

厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業

ステロイドシグナル経路を分子標的とした
新しい老年病の予防・治療法の開発

平成15～16年度 総合研究報告書

主任研究者 井上 聡
平成17(2005)年4月

目 次

I.	総合研究報告 ステロイドシグナル経路を分子標的とした新しい老年病の 予防・治療法の開発 井上 聡 -----	I - 1
II.	分担研究報告 1. 血管の老化と動脈硬化におけるステロイド作用機構の解明と応用 秋下 雅弘 ----- 2. 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 の役割の解明と応用 堺 隆一 ----- 3. 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 池田 和博 ----- 4. 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 役割の解明とその応用 近藤 宇史 ----- 5. 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 武山 健一 ----- 6. 脳の老化におけるステロイド受容体作用機構の解明とその応用 柳澤 純 ----- 7. 老化と老年病の疾患モデル動物の開発とその応用 津久井 通 -----	II - 1 II - 13 II - 22 II - 28 II - 36 II - 46 II - 56
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	III - 1
IV.	刊行物の別刷 -----	IV - 1

総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総合研究報告書

ステロイドシグナル経路を分子標的とした
新しい老年病の予防、治療法の開発

主任研究者 井上 聡
東京大学医学部附属病院老年病科講師

【研究要旨】

高齢社会の加速化に伴い、老化、老年病の予防、治療と健やかな加齢の実現が急務である。老化とともに体内で変化する大きな因子としてステロイドがあげられ、不足したステロイドを補うことにより老化を制御できる可能性から、本研究ではこの点に着目しステロイドの作用機構の解明とその老化、老年病予防、治療法の開発を目指す。特に、性ステロイドは生殖系の老化を決める大きな因子であるばかりでなく個体の老化、ならびに各臓器の老化（骨、血、脳の老化など）に深く関わっている。その作用経路としてステロイド受容体を介する機序が主なもので、それに加えて細胞膜や細胞内シグナル伝達系を介する **non-genomic action** も注目されている。本研究の目的は、ステロイド作用の調節、受容体機能、関連相互作用、共役因子、シグナル伝達、下流標的因子群の性状を分子レベルで探索し、ステロイドならびその受容体の、個体の老化、臓器の老化、老年病における役割を明らかにし、老化、老年病の新しい予防、治療法に応用することにある。老化、老年病におけるステロイド作用機構に関する多面的研究は世界的にも日本においても少数に限られ、この分野の基礎から臨床医学に関与する研究者らが学際的な研究チームを形成し、独自に発見、開発した材料や手法を用いて取り組む。特に当研究者らは、性ステロイド受容体と標的因子の同定、遺伝子改変動物の作製を推進しており、新規遺伝子・蛋白の単離、生化学的機能解析、ウイルスベクターとノックアウト・トランスジェニックマウスの作製解析、老年病の臨床医学に実績を持ち、ステロイドの臓器別作用と、注目を浴びつつも実体が不明な新規ステロイド作用経路を解析した。本研究により申請者らが開発した **genomic binding-site cloning** 法やデータベース検索、マイクロアレイ法、生化学的手法により **COX7RP**、**TG2**、**Alox15B**、**PCYT1B** をはじめとする新規ステロイド標的因子、**PP5** や **Cdk7**、**CHIP** 等のステロイド受容体修飾因子、共役因子、シグナル伝達因子、関連因子を探索・同定し、それら分子と新しいシグナル経路の機能を明らかにし、老年病治療法開発のための分子標的としての可能性を示した。さらに、遺伝子改変動物、ウイルスベクターにより、老化・老年病モデル動物を作製し、抗老化、抗老年病の新しい診断・予防・治療法の開発、ゲノム創薬の可能性を探った。倫理面に配慮しつつ、老化と病的老化を、ステロイド作用機序の観点から明らかにし、その老化制御作用を応用し、国民の保健・健康・福祉を向上させ社会に貢献することを目指し本研究を行い、診断と治療の標的となりうる分子を 10 個以上見出し、新たな創薬のシードとなることが期待される。

分担研究者氏名：所属機関名及び所属機関における職名

秋下 雅弘

東京大学

助教授

堺 隆一

国立がんセンター研究所

部長

池田 和博

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター

助手

近藤 宇史

長崎大学

教授

武山 健一

東京大学分子細胞生物学研究所

助手

柳澤 純

筑波大学

教授

津久井 通

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター

講師

A. 研究目的

高齢社会の加速化に伴い、老化、老年病の予防、治療と健やかな加齢が社会的に強く求められている。老化とともに体内で変化する大きな因子としてステロイドがあげられ、特に不足したステロイドを補うことにより老化を制御できることが知られている。この方法を発展させ、健全な加齢を促し、抗老化、老年病予防、治療法の開発により、より豊かな長寿社会を実現できることが想定される。特に、性ステロイドは性分化、性機能の調節に必須であり、生殖系の老化を決める大きな因子であるばかりでなく個体の老化を制御する大きな要因でもあり、しかも各臓器の老化、すなわち骨代謝、血管細胞新生、脳代謝などの老化に随伴する生理現象にも深く関わっている。高齢者での

性ステロイドの低下、すなわち女性でのエストロゲン分泌低下、男性でのアンドロゲン分泌低下は、骨粗鬆症、動脈硬化症、アルツハイマー性痴呆をはじめとする老年病に密接に関与しており、その作用経路としてステロイド受容体を介する機序が主なものと考えられる。エストロゲンの受容体(ER)には従来知られているER α に加えて、新しい受容体 ER β が発見され注目されている。アンドロゲンはそれによく似た構造を持つ受容体(AR)を介して働き、同じく老化と関連するグルココルチコイド受容体(GR)とともに、ステロイド受容体と総称される。老化における多彩なステロイド作用機序を知り、その抗老化作用、老年病における役割を明らかにするためには、各ステロイド受容体の組織特異的な発現と機能、情報伝達機構、ステロイド調節薬の作用機構の解明が不可欠である。本研究の狙いは、ステロイド作用の調節、受容体機能、関連相互作用、共役因子、シグナル伝達、下流標的因子群の性状を分子レベルで解明し、ステロイドならびその受容体の、個体の老化、臓器の老化、老年病における役割を明らかにし、老化、老年病の新しい予防、治療法に応用することにある。特に、未だ実体の明らかになっていない新たなステロイド作用経路を探索し、老化におけるステロイド作用機構の解明から、細胞増殖、分化制御、抗老化・老年病因子としての意義について明確にし、老化制御、老年病予防、治療法開発の新規標的とする。さらに老化、老年病の新しい分子標的の探索・同定からその臨床応用を探る。本研究の意義は、これらステロイドの抗老化・老年病作用を分子レベルで明らかにし、病的老化に伴う老年病発症メカニズムの解明、新たな予防、治療法の開発、ゲノム創薬により、国民の保健・健康・福祉の向上を目指し、社会に貢献することにある。

B. 研究方法

(1) 老化前立腺における新しいアンドロゲン応答遺伝子の探索 (分担: 井上)

アンドロゲンは前立腺の発生・機能維持に必須の性ステロイドであり、老化とともに激増する前立腺癌と前立腺肥大の増殖にもかかわる重要なホルモンである。新規アンドロゲン応答遺伝子を探索することにより、アンドロゲンシグナル経路を分子標的とした増殖性前立腺疾患の新しい診断・治療・予防法の開発が可能になると考えられる。核内受容体の1つであるアンドロゲン受容体(AR)は、アンドロゲン応答遺伝子の転写調節領域におけるアンドロゲン応答配列(ARE)にホルモン依存性に結合し、遺伝子の発現制御を行う。AREとしてはAGAACAをハーフサイトとする15塩基の回文型配列が知られており、全ゲノム中にはこのコンセンサス配列と一致する部位が確率的には数百存在すると考えられる。そこで、ヒトゲノム情報からバイオインフォマティクスにより同定されるAREが、*in vivo*においてホルモン依存性にARと特異的結合するかについて機能解析を行い、機能的AREの近傍に新規アンドロゲン応答遺伝子が存在するかについて探索を行う。

1) バイオインフォマティクスによるヒトゲノム上のアンドロゲン応答配列(ARE)の検索

ヒトゲノム情報は公開ゲノムブラウザ(Ensembl Genome Browser)よりダウンロードし、Perl言語によるプログラムとEMBOSSパッケージに含まれるdregプログラムを用いて、コンセンサスAREの探索を行った。コンセンサスAREは、転写因子データベースTRANSFACによる最も確率の高いAR結合部位配列5'-AGAACA_{nnn}TGTTCT-3'を用いた。

2) ヒト前立腺癌細胞におけるAREへのアンドロゲン受容体(AR)結合性の検討

ヒト前立腺癌細胞株として、AR陽性

のLNCaP細胞とAR陰性のDU145細胞を用い、ホルモン枯渇3日後、合成アンドロゲンR1881(10 nM)による刺激を24時間行い、AR特異的抗体および非特異的IgGを用いてクロマチン免疫沈降(chromatin immunoprecipitation: ChIP)を行った。得られたDNAを用いて、バイオインフォマティクスによりゲノム上に同定されたコンセンサスAREに対するAR結合性をリアルタイムPCRにより定量した。コントロール実験としては、前立腺特異的抗原PSAプロモーター(転写開始点より上流250 bp以内)およびエンハンサー領域(転写開始点より上流約4 kb)のAREにおけるAR結合性を検討した。

3) ヒト前立腺癌細胞におけるARE近傍遺伝子のアンドロゲン応答性の検討

コンセンサスAREの近傍遺伝子について、ヒト前立腺癌細胞株を用いて遺伝子発現のアンドロゲン応答性を検討した。近傍遺伝子としては、AREを含む遺伝子、AREより20 kb以内の下流に転写開始点をもつ遺伝子、およびこれらに該当する遺伝子がない場合はAREより20 kb以内の上流に遺伝子の3'端があるものを選択した。Ensemblゲノムブラウザ上で遺伝子の名称(アノテーション)が確定しているものがない場合、同ブラウザ上で遺伝子部位予想プログラム(Genscan prediction program)により予想遺伝子範囲が示されている場合には、これらについて検討を行った。前立腺癌細胞株としてはLNCaP細胞とDU145細胞を用い、ホルモン枯渇3日後、合成アンドロゲンR1881(10 nM)による刺激を行った。

(2) 骨における新しいエストロゲン応答経路の探索 (分担: 井上)

エストロゲン応答遺伝子を探索するために、二つの系を用いた。一つは、新生ラット頭蓋骨より採取した初代培養骨芽細胞を用い、constitutive active formのエストロゲンレセプター(ER) α 、 β それぞれ

れをアデノウイルスを用いて過剰発現させ、発現が誘導される新規エストロゲン応答遺伝子をマイクロアレイ法にて同定するという方法を用いた。もう一つは、子宮頸癌細胞株である Hela に ER α 、 β それぞれを恒常的に発現させた細胞を複製し、これを用いてエストロゲンで発現誘導される遺伝子をマイクロアレイにてスクリーニング的に検索し、得られた遺伝子の中から骨芽細胞においてエストロゲンによる発現誘導を受けるものを選抜するという方法を用いた。

(3) 骨における新しいグルココルチコイド応答経路の探索 (分担：井上)

新生ラット頭蓋骨より採取した初代培養骨芽細胞を、増殖期、及びアスコルビン酸、 β グリセロリン酸存在下で培養し、培養後 2 週、4 週の各時期にデキサメタゾンを追加し、発現誘導される遺伝子をマイクロアレイにて探索した。

(4) 骨における Alox15 のステロイド応答性 (分担：井上)

ヒト大腿骨由来骨芽細胞は、10%FBS、50 μ g/ml アスコルビン酸および 5 mM β -グリセロリン酸添加 α -MEM にて培養した。ヒト膝関節由来軟骨細胞は Clonetics 社の軟骨細胞基本培地ならびに分化誘導培地を用いて培養を行った。メディアウム交換を 0、2、5、7 日目に行い、培養 2 日、5 日、10 日後に RNA を回収し、それぞれの時点での Alox15、Alox15B、Alox12、Col2a1、アルカリホスファターゼ(ALP)遺伝子発現の変化を SYBR Green Real Time PCR 法にて解析した。培養 2 日目の骨芽細胞に dexamethasone (10^{-7} M) ならびに control としてエタノールを追加し、添加 6 時間後の RNA を採取し Alox15、Alox15B、Alox12 の遺伝子発現を SYBR Green Real Time PCR 法にて解析した。

(5) エストロゲン応答遺伝子 Efp の機能検索 (分担：井上)

mouse embryo、ヒト乳癌細胞株 MCF7、ヒト骨肉腫細胞株 MG63 由来の cDNA ラ

イブラリーを用い Efp 全長を bait として Efp 結合蛋白をスクリーニングした。

Flag タグを付加した Efp、Myc タグを付加した Efp ならびに Efp の各ドメイン (RING ドメイン、B-Box-coiled-coil ドメイン、B-Box ドメイン、SPRY ドメイン) を 293T 細胞にリポフェクション法で一過性過剰発現を行い Efp とその全長ならびに各ドメインとの結合を免疫沈降法を用いて確認した。乳癌細胞株 MCF7 細胞に Flag タグを付加した Efp もしくは Myc タグを付加した RING ドメインを欠落した Efp をアデノウイルスを用いて過剰発現し、その時の両者の結合を免疫沈降法を用いて確認した。さらにその時の 14-3-3 σ の発現を Western blot 法により確認した。一方、乳癌細胞株 MCF7 細胞もしくは MDA-MB-231 細胞に Myc タグを付加した RING ドメインを欠落した Efp をアデノウイルスを用いて過剰発現したときの細胞周期の変化を FACS 解析を用いて行った。

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

ERR α の 3'下流領域における遺伝子多型に関して、Taqman PCR 法を用いて genotype の分類を行った。閉経後女性 372 人を対象として BMD との関連を検討した。

骨芽細胞は、10%FBS、50 mg/ml アスコルビン酸および 5 mM β -グリセロリン酸添加 α -MEM にて培養した。メディアウム交換を週二回のペースで行い、培養 2 日、4 日、6 日、16 日、19 日、24 日、30 日後に RNA を回収し、それぞれの時点での ER α 、ER β 、ERR α 、アルカリホスファターゼ(ALP)遺伝子発現の変化を SYBR Green Real Time PCR 法にて解析した。

(7) ビタミン D3 応答遺伝子 p57^{Kip2} による骨形成制御機構に関する検討：

p57^{Kip2} 過剰発現安定性形質発現骨芽細胞株を用いた p57^{Kip2} シグナル下流遺伝子の探索 (分担: 井上)

ラット骨芽細胞様細胞株である UMR106 にリポフェクション法にて p57^{Kip2} 遺伝子を導入し G418 にて p57^{Kip2} 過剰を過剰発現した安定性形質発現株を作成した。Vector のみを導入した UMR106 をコントロールとし RNA を回収し、発現に差違のある遺伝子をマイクロアレイ法にて同定した。

(8) 低用量エストロゲンの内膜肥厚抑制作用 (分担: 秋下)

1) 薬剤投与と頸動脈傷害モデルの作成: 10 週齢の Wistar 系雌性ラットを用いた。全体を 10 群に分け、9 群に卵巣摘出手術を残りの 1 群に sham 手術を行った。4 日間の回復期間の後、6 群は水溶性 17 β -estradiol もしくは対照溶媒を充填した浸透圧ポンプ(Alza)を背部皮下に植え込んだ。エストロゲンの効果と比較する目的で、残りの 3 群に対してはアンジオテンシン II タイプ 1 受容体拮抗薬カンデサルタンとその対照溶媒を充填した浸透圧ポンプを植え込んだ。3 日後に左頸動脈に対するバルーン傷害手術を行った。麻酔下に左総頸動脈とその分枝を露出し、内頸動脈より挿入した血栓除去用 2F Fogarty バルーンカテーテルを用いて総頸動脈内を擦過し、血行再建を行って手術を終了した。これらすべての動物実験は東京大学の実験動物指針にしたがって実施した。

2) 血中ホルモンと脂質の測定: バルーン傷害手術 2 週間後、体重測定とテイルカフ法による血圧測定を行い、16 時間の絶食後に麻酔下で脱血屠殺した。採血した血液を用い、高感度 RIA による estradiol, estrone, progesterone の測定、酵素法による総コレステロールとトリグリセリド測定、およびヘパリン Ca-Ni 法による HDL-コレステロールの測定を行った。

3) 組織計測: 脱血屠殺後、ホルマリン

緩衝液により 100 mmHg で圧還流固定した。子宮を摘出し、重量を測定した。左頸動脈を摘出し、後固定・パラフィン包埋した。5 枚の亜連続横断切片を Elastica van Gieson 染色し、コンピューター取り込み画像から画像解析ソフトを用いて内膜と中膜面積を計測した。

(9) ラット血管平滑筋におけるエストロゲン応答遺伝子の検索と同定 (分担: 秋下)

1) 動物処置と RNA 調整: 8 週齢の Wistar 系雌性ラットを用いた。全体を 3 群に分け、2 群に卵巣摘出手術を、残りの 1 群 (Sham, n=4) に sham 手術を行った。2 週間の回復期間の後、卵巣摘出の 1 群 (OVX-E, n=5) には 3 週間徐放 0.5 mg 17 β -estradiol ペレット (Innovative Research) を、他の 2 群 (OVX+V, n=5; Sham) にはプラセボペレットを植え込んだ。2 週間後に脱血屠殺し、胸部大動脈を分離摘出した。血清 estradiol 濃度は Sham 群で 5.6 \pm 1.5 pg/ml、OVX+V 群で 2.8 \pm 1.0 pg/ml、OVX+E 群で 74.5 \pm 12.1 pg/ml であった。摘出した胸部大動脈は、カミソリ刃で内皮を剥落した後、すみやかに液体窒素中で凍結した。プールした各群の大動脈組織は Isogen を用いて RNA に調整した。

2) マイクロアレイ: 各群 2 プールの total RNA 1 μ g から約 100 μ g の cRNA を増幅し、high-density oligonucleotide microarray (GeneChip Rat GenomeU34A, Affymetrix) とハイブリダイズさせた。このマイクロアレイは、約 7,000 種のラット遺伝子に対応するプローブを含む。OVX+V 群の発現量に対して OVX+E 群で 1.5 倍以上の変化を示した遺伝子を同定した。

3) 大動脈組織および培養血管平滑筋細胞における発現確認: ラット大動脈組織における mRNA 発現量の確認は、total RNA 1 μ g と各遺伝子特異的プライマーを用いた real-time PCR により行った。培養血管平滑筋細胞は Wistar ラット胸部大動脈由来平滑筋細胞を用い、confluent に達し

た後 100 nM 17 β -estradiol もしくは対照溶媒を含む培養液に置き換え 24 時間後に細胞を回収した。total RNA を調整し、各遺伝子の発現を Northern blot により検討した。

(10) 血管平滑筋細胞(VSMC)および心筋線維芽細胞(CF)増殖における ER サブタイプの役割 (分担: 秋下)

1) 細胞培養: ラット VSMC は酵素法により Wistar ラットの動脈から、ラット CF は Wistar ラット胎仔心臓から従来の報告に従い得た。ヒト動脈由来 VSMC は Clonetics 社より購入した。細胞は 10% ウシ胎児血清 (Intergen), 25mM HEPES(pH7.4)ペニシリン(100 U/ml), ストレプトマイシン(100 μ g/ml)を添加した Dulbecco's 変法 Eagle's 培地(DMEM; Nikken Bio Medical Laboratory)にて、5% CO₂インキュベーター内で 37°Cで培養し、第 6-10 継代の細胞を使用した。また E2 を用いる実験では、dextran-coated charcoal にて処理しステロイドを除去した FBS (DCC-FBS)および弱いエストロゲン作用を有する phenol red を含まない DMEM (phenol red-free DMEM)を用いた。

2) ER を組み込んだアデノウイルスベクターの作成および細胞への感染: CMV-IE エンハンサー、ニワトリ β -アクチンプロモーターおよびヒト ER α 、ER β と ER β のドミナントネガティブ変異型を組み込んだ複製欠失型アデノウイルスベクターをアデノウイルス発現ベクターキット (Takara)を用いて作成し、それぞれ以下、AxCAER α 、AxCAER β および AxCAERDN β と命名した。アデノウイルスの感染は、ウイルスをディッシュに応じた培養液量で 2 時間細胞に曝露させ、その後 phosphate-buffered saline (PBS)にて 1 回洗浄し培養液を交換後、各実験を行った。

3) VSMC および CF の増殖: 増殖については、DNA 合成の指標としての [³H]-thymidine 取り込みと細胞数の算定により

検討した。24-well プレート上に細胞を 70-90%コンフルエントまで培養し、phenol red-free RPMI1640 に置き換え、増殖停止させた。24 時間後、17- β estradiol(E2; Sigma Aldrich)を含む 5% DCC-FBS で 24 時間刺激し、次いで [³H] thymidine 1 μ Ci/ml によるパルス標識を 3 時間行、取り込まれた [³H]-thymidine の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測した。6-well に細胞をまき、70-90%コンフルエントになるまで培養したところで phenol-red-free RPMI1640 に置き換え、24 時間増殖停止させた。5%DCC-FBS を含む phenol-red-free RPMI1640 に E2 または vehicle を添加したものに置き換え、さらに 48 時間培養した。細胞はトリプシン処理して懸濁させ、Coulter Counter を用いて細胞数をカウントした。

4) 遺伝子導入およびルシフェラーゼアッセイ: レポータープラスミドとして、ERE-TK-Luc レポータープラスミドおよびホタルルシフェラーゼレポーターベクターを使用した。VSMC もしくは CF へウイルス感染後、FuGENE6 (Roche)を用いて ERE-TK-Luc レポータープラスミドおよび pRL-SV40 コントロールプラスミドをプロトコールに従って細胞へ遺伝子導入を 24 時間 10% DMEM 中で行った。その後 PBS で培養液を洗浄し、続いて 1% phenol red-free RPMI1640 に交換し 24 時間培養し、その後 E2 あるいは vehicle を含む 1% phenol red-free RPMI1640 に交換し 24 時間培養した。細胞を lysis buffer で溶かし回収し、プロトコールに従ってルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。

5) ウェスタンブロット法: VSMC もしくは CF を 10cm ディッシュ上にまきコンフルエント後、発現ウイルスベクターを感染させ、その後 PBS で洗浄し phenol red-free RPMI1640 で 24 時間培養した。RIPA バッファーに溶解させたサンプル

は 12% SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロースメンブレンにブロットし、抗 ER α ポリクロナール抗体 (H-184, Santa Cruz) もしくは抗 ER β ポリクロナール抗体にて免疫ブロットを行い、ECL システム(Amersham)で検出した。

(11) 高齢患者における血中アンドロゲン濃度と動脈硬化指標との関連 (分担：秋下)

1) 対象：杏林大学医学部附属病院高齢医学科物忘れ外来通院中の症例を対象とした。脳卒中、冠動脈疾患、閉塞性動脈硬化症の既往例は除外し、アルツハイマー型痴呆もしくは軽度認知機能障害と診断された症例で、合計 134 名(男性 46 名、女性 88 名)、年齢 76 \pm 7 歳(平均 \pm SD)を解析に用いた。

2) 測定項目：アンドロゲンとして、遊離テストステロン (free-T)、Dehydroepiandrosterone sulfate(DHEAS)、動脈硬化関連マーカーとして高感度 CRP、interleukin (IL)-6、monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)、tumor necrosis factor (TNF- α) の血中濃度を測定した。また、血管硬化度の指標として脈波伝播速度 (PWV) を、日本コーリン製 form PWV/ABI を用いて、上腕～足首間の PWV として測定した。さらに、脳 MRI の FLAIR 画像から白質の虚血病変のうち脳室周囲白質病変(periventricular hyperintensity, PVH) を Junqué の重症度分類(PVH スコア、0～40)により、深部白質病変(deep white matter hyperintensity, DWMH)とともに定量評価した。

3) 統計解析：高感度 CRP、MCP-1、IL-6、TNF- α は、正規分布をとるよう対数変換して解析に用いた。各指標間の相関は Pearson の単相関係数により計算した。多因子の解析は重回帰分析により行った。P<0.05 を有意と判定した。

4) 倫理面への配慮：杏林大学「医の倫理委員会」の承認を得て実施した。

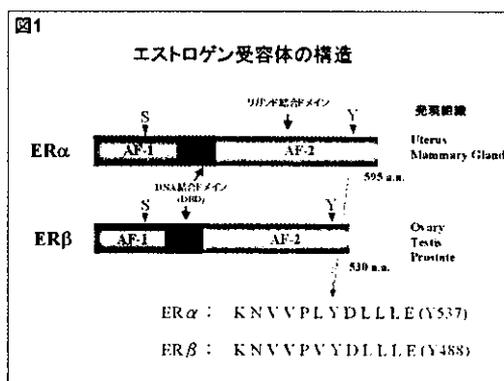
(12) 虚弱高齢男性における血中テストス

テロン濃度と日常生活機能 (分担：秋下)

老人保健施設(まほろばの郷、長野県塩尻市)に通所もしくは入所中の高齢男性 54 名(70-95 歳、平均 82 \pm 6 (SD) 歳)を対象とした。悪性腫瘍、内分泌疾患、急性疾患、低栄養は除外した。一般血液検査に加え、血中総テストステロン、遊離テストステロン濃度を測定し、日常生活機能として基本的 ADL(Barthel Index)、手段的 ADL(Lawton & Brody)、認知機能(改訂長谷川式, HDSR)、うつ(GDS)、意欲 (Vitality Index)との関係について解析した。杏林大学「医の倫理委員会」による承認を得て行った。

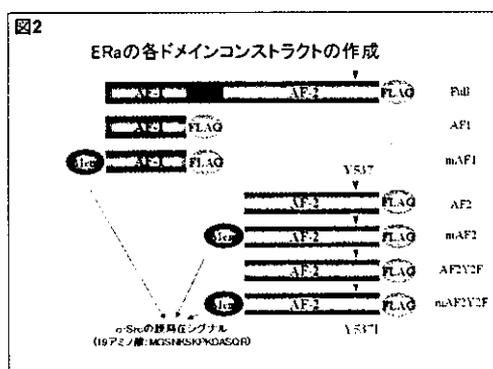
(13) エストロゲンの non-genomic 作用の解析 (分担：堺)

図 1 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。



エストロゲン受容体はこれまでの報告からチロシン残基でのリン酸化が観察されており、AF-2 ドメインの C 末側、ER α では第 537 残基のチロシンがメインのチロシンリン酸化部位であることが示唆されており、そのチロシン残基周辺の配列は、ER α と ER β の間で完全に保存されている(図 1)。しかしながらエストロゲン受容体が細胞内シグナル伝達においてその重要性が強調されているチロシンリン酸化を受ける意味について詳細はまだ不明である。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 タグと図 2 に示したように Src の膜移行シグナルを付加した形で発現ベクターを構築した。



更に MCF-7 細胞をはじめとする乳癌細胞株に発現させ、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した。またチロシンリン酸化状態やリン酸化依存的結合のコントロールとして、第 537 残基のチロシン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した(図 2)。

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的であるかどうかを、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。

(14)エストロゲン受容体修飾因子 PP5 とエストロゲン応答遺伝子 COX7RP の同定とその機能解析 (分担：池田)

ER と相互作用し転写活性を調節する新たな因子を同定するため、C 末端を欠く ERβを用いて、酵母 two-hybrid スクリーニング法を行った。得られたクローンは PP5 (protein phosphatase 5)であったが、PP5 と ER および ERβ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 ERαの検討は ERα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。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、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。

エストロゲン応答遺伝子 COX7RP のエストロゲンならびにタモキシフェンによる発現制御をヒト子宮内膜癌 Ishikawa 細胞ならびにヒト乳癌 MCF7 細胞を用いて解析した。COX7RP 遺伝子の第一イントロンに存在する ERE を含むプロモーター領域およびこの ERE に変異を導入したコンストラクトを用いてルシフェラーゼアッセイを行い、ER α と ER β による転写調節を解析した。Ishikawa 細胞のエストロゲン依存性の増殖における COX7RP の機能を解析するため、siRNA を用いて COX7RP の発現量を減少させる系を構築し、MTT アッセイにより細胞増殖を解析した。また、COX7RP タンパクの細胞内局在を免疫染色法を用いて検討した。さらに、COX7RP の機能を解析するため Ishikawa 細胞を用いて COX7RP の安定発現株を取得した。これらの安定発現細胞株を用いて、COX 活性、細胞増殖速度、軟寒天培地中における足場非依存性の増殖について解析した。

(3) エストロゲン受容体を介した心筋細胞保護作用に対するレドックス制御分子の意義 (分担: 近藤)

培養細胞

ラット心筋芽細胞、H9c2, を Dulbecco's modified Eagle's medium に 10% fetal calf serum を加え 95% air と 5% CO₂ 下 37°C で培養した。H9c2 細胞に glutaredoxin (GRX) 遺伝子を発現ベクターに結合させて導入した GRX 高発現株 (H9c2-GRX) も確立した。

E2 の細胞保護作用

細胞機能に及ぼす影響を、過酸化水素による細胞障害を MTT アッセイ、DNA 障害を Tunnell 法で測定した。

Akt 活性の測定

Akt 活性は、Akt assay kit (Cell Signaling Technology) を用いて GSK3 α/β を基質として測定した。

タンパク質のレドックス状態の測定

タンパク質の Cys 残基の修飾によるレ

ドックス状態の変化を、遊離 SH 基を AMS で修飾する Kobayashi らの方法に準拠して測定した。細胞を H₂O₂ などの酸化ストレス下で処理後、7.5% TCA でタンパクを変性させ、12,000 x g、10 分遠沈後、アセトンで 2 度洗浄、1% SDS と 15 mM AMS を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 に溶解後、10% SDS-PAGE で泳動し、特異抗体を用いた immunoblot で解析を行い、移動度の相違を検討した。

Protein phosphatase 活性の測定

PP2A 酵素活性は、Ser/Thr protein phosphatase assay kit 1 (Upstate Biotechnology) を用いて測定した。基質として phosphopeptide RKpTIRR と p-nitrophenylphosphate を用いた。

Thiol transferase 活性の測定

Thiol transferase 活性は Gan and Wells の手法に準拠して測定した。反応液 (137 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM GSH, 1.2 units GSSG 還元酵素, 2.5 mM Cys-SO₃, 0.35 mM NADPH, 1.5 mM EDTA) と試料とを 30°C で反応させ 340 nm の吸光度の変化を分光光度法で測定した。

Immunoblot 解析

Immunoblot 解析は、試料中のタンパク濃度を BCA assay kit (Pierce) で測定後、10%-15% SDS-PAGE で泳動し、nitrocellulose 膜に転写後 Tween20 を含んだ液で反応を停止、一次抗体で 4°C overnight 反応させた後、horseradish peroxidase-conjugated 抗 IgG 抗体を 2 次抗体として反応させた。膜上のタンパクは enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Bioscience) で発色させた。

Akt のタンパク量は抗 Akt 抗体、Akt のリン酸化はリン酸化 Ser473 とリン酸化 Thr309 に対するそれぞれの抗体 (Cell Signaling Technology) を用いて測定した。

Northern blot 解析

764bp の human γ -glutamylcysteine synthetase heavy subunit (γ -GCS-HS) プロンプは既報に基づいて作製した (Int. J

Cancer, 1999)。GRX の発現は RT-PCR 法で測定した。プローブを Random Primer DNA labeling kit (Takara)を用いて ^{32}P で放射標識し、total RNA の分離精製と Northern blot は Sambrook の方法に準拠して行なった。即ち、分離した total RNA(10 μg)を 0.6 M formaldehyde を含む 1 % agarose gel にて泳動し、nylon membrane に移した後に ^{32}P -標識プローブで hybridize し、放射活性を BAS5000 で測定した。

GSH 濃度の測定

細胞内 GSH 濃度の測定は、Beutler による recycling 法に準拠した Total Glutathione Quantification kit (DOJINDO Molecular Technology)で測定した。

γ -GCS の発現

γ -GCS のタンパク量は、ヒト γ -GCS-HS に対する家兎特異抗体を用いて Immunoblot 法で測定した。遺伝子発現は Northern blot 法で測定した。 γ -GCS 遺伝子プロモーターの導入と解析は、 γ -GCS-HS 遺伝子の 3.1kbp の E2 が結合する配列領域を持つプロモーター領域をルシフェラーゼベクターに組み込んだ。

Site-directed mutagenesis の作製

Akt cDNA の Cys-297 と Cys-311 の Ser 残基への変換は、QuickChange XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene)を用いて行なった。

(4) 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: 武山)

本研究は以下 4 つの独立した機能解析系により老化に伴う SBMA の発症・進行の分子機構とステロイドホルモン作用の低下・衰退の因果関係を分子レベルで解明した。第一にショウジョウバエ AR polyQ 依存的な神経変性および ER α ・AR 転写活性を指標に、遺伝子欠損あるいは過剰発現変異体と掛け合わせ、機能遺伝子の分子遺伝学的な探索を行った。次に

神経変性誘導に寄与する細胞核内の AR polyQ の蓄積・凝集において、核内の詳細な局在性や凝集体分子を明らかにするため、AR polyQ を bait にした生化学的アプローチにより細胞核内の局在性や相互作用分子の同定を試みた。第三に神経変性において AR の機能低下を導く転写共役因子の同定・性状解析を行った。最終的に染色体構造変換を指標とした転写共役因子の分子遺伝学的探索とその機能解析の系を構築した。

1) AR polyQ 依存的な神経変性誘導因子の分子遺伝学的探索とその機能解析

神経変性を制御する遺伝子を探索するため、SBMA モデルショウジョウバエ(AR polyQ 系統)の神経変性を指標として遺伝子変異体と掛け合わせた分子遺伝学的スクリーニングを行なった。当該遺伝子が欠損または過剰発現しているショウジョウバエ変異体と AR polyQ 系統を交配させ、次世代の複眼を観察した。約 1500 遺伝子のうち 25 遺伝子で神経変性の変化が観察された。中でも神経変性の著しい回復が、細胞周期制御因子であるヒト Retinoblastoma protein(hRb)のショウジョウバエホモログ Retinoblastoma family protein(dRbf)の過剰発現で認められ、AR polyQ 特異的な dRbf の遺伝的相互作用が示唆された。そこで AR polyQ 依存的な神経変性抑制における hRb および dRbf の作用機構の解明を試みた。

一方、AR polyQあるいはpolyQ単独に発現させ誘導した神経変性に対し、遺伝子欠損変異体で顕著に悪化する遺伝子群にはヒストン修飾やクロマチンリモデリング等のクロマチン構造変換・維持関連因子が多く存在することが判明した。そこでこれら因子とpolyQ構造の相互作用に共通した領域を生化学的に解析すると共に、これら因子の機能解析を行った。

2) AR polyQ 細胞内局在性および相互作用因子凝集体の生化学的探索

AR polyQ が誘導する神経変性は細胞

核内凝集体から引き起こされることは明確にしてきたが、詳細な細胞核内の局在性並びに凝集体形成時の相互作用因子は不明である。そこでショウジョウバエ embryo および複眼に強制発現させた AR polyQ を bait として細胞内画分後、AR polyQ の局在性および凝集体構成画分における相互作用因子のタンパク精製を試みた。はじめに、ショウジョウバエ embryo および複眼でリガンド非依存的に転写活性を示す AR 過剰発現ショウジョウバエ変異体[AR(AF-1)系統]の作出を行なった。次に、AR(AF-1)系統のこれら組織の核抽出液、クロマチンを含む沈殿の取得のため、スクロースグラジエントで細胞質画分と核画分に分離後、核抽出液ならびにクロマチンを含む沈殿を分画した。これら画分を用い AR(AF-1)および相互作用因子の同定を行った。

3) ER α および AR 転写共役因子の分子遺伝学的探索とその機能解析

ショウジョウバエに構築した ER α および AR 転写系において、既知転写共役因子が機能することを報告した。一方でリン酸化に代表される細胞内情報伝達系が核内レセプター転写制御に対し、その情報伝達系のクロストークが保持されているかの検討は、一連の核内レセプター機能解析に必須である。ER α は細胞内情報伝達因子によりリン酸化修飾され転写活性化能が増強することが知られている。細胞増殖因子により活性化される MAP kinase (MAPK) や細胞周期調節因子により活性化される Cyclin dependent kinase 7 (Cdk7) は細胞種特異的に ER α の Ser¹¹⁸ 残基をリン酸化し、転写活性化能を増強することが報告されている。これら ER α のリン酸化に関する培養細胞レベルでの知見を生体内で証明するため、ER α 転写活性化能を指標とし、MAPK 及び Cdk7 並びにこれらシグナル伝達因子の機能欠損変異ショウジョウバエを用いて、Ser¹¹⁸ を標的とするリン酸化シグナルを検討し

た。

これら細胞内情報伝達系との核内レセプターの情報伝達クロストークと、既知転写共役因子の機能の確認により、更なる転写共役因子の分子遺伝学的探索を遂行した。ER α および AR 発現ショウジョウバエを用いた転写共役因子群の分子遺伝学的な探索は数千種におよぶ各種遺伝子変異型ショウジョウバエとの交配により核内レセプター転写活性能の変動を指標に網羅的な探索を行った。転写強弱を示したハエ変異体から変異遺伝子を同定した後、相同性の高いヒトホモログ遺伝子を単離した。単離した遺伝子は HEK293T 細胞において ER α および AR と同時に過剰発現させ、それぞれレセプターの転写活性能をルシフェラーゼアッセイにより検討した。

4) 染色体構造変換を指標とした転写共役因子の分子遺伝学的探索とその機能解析

1),2),3)のスクリーニングにより同定した因子の多くは染色体構造調節機能を有していると推測され、本研究では生化学的な機能解析と同様に個体レベルで明確にすることが老化の評価系に必須であると考えた。現在、ヘテロクロマチンおよびユークロマチン状態と転写頻度との相関を示す Position Effect Variegation (PEV) 解析は、ショウジョウバエ複眼の表現系解析が最も有用とされている。本研究では PEV 解析を応用し AR 転写系を構築した。すなわち白眼の遺伝的条件下において、AR 応答配列下流に構築した赤色素を有する遺伝子をゲノム上ランダムに導入させた。この遺伝子導入位置がユークロマチン領域であればアンドロゲン依存的に複眼は赤色を呈すが、ヘテロクロマチン領域であれば転写は抑制化状態にあり、赤目遺伝子の発現は抑制され、白眼を示す。従ってアンドロゲン依存的にレポーター遺伝子位置の染色体構造状態を個体レベルで視覚的に把握し、取得した転写共役因子のクロマチン構造変換

機能の評価を行った。

(17) 脳の老化におけるステロイド受容体作用機構の解明とその応用 (分担: 柳澤)

1) エストロゲンによる IGF-1 受容体の活性化

脳においてエストロゲンと増殖因子である IGF-1 の間に機能的相互作用が存在することが知られている。IGF-1 は細胞表面上の IGF-1 受容体に結合し、IGF-1 受容体のリン酸化を促す。そこで、エストロゲン依存的に IGF-1 受容体がリン酸化を受けるか否かを検討した。IGF-1 受容体と ER α をともに発現している MCF-7 細胞をエストロゲン(10⁻⁸M)存在下と非存在下において培養し、回収した後ホモジナイザーで破碎することによって抽出液を作製した。この抽出液から抗 IGF-1 受容体抗体を用いて IGF-1 受容体を免疫沈降し、抗リン酸化抗体を用いてイムノブロットを行った。

2) エストロゲンによる MAP キナーゼと Akt の活性化

IGF1 受容体の下流には MAP キナーゼおよび Akt が存在し、IGF-1 受容体の活性化によって MAP キナーゼと Akt もリン酸化され活性化される。そこで、エストロゲンによる IGF-1 受容体のリン酸化にともない MAP キナーゼと Akt がリン酸化を受けるか否かを検討した。MCF-7 細胞をエストロゲン存在下、非存在下でそれぞれ培養し、細胞を回収後ホモジナイズにより破碎し、細胞抽出液を調整した。この細胞抽出液から MAP キナーゼ、Akt をそれぞれ特異的な抗体を用いて免疫沈降し、リン酸化抗体を用いてイムノブロットを行った。

3) 細胞質における ER α の局在

IGF-1 受容体がエストロゲン刺激によってリン酸化を受けること、エストロゲン依存的 IGF-1 受容体の活性化がエストロゲン添加後 15 分程度の短時間で起きることから、この過程には細胞質に存在

する ER α が関与しているものと考えられる。そこで、エストロゲン添加時における ER α の細胞質での局在を検討した。

MCF-7 または HeLa 細胞に GFP と融合した ER α を発現させ、エストロゲン未添加の状態と添加後 15 分で細胞内の GFP- ER α の局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

4) IGF-1 受容体と ER α との相互作用の解析

ER α はエストロゲン添加後 15 分以内に細胞膜上に移動する。エストロゲン刺激後 15 分で IGF-1 受容体がリン酸化されることを考えあわせると、ER α はエストロゲン依存的に IGF-1 受容体と相互作用する可能性が考えられた。そこで、MCF-7 細胞にエストロゲンを添加し、細胞を回収後破碎して調整した細胞抽出液から抗 IGF-1 受容体抗体を用いて IGF-1 受容体を免疫沈降した。免疫沈降物を SDS-PAGE にて分離し膜にブロットした後、抗 ER α 抗体で ER α を検出した。

5) IGF-1 受容体遺伝子欠損細胞に対するエストロゲンの作用

エストロゲンによる MAP キナーゼ、Akt の活性化は IGF-1 受容体を介しているものと考えられた。そこで、IGF-1 受容体遺伝子欠損マウスの繊維芽細胞を株化した R-細胞を用い、エストロゲンへの応答性を検討した。IGF-1 受容体を発現している R+細胞と発現していない R-細胞をそれぞれ培養し、エストロゲンを添加後、細胞を回収・破碎し、抗 MAP キナーゼ抗体、抗 Akt 抗体を用いて MAP キナーゼ、Akt を免疫沈降した。沈降した MAP キナーゼ、Akt を抗リン酸化抗体を用いてブロッティングし、リン酸化状態を検討した。

6) エストロゲン依存的に ER α と相互作用する細胞質蛋白質因子の単離と同定

IGF-1 受容体の発現していない R-細胞においてもエストロゲン依存的な MAP キナーゼと Akt の活性化が認められたこ

とから、IGF-1 受容体以外にも ER α と結合する膜局在蛋白質が存在する可能性が示唆された。そこで、大腸菌を用いて GST 融合 ER α 蛋白質を大量に調整し、GST-ER α カラムを作製した。このカラムにエストロゲン存在下または非存在下でマウス脳の細胞質および膜抽出画分をアプライし、エストロゲン依存的に結合した各分を SDS-PAGE にて分離した後、TOF-MS を用いた Mass fingerprinting によって同定した。

7) エストロゲン非存在下における ER α の分解誘導

ER α の蛋白質量を定量するため、MCF-7 細胞をエストロゲン(10^{-8} M)存在下と非存在下において培養し、回収した後ホモジナイザーで破碎することによって抽出液を作製し、抗 ER α 抗体を用いてイムノブロットを行った。ER α の分解がユビキチン・プロテアソーム系に依存しているか否かを確かめるため、プロテアソーム阻害剤である MG132 およびラクタシスチン存在下での ER α 蛋白質量についても上記と同様の方法を用いて定量した。さらに、MCF-7 細胞の破碎液から抗 ER α 抗体を用いて ER α を免疫沈降し、SDS-PAGE にて展開したのち、抗ユビキチン抗体を用いてイムノブロットを行い、ER α のユビキチン化の度合いを検討した。

8) エストロゲン非存在下における ER α の分解誘導に必要な領域の決定

ER α の各種領域欠損変異体を作製し、293 細胞にトランスフェクションした。293 細胞をエストロゲン、MG132 存在下または非存在下で培養し、破碎したのち、ER α の領域欠損変異体量を、抗 ER α を用いたイムノブロットによって定量した。

9) ER α の分解に関与する E3 型ユビキチン・リガーゼ、CHIP の同定

GST と融合させた ER α のエストロゲン結合領域を大腸菌に発現させ、超音波による破碎ののち、グルタチオンビーズを用いて精製した。精製した GST-ER α

をカラムに詰め、HeLa 細胞の抽出液をエストロゲン存在下または非存在下においてロードした。カラムを 150mM KCl を含む緩衝液で 3 回洗浄したのち、結合蛋白質をザルコシンもしくはグルタチオンを用いて溶出した。溶出蛋白質を SDS-PAGE にて展開し、銀染色を行ったのち、各蛋白質のバンドを切り出し、ゲルのままトリプシン処理を行った。トリプシン処理を行ったゲルからペプチドを回収し、飛行時間型質量分析器を用いて各ペプチドの質量を測定し、MS-fit によって蛋白質の同定を行った。質量分析による蛋白質の同定結果を確認するため、特異的抗体を用いてイムノブロットを行った。

10) CHIP 複合体構成因子の精製と同定

CHIP を含む蛋白質複合体を精製するため、FLAG と HA ダブルタグ CHIP を HeLa 細胞に発現させ、G418 でセレクションをかけることによって、stable transformant を得た。この stable transformant を大量に培養し、破碎したのち、CHIP を含む蛋白質複合体を、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。沈降物を FLAG ペプチドを用いて遊離させたのち、バックグラウンドを除くため、さらに抗 HA 抗体を用いて免疫沈降し、沈降物を SDS-PAGE にて展開した。各蛋白質のバンドを切り出し、ゲルのままトリプシン処理を行った。トリプシン処理を行ったゲルからペプチドを回収し、飛行時間型質量分析器を用いて各ペプチドの質量を測定し、MS-fit によって蛋白質の同定を行った。質量分析による蛋白質の同定結果を確認するため、特異的抗体を用いてイムノブロットを行った。

11) CHIP による ER α の品質管理

CHIP を 293 または MCF-7 細胞に発現させ、ER α の転写活性に与える影響を、ルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。さらに、ER α にアミノ酸変異を導入することにより、温度感受性変異体を作

製し、CHIP とともに 293 細胞にトランスフェクションした。293 細胞を破碎し、抗 ER α 抗体によってイムノプロットし、温度感受性変異体の蛋白質量に対する CHIP の効果を検討した。CHIP と ER α をトランスフェクションした 293 細胞を 42 度で 30 分間培養し、細胞を破碎後、抗 ER α 抗体によってイムノプロットし、ミスフォールディングした野生型 ER α に対する CHIP の影響を検討した。

12) CHIP 遺伝子欠損マウス由来細胞株を用いた ER α 品質管理機構の解析

CHIP 依存的な ER α の分解の生体内における重要性を検討するため、CHIP 遺伝子欠損マウス(CHIP $-/-$)、CHIP ヘテロマウス(CHIP $+/-$)およびこれらの同腹子である CHIP 野生型マウス(CHIP $+/+$)からマウス胎児繊維芽細胞(MEF)を単離し、ER α モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングによって ER α の蛋白質量を検討した。さらに、MEF 細胞を熱ストレス条件下(42 $^{\circ}$ C、30分)で培養し、ER α 蛋白質にミスフォールド誘導したのち、ER α モノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングすることによって ER α の蛋白質量を検討した。

(18) 老化と老年病の疾患モデル動物の開発とその応用 (分担: 津久井)

1) エストロゲンシグナルにおける生体作用: 疾患モデルマウスの作製と下流応答遺伝子群の発現制御

エストロゲンレセプターは 2 種類(ER α および ER β) 存在し、その生理作用について類似・相違性について未だ明確な報告がなく、ER α と ER β がお互いにオートクライン的に発現量、またはダイマー形成により転写因子としての作用を制御する可能性も考えられる。エストロゲン特異的シグナルを検討するには、KO マウスを検討することが重要と思われるが、より顕著に特異的なエストロゲンの生体作用を見るためにリガンド非依存型エストロゲンレセプター(caER α および

caER β) のコンディショナルトランスジェニック(cTg)マウスおよび 組織特異的プロモーター/Cre 作製・交配させることにより、標的臓器のみでリガンド非依存的に ER β シグナルのみを活性化することが可能である。さらに、ER α KO (ER β シグナルのみ存在)マウスを利用することにより、ER のシグナル特異性とその生体作用の特異性についても検討することが可能と考える。つまり、今まで不明瞭であった標的臓器での 1) エストロゲン(ステロイド) \Rightarrow 2) ER α /ER β の特異性およびその作用メカニズムについて詳細に検討し、エストロゲンシグナル経路の特異性について、生体内で生理作用および作用メカニズムについて検討をおこなう。

2) エストロゲンシグナルの生体作用: 標的臓器としての卵巣とエストロゲンシグナル

エストロゲンを合成する主要な臓器である卵巣について、そのステロイドレセプターである ER α および ER β の発現が報告されており、妊娠期に劇的に変化をとともなう子宮および乳腺が近接して存在する代表的な標的臓器として考えられる。とりわけ老年病との関連について考えると、女性の閉経後における生体変化は極めて重要な問題であり、骨粗鬆症、血管疾患、およびホルモン依存性ガン等と深く関連することが示唆されている。先ず、生体内の卵巣でエストロゲンシグナルの時間軸を換えて誘導することにより、他のホルモンシグナルとの作用について検討する。これらのエストロゲンレセプター(ER α および ER β) に卵巣作用に相違または類似性が存在するか検討した。また、エストロゲンシグナルおよび下流応答遺伝子の生体生理作用およびリスクについて検討するために、受精卵 2 細胞後期から発現が知られている CAG(β -actin/CMV-IE)プロモーター/Cre マウスと cTg マウスを交配して下流応答遺伝子が

過剰発現される条件を実験系により作製し、エストロゲンシグナルを介する下流応答遺伝子の生体での生理作用の解析、および副作用について評価した。さらに、エストロゲンレセプターの遺伝子改変マウスに卵巣特異的 *Cre* マウス (ZP3-*Cre*:*Zona pellucida* 3 プロモーターに *Cre* を融合した *Tg* マウス) を交配し、卵巣の卵巣組織にエストロゲンシグナルを過剰または異所的に誘導する系を目指した。マウスにおいてエストロゲンは生後 11 日目前後から合成が開始されると考えられるが、ZP3 プロモーター支配下に *Cre* を発現したマウスを交配することにより、生後 3 日前後でエストロゲンレセプターをリガンド非依存的に活性化し、エストロゲンシグナルの卵巣機能について検討した。また、これらのエストロゲン下流応答遺伝子が発現することにより引き起こされる生体作用について検討するとともに、他のステロイドホルモンシグナルとのクロストークについても併せて検討した。

C. 研究結果

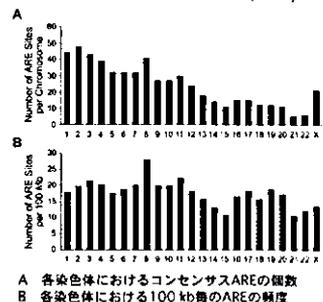
(I) 老化前立腺における新しいアンドロゲン応答遺伝子の探索

1) ヒトゲノム情報に基づくアンドロゲン応答配列(ARE)の網羅的同定

Ensembl ゲノムブラウザより取得されたヒトゲノム配列(バージョン Human 34d Gene Build)による解析において、563 個のコンセンサス ARE が同定された。ヒトゲノムに存在すると予想されるコンセンサス ARE の数は理論上 190 程度であり、その数を上回っていた。コンセンサス ARE の分布は概ね染色体サイズに相当しており、平均 100 Mb あたり 17.3 個 ARE が存在していた(図 3)。

2) ヒト前立腺癌細胞におけるコンセンサス ARE のアンドロゲン受容体(AR)結合性

図3 全染色体におけるコンセンサスアンドロゲン応答配列(ARE)の個数と頻度

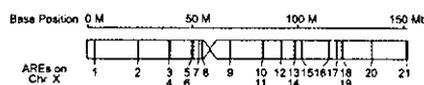


ChIP により得られた前立腺癌細胞サンプルを用い、コントロール実験として PSA プロモーターおよびエンハンサー領域の ARE における AR 結合性を検討した。AR 結合性は DU145 細胞では全く認められず、LNCaP 細胞において R1881 刺激したサンプルを AR 抗体により免疫沈降した場合においてのみ、AR 結合性が認められた。PSA プロモーター領域の ARE における AR 結合性はコントロールに比して~3.5 倍、エンハンサー領域の ARE における AR 結合性は~60 倍であった。

ヒトゲノム情報から *in silico* 解析により同定された ARE について、AR 自体が存在する X 染色体をモデルにして機能解析を行った。X 染色体上にはコンセンサス ARE が 21 個同定され(図 4)、8 個の部

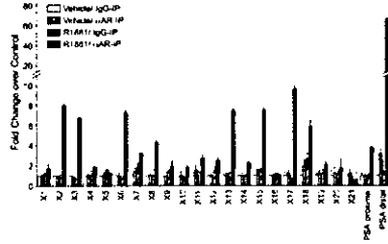
図4

X染色体におけるコンセンサスAREの分布



位に対して、LNCaP 細胞を用いた検討では、PSA プロモーター領域の ARE よりも高い AR 結合性(~4 倍以上)を認めた(図 5)。DU145 細胞を用いた検討では、全ての ARE について AR 結合性を認めな

図5 ヒト前立腺癌細胞LNCaPにおける X染色体上のコンセンサスAREへのAR結合性



細胞はホルモン枯渇72時間後に合成アンドロゲンR1881(10 nM)または対照として0.1%エタノール (Vehicle) にて24時間刺激した。クロマチン免疫沈降法により、AR特異的抗体 (AR-IP) または非特異的IgG (IgG-IP) で免疫沈降したDNAサンプルを作成し、定量的PCRにて解析した。各ARE におけるVehicle刺激にてIgG-IPを行った分画のAR結合性を1とし、それ以外の分画におけるAR結合性が何倍であるかを棒グラフで示す。前立腺特異的抗腫瘍PSAの近位および遠位AREに対するAR結合性を陽性コントロールとして示した。

った。コンセンサス ARE の 3 塩基からなるスペーサー部位の塩基配列と AR 結合性の関連性については、21 個のサンプルにおいては認められなかった。

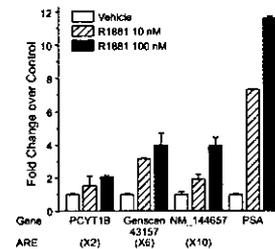
3) ヒト前立腺癌細胞における ARE 近傍遺伝子のアンドロゲン応答性

X染色体における 21 個のコンセンサス ARE(AREX1-X21)に対し、近傍遺伝子の採択基準に従い、21 個の遺伝子をリストアップした(表 1)。このうち、10 個についてはアノテーションがついている遺伝子のイントロンに ARE が存在していた。4 個についてはアノテーション

がついている遺伝子の upstream に存在していた(AREX4 近傍の BCOR 遺伝子(BCL-6 interacting corepressor)については、イントロンに ARE が存在するタイプと upstream 領域に ARE が存在するタイプがあるため、それぞれを別個にカウントした)。1 個についてはアノテーションがついている遺伝子の downstream に存在していた。

ARE 近傍遺伝子の mRNA 発現のアンドロゲン応答性について解析した。LNCaP 細胞を用いた R1881 刺激後 24 時間の mRNA 発現について、3 つの遺伝子が有意な上昇を認めた(図 6)。DU145 細

図6 LNCaP細胞における コンセンサスARE近傍遺伝子のアンドロゲン応答性発現



細胞はホルモン枯渇72時間後に合成アンドロゲンR1881(10 nMおよび100 nM)または0.1%エタノール (Vehicle) にて24時間刺激し、RNAを採取した。逆転写増幅反応によりcDNAを作成し、X染色体上のコンセンサスAREX2、X6、X10近傍に位置する3つの遺伝子PCYT1B、Genscan43157 (Genbank:NM_144657) の発現におけるアンドロゲン応答性を解析した。PSAは陽性コントロールとして用いた。

表1

X染色体上のコンセンサスARE近傍の遺伝子 および予想遺伝子配列

ARE ID*	X染色体上のAREの位置	ARE 配列	近傍遺伝子	Ensembl ID	ARE の位置 ^b
X1	3181583-3181597	AGAACAatggTGTTCT	PRKX	ENSG00000183943	遺伝子内
X2	23945954-23945968	AGAACAActaTGTTCT	PCYT1B	ENSG00000102230	遺伝子内
X3	38720672-38720686	AGAACAaagTGTTCT	Ab-initio Genscan transcript ^c	GENSCAN00000046001	遺伝子内
X4	38970910-38970924	AGAACAaagTGTTCT	BCOR	ENSG00000183337	5' (3 kb)/ 遺伝子内 ^d
X5	49168004-49168018	AGAACAagccTGTTCT	Ab-initio Genscan transcript ^c	GENSCAN00000107032	3' (8 kb)
X6	49225713-49225727	AGAACAagccTGTTCT	Ab-initio Genscan transcript ^c	GENSCAN00000043157	3' (10 kb)
X7	52321185-52321199	AGAACAAtaTGTTCT	O60275	ENSG00000124313	5' (4 kb)
X8	53952953-53952967	AGAACAAtaaTGTTCT	PFKFB1	ENSG00000158571	遺伝子内
X9	67507044-67507058	AGAACAgaatTGTTCT	Ab-initio Genscan transcript ^c	GENSCAN00000115882	遺伝子内
X10	82472510-82472524	AGAACAatgTGTTCT	NM_144657	ENSG00000165259	遺伝子内
X11	83327890-83327904	AGAACAAttcTGTTCT	NM_024921	ENSG00000124429	遺伝子内
X12	91506977-91506991	AGAACAaaaTGTTCT	Ab-initio Genscan transcript ^c	GENSCAN00000029252	遺伝子内
X13	98772894-98772908	AGAACAagaTGTTCT	SYTL4	ENSG00000102362	5' (5 kb)
X14	98951387-98951401	AGAACAAtctTGTTCT	Ensembl novel transcript	ENST00000328526	遺伝子内
X15	101412450-101412464	AGAACAagctTGTTCT	NGFRAP1	ENSG00000166681	3' (8 kb)
X16	114061336-114061350	AGAACAgaatTGTTCT	Ab-initio Genscan transcript ^c	GENSCAN000000064921	遺伝子内
X17	118442517-118442531	AGAACAgaatTGTTCT	CUL4B	ENSG00000158290	遺伝子内
X18	120798222-120798236	AGAACAActaTGTTCT	Ab-initio Genscan transcript ^c	GENSCAN00000054945	遺伝子内
X19	121144935-121144949	AGAACAgaatTGTTCT	GRIA3	ENSG00000125675	遺伝子内
X20	134752049-134752063	AGAACAaactTGTTCT	Q96NB7	ENSG00000173971	遺伝子内
X21	151348988-151349002	AGAACAaccTGTTCT	NM_152274	ENSG00000147382	5' (16 kb)

*ARE ID X1~X21は図2のNo. 1~21に対応。

^bAREの位置は近傍遺伝子/予想遺伝子配列に対してAREが5'側か、遺伝子内か、3'側かのどの位置に存在するかについて示す。5'側または3'側の場合は、括弧内にその距離を示す。

^cAb-initio Genscan トランスクリプト: Genscan prediction program を用いた Ensemblゲノムブラウザ情報解のバイブライン解析システムにより予想される遺伝子配列。

^dBCOR (BCL-6 interacting corepressor) は2つの遺伝子開始点をもつ。

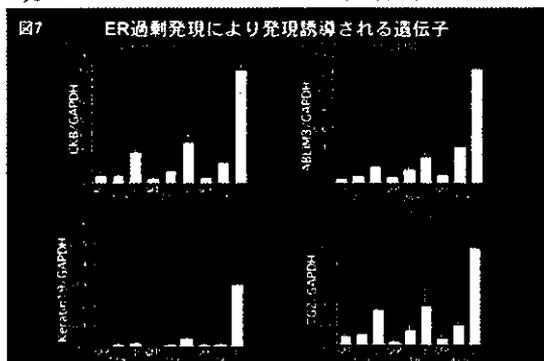
胞を用いた検討では、R1881 刺激によるこれら 3 遺伝子の発現上昇は認められなかった。3 遺伝子のうち2つはアノテーションがついており、PCYT1B 遺伝子 (phosphorylcholine transferase B)のイントロン7に AREX2 が、NM_144657 遺伝子のイントロン3に AREX10 が存在していた。1つは Genscan プログラムにより予想される遺伝子で、AREX6 の上流~10 kb

に存在すると考えられる。PCYT1B はフォスファチジルコリン合成にかかわる酵

素をコードする遺伝子である。NM_144657 の機能については明らかになっていないが、配列から 2 つの HOX ホメオボックスドメインをもつと考えられることから、核内の DNA 結合蛋白質をコードすると考えられる。

(2) 骨における新しいエストロゲン応答経路の探索

骨芽細胞においてエストロゲンによる発現誘導をうける遺伝子として得られたのは、Creatine Kinase B、Keratin 19、Actin binding LIM protein 3、Tissue Transglutaminase の 4 遺伝子であった(図 7)。Creatine Kinase B は、骨芽細胞にお



いてエストロゲンにより発現制御を受けることが既に報告されている遺伝子であり、分化、増殖の際のエネルギー代謝に関わっていることが示唆されるものである。Keratin 19 および Actin binding LIM protein 3 は骨芽細胞での発現やエストロゲン応答の有無に関する過去の報告はなく、今回の解析によって得られた新規の骨芽細胞でのエストロゲン応答遺伝子である。Tissue Transglutaminase は、骨芽細胞で発現していることは報告されているが、骨芽細胞でエストロゲンにより発現が促進されることは、今回の解析で新たに見出された。

(3) 骨における新しいグルココルチコイド応答経路の探索

増殖期、培養 2 週、培養 4 週それぞれにおける応答遺伝子をマイクロアレイで解析したところ、それぞれの時期特異的に発現誘導される遺伝子や、すべての時

期において発現が誘導される遺伝子が複数得られた。いくつか機能の類推できるものを抜粋すると、増殖期において発現誘導されていた遺伝子として、IGF-II mRNA binding protein が得られ、増殖期、培養 2 週、4 週すべてにおいて発現誘導された遺伝子として、CCAAT/Enhancer Binding Protein δ (C/EBP δ)、Matrix Gla Protein (MGP)、Krupel Like Factor 9 (KLF9)、Connective Tissue Growth Factor (CTGF)などが得られた。培養 2 週と 4 週で発現誘導された遺伝子には、Endothelin 1、Adrenomedullin などが含まれていた。さらに、培養 4 週において発現誘導された遺伝子には Follistatin、NGFI-B などが得られ、分化誘導刺激後の培養日数の違いにより、発現誘導される遺伝子もことなってくるが見出された(表 2)。実際

表2 マイクロアレイ解析より得られた骨芽細胞におけるデキサメタゾン誘導遺伝子とその作用

	増殖期	分化誘導 2 週	分化誘導 4 週	機能
IGF-II mRNA-BP	+	-	-	IGF-II 抑制
C/EBP δ	+	+	+	IGF-II 抑制
MGP	+	+	+	石灰化抑制
KLF9	+	+	+	転写因子
CTGF	+	+	+	骨形成促進
Endothelin1	-	+	+	大腸骨骨髄壊死
Adrenomedullin	-	+	+	骨形成促進
Follistatin	-	-	+	Activin, BMP 抑制
NGFI-B	-	-	+	アポトーシス誘導

+: 発現増加 -: 発現増加なし

の発現を C/EBP δ 、NGFI-B についてリアルタイム PCR で確認したところ、発現の増加が認められた。

(4) 骨における Alox15 のステロイド応答性

初代培養ヒト軟骨ならびに骨芽細胞では Col2a ならびに ALP といった分化マーカーの上昇に伴い、Alox15、Alox15B、Alox12 の発現上昇が確認された。デキサメタゾン添加においては Alox15 や Alox12 と比して Alox15B において顕著な発現上昇が mRNA レベルで確認された(図 8)。

(5) エストロゲン応答遺伝子 Efp の機能検索

Efp 結合蛋白に関して 2 ハイブリッド