研究では、骨芽細胞分化に必須である転写因子 Runx2 タンパク質とグルココルチコイド受容体 (GR) の機能相関について解析する。

B. 研究方法

(1) ルシフェラーゼアッセイによる転写活性化能の解析

Runx2 と GR の両者を骨芽細胞系の細胞株で発現させて、双方の転写活性化能への影響をルシフェラーゼ活性を指標にして測定する。

(2) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞内動態の観察

Runx2 あるいは GR と GFP, YFP との融合タンパク質を作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて両タンパク質の細胞内動態を、生細胞を用いて経時的に調べる。

(倫理面への配慮)

今回の実験では、広く用いられている培養細胞株を使った実験であり、倫理上特に問題はないものと考えられる。

C. 研究結果

(1) Runx2 は骨芽細胞株においてステロイドホルモン受容体 (GR, AR, ER) を介する転写活性化を抑制した。さらに、Runx2 とヘテロダイマーを形成する Cbfb を共発現させることでさらに強い抑制を認めた。

(2) GR はリガンド非存在下では、主として細胞質に局在する。しかしリガンド処理後は核内に移行して、核内で細かい foci を形成する。TIF2 など一部の核内

受容体コアクチベーターは、リガンド処理後 GR の foci にリクルートされる。

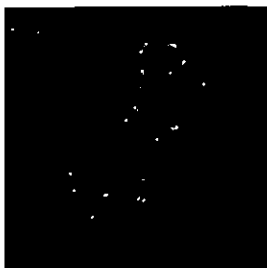
Runx2 は、コアクチベーターである TIF2 と同様に、リガンド依存性に GR と共局在し、核内で細かい foci を形成した。(図 1)

図 1 GR-YFP と Runx2-GFP のデキサメサゾン処理後の共局在。

GR-YFP



Runx2-GFP



D. 考察

Runx2 は骨芽細胞の分化増殖に必須な転写因子で、多数の骨芽細胞関連遺伝子の転写を調節する。今回の研究でステロイドホルモン受容体を介する転写活性化が Runx2 による調節を受けることが明らかになり、Runx2 は GR と同じ foci に共局在することが明らかになった。Runx2 はステロイドホルモン受容体と直接結合することが報告されていることもあり、Runx2 による転写活性化の抑制は、転写レベルよりもタンパク質レベルの制御機構であると考えられる。

Runx2 と GR を初めとするステロイドホルモン受容体は、ともに骨芽細胞の分化増殖を促進することが知られているが、

マウスを用いた実験から、Runx2 は骨芽細胞分化の初期には分化を促進するが、後期には逆に分化を抑制することが明らかになった。今回認められた Runx2 によるステロイドホルモン受容体を介する転写活性化の抑制は、Runx2 による後期の骨芽細胞分化抑制に関与している可能性がある。

今後は Runx2 と GR の相互作用の詳細な分子メカニズムの解明が必要であり、ステロイド骨粗鬆症の発症機構の解明および新規治療法の開発に繋がることが期待される。

E. 結論

Runx2 とステロイドホルモン受容体は、共に骨芽細胞の分化増殖において重要なタンパク質であるが、両者はタンパク質レベルで相互作用しており、密接に関連していることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大中佳三、高柳涼一. ステロイド骨粗鬆症と PTH の骨形成促進作用. *Clinical Calcium* 13 : 25-30, 2003.
- 2) 高柳涼一、大中佳三、河手久弥. ステロイド骨粗鬆症の病態と治療指針. *Clinical Calcium* 13 : 135-140, 2003.
- 3) 高柳涼一、柳瀬敏彦、大中佳三、名和田新. DHEA 補充療法とその効果. *治療学* 37 : 1081-1084, 2003.
- 4) Mu YM, Oba K, Yanase T, Ito T, Ashida K, Goto K, Morinaga H, Ikuyama S, Takayanagi R, Nawata H. Human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) inhibits human lung cancer A459 cell growth through activation of p21WAF1-CIP1. *Endocrine J.* 50 : 771-781, 2003.
- 5) DHEA と骨代謝. 柳瀬敏彦、鈴木静、後