

B. 研究方法

SIKの基質を同定するためのSIK酵素タンパク質として、ラットSIK1のキナーゼドメインをGSTと融合させたものをCOS細胞で発現して精製したものをを用いた。基質も10アミノ酸残基程度のペプチドをGSTに結合させて作製した。SIK1と基質を³²P-ATP存在下で反応させ、基質への放射活性の取り込みをリン酸化の指標とした。

TORC cDNAはインビトロジェン社のIMAGEクローンを利用した。TORC2のN-末端相当領域のcDNAにBamHIを導入し、GST融合TORC2 vector並びに、GFP-融合TORC2 vectorを構築した。

TORC2 cDNAおよび、各種変異SIK1、CREBレポーターをY1細胞または293細胞へ導入し、SIKによるTORC2リン酸化と遺伝子発現抑制の相関を検討した。

TORCのリン酸化を検証する目的で、TORC2のSer171をリン酸化し、N-およびC-末端に7アミノ酸残基ずつ付加したペプチドを合成しKLHにコンジュゲーションした。これを抗原としてウサギに免疫しリン酸化TORC (pSer171) に対する抗血清を得た。

C. 研究結果

図1にSIKの基質を検索するためのアッセイ系の概要と、試験したペプチドのアミノ酸配列を示す。SIKがAMPKファミリーに属することから、SIKがリン酸化するペプチドの候補としてAMPKで既にリン酸化が報告されているペプチドに関して重点的に検討した。特筆すべき点はp300のSer89であるが、このSerをThrに置換するとリン酸化されなくなった。すなわち、SIKはSer特異的リン酸化酵素と言える。さらに、

p300と機能的に相同なCBPのSer78も興味深く、これはSIKでリン酸化されなかった。p300とCBPとの大きな違いは-2位がOH-基を持つアミノ酸であるか否かである。その他の特徴あるペプチドからSIKがリン酸化する配列はLXR(S/T)XpSXXXLと結論した(pSはリン酸化セリン)。

次に、このモチーフを有するタンパクを検索したところ、TORCと命名された因子が報告されていた。興味深いことにTORCはCREB特異的な転写共役因子であり、CREBのbZIPドメインに結合することが報告されているから、SIKが作用する条件に一致する(図2)。

TORCが細胞内でSIKの基質として働くか否かを検討するためにTORC2のSer171のリン酸化を特異的に認識するポリクローナル抗体を作製し、この抗体を用いてSIKによるリン酸化を試験した(図3)。その結果、抗リン酸化TORC2 (Ser171)抗体は試験管内でのSIKリン酸化反応のみならず、細胞内でもSIK活性を評価できることが明らかとなった。さらに、この抗体はTORC1のSer167およびTORC3のSer162のリン酸化も同様に検出することができた。これらの実験の結果、SIKは細胞内において全てのTORCをリン酸化することが明らかとなった。

次に、SIKによるTORCのリン酸化の意義を検討した。まず、TORCを培養細胞で強制発現させると、CREB活性が上昇した。このときSIKも強制発現させると、TORC依存的なCREB活性化は阻害された。また、Ser171を破壊したTORC2はSIKによるTORC依存的なCREB活性化阻害を弱めた。SIKは細胞質に局在していても核内に局在していてもCREBを抑制することができるが(4、

5)、この現象は細胞内基質である TORC が核と細胞質を行き来する可能性を示唆している。

この可能性を検証するため、TORC2 に蛍光タンパク (GFP) を連結させて Y1 細胞に導入した。その際、同時に SIK も強制発現させて、TORC の SIK によるリン酸化依存的な細胞内局在の変動を試験した (図 4)。SIK 非存在下では GFP-TORC2 は主に核に局在した。しかし、SIK を強制発現させることにより GFP-TORC2 のシグナルのほとんどが細胞質で検出された。このことは、SIK によってリン酸化された TORC は核外に移行することで転写の場である核から排出され、CREB の共役因子としての機能を失うものと結論した。また、PKA は CREB をリン酸化して CREB を活性化するのみならず、SIK をリン酸化する。このとき SIK による TORC のリン酸化レベルは低下している。しかしこの際、SIK のタンパクリン酸化酵素としての比活性は変わらない。

最後に、TORC の核外移行に関与する他の因子が存在する可能性を検討した。リン酸化依存的に核-細胞質移行をするタンパク質因子の多くが 14-3-3 と呼ばれる因子と結合して細胞質に存在するから、SIK でリン酸化された TORC が 14-3-3 を結合する量を測定した (図 5)。その結果、TORC1 も TORC2 も SIK によってリン酸化されると 14-3-3 と結合することが示された。また、TORC2 の方が 1 分子当たりの 14-3-3 結合量が多いことも示された。おそらく、14-3-3 の結合が TORC 細胞内局在の決定に重要と思われる。

D. 考察及び結論

本研究により SIK の細胞内基質 TORC

を同定することができた。TORC は全ての細胞において発現しており、CREB の活性化に非常に重要な役割を果たす。SIK は副腎では StAR や CYP11A 等のステロイド合成遺伝子の発現を制御しているが、その他の細胞でも多くの遺伝子を支配していることが予想される。

TORC の活性化異常とその下流シグナルをさらに解析すれば、SIK-TORC の系の異常がより多くの疾患の背景にあることが明らかになるかもしれない。副腎疾患の場合、ACTH 不応答症やグルココルチコイド不応答症などの例について検索してみたい。

E. 参考文献

- 1) Wang ZN, et al : FEBS Lett 453 : 135 - 139, 1999
- 2) Lin, X - z., et al : Mol. Endocrinol 15 : 1264 - 1276, 2001
- 3) Doi J, et al : J. Biol. Chem. 277 : 15629 - 15637, 2002
- 4) Takemori H, et al : J. Biol. Chem. 277 : 42334 - 42343, 2002
- 5) Katoh Y, et al : Eur. J. Biochem. 271 : 4307 - 4319 2004
- 6) Sreaton RA, et al : Cell 119 : 61 - 74 2004

F. 研究発表

1. 論文発表

1. The CREB Coactivator TORC2 Functions as a Calcium - and cAMP - Sensitive Coincidence Detector. Sreaton RA, Conkright MD, Katoh Y, Best JL, Canettieri G, Jeffries S, Guzman E, Niessen S, Yates JR 3rd, Takemori H, Okamoto M, Montminy M. Cell 119 : 61-74 (2004)
2. Salt - inducible kinase - 1 represses cAMP response element - binding protein activity both in the nucleus and in the cytoplasm. Katoh Y, Takemori H, Min L, Lin X, Wang Z, Muraoka M, Doi J, Horike N,

- Okamoto M. Eur J Biochem 271:4307-4319 (2004)
3. Salt-inducible kinase (SIK) isoforms: their involvement in steroidogenesis and adipogenesis.
Katoh Y, Takemori H, Horike N, Doi J, Muraoka M, Min L, Okamoto M. Mol Cell Endocrinol. 217:109-112 (2004)
4. Salt-inducible kinase in steroidogenesis and adipogenesis.
Okamoto, M. Takemori, H., Katoh, Y. Trends Endocrinol Metab. 15:21-26 (2004)

2. 学会発表

1. 竹森洋・加藤芳子・村岡正章・岡本光弘：塩誘導性キナーゼ (SIK) の活性特性
第77回日本生化学会大会 平成16年10月
横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 特願 特願2004-143127
名称 スクリーニング方法
出願日 平成16年5月13日
発明人 竹森洋、岡本光弘
出願人 竹森洋、岡本光弘、
株式会社プロテイン・エクスプレス

図1 SIK1基質測定法(左)と試したペプチド配列(右)。Class はリン酸化の度合いを SIK 人工基質 (Syntide2)と比較して評価したものである。

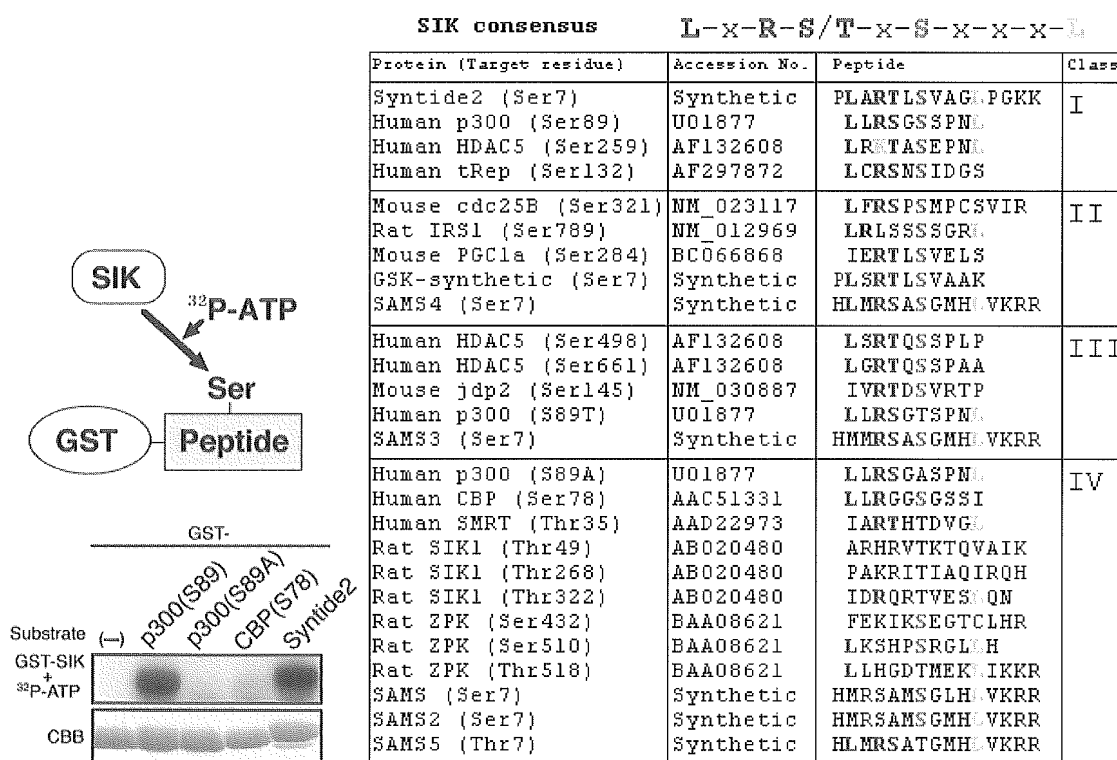


図2 TORCファミリーの構造と SIK モティーフの位置。

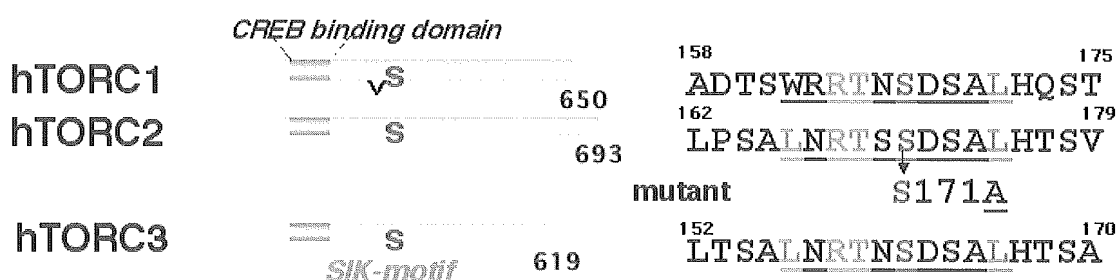


図3 SIKによるTORCリン酸化の検証。左;試験管内リン酸化反応、右:細胞内リン酸化反応。SIKは試験管内でTORC2-Ser171領域を含むペプチドをリン酸化した。GSTに全長TORC2を結合させ、培養細胞でSIK2と共発現させるとTORCへのリンの取り込みが上昇した。この上昇はSer171への変異で減少し、pSer171抗体はSIK2によるTORCリン酸化を検出できた。

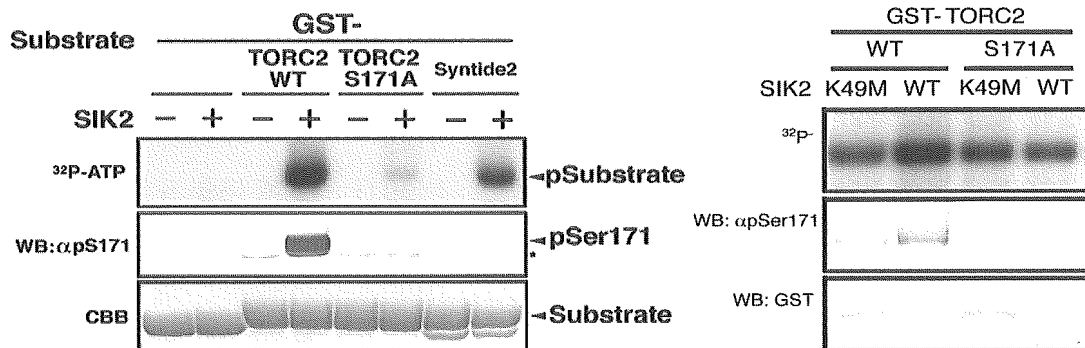


図4 SIKによるTORCの核外への排出

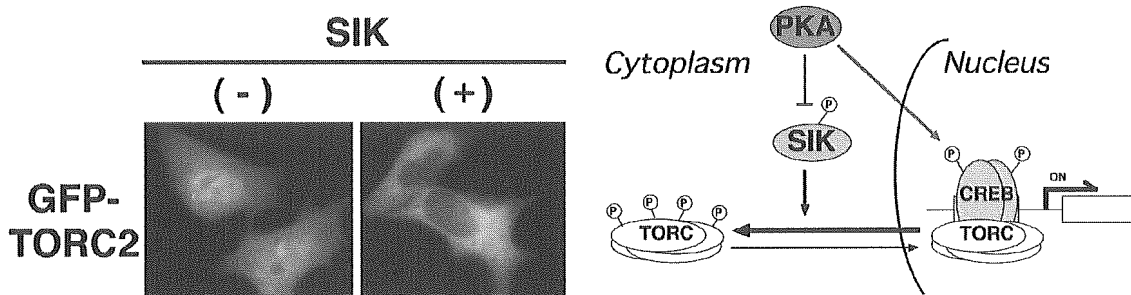
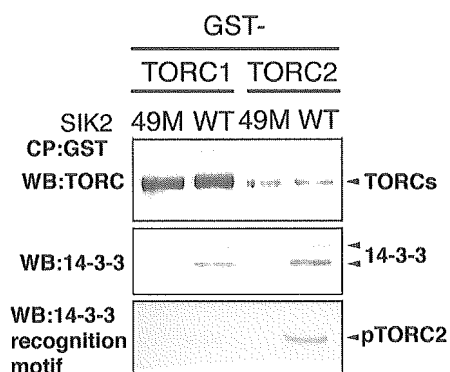


図5 SIK依存的TORCのリン酸化に伴う14-3-3の結合。GST-TORC1およびGST-TORC2をSIK2と細胞内で共発現させ精製した。14-3-3に対する抗体と14-3-3結合認識部位抗体で14-3-3の結合量を検討した。



HDL 受容体 CLA - 1 の副腎ホルモン産生および 副腎細胞増殖に与える影響について

村尾孝児、井町仁美、高原二郎、石田俊彦
香川大学医学部第一内科

研究要旨

我々はマウス SR - B1 相同遺伝子である CLA - 1 がヒト HDL 受容体であり、副腎で強く発現されていることを報告してきた。CLA - 1 の過剰発現はステロイドホルモン合成を促進し、変異を導入した Decoy CLA - 1 はその機能を抑制した。一方 CLA - 1 の C 末端を介する細胞内情報伝達系は副腎細胞増殖を刺激した。副腎における CLA - 1 の発現調節は様々な転写因子が関与しているが、新たに調節因子として転写因子 PREB を同定した。臨床応用として、CLA - 1 の副腎への遺伝子導入を検討した。超音波を利用した Ultrasonic microbubble destruction 法にて副腎への CLA - 1 遺伝子導入が可能であった。

A. 研究の目的

1996 年 Acton らによりマウス scavenger receptor class B type 1 (SR - B1) が HDL 受容体であると報告された。我々はマウス SR - B1 相同遺伝子である CLA - 1 がヒト HDL 受容体であり、副腎で強く発現されていることを報告してきた。また副腎におけるステロイド産生の最初の基質はコレステロールであり、副腎にコレステロールを提供する HDL - HDL 受容体とステロイドホルモン合成には密接な関係があることも報告してきた。今回の目的は副腎腫瘍細胞による CLA - 1 の発現を制御することでステロイドホルモン合成および腫瘍の増殖に与える影響について検討し、その臨床的応用について検証した。

B. 研究方法

プラスミドの作成

CLA - 1 の発現ベクターにランダムな mutation および deletion mutant (C 末端欠損) を挿入した。マウス副腎皮質腫瘍由来細胞株 (Y - 1) はヒューマンサイエ

ンス研究資源バンクより購入した。mutant CLA - 1 cDNA を含む発現ベクターをマウス副腎皮質腫瘍由来細胞株 (Y - 1) にリポソーム法にて遺伝子導入し、CLA - 1 過剰発現 stable clone を G418 の抵抗性にて樹立した。HDL 結合性コレステロール非取込みクローンを DiI - HDL の取り込みを指標にして選択した。

副腎ステロイドホルモン合成および細胞増殖能

ステロイドホルモン分泌能については、CLA - 1 過剰発現細胞に HDL を添加後、その培養液中の corticosterone 濃度を Amersham 社の RIA キットにて測定した。CLA - 1 mutant 導入細胞の細胞増殖能について細胞数の測定、³H - Thymidine uptake 法で評価した。アポトーシスに関しては、annexin - V FITC stain および FACS にて検討した。さらに propidium iodide (PI) 法にてアポトーシスについて検討を加えた。

Transfection : 転写因子 PREB cDNA full length を含む発現ベクターおよび CLA - 1 promoter を挿入した reporter

gene をマウス副腎皮質腫瘍由来細胞株 (Y-1) にリポソーム法にて遺伝子導入し、CLA-1 の転写活性に与える転写因子 PREB の影響について検討した。

C. 研究結果

遺伝子変異型 CLA-1 発現副腎細胞の生物学的特性

C 端の欠損変異 CLA-1 を Y-1 細胞 (Decoy CLA-1) に遺伝子導入し、stable transformant を作成した。Decoy CLA-1 導入細胞は、HDL 結合性は mock 細胞と比較して高く、DiI-HDL からのコレステロールの取り込み能が有意に高値を示した (図 1)。CLA-1 過剰発現細胞において、細胞増殖に及ぼす遺伝子変異型 CLA-1 (Decoy CLA-1) の影響について検討した。Decoy CLA-1 発現細胞においては、明らかに細胞数の増加抑制が認められた (図 2)。また [³H]-Thymidine uptake で検討すると mock 細胞においては、HDL の添加により [³H]-Thymidine の取り込みが亢進するが、Decoy CLA-1 発現細胞においては HDL の添加によっても [³H]-Thymidine の取り込みの亢進が認められなかった。薬理的な検討により、CLA-1 C 末端を介する細胞内情報伝達系は PI3-K/Akt カスケードを介し、転写因子 AP-1 の活性化が細胞増殖に関与していることが判明した (図 3, 4)。さらに Decoy CLA-1 遺伝子導入によるアポトーシス誘導作用についても検討をおこなった。Mock 細胞と比較して Decoy CLA-1 発現細胞においては、有意にアポトーシス細胞の割合が上昇していた。TNF- α はアポトーシスを誘導することで知られているが、HDL は TNF- α 作用に拮抗して抗アポトーシス作用があることが報告されている。そこで Decoy

CLA-1 細胞での HDL のアポトーシス抑制効果を検討した。Mock 細胞では TNF- α によりアポトーシスが誘導され、HDL の添加によりアポトーシスが抑制された。一方、Decoy CLA-1 発現細胞では、TNF- α によりアポトーシスが誘導されるが、HDL による抑制効果が認められなかった。さて、副腎における CLA-1 の遺伝子発現調節機構に関して新たな知見をえた。cAPM 依存性の転写因子 PREB が副腎に発現し、CLA-1 の転写促進作用を有していることが判明した (図 5)。In vivo における副腎特異的遺伝子導入実験: in vivo においてマイクロバブルと CLA-1 発現ベクターのエマルジョンを作成し、静注後、超音波照射による遺伝子導入をおこなった (Ultrasonic microbubble destruction 法)。副腎において CLA-1 遺伝子の発現が認められた。

D. 考察

マウス SR-B1 およびヒト CLA-1 はステロイド産生組織で発現されており、特に副腎において強く発現されている。マウスにおいては SR-B1 のノックアウトマウスが作製されており、SR-B1 ノックアウトマウスでは副腎におけるコレステロール含量が 72% も低下することが報告された。また SR-B1 に対する抗体で HDL との結合を阻害すると副腎細胞からのステロイドホルモン合成が極端に低下することが報告されている。一方 ACTH の投与によりマウス副腎における SR-B1 の発現が増すことが報告されており、SR-B1 および CLA-1 がステロイド合成に関与することが推定された。我々は CLA-1 が副腎細胞にコレステロールを供給することにより、ステロイドホルモン合成に寄与することを報告し

てきた。今回の検討によって、cAMP 依存性転写因子 PREB が cAMP の濃度依存性に CLA-1 遺伝子の転写を促進することが判明した。ACTH から CLA-1 遺伝子転写にいたる情報伝達系の解明がなされた。また PREB の結合配列は多のステロイドホルモン合成酵素の promoter にも存在することより、ACTH 刺激を仲介する転写因子として PREB が注目される。HDL からのコレステロールの取り込みを抑制することにより、ステロイドホルモン合成が低下することからも裏付けられる。ステロイドホルモン合成が亢進している副腎皮質腫瘍で CLA-1 の発現が増強されていることより、腫瘍による自立的なステロイドホルモン合成および腫瘍増殖に CLA-1 が関与することが考えられる。以前より、HDL の細胞増殖作用が指摘されており、また最近の報告によると SR-BI の C 末端側に細胞内情報伝達機能が存在することが指摘されている。今回我々が作成した Decoy CLA-1 は C-末端を欠いており、細胞内情報伝達を抑制する可能性が考えられた。Decoy CLA-1 遺伝子導入細胞で細胞増殖の抑制、アポトーシスの促進されていることより、C-末端を欠いた decoy CLA-1 は腫瘍の増殖に対しても抑制的に働くことが推定された。今後、この Decoy CLA-1 を副腎腫瘍に遺伝子導入することで腫瘍からのステロイドホルモン分泌の抑制および腫瘍増殖の抑制を目的とした遺伝子治療を検討している。

E. 結論

ヒト HDL 受容体 CLA-1 に変異を導入した Decoy CLA-1 は、副腎細胞におけるステロイドホルモン合成に影響を与えず、細胞増殖の抑制、アポトーシスの促進作用を示した。今後この Decoy CLA-

1 を遺伝子導入し、副腎腫瘍の新たな治療法を検討したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Cao WM, Murao K, Imachi H, Yu X, Dobashi H, Yoshida K, Muraoka T, Kotsuna N, Nagao S, Wong CW, Ishida T. Insulin like growth factor - I Regulation of hepatic scavenger receptor class BI *Endocrinology* 145 : 5540 - 7, 2004
- Murao K, Imachi H, Ishida T, Wong NC. Lipid-Altering Drugs : Decreasing Cardiovascular Disease at the Expense of Increasing Cancer ? *Cancer Res.* 64 : 6831-6832, 2004
- Cao WM, Murao K, Imachi H, Yu X, Abe H, Yamauchi A, Niimi M, Miyauchi A, Wong NCW, Ishida T. A Mutant HDL Receptor Inhibits Proliferation of Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 64 : 1515 - 1521, 2004
- Cao WM, Murao K, Imachi H, Hiramane C, Yu X, Abe H, Wong NCW, Ishida T. Phosphatidylserine Receptor in Apoptotic Function of Nursing Thymic Epithelial Cells *J Mol Endocrinol.* 32 : 497 - 505, 2004
- Murao K, Imachi H, Yu X, Cao WM, Tokumitsu H, Inuzuka H, Wong NCW, Shupnik MA, Kobayashi R, Ishida T. Role of calcium - calmodulin dependent protein kinase cascade in TRH upregulation of TSH and PRL gene expression. *Endocrinology* 145 : 4846-4852, 2004
- Abe H, Murao K, Imachi H, Cao WM, Yu X, Yoshida K, Wong NCW, Shupnik MA, Haefliger JA, Waeber G, Ishida T. TRH-stimulated TSH expression involves Islet - Brain - 1/c - Jun N - terminal Kinase Interacting protein-1. *Endocrinology* 145 : 5623 - 5628, 2004
- Yu X, Murao K, Sayo Y, Imachi H, Cao WM, Ohtsuka S, Niimi M, Tokumitsu H, Inuzuka H, Wong NC, Kobayashi R, Ishida T. The role of calcium/calmodulin - dependent protein kinase cascade in glucose upregulation of insulin gene expression.

Diabetes. 53:1475 - 1481, 2004

異所性下垂体腺腫による Cushing's 病の 1 例
村尾孝児、井町仁美、吉田和矢、忽那則子、
村岡都美江、永尾 幸、阿部 博、曹 聞銘、郁
暁、石田俊彦

ホルモンと臨床 44:15 - 18, 2004

HELLP 症候群に合併した汎下垂体機能低下
症の 1 例

井町仁美、村尾孝児、忽那則子、村岡都美江、
吉田和矢、永尾 幸、阿部 博、石田俊彦
日本内科学会雑誌 93:2213 - 2215, 2004

2. 学会発表

ACTH 負荷副腎静脈採血法を施行した原発
性アルドステロン症の一例

黒住知宏、村尾孝児、井町仁美、永尾 幸、
吉田和矢、村岡都美江、忽那則子、細川 等、
石田俊彦

第 92 回 日本内科学会四国地方会 (04, 06,
徳島)

IGF-I による HDL 受容体 CLA-1 の発現調
節

曹 聞銘、村尾孝児、井町仁美、郁 暁、忽
那則子、村岡都美江、吉田和矢、石田俊彦

第 77 回 日本内分泌学会総会 (04. 6 京都)
HDL 受容体を介する細胞増殖と細胞内情報
伝達系についての検討

村尾孝児、井町仁美、曹 聞銘、郁 暁、忽
那則子、村岡都美江、吉田和矢、石田俊彦

第 77 回 日本内分泌学会総会 (04. 6 京都)
副腎低形成における HDL 受容体 CLA-1 の
役割

村尾孝児、井町仁美、曹 聞銘、郁 暁、忽
那則子、村岡都美江、吉田和矢、石田俊彦

第 77 回 日本内分泌学会総会 (04. 6 京都)
血管内皮細胞における MCP-1 発現におよぼ
す PREB の影響

郁 暁、村尾孝児、井町仁美、曹 聞銘、忽
那則子、村岡都美江、吉田和矢、石田俊彦

第 77 回 日本内分泌学会総会 (04. 6 京都)
転写因子 PREB の glucokinase 遺伝子発現に
あたえる影響について

村岡都美江、村尾孝児、井町仁美、吉田和矢、
阿部 博、永尾 幸、忽那則子、石田俊彦

第 47 回 日本糖尿病学会総会 (東京 04. 5)
PDGF の血管平滑筋細胞における ABCA1 発
現におよぼす影響について

永尾 幸、村尾孝児、阿部 博、井町仁美、

石田俊彦

第 47 回 日本糖尿病学会総会 (東京 04. 5)
Glucose-Response Transcriptional Factor,
PREB Regulates MCP-1 Expression In
HUVECs

Cao WM, Murao K, Imachi H, Yu X,
Yoshida K, Muraoka T, Nagao S, Kotsuna
N, Ishida T

2004 ADA (ニューオーリンズ)

Scavenger Receptor Class B Type I Gene Is
Inhibited by High Glucose Stimulation.

Imachi H, Murao K, Cao WM, Yu X,
Yoshida K, Muraoka T, Nagao S, Kotsuna
N, Ishida T

2004 ADA (ニューオーリンズ)

Pancreatic Glucokinase Is Activated by
Insulin-like Growth Factor I

Yoshida K, Murao K, Imachi H, Abe H,
Cao WM, Yu X, Muraoka T, Nagao S,
Kotsuna N, Ishida T

2004 ADA (ニューオーリンズ)

G. 知的所有権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

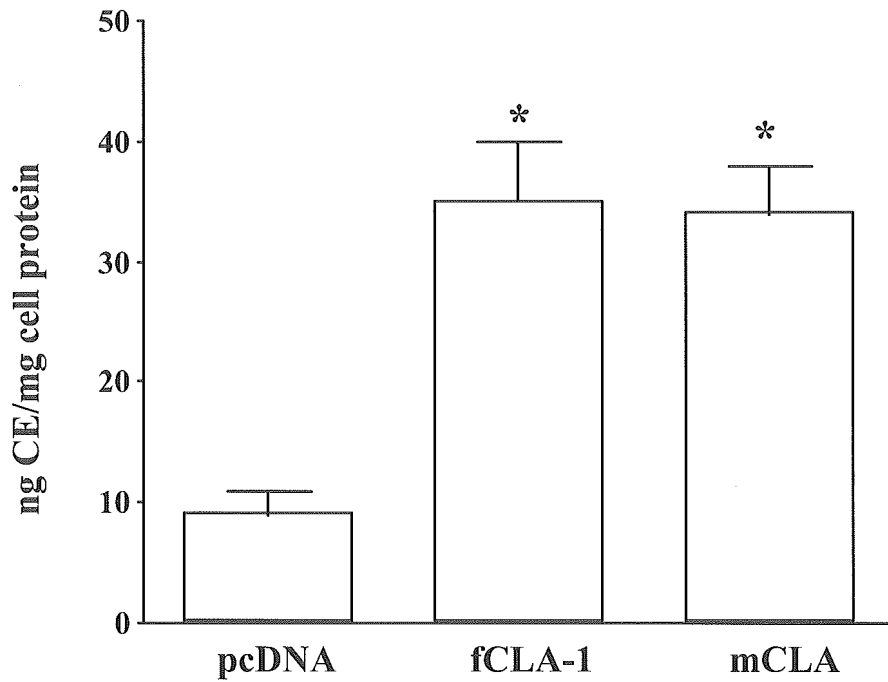


図1, Decoy CLA-1 の HDL からのコレステロール取り込みに与える影響について

pcDNA ; mock transfected cells, fCLA-1 ; full length CLA-1 transfected cells, mCLA : decoy CLA-1 transfected cells

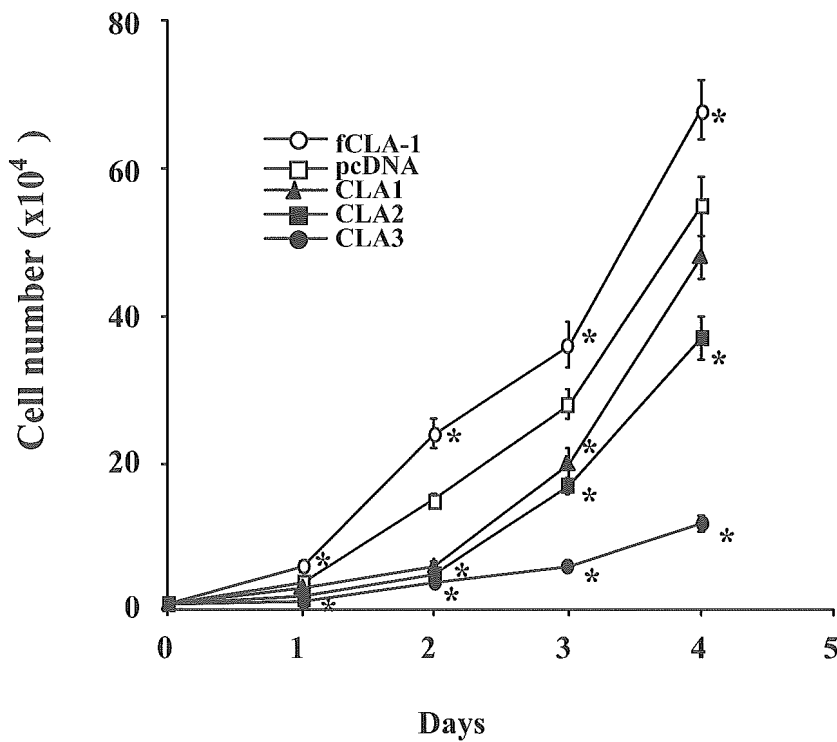


図2, 細胞増殖に及ぼす Decoy CLA-1 の影響

pcDNA ; mock transfected cells, fCLA-1 ; full length CLA-1 transfected cells, CLA1-3 ; decoy CLA-1 transfected clones

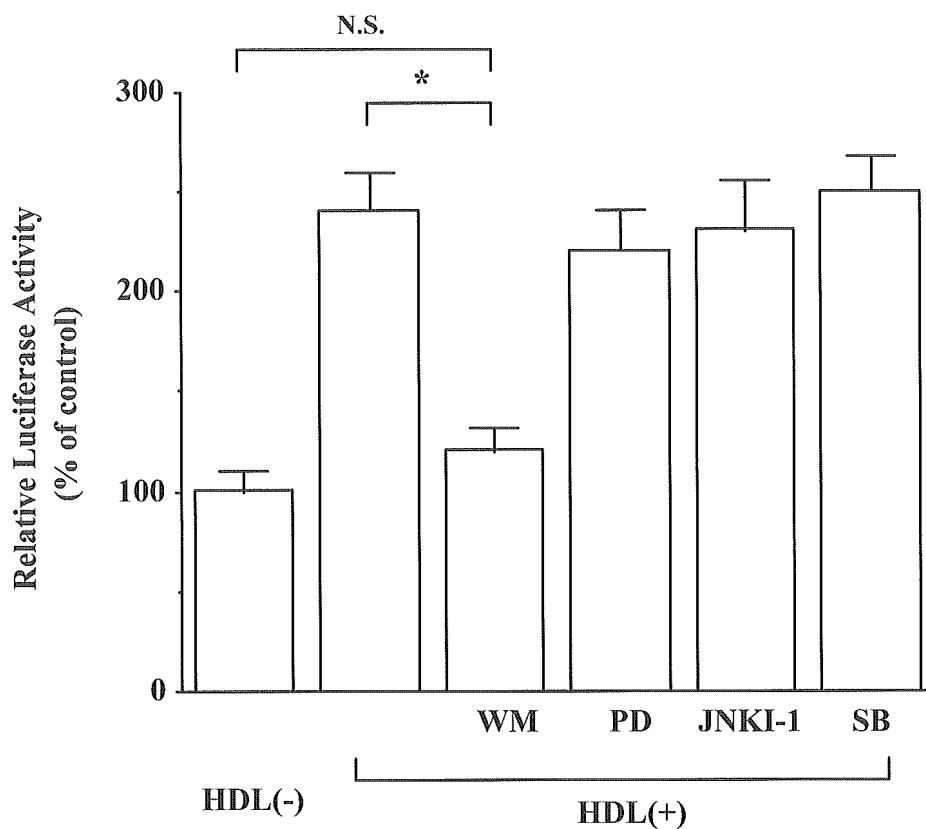


図3, HDL による AP-1 転写活性は wortmannin によって抑制される。
 WM ; wortmannin, PD ; PD98059, JNKI-1 ; JNK inhibitor,
 SB ; SB203580, HDL ; 500ug/ml HDL

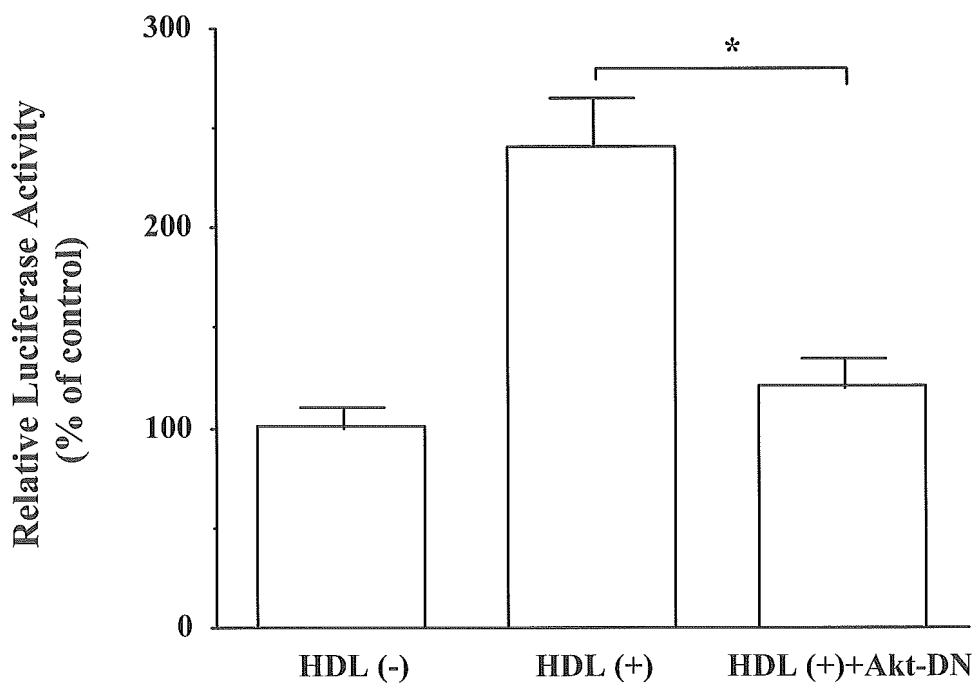


図4, AP-1 転写活性に与える HDL 刺激伝達系と Akt
 HDL ; 500ug/ml HDL, Akt-DN ; Akt dominant negative form

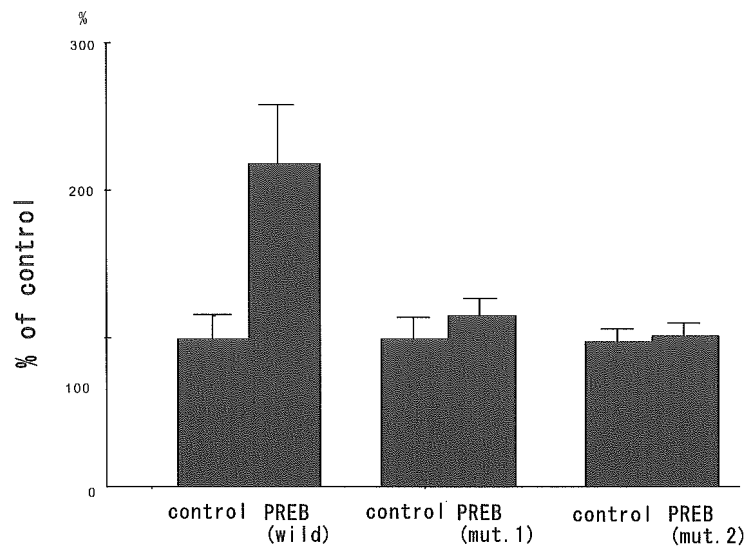


図5, 転写因子PREBのCLA-1 promoter 活性に与える影響について
 wild : CLA - 1 full promoter, mut1 : one site mutant of PREB
 binding site on CLA - 1 promoter, mut 2 ; two site mutant.

副腎皮質の発生初期過程に関する解析

諸橋 憲一郎

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

研究要旨

副腎皮質は生殖腺と同様にステロイドホルモン産生能を有する組織であり、初期発生の解析から生殖腺と極めて密接な関係にあることが分かっている。我々が着目してきた Ad4BP/SF-1 遺伝子は発生初期から両組織に発現するのみならず、視床下部や脳下垂体などの生殖活動に重要な組織に発現する。更に、この遺伝子の破壊マウスでは副腎と生殖腺が形成されないことから、本遺伝子がこれらの組織形成過程で重要な役割を担っていることが示唆された。そこで、トランスジェニックマウスの作製を通じ、Ad4BP/SF-1 がいかなるメカニズムのもとに副腎皮質に発現するのかを解析した。この解析からは副腎皮質の形成過程が明らかになってきているが、本研究は副腎皮質の形成メカニズムの解明を通じ、種々の副腎疾患の原因解明や副腎皮質の再生に向けた基礎的取り組みである。

A. 研究目的

Ad4BP/SF-1 遺伝子の副腎皮質特異的発現を調節するエンハンサー領域を同定し、この領域を通じた発現制御の実体を明らかにすることを目的とする。このことは副腎皮質の分化メカニズムを明らかにするものであり、同時に副腎皮質と生殖腺の発生過程における差異を分子レベルで理解するためには不可欠である。

B. 研究方法

Ad4BP/SF-1 遺伝子を含む DNA をトランスジェニックマウス用に作製したコスミドベクターに挿入した。これらのコスミドを用いてトランスジェニックマウスを作製することで、それぞれの DNA 断片の転写活性を調べた。これらの断片のうち副腎皮質に発現を示すものを用い、さらに活性を有する領域を決めていった。

(倫理面への配慮)

本実験には遺伝子破壊マウスを用いる

が、全ての動物実験は自然科学研究機構動物実験指針に従って行われた。なお本研究は自然科学研究機構実験動物委員会の承認を得たものである。

C. 研究成果

本研究では、マウスゲノムライブラリーより Ad4BP/SF-1 遺伝子を含むゲノム DNA 領域を BAC、またはコスミドクローンとして単離した。これらに lacZ をレポーターとして挿入し、トランスジェニックマウスを作製したところ、内在性の Ad4BP/SF-1 の発現を再現するトランスジェニックマウスが得られた。また、種々の欠失コンストラクトを用いて、副腎、視床下部や脳下垂体に特異的発現を誘導するエンハンサーを同定した。同定したエンハンサーのうちの副腎特異的なエンハンサーを詳細に解析するために、トランスジェニックマウスラインを作製し、発生にともなう lacZ の発現の変動を調べた。X-gal 染色による lacZ の活性

は胎仔9.5日齢にはじめて観察された。この発現は生後まで続いたが、副腎皮質と髄質の間の層にしか見られなかった。さらに、雄では生後35日に発現消失することから、胎仔副腎 (X-zone) と呼ばれる層に特異的なエンハンサーであることが明らかになった。

次いで、副腎エンハンサーではどのような調節機構が働くのかを DNA 配列をもとに予測した。エンハンサー中に4つの Ad4BP/SF-1 の結合部位が確認された。Ad4BP/SF-1 は転写因子であるため、自己調節の可能性が有る。これを検討するために、これらの配列に変異を導入してトランスジェニックマウスを作製した。副腎形成の初期 (胎仔11.5日齢) の副腎における lacZ の発現には影響がないが、胎仔17.5日齢の副腎ではその発現が消失した。このことから、副腎エンハンサー機能の発現開始には Ad4BP/SF-1 は関与しないが、発現を維持するためには Ad4BP/SF-1 が必要であり、Ad4BP 遺伝子が auto-regulation を受けることが明らかになった。さらに、Ad4BP/SF-1 以外に Pbx/Meis と Pbx/Hox の結合サイトも副腎皮質エンハンサーの活性には不可欠であることが明らかになった。実際に副腎原基における Pbx や Meis、またある種の Hox の発現が確認された。Ad4BP/SF-1 遺伝子破壊マウスのバックグラウンドにおいてこれらの配列による転写活性を調べたところ、Pbx/Meis と Pbx/Hox の結合サイトが Ad4BP/SF-1 遺伝子の初発の転写活性 (イニシエーション) に重要であることを示す結果が得られた。以上の結果より、このエンハンサーの機能発現は、イニシエーションとメンテナンスの2つのステップから構成されることが明らかになった。

本研究で同定された領域は胎生副腎における Ad4BP/SF-1 の発現を制御することから、本領域における突然変異は種々の副腎形成異常の原因となる可能性があるため、今後患者 DNA の検討を行う予定である。

D. 考察

従来から指摘されているように、胎児副腎と成人副腎では、その構造や機能が異なることが知られている。しかしながら、両者を構成する細胞の起源は明らかではなかった。本研究では Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現が胎児副腎と成人副腎では異なる領域によって制御されること、すなわち異なる制御機構のもとに調節されることを示した。このことは、胎児副腎と成人副腎が異なる刺激のもとに構築されることを示唆するものであり、その異なる構築機構にはじめて分子基盤を与えるものであった。成人副腎で機能するエンハンサーの同定は今後の重要な問題である。同時にこれらの配列をもとにした、副腎皮質形成の分子機構の詳細な解析は胎児副腎と成人副腎の形成過程を理解する上で不可欠である。また、これらの配列が胎児ならびに成人副腎における Ad4BP/SF-1 の発現には必須であることから、これまでその原因が明らかになっていない各種の副腎皮質疾患がこの領域の変異によって引き起こされたと考えることが出来る。患者 DNA の解析が待たれるところである。

E. 結論

Ad4BP/SF-1 遺伝子のイントロン内に胎仔副腎皮質特異的発現を制御する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、それぞれ Ad4BP/SF - 1 遺伝子の転写調節に必須の役割を担っていることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1, Identification of the boundary for histone acetylation between nuclear receptor genes, Ad4BP/SF - 1 and GCNF, aligned in tandem.
S. Ishihara and K. Morohashi
Biochem. Biophys. Res. Commun.
in press
- 2, Novel Isoform of Vinexin, Vinexin γ , Regulates Sox9 Gene Expression through activating MAPK Cascade in Mouse Fetal Gonad
M. Matsuyama, H. Mizusaki, A. Shimono, T. Mukai, K. Okumura, K. Abe, K. Shimada, and K. Morohashi
Genes to Cells in press
- 3, Mesonephric Fgf9 as the signal that stimulates gonad formation.
H. Yoshioka, Y. Ishimaru, N. Sugiyama, N. Tsunekawa, T. Noce, M. Kasahara, and K. Morohashi
Dev. Biol. in press
- 4, Expression of the estrogen - inducible EGFP gene in aromatase - deficient mice reveals differential tissue - response to estrogenic compounds.
K. Toda, Y. Hayashi, T. Okada, K. Morohashi, and T. Saibara
Mol. Cell. Endocrinol. 229, 119 - 126, 2005
- 5, Testicular Dysgenesis without Adrenal Insufficiency in a 46, XY Patient with a Heterozygous Inactive Mutation of Steroidogenic Factor - 1.
T. Hasegawa, M. Fukami, N. Sato, G. Sasaki, K. Fukutani, K. Morohashi, and T. Ogata
J. Clin. Endocrinol. Metab. 89,
5930 - 5935, 2004
- 6, SUMO - 1 Modification of the Synergy Control Motif of Ad4BP/SF - 1 Regulates Synergistic Transcription between Ad4BP/SF - 1 and Sox9.
T. Komatsu, H. Mizusaki, T. Mukai, H. Ogawa, D. Baba, M. Shirakawa, S.

Hatakeyama, K. Nakayama, H. Yamamoto, A. Kikuchi, and K. Morohashi
Mol. Endocrinol. 18, 2451 - 2462, 2004

- 7, Nuclear structure - associated TIF2 interacts with glucocorticoid receptor and its target DNA.
H. Ogawa, R. T. Yu, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, Y. Nakatani, K. Morohashi and K. Umesono
Biochem. Biophys. Res Commun. 320, 218 - 225, 2004
- 8, Loss of PGC - specific expression of the orphan nuclear receptor ERR - β results in regulation of germ cell number in mouse embryos.
K. Mitsunaga, K. Araki, H. Mizusaki, K. Morohashi, H. Haruna, N. Nakagata, V. Giguere, K. Yamamura, and K. Abe
Mech of Dev. 121, 237 - 246, 2004
- 9, Aromatase - knockout mouse carrying an estrogen - inducible enhanced green fluorescent protein gene facilitates detection of estrogen actions in vivo.
K. Toda, Y. Okada, M. Zubair, K. Morohashi, T. Saibara, and T. Okada
Endocrinol. 145, 1880 - 1888, 2004
- 10, Mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype - phenotype correlation
M. Kato, S. Das, K. Petras, K. Kitamura, K. Morohashi, D. N. Abuelo, M. Barr, D. Bonneau, A. Brady, N. J. Carpenter, F. Frisone, T. Fukuda, R. Guerrini, E. Iida, M. Itoh, A. F. Lewanda, Y. Nanba, A. Oka, V. K. Proud, K. L. Russel, P. Saugier - Veber, S. L. Schelley, A. Selicorni, R. Shaner, M. Silengo, F. Stewart, N. Sugiyama, J. Toyama, A. Toutain, A. Lía Vargas, M. Yanazawa, E. H. Zackai and W. B. Dobyns
Human Mutation 23, 147 - 159, 2004

2. 学会発表

(招待講演)

- 1、第27回日本分子生物学会 (神戸)
12月8-11日
ワークショップ「核内レセプター研究の最前線」諸橋 憲一郎
- 2、Ad4BP/SF - 1 遺伝子の組織特異的発現制御

- 機構 諸橋憲一郎、モハマドズバイル、嶋雄一、日下雅友、杉山紀之、小川英知、福井由宇子
- 3、第9回日本生殖内分泌学会（大阪）
11月27日
「性分化の分子メカニズム」 諸橋憲一郎
 - 4、第1回特定領域「性分化機構の解明」シンポジウム（東京）10月20日
転写群因子による生殖腺の分化、及び性分化制御機構 諸橋 憲一郎
 - 5、第77回日本内分泌学会（京都）
6月24日-26日
シンポジウム「内分泌代謝学におけるシグナル伝達と臨床応用」
「生殖腺の分化（性分化）メカニズム」 諸橋憲一郎、吉岡秀文、福井由宇子
 - 6、第5回 Women's Health Forum（京都）
6月25日
「卵巣機能とダイオキシン」 諸橋憲一郎
 - 7、ステロイドホルモンを考える会（東京） 第3回研究発表会 2月20-21日
教育講演「性分化の分子メカニズム」 諸橋憲一郎
 - 8、The 12th International Congress of Endocrinology, Lisbon, Portugal, Aug. 31 - Sep. 4, 2004, Symposium
Genetic Mechanisms Regulating Sex Determination
Ken-chirou Morohashi
Transcription factors in gonadal sex differentiation
 - 9、The 11th Adrenal Cortex Conference, New Orleans, June 12 - 15, 2004, Symposium
Growth factors from mesonephros implicated in gonadal and adrenal differentiation
K Morohashi, Y Ishimaru, N Sugiyama, H Yoshioka
 - 10、The 3rd International Nuclear Receptor Meeting in Japan April 15 - 17 Osaka
Morohashi K, Baba T, Miura J, Nakamura N, Harada N, Yamamoto M, Fujii - Kuriyama Y
Ah (dioxin) Receptor as a Key Factor in the Regulation of Female Reproduction.
- (一般演題)
- 1、The 11th Adrenal Cortex Conference, New Orleans, June 12 - 15, 2004
Mesonephric Wnt signaling associate with formation of an adreno - gonadal primordium in chick embryos
H Yoshioka, Y Ishimaru, N Sugiyama, M Kasahara, K Morohashi
 - 2、Key stone symposium; Nuclear Receptors: Orphan Brothers/Steroid Sisters Colorado Feb. 28 - March 4
T Komatsu, H Mizusaki, T Mukai, H Ogawa, D Baba, M Shirakawa, S Hatakeyama, K Nakayama, H Yamamoto, A Kikuchi, K Morohashi
SUMO - 1 modification regulates synergistic transcription of Ad4BP/SF - 1.
 - 3、T Baba, J Miura, M Yamamoto, K Morohashi, Y Fujii - Kuriyama
Ah (dioxin) receptor as the key factor to regulate female reproduction.
- 第27回日本分子生物学会（横浜）12月8日 - 11日
- 4、マウス生殖腺における Emx2 遺伝子の機能解析
日下雅友、杉山紀之、福井由宇子、諸橋憲一郎
 - 5、フォークヘッド遺伝子 Fkh3 の機能解析
大脇亜希子、福井由宇子、水崎博文、佐藤優子、諸橋憲一郎
 - 6、マウス Ad4BP/SF - 1 の胎仔副腎特異的なエンハンサーにおける2つのステップ活性化機構
モハマドズバイル、岡早苗、河和寛恵、ファチャ、石原悟、藤井義明、諸橋憲一郎
 - 7、Vinexin の新規 isoform である Vinexin γ はマウス胎仔生殖腺において MAP キナーゼを介した Sox9 の発現を制御している
松山誠、水崎博文、下野明彦、奥村克純、阿部訓也、諸橋憲一郎
 - 8、魚類特有の脳型アロマターゼに対する転写制御因子；LRH - 1
大室有紀、大久保範聡、松田勝、関桂君、鈴木大河、松山誠、王徳寿、小林亨、諸橋憲一郎、長濱嘉孝
- 第12回日本ステロイドホルモン学会（大阪）11月20日
- 9、Ad4BP/SF - 1 の SUMO 化による協調的な転写活性化の制御

小松朋子、水崎博文、向井徳男、小川英知、
馬場大地、白川昌宏、畠山慎次、中山敬一、
山本英樹、菊池章、諸橋憲一郎

10、ダイオキシン類による女性ホルモン用作用発
現の分子メカニズム

馬場崇、三村純正、中村直人、原田信宏、山
本雅之、諸橋憲一郎、藤井義明

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

副腎ステロイド産生における SF-1 および Ubc9, PIAS1 の役割

慶應義塾大学保健管理センター¹、同医学部内科²、同医学部泌尿器科³、
横浜市立大学大学院医学研究科微細形態学⁴

柴田洋孝^{1,2}、須田徳子²、小林佐紀子²、横田健一²、村井彩乃²、池田やよい⁴、
齊藤郁夫¹、村井 勝³、猿田享男²

研究要旨

副腎皮質および性腺の発生および全般的なステロイド産生に重要な核内受容体 SF-1 に対する SUMO 化酵素である Ubc9, PIAS1 の役割を検討した。SF-1 は、副腎皮質の束状層・網状層において CYP11A1, CYP17, CYP11B1 遺伝子の転写活性化に働き、コルチゾール産生を増加させるが、Ubc9, PIAS1 はコルチゾール産生増加に重要であることが、ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞を用いた研究で示された。一方で、Ubc9, PIAS1 はタンパク質の SUMO 化酵素であり、SF-1 は SUMO 化されると転写が抑制されることが最近報告された。そこで、SF-1 の SUMO 化欠失変異体を用いてレポーターアッセイを行うと、野生型 SF-1 と同様に Ubc9, PIAS1 はレポーター活性を増加させたことから、SUMO 化非依存性に SF-1 の coactivator として機能することが示された。Ubc9, PIAS1 の発現を検討した結果、正常副腎皮質の球状層・束状層に発現を認め、原発性アルドステロン症副腎腺腫では、腫瘍部、非腫瘍部ともに同程度の発現を認めたが、クッシング症候群副腎腺腫において、附随正常副腎より有意な PIAS1 の発現低下を認めた。以上の結果より、Ubc9, PIAS1 は SF-1 を SUMO 化修飾することによる転写抑制作用に加えて、SUMO 化非依存性に SF-1 の coactivator として転写活性化作用も有することが示された。また、クッシング症候群副腎腺腫において、特に PIAS1 はその細胞増殖やホルモン産生異常に何らかの関与があることが示唆された。

A. 研究目的

昨年度までの検討で、核内受容体 COUP-TFI は副腎皮質におけるステロイド産生調節に重要な転写因子であり、その新規転写共役因子として同定した Ubc9 および protein inhibitor of activated STAT1 (PIAS1) が COUP-TFI 依存性の CYP11B2 転写活性化に重要な coactivator であることを明らかにした。またその生理学的重要性は、ラット副腎において球状層のみに特異的な高発現を認めたことによっても裏付けられた。本年度は、Ubc9 および PIAS1 の SF-1 に対する役割、またヒト副腎皮質

腺腫における発現を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) Yeast two-hybrid assay、免疫共沈降法による蛋白-蛋白相互作用の検討

昨年度報告したのと同様に施行した。

2) Transient transfection assay

Human CYP11A1, CYP17, CYP11B1 遺伝子プロモーターに luciferase 遺伝子を連結させたレポーター遺伝子を用い、ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞において行った。ルシフェラーゼアッセイは、既

報の方法により施行した。

3) クロマチン免疫沈降法(ChIP assay)

既報の方法により、CYP17 プロモーター領域およびコントロール領域への結合を検討した。

4) Western blot および免疫組織化学

ヒト正常副腎および原発性アルドステロン症、クッシング症候群副腎皮質腺腫を用いて、抗 Ubc9 抗体、抗 PIAS1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 SF-1 抗体 (基礎生物学研究所 諸橋憲一郎教授より 供与)、抗 α -tubulin 抗体 (Oncogene) を用いて行った。

C. 研究結果

1) Ubc9 および PIAS1 と SF-1 の結合の検討

Yeast two-hybrid assay により、Ubc9 および PIAS1 と、核内受容体との結合を検討した結果、COUP-TFI, COUP-TFII, SF-1 と両者とも強い結合を認めしたが、DAX-1, TR β とは結合を認めなかった (図 1 A)。さらに、HEK293 細胞を用いた免疫共沈降法により、SF-1 と Ubc9 および PIAS1 とは同様に結合することが示された (図 1 B)。

2) Ubc9 および PIAS1 による SF-1 依存性転写活性に及ぼす影響の検討

次に、CYP17, CYP11A1, CYP11B1 プロモーター領域を含むレポーターアッセイを施行した。SF-1 の過剰発現により、いずれのレポーター活性も有意に増加し、Ubc9 または PIAS1 の共発現によりさらに増強された。しかし、SF-1 の過剰発現を行わないと、Ubc9 または PIAS1 単独では転写活性化を認めなかった (図 2 A)。また、Gal4-SF-1 と Gal4 応答性レポーターを用いて同様の実験を行うと、Gal4-SF-1 による転写活性化を Ubc9 ま

たは PIAS1 は用量依存性に増強した (図 2 B)。以上の結果から、Ubc9 および PIAS1 は SF-1 の coactivator として機能することが示された。

また、各々の蛋白は、SUMO 化の E2-conjugating enzyme, E3-ligase であることから、SUMO 化酵素活性との関連を検討するために、SUMO 化欠失変異体である Ubc9(C93S), PIAS1(C351S) の影響を検討した。その結果、いずれの変異体も野生型と同様に転写活性化を増強したことから、Ubc9, PIAS1 はその SUMO 化活性とは独立して、SF-1 の coactivator として機能することが示唆された。

3) SF-1, Ubc9, PIAS1 の内因性 CYP17 プロモーター領域への結合の検討

次に、クロマチン免疫沈降法(ChIP assay)により CYP17 プロモーター領域の Ad4 配列および無関係のコントロール領域への結合の有無を検討した。その結果、SF-1, Ubc9, PIAS1 は、内因性の CYP17 プロモーターの Ad4 配列周辺に特異的に動員されていることが示された (図 3)。上記のレポーターアッセイの結果と合わせると、Ubc9, PIAS1 が SF-1 の coactivator として動員されて複合体として機能していることが示唆された。

4) ヒト副腎における発現の検討

正常ヒト副腎における Ubc9, PIAS1 の発現を免疫組織化学により検討した結果、球状層と束状層の外側の細胞層に強い発現を認めた (図 4)。一方、SF-1 は副腎皮質全層の細胞に発現を認めた。

次に、ヒト副腎皮質腺腫における発現を検討した。原発性アルドステロン症副腎では、腫瘍部、非腫瘍部の間に SF-1, Ubc9, PIAS1 の発現量の差を認めなかった (図 5)。一方、クッシング症候群副腎

では、SF-1, Ubc9 は腫瘍部・非腫瘍部の間に発現量の差を認めなかったが、PIAS1 および PIAS3 の発現量が腫瘍部で有意に低下していることが示された (図6)。

D. 考察

SF-1 は、副腎皮質の発生およびステロイド産生に重要な転写因子である。本研究では、COUP-TFI の coactivator として同定した Ubc9, PIAS1 が SF-1 に対しても coactivator として機能することが明らかとなった。また、その機能は SUMO 化酵素活性とは独立していることが示された。さらに、ヒト副腎における発現を検討すると、正常副腎の球状層および束状層の外側に主に局在を認め、その領域で CYP17, CYP11A1, CYP11B1 などのステロイド合成酵素の転写活性化に関与していることが推察された。しかし、病的状態では、クッシング症候群副腎腺腫において、PIAS1, PIAS3 の特異的な発現低下を認め、この腫瘍における細胞増殖やステロイド産生に何らかの関与をしていることが示唆された

最近、核内受容体を含めた多くの転写因子が、多様な翻訳後蛋白修飾により、その機能が調節されることが示されている。その中でも、SUMO 化は最近明らかになり急速に研究されている修飾であり、Ubc9 は E2-SUMO conjugating enzyme, PIAS1 は E3-SUMO ligase であることが示されている。SF-1 は、最近 3つのグループから、SUMO 化修飾を受けること、また SUMO 化修飾の結果、転写抑制に働くことが報告されており、その機序としては核内の nuclear body (speckle) へ SUMO-SF-1 が局在を変化させることや、SUMO-SF-1 が DP103 という RNA helicase 活性を有する

corepressor を動員することなどが示されている。SUMO 化の生物学的重要性はまだ不明の部分が多く、今後の検討が期待される。本研究の結果、Ubc9, PIAS1 が SF-1 の coactivator として機能するという結果は、上記の 3つの報告とは相反する結果であるが、これはこれらの蛋白が SUMO 化非依存性に有する機能と考えられる。培養細胞では、多くの蛋白において SUMO 化蛋白と非 SUMO 化蛋白の割合は、後者が圧倒的に多いという報告が多く、これは SUMO 化が可逆的反応であり、脱 SUMO 化酵素が存在していることによるが、このバランスの調節機構も不明の点が多い。我々は、Ubc9, PIAS1 が有する SUMO 化非依存性に coactivator として機能するというデータを、その他の核内受容体 COUP-TFI, ER α においても明らかにしている。しかし、SUMO 化による転写抑制と coactivator としての転写活性化の切り替えが細胞内および生体内でどのように行われているかが重要であり、今後の検討が必要である。

SF-1 はリガンド不明のオーファンレセプターに属しており、これまでの多くの研究は、SF-1 の蛋白修飾や、SF-1 と結合する蛋白を検討することにより行われてきた。最近、SF-1 および LRH-1 の内因性リガンドとしてリン脂質が同定されており、今後リガンドを用いた検討により、SUMO 化修飾や coactivator としての機能の切り替えなどの機構が明らかになることが期待される。

E. 結論

核内受容体 SF-1 は、コルチゾール産生に重要な CYP17, CYP11A1, CYP11B1 遺伝子の転写活性化にはたらく activator であり、Ubc9 および PIAS1 は

SF-1 と複合体を形成することにより転写活性化を増強する coactivator であることが示された。さらに、この coactivator としての機能は、SUMO 化酵素活性とは独立していることが示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. H. Shibata, S. Kobayashi, I. Kurihara, N. Suda, K. Yokota, Y. Ikeda, A. Murai, I. Saito, W. E. Rainey, T. Saruta. COUP - TF and transcriptional co - regulators in adrenal steroidogenesis. *Endocr Res* 30 : 795-801, 2004.
2. K. Yokota, H. Shibata, S. Kobayashi, N. Suda, A. Murai, I. Kurihara, I. Saito, T. Saruta. Proteasome - mediated mineralocorticoid receptor degradation attenuates transcriptional response to aldosterone. *Endocr Res* 31 : 611 - 616, 2004.
3. S. Kobayashi, H. Shibata, K. Yokota, N. Suda, A. Murai, I. Kurihara, I. Saito, T. Saruta. FHL2, Ubc9 and PIAS1 are novel estrogen receptor α - interacting proteins. *Endocr Res* 30 : 617 - 621, 2004.
4. H. P. H. Neumann, M. Cybulla, H. Shibata, M. Oya, M. Naruse, E. Higashihara, T. Terachi, H. Ling, H. Takami, T. Shin, M. Murai. Current Concepts : New genetic causes of pheochromocytoma and the clinical relevance. *Keio J Med* (in press). 2005
5. I. Kurihara, H. Shibata, S. Kobayashi, N. Suda, Y. Ikeda, K. Yokota, A. Murai, I. Saito, W. E. Rainey, T. Saruta. Ubc9 and PIAS1 activate COUP - TFI - mediated human CYP11B2 gene transcription. *J Biol Chem*, 280 : 6721 - 6730, 2005.
6. H. Shibata, I. Kurihara, S. Kobayashi, N. Suda, K. Yokota, A. Murai, Y. Ikeda, W. E. Rainey, T. Saruta. Adrenal nuclear receptors and co - regulators. *Proceedings of 12th International Congress of Endocrinology*, p. 377 - 381, MEDIMOND S. r. l., Italy, 2004.
7. 柴田洋孝、栗原 勲、小林佐紀子、横田健一、須田徳子、齊藤郁夫、猿田享男. COUP - TF and novel transcriptional coregulators in adrenal cortical steroidogenesis. *ホルモンと臨床* 52 (増刊) : 150-157, 2004.
8. 柴田洋孝、齊藤郁夫. すべての高血圧患者に二次性高血圧の鑑別精査をすべきか? *Medicina* 41 (1) : 127 - 128, 2004.
9. 柴田洋孝、猿田享男. 微小腺腫によるアルドステロン症と特発性アルドステロン症の鑑別診断. *ホルモンと臨床*, 52 (5) : 39 - 47, 2004.
10. 栗原 勲、柴田洋孝、須田徳子、小林佐紀子、横田健一、多田由布子、市原淳弘、今福俊夫、本間桂子、笹野公伸、齊藤郁夫、林 松彦、猿田享男. コルチゾールおよびデオキシコルチコステロンの過剰産生を認めた ACTH 非依存性大結節性過形成によるクッシング症候群の一例. *ホルモンと臨床*, 52 (増刊号) : 122 - 134, 2004.
11. 柴田洋孝. 副腎皮質腫瘍におけるホルモン産生異常と情報伝達系. *内分泌・糖尿病科* 18 (2) : 112 - 119, 2004.
12. 柴田洋孝. 副腎インシデンタローマ 今日の治療指針 2005 年版, p. 553 - 554, 2005.
13. 柴田洋孝、栗原 勲、小林佐紀子、須田徳子、横田健一、村井彩乃、池田やよい、齊藤郁夫、猿田享男. アルドステロン合成酵素遺伝子の転写調節 *ホルモンと臨床*, 52 : 15 - 24, 2004.
14. 柴田洋孝. スピロノラクトン 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) 文光堂, p. 97 - 99, 2004.
15. 柴田洋孝、小林佐紀子、須田徳子、横田健一、栗原 勲、鈴木利彦、齊藤郁夫、林 晃一、猿田享男. 原発性アルドステロン症診断のクリニカルパスと ACTH 負荷副腎静脈サンプリングの意義 *東京女子医科大学雑誌* 74 (9 - 10) : 591 - 595, 2004.
16. 柴田洋孝、横田健一、栗原 勲、須田徳子、小林佐紀子、齊藤郁夫、猿田享男. アルドステロン症における血漿アルドステロン / 活性レニン濃度比