

度をELISAで測定した。

(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、倫理面において問題はないと考える。

### C. 研究成果

#### 1. HUVECとA549細胞のGR発現量に及ぼすGCの影響

HUVECにおいて、DEX処理4時間後にGR発現量は著明に低下し、この低下は48時間にわたって持続した。この変化はDEXの濃度依存性 ( $\geq 10^{-8}M$ ) に認められた (図1A)。また、RU486の添加により、DEXによるGR発現量の低下は解除された。

一方、A549細胞では、DEX処理5時間後GR発現量の低下を認めたが、24時間後にはDEX処理前にほぼ回復した (図1B)。

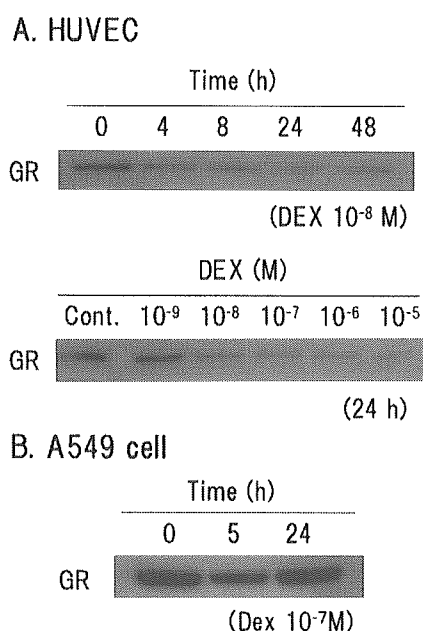


図1 HUVEC (A) およびA549細胞 (B) におけるGR発現量に及ぼすデキサメサゾン (DEX) の作用。ウェスタンブロット解析。

#### 2. HUVECとA549細胞におけるGCのIL-6産生抑制作用に対するGC前処理の影響

HUVECにおいて、TNF  $\alpha$  刺激時のIL-6産生をDEXは濃度依存性に抑制した。DEXの24時間前処理により、TNF  $\alpha$  刺激時のIL-6産生に対するDEXの作用は減弱した (図2A)。

A549細胞においても、TNF  $\alpha$  刺激時のIL-6産生をDEXは濃度依存性に抑制したが、DEX24時間の前処理によっても、DEXのIL-6産生抑制作用は変化を認めなかった (図2B)。

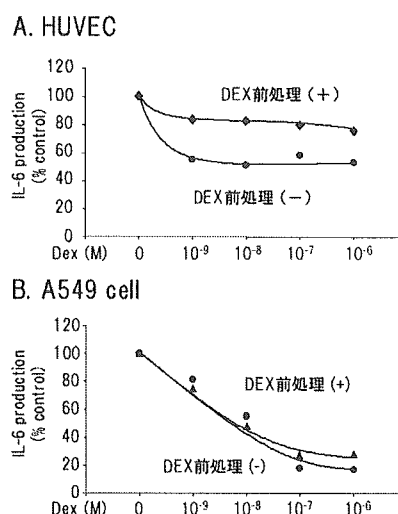


図2 HUVEC (A) およびA549細胞 (B) においてTNF  $\alpha$ により誘導されるIL-6産生に対するデキサメサゾン (DEX) の作用。DEX24時間前処理 (-) および (+) による影響を示した。

### D. 考察

GRの発現量がリガンドであるGCによって変化することが報告されているが、

その変化のパターンは標的細胞によって異なる。例えば、Mouse AtT20細胞・NIH-3T3細胞・ラット肝癌細胞・ラット臍由来AR42J細胞・HeLa細胞ではGR発現量はGCにより低下するのに対して、mouse 胸腺腫由来WEHI-7細胞・ヒトT細胞白血病由来CEM-C7細胞・ヒト骨髄腫由来OPM-2細胞ではGR発現量はGCにより逆に増加する。

今回の検討により、培養血管内皮細胞で、GR発現量がDEXによって著明に低下することが判明した。GR発現量の低下はDEXの処理4時間後に認められ、48時間後も持続していた。DEXによるGR発現量の低下はRU486の同時添加によって解除されたことから、この作用はGRを介した作用であることが示された。

一方、肺胞上皮細胞株A549細胞ではDEXの処理によってGR発現量の低下を認めたが、この変化は一過性であり、24時間後にはほぼ元の発現量にまで回復した。以上の結果より、GCによるGR発現量変化のパターンは、HUVECとA549細胞で異なることが明らかとなった。

次に、GCによるGR発現量の変化が、GCの生物学的活性に影響するか否かを明らかにするため、TNF $\alpha$ により誘導されるIL-6産生を指標として、これに対するDEXの抑制作用がDEXの前処理によって変化するかどうかを検討した。

その結果、HUVECにおいてはDEXの前処理後にはDEXのIL-6産生抑制作用が減弱するのに対して、A54細胞ではDEXの前処理によってもDEXのIL-6産生抑制作用が変化しないことが判明した。以上の結果より、DEXの前処理によるGR発現量の低下がDEXのIL-6産生抑制作用の減弱と相関することが明らかとなった。

我々は、これまで、IL-6遺伝子・VCAM-1遺伝子をGRの抗炎症作用の指標として

用いた解析により、①これら炎症性遺伝子の発現抑制には、GR標的遺伝子の転写促進に比べてより多くのGR発現量が必要であり、②GR高発現細胞ではGR低発現細胞に比べて、より少量のリガンドでこれら炎症性遺伝子の発現抑制が可能であることを報告してきた。しかし、これまでの検討は、GR発現ベクターを用いた強制発現系における検討であったため、GR発現量の生理的な変化がGCの作用強度の変化に直結するかどうかを示したものではなかった。

今回の結果は、HUVECとA549細胞におけるGCによるGR発現低下のパターンの差異がGCの抗炎症作用の強度と密接に関連することを示したものである。このことは、GC処理によりGC抵抗性を生じやすい細胞とそうでない細胞があることを示唆している。後者は、臨床的には、GCの継続投与による副作用に関連するかもしれない。

このように、GCによるGR発現量の低下はGC抵抗性に関与すると考えられる。GCの標的細胞におけるGR発現量を調節することによって、GC抵抗性とGCの副作用を改善させることができ、より効率の良いステロイド療法が可能となると思われる。

## E. 結論

血管内皮細胞ではGCによりGR発現量が低下する。この現象は、GCによるGC抵抗性獲得の分子機構を説明するものと考えられる。

## F. 研究発表 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.*, 328: 953-961, 2005.
- 4) 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*, 182: 71-77, 2005.
- 5) Kasayama, S., Saito, H., Mukai, M. and Koga, M. : Insulin sensitivity independently influences brachial-ankle pulse wave velocity in non-diabetic subjects. *Diabet. Med.*, 22: 1701-1706, 2005.
- 6) Otuski, M., Kasayama, S., Saito, H., Mukai, M. and Koga, M. : Sex-differences of age-dependent changes of insulin sensitivity in Japanese non-diabetic subjects. *Diabetes Care*, 28: 2590-2591, 2005.
- 7) Goya, K., Sumitani, S., Otsuki, M., Xu, X., Yamamoto, H., Kurebayashi, S., Saito, H., Kouhara, H., and Kasayama, S. : The thiazolidinedione drug troglitazone up-regulates nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells. *J. Diabetes Complications*, in press, 2005.
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

# HEXIM1 による GR 機能制御に関する研究

田中 廣壽

東京大学医科学研究所

## 【研究要旨】

HEXIM1 によるグルココルチコイド作用調節機構解明を切り口にグルココルチコイド抵抗症ならびにグルココルチコイド療法抵抗性疾患の病態を解明することを目的とした。HEXIM1 は、P-TEFb 抑制と GR との結合を介した GR 転写調節機能抑制、2つの経路によってグルココルチコイド応答性遺伝子発現を制御する。すなわち、HEXIM1 は転写伸張反応のみならず、たとえば、GR との結合を介して、特定の転写因子による転写開始反応をも抑制的に制御することが示された。一方で、GR が単に核内レセプターとして機能するだけでなく、P-TEFb 活性化因子として多くの遺伝子の発現調節に重要な役割を担うことも示唆された。

## A. 研究目的

グルココルチコイドは視床下部-下垂体-副腎系の末梢エフェクター分子として副腎皮質より分泌されるステロイドホルモンである。グルココルチコイドは生命維持と生体のストレス応答に必須のホルモンである。その作用は全身のほぼすべての臓器に存在するグルココルチコイドレセプター (glucocorticoid receptor: GR) を介して発現される。生理的には、糖脂質代謝、水電解質代謝などの調節を司り、恒常性維持に必須のホルモンである。しかし、各組織におけるグルココルチコイドの作用機構に関しては不明な点も多い。一方で、合成グルココルチコイドは副腎皮質ステロイド薬として炎症・自己免疫疾患の治療において重要な位置を占めている。しかし、GR は1種類であることから、薬理量のグルココルチコイド投与時にはこれらの薬理作用以外にも多く臓器でその作用が過剰に発現し、その結果として消化性潰瘍、骨粗鬆症、糖尿病などの副作用が問題となる。

現在までにミネラルコルチコイド作用を有さない合成グルココルチコイドは開発されたが、現時点で存在するグルココルチコイドを用いた場合、その作用と副作用を分離することは不可能と考えられている。したがって、グルココルチコイドの作用機構を分子レベルで理解し、とくに、生体内において各種の作用が発現するメカニズムを詳細に解明することは、生理学的のみならず薬理的あるいは臨床的にもきわめて切迫した課題である。GR は他の核内レセプターと同様にドメイン構造をとり、N 末端側から、転写活性化領域 (AF-1)、DNA 結合領域 (DBD)、リガンド結合領域 (LBD) / 転写活性化領域 (AF-2) などからなる。リガンド未結合の GR は LBD を介して hsp90 と結合し細胞質に存在する。リガンド結合に伴って hsp90 は解離し、GR はホモ二量体を形成して核に移行して標的遺伝子プロモーター上の特定の塩基配列 glucocorticoid response element (GRE) と結合する。GR による転写は他の転写因子と同様に、基

本転写装置を介して RNA polymerase II 依存性に活性化される。その過程で、多くの転写共役因子が関与する。近年、核内レセプターの転写共役因子が同定された。そのうち転写の活性化に関与する、いわば coactivator としては、ヒストンアセチル化活性を有する因子として p300/CBP、PCAF/GCN5、SRC-1/NCoA、TIF2/GRIPI1、ACTR、クロマチンリモデリングに関与する因子として SWI/SNF や WINAC などがある。また、PGC-1 や RNA である SRA なども coactivator 活性を有する。転写の抑制に関与する corepressor としては、ヒストン脱アセチル化酵素と結合する N-CoR/SMRT などがある。また、DRIP/TRAP などの核内レセプターと基本転写装置を結ぶメディエーターも同定されている。したがって、現時点では、GR の DNA への結合に引き続いてこれらの多くのタンパク質が複合体を形成し、ヒストンの修飾とクロマチンの高次構造変化によって GR による転写活性化がもたらされると考えられている。その際、GR/転写共役因子/メディエーター/基本転写装置/RNA polymerase II などの転写開始複合体は順次その構成を変化させ、次のステップである転写伸長反応に移行するらしい。HEXIM1 は血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cells: VSMC) において分化誘導剤 hexamethylene bisacetamide (HMBA) で発現誘導される遺伝子、核タンパクとして同定された。HEXIM1 遺伝子は染色体 17q21 に存在し、1 個のエクソンからなる。HEXIM1 は 359 アミノ酸からなる核タンパクで、既知のタンパク質との相同性がきわめて低い。HEXIM1 の N 末端領域はプロリンが、C 末端領域はアスパラギン酸、グルタミン酸、ロイシンが豊富であり、中央のアミノ酸 150-177 の領域は塩

基性アミノ酸に富み核局在シグナル (nuclear localization signal: NLS) として機能することが示されている。われわれは、HEXIM1 が NF- $\kappa$ B などによる転写活性化を抑制することを見出した。その後、Zhou、Bensaude らは、HEXIM1 は 7SK snRNA を介して P-TEFb と複合体を形成し、CTD のリン酸化抑制に関与することを報告した。HEXIM1 は、NLS 内のアミノ酸 150-158 の領域で 7SK snRNA と、C 末領域を介して P-TEFb の cyclin T1 と結合する。最近、HEXIM1 は C 末領域のアミノ酸 284-314 の領域を介してホモ二量体を形成することも確認された。現在、P-TEFb/7SK snRNA/HEXIM1 複合体は、HEXIM1 2 分子、7SK snRNA 1 分子、P-TEFb 2 分子で構成されていると推定されている。また、ヒトでは HEXIM1 に相同な HEXIM2 遺伝子が HEXIM1 と同じ染色体 17q21 上で HEXIM1 と約 10kbp 離れて存在する。HEXIM2 も HEXIM1 同様の転写伸張抑制作用を有するらしい。マウスおよびニワトリでは、HEXIM1 のホモログとして心臓の発生の初期に発現が増加する cardiac lineage protein-1 (CLP-1) が存在する。HEXIM1 の生物学的意義は不明だが、CLP-1 遺伝子破壊マウスは左心室の肥大を呈して胎児期に死亡する。HIV ウイルスの Tat タンパクは P-TEFb と結合して HIV ウイルスゲノムの long terminal repeat 上で複合体を形成して HIV ウイルス RNA 合成を促進させるが、HEXIM1 はそれを抑制する。

われわれは HEXIM1 による転写抑制機構解明をめざし、HEXIM1 結合タンパクを網羅的に同定することを試みたところ、HEXIM1 は P-TEFb 以外にも GR を含む多くの核内タンパク質と結合することが判明した。HEXIM1 は既知の転写共役因子などの GR 結合タンパク質とは相同性がない

ことから、HEXIM1 の GR 機能に与える影響を明らかにすることはグルココルチコイド作用機構解明に新たな展開をもたらす可能性がある。そこで、HEXIM1 によるグルココルチコイド作用調節機構解明を切り口にグルココルチコイド抵抗症ならびにグルココルチコイド療法抵抗性疾患の病態を解明するとともに、その成果を GR を分子標的とした副作用のない治療法開発の分子基盤確立に結実させることを目的とする。

## B. 研究方法

ヒト肝細胞癌株 HepG2 細胞、子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞、African green monkey 腎細胞株 COS7 細胞は共に理化学研究所の細胞バンクより購入し、10% fetal calf serum (FCS)、100 units/ml ペニシリンおよび 100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地 (Iwaki Glass inc.) で維持を行った。

抗 GR 抗体および抗 TIF2 抗体 (BD Transduction Laboratories, 611227, 610985)、抗 CDK9 抗体、抗 cyclin T1、抗体抗 CBP 抗体 (Santa Cruz, sc-484G, sc-8127, sc7300)、抗 FLAG 抗体 (Sigma, F3165) を用いた。

各細胞への一過性プラスミド導入は TransIT-LT1 transfection reagent (Panvera Corp) を用いて行った。

AdCALNL/FHhHEXIM1 (FLAG - 6xHis-hHEXIM1 発現誘導型ウイルス) は、pCMV2-FLAG-HEXIM1 を EcoRI/SalI で消化し、Klenow fragment (Takara) を用いて両端を平滑化した後に、コスミドベクター-pAxCALNLw (Takara) の SmaI 消化後の領域に挿入した。

(倫理面への配慮)

とくになし。

## C. 研究結果

HEXIM1 は GR を結合し、グルココルチコイド応答性遺伝子発現を負に制御することを発見した。HEXIM1 はその中央部に存在する NLS を介して GR の LBD と結合し、GR が TIF2 などの共役因子と相互作用するのを阻害する。したがって、HEXIM1 の発現量は組織のグルココルチコイド感受性を規定する因子の一つとも言える。なお、HEXIM1 は、たとえば、AhR や PPAR $\gamma$  などの転写因子とは結合せず、核内レセプター、とくにステロイドレセプターと比較的選択的に結合する。GR はその LBD の N 末端部分を介して、HEXIM1 の NLS の C 末端部分と結合する。一方、7SK は NLS の N 末端部分と結合する。さらに、GR は HEXIM1 と 7SK RNA の結合を阻害する (図 1)。すなわち、GR は HEXIM1 の P-TEFb 阻害活性に拮抗し、多くの遺伝子の転写を伸長反応のレベルで亢進させる可能性がある。

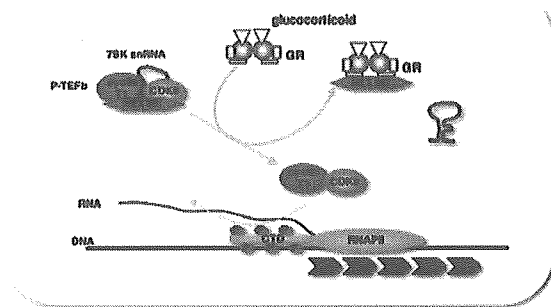


図 1 GR binding and 7SK binding are separable

## D. 考察

HEXIM1 は転写伸張反応のみならず、たとえば、GR との結合を介して、特定の転写因子による転写開始反応をも抑制的に制御することが示された。かかる GR の作

用機構はGRが単に核内レセプターとして機能するだけでなく、P-TEFb活性化因子として多くの遺伝子の発現調節に重要な役割を担う可能性をも示唆する(図2)。したがって、HEXIM1とGRの相互作用をさらに究明することはグルココルチコイドの作用機構とその生物学的意義を解明する上できわめて重要かもしれない。

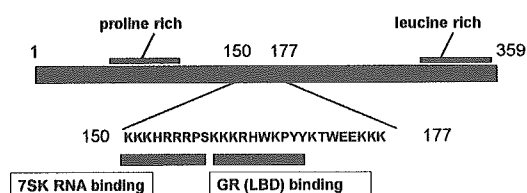


図2 新たなグルココルチコイド作用機構

(仮説)

#### E. 結論

HEXIM1は、P-TEFb抑制とGRとの結合を介したGR転写調節機能抑制、2つの経路によってグルココルチコイド応答性遺伝子発現を制御する。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yasuyo Urasaki, Mamoru Nori, Satoshi Iwata, Takahiro Sasaki, Osamu Hosono, Hiroshi Kawasaki, Hirotoshi Tanaka, Nam H Dang, Eiji Ikeda, Chikao Morimoto: Roxithromycin specifically inhibits development of collagen induced arthritis and production of proinflammatory cytokines by human T cells and macrophages. *J Rheumatol.* 2005; 32(9): 1765-1774
- 2) Sola S, Amaral JD, Castro RE, Ramalho RM, Borralho PM, Kren BT,

- Tanaka H, Steer CJ, Rodrigues CM.: Nuclear translocation of UDCA by the glucocorticoid receptor is required to reduce TGF-beta1-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology.* 2005; 42(4): 925-934
- 3) Kei Ohnuma, Tadanori Yamochi, Masahiko Uchiyama, Kunika Nishibashi, Satoshi Iwata, Osamu Hosono, Hiroshi Kawasaki, Hirotoshi Tanaka, Nam H. Dang, and Chikao Morimoto: CD26 Mediates Dissociation of Tollip and IRAK-1 from Caveolin-1 and Induces Upregulation of CD86 on Antigen-Presenting Cells. *Mol. Cell. Biol.* 2005; 25(17): 7743-7757
  - 4) Kei-ichi Hara, Mayumi Okamoto, Toshihiko Aki, Hideo Yagita, Hirotoshi Tanaka, Yoichi Mizukami, Hiroshi Nakamura, Akio Tomoda, Naotaka Hamasaki, Dongchon Kang: Synergistic enhancement of TRAIL-alpha-induced cell death by a phenoxazine derivative. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4(7): 1121-1127.
  - 5) Noriaki Shimizu, Rika Ouchida, Noritada Yoshikawa, Tetsuya Hisada, Hajime Watanabe, Kensaku Okamoto, Masatoshi Kusuvara, Hiroshi Handa, Chikao Morimoto, and Hirotoshi Tanaka: HEXIM1 forms a transcriptionally abortive complex with glucocorticoid receptor without involving 7SK RNA and positive transcription elongation factor b.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005;  
102: 8555-8560
- 6) Sasaki T, Iwata S, Okano HJ, Urasaki Y, Hamada J, Tanaka H, Dang NH, Okano H, Morimoto C.: Nedd9 protein, a Cas-L homologue, is upregulated after transient global ischemia in rats: possible involvement of Nedd9 in the differentiation of neurons after ischemia.  
Stroke 2005; 36(11): 2457-2462
- 7) Iwata S, Souta-Kuribara A, Yamakawa A, Sasaki T, Shimizu T, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Dang NH, Watanabe T, Arima N, Morimoto C.: HTLV-I Tax induces and associates with Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L).  
Oncogene. 2005; 24(7): 1262-1271
- 8) Hiroshi Nakamura, Yuichi Makino, Kensaku Okamoto, Lorenz Poellinger, Kei Ohnuma, Chikao Morimoto, and Hirotohi Tanaka: TCR Engagement Increases Hypoxia-Inducible Factor-1 Protein Synthesis via Rapamycin-Sensitive Pathway under Hypoxic Conditions in Human Peripheral T Cells.  
J. Immunol. 2005; 174: 7592 - 7599.
- 9) Noritada Yoshikawa, Keiko Yamamoto, Noriaki Shimizu, Sachiko Yamada, Chikao Morimoto, and Hirotohi Tanaka: The distinct agonistic properties of the phenylpyrazolosteroid cortivazol reveal interdomain communication in the glucocorticoid receptor.  
Mol. Endocrinol. 2005; 19: 1110-1124
- 10) Manotham K, Tanaka T, Ohse T, Kojima I, Miyata T, Inagi R, Tanaka H, Sassa R, Fujita T, Nangaku M.: A biologic role of HIF-1 in the renal medulla.  
Kidney Int. 2005; 67(4): 1428-1439
2. 学会発表  
なし。
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)
1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし



### (3) アルドステロン

# アルドステロンによるMDM2遺伝子を介する

## ヒト血管平滑筋細胞の増殖とその臨床的意義に関する研究

笹野 公伸

東北大学大学院病理学診断学分野

### 【研究要旨】

近年、各種ホルモンは心血管疾患の発生に大いに関連することがわかってきた。副腎でもステロイドホルモンが産生されるが、それらの心血管に対する作用とその機序については十分には解明されてはいないため、実験モデルによる検討が必要である。今回、我々はアルドステロンによる血管障害機序の解明に焦点をあて、MDM2がミネラルコルチコイド受容体 (MR) を介して誘導されることが証明され、ヒト血管でのリモデリングに関与する可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

アルドステロン(aldo)は、ミネラルコルチコイド受容体(MR)を介して直接心血管障害を引き起こす事が知られている。その機序の一つとして血管平滑筋細胞を増殖させ血管壁肥厚や血管のリモデリングを生じさせる事があげられている。一方原発性アルドステロン症(PA)患者の小血管では血管壁肥厚が顕著であり、比較的低濃度のaldoによる血管平滑筋増殖作用も想定されている。そこで今回、アルドステロンによって誘導される細胞増殖関連遺伝子を検索し、さらに生体でのその発現状態を検討した。

#### B. 研究方法

##### (1) 培養ヒト血管平滑筋細胞

ヒト大動脈由来の血管平滑筋細胞(HASMC)を用いた。その際、PCRやimmunoblottingにてMRおよび11 $\beta$ -HSD type 2 の発現を確認した。

##### (2) マイクロアレイ

培養ヒト血管平滑筋細胞でaldo(10nM)添加8時間後に誘導される細胞増殖関連の遺伝子をマイクロアレイ解析(Agilent)で網羅的に検索し、過去の文献上最も可能性が高いと思われる1つを標的遺伝子と決定した。

##### (3) 定量RT-PCR

決定した標的遺伝子について、aldoによるその遺伝子発現を定量PCR(LightCycler)にて確認した。

##### (4) Immunoblotting および免疫細胞化学的検索

標的遺伝子が蛋白レベルでも誘導されるか否かについて確認した。

##### (5) small interfering RNA

(siRNA) transfection による細胞増殖能解析

標的遺伝子をsiRNAで選択的に阻害し、それによるaldoでの細胞増殖誘導について検討した。

##### (6) ヒト小血管での発現解析

標的遺伝子発現を実際のPA患者とaldo

濃度が正常である高血圧患者の副腎腫瘍摘出標本近傍の血管壁を用いて比較検討した。

(倫理面への配慮)

東北大学医学部倫理委員会の承認済(2001-014)。

### C. 結果

マイクロアレイ解析では、細胞増殖に関与すると考えられるMDM2がaldoで特異的に誘導された。その結果は定量RT-PCR、immunoblotting、免疫細胞染色でも確認された(図1)。更にMDM2に対してのsiRNAを用いた細胞増殖能解析で、MDM2がaldoによる平滑筋細胞増殖に特異的に関与することも示された。また免疫組織化学的には、MDM2はPA患者の小血管平滑筋でその発現が有意に亢進していた(図2)。一方、選択的MRブロッカーであるeplerenoneの投与により、そのmRNAおよび蛋白発現が培養細胞で有意に抑制された(図1)。

### D. 考察

Aldoは、心血管障害をもたらすステロイドホルモンとして近年注目されている。ヒト血管平滑筋細胞では、炎症や線維化に関する遺伝子の発現を誘導することが報告されている。また、アンギオテンシンIIの存在下で、平滑筋細胞の増殖能が亢進することも知られている。今回の検討では、aldo単独でMDM2の誘導が確認された。MDM2は、細胞増殖を促進することやアポトーシスを抑制することが知られており、またヒト動脈の動脈硬化巣での発現も報告されている。またsiRNAでの検討から、aldo単独による細胞増殖能も有る程度存在し、それにMDM2が関与している可能性が示唆された。今後は、MDM2が他の経路とどのように関与するかを検討する必要があるものと思われる。PA症で腫瘍切除後も高血圧が

改善しない症例も知られているが、今回のヒト小動脈での検討からはMDM2がそれに関与している可能性も示唆された。また、eplerenoneがMDM2誘導を抑制することが確認されたが、過去の文献と同様aldoによる血管障害抑制効果機序の1つとして重要であると考えられた。

### E. 図の説明

図1. aldosterone10nM及び選択的MRブロッカーであるeplerenone100nMを24時間ヒト大動脈由来の血管平滑筋細胞(HASMC)に投与した時の標的遺伝子MDM2の発現の変化を定量RT-PCRで検討した結果。aldosterone 10nMの投与でMDM2遺伝子はその発現が有意に増加し、eplerenone 100nMの投与でこの発現亢進は有意に抑制される事が分かる。

図2. Aldosteronoma周囲(PA (+))及び高血圧を伴うが血液中のaldosterone濃度が正常な非機能性副腎皮質腺腫周囲(PA (-))のmedium sized arteryの血管壁平滑筋細胞でのaldosteroneの標的遺伝子であるMDM2の免疫組織化学を用いた発現動態の検討。両者とも血管平滑筋は肥厚が見られるがPA周囲の血管壁でMDM2の発現亢進が認められる。

### F. 結語

MDM2は血管平滑筋細胞のaldo応答遺伝子の1つであり、aldoによる重要な心血管障害の一つである血管壁肥厚や血管のリモデリングに関与すると考えられた。加えて eplerenone はMDM2を介したaldoの血管障害の抑制にも有効である可能性も示唆された。

### G. 研究発表

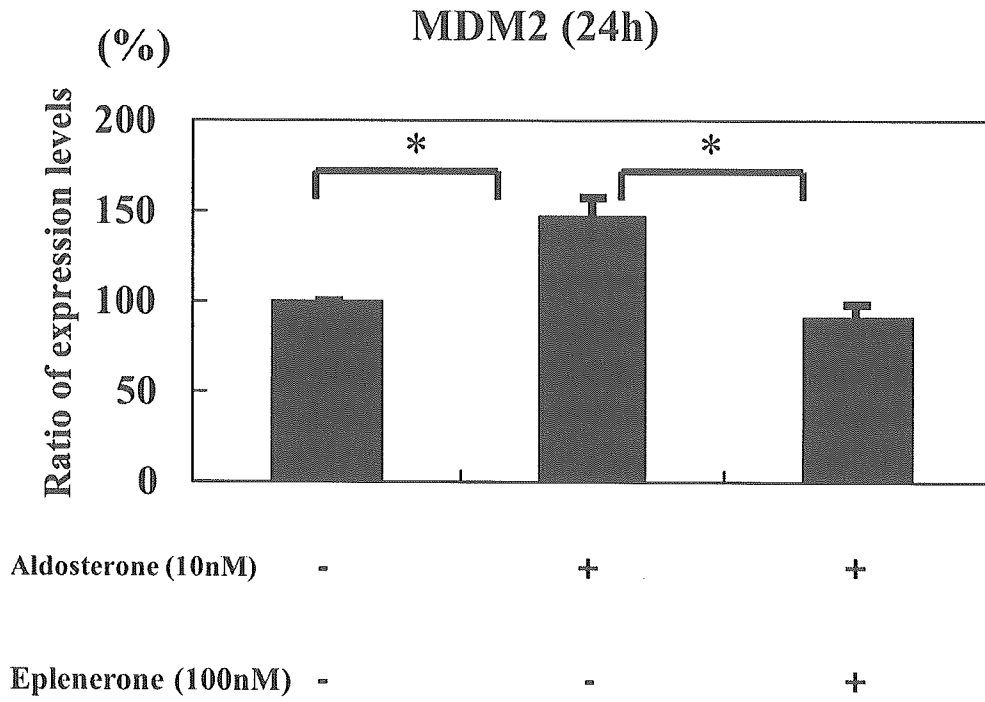
1. 論文発表

1. Takahashi K, Kikuchi K, Maruyama Y, Urabe T, Nakajima K, Sasano H, Imai Y, Murakami O, Totsune K. : Immunocytochemical localization of adrenomedullin 2/intermedin-like immunoreactivity in human hypothalamus, heart and kidney. *Peptides*. 2005
2. Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Ito K, Ohuchi N, Sasano H. : Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 12:701-720. 2005
3. Taniyama Y, Suzuki T, Mikami Y, Moriya T, Satomi S, Sasano H. : Systemic distribution of somatostatin receptor subtypes in human: an immunohistochemical study. *Endocr J*. 52:605-611. 2005
4. Suzuki S, Tsubochi H, Ishibashi H, Matsuda Y, Suzuki T, Krozowski ZS, Sasano H, Kondo T. : Inflammatory mediators down-regulate 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in a human lung epithelial cell line BEAS-2B and the rat lung. *Tohoku J Exp Med*. 207:293-301. 2005
5. Saito S, Ito K, Suzuki T, Utsunomiya H, Akahira J, Sugihashi Y, Niikura H, Okamura K, Yaegashi N, Sasano H. : Orphan nuclear receptor DAX-1 in human endometrium and its disorders. *Cancer Sci*. 96:645-652. 2005
6. Takahashi K, Arihara Z, Suzuki T, Sone M, Kikuchi K, Sasano H, Murakami O, Totsune K. : Expression of orexin-A and orexin receptors in the kidney and the presence of orexin-A-like immunoreactivity in human urine. *Peptides*. 2005
7. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Nakata T, Sunamori M, Handa M, Kondo T, Sasano H. : Estrogen inhibits cell proliferation through in situ production in human thymoma. *Clin Cancer Res*. 11:6495-6504. 2005
8. Suzuki T, Urano T, Tsukui T, Horie-Inoue K, Moriya T, Ishida T, Muramatsu M, Ouchi Y, Sasano H, Inoue S. : Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer. *Clin Cancer Res*. 11:6148-6154. 2005
9. Katayama Y, Takata N, Tamura T, Yamamoto A, Hirata F, Yasuda H, Matsukuma S, Daido Y, Sasano H. : A case of primary aldosteronism due to unilateral adrenal hyperplasia. *Hypertens Res*. 28:379-384. 2005
10. Hirono Y, Doi M, Yoshimoto T, Kanno K, Himeno Y, Taki K, Sasano H, Hirata Y. : A case with primary aldosteronism due to unilateral multiple adrenocortical micronodules. *Endocr J*. 52:435-439. 2005
11. Fukushima K, Funayama Y, Yonezawa H, Takahashi K, Haneda S, Suzuki T, Sasano H, Naito H, Shibata C, Krozowski ZS, Sasaki I. : Aldosterone enhances 11beta-hydroxy-steroid dehydrogenase type 2 expression in colonic

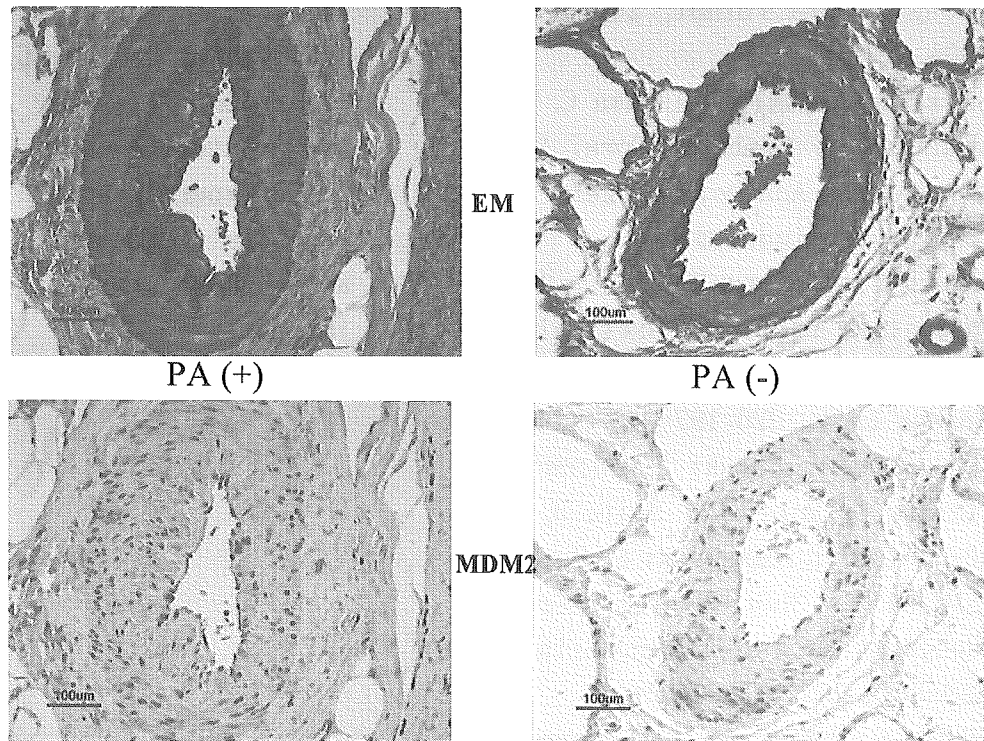
- epithelial cells in vivo.  
Scand J Gastroenterol. 40:850-857.  
2005
12. Takahashi K, Totsune K, Saruta M, Fukuda T, Suzuki T, Hirose T, Imai Y, Sasano H, Murakami O. : Expression of urocortin 3/stresscopin in human adrenal glands and adrenal tumors. Peptides. 2005
  13. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Niikawa H, Lu L, Miki Y, Moriya T, Hayashi S, Handa M, Kondo T, Sasano H. : Progesterone receptor in non-small cell lung cancer—a potent prognostic factor and possible target for endocrine therapy. Cancer Res. 65:6450-6458. 2005
  14. Sasano H, Anderson TJ, Silverberg SG, Santen RJ, Conway M, Edwards DP, Krause A, Bhatnagar AS, Evans DB, Miller WR. : The validation of new aromatase monoclonal antibodies for immunohistochemistry—a correlation with biochemical activities in 46 cases of breast cancer. J Steroid Biochem Mol Biol. 95: 35-39. 2005
  15. Kariya Y, Moriya T, Suzuki T, Chiba M, Ishida K, Takeyama J, Endoh M, Watanabe M, Sasano H. : Sex steroid hormone receptors in human skin appendage and its neoplasms. Endocr J. 52:317-325. 2005
  16. Saruta M, Takahashi K, Suzuki T, Fukuda T, Torii A, Sasano H. : Urocortin 3/stresscopin in human colon: possible modulators of gastrointestinal function during stressful conditions. Peptides. 26:1196-1206. 2005
  17. Fukuda T, Takahashi K, Suzuki T, Saruta M, Watanabe M, Nakata T, Sasano H. : Urocortin 1, urocortin 3/stresscopin, and corticotropin-releasing factor receptors in human adrenal and its disorders. J Clin Endocrinol Metab. 90: 4671-4678. 2005
  18. Seely J, Amigh KS, Suzuki T, Mayhew B, Sasano H, Giguere V, Laganriere J, Carr BR, Rainey WE. : Transcriptional regulation of dehydroepiandrosterone sulfotransferase (SULT2A1) by estrogen-related receptor alpha. Endocrinology. 146:3605-3613. 2005
  19. Nakamura Y, Suzuki T, Inoue T, Tazawa C, Ono K, Moriya T, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H. : Progesterone receptor subtypes in vascular smooth muscle cells of human aorta. Endocr J. 52:245-252. 2005
  20. Nakamura Y, Suzuki T, Sasano H. : Estrogen actions and in situ synthesis in human vascular smooth muscle cells and their correlation with atherosclerosis. J Steroid Biochem Mol Biol. 93:263-268. 2005
  21. Abd-Elaziz M, Moriya T, Akahira J, Suzuki T, Sasano H. : StAR and progesterone producing enzymes (3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cholesterol side-chain cleavage cytochromes P450) in human epithelial ovarian

- carcinoma: immunohistochemical and real-time PCR studies. *Cancer Sci.* 96:232-239. 2005
22. Nakamura Y, Suzuki T, Nakabayashi M, Endoh M, Sakamoto K, Mikami Y, Moriya T, Ito A, Takahashi S, Yamada S, Arai Y, Sasano H. : In situ androgen producing enzymes in human prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 12:101-107. 2005
23. Abd-Elaziz M, Moriya T, Akahira J, Nakamura Y, Suzuki T, Sasano H. : Immunolocalization of nuclear transcription factors, DAX-1 and Ad4BP/SF-1, in human common epithelial ovarian tumors: correlations with StAR and steroidogenic enzymes in epithelial ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 24:153-163. 2005
24. Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Ishizuka M, Semba S, Gorai I, Sasano H. : Analysis of gene expression induced by diethylstilbestrol (DES) in human primitive Mullerian duct cells using microarray. *Cancer Lett.* 220:197-210. 2005
25. Nakamura Y, Suzuki T, Inoue T, Tazawa C, Moriya T, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H. : 3beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in human aorta. *Endocr J.* 52:111-115. 2005
26. Cunat S, Rabenoelina F, Daures JP, Katsaros D, Sasano H, Miller WR, Maudelonde T, Pujol P. : Aromatase expression in ovarian epithelial cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 93:15-24. 2005
27. Miki Y, Suzuki T, Tazawa C, Blumberg B, Sasano H. : Steroid and xenobiotic receptor (SXR), cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance gene 1 in human adult and fetal tissues. *Mol Cell Endocrinol.* 231:75-85. 2005
28. Zhou J, Suzuki T, Kovacic A, Saito R, Miki Y, Ishida T, Moriya T, Simpson ER, Sasano H, Clyne CD. : Interactions between prostaglandin E(2), liver receptor homologue-1, and aromatase in breast cancer. *Cancer Res.* 65:657-663. 2005
29. Sato S, Fukushima K, Naito H, Funayama Y, Suzuki T, Sasano H, Krozowski Z, Shibata C, Sasaki I. : Induction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and hyperaldosteronism are essential for enhanced sodium absorption after total colectomy in rats. *Surgery.* 137:75-84. 2005

图 1



(图 2)



# ラット肥大心筋における蛋白の発現と

## アルドステロンブロッカーの影響

宮森 勇、范 春元、河合 康幸  
福井大学病態制御医学（第三内科）

### 【研究要旨】

アルドステロンは心血管系組織に対して直接作用し、組織障害的に働くことが明らかにされている。この腎外作用は主として心血管系に分布するアルドステロン受容体（MR）を介するとされている。我々はこれまでステロイドホルモンの心血管系作用に注目し、高食塩下 Dahl 食塩感受性ラットにおいて、選択的アルドステロン受容体拮抗薬であるエプレレノンの生命予後および MR 発現に与える影響を検討してきた。その研究においてエプレレノンは心肥大と間質の線維化および MR 発現を抑制することにより、著明に高食塩下 Dahl 食塩感受性ラットの生存率を改善することを明らかにした。今回、我々はこのモデルを用い、近年、心血管系の細胞の肥大に関与すると報告されている、NADPH oxidase の触媒サブユニットである NOX1 発現と NADPH oxidase 活性を検討した。心肥大期の高食塩下 Dahl 食塩感受性ラットにおいて NOX1 mRNA 発現および NADPH oxidase の活性亢進を認め、エプレレノンはこれらを完全に抑制した。このことからアルドステロンと NaCl は MR を介して NADPH oxidase 発現を亢進させ、それによって産生される過剰な活性酸素種により心肥大を惹起し、心病変を進展させる重要な因子であることが示唆された。

### A. 研究目的

心病変の進展にレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系や交感神経系などの神経体液因子が重要な役割を果たしている。近年、その中でもアルドステロンは体液過剰を介して心血管系に負担をきたすのみならず、その直接作用により心肥大や間質の線維化を促進し、心血管の独立したリスクホルモンとして注目されている。一方、NADPH oxidase は心血管系において活性酸素種を産生し、心血管系細胞の肥大に関与する酵素として注目されている。さらにアルドステロンがラットのメサングウム細胞において NADPH oxidase の活性化による活性酸素種産生亢進を刺激することが報告されて

いる。

我々はこれまで高食塩下 Dahl 食塩感受性ラットにおいて選択的アルドステロン受容体拮抗薬であるエプレレノンが心肥大と間質の線維化を抑制することを報告してきた。今回、我々はその中でも心肥大に注目し、心肥大期の高食塩下 Dahl 食塩感受性ラットにおいて NADPH oxidase の触媒サブユニットである NOX-1 発現と NADPH oxidase 活性を、またそれらに対するエプレレノンの効果を検討した。

### B. 研究方法

Dahl 食塩感受性ラットを6週齢までは 1%NaCl を含む飼料にて飼育する。6週例



以降、1%NaCl を含む飼料で飼育し続けたラットをコントロール群 (n=5) とした。6週齢より8%NaCl を含む飼料にて飼育し、エプレレノン (50mg/kg/day) を投与した投与群 (DS-Ep 群、n=5) と非投与群 (DS 群、n=5) に分け、心肥大期である10週齢目に、活性酸素種のレベルを評価するため、それぞれの群の心筋凍結切片を作成し、dihydroethidium (DHE) 染色を行い、レーザー顕微鏡にて蛍光強度を観察した。また心筋組織の一部からRNAを抽出し、NOX1 mRNA を real-time RT-PCR で測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は本学動物実験指針に基づいて行った。

### C. 研究結果

10週齢目の血圧、心拍数は両群間に有意差を認めなかった。心重量/体重比 (mg/g) は DS 群が DS-Ep 群に比べて有意に高値であった ( $6.96 \pm 0.26$  vs  $5.86 \pm 0.49$ ,  $P < 0.05$ )。コントロール群に比べて DS 群で NOX1 mRNA 発現が有意に亢進し、エプレレノンは完全に NOX1 mRNA 発現を抑制した。(図1) 心臓凍結切片を作成し NADPH oxidase が産生する活性酸素種のレベルを、DHE 染色で評価したところ、コントロールに比べて DS 群でより強い染色をみとめたが、エプレレノンはコントロールのレベルまで染色性を抑制した。(図2)

### D. 考察

血圧に影響を与えない濃度のエプレレノンが高食塩下 Dahl 食塩感受性ラットの心重量を軽減した。また、エプレレノンは心血管系細胞の肥大を促進する NOX1 発現亢進と NADPH oxidase 活性化により産生された過剰な活性酸素種を抑制

した。これらの結果からアルドステロンと NaCl は MR を介して NADPH oxidase 発現を亢進させ、それによって産生される過剰な活性酸素種により心肥大を惹起し、心病変を進展させる重要な因子であることが示された。

### E. 結論

心筋においてアルドステロンと NaCl は NADPH oxidase の活性化を介して活性酸素種を誘発する。さらにアルドステロンが誘導する NADPH oxidase の活性化は MR を介している。これらの結果は心肥大進展にアルドステロンが誘発する活性酸素の関与を示すものであり、心肥大抑制にアルドステロン受容体拮抗薬や NADPH oxidase 阻害薬の有用性が期待できる。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Yoshida M, Ma J, Tomita T, Morikawa N, Tanaka N, Masamura K, Kawai Y, Miyamori I. Mineralocorticoid receptor is overexpressed in cardiomyocytes of patients with congestive heart failure. *Congest Heart Fail.* 2005; 11: 12-16
2. 宮森勇、吉田正博、河合康幸 心血管とアルドステロンに関する基礎研究の update  
*循環器専門医* 2004; 12 3-8

#### 2. 学会発表

1. Morikawa N, Kawai Y, Yoshida M, Arakawa K, Kumamoto T, Masamura K, Miyamori I. Effect of eplerenone on mortality in Dahl salt-sensitive rats.  
*European Society of Cardiology.*

2004. 8. 31

2. 吉田正博 アルドステロン受容体拮抗薬 (エプレレノン) の心血管作用に関する基礎的検討

第 77 回日本内分泌学会学術総会

2004. 6. 24

# 脳虚血におけるアルドステロンの意義と アドレノメデュリンの治療効果に関する研究

伊藤 裕、宮下 和季、小山田 尚史  
京都大学大学院 医学研究科 内分泌代謝内科

## 【研究要旨】

アルドステロンが心臓への直接作用で心肥大と心線維化を促進して心不全を増悪させることが最近明らかとなり、アルドステロンの臓器障害因子としての意義が注目されている。そこで今回我々はアルドステロン拮抗薬であるスピロノラク톤を投与したマウスに中大脳動脈20分閉塞脳梗塞モデルを施行して、アルドステロンの脳虚血における意義を検討した。

脳梗塞発症後に血中アルドステロン濃度は有意に上昇し、スピロノラク톤を投与したマウスでは虚血域でのアポトーシスの有意な減少とともに梗塞域の縮小を認めた。また、副腎褐色細胞腫細胞から分離同定された血管拡張ペプチドであるアドレノメデュリンを過剰発現するトランスジェニックマウスにおいても同様に、虚血域でのアポトーシスの減少と、梗塞域の縮小を認めた。さらに浸透圧ポンプによるアドレノメデュリン投与は、脳梗塞後の血中アルドステロン濃度の上昇を抑制した。

これらの検討により、アルドステロンは虚血脳においてアポトーシスを惹起して脳虚血障害を増悪させる可能性が示唆され、スピロノラク톤やアドレノメデュリンはアルドステロンの作用に拮抗することで、脳卒中、脳血管性痴呆、血管性パーキンソン病など脳虚血障害において治療効果を発揮する可能性が示唆された。

## A. 研究目的

アルドステロンは腎臓に作用してナトリウム再吸収を促進し循環血漿量を増やすことで高血圧症を惹起する。さらには心臓への直接作用により心肥大と心線維化を促進して、心不全を増悪させることが最近明らかとなり、アルドステロンの臓器障害因子としての意義が注目されている。副腎褐色細胞腫細胞から分離同定された血管拡張ペプチド、アドレノメデュリン(AM)は、血管トーンを調節するのみならず、cAMP/cAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)系を介して血管保護再生作用を発揮することが明らかとなり、虚血性疾患で治

療的意義を有する可能性が示唆されている。そこで今回我々はアルドステロン拮抗薬であるスピロノラク톤を投与したマウスと、肝臓でアドレノメデュリンを過剰産生するアドレノメデュリントランスジェニックマウス(AM-Tg)に非致死的脳梗塞モデルである中大脳動脈20分閉塞術(20m-MCAO)を施行して、脳虚血におけるアルドステロンの意義と、アルドステロン拮抗薬ならびにAMの治療効果を検討した。

## B. 研究方法

C57b1/6マウスに20m-MCAOを施行して、その直後から腹腔内に浸透圧ポンプを留

置スピロノラクトン3.3 mg/day を投与した。第7病日に虚血脳を回収し、ニューロンマーカーNeuNとアポトーシスマーカーsingle strand DNA (ssDNA)を用いた免疫組織染色にて虚血基底核の梗塞域とアポトーシスを評価した。

肝臓特異的遺伝子発現プロモーターであるSerum amyloid-P (SAP)プロモーターを用いて、肝臓においてAMを過剰産生するAM-Tgマウスを作製した。AMの長期投与を模倣するこのAM-Tgマウスに20m-MCAOを施行して、第3~56病日に回収した虚血脳においてニューロンマーカーNeuN, グリアマーカーGFAP, 白血球マーカーCD45, アポトーシスマーカーssDNAを用いて組織学的解析を行い、梗塞域, グリオシス, 白血球浸潤, アポトーシスを評価した。

AM-Tgマウスならびに、腹腔内に浸透圧ポンプを留置してAMを50ng/hの用量で投与した外因性AM投与マウスにおいて、20m-MCAO施行前後の血漿アルドステロン濃度を対照マウスと比較した。

なお動物実験は京都大学医学部動物実験施設倫理規定に基づき実施した。

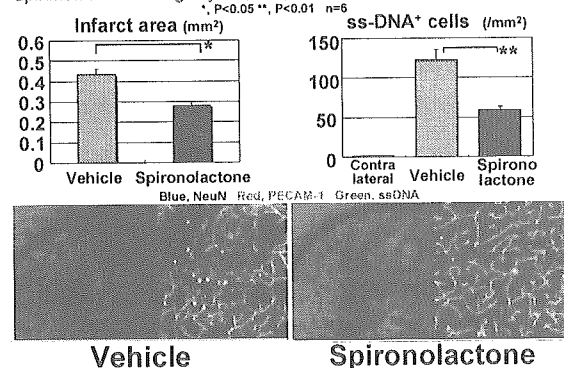
### C. 研究結果

投与した用量のスピロノラクトン(3.3mg/day)は収縮期血圧(mmHg)に影響を与えなかった(Vehicle群で110±2, スピロノラクトン投与群で108±3)。スピロノラクトンを20m-MCAO施行直後から投与したマウスでは、虚血域でのアポトーシスの有意な減少とともに、梗塞域の縮小を認めた。第7病日でのssDNA陽性細胞数(/mm<sup>2</sup>)はVehicle群で122.3±13.3, スピロノラクトン投与群で58.8±4.4 (P<0.01, n=6)、梗塞域(mm<sup>2</sup>)はVehicle群で0.44±0.03, スピロノラクトン投与群で0.28±0.02 (P<0.05, n=6)であった。

AM-Tgマウスの血中AM濃度は

585.5±117.7fmol/mlと生理的濃度の数十倍となり、ヒトへの投与で治療効果を発揮する濃度に達していた。AM-Tgマウスに20m-MCAOを施行すると、亜急性期(第3~7病日)から虚血域への白血球浸潤とアポトーシスが有意に抑制された。第7病日のCD45陽性細胞数(/mm<sup>2</sup>)は野生型197.5±16.6, AM-Tg 140.7±14.6 (P<0.05, n=12)、ssDNA陽性細胞数(/mm<sup>2</sup>)は野生型214.8±19.6, AM-Tg 123.3±11.1 (P<0.01, n=12)であった。また第7病日以降、AM-TgマウスではニューロンマーカーNeuNとグリアマーカーGFAPで評価した梗塞域とグリオシスが縮小した。第56病日の梗塞域(mm<sup>2</sup>)は野生型0.88±0.08, AM-Tg 0.64±0.08; P<0.05 (P<0.05, n=12)であった。さらには浸透圧ポンプを用いた外因性AM投与も梗塞域を縮小した(Vehicle群0.96±0.14, AM投与群 0.56±0.10; P<0.05, n=6)。

スピロノラクトンによる虚血脳アポトーシスの減少と梗塞域の縮小  
Spironolactone 3.3 mg/day を腹腔内投与 20m-MCAO 第7病日 虚血基底核



AM-Tgマウスにおいて20m-MCAO施行前後で血漿アルドステロン濃度(PAC)を測定すると、MCAO後のPAC上昇が抑えられていた。20m-MCAO第7病日のPAC(pg/ml)は野生型785±95, AM-Tg 730±91であった。外因性AM投与を行ったマウスではMCAO後のPACが有意に抑制され、野生型 1040±199, AM-Tg 567±69 (P<0.05, n=10)であった。