

forskolinほど強力ではなかったものの SF1-ArPII の相互作用を増強することが判明した。また aromatase promoter II 4Kbの欠失変異を用いた検討から、ArPII の -516bp 断片中の SF-1 サイトは AtrazineによるArPII の活性化に必須であることが判明した (図 3B)。atrazine/simazineがSF-1依存性のArPII 活性を増強する機序として、SF-1 発現量を変化させる可能性は Western blottingにより否定された。次に我々は、atrazine/shimazineがSF-1と結合しうるか否かをBiacore T100システムによる表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて検討した。精製SF-1 と内因性リガンドとして最近報告された16PCとの結合を検討したところ、強度の結合を認めた(図4A)。一方、atrazineは弱いSPRであったが、SF-1 との濃度依存性の結合を認め(図4B)、弱いながらも外因性リガンドである可能性が示唆された。一方、shimazine及びネガティブコントロールのp-nitrotolueneとSF-1の結合を認めなかった。

D. 考察

atrazine/shimazineがaromatase 活性を上昇させるか否かについては、論争があり、細胞によっては上げ、細胞によっては不変であるとの報告がなされていた (7, 8)。今回の研究において、SF-1発現量の低いKGN細胞では、atrazineの効果が認められないのに対し、KGN細胞の60倍以上のSF-1 の高発現を認める副腎皮質細胞癌H295R細胞では、atrazine により aromatase活性の上昇を認めること、その差異は、SF-1 の発現量の差異によって生じていることを明らかにした。報告者によるaromatase活性の上昇に関する議論の差異もこの点に起因する可能性がある。このことは極めて重要で、ヒトにお

いてSF-1高発現という条件下では aromatase の活性上昇により atrazineが 高エストロゲン環境を作り出す可能性を示唆しており、臨床疫学的に懸念されているエストロゲン依存性癌の乳癌や前立腺癌との関連が示唆される。

SF-1 は長い間、内因性リガンドが未同定のオーファン受容体として認識されてきた。極く最近、その生理学的意義はいまだ未解明であるが、リン脂質がSF-1の内因性リガンドとして同定された (9, 10)。今回の研究ではその内因性リガンドの一つである16-PCがSF-1と相互結合することを *in vitro* における親和性研究によって初めて示し得た。また、16PC に比べると極めて弱いですが、atrazine はSF-1 に結合することを示し、SF-1の外因性リガンドとして作用する可能性を提示した。atrazineのaromatase活性の上昇機序としてphosphodiesterase活性の抑制を介したcAMPの上昇による機序が報告されているが、それのみではなくSF-1のリガンドとしてSF-1 と aromatase promoter IIの相互作用を増強する機序も関与している可能性が示唆された。

E. 結論

atrazine/simazine による ヒト aromatase 遺伝子の転写活性化は、aromatase promoter II を介して転写レベルで起こり、その転写活性の刺激にはSF-1の高発現が、必須であった。atrazine とSF-1の直接的結合が認められたことから、atrazineはSF-1の外因性リガンドとして作用している可能性が示唆された。

F. 関連論文

- 1) Solomon, K., et al., Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters.

- Environ. Toxicol. Chem., 15: 31-76, 1996
- 2) 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 adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor 1 transactivation by reintegrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, general control nonderepressed-5/ transformation/transcription domain -associated protein, and suppressor, dosage-sensitive sex reversal-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol Endocrinol.* 18:127-41, 2004
 - 3) Nishi Y, Yanase T, Mu Y, Oba K, Ichino I, Saito M, Nomura M, Mukasa C, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Kashimura Y, Haji M, Nawata H. Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology* 142:437-45, 2001
 - 4) Gondo S, Yanase T, Okabe T, Tanaka T, Morinaga H, Nomura M, Goto K, Nawata H: SF-1/Ad4BP Transforms primary long-term cultured bone marrow cells into ACTH-responsive steroidogenic cells. *Genes to Cells* 9: 1239-1247, 2004
 - 5) Fan W, Yanase T, Morinaga H, Mu YM, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, Nawata H. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor inhibits aromatase transcription via nuclear factor-kappa B. *Endocrinology* 146:85-92. 2005
 - 6) Komatsu T, Mizusaki H, Mukai T, Ogawa H, Baba D, Shirakawa M, Hatakeyama S, Nakayama KI, Yamamoto H, Kikuchi A, Morohashi K. Small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) modification of the synergy control motif of Ad4 binding protein/steroidogenic factor 1 (Ad4BP/SF-1) regulates synergistic transcription between Ad4BP/SF-1 and Sox9. *Mol Endocrinol.* 18: 2451-62, 2004
 - 7) Morinaga H, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, Nawata H. A benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim, induce aromatase activity in a human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN). *Endocrinology* 145:1860-9, 2004
 - 8) Heneweer, M., M. van den Berg, and J. Sanderson, A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as in vitro screening tools for effects on aromatase. *Toxicol. Letters* 146: 183-194, 2004
 - 9) Li, Y., et al., Crystallographic identification and functional characterization of phospholipids

- as ligands for the orphan nuclear receptor Steroidogenic Factor-1. *Mol. Cell*, 17: 491-502, 2005
- 10) Krylova, I., et al., Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell* 120: 343-355, 2005
- G. 研究発表
論文発表
- (1) Wu Y, Ghosh S, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Hu Y: The orphan nuclear receptor NURR1 and NGFI-B modulate aromatase gene expression in ovarian granulosa cells: A possible mechanism for repression of aromatase expression upon luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 146(1): 237-46, 2005
- (2) Nishi Y, Hosoda H, Mori K, Kaiya H, Sato T, Fukue Y, Fukushima N, Yanase T, Nawata H, Kangawa K, Kojima M: Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghreln. *Endocrinology* 146(5): 2255-64, 2005
- (3) Fan W, Yanase T, Wei L, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, Nawata H: Activation of peroxisome proliferator activated receptor γ and retinoid X receptor inhibits CYP19 transcription through NF- κ B in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 146(1): 85-92, 2005
- (4) Fan W, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Sato T, Kawano H, Kato S, Nawata H: Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity due to decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. *Diabetes* 54(4): 1000-1008, 2005
- (5) Ashida K, Goto K, Zhao Y, Okabe T, Yanase T, Takayanagi R, Nomura M, Nawata H: Dehydroepiandrosterone negatively regulates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by a novel PTPN7 locus-derived transcript. *Biochim Biophys Acta (Gene Structure Exper)* 1728(1-2): 84-94, 2005
- (6) Taniyama M, Tanabe M, Saito H, Ban Y, Nawata H, Yanase T: Subtle 17 α -hydroxylase/17,20-lyase deficiency with homozygous Y201N mutation in an infertile women. *J Clin Endocrinol Metab* 90(5): 2508-2511, 2005
- (7) Nagasawa E, Abe Y, Nishimura J, Yanase T, Nawata H, Muta K: Pivotal role of peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR gamma) in regulation of erythroid progenitor cell proliferation and differentiation. *Experimental Hematology* 33: 857-64, 2005
- (8) Kawate H, Wu Y, Ohnaka K, Tao RH, Nakamura K, Okabe T, Yanase T, Nawata H, Takayanagi R. Impaired nuclear translocation, nuclear matrix targeting, and

intranuclear mobility of mutant androgen receptors carrying amino Acid substitutions in the deoxyribonucleic Acid-binding domain derived from androgen insensitivity syndrome patients. J Clin Endocrinol Metab. 90:6162-9. 2005

- (9) Chen G, Nomura M, Morinaga H, Matsubara E, Okabe T, Goto K, Yanase T, Zheng H, Lu J, Nawata H.: Modulation of androgen receptor transactivation by FoxH1. A newly identified androgen receptor corepressor. J Biol Chem. 280:36355-63. 2005
- (10) Harris SE, Chand AL, Winship IM, Gersak K, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Shelling A; INHA promoter polymorphisms are associated with premature ovarian failure. Mol Hum Reprod 2006 in press
- (11) Fan S, Goto K, Chen G, Morinaga H, Nomura M, Okabe T, Nawata H, Yanase T: Identification of the functional domains of ANT-1, a novel coactivator of the androgen receptor. Biochem Biophys Res Commun. 341:192-201, 2006

学会発表

- (1) 柳瀬敏彦、権藤重喜、岡部泰二郎、名和田 新: シンポジウム 9「内分泌領域における再生医療学」骨髄間葉系細胞からのステロイド産生細胞の再生. 第 78 回日本内分泌学会(東京) 2005 年 7 月 1 日-3 日
- (2) 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: SF-1/Ad4BP は長期培養骨髄細胞を副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)反応性ステロイドホルモン産生細胞に変化させる.

第 78 回日本内分泌学会(東京) 2005 年 7 月 1 日-3 日

- (3) 岡部泰二郎、水木一仁、権藤重喜、野村政壽、後藤公宣、柳瀬敏彦、名和田 新: 下垂体出血による続発性副腎不全および低ナトリウム血症補正後の橋外髄鞘崩壊症を併発した GH・PRL 複合欠損症と考えられる一例 第 78 回日本内分泌学会(東京) 2005 年 7 月 1 日-3 日
- (4) 柳瀬 敏彦: ドーパミントランスポータ異常 KIGS Japan National Conference 2005. 9.10

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

なし

Atrazine/Simazine はSF-1 依存性ArPII転写活性を増強する

(NIH-3T3: ArPII-Luc+pRL-CMV+SF1)

図 1 A

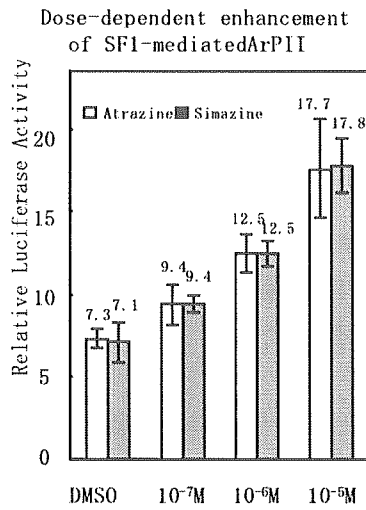


図 1 B

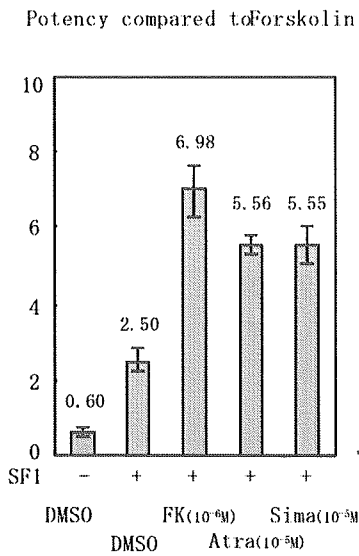


図 1 C

Atrazine/Simazine affect SF1 mediated ArPII in NIH-3T3 cells

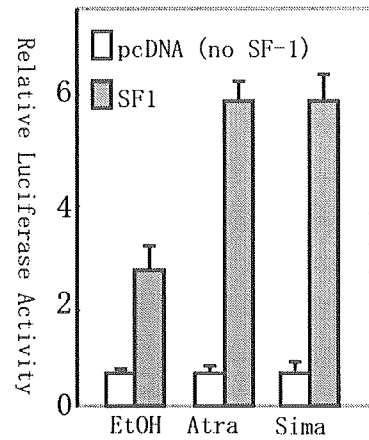


図 2 A

Atrazine/SimazineはH295RのArPII活性を増強する (SF1 の外因性発現なし)

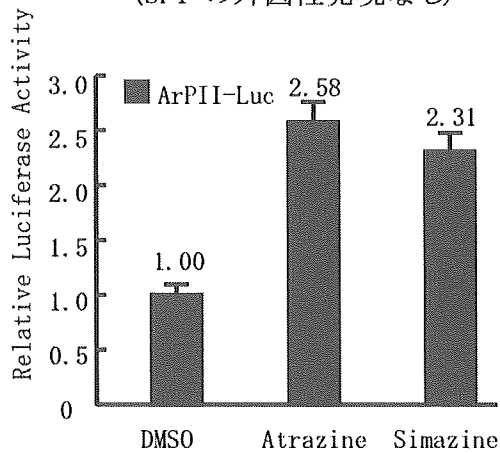


図 2 B

内因性 SF1 mRNA (Real Time PCR)

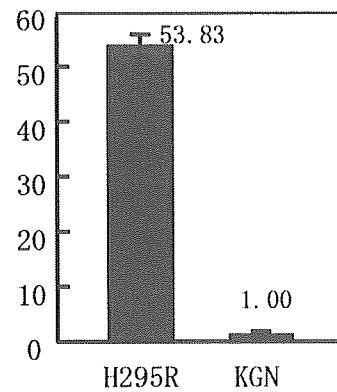


図 3A

Adx-SF1 導入はKGN細胞のAtrazine /Simazineに対するAromatase 遺伝子の反応性を回復させる

Aromatase活性

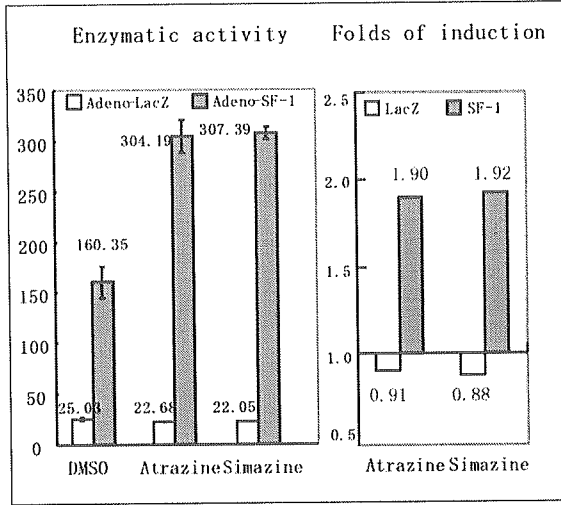


図 3B

ArPII のSF-1 サイトはAtrazine によるArPII の活性化に必須

Atrazine刺激下でのArPII プロモーターの欠失と転写活性 (H295R 細胞)

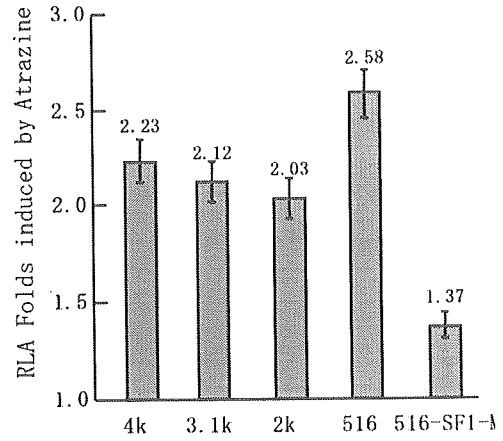
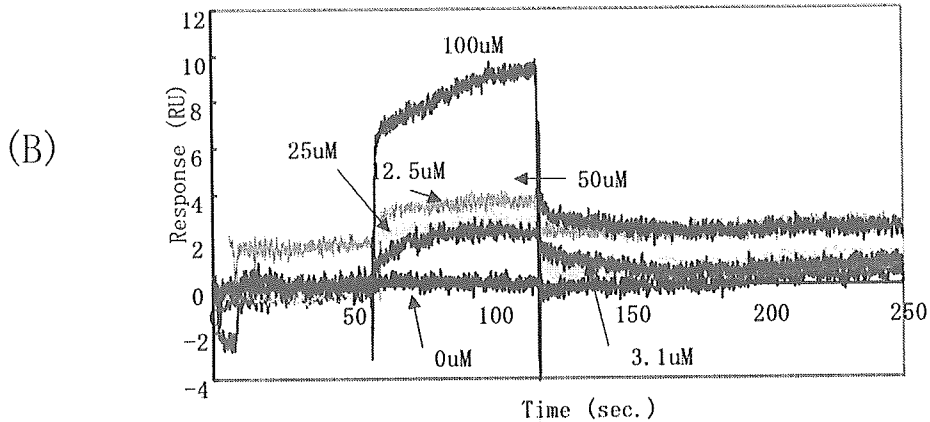
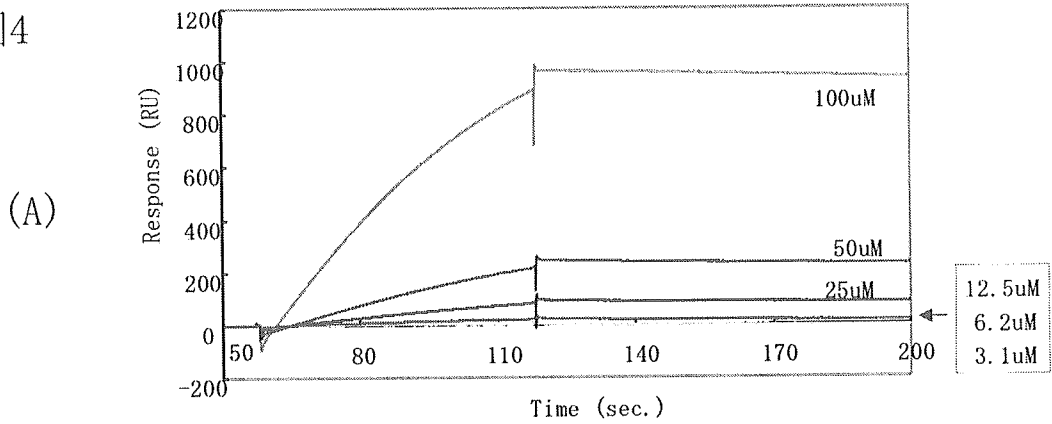


図 4



(2) グルココルチコイド

胎生期を起点としたメタボリックシンドローム発症と

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase による

組織特異的なグルコルチコイド代謝について

ー糖尿病合併妊娠モデルを中心にー

大関 武彦、藤澤 泰子、中川 祐一、中西 俊樹
浜松医科大学小児科

【研究要旨】

メタボリックシンドロームの重要な発症要因として、内臓脂肪におけるグルコルチコイド作用の増強が考えられている。一方、近年増加している糖尿病合併妊娠からの出生群は、その後の耐糖能異常・肥満・高血圧などの、いわゆるメタボリックシンドロームに関連する疾患のハイリスク群であることが疫学的研究より知られている。胎生期における糖代謝の異常がグルコルチコイド代謝に変化をきたし、将来におけるメタボリックシンドローム発症の潜在的因子のひとつとなっているのではないかと仮定し研究を行った。今回は、1型糖尿病ラットより出生した仔ラットをその後12週齢まで追跡し、10週齢における耐糖能異常と12週齢における肝臓および脂肪組織での11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β HSD1) アディポネクチン、レプチンの遺伝子発現と組織内グルコルチコイド濃度を検討した。糖代謝は10週齢という比較的早い週齢ですでに変化していた。体重の変化は性差があり、胎児発育が障害されなかった群（ヒトでの糖尿病合併妊娠と共通）では、Femaleで過体重傾向が明らかとなった。またグルコルチコイド標的臓器の代表である肝臓・脂肪組織において、11 β HSD1の発現に性差が認められた。Maleにおいて、肝臓・脂肪における11 β HSD1 mRNAの発現増強が確認されており、グルコルチコイド代謝の変化の存在が示唆された。しかしながら、同群における組織におけるグルコルチコイド濃度は低下しており、アディポネクチンの遺伝子発現も低下していたことより、活性型グルコルチコイドを産生する働きが強いと考えられる11 β HSD1ではあるが、今回検討した群（糖尿病母体から出生した雄ラット）では、逆方向の働きをしている可能性も考えられ、酵素の方向性を規定する条件なども含めて、今後の検討課題であるといえる。

A. 研究目的

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β HSD1) および type 2 (11 β HSD2) は糖質ステロイド代謝にとって重要な酵素であることはよく知られてい

る。特に11HSD1はグルコルチコイド標的臓器である、肝臓・脂肪組織に存在し、肥満やそれに伴う種々の代謝異常の病態に関わっていることが報告されている。昨年度の報告会において、糖尿病ラット

より出生した仔ラットにおいて12週齢の段階で脂肪組織および肝臓において11HSD1 遺伝子発現が増強していることを報告した。今回我々は、同様のモデルにおいて、組織内のグルココルチコイドレベルと、加えてグルココルチコイド関連遺伝子でもあるアディポネクチン、レプチンも検討を行った。また、雌雄差についても検討を加えた。

B. 研究方法

(対象)

1) 8週令の雄 Sprague-Dawley (SD) ラットにストレプトゾトシン (STZ) を 25~35 mg 投与したのち交配し、1型糖尿病妊娠ラットを作成した。

2) 出生した新生仔ラットの体重を測定 (day1) し、平均体重/1母体を、対照群である仔ラット (day1) の平均体重と比較し、子宮内発育遅延があった群 ($\leq -2SD$) (DM-R) となかった群 (DM-NR) の2群に分類し検討した。(図1)

(方法)

1) 週齢4、6、8、12に体重を測定した。

2) 10週齢にOGTTを施行した (2g / kg 糖水を投与後30分、60分、90分、120分の血糖値およびインスリン値測定)。

3) 12週齢に麻酔下にてサンプリングを行い、脂肪組織 (後腹膜・睪丸周囲) 肝臓を採取した。

4) 血漿コルチコステロン値およびインスリン値は、RIA法を用いて測定した。

5) 脂肪組織における各種遺伝子発現の解析: ラットの脂肪組織より全RNAを抽出した。RNA量は逆転写したのち 11 β -HSD1・アディポネクチン・レプチンのmRNA発現をreal time PCR法を用いて評価した。

6) 脂肪組織からジクロロメタンを用いてコルチコステロンを抽出しRIA法を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は浜松医科大学の倫理規定に基づき施行した。動物に対しては可能なかぎり麻酔等を用いて苦痛を少なくして実験を進めた。

C. 研究結果

1. 糖代謝は10週齢という比較的早い週齢ですでに変化していた。(図3)

2. 体重の変化は性差があり、胎児発育が障害されなかった群 (ヒトでの糖尿病合併妊娠と共通) では、Female で過体重傾向が明らかとなった。(図2)

3. グルココルチコイド標的臓器の代表である肝臓・脂肪組織において、11 β HSD1 の発現に性差が認められた。

(図3、4) Male において、肝臓・脂肪における11 β HSD1 mRNA の発現増強が確認された。(図3、4)

4. 脂肪組織におけるグルココルチコイド濃度は低下していた。またアディポネクチン mRNA は低下していた。

(図5、6)

D. 考案

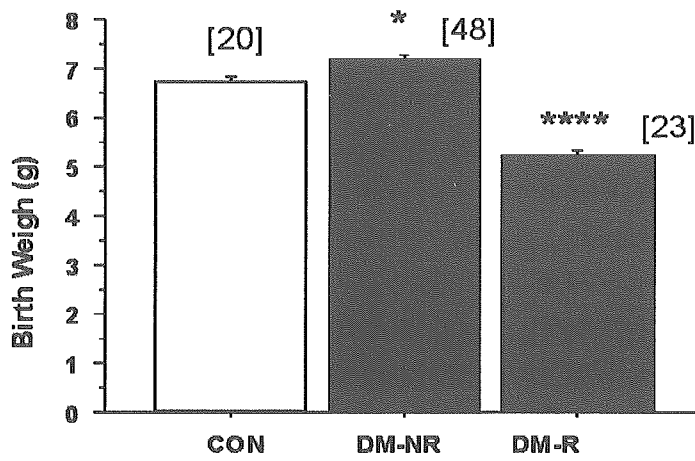
糖尿病母体からの出生群において、グルココルチコイド標的臓器において11 β HSD1 mRNA が変化している事実は興味深く、病態への関与の解明が必要である。Fetal programming をうけた個体において、体重や糖代謝等の変化の起点は生後どの時点であるかが次のテーマでもある。また、臓器における11 β HSD1 mRNA 発現の性差について検討を深める必要が有る。組織内のコルチコステロン濃度やアディポネクチン mRNA の動きは、これまで考えられている11 β HSD1 の働きでは説明が不十分であり、より研究を進める必要があるといえる。11 β HSD1 のdirectionality (方向性) を今後の検討項目とする。(活性型グルココルチコイド産生か、それともグルココルチコイドの不活化しているか?)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得なし
2. 実用新案登録なし
3. その他なし

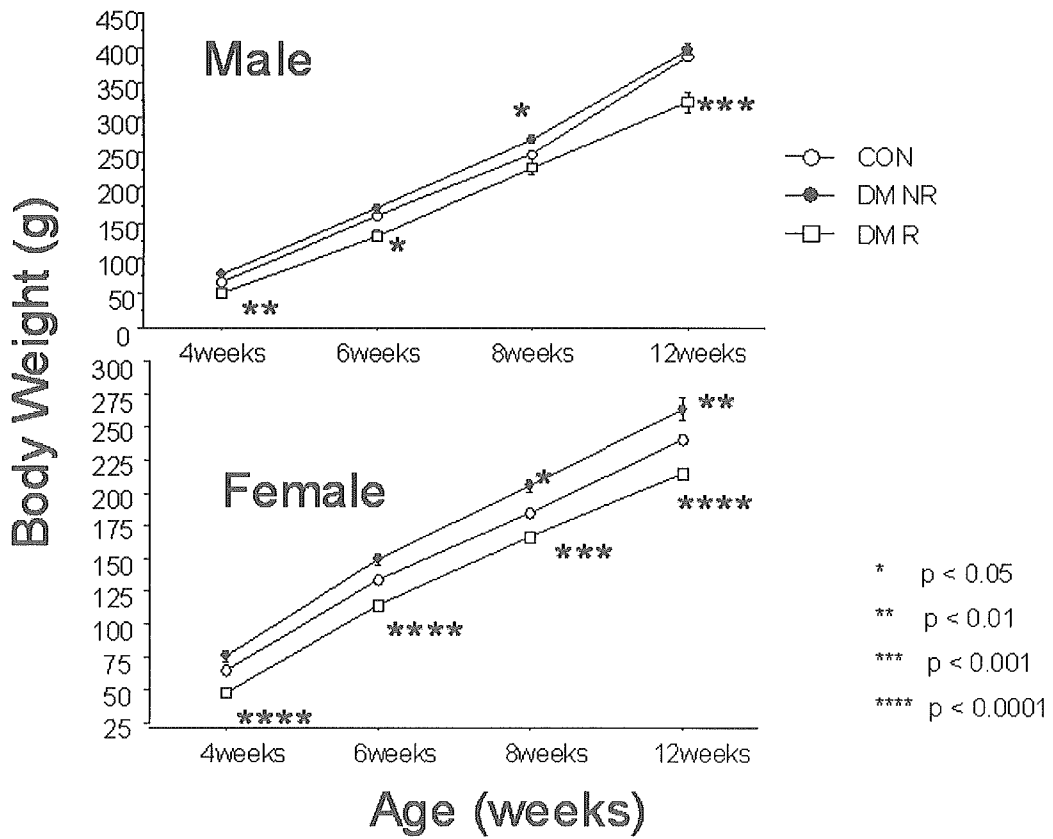
H. 研究発表

1. 学会発表 第25回日本肥満学会学術集会(2004年9月29日30日 大阪国際会議場) 糖尿病合併妊娠母体の出生群と、その後のメタボリックシンドロームの発症における、組織特異的なグルコルチコイド代謝の変化について
浜松医科大学 藤澤泰子 中川祐一 李仁善 中西俊樹 齋 秀二 大関武彦



☒ 1

* p < 0.05
**** p < 0.0001



☒ 2

* p < 0.05
** p < 0.01
*** p < 0.001
**** p < 0.0001

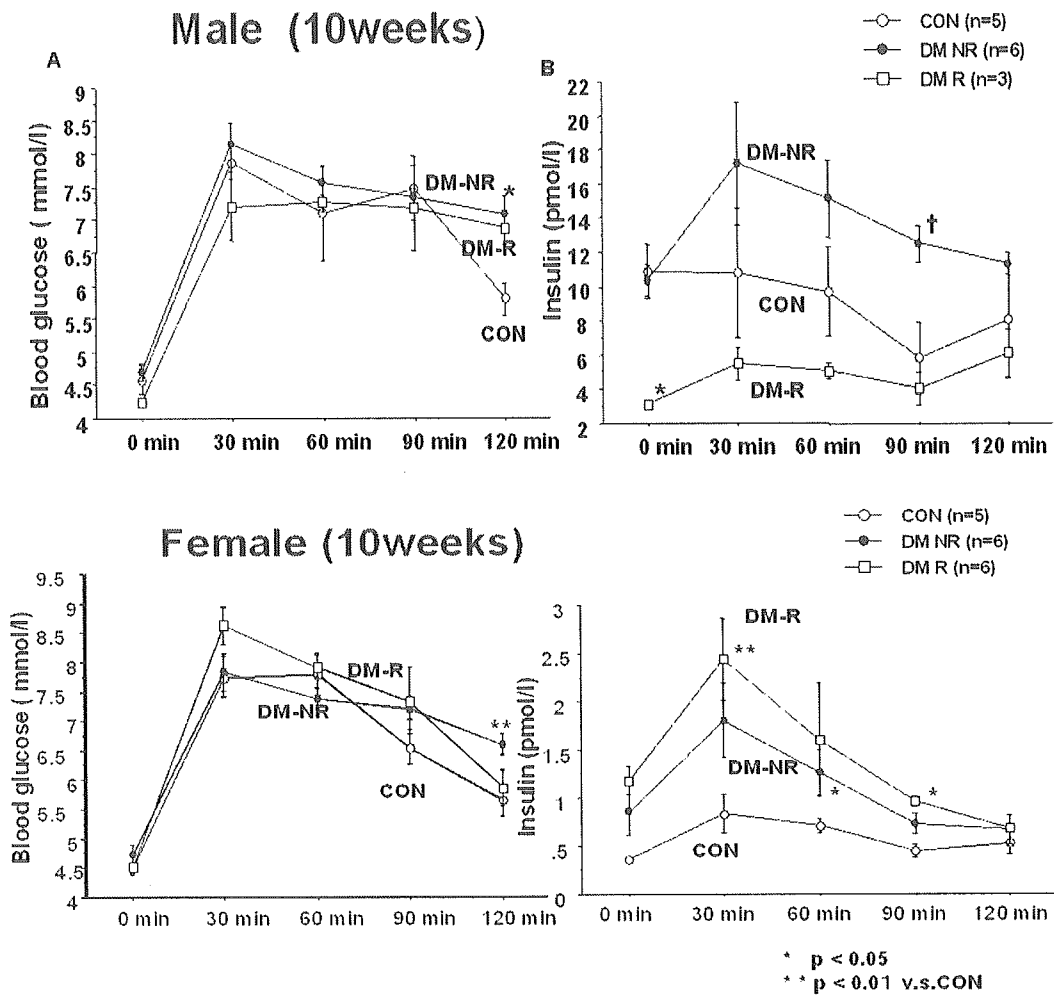


図 3 OGTT (10 週齡)

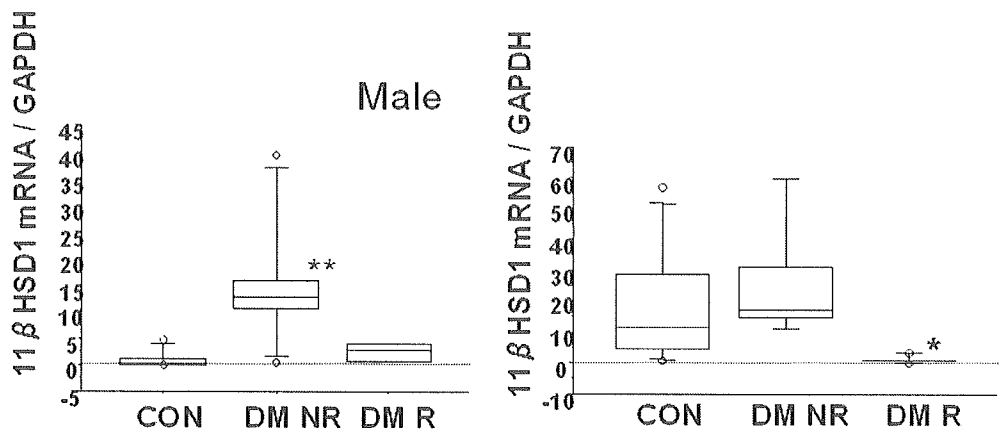


図4 脂肪組織 11βHSD1mRNA

* p < 0.05
 ** p < 0.01 v.s. CON

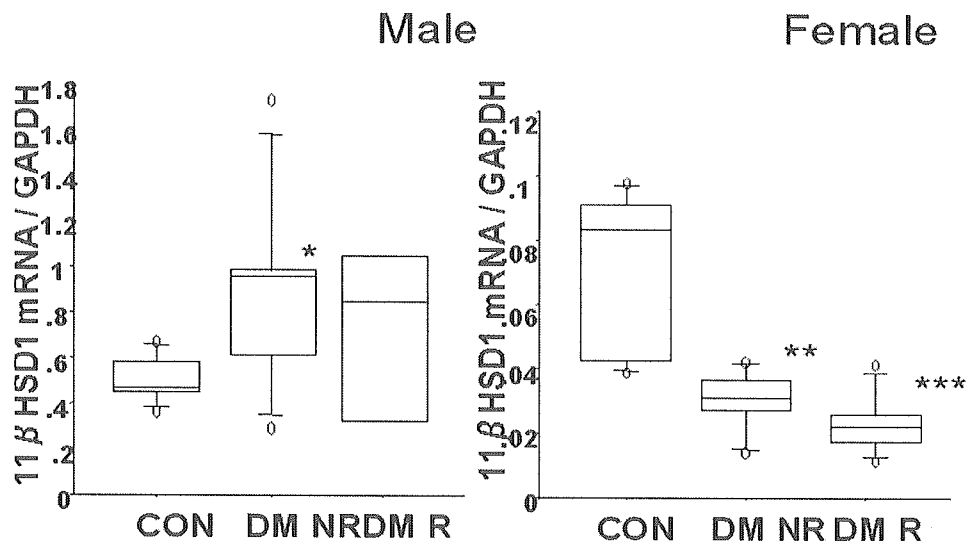


図5 肝臓 11βHSD1mRNA

* p < 0.05
 ** p < 0.01
 *** p < 0.001 vs. CON

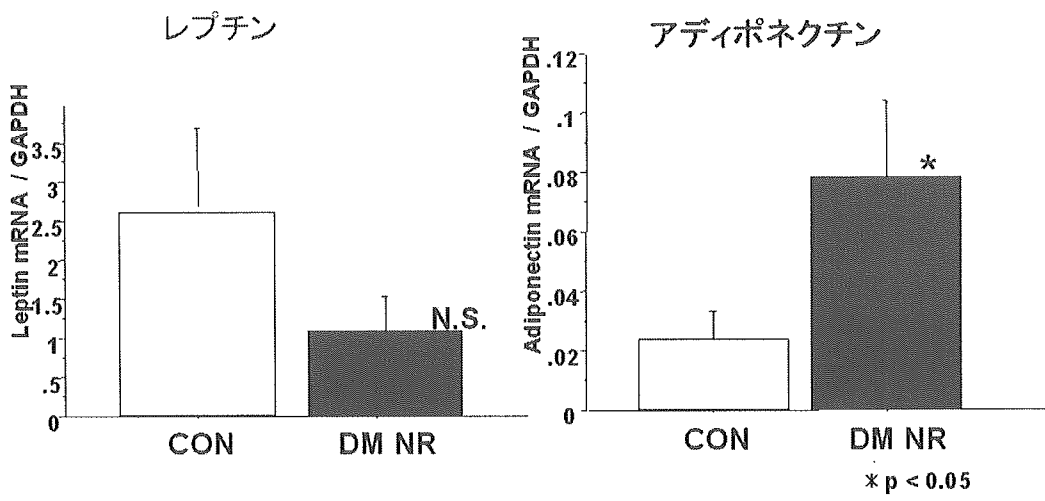


図 6

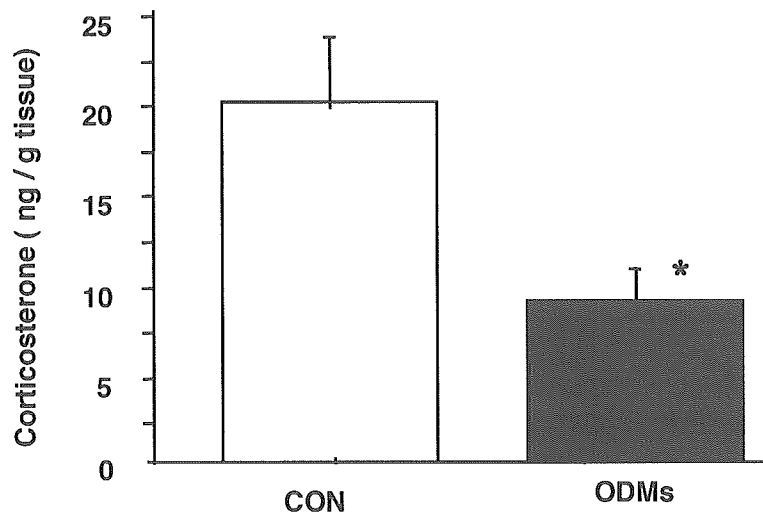


図 7

ヒト骨芽細胞におけるグルココルチコイドによる

Wnt シグナルの抑制機構

高柳 涼一、大中 佳三、河手 久弥
九州大学大学院医学研究院老年医学

【研究要旨】

グルココルチコイドによるステロイド療法は優れた臨床効果を示す一方、さまざまな副作用をひきおこす。ステロイド性骨粗鬆症もその一つで、骨折により ADL や QOL の低下を招く。ステロイド性骨粗鬆症の発症にはグルココルチコイドによる骨形成の抑制が深く関与するが、不明の点も多い。本研究では新しい骨形成制御系として注目される Wnt シグナル経路に対するグルココルチコイドの影響についてヒト培養骨芽細胞を用いて検討し、臨床的に用いられる濃度のグルココルチコイドが標準的 Wnt シグナルを抑制することを見出した。

A. 研究目的

グルココルチコイド (GC) は強力な抗炎症作用や免疫抑制作用、抗腫瘍作用を有し、膠原病、呼吸器疾患、血液疾患などの治療に不可欠の薬剤である。一方で長期間のステロイド療法はさまざまな副作用をひきおこす。ステロイド性骨粗鬆症もその一つで、骨折により ADL や QOL の低下を招く。ステロイド性骨粗鬆症の発症要因には GC による骨形成の抑制が深く関与するが、そのメカニズムは十分には解明されていない。本研究では骨形成の新しい制御系として注目される Wnt シグナル経路に対する GC の作用についてヒト骨芽細胞初代培養系を用いて検討を行った。

B. 研究方法

(1) ヒト骨芽細胞初代培養

手術時に得られた大腿骨海綿骨部より explant 法にて骨芽細胞を調製後、10%FCS 添加 α -MEM にて培養した。

(2) Wnt シグナル関連分子発現の解析

ヒト培養骨芽細胞に dexamethasone (Dex) を添加し、Wnt シグナルに関連する分子の mRNA と蛋白質の発現を、それぞれ Northern blot 法、Western blot 法にて解析した。

(3) ルシフェラーゼアッセイによる転写活性化の解析

GC により発現増加を認めた dickkopf-1 (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 GC による転写活性化を解析した。また Wnt/ β -catenin の下流で作用する Tcf/Lef 応答遺伝子のプロモーター活性に対する GC の作用についても同様に解析を行った。

(4) 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

β -catenin と蛍光タンパク質 GFP 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、 β -catenin の細胞内動態に対する GC の作用について検

討した。

(5) マイクロアレイを用いた遺伝子の発現解析

Dex を添加および非添加のヒト培養骨芽細胞より RNA を調製し、cDNA マイクロアレイを用いて遺伝子の発現解析を行った。

(倫理面への配慮)

大腿骨骨片の提供にあたっては、事前に研究目的での利用に関して説明を行い、文書にて提供者の承諾を得た。

C. 研究結果

(1) Wnt シグナル関連分子の発現に対する GC の作用

合成GCであるdexamethasone (Dex) の添加により、培養ヒト骨芽細胞において Wnt のアンタゴニストである dickkopf-1 (Dkk-1) の mRNA の発現が著しく増加した (図 1)。この増加作用は、Dex の濃度依存性であり、かつ時間依存性であった。また、他のステロイドホルモン (17 β -エストラジオール、ジヒドロテストステロン、1, 25-(OH) $_2$ ビタミン D $_3$) では増加作用は認められず、GC に特異的であった。Dkk に高い親和性を有する Kremen1 の発現は Dex 添加により変化しなかったが、Wnt の co-receptor である LRP5 は Dex によりやや減少した。

(2) Dkk-1 遺伝子のプロモーター活性に対する GC の作用

Dex は培養骨芽細胞において Dkk-1 遺伝子のプロモーター活性を増加させた。プロモーター領域 (上流約 1kbp) には、3 つの GRE 様配列が存在し、最も上流の GRE が、GC による Dkk-1 の転写促進に重要であった (図 2)。

(3) 標準的 Wnt シグナルに対する GC の作用

Wnt3a は Tcf/Lef 応答遺伝子の転写活性

を約 3 倍に増加させたが、Dex は臨床的に使用される濃度でこれを完全に抑制した。抗 Dkk-1 抗体添加によりこの抑制は一部回復した (図 3)。GSK-3 β 阻害剤 LiCl も Wnt3a と同程度に Tcf/Lef 応答遺伝子の転写活性を増加させたが、Dex はこれには影響しなかった。

(4) β -catenin に対する GC の作用

Wnt3a は細胞質の β -catenin レベルを増加させたが、Dex 添加はこれを抑制した。また Dex 添加は Wnt3a による β -catenin の核内移行を抑制した。

(5) マイクロアレイを用いた遺伝子の発現解析

検索した 5 万余りの遺伝子のうち、Dex 添加により発現が 2 倍以上に増加した遺伝子が 1269 個、1/2 以下に低下した遺伝子が 489 個であった。Wnt シグナル経路に関与する遺伝子では Dkk-1 が約 20 倍に増加した以外には、大きな変動を示したものはなかった。

D. 考察

Wnt シグナルは胎生期の発生・分化と形態形成に加えて、癌化、インスリン分泌不全、脂質代謝異常などの病態形成に関与する重要なシグナル伝達系である。Wnt の co-receptor である LRP5 遺伝子の変異解析により、Wnt シグナルが骨形成においても重要な役割を担うことが明らかにされた。

我々は本研究において臨床的に常用される量の GC がヒト初代培養骨芽細胞で Wnt のアンタゴニストである Dkk-1 の発現を主に転写レベルにおいて著しく増加させることならびに、Wnt シグナルの canonical 経路を完全に抑制することを見出した。この抑制作用は、抗 Dkk-1 抗体の添加により部分的に回復すること、GSK-3 β 阻害剤による Wnt シグナルの活性

化をGCは抑制しないことなどより、GCによるDkk-1の著明な上昇と細胞内のGSK-3 β までの経路の抑制によると考えられた。

Wntシグナルによる骨形成作用は、骨の発生・分化に重要な転写因子Cbfal (Runx2)の作用とは独立したものであり、出生後の骨量と骨強度の増加に重要であることが示されている。GCがこのWntシグナルに影響を及ぼす結果、成長後の骨に対して骨芽細胞の骨形成機能を強く抑制し、骨粗鬆症の発症に関与する可能性が考えられた。

E. 結論

GCはヒト骨芽細胞において標準的Wntシグナル経路を抑制する結果、骨形成を抑制する可能性が示唆された。

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, 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.
- 2) 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, 2005.
- 3) 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.
- 4) Kawate H, Wu Y, Ohnaka K, Tao RH, Nakamura K, Okabe T, Yanase T, Nawata H, Takayanagi R. Impaired nuclear translocation, nuclear matrix targeting, and intranuclear mobility of mutant androgen receptors carrying amino acid substitutions in the deoxyribonucleic acid-binding domain derived from androgen insensitivity syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6162-6169, 2005.
- 5) Ishizuka M, Kawate H, Takayanagi R, Ohshima H, Tao RH, Hagiwara H. A zinc finger protein TZF is a novel corepressor of androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 1025-1031, 2005.
- 6) 大中佳三、高柳涼一：ステロイド性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-。 *Osteoporosis Jpn* 13: 299-301, 2005.
- 7) 高柳涼一、大中佳三：ステロイド性骨粗鬆症。 *ファーマナビゲーター ビスフォスフォネート編*。松本俊夫(監修)。p64-77, メジカルレビュー社, 東京, 2005.
- 8) 大中佳三、高柳涼一：ステロイド性骨粗鬆症。 *Medicina* 42: 1249-1251, 2005.
- 9) 大中佳三、高柳涼一：ステロイド性骨粗鬆症の発症メカニズム。 *総合臨床* 54: 2810-2816, 2005.

2. 学会発表

- 1) 大中佳三、高柳涼一：ステロイド性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 78 回日本内分泌学会学術総会（シンポジウム「グルココルチコイドと骨粗鬆症」）、東京、平成 17 年 6 月。
- 2) 大中佳三、河手久弥、高柳涼一：グルココルチコイドはヒト初代培養骨芽細胞の標準的 Wnt シグナルを抑制する。
第 23 回日本骨代謝学会学術集会、大阪、平成 17 年 7 月。
- 3) 大中佳三、田邊瑞穂、足立雅広、河手久弥、高柳涼一：ヒト初代培養骨芽細胞におけるグルココルチコイドによる標準的 Wnt シグナルの抑制。
第 52 回日本臨床検査医学会総会、平成 17 年 11 月。
- 4) Kawate H, Wu Y, Ohnaka K, Yanase T, Nawata H, Takayanagi R: Functional relationship between Runx2 and steroid hormone receptors.
87th Annual Meeting of the Endocrine Society, San Diego, 2005. 6.
- 5) Wu Y, Kawate H, Ohnaka K, Yanase T, 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.
87th Annual Meeting of the Endocrine Society, San Diego, 2005. 6.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図1. 培養ヒト骨芽細胞における dexamethasone (Dex) の dickkopf-1 (Dkk-1) 発現への作用

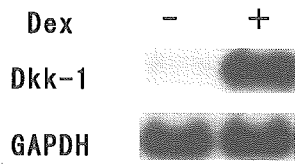


図2. ヒト培養骨芽細胞でのヒト Dkk-1 遺伝子の promoter 活性に対する Dex の作用

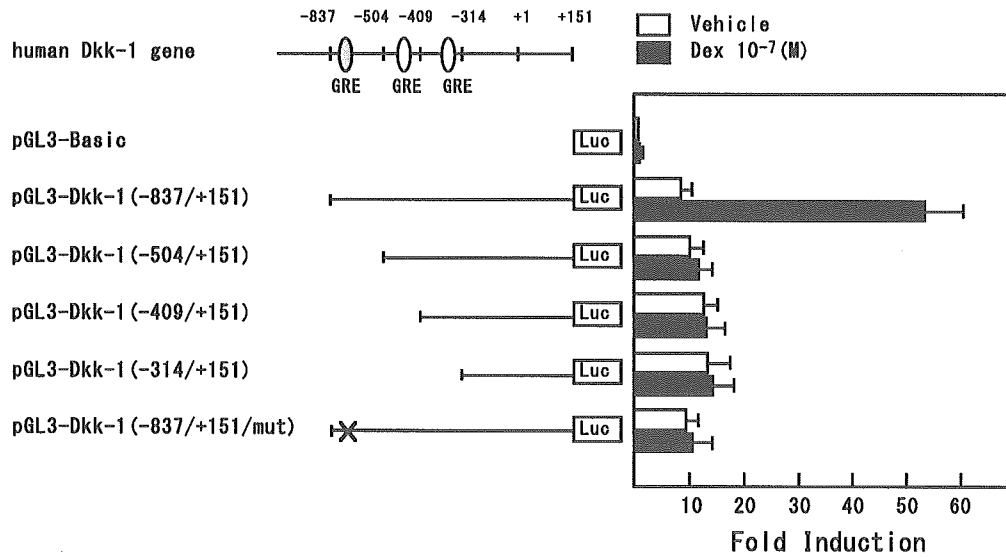
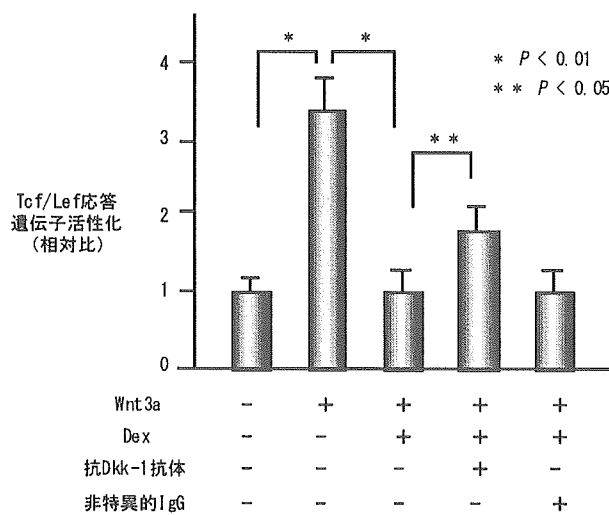


図3. ヒト培養骨芽細胞での Wnt3a による Tcf/Lef 応答遺伝子活性化に対する Dex の作用



GR 発現量からみたグルココルチコイド抵抗性獲得機構の解析

笠山 宗正、大月 道夫

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】

グルココルチコイド受容体 (GR) の発現量の変化がグルココルチコイド抵抗性に関連するか否かを明らかにすることを目的として、培養血管内皮細胞 (HUVEC) と培養ヒト肺胞上皮細胞 (A549) を用いて、グルココルチコイドによる GR 発現量の変化とグルココルチコイドの IL-6 産生抑制作用の関連について検討した。HUVEC において、デキサメサゾン (Dex) は GR 発現量を著明に低下させた。TNF α 刺激時の IL-6 産生に対する Dex の抑制作用は、Dex 前処理により減弱した。一方、A549 細胞では Dex による GR 発現量の低下は一過性であった。A549 細胞では、TNF α 刺激時の IL-6 産生に対する Dex の抑制作用は、Dex 前処理によっても減弱しなかった。以上より、グルココルチコイドによる GR の発現量変化は標的細胞によって異なること、HUVEC ではグルココルチコイドによる GR 発現低下がグルココルチコイド抵抗性に関連すること、が示された。

A. 研究目的

グルココルチコイド (GC) 薬の抗炎症作用が投与初期には顕著に認められても継続投与に伴って減弱する場合がある (GC抵抗性)。また、GC薬の継続投与に伴い、抗炎症作用に比べ副作用の方がより強く出現することもしばしば経験するところである。

GC抵抗性の分子機構として、グルココルチコイド受容体 (GR) の発現量の低下・GR β による GR 活性の阻害・炎症性転写因子による GR 機能の低下などが想定されているが、詳細は不明である。GC の抗炎症作用の多くは、炎症細胞に発現する GR を介した炎症性遺伝子の転写抑制 (trans-repression) 作用によるものである。一方、GC の副作用の多くは非炎症性細胞に発現する GR を介した標的遺伝子の転写促進 (trans-activation) 作用によると考えられている。

GC薬の継続投与に伴いGC薬の抗炎症

作用と副作用が乖離する分子機構を明らかにすることができれば、より副作用の少ないGC療法の開発につながると考えた。この目的のために、炎症性細胞として血管内皮細胞を用いて、GC処理によるGR発現量の変化およびGC処理によるGCの抗炎症作用の変化について解析した。また、非炎症性細胞としてGRを多く発現するヒト肺胞上皮細胞株A549を用いて、同様の解析を行った。

B. 研究方法

ヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC) およびヒト肺胞上皮細胞株 (A549) を、種々の濃度のデキサメサゾン (DEX) で処理したときのGR発現量の変化をウェスタンブロット法で解析した。HUVECおよびA549細胞をDEX (10⁻⁷M) で前処理 (24h) した後培養液を洗浄し、種々の濃度の DEX 存在下で TNF α (20ng/ml) で刺激し培養液中のIL-6濃