

# 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

本年度は、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 の発現が欠失していることに注目して、この発現抑制機構を追及した。その結果、BRG1、Brm 遺伝子ともに転写は活発にされているもののその mRNA は生成されず、post-transcriptional なレベルで抑制を受けるという極めて独特な制御を受けることがわかった。Brm の発現欠失するヒト腫瘍由来細胞株についても調べたところ、やはり post-transcriptional な制御を受けていることが示され、この Brm 特異的な制御の普遍性が示された。さらに SW13 (vim-) 細胞内で外来的に Brm または BRG1 を強制発現させると軟寒天中でのコロニー形成能が著しく減少することが示され、両遺伝子が発現癌抑制活性を持つことが判明した。またヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤で SW13 (vim-) 細胞を一過的に処理することにより両遺伝子の発現を安定して誘導する事が可能であって、その結果 SW13 (vim-) 細胞のもつ発癌活性を著しく抑圧できることも示された。

## 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これまで研究を進めてきた。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。本年度は、ヒト副腎皮質上皮癌細胞株 SW13 (vim-) において、

BRG-1 と Brm の両者が発現しないことに注目し、両遺伝子の発癌における機能解析や、エピジェネティカルな変換を誘導する薬剤の検索を行って副腎癌の発癌抑制法を検討することとした。

## B. 研究方法

副腎皮質上皮癌細胞 SW13 (vim-) に対して VSV-G シュードタイプレトロウイルスを使用して、外来的に Brm 及び BRG1 遺伝子を導入してその発癌活性を軟寒天中でのコロニー形成活性で評価する。また SW13 細胞中で、post-transcriptional な制御により発現を抑制されている Brm 及び BRG1 遺伝子の発現を人為的に誘導するようなエピジェネティクス制御試薬の検索を行う。

## C. 研究結果

SW13 (vim-) 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

1) SW13 (vim-) 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。Brm の発現を欠失するヒト癌由来細胞株すべてにおいて、SW13 (vim-) と同様 Brm 遺伝子の転写が活発に起きていることが明確となり、この post-transcription レベルでの抑制が、Brm 遺伝子では普遍的におきていることが示された。また 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。

2) SW13 (vim-) 細胞に epigenetical な変換を誘導して、Brm、BRG1 を発現するようにする試薬を検索したところ、トリコスタチン A、Chap31、FK228 等の HDAC 阻害剤の一過的な処理で SW13 (vim-) 細胞は Brm 及び BRG1 遺伝子を発現する細胞へと極めて高い効率で安定して変換しうることが示された。上述の Brm 発現欠失細胞株、7 株すべてについても HDAC 阻害剤の処理により、Brm 遺伝子が安定して発現するようになった。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も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

癌抑制遺伝子である Brm が p53、Rb 等で見られるように変異をおこすことなく、また p16 のように DNA メチル化による転写抑制を受けることもなく、後転写レベルでの抑制という独特の制御を

受けることは極めて興味深い。また、これを解除する試薬を見出した事の意義は大きい。SW13 (vim-) が前年度に見出した SW13 (vim+) へと安定して epigenetical に変換できるのか、または両者に遺伝的な差があるのかについては、今後の問題である。

#### E. 結論

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 の発現が、post-transcription のレベルでエピジェネティカルに抑制されていて、この抑制は HDAC 阻害剤の一過的な処理により、長時間にわたって解除することが示された。また 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すると発癌活性を著しく低下させられることが示された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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*. 23 : 726 - 734 (2004)

Hirano, M., kikuchi, Y., Nisitani, S., Yamaguchi, A., Satoh, A., Ito, T., Iba, H. and Takatsu, K. Bruton's tyrosine kinase (Btk) enhances transcriptional co-activation activity of BAM11, a Btk-associated molecule of a subunit of SWI/SNF complexes. *International Immunology* 16 : 747 - 757 (2004)

# 副腎偶発腫・非機能性腺腫における 18-hydroxycortisol、18-oxocortisol の検討

上芝 元、山本奈津子、一城貴政  
東邦大学医学部内科学糖尿病・代謝・内分泌科

## 研究要旨

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、アルドステロン産生腺腫で高値を示すといわれている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。副腎皮質非機能性腺腫 30 例を検討したところ、3 例で高値を示した。これらの症例では将来アルドステロン産生腺腫になる可能性を考慮し、経過観察が必要と考えられた。臨床的に副腎皮質非機能性腺腫と診断した症例の中にも、preclinical aldosteronism と考えられる症例が潜んでいる可能性を示した。

### A. 研究目的

アルドステロン産生腺腫で高値を示すといわれている 18-hydroxycortisol (18-OHF) 及び 18-oxocortisol (18-OXOF) の発現を、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、検討した。昨年度の検討で、非機能性腺腫 20 例のうち 3 例が高値を示した。今年度は高値を示した 3 例の経過観察と新規症例 10 例を検討した。

### B. 研究方法

副腎皮質非機能性腺腫 30 例 (男性 17 例、女性 13 例、平均年齢 56.5 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、<sup>131</sup>I-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。アルドステロン産生腺腫は 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 例で正常対照群より 2~3 倍の高値を示した (平均値: 尿中 18-OHF 169.0 vs 64.9 ng/day、血中 18-OHF 2.67 vs 0.98 ng/ml、尿中 18-OXOF 3.70 vs 1.40 ng/day、血中 18-OXOF 0.15 vs 0.060 ng/ml)。アルドステロン産生腺腫群の平均値は、正常対照群の平均値の 4~5 倍の高値を示した (平均値: 尿中 18-OHF 265.0 ng/day、血中 18-OHF 4.50 ng/ml、尿中 18-OXOF 6.81 ng/day、血中 18-OXOF 0.

30 ng/ml)。これら3例は、1年後の再測定においても同様に高値を示した。しかし、臨床的にアルドステロン産生腺腫の兆候はみられていない。

#### 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30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症例を見ると、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、1年間の経過観察上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、将来アルドステロン産生腺腫となることも、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、今後さらなる経過観察が必要と考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ueshiba H, Miyachi Y : Effect of the long-acting calcium channel blockers,

amlodipine, manidipine and cilnidipine on steroid hormones and insulin resistance in hypertensive obese patients. *Internal Medicine* 43 (7) : 561 - 565, 2004

- 2) 一城貴政、山本奈津子、上芝 元、宮地幸隆 : Adrenal incidentaloma in Japan. -平成11～13年度調査結果より-ホルモンと臨床 (冬季増刊号 : ステロイドホルモン研究の進歩 2003) 52 : 160 - 168, 2004 13 : 237 - 241, 2003

- 3) 一城貴政、山本奈津子、上芝 元、宮地幸隆 : 副腎偶発腫瘍の疫学。ホルモンと臨床 52 : 43 - 53, 2004

- 4) 中園奈津子、上芝 元、宮地幸隆 : DHEAと耐糖能異常・基礎的検討。医学と薬学 51 : 335 - 341, 2004

- 5) Mizuno H, Ohro Y, Sugiyama Y, Ito T, Hasegawa T, Homma K, Ueshiba H, Ono M, Togari H : Transient hyper-17-OHP nemia unrelated to cross-reactions with residual fetal adrenal cortex products. *Hormone Research* 61 : 242 - 245, 2004

- 6) 上芝 元、芳野 原 : 更年期と脂質代謝。臨床病理 (レビュー特集 シリーズ女の一生と臨床検査) 131 : 125 - 130, 2004

- 7) 石川真由美、上芝 元、芳野 原 : クッシング症候群の早期診断。日本医事新報 第4208号 : 1 - 7, 2004

- 8) 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 : 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-

厚生労働科学研究費補助金 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 平成15年度研究報告書 : 83 - 86, 2004

- 9) 上芝 元、一城貴政、山本奈津子 : 副腎偶発腫の全国調査報告。厚生労働科学研究費補助金 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 平成15年度研究報告書 : 117 - 119, 2004

- 10) 上芝 元 (分担) : 内分泌検査 (ホルモン年齢)。アンチエイジング医学の基礎と臨床 日本抗加齢医学会専門医・指導士認定委員会編 p.145 - 146, メジカルビュー社、東京、2004

- 11) 上芝 元 (分担) : 合成ステロイド薬 (プレドニゾン)。臨床に直結する内分泌・代

謝疾患治療のエビデンス (阿部好文、西川哲男 編) p. 113-115, 文光堂、東京、2004

## 2. 学会発表

1) ○ Ueshiba H, Ishikawa M, Nagasawa K, Yamamoto N, Ichijo T, Tsuchida Y, Hiroi N, Shimojo M, Tsuboi K, Yoshino G : 18 - hydroxycortisol and 18 - oxocortisol in non - functioning adrenocortical adenoma. 12th International Congress of Endocrinology, Lisbon, 2004, 9

2) ○ Ishikawa M, Kimura K, Tachibana T, Akishima Y, Shimojo M, Ueshiba H, Tsuboi K, Nakata K, Akasaka Y, Shibuya K, Yoshino G : A novel cell line derived from a human small cell lung carcinoma that secretes PTH, PTH - related protein, and proopiomelanocortin. 12th International Congress of Endocrinology, Lisbon, 2004, 9

3) ○ Tsuboi K, Shimojo M, Yamamoto N, Nagasawa K, Nakano S, Ishikawa M, Ueshiba H, Yuasa R, Yoshino G : TSH receptor autoantibody assay using receptor coated tubes (TRAb CT) : A study of relapse prediction in Graves' disease during remission. 12th International Congress of Endocrinology, Lisbon, 2004, 9

4) ○上芝 元、芳野 原 : アンジオテンシン II 受容体拮抗薬カンデサルタンのインスリン抵抗性及び副腎アンドロゲンに対する佐用。第 101 回日本内科学会、東京、2004, 4

5) ○上芝 元、芳野 原 : 2 型糖尿病における DHEA, DHEA - S と酸化ストレスマーカーとの関係。第 47 回日本糖尿病学会、東京、2004, 5

6) ○上芝 元、芳野 原 : 高齢者 2 型糖尿病における酸化ストレスマーカーと DHEA の関係について。第 4 回日本抗加齢医学会、東京、2004, 6

7) ○上芝 元、山本奈津子、長澤 薫、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 : 副腎皮質非機能性腺腫における 18 - hydroxycortisol, 18 - oxocortisol の検討。第 77 回日本内分泌学会学術総会、京都、2004, 6

8) ○上芝 元、山本奈津子、一城貴政 : 副腎偶発腫の全国調査。第 12 回日本ステロイドホルモン学会、大阪、2004, 11

9) 中野三郎、森田 宏、石川真由美、上芝元、坪井久美子、芳野 原 : 当科にて経験した原発性アルドステロン症の 1 例。東京内科医学会第 153 回臨床研究会、東京、2004, 12

## 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	腫瘍の大きさ
1	52	男	24.8	132/72 130/72	138/3.9 136/3.7	24.5/9.8 26.5/9.7	83.5/0.91 72.5/0.85	2.9/0.17 2.8/0.18	192/4.2 185/4.5	右・25mm 右・25mm
2	55	男	25.2	138/80 136/78	140/3.8 138/3.7	32.4/8.9 28.7/9.1	72.4/0.72 84.5/0.81	2.6/0.15 2.4/0.18	181/3.5 174/3.9	左・19mm 左・20mm
3	48	女	24.3	130/72 128/70	139/4.0 138/3.9	29.3/9.2 32.5/8.7	65.3/0.81 82.3/0.90	2.5/0.13 2.7/0.12	134/3.4 130/3.2	右・22mm 右・22mm

Na/K : mEq/l, ACTH : pg/ml, F :  $\mu$ 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

上段 : 発見時のデータ、下段 : 1年後のデータ

# ホルモン産生副腎腫瘍に対する外科的治療の検討

吉村一宏、奥山明彦

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）

## 研究要旨

2004年までに当科で施行したホルモン産生副腎腫瘍に対する外科的治療について鏡視下手術症例と開腹手術症例について検討した。大きな褐色細胞腫や副腎癌症例では、従来からの開腹術が適応となる場合もあるものの、最近の症例では、そのほとんどが鏡視下に摘除されており、現在ではホルモン産生副腎腫瘍の外科的治療のGolden Standardとなった印象がある。手術手技も標準化してきており、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推奨されるべき手技であると考えられた。

### A. 研究目的

ホルモン産生副腎腫瘍、特に原発性アルドステロン症、褐色細胞腫に対する外科的治療としての鏡視下手術の有用性と安全性について開腹手術症例との比較検討をおこなった。

### B. 研究方法

対象は2004年12月までに当科で外科的治療を施行された原発性アルドステロン症（全てアルドステロン産生腺腫）63例および副腎褐色細胞腫9例で、1990年2月から2004年12月の間に施行された開放手術による13例（男性7例、女性6例）と1992年9月から2004年12月の間に施行された鏡視下手術による59例（男性39例、女性20例）である。これらの症例について手術時間、出血量、経口摂取・歩行開始時期、鎮痛剤使用量、術後在院日数について比較検討した。また鏡視下手術例において治療成績を検討し、特に合併症について詳細な検討を加えた。次に、鏡視下副腎摘除術を施行された症例のうち、術後2ヶ月以上の期間、経過をfollowできた39例（男性19例、女性20例）を対象として、術後降圧剤を必要

とする高血圧症持続症例について検討を行った。術前施行検査としてCT、副腎シンチ、静脈サンプリング、生食負荷試験、カプトリル負荷試験、フロセミド立位負荷試験を行い、各症例における術前検査施行率、術前・術後のホルモン動態などについて詳細な検討を加えた。

（倫理面での配慮）術前に患者に対して十分なインフォームド・コンセントを得て本術式を施行した。

### C. 研究結果

平均手術時間は鏡視下手術に比べ開放手術の方が短かったが、その他のパラメーター（平均出血量、経口摂取・歩行開始時期、鎮痛剤使用量、術後在院日数）において鏡視下手術が有意に優れていた（表1）。平均手術時間は220分であるが、開始当初に長時間を要していたため、最近ではほとんど全て180分以内で手術を終了している。また平均出血量においても同様で、最近ではほとんど出血なしで手術は行われている。鏡視下手術における合併症は59例中5例（9.4%）で全例術中・術後の出血であった。また5例中3例は右側の症例で肝下面癒着を原因とし、

肝損傷によるものであった。しかし、最近9年間は合併症を認めていない。次に、鏡視下副腎摘除術を施行された59例中、術後2ヶ月以上の期間、経過をfollowできた39例における術前検査施行率および診断率では、CTや副腎シンチの施行率は高いが、静脈サンプリングや各種負荷試験の施行率は低かった。また副腎シンチの診断率は低い傾向を示した。原発性アルドステロン症症例では、血漿アルドステロン濃度は術後全例正常値を示し、血漿レニン活性もほとんどの症例で回復していた。しかし術後降圧剤服用を必要とした症例を10例(25.6%)認めた。これらの症例においてホルモン動態には明らかな差を認めなかったが、10例中8例が男性であり、平均年齢は64.3歳で全体の50.1歳に比べ明らかに高い傾向を示した。また術後高血圧持続症例は負荷試験検査を含め、術前の未施行検査が多い傾向を示した。褐色細胞腫症例では、大きな腫瘍に対しては開腹術が適応になるが、開腹術群と鏡視下手術群で手術時間に大きな差はなく、鏡視下手術群のほうが術中出血量は有意に少なく、術後の回復も早かった(表2)。

#### D. 考察

今回の研究結果より、ホルモン産生副腎腫瘍に対する鏡視下手術は開腹手術に比べ手術時間がやや長くなる傾向がみられた。しかし、最近の症例では鏡視下手術でも3時間前後で手術が終了する症例がほとんどで、開腹手術に比べ遜色ない結果となっている。さらに、鏡視下手術では術中出血量が開腹術症例に比し有意に少なく、術後の鎮痛剤使用回数も有意に減少し、術後の歩行開始、摂食開始が有意にはやくなっていた。また、鏡視下手術では、皮膚に径約0.5~1cmの切開

を3~4カ所加えるだけで施行可能であり、美容的な観点からも患者にとって大きな利点であると考えられた。また以前は開腹手術でも、術前術中および術後の管理が困難であるとされてきた褐色細胞腫症例においてもわれわれの経験では、腫瘍径が5cmまでくらいのものであれば鏡視下手術でも十分に施行できると考えられた。しかし、腫瘍径が大きな症例や副腎癌症例では従来からの開腹術が第一適応になるものと考えている。

#### E. 結論

腫瘍の大きさなどの適応を正しく検討し、鏡視下手術に精通した外科医がおこなえば、鏡視下手術は安全で非常に有用な術式であり、手術時間も開腹術に遜色なく現在のGolden Standardと考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 吉村一宏、奥山明彦：「副腎」疾患別術前・術後の管理. 改訂版 内分泌外科標準手術アトラス, pp219-229, インターメルク, 2003.
2. 三宅 修、木内 寛、吉村一宏、奥山明彦:Robotic Surgery …… 腹腔鏡下副腎摘出術 内分泌外科 21, 99-105, 2004.

##### 2. 学会発表

1. 内分泌腫瘍に対する鏡視下手術 「副腎」 三宅 修、吉村一宏、垣本健一、辻畑正雄、高原史郎、奥山明彦 第14回日本内分泌外科学会総会ビデオシンポジウム 2002 大阪
2. 当科における内視鏡下副腎摘除術の検討 辻畑正雄、鄭 則秀、辻川浩三、吉村一宏、三宅 修、奥山明彦 第15回日本内分泌外科学会総会 2003 京都



3. 当科における原発性アルドステロン症 63  
 例に対する臨床的検討 辻畑 正雄、吉村  
 一宏、辻川 浩三、鄭 則秀、奥山 明彦  
 第 16 回 日本内分泌外科学会総会 2004  
 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況  
 なし

表 1 鏡視下手術と開放手術の比較

	鏡視下手術 N = 59	開放手術 N = 13	P value
平均手術時間 (分)	220	133	0.0040
平均出血量 (ml)	95	299	0.0021
経口摂取 (日)	1.8	2.3	0.0011
歩行開始 (日)	2.1	4.0	<0.0001
鎮痛剤 硬麻 (日)	1.0	2.7	<0.0001
NSAID (mg)	42.1	98.9	0.0018
術後在院日数 (日)	9.8	13.3	0.0022

表2 褐色細胞腫における鏡視下手術と開放手術の比較

	鏡視下手術 N = 6	開放手術 N = 3
腫瘍径 (cm)	4.7	7.7
平均手術時間 (分)	256	310
平均出血量 (ml)	220	580
経口摂取 (日)	1.3	4.0
歩行開始 (日)	2.3	3.3

## 副腎皮質腫瘍と NGFIB 核内受容体ファミリー

宗 友厚、諏訪哲也、村松 学、武田 純  
岐阜大学大学院医学系研究科内分泌代謝病態学分野

### 研究要旨

副腎皮質組織の NGFIB 核内受容体ファミリー mRNA 発現量をリアルタイム PCR・competitive RT-PCR 法にて定量し、アルドステロン合成酵素 (B2)・17 $\alpha$ 水酸化酵素 (C17)・3 $\beta$ -HSD タイプ 2 (3 $\beta$  HSD) 発現量や臨床指標との関連を検討した。NGFIB は正常副腎 (N; n=12) 131  $\pm$  42 ( $\times 10^{-3}$ ;  $\pm$  SE) / アルドステロン産生副腎腺腫 (APA; 26 例) 469  $\pm$  162 / Cushing 症候群副腎腺腫 (CS; 22 例) 135  $\pm$  32、と APA は N・CS より高値。Nurr1 は N12.0  $\pm$  5.9 / APA94.2  $\pm$  36.8 / CS10.9  $\pm$  3.5、と APA は N・CS より高値。Nor1 は N323  $\pm$  191 / APA104  $\pm$  43 / CS20  $\pm$  6 と CS は N より低値であった。回帰分析では、N 群の 3 $\beta$  HSD が Nor1 と、APA 群の 3 $\beta$  HSD が NGFIB と Nurr1、B2 が Nurr1 と、CS の尿中遊離コルチゾールが Nor1 と正相関した。APA では、B2 過剰発現が Nurr1 増加による可能性、3 $\beta$  HSD 発現増加が NGFIB と Nurr1 増加による可能性、が示唆される。

### A. 研究目的

副腎皮質腫瘍はいわゆる良性の腫瘍が多く、その発生メカニズムは現時点では全く不明と云わざるを得ないが、内分泌腺腫瘍の中では臨床的にも比較的頻繁に遭遇する疾患群であり、非内分泌組織に比べ様々なステロイドホルモンの過剰産生をきたす機能性腫瘍が多い点の特徴である。機能性を獲得する原因の一つは腫瘍部における特異的なステロイド合成酵素の発現異常であり、アルドステロン産生腺腫 (APA) ではアルドステロン合成酵素 CYP11B2 の過剰発現を、Cushing 症候群をきたすコルチゾール産生腺腫 (CS) では 17 $\alpha$ 水酸化酵素 CYP17 の過剰発現をきたすことにより、腫瘍特異的なホルモン産生異常に至ると考えられてきた。腫瘍中のステロイド合成酵素遺伝子自身の異常は見出されておらず転写レベルの異常と考えられることから、ステロイド合成酵素遺伝子のプロモーター領域に結合する核内オーファン受容体や転

写共役因子の量的或いは質的な異常が想定される。したがって、上流に位置する転写因子群の量的な変動がステロイド合成酵素遺伝子群の発現、ひいては疾患表現型に関連するかどうかをまず明らかにする必要がある。昨年度は CYP11B2、11 $\beta$ 水酸化酵素 CYP11B1 及びステロイド合成酵素発現に必須の転写因子とされる Ad4BP/SF1 (adrenal 4-binding protein/steroidogenic factor) について、各々の発現レベルの相互の関係や遺伝子多型との関連について報告した。今年度は、ステロイド合成酵素の転写調節や細胞増殖への関与が示唆される NGFIB 核内受容体ファミリーに着目した。本ファミリーは、nerve growth factor-induced clone B (NGFIB; NR4A1)、Nur-related factor 1 (Nurr1; NR4A2)、neuron-derived orphan receptor (Nor1; NR4A3) の 3 つの核内受容体からなり、いずれも NGFIB response element と呼ばれる配列 (AAAGGTCA) に結合し種々

遺伝子の転写調節に携わっており、特に最近 CYP11B2<sup>1)</sup> や 3 $\beta$  水酸化ステロイド脱水素酵素 HSD3B2<sup>2)</sup> の転写を正に調節することが示され、ステロイド合成とのリンクが注目されている。今回の研究では、正常副腎、APA、CS 組織中の NGFIB ファミリー mRNA 発現レベルを定量し、ステロイド合成酵素遺伝子発現との関連、APA・CS 患者の臨床データとの関連、などについて検討した。

## B. 研究方法

### 1. 対象

1992 年から 2002 年までの間に岐阜大学医学部附属病院および関連病院にて片側副腎摘出術を受けた APA 患者 26 例（男性 10 例 / 女性 16 例、25 ~ 58 歳）および CS 患者 22 例（男性 1 例 / 女性 21 例、24 ~ 59 歳）の腺腫組織、腎癌手術時に得た正常副腎組織（N；n=12）を対象とした。各組織は摘出後速やかに -80°C で冷凍保存した。なお、対象患者からはいずれも予め書面でインフォームドコンセントを得た。血清電解質やホルモン測定は、早朝空腹時にそれぞれ 30 分以上の仰臥位を保った後に採血した。血漿レニン活性、血漿アルドステロン濃度、24 時間尿中アルドステロン排泄量、血漿 ACTH、コルチゾール、および 24 時間尿中遊離コルチゾール排泄量は市販の RIA キットを用い測定した。

### 2. ステロイド合成酵素遺伝子・NGFIB 核内受容体ファミリーの mRNA レベル定量

凍結組織から total RNA を抽出し、DNase 処理後、逆転写反応に供し cDNA サンプルを得た。昨年の本班会議報告書<sup>3)</sup> に記載した如く、CYP11B1、CYP11B2 と glyceraldehyde 3 -

phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA レベルは PCR MIMIC™ KIT (Clontech) を用いた競合的 PCR 法により定量した。NGFIB (GeneBank Accession # NM\_002135) は 5' - GAA GGA AGA TGC TGG GGA TGT - 3' (s, nt 1299 - 1319) & 5' - ATG AGG ACA AGG GCA GAG AGG - 3' (as, nt 1626 - 1646)、Nurr1 (NM\_006186) は 5' - TCT GAT CAG TGC CCT CGT C - 3' (s, nt 1424 - 1442) & 5' - TGG GTT GGA CCT GTA TGC T - 3' (as, nt 1688 - 1706)、Nor1 (NM\_006981) は 5' - TGG TCT GTC AAC TAG TCC AAC C - 3' (s, nt 4635 - 4656) & 5' - CAA GGT CAA ACA GCT GGT AAC A - 3' (as, nt 4711 - 4732)、CYP17 (NM\_000102) は 5' - TCT CTG GGC GGC CTC AA - 3' (s, nt 338 - 354) & 5' - AGG CGA TAC CCT TAC GGT TGT - 3' (as, nt 380 - 400)、HSD3B2 (NM\_000198) は 5' - GCC AGT GTG CCA GTC TTC ATC - 3' (s, nt 486 - 506) & 5' - GCC AGC ACA GCC TTC TCA GC - 3' (as, nt 627 - 646)、GAPDH (NM\_002046) は 5' - TCA TCA TCT CTG CCC CCT CTG CTG - 3' (s, nt 431 - 454) & 5' - GAC GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG - 3' (as, nt 849 - 872)、の各プライマーを用いてリアルタイム PCR 法 (Roche 社 LightCycler を使用) により定量した。またスタンダードとしては、各々のターゲットに対するフラグメントを精製、Agilent 社の BioAnalyzer を用いて定量しコピー数を算出、 $10^7 \sim 10^2$  copies/ $\mu$ l の範囲の標準曲線を使用した。なお DNase 処理や逆転写効率の違いによるサンプル間のばらつきを最小限にするため、mRNA レベルは housekeeping gene の一つである GAPDH の mRNA レベルに対する比と

して算出した。データは mean  $\pm$  SE で表示し、2群間の差は Mann Whitney の U 検定を用いて、2変数間の関係は直線回帰を用いて評価した。

## C. 研究結果

### 1. NGFIB ファミリー mRNA の発現レベル (図 1)

正常副腎における NGFIB、Nurr1 および Nor1 の mRNA 発現量は、GAPDH mRNA 発現量のそれぞれ約 13%、1.2% 及び約 32% であった。NGFIB の mRNA 発現量は、 $N131 \pm 42$  ( $\times 10^{-3}$ ;  $\pm$  SE)、 $APA469 \pm 162$ 、 $CS135 \pm 32$  であり、APA では N $\cdot$ CS より高値 ( $P=.033 \cdot P=.004$ ) であった。Nurr1 の mRNA 発現量は、 $N12.0 \pm 5.9$ 、 $APA94.2 \pm 36.8$ 、 $CS10.9 \pm 3.5$  であり、APA では N $\cdot$ CS より高値 ( $P=.002 \cdot P<.001$ ) であった。Nor1 の mRNA 発現量は、 $N323 \pm 191$ 、 $APA104 \pm 43$ 、 $CS20 \pm 6$  であり、CS では N より低値 ( $P=.006$ ) であった。これらの平均値を用いて、図 1 に相対的な量的関係を示した。

### 2. NGFIB ファミリー $\cdot$ ステロイド合成酵素発現の相関

正常副腎においては、HSD3B2 mRNA 発現量は Nor1 mRNA 発現量と正相関 ( $P=.001$ ) したが、NGFIB や Nurr1 とは有意な相関はなかった。CYP17 や CYP11B1 も本ファミリーとは有意な直線相関は認めなかったが、CYP11B2 mRNA 発現量は Nurr1 mRNA 発現量と正に相関する傾向 ( $P=.07$ ) を認めた。(図 2)

APA 組織においては、HSD3B2 mRNA 発現量は NGFIB 及び Nurr1 mRNA 発現量と正に相関 ( $P<.001$  及び  $P=.025$ ) したが、Nor1 とは有意な相関は

なかった。CYP17 や CYP11B1 も本ファミリーとは有意な直線相関は認めなかったが、CYP11B2 mRNA 発現量は Nurr1 mRNA 発現量と正に相関 ( $P=.049$ ) した。(図 3)

CS 組織においては、HSD3B2 mRNA 発現量は Nor1 mRNA 発現量と正相関する傾向 ( $P=.025$ ) を示したが、NGFIB や Nurr1 とは有意な相関はなく、CYP17 も本ファミリーとは有意な直線相関は認めなかった。(図 4)

### 3. NGFIB ファミリー発現と臨床データとの関連

APA 群については、血漿レニン活性、血漿アルドステロン濃度、24 時間尿中アルドステロン排泄量のいずれの指標も、本ファミリー mRNA 発現量との有意な相関は見られなかったが、CS 群の血漿コルチゾールおよび 24 時間尿中遊離コルチゾール排泄量は Nor1 mRNA 発現量と有意に正相関し (図 5)、図には示さないが尿中 17OHCS ( $r=.73$ ,  $P=.0001$ ) も正相関した。

## D. 考察

NGFIB ファミリーの発現量や発現動態には heterogeneity があることが判明した。

正常副腎の発現量は Nor1>NGFIB>Nurr1 の順であった。量的に多い Nor1 発現量がかかなり HSD3B2 発現量と正相関する、との今回の結果を単純に解釈すれば、正常副腎では Nor1 が HSD3B2 発現を規定する主因子である、とも云える。NGFIB についての最近の報告<sup>2)</sup>では、NGFIB が HSD3B2 の転写を直接制御することが示されている。今回の検討でも直線回帰では有意ではないものの、べき乗回帰では NGFIB は HSD3B2 に対して

有意な相関 ( $P=.0039$ , vs. *Nor1*;  $P=.0035$ ) を示しており、Bassett らの報告<sup>2)</sup>を臨床的な観点から支持するものである。今回の結果からは *Nor1* の方が影響が大きいことが予想されるが、*Nor1* が *HSD3B2* 転写に与える効果は未だ報告されておらず、*in vitro* の系での確認が必要と考えられる。さらに *CYP11B2* 発現については、*Nurr1* が正相関する傾向 (べき乗回帰では  $P=.051$ ) が見られた。正常副腎では *NGFIB* や *Nor1* に比べて発現量は少ないが、後述の APA での相関も考慮すると、報告された *in vitro* での検討<sup>1)</sup> の如く *CYP11B2* の発現調節にかなり影響を与えることが予想される。

APA での発現量は  $NGFIB > Nurr1 \approx Nor1$  であった。*NGFIB* のみならず *Nurr1* 発現も正常副腎に比べ有意に増加していた。正常副腎に比べ高い傾向 ( $P=.055$ ) にある *HSD3B2* は、*NGFIB* と強く正相関し、*Nurr1* とも有意に正相関した。さらに APA で過剰発現している *CYP11B2* は、*Nurr1* と有意に正に相関 (べき乗回帰でも  $P=.014$ ) し、*NGFIB* ともべき乗回帰では有意に相関 ( $P=.028$ ) していた。ヒト副腎や APA における *NGFIB*・*Nurr1* の免疫組織学的検討を行った最近の Lu らの報告<sup>4)</sup> では、*NGFIB*・*Nurr1* が APA 腫瘍細胞の核に濃染することが明らかに示されており、今回の結果とあわせ両者が *in vivo* においても *CYP11B2* 転写を調節し、過剰発現の一因となっている可能性が高い。

一方、CS 組織においては、*NGFIB*・*Nurr1* 発現量は正常副腎と同程度であったが、*Nor1* 発現量は明らかに低下していた。*Nor1* 発現は *HSD3B2* 発現と正に相関する傾向を認めたが、*Nor1* のレベル自体が低いことを考えると、あまり意義は無いのかもしれない。なお今回の検

討では、少なくとも単位組織あたりの *HSD3B2*・*CYP17* 発現量は正常副腎とほぼ同程度であった。例数は少ないが CS の付随副腎 2 例では確かにいずれの発現量も低く、腫瘍の容積も考慮する必要はあるが、*CYP17* mRNA の過剰発現が必ずしも見られるわけでは無さそうである。

*NGFIB* ファミリー発現量と臨床所見すなわち表現型との関連について、APA 患者では血中・尿中レベルでみたアルドステロン分泌量との相関は検出されなかった。CS 患者では、血中・尿中コルチゾールレベルは *Nor1* と正に相関したが、CS 組織では *Nor1* はかなり減少していることを考えると、コルチゾール産生を増加させる別の因子により *Nor1* 発現が調節される可能性なども考えられる。

本稿では詳しく述べなかったが、*DAX-1*、*COUP-TF1*、*SF1* などを更に説明変数に加えたプレリミナリーな検討 (stepwise regression analysis) では、例えば、正常副腎における *CYP17* 発現に影響する転写因子として *DAX-1* が、しかも正の相関を示す変数として検出されており、*SF1* の作用を抑制すると云う *in vitro* での成績とは矛盾した結果となっている。現実にはその場には複数の転写因子が存在することを考えると、ステロイド合成酵素の個々の転写因子による調節様式のみならず相互の関連、転写因子群のレパートリーが量的にどの様に変動しているのか、非常に興味のある所である。と同時に、どの様な手法で総合的な解析を進めれば良いのか、統計的な手法も含め方法論的な壁にぶち当たっている様にも感じられる。

## E. 結論

APA では、*CYP11B2* の過剰発現が *Nurr1* 増加による可能性、*HSD3B2* の発

現増加が NGFIB と Nurr1 増加による可能性、が示唆される。

#### [参考文献]

1. Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC, Rainey WE. The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production. *Mol Endocrinol.* 18 : 279 - 290, 2004.
2. Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, de Vries CJM, Jimenez PT, Carr BR, Rainey WE. The orphan nuclear receptors NGFIB regulates transcription of  $3\beta$  - hydroxysteroid dehydrogenase : Implications for the control of adrenal functional zonation. *J Biol Chem.* 279 : 37622 - 37630, 2004.
3. 宗友厚, 諏訪哲也, 武田純. CYP11B2 の遺伝型～表現型相関 : 正常副腎・原発性アルドステロン症における検討 副腎ホルモン産生異常に関する研究班 平成 15 年度研究報告書 58 - 65, 2004.
4. Lu L, Suzuki T, Yoshikawa Y, Murakami O, Miki Y, Moriya T, Bassett MH, Rainey WE, Hayashi Y, Sasano H. Nur - related factor 1 and nerve growth factor - induced clone B in human adrenal cortex and its disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 89 : 4113 - 4118, 2004.

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shimamoto Y, Ishida J, Yamagata K, Saito T, Kato H, Matsuoka T, Hirota K, Daitoku H, Nangaku M, Yamagata K, Fuji H, Takeda J, Fukamizu A. Inhibitory effect of small heterodimer partner hepatocyte nuclear factor - 4 mediates bile acid - induced repression of human angiotensinogen gene. *J Biol Chem* 279 : 7770 - 7776, 2004.
- 2) Kim Y, Kim HJ, Seong HA, Park KC, Sanyal S, Takeda J, Ha H, Shong M, Tsai MJ, Choi HS. Orphan nuclear receptor SHP, a novel corepressor for a basic Helix - Loop - Helix (bHLH) transcription factor BETA2/NeuroD. *Mol Endocrinol* 18 :

776 - 790, 2004.

- 3) Shihara N, Horikawa Y, Onishi T, Ono M, Kashimada K, Takeda J. Identification of a de novo case of hepatocyte nuclear factor - 1  $\beta$  mutation with highly varied phenotypes. *Diabetologia* 47 : 1128 - 1129, 2004.
- 4) Enya M, Kanoh Y, Mune T, Ishizawa M, Sarui H, Yamamoto M, Takeda N, Yasuda K, Yasujima M, Tsutaya S, Takeda J. Depressive state and paresthesia dramatically improved by intravenous MgSO<sub>4</sub> in Gitelman's syndrome. *Intern Med* 43 (5) : 410 - 414, 2004.
- 5) 武田 純 : 糖尿病. ヒトゲノム 生命システムの理解と医学への展開 榊 佳之他編集 中山書店 258 - 265 (2004)
- 6) 宗友厚, 諏訪哲也, 武田純 : アルドステロンの基礎と臨床 Apparent Mineralocorticoid Excess 症候群の現況 ホルモンと臨床 52 (8) : 101 - 107, 2004.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 特になし。

図1. 正常副腎, APA, CS における NGFIB ファミリーの相対的発現量

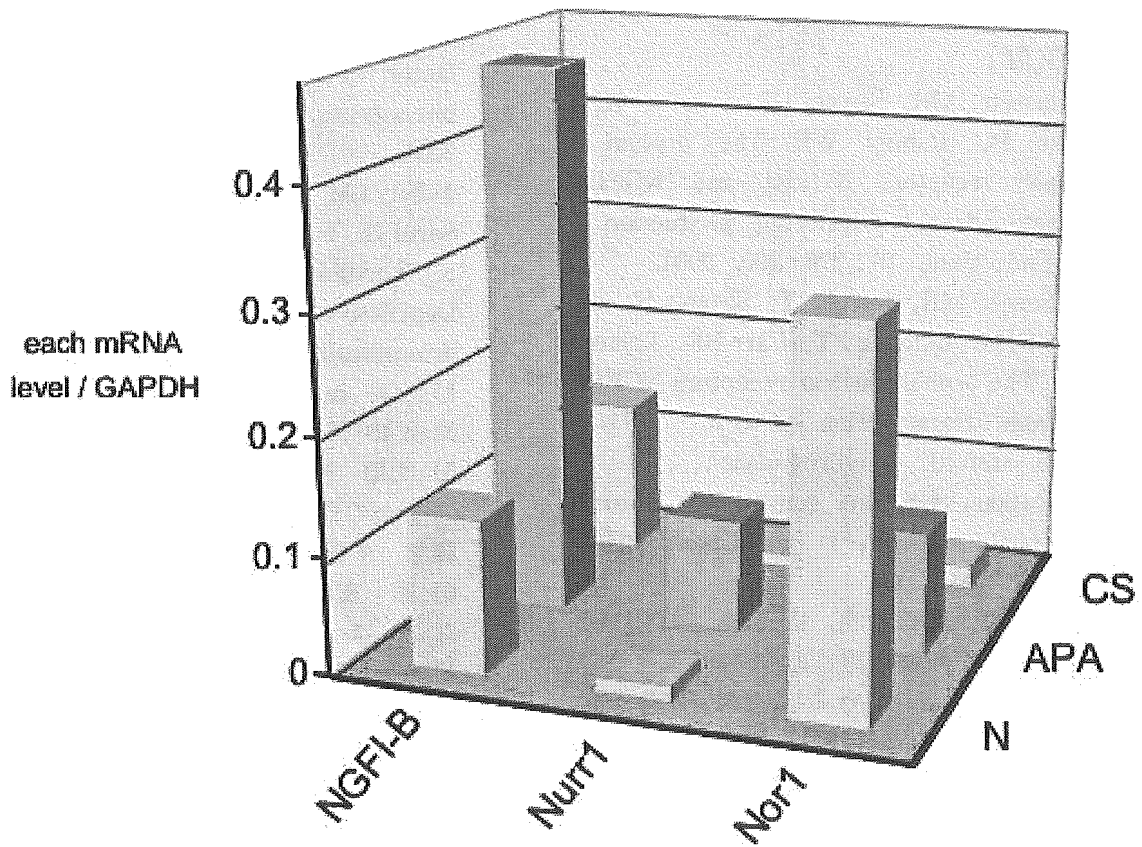


図2. 正常副腎における NGFIB ファミリーとステロイド合成酵素発現の相関

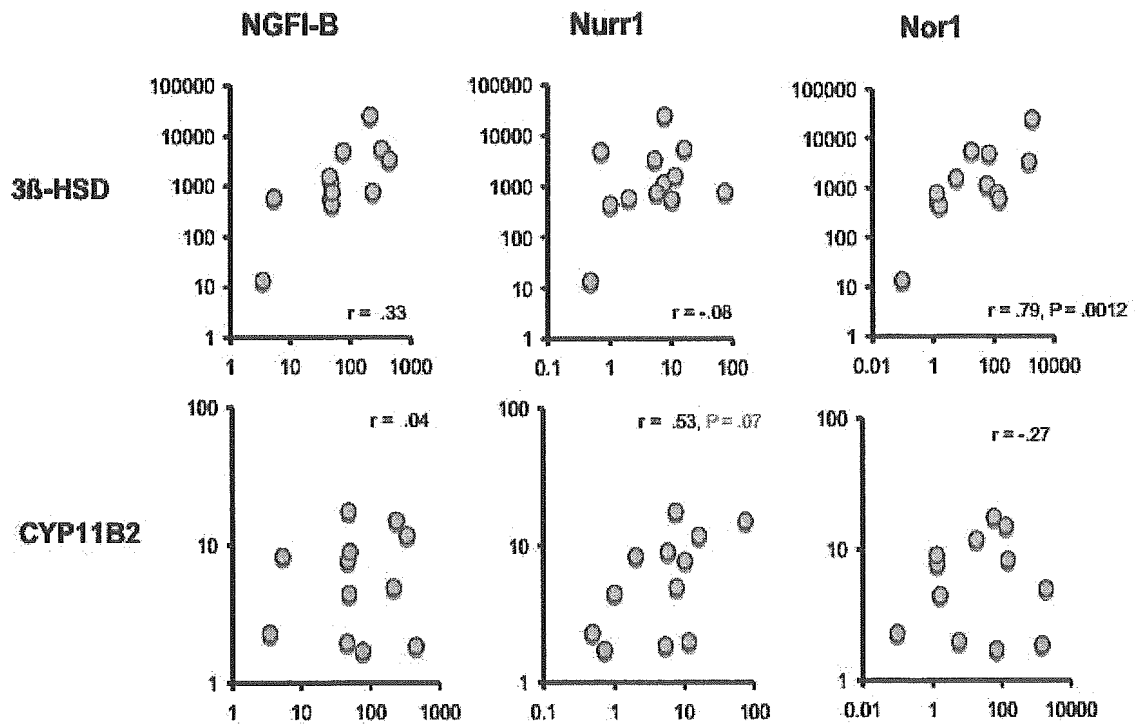




図 3. APA 組織における NGFIB ファミリーとステロイド合成酵素発現の相関

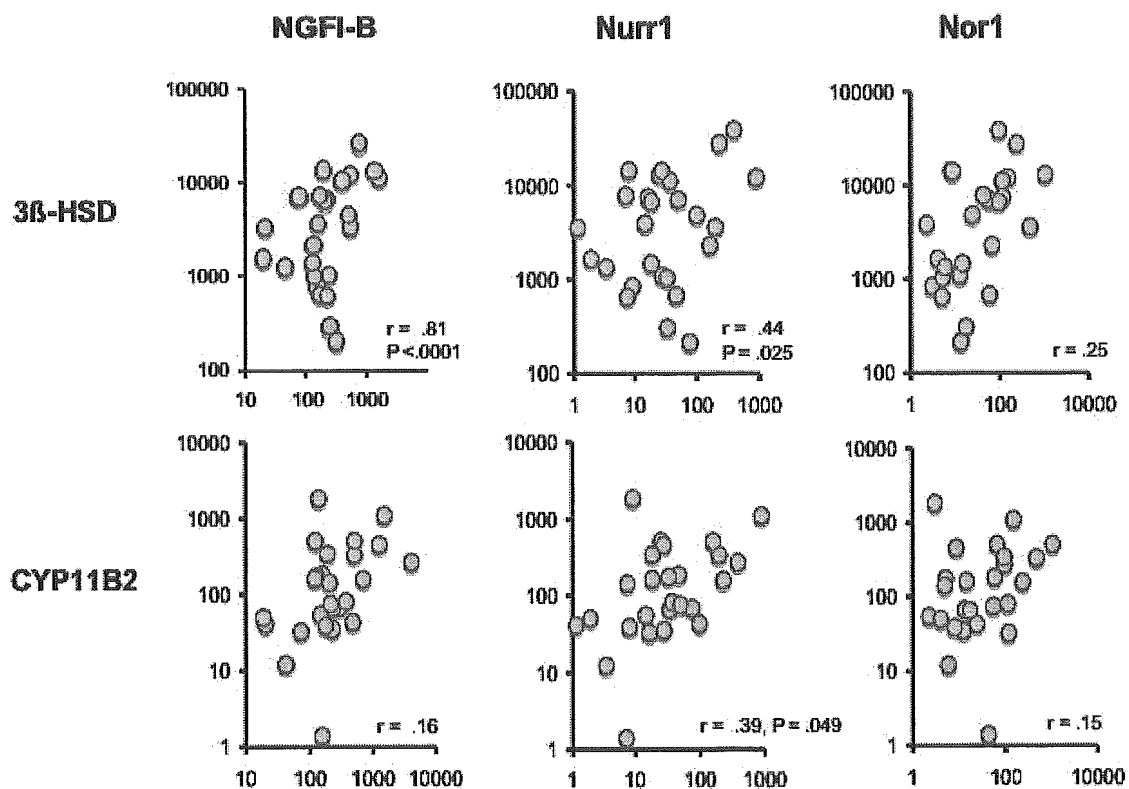


図 4. CS 組織における NGFIB ファミリーとステロイド合成酵素発現の相関

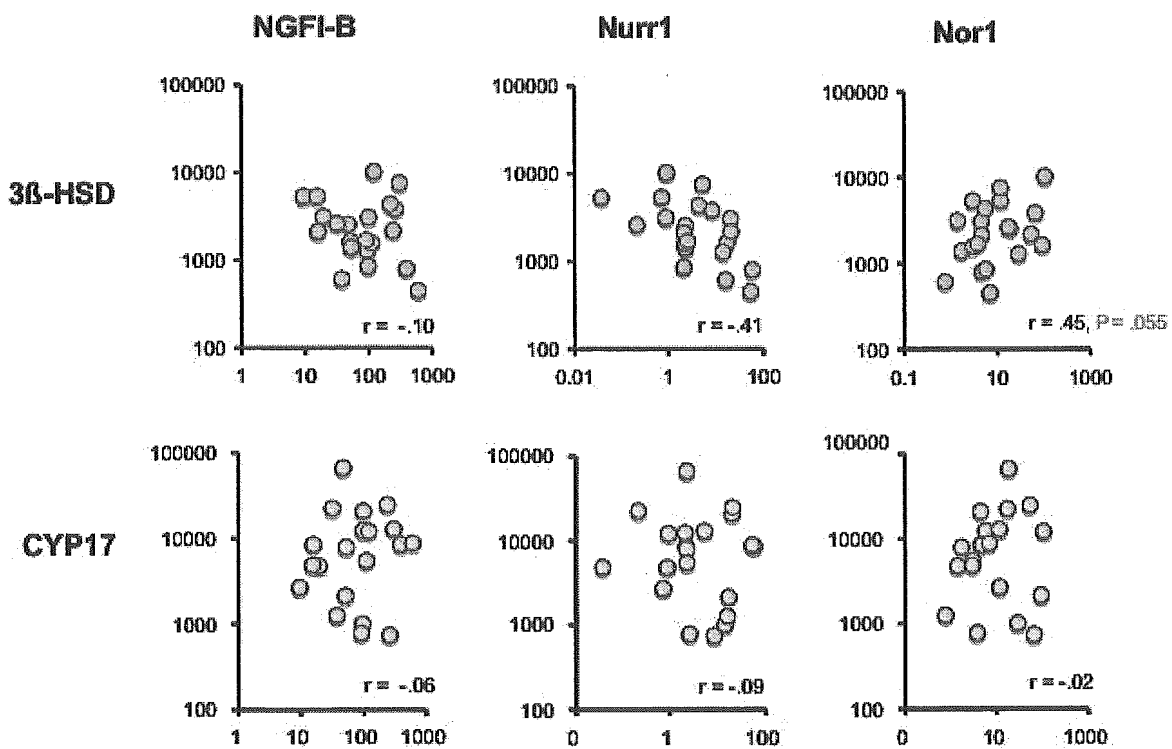
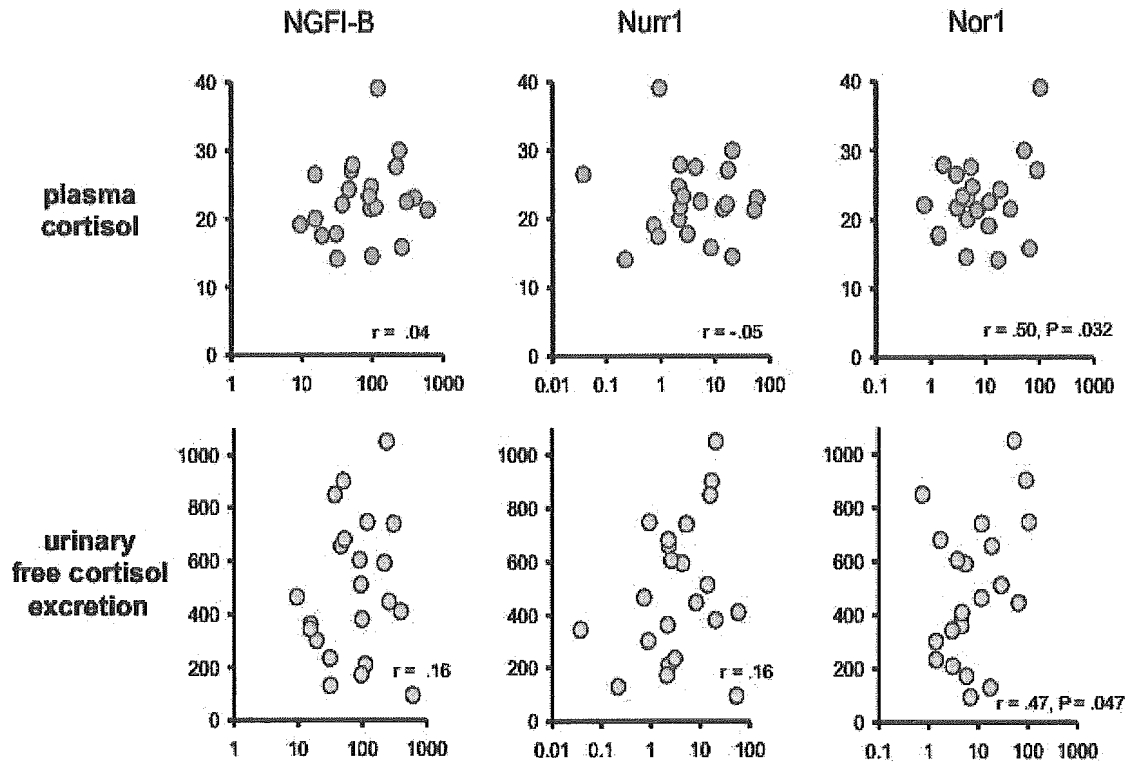


図 5. CS 組織の NGFIB ファミリーと CS 患者臨床指標との相関



# 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

中島 淳

横浜市立大学第三内科

## A. 研究目的

副腎アンドロゲンである dehydroepiandrosterone (DHEA) は思春期においてその分泌量がピークに達し、以後加齢とともに減少するユニークなホルモンである。これまでその生理作用は、不明な点が多かったが、近年、抗糖尿病作用、抗動脈硬化作用、抗腫瘍作用、免疫賦活作用などについての報告がある。これまで DHEA の抗糖尿病作用の研究には糖尿病モデルマウスを用いた実験が行なわれており、我々もその作用機序を解明するため、db/db マウスに DHEA を投与し、肝臓の糖新生系酵素の発現を調べた。その結果、db/db マウスでは高い値を示していた糖新生系酵素 glucose-6-phosphatase (G6Pase) や fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) の発現が DHEA の投与により抑制され、その結果、インスリン抵抗性を改善することを報告した。

本研究は、DHEA が肝臓に及ぼす糖新生系酵素の活性低下の作用機序解明を目的とした。

これまで DHEA の特異的結合部位に関する報告はなされていなかったが、T 細胞性白血病株において細胞内シグナル伝達の重要な分子である p38MAPK のリン酸化を抑制する protein phosphatase である DHEA-induced protein dual-specificity phosphatase (DDSP) が DHEA の標的分子として同定された。これに基づき DHEA による p38MAPK と PGC-1 のリン酸化への作用を HepG2

において検討した。

## B. 研究方法

### 1. DHEA

DHEA は Sigma 社より購入した。99.5%のエタノールに溶解し、ヒト癌化培養細胞 HepG2 の培養に対し  $10^{-5}$ M の濃度を用いた。対照群には同量のエタノールを添加した。

### 2. db/db マウスの初代培養細胞

生後7週齢の db/db マウスを開腹し、下大腹静脈より EGTA、HEPES を含むハンクス培地を還流し、その後、コラゲナーゼ、HEPES を含むハンクス培地を還流した。肝臓を取り出し、細胞をハンクス培地で洗浄した後、6cm dish にまきペニシリン-ストレプトマイシン（最終濃度それぞれ 50U/ml、0.05  $\mu$ g/ml）、10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む William's E medium で6時間培養した。

### 3. ヒト癌化培養細胞 HepG2 の培養

HepG2 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、0.05  $\mu$ g/ml）、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含むダルベッコイーグル培地 (DMEM) で、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。80%セミ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1%BSAのDMEM培地で培養し、DHEA  $10^{-5}$ M、 $10^{-6}$ M、 $10^{-7}$ M、 $10^{-8}$ 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

タンブロットティングには2時間 DHEA $10^{-5}$ M 入りの無血清 DMEM 培地で培養し、DHEA $10^{-5}$  M、lipopolysaccharides (LPS)  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  を1分暴露した細胞を用いた。

#### 4. RNA の抽出

ノーザンハイブリダイゼーションのための total RNA は Isogen (ニッポンジーン社製) を使用し mRNA を抽出した。抽出は説明書にのっとり行った。概説すると、培養プレートに Isogen を使用し細胞を回収した。1ml の Isogen と細胞抽出液に対し、0.2ml のクロロホルムを加え、ボルテックスを行なった。2、3分間室温で放置し、12000g、15分間遠心を行なった。その後上層の水層を回収し、0.5ml のイソプロパノールと混和した。15分間放置し、12000g で10分間遠心を行なった。イソプロパノールを取り除き、沈殿した RNA に70%エタノールを加え、7500g、5分間遠心した。RNA の沈殿を乾燥させ、水に溶解させた。RNA の濃度は260nm の吸光度にて gene quant pro (Amersham 社製) を用いて定量した。

#### 5. ノーザンハイブリダイゼーション

抽出した total RNA  $10 \mu\text{g}$  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 社製) に転写した。そのメンブレンを UV クロスリンクにて固定した。 $^{32}\text{P}$  で標識された G6Pase 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 (富士フイルム社製) 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 G6Pase 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。

#### 6. ウェスタンブロットティング

NER-PER (Pierce 社製) を用いて核分画、細胞質分画にタンパクを調整した。タンパクは3分間、95°C で加熱した後、12.5%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 社製) に転写をした。メンブレンは 10mM Tris-HCl と 150mM NaCl (pH7.4) と 0.1% Tween20 (TBS-T) 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、それぞれ抗 p38MAPK 抗体 (1:600) (Santa Cruz 社製) 抗 p-p38MAPK 抗体 (1:600) (Santa Cruz 社製) 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 社製) 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 社製) と Gel pro analyzer 3.1 (TOYOBO 社製) にてタンパク量を解析した。

#### 7. 免疫沈降

細胞を TBS で洗浄後、nonidet 入り Buffer で可溶化し、13,000rpm で10分間遠心した。上清に Anti-Phosphothreonine-ProteinA-Sepharose (sigma 社製) を加え、4°C で over-night 回転撹拌した。ProteinA-Sepharose に結合した抗体複合体を3分間、95°C で加熱した後、電気泳動した。