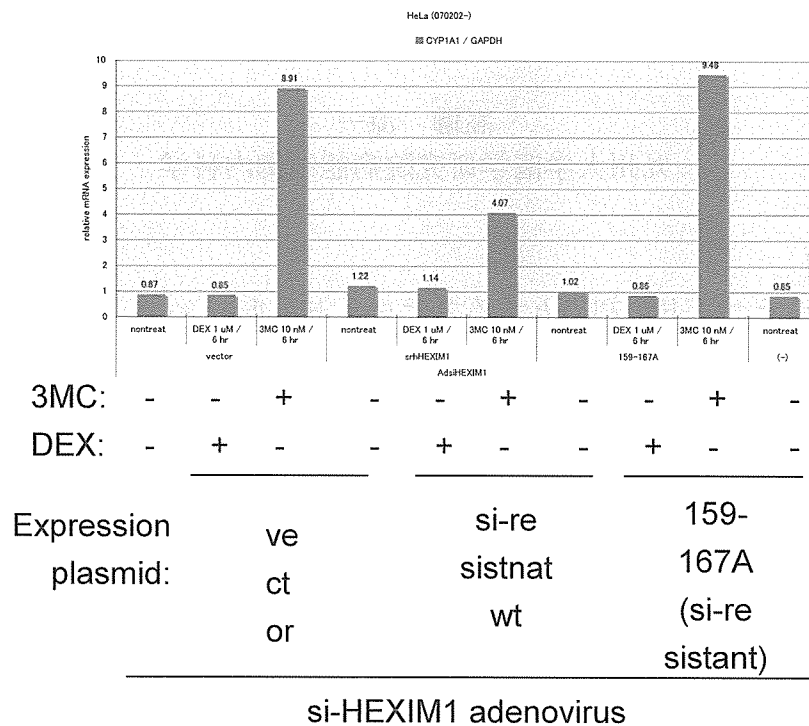
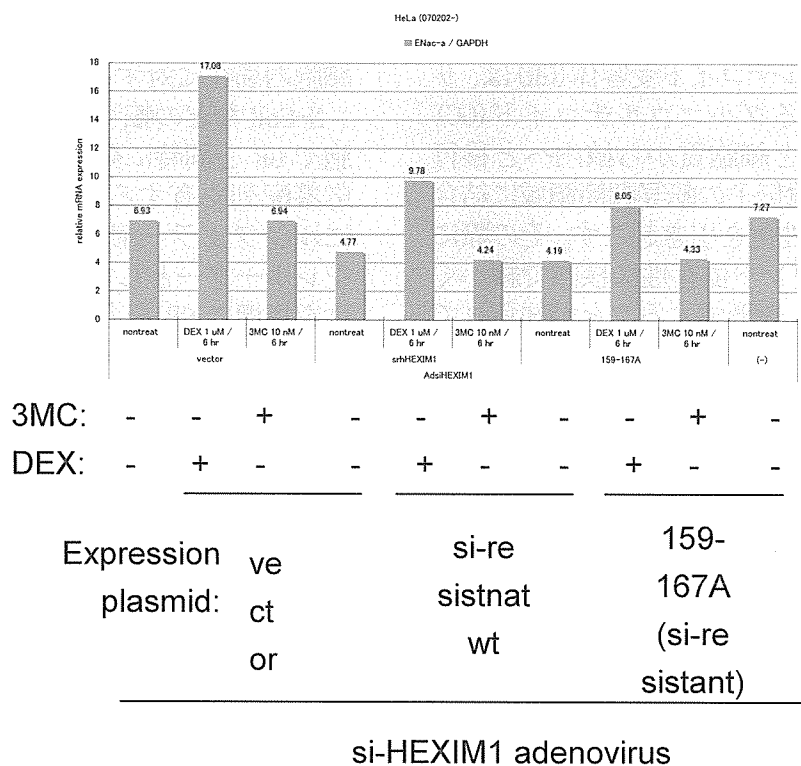


図5 HEXIM1による遺伝子発現制御機構

(A) mRNA expression of CYP1A1 (AhR-dependent)



(B) mRNA expression of ENac-alpha (GR-dependent)



グルココルチコイド受容体の核内 foci 形成および

転写活性化に対する転写制御因子の影響

高柳 涼一

九州大学医学研究院病態制御内科学

【研究要旨】

グルココルチコイドを初めとするステロイドホルモンは、受容体を介して標的遺伝子の転写活性化を引き起こす。ステロイドホルモン受容体は、リガンド依存性に核内に均一な細かい foci を形成することが知られていたが、その生理的意義に関しては明らかになっていなかった。本年度の研究において、我々はステロイドホルモン受容体の foci 形成は、転写コアクチベーターとコリプレッサーの発現量の比に依存することを明らかにした。また、転写を阻害することで、foci 形成も阻害されることを示した。今回得られた結果から、ステロイドホルモン受容体の foci は、転写活性化を行う受容体とコアクチベーターの複合体が一時的に貯蔵される場所であることが推測された。

A. 研究目的

グルココルチコイド受容体(GR)は、リガンドであるグルココルチコイド(GC)が結合すると細胞質から核内へと移行して、標的遺伝子の転写調節領域に結合して転写活性化を引き起こす。その際に GR は、リガンド依存性に核内で細かく均一な foci を形成することが知られている。この foci 形成は、転写活性化と相関しており、転写コアクチベーターも共局在することが報告されているが、その生理的意義については明らかになっていない。今回の研究で、GR を含めたステロイドホルモン受容体の foci 形成の意義について検討した。また、転写コリプレッサーである N-CoR の、GR の転写活性化および核内 foci 形成への影響について解析した。

B. 研究方法

(1) GR を介する転写活性化および GR の細胞内局在に対する N-CoR の影響

N-CoR などの転写制御因子を、培養細胞で GR と同時に発現させて、ホルモン応答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 GR を介する転写活性化に対する N-CoR の影響を解析した。また GR および N-CoR 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。

(2) N-CoR の機能ドメインの同定

N-CoR の欠失ミュータントを作製して、N-CoR による GR の転写活性化抑制および N-CoR の核内局在に重要なドメインを同定した。

(3) 核内 foci 形成に対する転写阻害剤の影響

ステロイドホルモン受容体の foci 形成に対する転写阻害剤の効果を検討した。

(4) 三次元画像構築

共焦点レーザー顕微鏡で得られた二次元断層像を元にして三次元画像を構築し、ステロイドホルモン受容体の核内 foci の定量的解析を行った。

(倫理面への配慮)

実験は、すでに樹立されている培養細胞株を用いた実験なので、倫理上の問題は特にないと考えられる。

C. 研究結果

(1) GRとN-CoRのリガンド依存性核内共局在

GRとN-CoRを細胞内共発現させた場合、リガンドがない状態では、GRは細胞質に均一に存在し、N-CoRは核内でdotを形成する。リガンドであるデキサメタゾンで処理すると、GRは核に移行して、N-CoRと共局在した。このとき、N-CoRの核内dotは消失した。同じ現象がアンドロゲン受容体を用いた実験でも認められた。

(2) N-CoRによる、GRを介する転写活性化の抑制

GC応答配列を有するレポーターを用いた実験から、N-CoRはGRの転写活性化能を抑制することが明らかになった (図1)。

(3) N-CoRの中央部分(1134-1798)が、N-CoRの細胞内局在、GRとの結合、およびGRを介する転写活性化の抑制に重要である。

様々なN-CoRの欠失ミュータントを作製して、機能ドメインを探索したところ、N-CoRの中央部分(1134-1798)が、N-CoRの全長と同様にGRの転写活性化能を抑制した (図1)。さらに、このN-CoR(1134-1798)は、全長のN-CoRと同様の細胞内挙動を示し、リガンド依

存性にGRと共局在した。

(4) 転写阻害剤によるGRのfoci形成の抑制

転写阻害剤であるアクチノマイシンDや α -アマニチンで前処理した後に、リガンド処理を行うと、GRの核内foci形成が著しく抑制された (図2)。このことは、GRの核内foci形成は、転写活性化に先立って起こるものではないということを示唆している。

(5) N-CoRによる受容体のfoci形成の阻害およびコアクチベーターによるfociの回復

ステロイドホルモン受容体とGFPおよびN-CoRとYFPの二つの融合タンパク質を共発現させ、核内foci数を、三次元画像解析法を用いて定量的に解析した結果、N-CoRを発現させると、受容体のリガンド依存性foci形成は抑制され、同時にN-CoRの核内dotも消失し、受容体と共局在を示した。さらにコアクチベーターを発現させると、受容体のfoci数は回復し、N-CoRの核内dotが再び出現した。このことは、コアクチベーターを発現させることによって、N-CoRがステロイドホルモン受容体から解離して、自分自身のコンパートメントに戻ったものと考えられた。

D. 考察

転写阻害剤でGRのfoci形成が抑制されることから、foci形成は転写活性化後に起こる現象であることが示唆された。GRは標的遺伝子の転写調節領域への結合と解離を繰り返していることから、fociは転写調節領域に結合していたステロイドホルモン受容体と転写コアクチベーターの複合体が、一時的に貯蔵される場所ではないかと推測される。

N-CoRの発現は、GRのリガンド依存

性 foci 形成を阻害するが、コアクチベーターの共発現によって、GR の foci および N-CoR の dot が出現し、転写活性化能が回復した。このことから、転写コアクチベーターとコリプレッサーの細胞内での量比が、ステロイドホルモン受容体の転写活性化能および foci 形成能を規定するものと考えられる。

E. 結論

ステロイドホルモン受容体の foci 形成は、転写コアクチベーターとコリプレッサーの発現量に左右されており、細胞の転写活性化の状態を反映するものと考えられる。Foci は、受容体と転写コアクチベーターの複合体が一時的に貯蔵される場所と考えられた。

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. Kawate H, Wu Y, Ohnaka K, Takayanagi R : Mutual transactivational repression of Runx2 and the androgen receptor by an impairment of their normal compartmentalization. *J Steroid Biochem Mol Biol* : in press, 2007.
2. Wu Y, Kawate H, Ohnaka K, Nawata H, Takayanagi R : Nuclear compartmentalization of N-CoR and its interactions with steroid receptors. *Mol Cell Biol*, 26(17) : 6633-6655, 2006.
3. Tao R-H, Kawate H, Wu Y, Ohnaka K, Ishizuka M, Inoue A, Hagiwara H, Takayanagi R : Testicular zinc finger protein recruits histone deacetylase 2 and suppresses the transactivation function and intranuclear foci formation of agonist-bound androgen receptor competitively with TIF2. *Mol Cell Endocrinol*, 247(1-2) : 150-165,

2006.

4. Tao R-H, Kawate H, Ohnaka K, Ishizuka M, Hagiwara H, Takayanagi R : Opposite effects of alternative TZF spliced variants on androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 341(2) : 515-521, 2006
5. 河手久弥、高柳涼一 : 加齢とステロイド、内分泌・糖尿病科、23(4) : 348-352, 2006.
6. 河手久弥、高柳涼一 : 続発性骨粗鬆症の観点から、カレントセラピー、24(9) : 783-787、2006.
7. 河手久弥、高柳涼一 : 性ホルモンとアンチ・エイジング、*BIO Clinica*、21(7) : 600-605, 2006.
8. 大中佳三、高柳涼一 : ステロイド性骨粗鬆症、別冊 新領域別症候群シリーズ No. 2 内分泌症候群 (第 2 版) II、日本臨床、: 87-91, 2006.
9. 大中佳三、高柳涼一 : 急性副腎皮質機能低下症、別冊 新領域別症候群シリーズ No. 1 内分泌症候群 (第 2 版) I、日本臨床 : 559-561, 2006.
10. 大中佳三、高柳涼一、慢性副腎皮質機能低下症 [原発性、続発性]、別冊 新領域別症候群シリーズ No. 1 内分泌症候群 (第 2 版) I、日本臨床 : 549-552, 2006.
11. 大中佳三、高柳涼一 : グルココルチコイドの骨代謝作用機構 : 分化促進と骨形成抑制、腎と骨代謝、19(2) : 107-114, 2006.
12. 高柳涼一 : 私の処方 ステロイド性骨粗鬆症、*Modern Physician*、26(4) : 618-619, 2006.
13. 高柳涼一 : 内分泌性高血圧症の分類と疫学 内分泌性高血圧症の疫学 本邦における全国疫学調査、*日本内科学会雑誌*、95(4) : 622-628, 2006.
14. 岡部泰二郎、高柳涼一、名和田新 : コルチコステロイドの抗炎症作用とその機序、*アレルギー科*、21(4) : 321-328, 2006.
15. 足立雅広、高柳涼一 : 男性の骨と性ステロイド 副腎アンドロゲン (DHEA)、*The Bone*、20(2) : 187-193, 2006.

16. 河手久弥、高柳涼一：骨粗鬆症の病型 -老人性骨粗鬆症-、内分泌・糖尿病科、22(2)：147-152, 2006.

17. 高柳涼一：高齢者の内分泌疾患の特徴、ホルモンと臨床 54 春季増刊、296-299, 2006.

18. 大中佳三、高柳涼一：ステロイド性骨粗鬆症の病態と発生機序、痛みと臨床、6(2)：146-152, 2006.

2. 学会発表

1. Wu Y, Kawate H, Ohnaka K, Takayanagi R：N-CoR competitively suppresses the transactivation function of steroid hormone receptors with coactivators through its middle region. 第14回日本ステロイドホルモン学会、大阪、2006年12月.

2. Wu Y, Kawate H, Ohnaka K, Takayanagi R：Nuclear compartmentalization of N-CoR and steroid hormone receptors. 日本分子生物学会2006フォーラム、名古屋、2006年12月.

3. Adachi M, Nicol CJ, Gonzalez FJ, Takayanagi R：The influence of PPARgamma in endothelial cells against high fat diet-induced hypertension. The 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Fukuoka(Japan)、October 15-19, 2006.

4. 河手久弥、大中佳三、足立雅広、高柳涼一：アレンドロネート投与による閉経後骨粗鬆症患者のQOL改善効果の検討. 第8回日本骨粗鬆症学会、東京、2006年10月.

5. 足立雅広、河手久弥、大中佳三、高柳涼一：血管内皮細胞におけるPPAR γ の血圧調節への作用. 第48回日本老年医学会学術総会、金沢、2006年6月.

6. Takayanagi R, Tao RH, Kawate H, Ohnaka K, Hagiwara H：Two Alternative Splicing Variants of Testicular Zinc Finger Protein Show Opposite Effects on Transactivation Function of Androgen Receptor. The Endocrine Society's 88th Annual Meeting、Boston(USA)、2006年6月.

7. Ohnaka K, Tanabe M, Kawate H, Takayanagi R：Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in primary cultured human osteoblasts: Novel mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. The Endocrine Society's 88th Annual Meeting、Boston(USA)、2006年6月.

8. Kawate K, Tao R-H, Wu Y, Ohnaka K, Hagiwara H, Takayanagi R：Testicular Zinc Finger Protein Suppresses the Transactivation Function and Intranuclear Foci Formation of Agonist-Bound Androgen Receptor through Recruitment of Histone Deacetylase 2. The Endocrine Society's 88th Annual Meeting、Boston(USA)、2006年6月.

9. Adachi M, Kawate H, Ohnaka K, Okabe T, Yanase T, Takayanagi R：The Mutations in DNA Binding Domain of Androgen Receptor Derived from Two Androgen Insensitivity Syndrome Patients Impaired Nuclear Translocation, Nuclear Matrix Targeting and Intranuclear Mobility of the Receptor. The Endocrine Society's 88th Annual Meeting、Boston(USA)、2006年6月.

10. Wu Y, Kawate H, Ohnaka K, Nawata H, Takayanagi R：Ligand-Induced Intranuclear Compartmentalization of Androgen Receptor Is Dose Dependent and Coupled to Its Mediated Transactivation. The Endocrine Society's 88th Annual Meeting、Boston(USA)、2006年6月.

11. 河手久弥、大中佳三、高柳涼一、骨粗鬆症 QOL 研究会：閉経後骨粗鬆症の QOL に対するビスフォスフォネート投与の影響. 第16回日本老年医学会九州地方会、福岡、2006年3月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

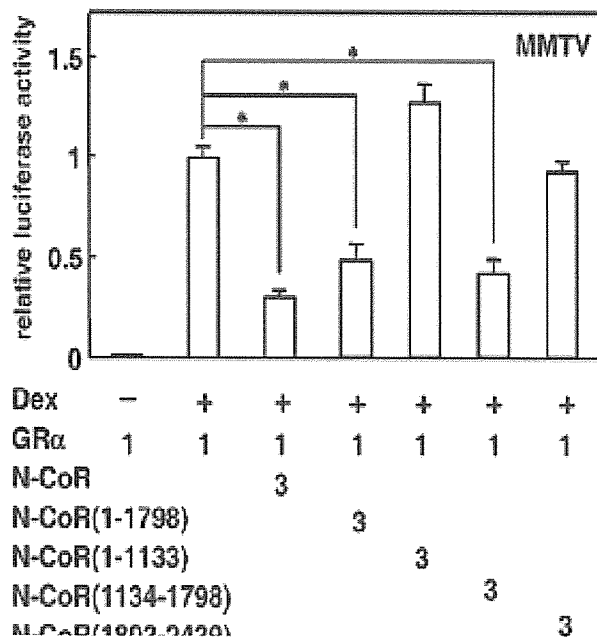
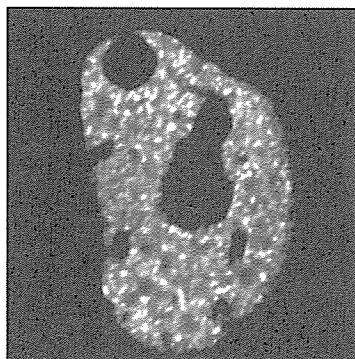
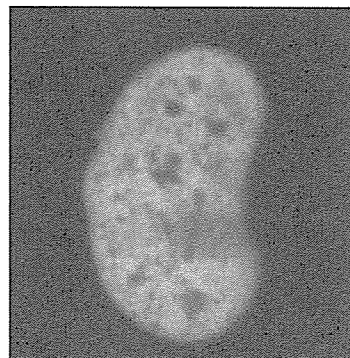


図1 N-CoRおよびその欠失ミュータントによる、GRを介した転写活性化の抑制
N-CoRの中央部分を含むN-CoR(1134-1798)が、全長のN-CoRと同様の転写活性化抑制を示した。



(-)



ActD処理

図2 転写阻害剤によるGRのfoci形成阻害

COS-7細胞でGR-GFPを発現させて、転写阻害剤アクチノマイシンD(ActD)で前処理をしたものとしていないもので、デキサメタゾン処理後のGRのfoci形成を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

グルココルチコイドホルモンによる

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 の調節機構

齋 秀二, 中川 祐一, Jonathan R Seckl*, Karen E Chapman*, 大関 武彦
浜松医科大学小児科, *Endocrinology Unit, Edinburgh University

【研究要旨】

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11HSD1)は、主に肝臓・脂肪・肺組織に存在し、非活性型のグルココルチコイドを活性型に変換することによって、細胞内のグルココルチコイド作用を増強している。近年肥満研究において、この 11HSD1 活性の上昇が肥満およびメタボリックシンドロームの病因として注目されている。今回の検討によって、グルココルチコイドホルモンが、11HSD1 プロモーターに作用し、C/EBP α と協調的に 11HSD1 プロモーター活性を上昇させることが明らかとなった。このことは肥満の発症のメカニズムの解明に寄与する可能性がある。

A. 研究目的

高血圧・糖尿病・肥満を呈するメタボリックシンドロームは、欧米諸国・日本を中心に現在注目されている疾患である。特に肥満は脂肪組織内の特異的なグルココルチコイド過剰状態が、病因のひとつとして考えられており、組織内グルココルチコイド濃度を調節する酵素の 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11HSD1)が、重要な役割を果たしている。一般的に肥満患者の脂肪組織では、11HSD1 の活性が上昇しており、その上昇がグルココルチコイド作用の増強をきたし、結果として肥満を引き起こすと考えられている [1, 2]。したがって 11HSD1 を調節する因子の解明は、肥満治療および肥満のコントロールにおいて非常に重

要な研究課題である。

11HSD1 を調節する因子としては、現在のところ IL-1, TNF α などのサイトカイン、ステロイドホルモン、PPAR α , PPAR γ , LXR α , C/EBP α などが報告されている[3-7]。我々はグルココルチコイドホルモンの 11HSD1 への影響について注目し検討を行った。いままでの報告ではグルココルチコイドホルモンもまた 11HSD1 の活性および mRNA へ影響を与えて、多くは 11HSD1 を上昇させたと報告されているが [8-11], 詳細な分子生物学的な検討は少ない。そこでグルココルチコイド自身がどのように 11HSD1 プロモーターに影響を及ぼすか, 11HSD1 プロモーターを HepG2 細胞にトランスフェクションして検討を行った。

B. 研究方法 (対象)

11HSD1 には2つのプロモーターが存在し、P2 プロモーターは主に肝臓・脂肪・肺組織の転写調節を促進している。今回の検討では、この P2 プロモーター (-1799 to +49 with respect to the transcription start at +1)を用いて、HepG2 細胞 (human hepatoma cell)にトランスフェクションし、グルココルチコイドとしてデキサメサゾン (dex)を 10^{-6} M 投与し、コントロールと比較して検討を行った。HepG2 細胞には、内因性のグルココルチコイドレセプター (GR)が非常に少ないため、外因性の GR を同時にトランスフェクションした。C/EBP α も同時にトランスフェクションし、投与有無について検討を行った。

C. 研究結果

C/EBP α は、11HSD1 プロモーター活性を有意に上昇させた (10.1 fold activation)。C/EBP α は、肝臓・脂肪・肺組織において 11HSD1 の発現に必要な不可欠な因子であり、11HSD1 プロモーター上の結合領域に作用し、11HSD1 プロモーター活性を上昇させる (7)。
グルココルチコイドホルモン (dex) は、C/EBP α をトランスフェクションしない場合は、11HSD1 プロモーターに全く影響を及ぼさないが、C/EBP α をトランスフェクトした状態では、11HSD1 プロモーターを有意に上昇させた (3 fold activation compared to C/EBP α alone) (Fig 1)。
11HSD1 プロモーター上に、グルココルチコイド反応領域 (GRE) が存在すると考え、

11HSD1 プロモーターの5' deletion をつくり、GRE の同定を行った。-1799 (-1799 to +49 with respect to the transcription start at +1) から、-196 領域までは、dex による反応を認めたが、-88 領域までプロモーターを切断していくと、dex による反応は消失した。すなわち 11HSD1 プロモーター上の-196 から-88 までの間に、GRE が存在することが考えられた (Fig 2)。GRE の近傍には、C/EBP プロテイン結合領域が GRE を挟むように存在した。

D. 考察

グルココルチコイドホルモン (dex) は、11HSD1 プロモーター上の反応領域に結合し、プロモーター活性を促進することによって、11HSD1 mRNA および活性を調節する因子であることが明らかになった。このグルココルチコイドホルモンによるレギュレーションは、C/EBP α の存在するときのみ認められ、C/EBP α に依存的であると考えられた。つまりグルココルチコイドホルモンは、C/EBP α と協調的に、11HSD1 プロモーター活性を上昇させることが明らかとなった。

C/EBP α は脂肪分化に重要な因子である。近年の研究では、脂肪組織における C/EBP α の発現量は、肥満では正常に比べて多いと報告されている [12]。今回の検討では、C/EBP α の存在するときのみ、11HSD1 はグルココルチコイドによって上昇した。つまり C/EBP α のより多い脂肪細胞では、グルココルチコイドが 11HSD1 の活性を促進し、C/EBP α の少ない状態では、11HSD1 の発現も少ないと推

測される。このことは、11HSD1の発現の組織特異性、部位特異性の説明のひとつとなると考えられる。

Cushing's 症候群が、中心性肥満を呈することは、よく知られており、グルココルチコイドホルモン過剰状態は、肥満の原因となる。グルココルチコイド過剰状態・11HSD1の上昇・肥満という3つの因子は、非常に密接な関係があると考えられる。今回の結果より、グルココルチコイド過剰状態が、11HSD1の上昇をきたし、結果として肥満・メタボリックシンドロームを引き起こす可能性がある。また肥満患者の脂肪組織では、C/EBP α が非常に多く発現しているため、グルココルチコイドによる感受性が高く、11HSD1が上昇しやすい状態となっている。

今後の課題は、(1)3T3細胞などの脂肪組織で同様のメカニズムが生じているか。

(2)C/EBP α はいかにしてこのレギュレーションに関わっているのか、C/EBP β ・ γ との関係はどのようになっているのかをみることに重要と考えられる。

E. 結論 (文献)

グルココルチコイドホルモンが11HSD1発現を誘導し、上昇した11HSD1によって細胞内グルココルチコイドホルモン作用が増強される。同様のメカニズムが脂肪細胞で生じている可能性があり、肥満の発症機構の解明に寄与するものと考えられた。

References

[1] Seckl JR (2004) *Prog Horm Res* 59: 359-393

[2] Masuzaki H (2003) *J Clin Invest* 112: 83-90.

[3] Low SC (1994) *J Endocrinol* 143:541-548

[4] Hermanowski-Vosatka A (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 279:330-336

[5] Berger J (2001) *J Biol Chem* 276:12629-12635

[6] Stulnig TM (2002) *Diabetes* 51:2426-2433

[7] Williams LJS (2000) *J Biol Chem* 275:30232-30239

[8] Jamieson PM (1995) *Endocrinology* 136:4754-4761

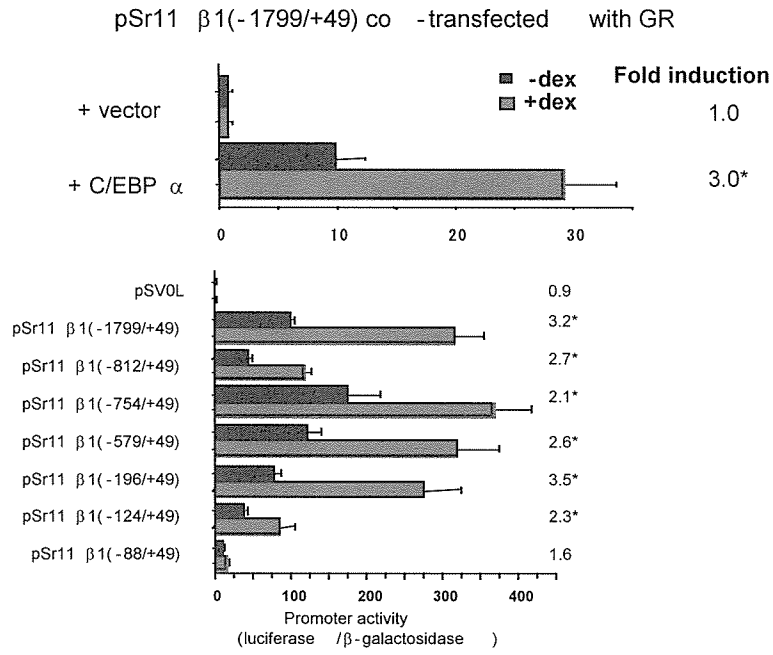
[9] Voice MW (1996) *Biochem J* 317:621-625

[10] Bujalska IJ (1999) *Endocrinology* 140:3188-96

[11] Whorwood CB (2001) *J Clin Endocrinol Metab* 86:2296-2308.

[12] Krempler F (2000) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:443-449

Fig



11βHSD タイプ1・H6PD 遺伝子多型と内臓脂肪蓄積

宗 友厚、山田 亘子、村松 学、諏訪 哲也、武田 純
岐阜大学大学院医学系研究科内分泌代謝病態学分野

【研究要旨】

局所のコルチゾール再活性化機構である 11β 水酸化ステロイド脱水素酵素タイプ1 (*HSD11B1*)・ヘキソース6リン酸脱水素酵素 (*H6PD*) 両遺伝子と内臓脂肪蓄積等との関連を検討。1537例(臍部CT 812例)で、*HSD11B1* intron 3 T/G 多型、intron 4 C/T 多型、*H6PD* Ala212 G/A 多型を TaqMan 法、*H6PD* Arg (R) 453Gln (Q) 多型を直接シーケンスによりタイピングし、疾患・腹部脂肪や脂質代謝について遺伝型-表現型相関の有無を解析。T/G と C/T 間、G/A と R/Q 間に連鎖不平衡。T/G 多型の G アリルは IFG (P=0.015) や高血圧 (P=0.043) で高頻度、R/Q 多型の Q アリルも高血圧で多い傾向。血圧正常者では、T/G 多型の GG 型で内臓脂肪面積 V 及び V/皮下脂肪面積比が低値。HDL コレステロールが T/G 多型の GG 型で高値。コルチゾールの再活性化能が低いと想定されるアリル (G・Q) 保有者は細胞内コルチゾールが相対的に低く、内臓脂肪蓄積が軽度で肝 HDL 産生能も高い、と考えられた。*HSD11B1*・*H6PD* の多型は、内臓脂肪蓄積や HDL・高血圧、などいわゆるメタボリック症候群の判断基準に含まれるリスクファクターに関連することが判明した。

A. 研究目的

11β 水酸化ステロイド脱水素酵素 (11βHSD) は、活性型のグルココルチコイドであるコルチゾールと不活性型のコーチゾンとの間の転換を司る酵素であり、ステロイド骨格の11位にβ方向に付いた水酸基をケト基に変換する dehydrogenase 活性と、逆の reductase 活性、の2つの酵素活性を総称した呼び名である。2種類のアイソザイムが確認され、いずれも小胞体に存在するが、遺伝子の構造、組織分布やトポロジー、生化学的な性質など

がかなり異なり、種類の違う酵素といえる。コルチゾール脱水素(不活化)酵素である 11βHSD タイプ2はミネラルコルチコイドレセプター防御機構として確立されている¹⁾が、インスリン分泌との関連²⁾など古典的標的臓器以外の組織での役割も示唆されている。

一方、11βHSD タイプ1 (*HSD11B1*) は dehydrogenase/reductase 双方向性の酵素とされてきたが、生体内では、補酵素供給系のヘキソース6リン酸脱水素酵素 (*H6PD*) と協調し、主にコーチゾン還

元(再生)酵素として働くことが明らかとなった。肝・内臓脂肪のみならず視床下部・下垂体、肺、血管内皮・平滑筋、性腺や皮膚など、かなり広汎な組織に存在し、グルココルチコイド作用の局所増幅機構として重要な働きを担っている。

11 β HSDタイプ1に関しては、特にモデル動物の解析から興味深い報告が続いている。ノックアウトマウス³⁾は、飢餓時には肝糖新生が障害されること、視床下部・下垂体系のフィードバック異常によると思われる副腎過形成を来すことが示された。更に興味深いことに、ノックアウトマウスの方が加齢による学習や記憶の障害が軽いことが示唆されている。一方、脂肪組織に特異的に過剰発現させると内臓脂肪蓄積⁴⁾を、肝特異的に過剰発現させると脂肪肝・高脂血症・高血圧⁵⁾を来すことが示され、最近はやりのいわゆるメタボリック症候群との関連に注目が集まっている。ヒトでは、*HSD11B1*と*H6PD*が共に障害されると、多毛症、痤瘡、稀発月経、不妊などのアンドロジェン過剰徴候を呈するコーチゾン還元酵素欠損症を来す⁶⁾と考えられており、コルチゾールの血中レベルは正常ではあるが細胞内レベルが低下するため、本邦で云う所の副腎性器症候群を引き起こすことになる、と理解できよう。

以上の点を踏まえ、今回の研究では、*HSD11B1*・*H6PD*両遺伝子について比較的頻度の高い多型を検索し、遺伝型と表現型(高血圧や糖尿病といった病態、および血中脂質レベルや内臓肥満の程度といった量的データ)との関連を検討した。

B. 研究方法

1. 対象

岐阜大学医学部附属病院第3内科および関連病院に受診し、インフォームドコンセントを得た計1537例(男/女1200/337例)を対象とした。内訳は、血圧に関して正常血圧1003例・高血圧

(140/90mmHg以上または降圧剤内服中)526例、血糖に関して正常者(ND)870例・空腹時高血糖(IFG)57例・境界型(IGT)205例・2型糖尿病377例。

2. *HSD11B1*・*H6PD*両遺伝子の多型検索

*HSD11B1*については既報⁷⁾のプライマーに加え、上流域に5'-ATC CTT ATT TTC TAG CAT CGT A-3'(s, nt -2011~ -1990) & 5'-GCC AAA TCT CAC TCT CAG TCC-3'(as, nt -477~ -458)、約2.5kbに及ぶintron4領域についてはSNPデータベースも考慮した上で、5'-GAA GCA TTG TTG TCG TCT CC-3'(s, nt 488~ 507; coding within exon 4) & 5'-TAG AAA GTT ACA TTC GTC AAA-3'(as, nt +1587~ +1607 of 5'-intron 4)、5'-ATT GAT TTC AGA CTT CTT GAC T-3'(s, nt -11284~ -11263 of 3'-intron 4) & 5'-GAG GCC TAC ATG CTT TCG TTC-3'(as, nt -9504~ -9484 of 3'-intron 4)、5'-CAA GAG TGG CAC CCG AAA GA-3'(s, nt -1620~ -1601 of 3'-intron 4) & 5'-ACC TAA TGT AAG TGA CGA GTT-3'(as, nt +122~ +142 of 5'-intron 5)、の各プライマーを設定した。

*H6PD*については、exon 2を含む領域; 5'-GCC TTT GCC GCT TTC CTA TG-3'(s, nt -300~ -281) & 5'-GGC TTT GTT GCT GGG GTC TAC-3'(as, nt +49~ +69 of

5' -intron 2)、exon 3 をカバーする領域; 5' -ACT GCT CAG AGG GCA TCT T-3' (s, nt -125 ~ -107 of 3' -intron 2) & 5' -CCT ACT TCT CTG GAC CAT ACG-3' (as, nt +202 ~ +222 of 5' -intron 3)、exon 4 領域; 5' -TCT GTA GAG GCT CAC GGA TTT-3' (s, nt -249 ~ -229 of 3' -intron 3) & 5' -TCC ACC CAA GGG CGT CTG C-3' (as, nt +62 ~ +80 of 3' -intron 4)、exon 5 領域; 5' -TGT GGG GCG TCC TTT AGA GTC-3' (s, nt -319 ~ -299 of 3' -intron 4) & 5' -CCG AGA AGG GAG GGA AGA CAC-3' (as, nt +49 ~ +69 from stop in 3' -UTR)、を設定した。

まず 16~24 例の genomic DNA と各々のプライマーを用いて、PCR ダイレクトシーケンス法により多型の有無をチェックした。以上のスクリーニングにより *HSD11B1* について、3' -intron 3 -39bp に T/G 多型 (t83597g; 40bp 上流の 83557 に a 一塩基挿入と完全に連鎖)、5' -intron 4 +915bp に G/T 多型、3' -intron 4 -9917bp に T/G 多型、3' -intron 4 -9557bp に C/T 多型 (これら 3 種も完全連鎖)、を確認した。*H6PD* については、exon 3 内の Ala212 (-3rd) 部に G/A 多型、Ala247 (-3rd) 部に T/C 多型、5' -intron 3 +88bp に T/A 多型 (これら 3 種は完全連鎖) を、exon 4 内の Tyr257 (-3rd) 部に C/T 多型、3' -intron 4 -113bp に G/C 多型、3' -intron 4 -99bp に 8bp 挿入多型、exon 5 内に Arg (R) 453Gln (Q) 多型、を検出した。

3. タイピングと臨床データ・腹部内臓脂肪との関連解析

以上の結果に基づき、*HSD11B1* intron 3 T/G 多型、intron 4 C/T 多型、*H6PD* Ala212 G/A 多型を TaqMan 法、*H6PDR* 453Q 多型は TaqMan 法では良好な分離を得られなかったため直接シーケンス法によりタイピングし、疾患・血中脂質レベル、さらに一部の症例 (812 例) で臍部 CT により測定した内臓および皮下脂肪面積 (V 及び S) との関連を検討した。連鎖不平衡の解析には Haploview を用い、遺伝型間の臨床データ解析は、GLM プロシジャ (SAS) を用い性・年齢・BMI を補正後、検討した。なお本研究に含まれる遺伝子解析に関しては既に、「生活習慣病と副腎皮質ステロイド関連遺伝子多型との関連」(平成 14 年 11 月)として岐阜大学医学部の倫理審査委員会の承認済みである。

C. 研究結果

図 1 に示す如く、今回検討した多型間に連鎖不平衡を認めた。

1. 疾患との関連

HSD11B1 T/G 多型の G アリル頻度は高血圧群で高く、*H6PDR* 453Q 多型の Q アリル頻度も高い傾向にあった。糖代謝に関しては、*HSD11B1* T/G 多型の G アリル頻度は IFG で高かった。(表 1)

2. 臨床データとの関連

内臓脂肪については、*HSD11B1* T/G 多型の GG 型で TT 型より V 及び V/S 比が低かった (図 2)。また、*HSD11B1* T/G 多型の GG 型、及び *H6PDR* 453Q 多型の RQ 型・QQ 型で、HDL コレステロールが高値であった (図 3)。

D. 考察

HSD11B1 T/G 多型の G アリルはミニジーンを用いた *in vivo* の検討で 11 β HSD タイプ 1 発現が少なく、*H6PDR453Q* 多型の Q アリルでは *H6PD* 活性が 50%以下になることが示されている⁶⁾。すなわちコーチゾンからコルチゾールへの reductase 活性が低いと想定される G アリルや Q アリル保有者では細胞内（正確には小胞体内）活性型グルココルチコイドが相対的に低いいため、内臓脂肪蓄積が軽く肝での HDL 産生能が高いと考えられ、今回の結果に合致する。

高血圧と *HSD11B1* T/G 多型の G アリルとの関連は、一見、逆方向に思われるが、コーチゾン還元酵素欠損症 (ACRD) の病態⁶⁾や *H6PDR453Q* 多型の Q アリルと多嚢胞性卵巣症候群との関連⁸⁾などを考慮すると、グルココルチコイドフィードバック亢進の関与が示唆される。ACRD の病因やメタボリックシンドロームとの関連についても不明な点が多い⁹⁾が、定量的な内臓脂肪測定についての検討は未だ行われていない。

いずれにせよ、グルココルチコイド作用の緻密な調節は、生命維持に欠かせないのみならず、糖尿病・高血圧・高脂血症・肥満などの生活習慣病の素因と発症にかなり関わるものと予想される。今回はレセプター前レベルの調節機構であるが、合成や作用に関わる *CYP11B1*・*CYP17*・*NR3C1* についても検討を進める予定である。すなわち、「コルチゾール合成代謝の、どのステップに機能に影響するバリエーションがあり、どの疾患あるいはリスクファクターに影響するのか?」、を明らかにして行く必要があると考えて

いる。

E. 結論

HSD11B1・*H6PD* 多型は、内臓脂肪蓄積や HDL コレステロール値など、いわゆるメタボリックシンドロームの判断基準に含まれる複数のリスクファクターと関連する。

F. 謝辞

臨床データ収集に力を注いだ故高見理恵子先生に追悼の意を表するとともに、安田圭吾前教授、森田浩之総合内科助教授、武田則之（村上記念病院）、高見和久（木沢病院）、林 慎・山北宜由（松波総合病院）の諸先生方に深謝いたします。

[参考文献]

1. White PC, Mune T, Agarwal AK. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocr Rev.* 18: 135-156, 1997.
2. 安田圭吾、宗 友厚、諏訪哲也、他. 11 β HSD タイプ 2 遺伝子の CA リピート多型と電解質・糖代謝との関連 副腎ホルモン産生異常に関する研究班 平成 14 年度研究報告書 44-52, 2003.
3. Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, et al: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14924-14929, 1997.
4. Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H,

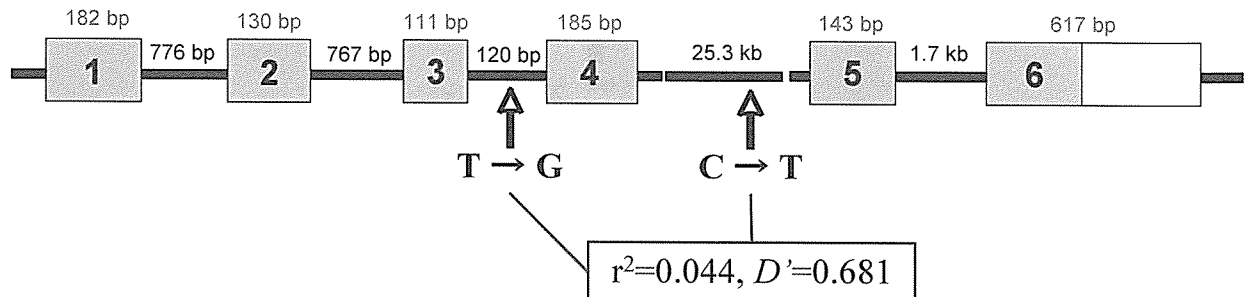
- et al. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294: 2166-2170, 2001.
5. Paterson JM, Morton NM, Fievet C, et al. Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7088-7093, 2004.
 6. Draper N, Walker EA, Bujalska IJ, et al. Mutations in the genes encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency. *Nat Genet.* 34: 434-439, 2003.
 7. Nikkila H, Tannin GM, New MI, et al. Defects in the HSD11 gene encoding 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase are not found in patients with apparent mineralocorticoid excess or 11-oxoreductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 77: 687-691, 1993.
 8. San Millan JL, Botella-Carretero JJ, Alvarez-Blasco F, et al. A study of the hexose-6-phosphate dehydrogenase gene R453Q and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene 83557insA polymorphisms in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 90: 4157-4162, 2005.
 9. White PC, Rogoff D, McMillan DR, Lavery GG. Hexose 6-phosphate dehydrogenase (H6PD) and corticosteroid metabolism. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Jan 19; Epub ahead of print.
- F. 研究発表**
1. 論文発表
 - 1) Morita H, Isomura Y, Mune T, et al. Plasma cortisol and cortisone concentrations in normal subjects and patients with adrenocortical disorders. *Metabolism* 53(1): 89-94, 2004.
 - 2) Isomura Y, Mune T, Morita H, et al. Physiologic roles of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in kidney. *Metabolism* 55(10): 1352-1357, 2006.
 - 3) 宗 友厚、佐久間博也、塩谷真由美、佐々木昭彦、諏訪哲也、武田 純：11 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素タイプ1欠損症 臨床分子内分泌学 2 日本臨床 63 Suppl 3: 296-301, 2005.
 - 4) 宗 友厚、諏訪哲也：遺伝性血圧異常症の分子内分泌学 医学のあゆみ 213(5): 423-427, 2005.
 - 5) 佐久間博也、廣田卓男、村松 学、宗 友厚：内分泌性高血圧症 診断と治療の進歩 Apparent Mineralocorticoid Excess 症候群 日本内科学会雑誌 95(4): 662-667, 2006.
 - 6) 宗 友厚：11 β -HSD2 欠損症 (AME 症候群) 内分泌症候群 (I) 第2版 日本臨床 64 Suppl 1: 651-654, 2006.

7) 宗 友厚、山田亘子、廣田卓男、村
松 学、諏訪哲也：ミネラルコルチ
コイドの分子遺伝学 内分泌・糖尿
病科 23(6)：643-647, 2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

図 1. *HSD11B1*、*H6PD*、両遺伝子の common SNPs と連鎖不平衡の程度

Type 1 11β-hydroxysteroid dehydrogenase gene (*HSD11B1*) 1q32-q41



Hexose-6-phosphate dehydrogenase gene (*H6PD*) 1p36

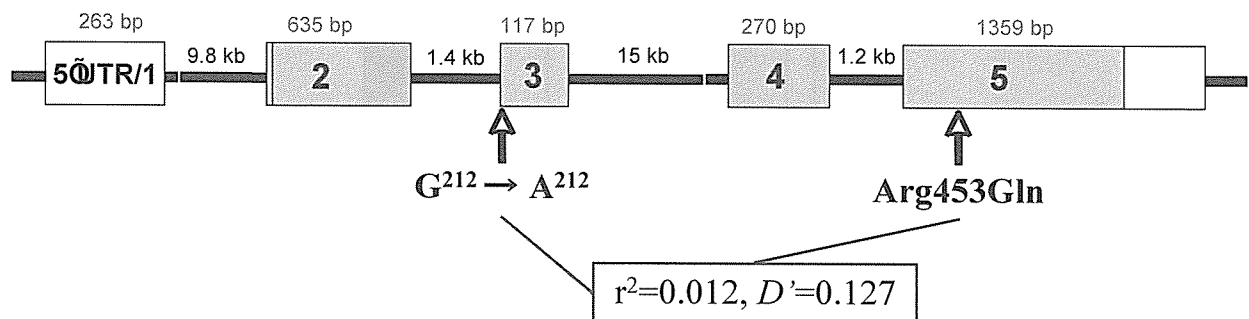


表 1. *HSD11B1* intron 3 T/G 多型、*H6PD* R453Q 多型の genotype およびマイナーアレル頻度と、高血圧、耐糖能異常、との関連

<i>HSD11B1</i>	intron 3 T to G			minor allele freq.	P value	<i>H6PD</i>	R453Q			minor allele	P value
	TT	TG	GG				RR	RQ	QQ		
NT	738	244	21	0.143	0.043	NT	299	512	180	0.440	0.057
HT	364	145	17	0.170		HT	139	270	114	0.476	
	TT	TG	GG	minor allele freq.	P value vs. ND		RR	RQ	QQ	minor allele	P value vs. ND
ND	624	227	19	0.152		ND	248	448	165	0.452	
IFG	36	21	4	0.238	0.012	IFG	19	31	11	0.434	0.709
IGT	150	52	3	0.141	0.581	IGT	62	109	32	0.426	0.349
DM2	279	87	11	0.145	0.619	DM2	103	188	81	0.470	0.394

図2. *HSD11B1* intron 3 T/G、*H6PD* R453Q、各遺伝型における内臓・皮下脂肪面積(V・S)およびその比 (白はメジャー・黒はマイナーアリのホモ接合、灰色はヘテロ接合を示す)

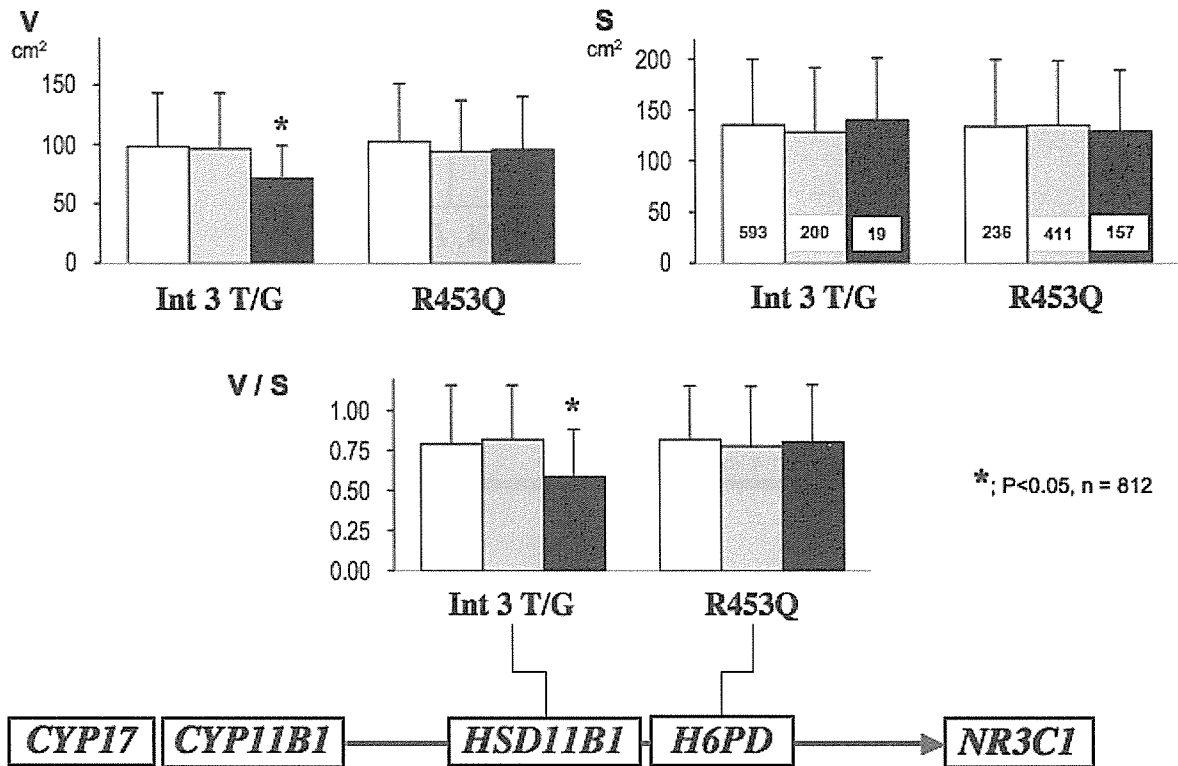
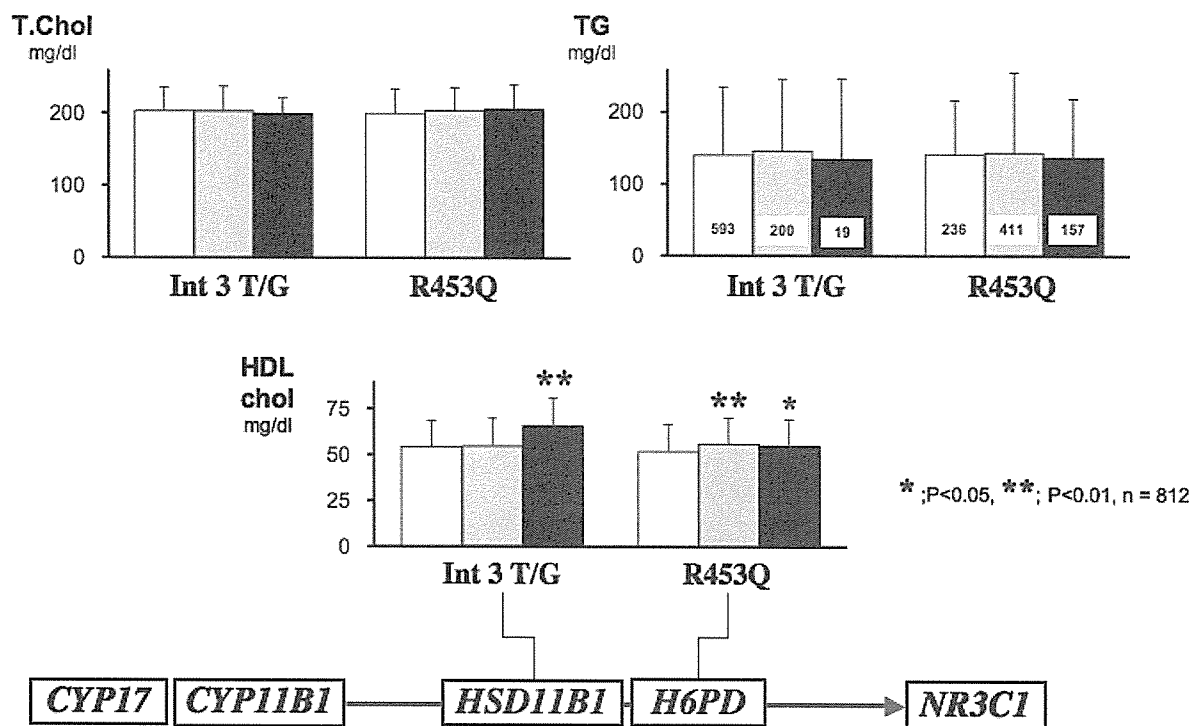


図 3. *HSD11B1* intron 3 T/G、*H6PD* R453Q、各遺伝型における血中脂質レベル



V. 平成 18 年度研究報告会
(平成 18 年 12 月 15 日：東京)
プログラム