

脂肪組織におけるステロイドホルモン合成酵素及び

レセプターの遺伝子発現

武田 仁勇、米田 隆、朱 傲霜

金沢大学大学院臓器機能制御学(内分泌代謝内科)

【研究要旨】

[目的] ヒト及びラットにおける脂肪組織のアルドステロンを含むステロイドホルモン産生の有無及びレセプター発現に関して検討を行なった。

[方法] ヒト皮下脂肪組織及びラット腎周囲脂肪組織における、ミネラルコルチコイドレセプター(MR)、グルココルチコイドレセプター(GR)、I型 Ang II レセプター(AT1R)、21水酸化酵素遺伝子、CYP21、aldo合成酵素遺伝子 CYP11B2、コルチゾール合成酵素遺伝子 CYP11B1、及び11 β -HSD1, 2の各メッセンジャーRNA (mRNA)を Real time PCR 法にて検討した。

[結果と考察] ヒト脂肪組織におけるMRmRNAの発現は副腎の5倍、腎と同程度の発現を認め、CYP21、CYP11B1、B2 mRNAの発現は副腎に比して発現量は少なかった。11 β -HSD2 mRNA発現量は副腎に比して約1/3の発現量であった。これらの結果から脂肪組織におけるアルドステロン産生の可能性が示唆され、またアルドステロンが直接脂肪組織に作用し、メタボリック症候群の病態に関与している可能性が考えられた。

[結語] 脂肪組織にはステロイド合成酵素やステロイドホルモンレセプターが存在することが明らかになった。

【緒言】

我々は心血管系におけるアルドステロン産生の可能性及び病態における意義に関して報告してきた。^{1), 2)} 脂肪組織はエネルギー代謝以外に、ホルモン産生臓器として重要であり、近年糖尿病を始めとするメタボリック症候群や循環器疾患における病因的重要性が数多く報告されている。脂肪組織からのアンジオテンシノーゲン産生の高血圧への関与³⁾や、コル

チゾール代謝酵素である11 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(11 β -HSD)1のメタボリック症候群の成因における重要性⁴⁾などが、臨床研究や培養細胞、動物実験から明らかにされている。脂肪組織とミネラルコルチコイドホルモンに関しては、近年脂肪組織からアルドステロン分泌刺激物質が産生されることが報告⁵⁾されている以外にはなく、アルドステロンの脂肪組織における役割

は不明である。今回ヒト及びラットにおける脂肪組織のステロイドホルモン産生の有無及びレセプター発現に関して検討を行った。

【研究方法】

肥満にて入院した患者皮下脂肪生検組織 (n=6) 及びウィスターラット (n=6) 腎周囲脂肪組織から RNA を抽出し、ミネラルコルチコイドレセプター (MR), グルココルチコイドレセプター (GR), I 型 Ang II レセプター (AT1R)、21 水酸化酵素遺伝子, CYP21, aldo 合成酵素遺伝子 CYP11B2, コルチゾール合成酵素遺伝子 CYP11B1, 及び 11 β -HSD1, 2 の各メッセンジャーRNA (mRNA) をそれぞれ特異的なプライマーを作製し、Real time PCR 法にて検討した⁶⁾。なお脂肪培養細胞である 3T3-L1 細胞を用いても一部同様に検討した。対照として副腎非機能腺腫随伴副腎組織及びラット腎を用いて比較検討した。

【結果】 : Fig. 1 にヒト脂肪組織における MRmRNA の発現を示す。副腎に比して約 5 倍の発現高値であった。ラット脂肪組織における GRmRNA 発現量は腎臓に比して多かったが、MRmRNA は腎と同程度の発現を認めた。Fig 2 にヒト脂肪組織における CYP21mRNA 及びラット脂肪組織における CYP11B1, B2 mRNA 発現を示す。副腎に比して発現量は少ないが、脂肪組織におけるアルドステロンの産生の可能性が示唆された。Fig 3 にヒト脂肪組織における 11 β -HSD1 及び 11 β -HSD2mRNA 発現を示す。11 β -HSD2mRNA は副腎に比して約 1/3 の発現量であった。

【考案】 脂肪組織におけるレニン-アンジオテンシン系 (RAS) がメタボリック症候群に関与していることが数多く報告されている。肥満患者において AT1R が増加していること⁷⁾、インスリンが脂肪におけるアンジオテンシノーゲンの発現を増加させること、RAS がインスリン抵抗性を惹起すること⁸⁾などである。今回の実験結果から脂肪組織において MR mRNA が腎と同程度に発現していたことは、脂肪組織においてアルドステロンが病態生理学的に重要な役割を果たしていることが強く示唆される。肥満ラットに選択的アルドステロンブロッカーであるエプレレノンを投与することにより体重の減少が観察された (未発表データ)。また副腎に比して発現量は弱い⁹⁾が、アルドステロンに到るまでステロイド合成酵素遺伝子が存在していたことは、ステロイドホルモンのパラクリン、オートクリンの作用も示唆されさらに検討が必要である。内臓脂肪組織において 11 β -HSD1 遺伝子を過剰発現させたマウスではメタボリック症候群を呈することが報告され⁴⁾脂肪組織における局所でのグルココルチコイド作用の重要性は明らかであるが、今回の実験では 11 β -HSD2 の発現も観察された。上皮組織において MR 及び 11 β -HSD2 の存在はアルドステロンによる電解質調節や血圧調節を考える上で重要であり、遺伝性高血圧症である apparent mineralocorticoid excess syndrome では 11 β -HSD2 遺伝子異常に伴う腎での 11 β -HSD2 活性低下ないし欠損が原因である⁷⁾。近年原発性アルドステロン症におけ

るインスリン抵抗性や糖代謝異常が明らかにされている⁸⁾。脂肪組織においてMRは腎におけると同程度の発現を示したことより、11 β -HSD2の存在も考慮すると、アルドステロンが脂肪組織に何らかの病態生理学的役割を果たしていることが推察される。

【結語】 脂肪組織にはステロイド合成酵素やステロイドホルモンレセプターが存在することが明らかになった。脂肪組織におけるアルドステロンの作用に関してはさらに検討が必要である。

【文献】

- 1) Takeda Y. Vascular synthesis of aldosterone: role in hypertension. *Molec Cel Endocrinol* 217, 75-79, 2004
- 2) Takeda Y. Pleiotropic actions of aldosterone and the effects of eplerenone, a selective mineralocorticoid receptor antagonist. *Hypertens Res* 27, 781-789, 2004
- 3) Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathology of the adipose tissue rennin-angiotensin system. *Hypertension* 35: 1270-1277, 2000
- 4) Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, et al. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294: 2166-2170, 2001

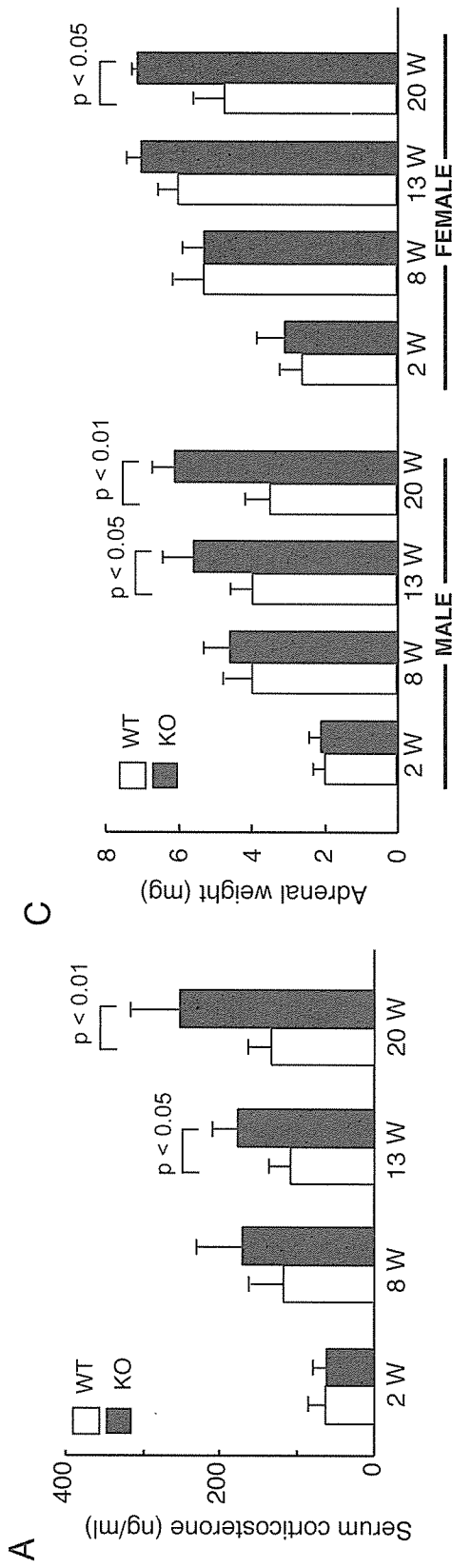
- 5) Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, et al. Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *PNAS* 100: 14211-14216, 2003.
- 6) Takeda Y, Usukura M, Yoneda T *et al*: The expression of messenger RNA for ADP-ribosyl cyclase in aldosterone-producing adenomas. *Clin Endocrinol* 62, 504-508, 2005
- 7) Mune T, Rogerson FM, Nikkila H et al. Human hypertension caused by mutations in the kidney isozymes of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Nat Genet* 10: 394-399, 1995
- 8) CATERA C, LAPENNA R, BAROSELLI S, et al. Insulin sensitivity in patients with primary aldosteronism: a follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 3457-3463, 2006.

業績

1. Oda N, Takeda Y, Zhu A, Usukura M, Yoneda T, Takata H, Mabuchi H. Pathophysiological roles of the adrenal renin-angiotensin system in patients with primary aldosteronism. *Hypertens Res* 29: 9-14, 2006
2. 武田仁勇、食塩感受性高血圧における

アルドステロンブロッカーによる臓器保護作用. 内分泌、糖尿病科 23: 613-616, 2006

3. 武田仁勇、抗アルドステロン系利尿薬、循環器科 60: 513-517, 2006.



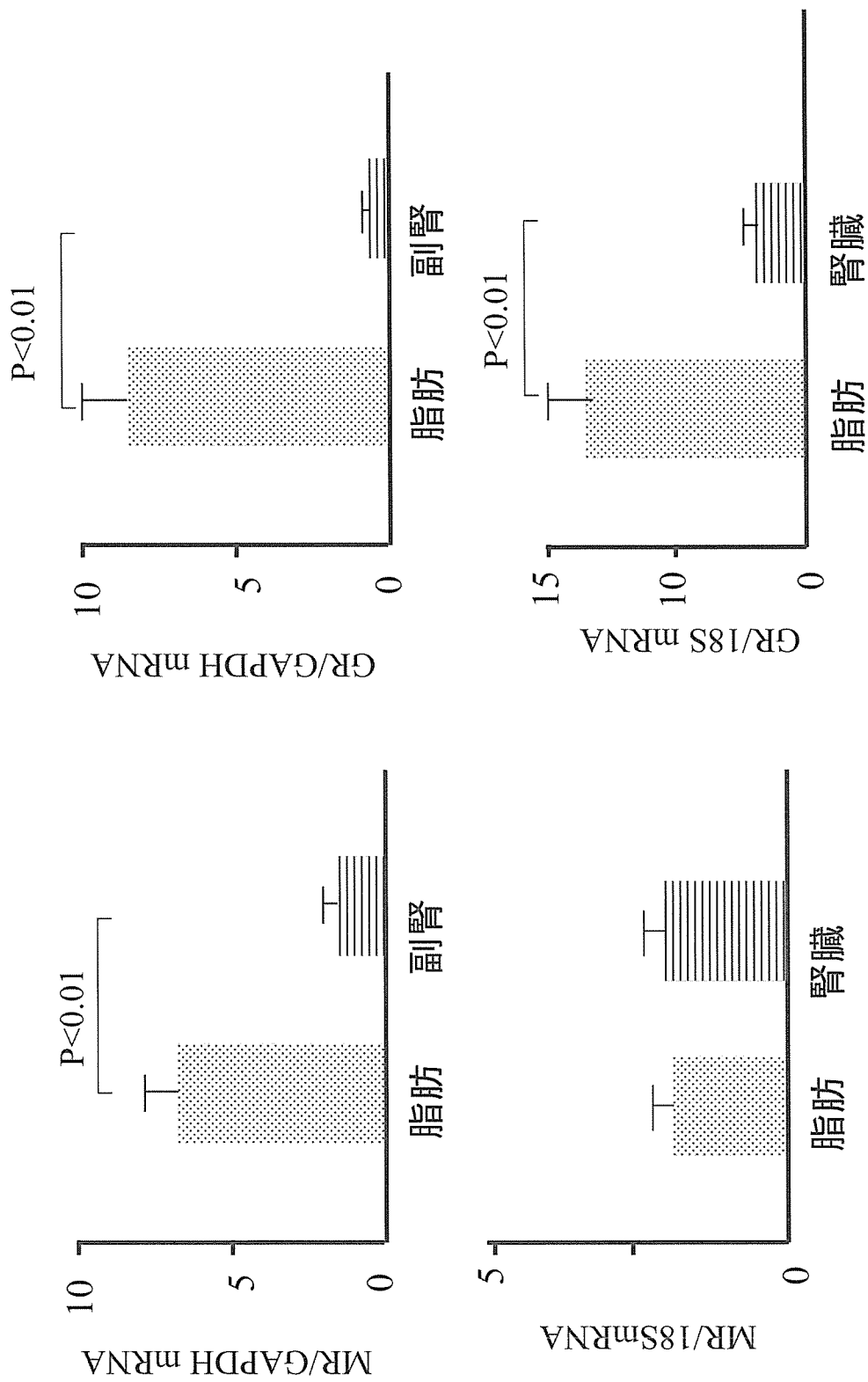


Fig.1. 上段にヒト脂肪組織及び副腎におけるミナロコルチコイド受容体(MR)及びグルココルチコイド受容体(GR)mRNA発現量を示す。MR及びGRmRNAは副腎より強く発現していた。下段にラット脂肪組織及び腎臓におけるMR, GRmRNAの発現量を示す。MRmRNAは脂肪組織において腎臓と同等の発現量を示した。

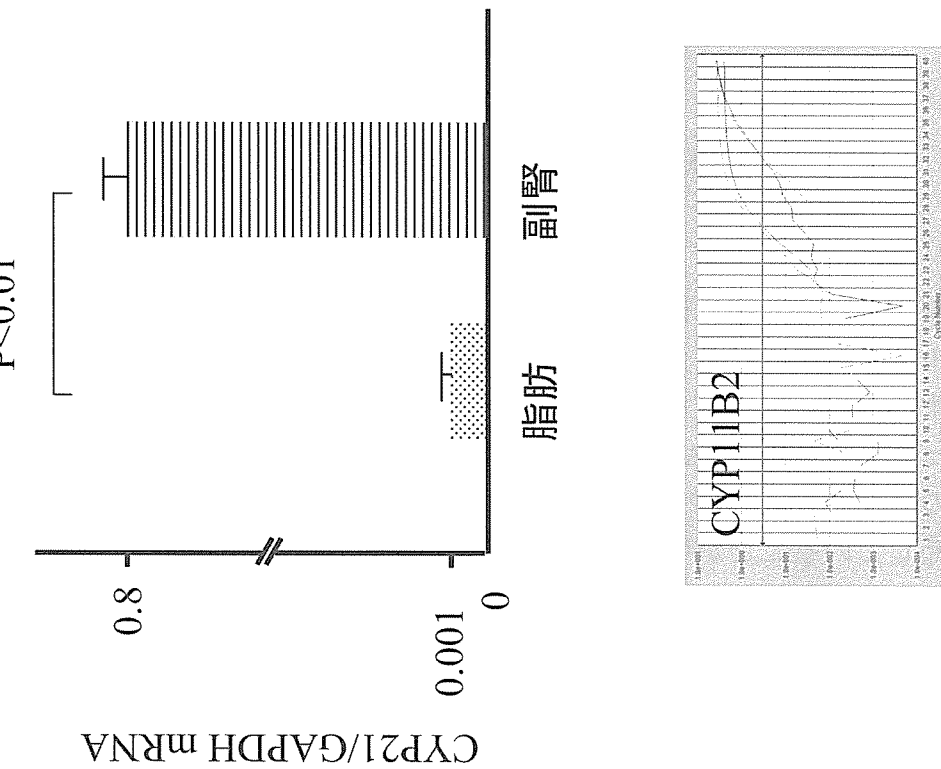


Fig2. 上段にヒト脂肪組織におけるCYP21mRNAの発現量を示す。脂肪組織における発現量は副腎に比して微量であった。下段にラット脂肪組織におけるCYP11B1, B2mRNAの発現を示す。脂肪組織におけるアルドステロン産生の可能性が示唆された。

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】

グルココルチコイド分泌は視床下部-下垂体-副腎系により調節されている。我々は、グルココルチコイド分泌調節における男性ホルモンレセプターの機能を明らかにするため、アンドロゲンレセプター (AR) 遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。その結果、AR は主に下垂体前葉におけるグルココルチコイドレセプターの発現を正に制御することにより、ACTH を介したグルココルチコイド分泌を調節していることが明らかとなった。

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の分泌は視床下部-下垂体-副腎系によるネガティブフィードバック機構により調節されている。特に視床下部/下垂体にはリガンド依存性転写因子であるグルココルチコイドレセプター (GR) が多く存在しており、血中リガンド濃度に応答し ACTH 分泌を調節すると考えられている。

慢性のグルココルチコイド過剰により引き起こされる疾患としてクッシング症候群が知られている。クッシング症候群は中心性肥満をはじめとし、脂質代謝、糖新生異常や骨代謝異常、高血圧など種々の症状を呈する。クッシング症候群の内、ACTH 依存性クッシング症候群は男性に比べ女性にその発症が多いという報告があるが、この ACTH 依存性クッシング

症の性差を規定する要因に関しては未だ何もわかっていない。

我々はこれまでにグルココルチコイドと同様にステロイドホルモン類に属するアンドロゲンの生体内高次機能を検索するため、アンドロゲンレセプター (AR) 遺伝子欠損 (ARKO) マウスを作出、解析してきた。その過程で ARKO 雄マウスは後発性の肥満を呈することが明らかとなった。しかしながら、ARKO 雌マウスでは顕著な肥満は観察されなかったことからアンドロゲン/AR が関連する肥満発症にも ACTH 依存性クッシングと同様に性差が存在する可能性が示唆された。

そこで本研究では視床下部-下垂体-副腎系に着目し、ARKO マウスを用いてグルココルチコイド分泌調節における AR 機能を検討した。

B. 研究方法

1: ARKO マウスにおける副腎機能の解析

副腎機能に関して、血中コルチコステロン、ACTH の測定、副腎組織学的解析を行った。また、副腎におけるアポトーシスおよび細胞増殖をそれぞれ検出するため、TUNNEL アッセイおよび BrdU アッセイを施行した。

2: ARKO マウスにおける下垂体機能の解析

デキサメサゾン負荷抑制試験を行うため ARKO マウスにデキサメサゾン各用量 (0, 2, 5 ug/20 g body weight) を腹腔内投与し 6 時間後に血液採取を行い、コルチコステロン、ACTH 濃度を測定した。次に下垂体機能に関して、各種ホルモン産生細胞の局在変化を検証するため ACTH、LHb、FSHb、TSHb、PRL、GH の免疫染色を行った。さらに、下垂体での AR、GR、ACTH の三重染色を行い、3 者の共局在の有無を検討した。

3: AR による GR 転写制御に関する解析

下垂体においてアンドロゲン/AR により制御を受ける下流遺伝子を同定するため、既知の下垂体制御因子の mRNA 発現を半定量的 RT-PCR 法により ARKO と WT で検討した。さらにコルチコトロプ腫瘍細胞株である AtT-20 細胞を用いて、アンドロゲン処理による GR、POMC の発現に対する効果をノザンブロット法、ウエスタンブロット法により調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は東京大学分子細胞生物学研究所組み換え DNA 実験実施規則および東京大学動物実験実施規則にそって行われた。

C. 研究結果

1: ARKO 雄マウスにおけるコルチコステロン分泌亢進

2 週、8 週、13 週、20 週の各週齢における血中コルチコステロン濃度を測定した結果、13 週および 20 週齢の ARKO 雄マウスにおいて顕著な血中コルチコステロン濃度の上昇が観察された (Fig. 1A)。

そこで次に副腎の解析を行ったところ、コルチコステロン分泌亢進に相関して 13 週および 20 週齢の ARKO 雄マウスの副腎重量が増加していることを見出した (Fig. 1B)。ARKO 副腎を組織学的に調べたところ、主にグルココルチコイドを分泌する束状帯の肥大、ヒト胎児皮質に相当する X ゾーン層の退縮不全が観察された (Fig. 1D)。さらに、ARKO 副腎皮質においてアポトーシスの低下と細胞増殖の亢進が明らかとなった。

2: ARKO 下垂体における ACTH 分泌亢進

ARKO マウスにおけるコルチコステロン上昇が中枢性であるか否かを検証するため、デキサメサゾン負荷抑制試験を行った。その結果、ARKO マウスではクッシング症候群と同様に低用量では血中コルチコステロンの低下はみられず、高用量でのみ血中コルチコステロン低下を誘導した。また、血中 ACTH 濃度を測定した結果、ARKO マウスにおいて ACTH 濃度が上昇していることが判明した (Fig. 1B)。しかし、下垂体の免疫組織学的解析では ARKO において ACTH、LHb、FSHb、TSHb、PRL 産生細胞の分布パターンに変化はみられなかった。

3: ARKO 下垂体における GR 発現低下

ARKO 下垂体における各種遺伝子発現を検討したところ、ACTH 分泌亢進に対応して POMC 遺伝子の発現上昇が明らかとなった。一方、GR 発現が ARKO 下垂体で有意に低下していることを見出した。また、野生型マウス下垂体の三重染色を行ったところ、AR、GR、ACTH が共局在していたことから、AR が GR 発現調節により ACTH 分泌を制御している可能性が強く示された。さらに、AtT-20 細胞株においてジヒドロテストステロン投与により GR 発現が著しく増加することが明らかとなった。

D. 考察

ARKO 雄マウスでは、視床下部-下垂体-副腎系のネガティブフィードバック機構の破綻による副腎皮質過形成およびグルココルチコイド産生亢進を呈することが明らかとなった。この要因として、主に POMC 遺伝子発現上昇に伴う ACTH 産生亢進が明らかとなった。この ACTH 産生亢進の分子機構の一端として、下垂体レベルにおいて GR 遺伝子発現が AR により正に制御されている可能性が強く示唆された。このように、グルココルチコイド分泌調節の視床下部-下垂体-副腎系のネガティブフィードバック機構における新規の AR 機能が明らかとなった。しかしながら、アンドロゲン/AR によるグルココルチコイド分泌調節およびその破綻を示す臨床的知見は乏しい。また、GR 遺伝子プロモーター上における AR 転写制御機構の詳細は未解決の部分であり今後の課題である。

E. 結論

AR は下垂体での GR 遺伝子発現を正に制御することにより、グルココルチコイド分泌調節における視床下部-下垂体-副腎系のネガティブフィードバック機構を調節していることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S.: Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature*, 2007. (in press)

Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Nakamura, T., Akimoto, C., Yamamoto, Y., Katagiri, T., Foulds, C., Takezawa, S., Kitagawa, H., Takeyama, K., O' Malley, B. W., Kato, S.: DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of MicroRNAs. *Nat. Cell Biol.*, 2007. (in press)

Takezawa, S., Yokoyama, A., Okada, M., Fujiki, R., Iriyama, A., Yanagi, Y., Ito, H., Takada, I., Kishimoto, M., Miyajima, A., Takeyama, K., Umesono, K., Kitagawa, H., Kato, S.: A cell cycle-dependent co-repressor for

- photoreceptor cell-specific nuclear receptor (PNR). *EMBO J.*, 2007. (in press)
- Yamaoka, K., Shindo, M., Iwasaki, K., Yamaoka, I., Yamamoto, Y., Kitagawa, H., Kato, S.: Multiple co-activator complexes support ligand-induced transactivation function of VDR. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007. (in press)
- Memezawa, A., Takada, I., Takeyama, K., Igarashi, M., Ito, S., Aiba, S., Kato, S., Kouzmenko, A.P.: Id2 gene targeted crosstalk between Wnt and retinoid signaling regulates proliferation in human keratinocytes. *Oncogene*, 2007. (in press)
- Kim, M.-S., Fujiki, R., Murayama, A., Kitagawa, H., Yamamoto, K., Yamamoto, Y., Mihara, M., Takeyama, K., Kato, S.: $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. *Mol. Endocrinol.*, 21, 334-342, 2007.
- Shiina, H., Matsumoto, T., Sato, T., Igarashi, K., Miyamoto, J., Takemasa, S., Sakari, M., Takada, I., Nakamura, T., Metzger, D., Chambon, P., Kanno, J., Yoshikawa, H., Kato, S.: Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 224-229, 2006.
- Oishi, H., Kitagawa, H., Wada, O., Takezawa, S., Tora, L., Kouzu-Fujita, M., Takada, I., Yano, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: An hGCN5/TRRAP HAT complex coactivates BRCA1 transactivation function through histone modification. *J. Biol. Chem.*, 281, 20-26, 2006.
- Yamaoka, K., Kim, M.-S., Takada, I., Takeyama, K., Kamimura, T., Kato, S.: Culture serum-induced conversion from agonist to antagonist of a Vitamin D analog, TEI-9647. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 100, 177-183, 2006.
- Kishimoto, M., Fujiki, R., Takezawa, S., Sasaki, Y., Nakamura, T., Yamaoka, K., Kitagawa, H., Kato, S.: Nuclear receptor mediated gene regulation through chromatin remodeling and histone modifications. *Endocrinol. J.*, 53, 157-172, 2006.
- Yamada, T., Kawano, H., Koshizuka, Y., Fukuda, T., Yoshimura, K., Kamekura, S., Saito, T., Ikeda, T., Kawasaki, Y., Azuma, Y., Ikegawa, S., Hoshi, K., Chung, U., Nakamura, K., Kato, S., Kawaguchi, H.: Carminerin contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification. *Nature Medicine*, 12, 665-670, 2006.

- Yamamoto, K., Sokabe, T., Matsumoto, T., Yoshimura, K., Shibata, M., Ohura, N., Fukuda, T., Sato, T., Sekine, K., Kato, S., Isshiki, M., Fujita, T., Masuda, H., Kobayashi, M., Kawamura, K., Kamiya, A., Ando, J.: Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nature Medicine*, 12, 133-137, 2006.
- Li, M., Hener, P., Zhang, Z., Kato, S., Metzger, D., Chambon, P.: Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. US A.*, 103, 11736-11741, 2006.
- Tateishi, Y., Sonoo, R., Sekiya, Y., Sunahara, N., Kawano, M., Wayama, M., Hirota, R., Kawabe, Y., Murayama, A., Kato, S., Kimura, K., Yanagisawa, J.: Turning off estrogen receptor beta-mediated transcription requires estrogen-dependent receptor proteolysis. *Mol. Cell. Biol.*, 26, 7966-7976, 2006.
- Katsu, Y., Kohno, S., Oka, T., Mitsui, N., Tooi, O., Santo, N., Urushitani, H., Fukumoto, Y., Kuwabara, K., Ashikaga, K., Minami, S., Kato, S., Ohta, Y., Guillelte, L. J. Jr., Iguchi, T.: Molecular cloning of estrogen receptor alpha (ER α ; ESR1) of the Japanese giant salamander, *Andrias japonicus*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 257-258, 84-94, 2006.
- Ma, Y., Khalifa, B., Yee, Y. K., Lu, J., Memezawa, A., Savkur, R. S., Yamamoto, Y., Chintalacharuvu, S. R., Yamaoka, K., Stayrook, K. R., Bramlett, K. S., Zeng, Q. Q., Chandrasekhar, S., Yu, X. P., Linebarger, J. H., Iturria, S. J., Burris, T. P., Kato, S., Chin, W. W., Nagpal, S.: Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective, nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators. *J. Clin. Invest.*, 116, 892-904, 2006.
- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Okabe, T., Nomura, M., Daitoku, H., Fukamizu, A., Kato, S., Takayanagi, R., Nawata, H.: IGF1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of FOXO1 with androgen receptor. *J. Biol. Chem.*, 2007. (in press)
- Yokota, K., Shibata, H., Kurihara, I., Kobayashi, S., Suda, N., Murai-Takeda, A., Saito, I., Kitagawa, H., Kato, S., Saruta, T., Itoh, H.: Coactivation of the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by Ubc9. *J. Biol. Chem.*, 282, 1998-2010, 2007.

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

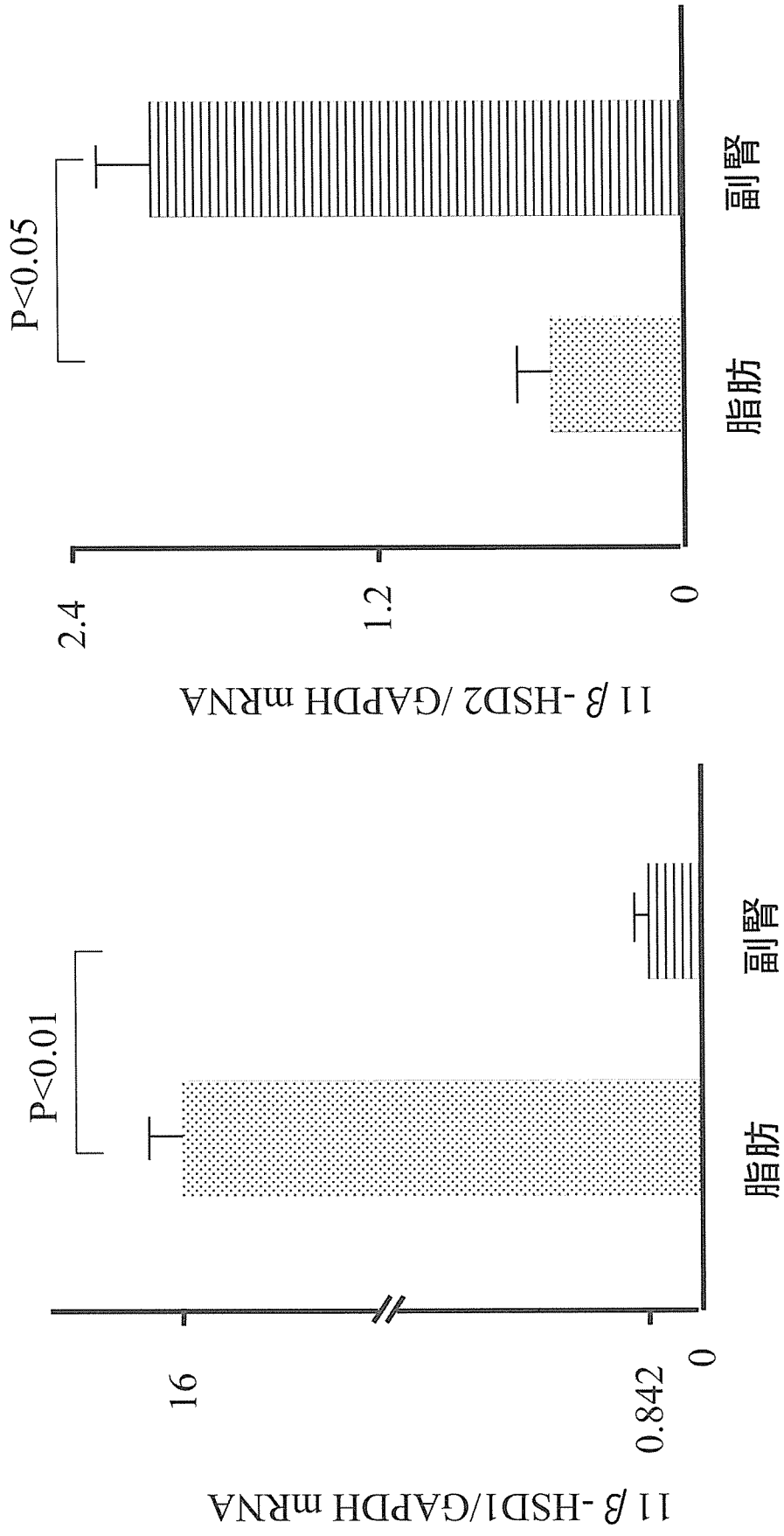


Fig.3 ヒト脂肪組織における11β-hydroxysteroid dehydrogenase (11β-HSD)I 及び11β-HSD2mRNA発現量を示す。11β-HSDIは脂肪組織に強く発現し11β-HSD2は副腎に比して発現量は少なかった。

グルココルチコイド作用調節機構に関する研究

田中 廣壽、吉川 賢忠、清水 宣明
東京大学医科学研究所先端医療研究センター

【研究要旨】

新たなグルココルチコイド作用調節因子 HEXIM1 はグルココルチコイドレセプター (GR) との直接結合を介してグルココルチコイド応答性遺伝子発現を負に制御する。細胞内 HEXIM1 発現量は細胞のグルココルチコイド応答性を規定する。HEXIM1 による GR 応答性遺伝子発現の抑制機構は、P-TEFb 抑制、GR との直接相互作用、という、少なくとも二つの異なった経路による。今後、グルココルチコイド作用調節における HEXIM1 の意義をより明確にし、グルココルチコイド抵抗性病態の解明や新規 GR 標的治療法開発などへと展開していきたい。

A. 研究目的

グルココルチコイド作用調節機構を解明し、グルココルチコイド異常症の病態解明とグルココルチコイド療法を改良する事を目的とする。とくに、最近われわれが発見した新たなグルココルチコイド作用調節因子である HEXIM1 に焦点をあてる。すでに、HEXIM1 は、グルココルチコイドレセプター (GR) に直接結合し、GR 応答性遺伝子発現を負に制御することを見いだしている。今年度はその分子機構を明らかにする事を試みた。

B. 研究方法

- 1) GR の標的遺伝子プロモーターとの相互作用はクロマチン免疫沈降法によって解析した。
- 2) GR をはじめとした核内レセプターと HEXIM1 の結合を GST pull-down 法によって解析した。

- 3) GR 応答性遺伝子発現は GRE-luciferase 遺伝子を用いたレポーターアッセイにより、内因性グルココルチコイド応答性遺伝子の mRNA 発現はリアルタイム PCR 法によった。

(倫理面への配慮)

とくになし。

C. 研究結果

GR の標的遺伝子プロモーターとの結合を解析するためクロマチン免疫沈降法を立ち上げた。グルココルチコイド応答性内因性遺伝子としては ATP1A1、SGK2、ACE2 を用いた。デキサメタゾン添加後各時間で核抽出液を採取し、抗 GR 抗体で免疫沈降した。20、40分において GR の結合は増加したが、その後、60分後には消失した。しかし、80分以降はまた結合が観測され、GR と標的遺伝子プロモーターとの相互作用はある種のオッシレーション

オンを呈する事が確認された(図1)。過剰量のHEXIM1存在下ではGRとこれらの標的遺伝子プロモーターとの相互作用は、いずれの時間においてもコントロールに比して低下していた(図2)。

GRの変異体を用いてHEXIM1と直接相互作用する部位を検討した結果、ヒンジ領域が重要である事が示唆された(図3)。HEXIM1と核内レセプターとの相互作用を解析した結果、GRに加えてAR、MR、PRも弱いながらもHEXIM1に結合する事がわかった。しかし、これらのステロイドホルモンレセプターとは相同性が低いPPAR γ 、VDR、RAR、RXRなどはHEXIM1とは結合しなかった。HEXIM1と相互作用しないPPAR γ のヒンジ領域をGRのそれとスワップした変異体はHEXIM1と結合した(図4)。HEXIM1に関しては中央の核移行に必須な領域がGRとの相互作用に重要であり、7SK RNAと結合する領域とは分離可能であった。7SK非結合性かつGR結合性のHEXIM1は、*in vitro*においてRNAポリメラーゼIIのリン酸化を指標にした際P-TEFb抑制活性を有しなかった。

ダイオキシンレセプターAhRはHEXIM1とは直接結合しないが、HEXIM1はAhR応答性レポーター遺伝子の発現をP-TEFb抑制を介して負に制御した。一方、7SK非結合性HEXIM1はP-TEFb抑制活性はないが、GR応答性レポーター遺伝子の発現は抑制した。内因性にAhRとGRによって制御される遺伝子(各々CYP1A1、ENaC α)の発現に与えるHEXIM1の影響を、HEXIM1 siRNA、各種HEXIM1発現プラスミドを用いて検討した結果、レポーター遺伝子を用いた実験結果と同様に、AhR応答性

CYP1A1 mRNA発現をHEXIM1はP-TEFb抑制を介して抑制した。一方、HEXIM1はENaC α mRNA発現をP-TEFb抑制経路とは独立して負に制御する事を確認した(図5)。

D. 考察

すでにHEXIM1はGRをTIF2などの転写共役因子とは異なる核内コンパートメントにシフトさせる可能性を指摘している。今回のクロマチン免疫沈降の結果はかかる結果を支持する者であり、HEXIM1過剰量存在下では十分な濃度のリガンドが存在していても核内においてプロモーターにアクセス可能なGR量は減少する事を示している。すなわち、HEXIM1の細胞内の量はグルココルチコイド応答性を規定する因子である可能性がある。

遺伝子発現は転写開始とともに伸張反応によっても精緻に制御されている。P-TEFbはRNAポリメラーゼIIのリン酸化を通じて伸張反応を正に制御する。HEXIM1はCdk9と結合してP-TEFbを抑制し、RNAポリメラーゼIIのリン酸化を減少させて伸張反応を負に制御する。実際、AhR応答性レポーター遺伝子を用いた実験、内因性AhR応答性遺伝子であるCYP1A1のmRNA発現を解析した実験の結果から、かかるHEXIM1の機能は生細胞においても確認されたと言える。今後、遺伝子改変動物を用いてグルココルチコイド作用調節におけるHEXIM1の意義をより明確にする必要がある。

E. 結論

HEXIM1はGRとの直接結合を介してグルココルチコイド応答性遺伝子発現を負

に制御する。細胞内 HEXIM1 発現量は細胞のグルココルチコイド応答性を規定する。HEXIM1 による GR 応答性遺伝子発現の抑制機構は、P-TEFb 抑制、GR との直接相互作用、という、少なくとも二つの異なった経路による。現在、遺伝子改変マウスの作成を含め、個体レベルにおける実験も進行中であることを付記する。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

論文発表

Takuya Fukazawa, Yutaka Maeda, Mary L. Durbin, Toru Nakai, Junji Matsuoka, Hirotohi Tanaka, Yoshio Naomoto, and Noriaki Tanaka

Pulmonary adenocarcinoma-targeted gene therapy by a cancer- and tissue-specific promoter system.

Mol. Cancer Ther. 2007;6(1):244-252

Inamoto S, Iwata S, Inamoto T, Nomura S, Sasaki T, Urasaki Y, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Dang NH, Morimoto C.

Crk-associated substrate lymphocyte type regulates transforming growth factor-beta signaling by inhibiting Smad6 and Smad7.

Oncogene. 2007;26(6):893-904

Sano M, Izumi Y, Helenius K, Asakura M, Rossi DJ, Xie M, Taffet G, Hu L, Pautler RG, Wilson CR, Boudina S, Abel ED,

Taegtmeyer H, Scaglia F, Graham BH, Kralli A, Shimizu N, Tanaka H, Makela TP, Schneider MD.

Menage-a-Trois 1 Is Critical for the Transcriptional Function of PPARgamma Coactivator 1.

Cell Metab. 2007;5(2):129-142

Kei Ohnuma, Masahiko Uchiyama, Tadanori Yamochi, Kunika Nishibashi, Osamu Hosono, Nozomu Takahashi, Shinichiro Kina, Hirotohi Tanaka, Xin Lin, Nam H. Dang, and Chikao Morimoto
Caveolin-1 triggers T-cell activation via CD26 in association with CARMA1
J. Biol. Chem., in press.

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。

図1 グルココルチコイド応答性遺伝子プロモーターと
 グルココルチコイドレセプター(GR)の相互作用
 - クロマチン免疫沈降法による検討

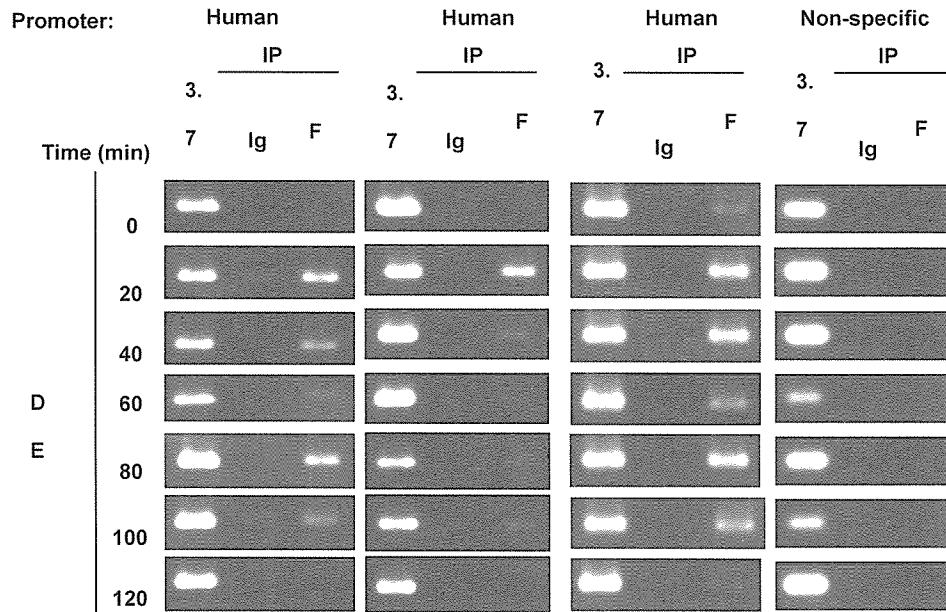


図2 HEXIM1過剰量存在下ではGRのプロモーターへの結合は減少する

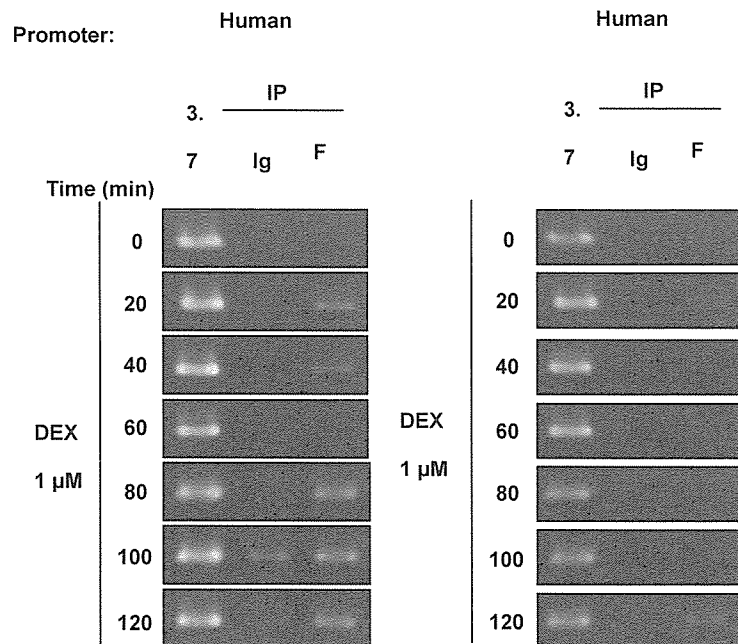


図3 GRはヒンジ領域を介してHEXIM1と結合する

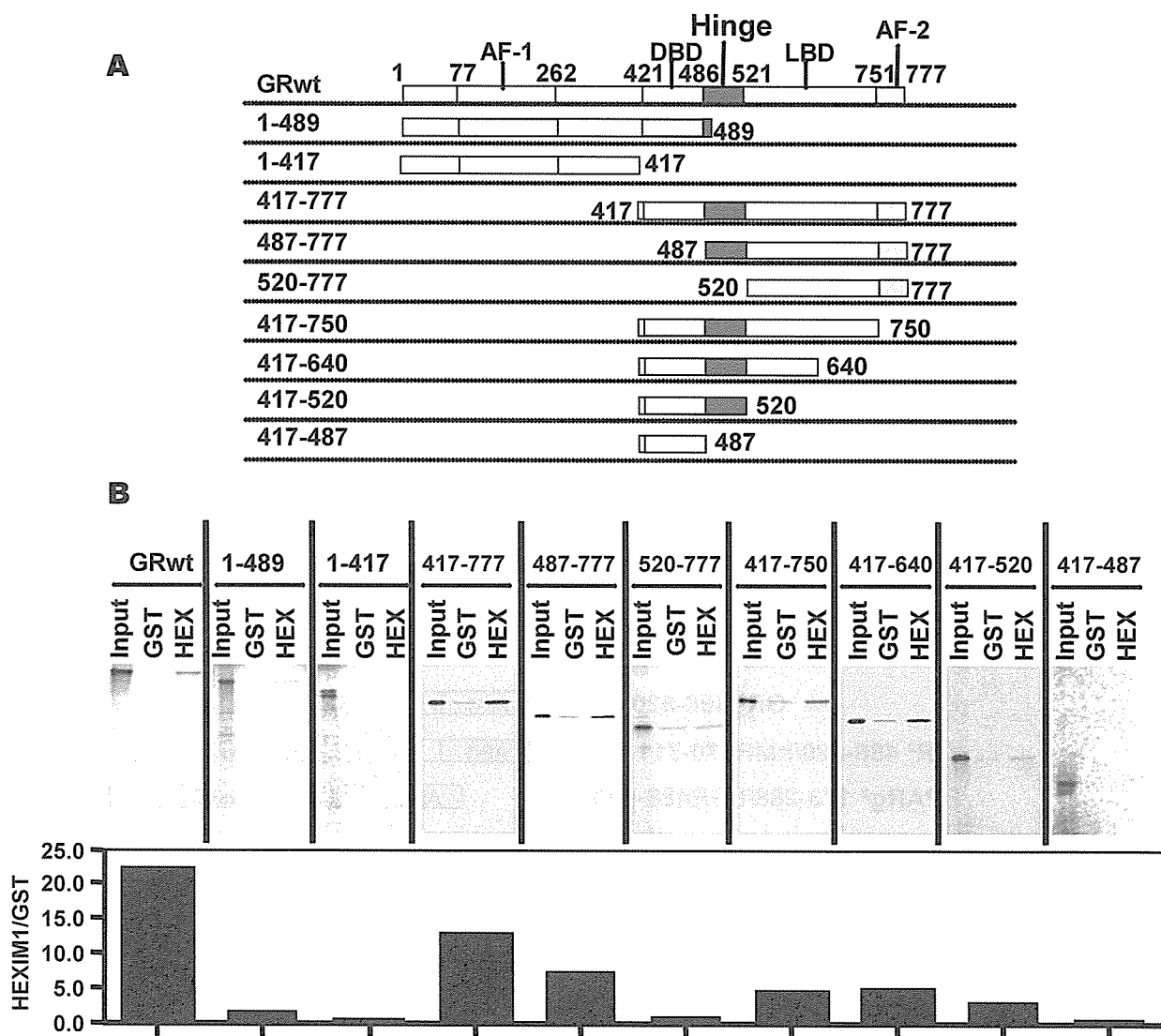
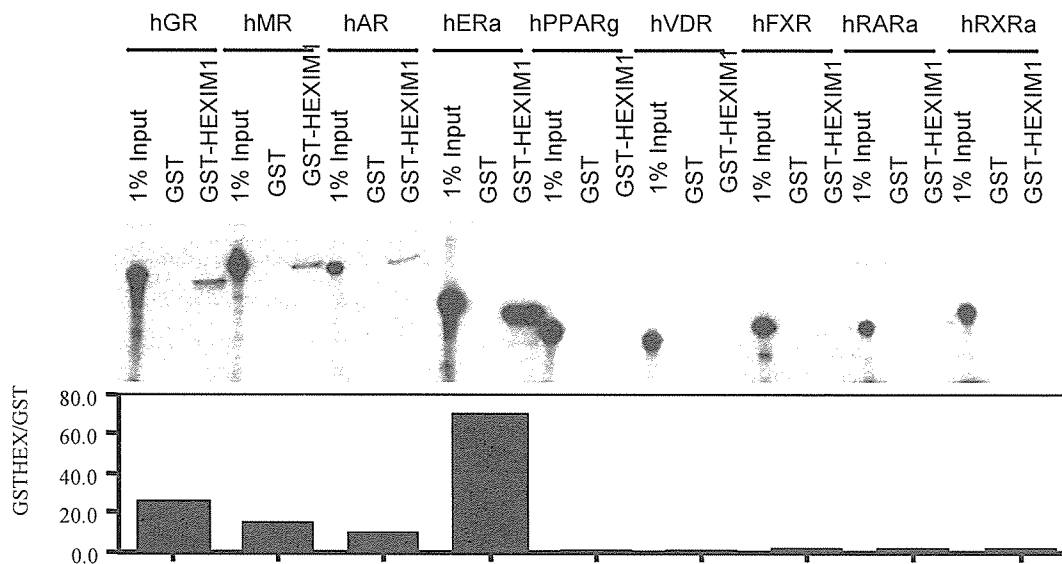


図4 核内レセプターとHEXIM1の相互作用

A



B

