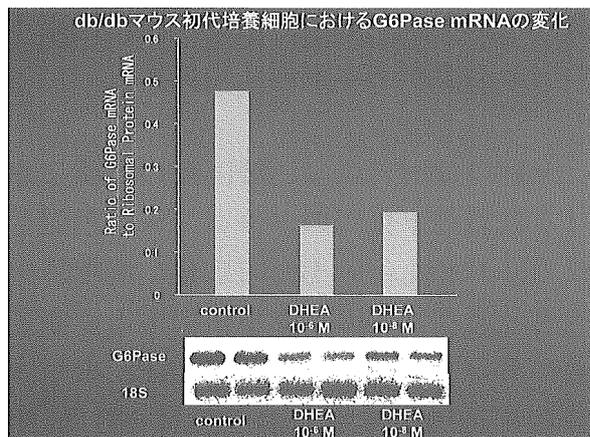


## C. 研究結果

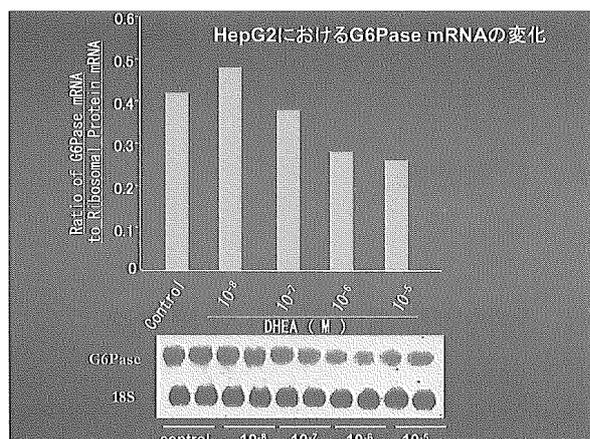
### 1. 初代培養細胞での DHEA の G6Pase mRNA 発現に対する効果

DHEA ( $10^{-8}$ M と  $10^{-6}$ M) 暴露 24 時間後の G6Pase mRNA の発現はそれぞれ対照群と比較し 44.8%、37.5% と濃度依存的に減少していた。



### 2. ヒト培養肝細胞 HepG2 での DHEA の G6Pase mRNA 発現に対する効果

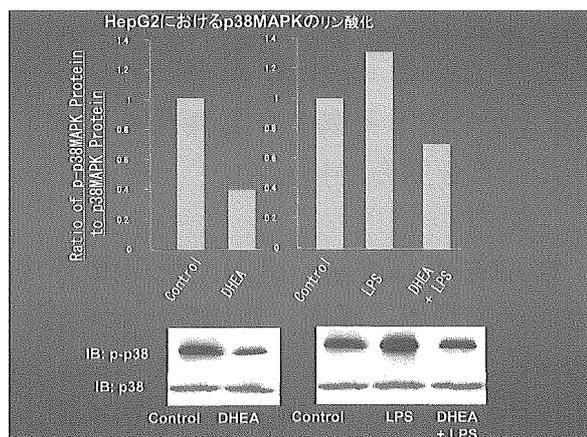
DHEA ( $10^{-8}$ M と  $10^{-7}$ M と  $10^{-6}$ M と  $10^{-5}$ M) 暴露 24 時間後の G6Pase mRNA の発現はそれぞれ対照群と比較し濃度依存的に減少していた。



### 3. DHEA の MAPK のリン酸化に対する効果

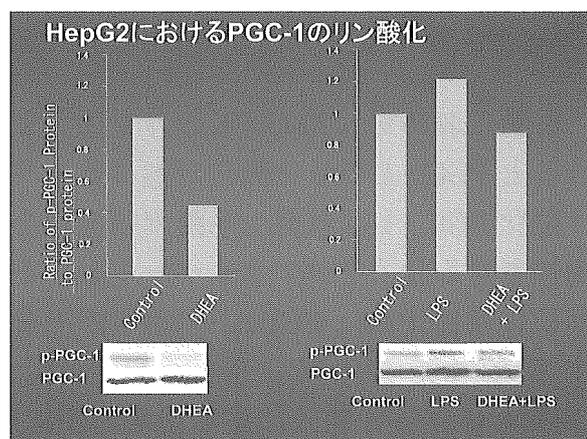
DHEA ( $10^{-5}$ M) 暴露 2 時間後、対照群と比較し 40.3% と減少した。また、LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) 暴露 1 時間のリン酸化 MAPK タンパク発現は対照群と比較し 138.2% と増加した。この条件に DHEA

( $10^{-5}$ M) 暴露 2 時間後、対照群と比較し 71.3% と減少を認めた。



### 4. DHEA の PGC-1 のリン酸化に対する効果

DHEA ( $10^{-5}$ M) 暴露 2 時間後、対照群と比較し 43.3% と減少した。また、LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) 暴露 1 時間のリン酸化 PGC-1 タンパク発現は対照群と比較し 120.2% と増加した。この条件に DHEA ( $10^{-5}$ M) 暴露 2 時間後、対照群と比較し 90.6% と減少を認めた。



## D. 考察

DHEA は、様々な生理作用を持っていることが報告され、生活習慣病の予防の観点から注目されるホルモンである。我々は DHEA の db/db マウスにおけるインスリン抵抗性改善作用について報告した。これにより肝臓糖新生系酵素 glucose - 6 - phosphatase (G6Pase)、fructose - 1, 6 - bisphosphatase (FBPase)

活性と mRNA 発現の上昇による肝糖新生の亢進が、糖尿病 db/db マウスのインスリン抵抗性と高血糖の原因であり、DHEA は、この酵素活性の上昇と mRNA 発現を抑制し、血糖値を正常化することを明らかにした。

DHEA の G6Pase mRNA 低下機序を解明するため、最近、T 細胞白血病株において報告された DHEA-induced protein dual-specificity phosphatase (DDSP) の作用機序に注目し、その下流シグナルである、p38MAPK と DHEA の関係に着目し、今回の検討を行なった。その結果、肝細胞において LPS 刺激後の p38MAPK リン酸化の減少が確認された。また、肝臓で糖新生酵素と PGC-1 の関係はよく知られている。このため DHEA と PGC-1 の関係に注目し、今回検討を行なった。その結果、肝細胞において DHEA の LPS 刺激後の PGC-1 リン酸化減少も確認された。

肝臓において p38MAPK がリン酸化されると PGC-1 のリン酸化が起こる。リン酸化 PGC-1 は糖新生系酵素の発現を増加させる分子をコアクチベートし、それにより G6Pase、FBPase の活性が上昇すると考えられる。今回、我々は、DHEA は、LPS 刺激による p38MAPK、PGC-1 のリン酸化を抑制することを示した。

DHEA が p38MAPK のリン酸化を抑制する機序は明らかではない。肝臓に DDSP が存在すると仮定すれば、DHEA による DDSP の活性化が p38MAPK の脱リン酸化を促進している可能性は考えられる。p38MAPK による PGC-1 のリン酸化は、PGC-1 タンパクの安定化など

を介して PGC-1 の活性化に関与している。PGC-1 は G6Pase の発現調節に関わる転写因子の coactivator であるので、PGC-1 の活性化は G6Pase 発現を増加し、一方 PGC-1 の不活性化は G6Pase 発現の減弱をもたらす。DHEA が G6Pase 発現を減弱させる分子機序の 1 つとして、PGC-1 の不活性化を介する可能性を考察する必要があると考えられる。

今回の検討により、DHEA の肝臓における血糖降下作用のメカニズムが示唆された。しかし、一般に DHEA の血清中生理的濃度は、 $10^{-8}$ M 前後である。本実験において、LPS 誘導 p38MAPK のリン酸化抑制効果を示した濃度は  $10^{-5}$ M であった。更なる DHEA の作用機序解明には、濃度と作用時間における検討を追加する必要がある。

## E. 結論

DHEA は p38MAPK を介し PGC-1 のリン酸化をへて G6Pase mRNA の発現を増加させ糖新生を抑制する可能性が示唆された。

## F. 研究発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(4) グルココルチコイド、GR

# 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

大月道夫、許 欣、紅林昌吾、笠山宗正

大阪大学大学院医学系研究科 分子病態内科学講座

## 研究要旨

炎症担当細胞におけるグルココルチコイド抵抗性を克服し、少量のグルココルチコイド薬による十分な抗炎症作用発揮を目的として、グルココルチコイドレセプター (GR) の発現量変化が標的遺伝子の転写制御に及ぼす影響について解析した。GR 発現ベクターを培養血管内皮細胞に導入し、GR を種々の量発現する内皮細胞を得た。GR の標的遺伝子として、MMTV プロモーターを含むレポーター遺伝子 (転写促進) と TNF  $\alpha$  誘導性 VCAM-1 遺伝子 (転写抑制) をターゲットとし、その転写調節に及ぼすデキサメサゾン (Dex) の用量反応性について検討した。その結果、GR 高発現細胞では低発現細胞に比べてより低用量の Dex で両遺伝子の転写調節が可能であった。GR 発現量の変化に伴う標的遺伝子の転写調節に必要な Dex の用量の変化は、GR の転写抑制作用においてより顕著であった。すなわち、GR 発現量の増加によって転写促進作用より炎症性遺伝子の転写抑制作用を増強させ得ることが判明した。

## A. 研究目的

グルココルチコイド (GC) 薬は、炎症担当細胞において炎症性遺伝子の発現を抑制することで強力な抗炎症作用を発揮する。GC 薬の抗炎症作用の多くは、GR による炎症性遺伝子の転写抑制 (trans-repression) を介した作用であり、GC 薬の副作用の多くはグルココルチコイドレセプター (GR) による標的遺伝子の転写促進 (trans-activation) による作用と考えられる。一般に、抗炎症作用を発揮する GC の用量は、副作用の多くに関連すると考えられる代謝作用に要する GC の用量より多くを必要とする。すなわち、炎症担当細胞では GC 抵抗性の状態を呈していると判断できる。

GR の転写抑制作用は、NF- $\kappa$ B や AP-1 などの炎症性転写因子の活性を抑制することによって担われると考えられている。しかしながら、これら炎症性転写因子の活性を抑制する GR リガンドの用量を規定する因子は不明であった。

我々は、これまでの研究で、核内受容体の発現量を増加させることによって炎症性遺伝子の転写抑制を引き起こす核内受容体リガンドの用量反応性を促進し得ることを報告してきた。しかし、核内受容体の発現量増加によってその標的遺伝子の転写促進作用に対しても同様にリガンドの用量反応性が促進されてしまうと、少量のリガンドで抗炎症作用だけでなく副作用も発揮されてしまう可能性がある。

そこで本研究では、GR 発現量の変化が GR の転写促進作用と転写抑制作用を発揮する GR リガンドの用量反応性にどのように影響するかについての解析を行った。

## B. 研究方法

血管内皮細胞において炎症性サイトカイン TNF  $\alpha$  の刺激により発現が増加する VCAM-1 に対する GC の作用を、VCAM-1 遺伝子のプロモーターを含むレポーター遺伝子の転写活性を指標に解

析した。同時に、種々の濃度の GR 発現ベクターを導入し、GR 発現量が両遺伝子の転写抑制に必要なデキサメサゾン (Dex) の用量応答曲線に及ぼす影響について検討した。

GR により転写促進される標的遺伝子として、MMTV プロモーターを含むレポーター遺伝子を培養血管内皮細胞に導入し、同様の解析を行なった。

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究成果

#### 1. 血管内皮細胞の VCAM-1 遺伝子の転写抑制に必要な GC の用量反応性に及ぼす GR 発現量の影響

培養ウシ大動脈内皮細胞に GR 発現ベクターを導入し、GR を種々のレベルで発現する内皮細胞を得た。GR 低発現細胞では VCAM-1 遺伝子の転写活性の抑制に高濃度の Dex が必要であった。一方、GR 高発現細胞では、より低濃度の Dex により VCAM-1 遺伝子の転写活性の抑制が認められた。

#### 2. 血管内皮細胞の MMTV 遺伝子の転写促進に必要な GC の用量反応性に及ぼす GR 発現量の影響

次に、GR を種々のレベルで発現する培養ウシ大動脈内皮細胞に MMTV レポーター遺伝子を導入し、転写促進作用を引き起こす Dex の用量反応性について検討した。GR 高発現細胞では、GR 低発現細胞に比べてより低濃度の Dex で MMTV プロモーターの活性促進が認められた。

しかし、GR 低発現細胞と GR 高発現細胞における MMTV プロモーター活性促

進に必要な Dex の用量 (EC50) の差異は、VCAM-1 プロモーターの転写抑制に必要な Dex の用量の差異 (IC50) に比べてより軽度であった (表)。

表：GR 低発現血管内皮細胞と GR 高発現血管内皮細胞における VCAM-1 転写抑制と MMTV 転写促進に必要なデキサメサゾンの用量 (最大作用の 50% を惹起する用量を IC50 および EC50 で示した)

	VCAM-1 転写抑制 (IC50) (M)	MMTV 転写促進 (EC50) (M)	IC50/EC50
GR 低発現細胞	$>1 \times 10^{-6}$	$7 \times 10^{-10}$	$>1429$
GR 高発現細胞	$7 \times 10^{-9}$	$3 \times 10^{-10}$	23
GR 低発現 / GR 高発現	143 倍	2.3 倍	

### D. 考察

本研究で、GR を種々のレベルで発現する培養血管内皮細胞を用いて、TNF  $\alpha$  により誘導される VCAM-1 遺伝子の発現を抑制するリガンドの用量応答性について解析した。その結果、① GR 高発現細胞では、GR 低発現細胞に比べて、より低用量の Dex による VCAM-1 遺伝子の転写活性の抑制が認められること、② GR 高発現細胞では、GR 低発現細胞に比べて、より低用量の Dex による MMTV 遺伝子の転写活性の促進が認められること、③ GR 発現量の変化に伴う標的遺伝子の転写調節に必要な Dex の用量の変化は、GR の転写抑制作用においてより顕著であること、を明らかにした。

すなわち、血管内皮細胞の炎症性遺伝子発現抑制作用におけるグルココルチコイド抵抗性は、血管内皮細胞における GR 発現量の低下によってもたらされている可能性が示された。そして、GR 発現量を増加させることによりグルココルチコイド抵抗性を改善させ得ることが判明した。一方、グルココルチコイドの転

写促進作用に対しては、GR 発現量低下がグルココルチコイド抵抗性に関与する度合いは比較的少ないものと思われた。

GR 発現量が GR による炎症性遺伝子の転写抑制作用を引き起こす Dex の用量反応性に大きな影響を与えるという現象は、次のモデルで説明できると思われる。すなわち、GR 低発現細胞では炎症性転写因子の活性を十分に抑制することができないが、GR 高発現細胞では同じ用量の Dex であってもより多くの GR が Dex と結合し活性型となるため炎症性転写因子の活性を十分に抑制できる、というモデルである。

このように、GR の発現量が炎症性遺伝子の発現抑制作用を発揮する GR リガンドの用量を規定することをはじめて証明した。炎症担当細胞の GR の発現量を増加させる薬剤が開発できれば、炎症担当細胞における GC 抵抗性を克服することが可能となり、少量の GC 薬による十分な抗炎症作用を発揮させることができるであろう。

## E. 結論

GR の発現量を増加させることによって、炎症担当細胞における炎症性遺伝子の転写抑制に必要なリガンドの用量を減少させ得ることが明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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

Hashimoto, K., Kasayama, S., Yamamoto,

H., Kurebayashi, S., Kawase, I., and Koga, M. : Strong association of C - reactive protein with body mass index and 2 - hour post - challenge glucose in non - diabetic, non - smoker subjects without hypertension. *Diab. Med.*, 21 : 581 - 585, 2004.

Goya, K., Sumitani, S., Xu, X., Kitamura, T., Yamamoto, H., Kurebayashi, S., Saito, H., Kouhara, H., Kasayama, S. and Kawase, I. : Peroxisome proliferators - activated receptor  $\alpha$  agonists increase nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24 : 658 - 663, 2004.

Sumita, C., Maeda, M., Fujio, Y., Kim, J., Fujitsu, J., Kasayama, S., Yamamoto, I. and Azuma, J. : Pioglitazone induces plasma platelet activating factor - acetylhydrolase and inhibits platelet activating factor - mediated cytoskeletal reorganization in macrophage. *Biochim. Biophys. Acta*, 1673 : 115 - 121, 2004.

Inaba, M., Otani, Y., Nishimura, K., Takaha, N., Okuyama, A., Koga, M., Azuma, J., Kawase, I. and Kasayama, S. : Marked hyperglycemia after androgen deprivation therapy for prostate cancer and usefulness of pioglitazone for its treatment. *Metabolism*, 54 : 55 - 59, 2005.

Kasayama, S., Fujita, M., Goya, K., Yamamoto, H., Fujita, K., Morimoto, Y., Kawase, I. and Miyatake, A. : Effects of alendronate on bone mineral density and bone metabolic markers in postmenopausal asthmatic women treated with inhaled corticosteroids. *Metabolism*, 54 : 85 - 93, 2005.

Yamamoto, H., Kasayama, S., Fujita, M., Fujita, K., Kawase, I. and Miyatake, A. : Improvement of reduced bone mineral density by intermittent cyclical etidronate in postmenopausal asthmatic patients receiving inhaled corticosteroids. *Allergol.*

Int., in press, 2005.

Inaba, M., Saito, H., Fujimoto, M., Sumitani, S., Ohkawara, T., Tanaka, T., Kouhara, H., Kasayama, S., Kawase, I., Kishimoto, T. and Naka, T. : Suppressor of cytokine signaling 1 suppresses muscle differentiation through modulation of IGF-I receptor signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press, 2005.

Kurebayashi, S., Xu, X., Ishii, S., Shiraishi, M., Kouhara, H. and Kasayama, S. : A Novel Thiazolidinedione MCC - 555 Down-regulates Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  - Induced Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule - 1 in Vascular Endothelial Cells. *Atherosclerosis*, in press, 2005.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# 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

田中廣壽<sup>1,2</sup>、吉川賢忠<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>東京大学医科学研究所附属病院アレルギー免疫科

## 研究要旨

副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイドはグルココルチコイドレセプター (GR) に結合してその作用を発現させる。しかし、グルココルチコイド抵抗症の発症機序や、薬理量のグルココルチコイド投与時の治療抵抗性・副作用の発現機構は不明のままであり、副作用のないグルココルチコイドが待望されて久しい。われわれは、新規 GR 機能修飾装置 HEXIM1 を発見した。HEXIM1 は GR と直接結合し、GR のリガンド結合領域を介してその転写調節機能を抑制的に制御する。HEXIM1 のかかる作用は転写伸長因子 P-TEFb 抑制効果とは独立であり、GR に選択性も高く、たとえば、AhR などとは相互作用しない。これらの成果は、グルココルチコイド抵抗性の分子機構を明らかにし、作用副作用分離型リガンド開発の分子基盤を創成する上で重要である。

## A. 研究目的

副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイドはグルココルチコイドレセプター (GR) に結合してその作用を発現させる。しかし、グルココルチコイド抵抗症と診断可能な症例や、薬理量のグルココルチコイド投与時に十分な作用が発現しない症例など、GR レベルの異常によるグルココルチコイドに対する感受性の低下は臨床的に重要であるにもかかわらずその本態は不明のままである。また、グルココルチコイドを治療薬として用いる場合、その作用と副作用の分離は緊急の課題であるが、具体的解決方法は得られていない。一方、グルココルチコイドであるデキサメタゾン (DEX)、ミネラルコルチコイドであるアルドステロン (ALD) は各々のレセプターである GR、ミネラルコルチコイドレセプター (MR) に結合しその作用を発現させる。しかし、前者は MR に、後者は GR にも結合可能であ

り、GR、MR ともに同じ DNA 配列 GRE/MRE に結合することから両ホルモンの作用には redundancy が存在する。最近、心大血管系において MR 以降の経路が線維化などの病態に関わっていることが示唆されており、とくに薬理量 GC 投与時、心などの  $11\beta$ -HSD2 の発現の少ない組織における MR を介したかかる副作用が発現することが懸念される。

そこで、グルココルチコイドの作用機構をとくに GR に焦点をあてて究明して、グルココルチコイド抵抗症の病態を明らかにすること、作用分離型あるいは GR 超選択的 GR 作動薬の分子基盤を構築すること、を目的とした。平成 16 年度は、とくに、GR 拮抗装置 HEXIM1 に関する研究を重点的に行なった。

## B. 研究方法

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

fluorescent protein (GFP) 融合タンパク発現系を用いて検討した。GR の転写活性化作用は GRE/MRE 配列の下流にルシフェラーゼの cDNA を有するレポータープラスミドを用いたトランジェントトランスフェクションによって測定した。GR のタンパク分解酵素による限定分解は、試験管内で 35S 標識した GR をトリプシンによって消化後、SDS-PAGE によって解析した。

#### (倫理面への配慮)

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

### C & D. 研究結果と考察

GR 結合タンパクを GST pull-down 法などを用いて探索した結果、血管平滑筋の分化に関連すると考えられていたタンパクである HEXIM1 が LBD を介して GR と結合することがわかった。HEXIM1 は最近 7SK 低分子核内 RNA と結合して転写伸長因子 P-TEFb を阻害し、RNA polymerase II 依存性転写を抑制することが報告されていた。しかし、GR と HEXIM1 の結合は 7SK 非依存性であり、GR-HEXIM1 複合体中には 7SK ならびに P-TEFb は含まれず、独立した複合体と結論された。HEXIM1 は GR 機能を抑制的に制御し、その標的遺伝子の発現を低下させ、結果的にグルココルチコイド作用を減弱させる。HEXIM1 の発現は、分化段階、組織間で大きく異なっていることから、HEXIM1 は従来知られていなかった、GR 機能を組織特異的に制御する分子として機能している可

能性がある。今後、HEXIM1 自身の発現制御機構などを解明し、グルココルチコイド抵抗性との関連を明確にしたい。また、GR のみならず、HEXIM1 を含めた GR の広義の cofactor の遺伝子多型の解析も、個体の反応性を考慮したグルココルチコイド療法を構築していく上で必須の検討課題であろう。

### E. 結論

HEXIM1 を軸とした研究者ら独自の研究により、グルココルチコイド抵抗症の病態解明に近づいたとともに、作用分離型あるいは GR 超選択的 GR 作動薬が分子基盤の構築されつつある。

### F. 健康危険情報

とくになし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Hiroshi Nakamura, Yuichi Makino, Kensaku Okamoto, Lorenz Poellinger, Kei Ohnuma, Chikao Morimoto, and Hirotoshi Tanaka

TCR - engagement increases HIF - 1  $\alpha$  protein synthesis via rapamycin-sensitive pathway under hypoxic conditions in human peripheral T cells  
J. Immunol. (印刷中)

Kei Ohnuma, Tadanori Yamochi, Masahiko Uchiyama, Kunika Nishibashi, Noritada Yoshikawa, Noriaki Shimizu, Satoshi Iwata, Hirotoshi Tanaka, Nam H. Dang, and Chikao Morimoto  
CD26 up - regulates expression of CD86 on antigen - presenting cells by means of caveolin - 1  
Proc Natl Acad Sci USA 2004 101 : 14186 - 14191

Manotham K, Tanaka T, Ohse T, Kojima I, Miyata T, Inagi R, Tanaka H, Sassa R, Fu

jita T, Nangaku M  
A biological role of HIF - 1 in the Renal  
Medulla  
Kidney International (印刷中)

Noritada Yoshikawa, Keiko Yamamoto,  
Noriaki Shimizu, Sachiko Yamada, Chikao  
Morimoto, and Hirotohi Tanaka  
Glucocorticoid ligands differentially  
regulate the interdomain communication in  
the glucocorticoid receptor  
Mol. Endocrinol. (印刷中)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

とくになし。

# 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

高柳涼一

九州大学医学研究院老年医学

## 研究要旨

グルココルチコイドを始めとするステロイドホルモンは、直接的あるいは間接的に骨代謝調節に大きく関与していることが知られている。近年、ステロイドホルモン受容体を介するシグナルと他のシグナル伝達機構との間のクロストークの重要性が次第に明らかになってきている。これまでの研究で、骨芽細胞におけるシグナル伝達に関与するタンパク質 Runx2 が、ステロイドホルモン受容体を介する転写活性化に対して抑制効果を有し、リガンド結合型受容体の核内 foci 形成を阻害することが明らかになった。また、グルココルチコイドの Wnt シグナル系への作用を、ヒト培養骨芽細胞を用いて解析した。

### A. 研究目的

グルココルチコイド (GC) は、生理量では骨芽細胞の分化増殖に必要であるが、過剰量の投与では逆に骨芽細胞の分化増殖を抑制し、アポトーシスを促進することが知られている。最近、ステロイド性骨粗鬆症の発症要因において、骨芽細胞に対する GC の直接作用が重要であることがわかってきた。

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

### B. 研究方法

#### (1) ルシフェラーゼアッセイによる転写活性化能の解析

Runx2 と核内受容体の両者を骨芽細胞系の細胞株で共発現させて、双方の転写活性化能への影響を、ホルモン応答配列あるいは Runx2 結合配列を有するプ

ロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだものをレポーターとして、ルシフェラーゼ活性を指標にして測定した。

#### (2) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた、タンパク質の細胞内動態の観察

Runx2、TIF2 あるいは GR、AR と、蛍光タンパク質 GFP、YFP との融合タンパク質を作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、それぞれのタンパク質の細胞内動態を、生細胞を用いて観察した。

#### (3) グルココルチコイドの Wnt シグナル系への影響

ヒト培養骨芽細胞を GC で処理し、Wnt シグナルに関連するタンパク質の発現を Northern blot 法で解析した。

#### (4) Dkk-1 のプロモーター解析

GC により転写促進を認めた Dkk-1 のプロモーター領域を単離し、ルシフェラーゼ活性を指標にして解析した。

#### (倫理面への配慮)

ヒト骨芽細胞を用いる実験では、事前に研究目的での利用に関して、提供者の承諾書を取得している。

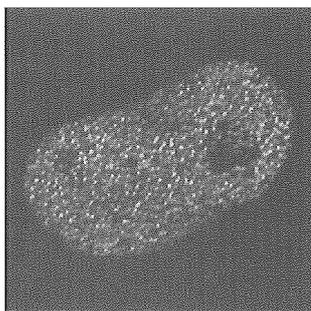
### C. 研究結果

(1) Runx2 は骨芽細胞株においてステロイドホルモン受容体 (GR、AR、ER) を介する転写活性化を抑制した。一方、ER はリガンド依存性に Runx2 を介する転写活性化を促進するが、AR と GR は逆に抑制することが明らかになった。

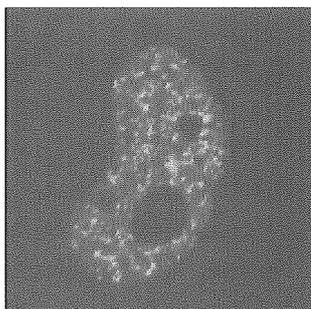
(2) AR、GR はリガンド非存在下では、主として細胞質に局在するが、リガンド処理後は核内に移行して、核内で細かい foci を形成する。Runx2 は核内で不均一に存在するが、リガンド処理後は TIF2 などの核内受容体コアクチベーターとともに、AR、GR と共局在した。AR の細かい均一な核内 foci は、Runx2 の発現によって不均一になることが明らかになった (図 1)。

図 1 Runx2 発現に伴う AR の核内 foci の変化。A は AR-GFP を単独で発現させた細胞。B は AR-GFP に加えて、蛍光ラベルしていない Runx2 を共発現させた細胞。両者ともリガンド処理を行った後に、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

AR-GFP  
DHT (+)

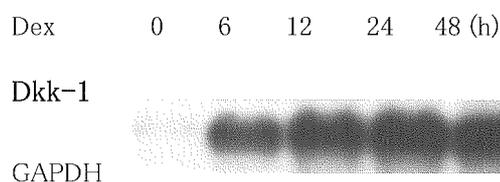


AR-GFP  
Runx2-CMV  
DHT (+)



(3) ヒト骨芽細胞を合成 GC であるデキサメサゾンで処理すると、Wnt のアンタゴニストである Dkk-1 の発現が転写レベルで著しく増加した (図 2)。Dkk-1 の上流約 1kbp のプロモーター解析の結果、3つの GRE 様配列を認め、その中で一番上流のものが、GC による Dkk-1 の転写促進に重要であることが示唆された。

図 2 GC 処理による Dkk-1 発現の誘導  
ヒト骨芽細胞をデキサメサゾン処理して、経時的に RNA を回収し、Northern blot 法で Dkk-1 の発現を調べた。



### D. 考察

GFP 融合タンパク質を用いた解析から、Runx2 が AR や GR のリガンド依存性の核内 foci 形成を抑制することが明らかになった。これまでの我々の研究から、AR や GR の核内 foci 形成は、核内受容体によるリガンド依存性の転写活性化と parallel であることがわかってきた。Runx2 は、AR や GR を通常局在すべき場所から引き離すことによって、AR や GR が標的遺伝子上へ移動して正常な転写複合体を形成することを阻害し、転写活性化の抑制に至ることが推測された。

GC による Dkk-1 の発現誘導によって、Wnt の coreceptor である LRP と複合体を形成することで、Wnt シグナルを抑制すると考えられる。実際に GC は、Wnt による Tcf/Lef 応答遺伝子の転写活性化を強く抑制した。つまり、GC は骨芽細胞での  $\beta$ -カテニン依存性の標準的経路

を抑制して、骨形成機能を抑制することが示唆された。

## E. 結論

ステロイドホルモン受容体は、骨芽細胞の分化増殖において重要な Runx2 や Wnt シグナル系と密接に関与しており、これらの相互作用で骨芽細胞における転写調節を制御していることが示唆された。

## F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ohnaka K, Taniguchi H, Kawate H, Nawata H, Takayanagi R. Glucocorticoid enhances the expression of dickkopf - 1 in human osteoblasts : novel mechanism of glucocorticoid - induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 318 : 259 - 64, 2004.
- 2) 高柳涼一、大中佳三。スタチンは骨形成薬となり得るか? *Medical Science Digest*, 30 : 95 - 98, 2004.
- 3) 大中佳三、高柳涼一。ステロイド性骨粗鬆症発症の分子機構。 *Osteoporosis Japan*, 12 : 317 - 320, 2004.
- 4) Yanase T, Adachi M, Goto K, Takayanagi R, Nawata H. Coregulator - related diseases. *Intern Med.* 43 (5) : 368 - 373, 2004.
- 5) 高柳涼一、名和田新。ステロイド性骨粗鬆症の診断基準と治療開始基準の検討。 *The BONE*, 18 : 351 - 354, 2004.
- 6) 高柳涼一、河手久弥。転写因子と内分泌疾患 II: ステロイドホルモン。 *臨床検査*, 48 : 1159 - 1164, 2004.
- 7) 高柳涼一。慢性副腎不全の急性増悪。 *救急医学*, 28 : 1075 - 1078, 2004.
- 8) 河手久弥、高柳涼一。ホルモン補充療法による抗加齢療法。 *治療学*, 38 : 818 - 820, 2004.
- 9) 河手久弥、呉茵、大中佳三、岡部泰二郎、柳瀬敏彦、名和田新、高柳涼一。DNA 結合ドメインの変異により、アンドロゲン受容体

の核移行障害、核内局在障害および核内での mobility の低下を認めたアンドロゲン不応症の 2 例。 *ホルモンと臨床 増刊号「内分泌興味ある症例 第 45 集」* 52 巻、増刊号 : 134 - 139, 2004.

- 10) Kawate H, Wu Y, Ohnaka K, Nawata H, Takayanagi R. Tob proteins suppress steroid hormone receptor - mediated transcriptional activation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 230 : 77 - 86, 2005.
- 11) Ohnaka K, Tanabe M, Kawate H, Nawata H, Takayanagi R. Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 329 : 177 - 181, 2005.
- 12) Nawata H, Soen S, Takayanagi R, Tanaka I, Takaoka K, Fukunaga M, Matsumoto T, Suzuki Y, Tanaka H, Fujiwara S, Miki T, Sagawa A, Nishizawa Y, Seino Y. Guidelines on the management and treatment of glucocorticoid - induced osteoporosis of The Japanese Society for Bone and Mineral Research (2004 edition). *J Bone Miner Metab*, 23 : 105 - 109.

### 2. 学会発表

- 1) 大中佳三、河手久弥、谷口博、橋本俊彦、名和田新、高柳涼一。スタチンはヒトの骨吸収を抑制する。第 14 回日本老年医学会九州地方会、福岡、平成 16 年 3 月
- 2) 河手久弥、大中佳三、名和田新、高柳涼一。骨芽細胞株におけるステロイドホルモン受容体と Runx2 の相互作用。第 46 回日本老年医学会学術集会総会、千葉、平成 16 年 6 月。
- 3) 河手久弥、呉茵、大中佳三、岡部泰二郎、柳瀬敏彦、名和田新、高柳涼一。アンドロゲン不応症患者由来の変異型 AR の核移行および局在障害。第 41 回臨床分子医学会学術集会、福岡、平成 16 年 7 月。
- 4) 河手久弥、呉茵、大中佳三、高柳涼一。ステロイドホルモン受容体の転写抑制因子としての Runx2。第 22 回日本骨代謝学会学術総会、大阪、平成 16 年 8 月。
- 5) Ohnaka K, Taniguchi H, Kawate H, Nawata H, Takayanagi R. Glucocorticoid enhances the expression of dickkopf - 1 in

primary cultured human osteoblasts : novel mechanism of glucocorticoid - induced osteoporosis. 26th Annual Meeting of American Society of Bone Mineral Research, Seattle USA, Oct. 2004.

6) Kawate H, Wu Y, Ohnaka K, Nawata H, Takayanagi R. Runx2 as a Transcriptional Repressor of Steroid Hormone Receptors. 26th Annual Meeting of the American Society of Bone and Mineral Research, Oct. 2004.

7) 大中佳三。ステロイド骨粗鬆症発症の新機構:グルココルチコイドによる Wnt シグナルの抑制。第 6 回日本骨粗鬆症学会、埼玉、平成 16 年 11 月。

8) Yin W, Kawate H, Ohnaka K, Nawata H, Takayanagi R. N - CoR interacts with AR through both its amino - and carboxyl - terminus and participates in ligand - induced subnuclear compartment of steroid hormone receptors. 第 12 回日本ステロイドホルモン学会、大阪、平成 16 年 11 月。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# 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

加藤茂明

東京大学分子細胞生物学研究所

## 【研究要旨】

以前より我々は当研究室で確立した生化学的手法による核内受容体転写共役因子複合体同定法により、ミネラルコルチコイドレセプター (MR) の転写制御メカニズムの解明を目指してきた。その結果、RHA/CBP 複合体がリガンド選択的に MR の N 末端側 AB 領域に結合し、転写制御する事を明らかにした (H. Kitagawa et al, MCB 2002)。今回はグルココルチコイドレセプター (GR) に関する転写因子としての性状及び共役する補助因子群の検索を行い、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC2 の同定に成功した。更にノックアウトマウスの解析から、核内受容体アンドロゲンセプター (AR) が副腎機能に関与する事を見出した。

## A. 研究目的

近年、核内受容体の転写制御には様々な転写共役因子複合体が関与する事が知られているが、その機能や因子群について未だ不明な点が多い。従って蛋白精製の手法を用いて核内受容体と相互作用する因子群の取得が必要と考えられる。また MR やグルココルチコイドレセプター (GR) 等の核内受容体はリガンド依存的な転写活性化能に加え、恒常的な転写活性を有する領域 AF1 が存在する。しかしながら AF1 に結合する転写共役因子群については不明な点が多い。このような核内受容体の特徴を考え、核内受容体の独特の転写制御機構に迫りたいと考えている。また、生体内において副腎機能に関与する転写制御因子群についても未だ不明な点が多いのが現状である。そこで当研究室で作出した AR 欠損マウスに関し副腎機能の解析を行い、副腎形成に関わる新たな分子機構の解明を目指した。

## B. 研究内容

1 : タンパク質複合体精製系の確立

大量の培養細胞より核抽出液を取得し、核内受容体に結合する因子群を取得した。更に得られた巨大な複合体についてその複合体の機能を明らかにするとともに構成因子を同定した。

2 : タンパク質同定系の発展

MALDI-TOF MS を用いたタンパク質同定法を駆使し、取得した複合体の同定を行った。同定した結果は Western blotting にて確認した。

3 : GR 転写共役因子複合体の同定

一昨年 MR AF1 に結合する因子として RHA/CBP 複合体を同定したが、この時用いた方法は MR AF1 の 1/3 程の大きさを GST と融合した蛋白を bait として結合する因子群を精製した。今回の方法は GR を細胞内に発現させ、これまでと同様に細胞核抽出液から結合因子群をタグ抗体カラムで精製・抽出し SDS-PAGE にて展開し、In gel digestion を行い、MALDI-TOF MS を用いてそれらを同定する。

4 : AF1 転写メカニズムの解明

取得した転写共役因子群が前述の転写

のどの段階で作用する因子であるかを検索する予定である。In vitro クロマチン再構築系を立ち上げ、取得した複合体がクロマチン再構築能があるか、また構造変換機能があるかを明らかにした。

#### 5：ノックアウトマウスの解析

まず副腎の性状について解析を行った。更に血中コルチコステロン濃度の測定や、デキサメタゾン負荷実験を行い、ARの副腎機能における作用機序の解明を目指した。

(倫理面への配慮)

使用している生物材料は主に培養細胞であり、倫理面への配慮は必要ないと考えられる。また実験動物に関しても所定の規則に則って実験を行っている。

### C. 研究結果

#### 1：GR 転写活性化複合体の同定

GR に結合する転写共役因子複合体を同定するために、GR を強制発現させた浮遊 HeLa 細胞株を樹立した。この細胞株を大量培養し、核抽出液からタンパク精製を行った。この精製産物をグリセロールグラジエントでサイズ分画を行った結果、GR と転写因子 AP1 複合体の分離に成功した。

#### 2：クロマチンを介した転写メカニズムの解明

In vitro のクロマチン再構築系を作成する事により、WINAC がクロマチンを再構築し、VDR 依存的なクロマチン構造変換の機能を有する事が明らかになった。

#### 3：AR ノックアウトマウスにおける副腎機能の解明

雄 AR ノックアウトマウスにおいて、副腎腫大および血清コルチコステロン値高値を認めた。更に視床下部及び異常を考慮しデキサメタゾン (Dex) 負荷試験

を行った結果、少量の Dex で制御されず、大量の Dex で抑制された。以上の結果から、AR は視床下部または下垂体を介し副腎機能を亢進する可能性を見出した。

### D. 考察

GR は副腎機能に重要な役割を担う因子の一つであるが、今回の結果から核内受容体と異なるクラスの転写因子 AP1 やヒストン脱アセチル化酵素 HDAC2 と複合体を形成する事を見出した。今後、下垂体等における GR と AP1 のクロストークについての新たな機能が期待できる。また AR の欠損が副腎腫大を引き起こす事を見出した。今後、アンドロゲンの副腎機能における役割を明確にする事で新たな治療法が確立出来ると考えられる。

### E. 結論

GR の強制発現細胞を用い生化学的な手法で精製を行った結果、GR と AP1 のクロストークを担う因子として HDAC2 の同定に成功した。この複合体は GR のリガンド依存的な転写抑制に関わると思われる、今後の解析が注目される。また AR ノックアウトマウスの結果から、AR が視床下部又は下垂体において機能し、副腎形成に関わる事を見出した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Murayama, A., Kim, M., Yanagisawa, J., Takeyama, K., Kato, S.: Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J.*, 23, 1598 - 1608, 2004.

Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A., Yamada,

- T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Nakamura, T., Yoshimura, K., Yshizawa, T., Metzger, D., Chambon, P., Kato, S.: Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 1673 - 1678, 2004.
- Kouzmenko, A.P., Takeyama, K., Ito, S., Furutani, T., Sawatsubashi, S., Maki, A., Suzuki, E., Kawasaki, Y., Akiyama, T., Tabata, T., Kato, S.: Wnt/beta - catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J. Biol. Chem*, 279, 40255 - 40258, 2004.
- Maki, A., Sawatsubashi, S., Ito, S., Shirode, Y., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Kouzmenko, A., Takeyama, K., Kato, S.: Juvenile hormones antagonize ecdysone actions through corepressor recruitment to EcR/USP heterodimers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320, 262 - 267, 2004.
- Sawatsubashi, S., Maki, A., Ito, S., Shirode, Y., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Kouzmenko, A., Takeyama, K., Kato, S.: Ecdysone receptor dependent gene regulation mediates histone poly (ADP - ribosyl) ation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320, 268 - 272, 2004.
- Takeyama, K., Ito, S., Sawatsubashi, S., Shirode, Y., Yamamoto, A., Suzuki, E., Maki, A., Yamagata, K., Zhao, Y., Kouzmenko, A., Tabata, T., Kato, S.: A novel genetic system for analysis of coactivators for the N - terminal transactivation function domain of the human androgen receptor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 1209 - 1215, 2004.
- Wada, O., Oishi, H., Takada, I., Yanagisawa, J., Yano, T., Kato, S.: BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220. *Oncogene*, 23, 6000 - 6005, 2004.
- Ito, S., Takeyama, K., Yamamoto, A., Sawatsubashi, S., Shirode, Y., Kouzmenko, A., Tabata, T., Kato, S.: In vivo potentiation of human oestrogen receptor  $\alpha$  by Cdk7 - mediated phosphorylation. *Genes to Cells*, 9, 983 - 992, 2004.
- Kato, S., Fujiki, R., Kitagawa, H.: Vitamin D receptor (VDR) promoter targeting through a novel chromatin remodeling complex. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.*, 89 - 90, 173 - 178, 2004.
- Kato, S., Matsumoto, T., Kawano, H., Sato, T., Takeyama, K.: Function of androgen receptor in gene regulations. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.*, 89 - 90, 627 - 633, 2004.
- Unno, A., Takada, I., Takezawa, S., Oishi, H., Baba, A., Shimizu, T., Tokita, A., Yanagisawa, J., Kato, S.: TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004 (in press) .
- Tateishi, Y., Kawabe, Y., Chiba, T., Murata, S., Ichikawa, K., Murayama, A., Tanaka, K., Baba, T., Kato, S., Yanagisawa, J.: Ligand-dependent switching of ubiquitin - proteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO J.*, 23, 4813 - 4823, 2004.
- Meindl, S., Rot, A., Hoetzenecker, W., Kato, S., Cross, S., Elbe - Burger, A.: Vitamin D receptor ablation alters skin architecture and homeostasis of dendritic epidermal T cells. *British J. Dermatology*, 2004 (in press).
- Ikeda, K., Ogawa, S., Tsukui, T., Horie-Inoue, K., Ouchi, Y., Kato, S., Muramatsu, M., Inoue, S.: Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor mediated transcription. *Mol. Endocrinol.*, 18, 1131 - 1143, 2004.
- Kahata, K., Hayashi, M., Asaka, M., Hellman, W., Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Kato, S., Imamura, T., Miyazono, K., Regulation of transforming growth factor -  $\beta$  and bone morphogenetic protein signalling by transcriptional coactivator GCN5. *Genes to Cells*, 9, 143 - 151, 2004.

- Aihara, K.I., Azuma, H., Akaike, M., Ikeda, Y., Yamashita, M., Sudo, T., Hayashi, H., Yamada, Y., Endoh, F., Fujimura, M., Yoshida, T., Yamaguchi, H., Hashizume, S., Kato, M., Yoshimura, K., Yamamoto, Y., Kato, S., Matsumoto, T. : Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice. *J. Biol. Chem.*, 279, 35798 - 35802, 2004.
- Yamada, T., Kawano, H., Sekine, K., Matsumoto, T., Fukuda, T., Azuma, Y., Itaka, K., Chung, U.I., Chambon, P., Nakamura, K., Kato, S., Kawaguchi, H.: SRC - 1 is necessary for skeletal responses to sex hormones in both males and females. *J. Bone Miner. Res.*, 19, 1452 - 1461, 2004.
- Kawasumi, M., Okada, T., Yamada, M., Miyamae-Kaneko, M., Matsuoka, M., Nakahara, J., Tomita, T., Iwatsubo, T., Kato, S., Aiso, S., Nishimoto, I., Kouyama, K. : Targeted introduction of V642I mutation in amyloid precursor protein gene causes functional abnormality resembling early stage of Alzheimer's disease in aged mice. *Eur. J. Neurosci.*, 19, 2826 - 2838, 2004.
- Segawa, H., Kaneko, I., Yamanaka, S., Ito, M., Kuwahara, M., Inoue, Y., Kato, S., Miyamoto, K. : Intestinal Na - Pi cotransporter adaptation to dietary Pi content in vitamin D receptor null mice. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 287, F39 - F47, 2004.
- Capuano, P., Wagner, C.A., Radanovic, T., Bacic, D., Kato, S., St-Arnaud, R., Murer, H., Biber, J.: Intestinal and renal adaptation to a low Pi-diet of type II Na-Pi-cotransporters in VDR and  $1\alpha$ -OHase deficient mice. *AJP/Cell*, 2004 (in press) .
- Peters, J.M., Kato, S., Gonzalez, F.: The United States-Japan workshop on: the role of nuclear receptors in carcinogenesis. *Mol. Carcinogenesis*, 41, 77 - 84, 2004.
- Uchida, E., Kagawa, N., Sasaki, T., Urushino, N., Sawada, N., Kamakura, M., Ohta, M., Kato, S., Inouye, K. : Purification and characterization of mouse CYP27B1 overproduced by an Escherichia coli system coexpressing molecular chaperonins GroEL/ES. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 323, 505 - 511, 2004.
- Fan, W., Yanase, T., Wu, Y., Kawate, H., Saitoh, M., Oba, K., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Yanagisawa, J., Kato, S., Takayanagi, R., Nawata, H. : Protein kinase A potentiates Ad4BP/SF - 1 transactivation by re - integrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, GCN5/TRRAP, and suppressor, DAX - 1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol. Endocrinol.*, 18, 127 - 141, 2004.
- Nakagawa, K., Kawaura, A., Kato, S., Takeda, E., Okano, T. :  $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D3 is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis*, 26, 429 - 440, 2005.

# 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

福田 剛、鈴木 貴、笹野公伸

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

## 研究要旨

Urocortin (Ucn) は CRF と受容体 (CRF<sub>1</sub> と CRF<sub>2</sub>) を共有するストレス関連ペプチドであり種々の末梢組織でストレス反応を制御している可能性が示唆されている。そこで本研究では Ucn1、Ucn3、CRF<sub>1</sub>、CRF<sub>2</sub> のヒト副腎及びその病変における発現動態を免疫組織化学、mRNA in situ hybridization、RIA、RT-PCR を用いて検討した。Ucn1 は副腎髄質に、Ucn3 は副腎皮質と髄質双方に、CRF<sub>1</sub> と CRF<sub>2</sub> は副腎皮質のうち束、網状層で発現を認め、腺腫、癌、褐色細胞腫などではいずれの発現も低下していた。以上より Ucn3 が主に正常副腎皮質で CRF-R を介して autocrine 的に正常副腎の機能の制御に関与している事が示唆された。

## A. 研究目的

Urocortin (Ucn) は近年同定された神経ペプチドであり、corticotropin releasing factor (CRF) のファミリーである。ヒトでは少なくとも Ucn1 と Ucn3 が発現していることが知られている。Ucn1 は CRF と相同性が 43% であり、一方 Ucn3 は 26% の相同性を有する。Ucn1 は CRF のレセプターである CRF1 型レセプター (CRF<sub>1</sub>) とそのファミリーである CRF2 型レセプター (CRF<sub>2</sub>) に結合することが知られており、一方 Ucn3 は CRF<sub>2</sub> にのみ結合する。このように CRF システムはヒトにおいて 3 つのリガンドと 2 つのレセプターより構成され、生体内において様々な機能に関与している。

近年の数多くの研究より、CRF システムはストレス入力に対する応答に関与する因子として知られてきた。脳内において主に CRF<sub>1</sub> を介するシグナルは催不安作用を、CRF<sub>2</sub> を介するシグナルは抗不安作用を引き起こすことが明らかになってきた。また視床下部-下垂体-副腎系

(HPA axis) においては CRF の分泌が adrenocorticotrop hormone (ACTH) の産生を促進することから、CRF システムがストレス入力に対する HPA axis の応答に関与していると考えられている。

ところが、現在のところ副腎における CRF システムを構成する因子の局在については詳細な検討がなされていない。そこで本研究では副腎及びその病変における Ucn1、Ucn3、CRF1、CRF2 の局在について免疫組織化学と mRNA in situ hybridization 法を用ることにより、検討することとした。

## B. 研究方法

### 1. 検体

正常副腎については 1998 年-2004 年に東北大学において施行された剖検症例を検討標本として用いた。また副腎腫瘍については 1998 年-2004 年に施行された手術症例を検討標本として用いた。標本は 10% ホルマリン固定後、パラフィンブロックを作成した。

## 2. 免疫組織化学

1次抗体として用いた抗Ucn1抗体および抗Ucn3抗体は共同研究者である高橋和広氏（東北大学大学院医学系研究科分子生物学教室）より受領した。また抗CRF<sub>1</sub>抗体はSanta Cruz社より、抗CRF<sub>2</sub>はAbCam社より入手した。抗原賦活化処理にautoclaveを用い、Avidin-biotin complex法を用いてDAB発色を行った。また抗Ucn1抗体および抗Ucn3抗体については抗原ペプチドをペプチド研より購入し、吸収試験を行い、抗体の反応性を確認した。

## 3. in situ hybridization 法

機器にBenchmark (Ventana社)を、試薬にRibo Map Kit (Ventana社)、Blue Map Kit (Ventana社)を用い、自動染色によりin situ hybridization法を行った。プローブはUcn1は468bp (GenBank: AF038633; 2256-2954)、Ucn3は469bp (GenBank: AF361943; 5-473)とし、RT-PCR法を用いてそれぞれのcDNAの抽出を行い、pSPT19 (Roche Diagnostics社)に組み込んだ。プローブはセンス鎖、アンチセンス鎖双方作成し、Ucn1は3ng/slide、Ucn3は100ng/slideとなるようにハイブリダイゼーション反応を行った。

## 4. 倫理面への配慮

本研究計画は東北大学倫理委員会の承認(2003-097)を得て施行している。

## C. 研究成果

### 1. ヒト正常副腎におけるUcn1とUcn3の発現

正常副腎におけるUcn1 (図1A)とUcn3 (図1B)の免疫染色の結果を提示する。また比較対照として副腎髄質細胞

のマーカーであるクロモグラニンA (図1C)の結果を示す。Ucn1は副腎髄質に強いシグナルが見られ、副腎皮質にはほとんどシグナルが見られなかった。一方Ucn3は副腎皮質全体にシグナルが見られ、髄質にはほとんどシグナルが見られなかった。次に正常副腎におけるUcn1 (図2A)とUcn3 (図2B)のmRNA in situ hybridization法の結果を提示する。Ucn1のアンチセンス鎖 (図2A)では副腎髄質に強いシグナルが見られたが、Ucn1のセンス鎖では (図2C)ではシグナルが見られなかった。一方Ucn3のアンチセンス鎖では (図2B)副腎皮質に弱いシグナルが見られたが、Ucn3のセンス鎖 (図2D)ではシグナルが見られなかった。

### 2. ヒト正常副腎におけるCRF<sub>1</sub>とCRF<sub>2</sub>の発現

CRF<sub>1</sub> (図1D)とCRF<sub>2</sub> (図1E)の結果を示す。CRF<sub>1</sub>は網状層、束状層に強いシグナルが見られ、球状層、髄質にも弱いシグナルが見られた。一方CRF<sub>2</sub>は網状層に強いシグナルが見られ、束状層、球状層にもシグナルが見られ、髄質にも弱いシグナルが見られた。

### 3. 鏡面像を用いた解析

副腎皮質にシグナルが見られたUcn3とそのレセプターであるCRF<sub>2</sub>について、同一の皮質細胞で発現しているかどうかを検討する目的で鏡面像による解析を3例の正常副腎標本を用いて行い、それぞれの陽性細胞について検討を行った。結果は図1F (Ucn3)と図1G (CRF<sub>2</sub>)に示す。副腎皮質細胞のUcn3陽性細胞の85%以上でCRF<sub>2</sub>陽性のシグナルが見られた。