

200400808A

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 2004

平成16年度研究報告書

平成17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、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、私が残りの2年間で主任研究者として、研究を継続致しました。

本研究班は、(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) 副腎性高血圧異常症の4つを研究対象として進めました。

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、COUP-TF、Foxo1などの転写因子、SIK、層特異的なIZA、ZOGなどの副腎の発生、分化、層構造形成における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、SWI/SNF との相互作用、GRの転写活性化と転写抑制の分離を明らかにしました。

3. 副腎腫瘍

世界において最大規模の副腎偶発腫の疫学的長期予後調査を行い、頻度、病因、悪性化について明らかにしました。

Ad4BP/SF-1、COUP-TF、SUMO化酵素、Ubc9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明らかにしました。

4. 副腎性高血圧

原発性アルドステロン症の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検討、ミネラルコルチコイドレセプター (MR) に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抗アルドステロン剤の有効性を明らかにしました。

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。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をめざして、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17年3月31日

主任研究者 名和田 新

目 次

I 総括研究報告

主任研究者 名和田 新 1

II 分担研究報告

(1) 副腎発生・分化、ステロイド合成酵素

1. ① Forkhead transcription factor Foxo1 の
副腎における発現・機能に関する研究
②先天性ステロイドホルモン産生異常症の新たな病因の検索 5
旭川医科大学小児科 藤枝 憲二
2. 塩誘導性キナーゼ (SIK) による cAMP 依存的遺伝子の発現制御 12
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
3. HDL 受容体 CLA-1 の副腎ホルモン産生および
副腎細胞増殖に及ぼす影響について 17
香川大学医学部第一内科 村尾 孝児、井町 仁美、
高原 二郎、石田 俊彦
4. 副腎皮質の発生初期過程に関する解析 24
自然科学研究機構 基礎生物学研究所
発生生物学研究領域 性差生物学研究部門 諸橋憲一郎
5. 副腎ステロイド産生における SF-1 および Ubc9, PIAS1 の役割 29
慶應義塾大学保健管理センター、同医学部内科、
同医学部泌尿器科、横浜市立大学大学院医学研究科微細形態学
柴田 洋孝、須田 徳子、小林佐紀子、
横田 健一、村井 彩乃、池田やよい、
齋藤 郁夫、村井 勝、猿田 享男
6. 副腎細胞再生に関する研究 41
九州大学大学院医学研究院病態制御内科
権藤 重喜、柳瀬 敏彦、岡部泰二郎、田中 智子、
森永 秀孝、野村 政壽、後藤 公宣、名和田 新

(2) ミネラルコルチコイド、MR、原発性アルドステロン症

7. 副腎静脈血サンプリングによる局在診断法—その有用性と問題点 51
横浜労災病院内分泌・代謝内科、
社会保険総合中央病院糖尿病・内分泌内科
西川 哲男、齋藤 淳、伊藤 浩子、伊藤 譲、大村 昌夫

8. デキサメサゾン抑制下 迅速 ACTH 負荷試験による
アルドステロン産生腺腫の診断 57
京都大学医学部・医学研究科・内分泌代謝内科
伊藤 裕、宮下 和季、山原 研一、曾根 正勝、小林(万木) 貴美、
朴 貴典、小山田尚史、澤田 直哉、田浦 大輔、中尾 一和
9. 原発性アルドステロン症診断における
ACTH 負荷副腎静脈サンプリング法の機能的意義に関する研究 60
東京大学大学院医学研究科内科 高橋 克敏、本清 雅子、藤田 敏郎
10. 心血管組織における鉱質コルチコイド受容体発現と病態的意義 66
福井大学病態制御医学(第三内科)
宮森 勇、河合 康幸、吉田 正博、森川 玄洋

(3) 副腎腫瘍、DHEA

11. 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 71
東京大学・医科学研究所・感染免疫大部門 伊庭 英夫
12. 副腎偶発腫・非機能性腺腫における
18-hydroxycortisol、18-oxocortisol の検討 73
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、一城 貴政
13. ホルモン産生副腎腫瘍に対する外科的治療の検討 77
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)
吉村 一宏、奥山 明彦
14. 副腎皮質腫瘍と NGFIB 核内受容体ファミリー 81
岐阜大学大学院医学系研究科内分泌代謝病態学分野
宗 友厚、諏訪 哲也、村松 学、武田 純
15. Dehydroepiandrosterone (DHEA) による
糖新生系酵素低下におけるメカニズムの検討 89
横浜市立大学第三内科 中島 淳

(4) グルココルチコイド、GR

16. グルココルチコイドレセプターの発現量変化とその転写制御への影響 93
大阪大学大学院医学系研究科 分子病態内科学講座
大月 道夫、許 欣、紅林 昌吾、笠山 宗正
17. グルココルチコイドレセプターの調節機構の解明と
その臨床応用に関する研究 97
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アレルギー免疫科
田中 廣壽、吉川 賢忠

| | |
|---|------------|
| 18. グルココルチコイド受容体を介する 転写活性化と骨芽細胞関連タンパク質 | 100 |
| 九州大学医学研究院老年医学 高柳 涼一 | |
| 19. 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 | 104 |
| 東京大学分子細胞生物学研究所 加藤 茂明 | |
| 20. 副腎及び副腎腫瘍における ウロコルチンファミリーとそのレセプターの局在 | 108 |
| 東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理学講座病理診断学分野 福田 剛、鈴木 貴、笹野 公伸 | |
| 21. メタボリックシンドローム発症の潜在的病因としての 胎生期からの 11 β - hydroxysteroid dehydrogenase 調節異常 | 115 |
| 浜松医科大学小児科 大関 武彦、中川 祐一、藤澤 泰子、 李 仁善、齋 秀二、中西 俊樹 | |
| (5) 副腎偶発腫全国調査 | |
| 22. 本邦における5年間の継続的副腎偶発腫疫学調査－最終報告－ | 121 |
| 東邦大学医学部内科学糖尿病・代謝・内分泌科 一城 貴政、上芝 元 | |
| Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表 | 131 |
| 研究班構成員名簿 | 145 |

I 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

当研究班も本年度が最終年度となったが、本年度も研究の集大成となるような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、COUP-TF、Foxo1などの転写因子、プロテインキナーゼ SIK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取得する。

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 などとの相互作用、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、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。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高血圧における臓器障害、11 β HSD type1 および type2、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 16 年度の研究報告会を平成 17 年 1 月 21 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 を、アデノウイルスを用いて、マウス骨髄由来の組織幹細胞に発現させることにより、種々のステロイドを産生する細胞を誘導することができた。（名和田）。

Ad4BP/SF-1 遺伝子の第4イントロン内に胎生副腎特異的な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と Pbx/Meis と Pbx/Hox の結合配列が存在し、前者が遺伝子発現のイニシエーションに、後者がメンテナンスに必要な配列であることがわかった（諸橋）。

COUP-TFI 結合蛋白として同定された SUMO 化酵素 Ubc9 および PIAS1 は SF-1 を SUMO 化して SF-1 の転写活性を抑制すると同時に、SUMO 化非依存性に SF-1 の coactivator として働くことがわかった（猿田）。

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 がリン酸化する基質を検索したところ、TORC と呼ばれる CREB 特異的な転写共役因子が同定された。SIK によりリン酸化された TORC は核外に移行し、CREB 依存性の遺伝子の転写が抑制されることが示された（岡本）。

複合型ステロイド合成障害と外陰部異常を伴う Antley-Bixler 症候群（ABS）症例において P450 oxidoreductase（POR）遺伝子変異（複合ヘテロ変異）を世界で初めて同定した（藤枝）。

Ad4BP/SF-1 を用いた副腎再生の試みに関しては、副腎と性腺への誘導特異性の解明、副腎分化に関係する遺伝子の同定、ヒト骨髄を用いた副腎再生の試みへの発展が期待される。また Ad4BP/SF-1 遺伝子の副腎特異的なエンハンサーの同定は、種々の因子を副腎特異的に発現させることにつながるため、副腎へ分化が誘導された細胞の同定や遺伝子治療への応用が期待される。

また、ステロイド合成酵素の遺伝子発現に影響を与える因子や情報伝達経路、ステロイド合成異常症についての新たな知見を得た。

2) ステロイドホルモン不応症

GR に結合する転写因子複合体の解析から、GR と AP-1 からなる複合体にはヒストン脱アセチル化酵素 HDAC-2 が含まれる事が明らかになった。これらの複合体の構成成分の詳細な解析は、新たな抗炎症薬の開発につながる可能性がある（加藤）。

AR ノックアウトマウスでは、副腎の腫大、血清コルチコステロン値の高値を認め、デキサメサゾン抑制試験にて少量では抑制されず、大量にて抑制された事より、視床下部-下垂体-副腎皮質系の機能亢進が認められた。下垂体でのグルココルチコイドによるネガティブフィードバックに AR が関与することが示唆された（加藤）。

GR の発現量を増加させることによって、血管内皮細胞の炎症性遺伝子（VCAM-1）発現がより少量のグルココルチコイドにより抑制されることを明らかにした（笠山）。

ヒト骨芽細胞において、グルココルチコイドは Dkk-1 の発現を誘導することにより Wnt シグナルを抑制することを明らかにした。（高柳）。

ウロコルチンファミリー（Ucn1, Ucn3）とそのレセプター（CRF1, CRF2）の局

在を副腎において検討した結果、Ucn1は副腎髄質に、Ucn3は副腎皮質、髄質双方に、CRF1とCRF2は副腎皮質のうち束、網状層で発現を認めた（笹野）。

ラットを用いた実験より、妊娠糖尿病では、胎児期より11 β -HSD type2の発現低下または11 β -HSD type1の発現増強により、グルココルチコイドの作用増強が生じている可能性があり、児が将来メタボリックシンドロームを発症する原因として注目される事が示唆された。グルココルチコイドを活性化する酵素11 β -HSD type1の活性低下によりグルココルチコイド抵抗性が、また活性亢進によりメタボリック症候群が発症する可能性が示唆された（大関）。

GRに直接結合しGRの機能を抑制的に調節する新規GR機能修飾因子HEXIM1を同定した。HEXIM IはGR不応症克服にむけた新たな標的分子の候補になりうるものである（田中）。

副腎アンドロゲンであるDHEAの肝臓における糖新生酵素発現抑制のメカニズムを検討した結果、糖新生酵素発現における転写共役因子PGC-1のp38MAPKによるリン酸化をDHEAが抑制することを見出した（中島）。

グルココルチコイドおよびGRの作用、感受性調節、抵抗性のメカニズムとその克服に関して、種々の新しい知見が得られた。

3) 副腎腫瘍

平成11年度から平成15年度までの5年間に報告を受けた3678例の副腎偶発腫の全国疫学調査の検討で、病因別頻度ではホルモン非産生腺腫が50.8%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10.5%、褐色細胞腫が8.5%、アルドステロン産生腺腫が5.1%、副腎癌が50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のカットオフ値は3cmが適切と考えられ、腫瘍径が3cm以上の副腎偶発腫の約4%が副腎癌で、腫瘍径が3cm未満の場合は99.7%の確立で副腎癌を否定できた。また、1年以上の経過観察があった1,311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、約3分の1が増大傾向を示した。これらの疫学調査結果をもとに、副腎偶発腫の治療・診断指針案を作成した（上芝）。

副腎皮質上皮癌細胞株SW13を用いた検討から、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が癌抑制活性を持つことがわかり、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（伊庭）。

ヒトのHDL受容体であるCLA-1の遺伝子発現が、cAMP依存性の転写因子であるPREBにより増強されることが示された。また、超音波を利用したUltrasonic microbubble destruction法による、副腎へのin vivo遺伝子導入法を開発した（村尾）。

副腎腫瘍に対する鏡視下手術は、開腹手術に比べ手術の低侵襲性、術後疼痛の軽減、早期回復、美容的な観点からも優れていることが示された（奥山）。

副腎腫瘍の診断、治療のための指針を作成すると同時に、副腎腫瘍の新たな治療標的分子の同定ならびに副腎の遺伝子治療にむけた基礎的なデータを得た。

4) 副腎性高血圧

過去5年間に原発性アルドステロン症が疑われた74例に対してACTH負荷副腎静脈採血を施行し、同手技が微小病変の特定や病変部位の的確な診断に有用であること

が示された（西川）。

ACTH 負荷副腎静脈採血における左右アルドステロン/コルチゾール比が病変局在診断に有用であることが示された（藤田）。

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おいて、1mg デキサメサゾン抑制下迅速 ACTH 負荷試験の正診率は 88% であり有用性が示された。これらの診断法を用いることにより、根治可能な副腎性高血圧の早期発見が可能になると思われる（伊藤）。

副腎皮質非機能性腺腫 30 例を検討したところ 3 例で、アルドステロン産生腺腫で高値を示すと言われている 18-hydroxycortisol および 18-oxocortisol の産生亢進がみられ、これらの症例は将来アルドステロン産生腺腫になる可能性つまり Preclinical Aldosteronism である可能性が示唆された（上芝）。

アルドステロン産生腺腫においてステロイド合成酵素の発現と NGF-IB 核内受容体ファミリーの発現との相関を検討した結果、アルドステロン合成酵素と Nurr1 の発現が、 3β -HSD type2 と NGF-IB ならびに Nurr1 が相関することが示された（武田）。

アルドステロンは心血管系組織に直接作用し組織障害的に働くことが明らかにされているが、アルドステロンの受容体である MR の発現がヒト心不全心筋で増加していること、および心不全モデル動物を用いた実験より、選択的 MR 拮抗薬であるエプレレノンにより MR の発現増加が抑制されることが示された（宮森）。

副腎性高血圧の代表的な疾患である原発性アルドステロン症の病態、診断、合併症、治療に関して新しい知見を得た。

II 分担研究報告

(1) 副腎発生・分化、ステロイド合成酵素

① Forkhead transcription factor Foxo1 の副腎における 発現・機能に関する研究

②先天性ステロイドホルモン産生異常症の新たな病因の検索

藤枝 憲二

旭川医科大学小児科

研究要旨

① Forkhead transcription factor Foxo1 の副腎における発現・機能に関する研究：Forkhead transcription factor Foxo1 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。Foxo1 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。

これまでに我々は Foxo1 がマウスでは胎児期から副腎で発現していることを見出し、*in situ hybridization* 法からは、成獣副腎髄質および副腎皮質球状層において発現していることを報告してきた。副腎における Foxo1 の機能解明を目指し、培養細胞に Foxo1 を発現させたが、ステロイド合成酵素遺伝子の mRNA に影響は認められなかった。今後もさらなる検討を加えていきたい。

②先天性ステロイドホルモン産生異常症の新たな病因の検索：先天性骨系統疾患の一つである Antley - Bixler 症候群 (ABS) は外陰部異常を伴う群と、伴わない群とに大別される。外陰部異常を伴う ABS は常染色体劣性の疾患でしばしばステロイド合成障害を合併することがこれまで報告されているがその原因は不明であった。複合型ステロイド合成障害と外陰部異常を伴う ABS 症例において P450 oxidoreductase (POR) 遺伝子変異 (複合ヘテロ変異) を世界で初めて同定した。POR に依存するミクロゾーム酵素である CYP21A2、CYP17A1、CYP19A1 などの酵素活性が低下し、これにより複合型ステロイド合成障害、外陰部異常を呈することがその病因と考えられた。

A. 研究目的

① Forkhead transcription factor Foxo1 の副腎における発現・機能に関する研究：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 Foxo1 (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、Foxo1 はインスリン・IGF-1 により phosphatidylinositol-3 (PI3) 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。

Foxo1 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、Foxo1 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。

これまでに我々は Foxo1 がマウスでは胎児期から副腎で発現していることを見出し、in situ hybridization 法による検討から、その発現の局在は成獣副腎髄質および副腎皮質球状層であることを報告してきた。副腎における Foxo1 の機能解明を目指し、培養細胞に Foxo1 を発現させ、ステロイド合成酵素遺伝子の mRNA の発現量の変化について検討する。

②先天性ステロイドホルモン産生異常症の新たな病因の検索：先天性骨系統疾患の一つである Antley - Bixler 症候群 (ABS) は外陰部異常を伴う群と伴わない群とに大別される。外陰部異常を伴わない ABS は常染色体優性の疾患で、FGFR2 のヘテロ変異が同定されている。他方、外陰部異常を伴う ABS は常染色体劣性の疾患でしばしばステロイド合成障害を合併することがこれまで報告されているが、その原因は不明である。複合型ステロイド合成障害と外陰部異常を伴う ABS 症例において新たな病因となりうる因子の同定を目指す。

B. 研究方法

① Forkhead transcription factor Foxo1 の副腎における発現・機能に関する

研究：Foxo1 の野生型および既に報告されている機能喪失型変異体、恒常的機能獲得型変異体の発現ベクターを作成した。これら3種類の発現ベクターをマウス副腎腫瘍組織由来の Y-1 細胞に対してリポフェクション法により導入し、Y-1 で発現している Cyp11B2 (P450aldo)、Cyp11b1 (11 β -OHase)、Cyp11a1 (P450scc) の3種のステロイド合成酵素 mRNA 発現レベルを定量的 RT-PCR 法により検討した。

②先天性ステロイドホルモン産生異常症の新たな病因の検索：患者のステロイドプロファイルからは 21 水酸化酵素および 17 α 水酸化酵素の複合型障害が予想されたが、これら2つの酵素には遺伝子異常は同定されなかった。また、骨病変は CYP51A1 の遺伝子異常も想定されたが、やはり異常は見出されなかった。そこで、これらミクロゾームに存在する P450 酵素の活性化に必須とされる P450 oxidoreductase (POR) に着目し、その遺伝子解析を direct sequence 法にて行った。

また、機能解析については PCR を利用した site-directed mutagenesis のキットを用いて R457H 変異を導入した発現ベクターを作成した。これを大腸菌または酵母で発現させ、既報に基づいてチトクローム C、NADPH の活性、ならびに P450c17 の酵素活性を計測した。

(倫理面への配慮)

① Forkhead transcription factor Foxo1 の副腎における発現・機能に関する研究：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。

②先天性ステロイドホルモン産生異常

症の新たな病因の検索：患者および両親に対して十分な説明を行い、インフォームドコンセントを得た後に当該遺伝子の解析を行った。

C. 研究結果

① Forkhead transcription factor Foxo1 の副腎における発現・機能に関する研究：Cyp11B2 (P450aldo)、Cyp11b1 (11 β -OHase)、Cyp11a1 (P450scc) の3種のステロイド合成酵素 mRNA 発現レベルに関して、野生型、機能喪失型変異体、恒常性機能獲得型変異体いずれにおいても明らかな変化は観察されなかった。(図1)

②先天性ステロイドホルモン産生異常症の新たな病因の検索：

1. direct sequence

患者ではPORのintron 6において731+1 G→Aの1塩基変異と、exon 11においてコドン457のアルギニンがヒスチジンに変換するミスセンス変異(R457H)をそれぞれヘテロ接合性に認めた。(図2、3、4) 両親の解析からintron 6の変異は父由来で、exon 11の変異は母由来であることが判明した。

2. 機能解析

R457H変異はチトクロームアッセイおよびP450c17アッセイの両者においてPORとしての活性が低下していることが明らかとなった。(表1)

D. 考察

① Forkhead transcription factor Foxo1 の副腎における発現・機能に関する研究：マウス Foxo1 は副腎においては胎仔期から発現していることから、副腎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。副腎における発現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關与する可能性が示唆され、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た。

このため、培養細胞を用いて Cyp11B2 (P450aldo)、Cyp11b1 (11 β -OHase)、Cyp11a1 (P450scc) の3種のステロイド合成酵素 mRNA 発現量に与える Foxo1 の影響を検討したが、明らかな変化を見出すことはできなかった。今後は、他の培養細胞等を用いてさらに詳しく検討を加えていきたい。

②先天性ステロイドホルモン産生異常症の新たな病因の検索：患者において複合ヘテロ接合性にPOR遺伝子変異を同定することができた。これら2つの変異はそれぞれ両親由来の変異であったこと、イントロン6の異常によりC端側が欠損する異常タンパクが生成されると予想されること、また、機能解析の結果からミスセンス変異は機能喪失型の変異と考えられたことからABSの原因として矛盾しない結果と考えられた。

E. 結論

① Forkhead transcription factor Foxo1 の副腎における発現・機能に関する研究：マウス副腎で発現している Foxo1 の機能に関して Cyp11B2 (P450aldo)、Cyp11b1 (11 β -OHase)、Cyp11a1 (P450scc) の3種のステロイド合成酵素 mRNA 発現量に与える影響を検討したが、明らかな変化を見出すことはできなかった。

②先天性ステロイドホルモン産生異常症の新たな病因の検索：複合型ステロイド合成障害と外陰部異常を伴うABS症例において、POR遺伝子異常を同定した。機能解析の結果からは、機能喪失型の遺伝子変異と予想されたことから新たな病

因と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fluck CE, Tajima T, Pandey AV, Arlt W, Okuhara K, Verge CF, Jabs EW, Mendonca BB, Fujieda K, Miller WL: Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley - Bixler syndrome. *Nat Genet.* 36: 228-230, 2004
2. Pandey AV, Fluck CE, Huang N, Tajima T, Fujieda K, Miller WL: P450 oxidoreductase deficiency: a new disorder of steroidogenesis affecting all microsomal P450 enzymes. *Endocr Res.* 30: 881-888, 2004
3. Tanaka T, Niimi H, Matsuo N, Fujieda K, Tachibana K, Ohyama K, Satoh M, Kugu K: Results of Long - Term Follow - Up After Treatment of Central Precocious Puberty with Leuprorelin Acetate: Evaluation of Effectiveness of Treatment and Recovery of Gonadal Function. The TAP -144- SR Japanese Study Group on Central Precocious Puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 in press.
4. Shirato H, Aoyama H, Ikeda J, Fujieda K, Kato N, Ishi N, Miyasaka K, Iwasaki Y, Sawamura Y: Impact of margin for target volume in low - dose involved field radiotherapy after induction chemotherapy for intracranial germinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 60: 214-217, 2004
5. Zimmermann MB, Hess SY, Molinari L, De Benoist B, Delange F, Braverman LE, Fujieda K, Ito Y, Jooste PL, Moosa K, Pearce EN, Pretell EA, Shishiba Y: New reference values for thyroid volume by ultrasound in iodine - sufficient schoolchildren: a World Health Organization/Nutrition for Health and Development Iodine Deficiency Study Group Report. *Am J Clin Nutr.* 79: 231-237, 2004
6. Kenji Fujieda, Jun Nakae, Tokuo Mukai: 3β - Hydroxysteroid dehydrogenase deficiency.

Encyclopedia of Endocrine Diseases.

Vol. 2, 2004 Academic Press, Elsevier Inc., San Diego, CA, pp. 498-503

7. 藤根美穂、古賀康嗣、田中敏章、田島敏広、藤枝憲二: 生物学的不活性型成長ホルモンによる低身長症の1例: ホルモンと臨床、52巻10号: 997-1001、2004
8. 蒔田芳男、岡本年男、藤枝憲二、田島敏広: 日本人集団において StAR 遺伝子変異 Q258X に創始者効果が存在するか?: ホルモンと臨床、52巻10号: 977-979、2004
9. 藤枝憲二: Lipodystrophy の遺伝子診断: *Adiposcience*、1巻2号: 180-186、2004
10. 藤枝憲二: 性腺疾患 性腺機能低下症: 小児科診療、67巻10号: 1651-1659、2004
11. 向井徳男、藤枝憲二: 副腎疾患 先天性副腎低形成症: 小児科診療、67巻10号: 1623-1629、2004
12. 田島敏広、藤枝憲二: 副腎疾患 先天性副腎過形成症: 小児科診療、67巻10号: 1617-1622、2004
13. 藤枝憲二: GPR54 と性腺機能低下症: 内分泌・糖尿病科、19巻1号: 89-97、2004
14. 藤枝憲二: ジェンダーと医学・医療 性を決定する分子メカニズム: 医学のあゆみ208巻11号: 955-961、2004
15. 藤枝憲二、向井徳男: 副腎、生殖腺の発生・分化 先天性副腎リポイド過形成症及び先天性副腎低形成症の分子病態: ホルモンと臨床、52巻冬季増刊: 120-125、2004
16. 藤枝憲二、向井徳男: 第二次性決定機構の異常症 内性器、外性器の分化異常 女性仮性半陰陽 先天性副腎過形成症: 日本臨床、62巻2号: 361-367、2004

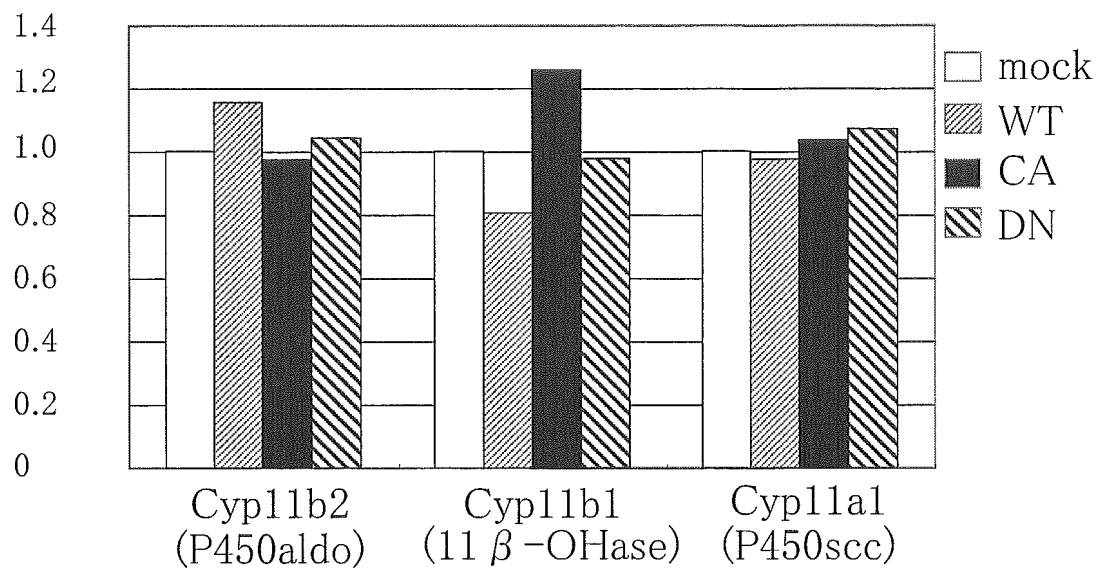
2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

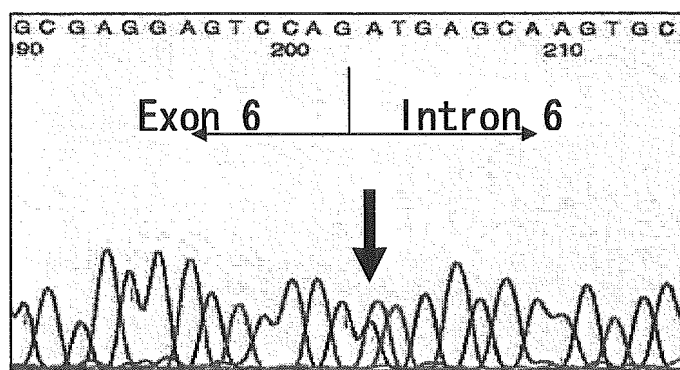
(图1) 定量的 RT-PCR



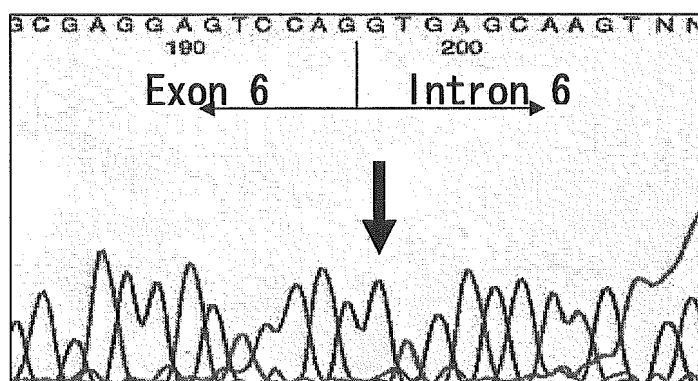
(图2) POR 遗传子解析
intron 6

mutant (paternal)

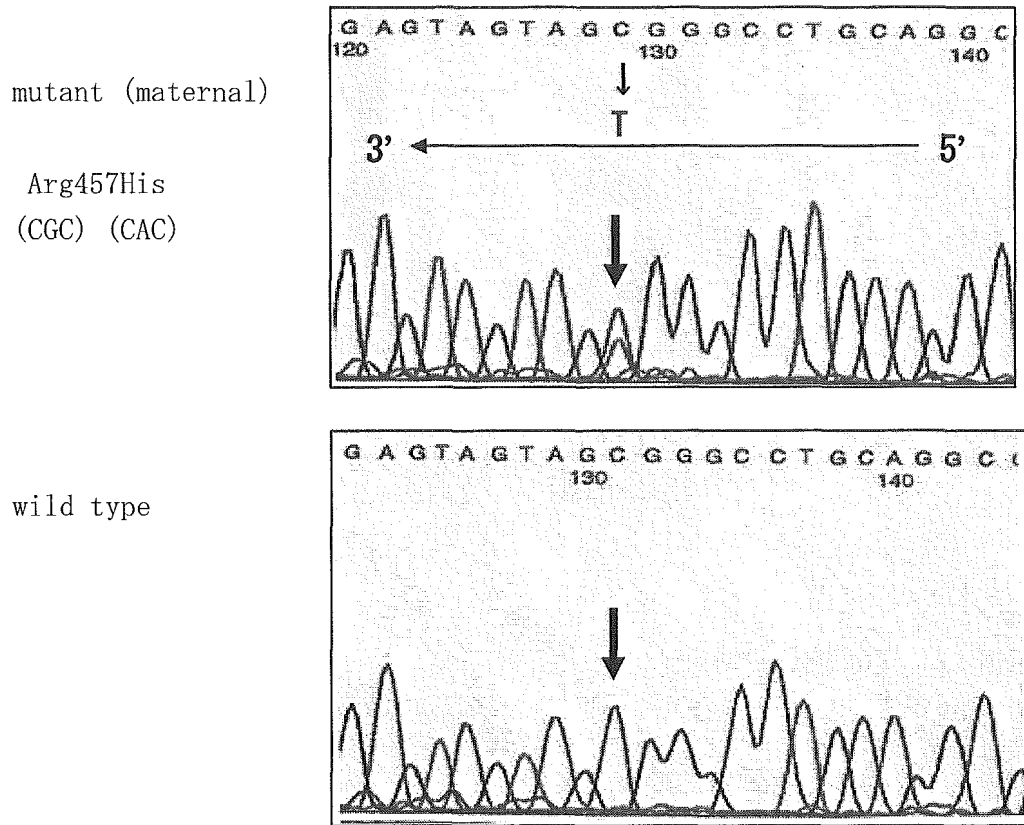
731+1 B→A



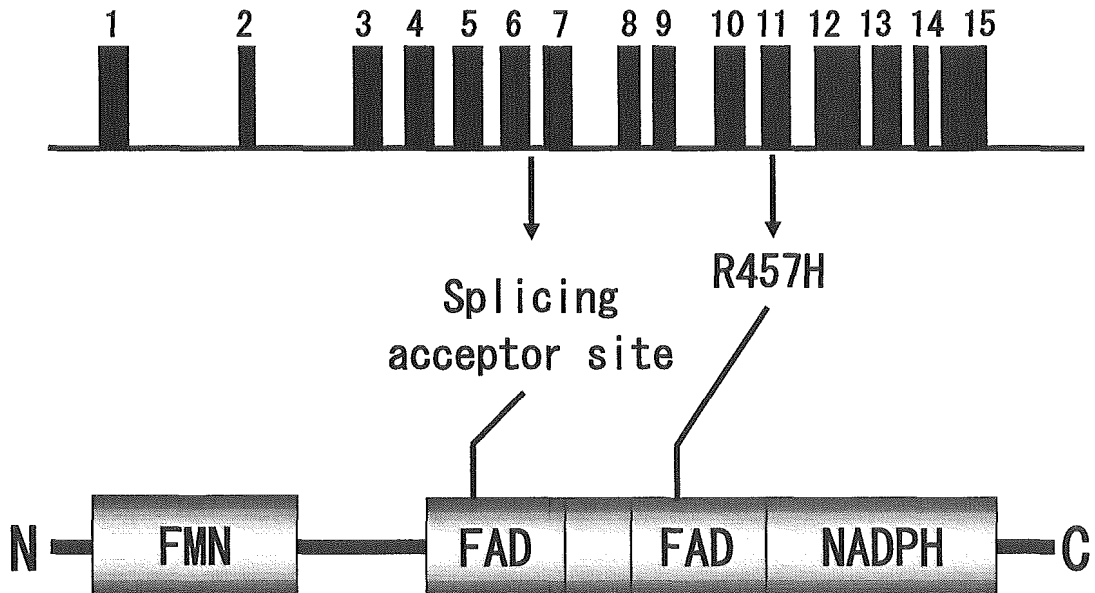
wild type



(图 3) POR 遺伝子解析 : exon11 (reverse strand)



(图 4) POR 遺伝子



(表 1) POR 活性の検討

| Cytochrome C assays | | | | | | |
|---------------------|--------------|--------------|---------|---------------|--------------|---------|
| POR | Cytochrome C | | | NADPH | | |
| | Km | Vmax | Vmax/Km | Km | Vmax | Vmax/Km |
| WT | 1.2 ±0.2 | 96.3 ±7.3 | 80 | 0.13 ±0.01 | 68.9 ±1.6 | 539 |
| R457H | 14.5 ±0.7 | 9.4 ±0.2 | 0.65 | NC | NC | NC |

| P450c17 assays | | | | | | |
|----------------|--------------------------|---------------|---------|---------------|---------------|---------|
| POR | 17 α -hydroxylase | | | 17, 20 lyase | | |
| | Km | Vmax | Vmax/Km | Km | Vmax | Vmax/Km |
| WT | 3.1 ±0.03 | 0.45 ±0.02 | 0.15 | 0.66 ±0.06 | 0.15 ±0.01 | 0.23 |
| R457H | >8 | <0.03 | NC | >10 | <0.02 | NC |

塩誘導性キナーゼ (SIK) による cAMP 依存的遺伝子の発現制御

岡本光弘

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

研究要旨：

副腎皮質細胞において ACTH シグナルの下流にある cAMP-PKA 経路は多くのステロイド合成酵素遺伝子の発現を調節する。塩誘導性キナーゼ (SIK) は高塩食を処理したラットの副腎皮質に特異的に誘導されるキナーゼとして単離したが、培養副腎皮質細胞では PKA の活性化によって誘導され、PKA で活性化される CREB 依存的な遺伝子の発現を負に制御することが明らかとなった。SIK がリン酸化する基質を検索したところ、TORC (Transducers of Regulatory Coactivators) と呼ばれる新しいグループに属する CREB 特異的転写共役因子であった。SIK が TORC をリン酸化すると TORC は核外に移行し、14-3-3 に結合する。その結果、CREB 依存性の遺伝子の転写が抑制される。

A. 研究目的

副腎皮質におけるステロイド合成酵素の遺伝子発現は主に、下垂体から分泌される副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) によって制御されている。ACTH が副腎皮質細胞の表面膜にある受容体に結合すると、細胞内 2 次メッセンジャーとして cAMP が合成される。細胞内の cAMP 濃度が上昇すると cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) が活性化され、PKA は次に標的遺伝子上流にある cAMP 応答配列 (CRE) に結合している転写因子 CREB 等の活性化を引き起こす。リン酸化された CREB は転写共役因子と結合して、その結果標的遺伝子のプロモーター活性が上昇する。

我々はナトリウムあるいはカリウム負荷をしたラットの副腎皮質において特異的に誘導される新しいセリン・トレオニンプロテインキナーゼ SIK (Salt-inducible kinase) を単離した(1)。SIK は N-末端側にキナーゼ領域を持ち、その一次構造は SNF1/AMPK ファミリーと相同性が高い。その後の研究の結果 SIK

は副腎皮質由来の Y1 細胞株を ACTH で刺激すると迅速に誘導されることが分かった。また ACTH による SIK 誘導のシグナル伝達は cAMP/PKA カスケードを介すること、SIK は cAMP/PKA で活性化された CRE を抑制するが、そのためには SIK のタンパク質リン酸化活性が必要であることも明らかになった (2)。SIK による CRE 抑制は、CREB/ATF ファミリーの転写活性を抑制することによるものである (3)。実際、Y1 細胞において SIK を高発現させると、ACTH によるステロイド合成酵素遺伝子の誘導が抑制された (2)。しかし、SIK による ACTH 依存的遺伝子発現抑制の分子機構は未だ不明瞭な点が多い。

そこで、今回は SIK によって直接的にリン酸化される基質を同定し、そのリン酸化基質の遺伝子発現制御における役割を解明することで、副腎ステロイド合成における SIK の役割を解明することを試みた。