

中 DHEA-S、尿中 17-OHCS および尿中 17-KS)、画像的特徴を含めて、総合的に判断しなければならないと考えられた。諸外国での副腎偶発腫における副腎癌の頻度の比較では、報告による対象症例数に差があり、その点を考慮しなければならないが、人種差の存在は現在のところ否定的と思われる。

## E. 結論

これまでの副腎偶発腫の5年間の継続調査を元に副腎癌の解析を行った。副腎癌の鑑別には、腫瘍径とともに、従来から有用とされてきたマーカー（血中 DHEA-S、尿中 17-OHCS および尿中 17-KS）、画像的特徴を含めて、総合的に判断しなければならないと考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 上芝 元：副腎疾患. 診断と治療 95(2) : 287-292, 2007
- 2) Tsuboi K, Ueshiba H, Shimojo M, Ishikawa M, Yamamoto N, Nagasawa K, Yuasa R, Yoshino G : The relation of initial methimazole dose to the incidence of methimazole-induced agranulocytosis in patients with Graves' disease. *Endocrine J* 54(1):39-43, 2007
- 3) Yamada Y, Sekihara H, Omura M, Yanase T, Takayanagi R, Mune T, Yasuda K, Ishizuka T, Ueshiba H, Miyachi Y, Iwasaki T, Nakajima A, Nawata H : Changes in serum sex

hormone profiles after short-term low-dose administration of dehydroepiandrosterone(DHEA) to young and elderly persons. *Endocrine J* 54(1):153-162, 2007

4) 上芝 元：副腎インシデンタローマの疫学と自然史. *内分泌外科* 24(1) : 3-6, 2007

5) 上芝 元：副腎偶発腫瘍. *総合臨床* 56(Supplement 4月) : 1624-1628, 2007

6) 上芝 元、芳野 原：アンジオテンシンII受容体拮抗薬ロサルタンのインスリン抵抗性改善作用. *Therapeutic Research* 28(6) : 1169-1174, 2007

7) 上芝 元：インスリン抵抗性と DHEA.

*Modern Physician* 27(8) : 1141-1144, 2007

8) 上芝 元 (分担)：疫学・頻度. 原発性アルドステロン症診療マニュアル (成瀬光栄、平田結喜緒 編集) p.29-31, 診断と治療社, 東京, 2007

### 2. 学会発表

1) ○Hiroi N, Ichijo T, Yoshiwara A, Sue M, Ueshiba H, Higa M, Tsuboi K, Yoshino G : Frequency of adrenal tumor in Japanese type 2 diabetic patients. 89th Annual Meeting of The Endocrine Society, Toronto, 2007, 6

2) ○Ichijo T, Ueshiba H, Hiroi N, Yoshino G : Analysis of the 50 cases of adrenal carcinoma from the adrenal incidentaloma survey in Japan. 89th Annual Meeting of The Endocrine

Society, Toronto, 2007, 6

3) ○Ueshiba H, Ueshiba Hideko, Yoshino G : Serum androsterone levels in normal children. XI International Congress of Auxology, Tokyo, 2007, 9

4) ○Ueshiba H, Yoshino G : Free testosterone level is associated with insulin resistance in Japanese men with metabolic syndrome. The second Japan-ASEAN Men's Health & Aging Conference, Kaga, 2007, 11

5) ○上芝 元、芳野 原 : アンジオテンシン変換酵素阻害薬イミダプリルのインスリン抵抗性改善作用及び副腎アンドロゲン増加作用. 第 12 回アンジオテンシンカンファレンス、東京、2007, 2

6) ○近藤泰之、廣井直樹、土田恭代、一城貴政、上芝 元、芳野 原 : ステロイド補充療法により歩行可能となった原発性副腎不全の 1 例. 第 7 回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会、東京、2007, 2

7) ○一城貴政、葛西 梢、東條 靖、久保木幸司、上芝 元、廣井直樹、芳野原 : 潜在性クッシング症候群を伴った原発性アルドステロン症の 1 例. 第 17 回臨床内分泌代謝 Update、東京、2007, 3

8) ○上芝 元、芳野 原 : オルメサルタン、アゼルニジピン併用療法におけるインスリン抵抗性改善作用について. 第 104 回日本内科学会、大阪、2007, 4

9) ○上芝 元、中野三郎、芳野 原 : インスリン抵抗性とフリー・テストステロンの関連について. 第 50 回日本糖尿病学会、仙台、2007, 5

10) ○上芝 元、中野三郎、渡邊奈津

子、長澤 薫、一城貴政、土田恭代、石川真由美、廣井直樹、坪井久美子、芳野 原 : メタボリックシンドロームにおけるフリーテストステロンとインスリン抵抗性の関連について. 第 80 回日本内分泌学会学術総会、東京、2007, 6

11) ○一城貴政、上芝 元、廣井直樹、芳野 原 : 副腎癌 50 例の解析. 一副腎偶発腫全国疫学調査より— 第 80 回日本内分泌学会学術総会、東京、2007, 6

12) ○廣井直樹、一城貴政、須江麻里子、吉原 彩、上芝 元、比嘉真理子、坪井久美子、芳野 原 : 2 型糖尿病における副腎腫瘍の合併頻度について. 第 80 回日本内分泌学会学術総会、東京、2007, 6

13) ○上芝 元、中野三郎、芳野 原 : メタボリックシンドローム男性における遊離テストステロンとインスリン抵抗性について. 第 7 回日本抗加齢医学会、京都、2007, 7

14) ○上芝 元、中野三郎、芳野 原 : 肥満高血圧症におけるインスリン抵抗性及び血中ステロイドホルモンに対するバルサルタンの効果. 第 28 回日本肥満学会、東京、2007, 10

15) ○安田睦子、薬師寺史厚、下条正子、長澤 薫、上芝 元 : 無月経、頭痛を主訴に来院した  $17\alpha$  水酸化酵素欠損症を疑われた社会的な女性. 第 15 回日本ステロイドホルモン学会、仙台、2007, 11

## G. 知的財産の出願・登録状況

### 1. 特許許諾

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他 特になし

図1 発見時腫瘍径の分布

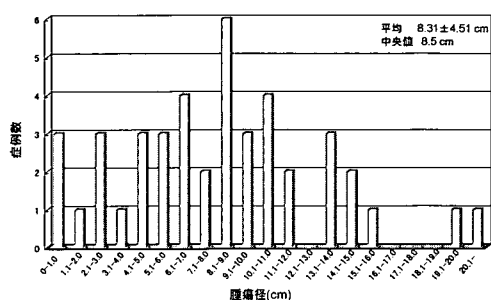


図2 年齢分布

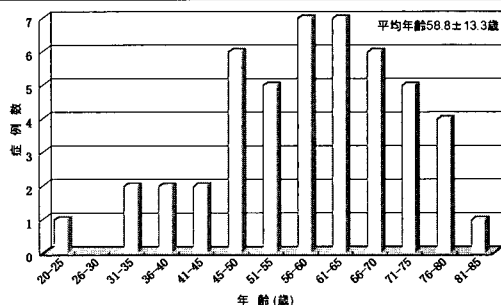


図3 血中DHEA-Sの分布

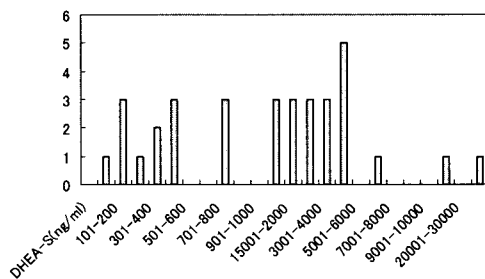


表1 諸外国での副腎偶発腫における副腎癌

報告者 (年)	国	対象症例数	副腎癌の頻度	文献
Herrera MF (1991)	USA	342	1%	Surgery 110: 1014-1021, 1991
Benesik Z (1996)	Hungary	63	1.6%	J Intern Med 237: 686-689, 1996
Seppl T (1996)	Germany	85	2%	Dtsch Med Wochenschr 121: 502-507, 1996
Bartolmis EA (1997)	Greece	86	3%	Am Surg 63: 356-360, 1997
Kasperlik-Zeluska AA (1997)	Poland	208	9%	Clin Endocrinol 46: 29-37, 1997
Xiao X (1998)	China	78	12%	Br J Urol 82: 199-205, 1998
Tutuncu NB (1999)	Turkey	33	6%	J Surg Oncol 70: 247-250, 1999
Mantero F (2000)	Italy	1004	6%	JCEM 85: 637-644, 2000
Leton JP (2000)	France	88	2%	Eur J Endocrinol 143: 111-117, 2000
Blow B (2002)	Sweden	318	12%	J Intern Med 252: 239-246, 2002

## 21-水酸化酵素欠損症の出生前診断、治療についての

### アンケート調査

田島敏広

北海道大学大学院医学研究科小児科

大関武彦

浜松医科大学小児科

藤枝憲二、向井徳男

旭川医科大学小児科

#### A. 研究目的

先天性副腎皮質過形成症のなかでも21-水酸化酵素欠損症(21-OHD)はその発症頻度は約15000に1人と極めて頻度の高い遺伝病である。女兒においては副腎性アンドロゲンの過剰による外性器の男性化、内性器の男性化は重大な合併症で外科的矯正が必要である。したがって患児や家族にとって大きな肉体的、精神的負担となっている。特にその外科的矯正手術は難しい場合があり、必ずしも美的、機能的にも満足すべき結果とならない場合がある。外性器の男性化抑制を目的とした21-OHDの出生前治療は、欧米諸国において数多く実施されてきている。

しかしいまだ世界中においてコンセンサスの得られた治療法ではない。

また本症において重症例、コントロール不良例では男性・女性とも不妊との関連が報告されている。

そこで本邦での出生前診断・治療の現

状を把握すること、日本での本疾患の妊孕性などについてアンケート調査を行った。

#### B. 研究方法

アンケートの送付先は内科、外科、産婦人科、泌尿器科標榜施設を対象に10,217施設にアンケート用紙を郵送、検討した。その結果二次調査回答数は89施設0.9%であった。また本疾患の主なフォロー主治医は小児科医であることから日本小児内分泌学会員1,090名に同様なアンケートを郵送し、201名、18.4%の回答を得た。

#### C. 研究成果

出生前診断(絨毛、羊水細胞による遺伝子検査、ホルモン検査)は6施設6症例のみで行われていた。そのうち自施設で行われたものは3施設であった。3例は他施設に絨毛採取、羊水の採取や遺伝

子診断を依頼していた。性別診断は3例で絨毛による SRY 遺伝子の同定、他の1例は羊水細胞培養による染色体検査であった。絨毛細胞による 21-OHD の遺伝子診断は3例で行われていた。これらによって診断できなかった症例はなく、出生前診断と出生後診断は一致していた。他の1例は妊娠判明時点で、デキサメサゾンが投与され、性別診断はおこなわれていなかったが詳細は不明であった。

出生前診断に基づく治療について、分娩まで治療された症例は罹患女兒1例であった。出生前診断後に治療中断された症例は4例であり、内訳は男児と判明したため治療中止、流産が1例であった。出生前治療を受けた本疾患罹女兒の外性器は同胞例に比べ、Prader 分類 II 度以下であり、効果があったと考えられる。

治療児への副作用は少なく、奇形や周産期異常の合併症は認められなかった。

母体の副作用としては体重増加、胃部不快感、頭痛、満月様顔貌など報告されたが、副作用のため中止にいたった例はなかった。

今後家族の希望、同意があれば、出生前診断・治療を行いたいとするのは約60%である。しかし施設の多くは、絨毛採取、遺伝子診断、性別診断を行うのが難しいのが実情であった。実際自施設で可能としている8施設にいても絨毛・羊水細胞の採取可能3施設、他院絨毛・羊水細胞産科に依頼4施設、21-OHD の遺伝子診断可能施設4施設、倫理委員会認可4施設であり、自施設ですべて可能であったのは3施設のみであった。

本疾患の長期のフォローにおいて、欧

米においては古典型の本症において成人女性での結婚率の低下、妊孕性の低下が報告されている。今回20歳以上の患者における結婚、妊娠についても同様にアンケート調査を行った。

20歳以上の古典型女性107人、非古典型19名において結婚女性は10名(7.8%)であり、一般同年齢女性と比較してその割合は低いものではなかった。このうち8名が妊娠・分娩の経験があった。また古典型女性患者において8名が不妊外来への通院歴あるいは通院中であった。

#### D. 考察

2002年のアンケート調査に比較し、本疾患に対する出生前診断における遺伝子診断可能施設が減少していた。アンケート調査ではいくつかの特定施設で一貫した絨毛や羊水細胞からの21-OHDの遺伝子診断、性別判定、ホルモン測定を行うべきとの意見が多かった。今後しかるべく施設の整備、ネットワーク化を考える必要がある。しかし倫理的に同意できない、出生前治療をうけて児の長期予後が不明な時点で、この出生前診断・治療を行うべきではないとする意見も認められた。今後のコンセンサス作りが大切である。

結婚、妊娠について患者数は少ないが、成人女性の古典型において一部はやはり、卵巣機能に何らかの障害を有する可能性が示唆された。

#### E. 結論

21-OHDにおける出生前治療、診断については今後絨毛、羊水細胞による診断可

能な施設が十分ではないことが判明した。  
今後この診断・治療を行うため各診療科

との連携し対応できるシステムの構築し  
なければならない。

## (2) 副腎の再生に関する研究

# SF-1/Ad4BP はヒト骨髄由来間葉系幹細胞を

## ステロイド産生細胞へ分化誘導する

柳瀬 敏彦、田中智子、権藤重喜、岡部泰二郎、高柳涼一

九州大学大学院医学研究院

### 【研究要旨】

SF-1/Ad4BP はステロイド合成及び副腎・性腺分化に必須の核内受容体である。我々は、SF-1/Ad4BP の強制発現により、マウス初代培養骨髄由来間葉系幹細胞 (BMC) が ACTH 依存性に各種ステロイドを産生する細胞に形質転換されることを既に報告した。そこで今回、ヒト BMC のステロイド産生能を検証し、そのプロフィールをマウス BMC のそれと比較検討した。ヒト BMC はマウス BMC 同様、ステロイド産生細胞へ形質転換されたが、マウス BMC と異なり、ACTH 受容体及び LH 受容体の劇的な誘導を認め、ACTH, LH に対しても良好な反応性とステロイド産生性を示した。また、幾つかの性分化関連因子を同様にヒト BMC へ遺伝子導入したが、SF-1/Ad4BP のみがステロイド産生細胞への転換能を示し、SF-1 がこの機能において真にマスターレギュレーターであることが確認された。

### A. 研究目的

私達はこれまでの研究で SF-1/Ad4BP がマウス骨髄由来間葉系幹細胞をステロイド産生細胞へ分化誘導することを明らかにした 1)。ステロイドホルモン欠損症患者への自己細胞移植療法の臨床応用を考慮した場合、ヒト骨髄由来細胞 (BMCs) への SF-1/Ad4BP の効果を調べることは非常に重要である。よって私達はこれまで確立した方法をヒト BMCs に応用し、そのステロイドプロフィールをマウスと比較した。さら

に、副腎や性腺の分化に関与することが知られる既知の因子 WT1、DAX1、PBX1、CITED2、WNT4 をヒト BMCs へ遺伝子導入した場合、ステロイド産生細胞へ分化誘導できるかどうかについて検討した。

### B. 研究方法

1. アデノウイルスおよびレンチウイルスベクターの構築

ウシ SF-1 cDNA または LacZ cDNA 搭載ヒト 5 型アデノウイルス由来組換えアデノウイルスベクター



(Adx-bSF-1 または Adx-LacZ) は Adenovirus Expression Vector kit にて作製した。ヒト SF-1/Ad4BP、WT1、DAX-1、PBX-1、CITED2 および WNT4 cDNA は、RT-PCR 法にて発現組織の total RNA よりクローニングし、レンチウイルスベクタープラスミド (CS-CDF-CG-PRE, 理研バイオソースセンターより供与) へ挿入した。組換えレンチウイルスの調整はプロトコルに従った。

## 2. ヒト間葉系 BMCs の培養とウイルス感染

ヒト骨髄単核球を Lonza 社より購入し、非造血幹細胞培地中にて培養後、接着細胞のみを実験に用いた。ヒト BMCs (104 cells/well) を 24-well コラーゲン type I プレートにて培養し、Adx-bSF-1 または Adx-LacZ を 37°C、1 時間感染後、PBS にて洗浄し培養した。また、ヒト BMCs (104 cells/well) を 24-well プレートにて培養し、レンチウイルスベクターを含む培地中にて 37°C、over night 培養し、PBS にて洗浄後、培養し実験に用いた。

## 3. ステロイドホルモン測定およびリアルタイム PCR

培養上清中のプロゲステロン (P4)、コルチコステロン (B)、コルチゾール (F)、アルドステロン、デヒドロエピアンドロステロン (DHEA)、テストステロン (T) およびエストラジオール (E2) 濃度は EIA キットにて定量した。ACTH 受容体、LH 受容体およびステロイド合成酵

素の mRNA 発現レベルの定量的解析はリアルタイム PCR 法にて行った。各発現量は  $\beta$ -actin との比で示した。

## 4. 免疫蛍光細胞染色

ACTH 受容体、LH-R 受容体および Ad4BP に対する抗体、Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG、Alexa Fluor 594 rabbit anti-goat IgG を用いて免疫蛍光染色を行った。

(倫理面への配慮)

本実験では、試薬メーカーより購入したヒト骨髄由来単核球を用いた。また、遺伝子組換え実験および感染実験は九州大学の実験承認可に行った。全て in vitro 研究であり、倫理的問題はない。

## C. 研究成果と考察

### 1. SF-1/Ad4BP によるステロイド産生細胞への分化誘導

Adx-SF-1 または Adx-LacZ 感染ヒト BMCs の培養上清中 (7-11 日目) のステロイドホルモン濃度を定量した結果、Adx-bSF-1 感染細胞において P4、B、F、アルドステロン、DHEA、T、E2 濃度が増加したが、Adx-LacZ 感染細胞ではステロイド濃度は変化しなかった。(Fig. 1A)。よって SF-1/Ad4BP によりヒト BMCs は様々なステロイド産生性を示す細胞へと分化した。ヒト BMCs はマウス細胞と同様にコルチゾールと性ホルモンの両方を産生し、副腎・性腺混合型のステロイド産生性

を示した。この結果は、共通の前駆細胞が多く、転写因子の制御を受けて二つの性質の異なる細胞、副腎前駆細胞と性腺前駆細胞へと分化し、それぞれがさらに副腎皮質細胞、精巣または卵巣へと分化するという概念に一致している。

次に、mRNA レベルをリアルタイム PCR 法にて解析した結果、P450<sub>sc</sub>c、3 $\beta$ -HSD、P450<sub>c21</sub>、P450<sub>c11</sub>、P450<sub>c17</sub>、17 $\beta$  HSD type3、P450<sub>arom</sub> の mRNA の発現量は Adx-bSF-1 の MOI 依存的に増加したが、Adx-LacZ 感染細胞ではこのような現象は認めなかった (Fig. 1B)。P450<sub>c21</sub> の発現誘導はヒトでは明瞭であったがマウスでは検出されなかった (1)。Adx-bSF-1 感染ヒト BMCs はアルドステロン産生性を示したが、P450<sub>aldo</sub> の発現はリアルタイム PCR 法では検出されなかった。従ってヒト BMCs のアルドステロン産生については完全に結論づけることはできない。この点については、PCR の条件の最適化を含めて検討が必要である。

## 2. ACTH 受容体と LH 受容体の発現誘導および ACTH、LH 応答性

リアルタイム PCR および免疫蛍光細胞染色の結果、ヒト BMCs において SF-1/Ad4BP によって ACTH 受容体および LH 受容体の発現が誘導された (Fig. 2A および 2B)。次に Adx-bSF-1 感染ヒト BMCs を 2.4  $\mu$ M ACTH または 10 mU/ml hCG にて刺激し、培養上清中のステロイドを定量した。コルチゾール分泌は 2.4  $\mu$ M

ACTH および 10 mU/ml hCG によって増加した (Fig. 2C)。同様にテストステロン産生も hCG および ACTH 応答して増加した (Fig. 2C)。これらの結果よりステロイド産生細胞へ形質転換したヒト BMCs は ACTH および LH 反応性を持つことが示唆された。SF-1/Ad4BP による ACTH 受容体および LH 受容体の発現誘導がみられる点でヒトとマウス細胞とは大きく異なる。マウス BMCs は本来副腎型 ACTH 受容体よりも脂肪組織型 ACTH 受容体を優位に発現しており、脂肪組織タイプの ACTH 受容体のプロモーター領域には SF-1/Ad4BP 結合部位が存在しないため、SF-1/Ad4BP の導入自体はマウスの BMCs において ACTH 受容体の発現を誘導しないのではないかと考えられる (1)。一方、ヒト ACTH 受容体は遺伝子構造上、副腎型以外のアイソフォームは無いようであり、SF-1/Ad4BP 結合部位を持つ副腎型 ACTH 受容体のみをつくる。同様に LH 受容体はヒト BMCs において明瞭に誘導されるが、マウスにおいては誘導されない。ヒト LH 受容体プロモーター領域には SF-1/Ad4BP が結合する可能性のある配列が存在するが、結合は証明されていない。SF-1/Ad4BP が誘導する因子の中に LH 受容体の発現を促進する因子があるのかもしれない。いずれにせよヒト BMCs において ACTH 受容体と LH 受容体が誘導され ACTH または LH 応答性を示すという発見は、私達

が将来的にステロイド不全症に対する自己 BMC 移植療法への臨床応用を考慮した場合、生理的に重要である。

### 3. 副腎・性腺分化因子の単独導入の影響

最後に、私達はヒト疾患や遺伝子欠失マウスの表現形の解析から副腎または性腺の分化に関与する因子として知られているいくつかの因子について検討した。SF-1/Ad4BP をポジティブコントロール、GFP をネガティブコントロールとして WT1、DAX1、PBX1、CITED2 および WNT4 について検討した。WT1 はエクソン 5 の 17 アミノ酸配列の有無とエクソン 9 中の 3 アミノ酸配列 Lys-Thr-Ser (KTS) の有無による 4 種類のアイズフォーム -/-、+/-、-/+、+/+ について検討した。この実験では、ウイルスの作製がより簡便であるレンチウイルスベクターを用いた。感染細胞の培養上清中 (11-14 日目) のコルチゾールおよびテストステロンを測定し、P450<sub>scc</sub> の発現レベルをリアルタイム PCR 法にて解析した結果、SF-1/Ad4BP のみがヒト BMCs においてコルチゾールおよびテストステロン産生性を示し (Fig. 3A)、P450<sub>scc</sub> の発現を誘導した (Fig. 4B)。WT1 (+/+, +/-, -/+, -/-)、DAX1、PBX1、CITED2、WNT4 の単独導入はこのような効果を示さなかった。これは、ヒト間葉系 BMCs からのステロイド産生細胞の創生にとって SF-1/Ad4BP がマスターレギュレー

ターである可能性を示唆している。しかしながら副腎・性腺の分化は様々な因子の一連のカスケードによって起こることから 2)、SF-1/Ad4BP と他の因子とのステロイド産生細胞への分化誘導における関係を複数の遺伝子導入によって調べることが重要である。

### D. 結論

SF-1/Ad4BP はヒト骨髄由来間葉系細胞をステロイド産生細胞へ形質転換した。さらにこのステロイド産生細胞は ACTH および LH 応答性を示すことが明らかになった。

### E. 関連論文

(1) Gondo S, Yanase T, Okabe T, Tanaka T, Morinaga H, Nomura M, Goto K, Nawata H (2004) *Genes Cells* 9(12), 1239-1247

(2) Yanase T, Gondo S, Okabe T, Shirohzu H, Fan W, Oba K, Morinaga H, Nomura M, Ohe K and Nawata H (2006) *Endocr J* 53(4), 449-459

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

(1) Fan W, Yanase T, Morinaga H, Gondo S, Okabe T, Nomura M, Komatsu T, Morohashi K, Hayes TB, Takayanagi R, Nawata H.: Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and

reproductive cancers in humans. *Environ Health Perspect.* 115:720-7, 2007

(2) Miyamoto J, Matsumoto T, Shiina H, Inoue K, Takada I, Ito S, Itoh J, Minematsu T, Sato T, Yanase T, Nawata H, Osamura YR, Kato S. : The pituitary function of androgen receptor constitutes a glucocorticoid production circuit. *Mol Cell Biol.* 27:4807-14, 2007

(3) Fan W, Yanase T, Morinaga H, Gondo S, Okabe T, Nomura M, Hayes TB, Takayanagi R, Nawata H. : Herbicide atrazine activates SF-1 by direct affinity and concomitant co-activators recruitments to induce aromatase expression via promoter II. *Biochem Biophys Res Commun.* 20:355:1012-8. 2007

(4) Saito Y, Yamada N, Shirai K, Sasaki J, Ebihara Y, Yanase T, Fox JC. : Effect of rosuvastatin 5-20mg on triglycerides and other lipid parameters in Japanese patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis.* 194:505-11, 2007

(5) Fan W, Yanase T, Morinaga H, Okabe T, Nomura M, Daitoku H, Fukamizu A, Kato S, Takayanagi R, Nawata H. ; Insulin-like growth factor 1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of Foxo1 with androgen receptor. *J Biol Chem.* ;282:7329-38, 2007

(6) Yamada Y, Sekihara H, Omura M, Yanase T, Takayanagi R, Mune T, Yasuda K, Ishizuka T, Ueshiba H, Miyachi Y, Iwasaki T, Nakajima A, Nawata H. ; Changes in serum sex hormone profiles after short-term low-dose administration of dehydroepiandrosterone (DHEA) to young and elderly persons. *Endocr J.* 54:153-62, 2007

(7) Goto Y, Nomura M, Tanaka K, Kondo A, Morinaga H, Okabe T, Yanase T, Nawata H, Takayanagi R, Li E. ; Genetic interactions between activin type IIB receptor and Smad2 genes in asymmetrical patterning of the thoracic organs and the development of pancreas islets. *Dev Dyn.* 236:2865-74, 2007

(8) Tanaka T, Gondo S, Okabe T, Ohe K, Shirohzu H, Morinaga H, Nomura M, Tani K, Takayanagi R, Nawata H, Yanase T. ; Steroidogenic factor 1/adrenal 4 binding protein transforms human bone marrow mesenchymal cells into steroidogenic cells. *J Mol Endocrinol.* 39:343-50, 2007

## 2. 学会発表

(1) IGF1/Insulin signalong activates androgen signaling through direct interactions of FOXO1 with androgen receptor. Yanase T , Fan W , Takayanagi R, Nawata H 第4回核内レセプター国際会議 (大阪) 2007年2月1日-2

日

(2) シンポジウム7「再生医療のトピックス」骨髄及び脂肪由来間葉系幹細胞からのステロイド産生細胞の創生」柳瀬敏彦、権藤重喜、田中智子、白水久男、岡部泰二郎、高柳涼一、名和田新 第80回日本内分泌学会学術総会(東京)2007年6月14-16日

(3) クリニカルアワー8「診断、治療に難渋したクッシング病、プレクリニカルクッシング症候群」副腎性プレクリニカルクッシング症候群(PCS)の診断基準改定上の問題点 柳瀬敏彦、大江賢治、高柳涼一 第80回日本内分泌学会学術総会(東京)2007年6月14-16日

(4) シンポジウム10「核内レセプターと糖脂質代謝代謝の最前線」アンドロゲン-アンドロゲン受容体作用系とメタボリックシンドローム 柳瀬敏彦、権藤重喜、田中智子、白水久男、岡部泰二郎、高柳涼一、名和田新 第80回日本内分泌学会学術総会(東京)2007年6月14-16日

(5) 「長期的エストロゲン欠乏が糖、脂質代謝、肝機能に及ぼす影響-自験ターナー症候群10例及び先天性副腎低形成1例の臨床像のまとめ」柳瀬敏彦、岡部泰二郎、大江賢治、野村政壽、高柳涼一 第80回日本内分泌学会学術総会(東京)2007年6月14-16日

(6) 「末端肥大症、副腎皮質腫瘍及び直腸カルチノイドを合併し、低レニン性高血圧症を呈したMEN I型

の1例」園田浩一朗、大江賢治、権藤重喜、渡辺哲博、坂本竜一、野村政壽、岡部泰二郎、柳瀬敏彦、高柳涼一

第15回日本ステロイドホルモン学会(仙台)2007年11月24日

(7) 「健常中高年男性への25mgDHEA,6か月投与試験」柳瀬敏彦、高柳涼一、名和田新一 第15回日本ステロイドホルモン学会(仙台)2007年11月24日

(8) 「マウス Ad4BP/SF-1 遺伝子第1イントロンに存在する CpG アイランドの DNA メチル化状態の解析」白水久男、岡部泰二郎、権藤重喜、松原恵理、森永秀孝、野村政壽、柳瀬敏彦、高柳涼一

第15回日本ステロイドホルモン学会(仙台)2007年11月24日

(9) 「エネルギー過剰状態での CRH 受容体の役割」松原恵理、野村政壽、柳瀬敏彦、高柳涼一 第15回日本ステロイドホルモン学会(仙台)2007年11月24日

## 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

# ステロイド産生細胞の分化再生に関する研究

宮本 薫

福井大学医学部医学科生命情報医科学講座分子生体情報学領域

## 【研究要旨】

副腎ステロイドホルモン産生異常の治療としては、主にホルモン補充療法が用いられている。一方ホルモン補充療法では、頻繁な補充が必要であることに加えて、様々な副作用があることから、これによって変わる治療法が求められている。私どもは、ホルモン補充療法に変わりうる再生治療法の開発を目指し、間葉系幹細胞を副腎ステロイド産生細胞に転換することを試みている。本年度は、SF-1 に代わり同じファミリーに属する転写因子 LRH-1 をヒト骨髄間葉系幹細胞に導入し cAMP 処理することにより、同様にステロイドホルモン産生能を持つ細胞株を得ることが出来た。

## A. 研究目的

副腎ホルモン産生異常に関連した疾患の治療に、幹細胞を用いた再生医療の応用が期待されている。副腎皮質ホルモン産生異常の治療には、主にホルモン補充療法が用いられているが、より生理的なホルモン動態を考慮すると外部からの投与によるホルモン補充療法にかわる自律的な分泌調節が可能な再生医療の開発が望まれる。私どもはこういった観点に立って、幹細胞からフィードバック機能を備えた副腎皮質ホルモン産生細胞の作製を試みている。幹細胞としては全能性を持つ ES 細胞の利用も考えられるが、倫理的問題や技術的な困難さが伴うため現実的でない。私どもは ES 細胞に代わる幹細胞として骨髄由来の間葉系幹細胞に注目した。骨髄間葉系幹細胞は成体から比較的容易に採取できること、さらに ES 細胞

ほどではないにしろ様々な細胞に分化しうることから再生医療への応用に適した幹細胞である。本研究の目的は、骨髄間葉系幹細胞を用いて、フィードバック機能を備えた副腎皮質ホルモン産生細胞を作り出し、副腎ステロイドホルモン産生異常症に対する再生医療への基礎的検討を行うことである。

## B. 研究方法

1. 様々なヒト骨髄間葉系幹細胞株に、転写因子でオーファン核内受容体遺伝子 Ad4BP/SF-1 をトランスフェクトし、SF-1 恒常発現細胞株を樹立した。この SF-1 恒常発現細胞株を dibutyl-cAMP 存在下に 7 日間培養し、分化誘導を行った。分化誘導の検証には、ステロイド産生細胞特異的な分子マーカーである P450<sub>scc</sub> をはじめとする特異的遺伝子群の発現を

RT-PCRにより解析した。また、これらのタンパク質としての発現を、それぞれの特異的抗体を用いてウエスタンブロットにより解析した。

2. Ad4BP/SF-1と同じファミリーに属するもうひとつの核内受容体遺伝子LRH-1のヒトステロイドホルモン産生器官での遺伝子発現を、Ad4BP/SF-1の発現と比較検討するため、ヒト精巣、卵巣、副腎の各組織からmRNAを抽出し、RT-PCRにより検討した。

3. LRH-1のステロイド合成関連遺伝子群の転写活性化能を、各遺伝子プロモーター領域を蛍光タンパク質の上流に組み込んだレポーターシステムを用いて、Ad4BP/SF-1のそれと比較検討した。ステロイド合成関連遺伝子群として、StAR, CYP11A, HSD3B2, CYP17の各遺伝子プロモーター領域を用いた。レポーターベクターとLRH-1およびAd4BP/SF-1発現ベクターとを共発現させて、これら遺伝子プロモーターの活性化に対する影響を解析した。

4. ヒト骨髄間葉系幹細胞株に、オーファン核内受容体遺伝子LRH-1をトランスフェクトし、LRH-1恒常発現細胞株を樹立した。このLRH-1恒常発現細胞株をdibutyl-cAMP存在下に7日間培養し、分化誘導を行った。分化誘導の検証には、ステロイド産生細胞特異的な分子マーカーであるP450<sub>scc</sub>をはじめとする特異的遺伝子群の発現をRT-PCRにより解析した。さらに、分泌されるステロイドホルモンのパターンをELISAにより測定し、SF-1恒常発現細胞のそれと比較検討した。

## C. 研究結果

1. 様々なヒト骨髄間葉系幹細胞株に、Ad4BP/SF-1をトランスフェクトし、SF-1恒常発現細胞株を樹立した。このSF-1恒常発現細胞株をdibutyl-cAMP存在下に7日間培養して分化誘導を行った。その結果、用いたヒト骨髄間葉系幹細胞株により、異なるパターンのステロイド産生細胞株を樹立することができた。

2. LRH-1のヒトステロイドホルモン産生器官での遺伝子発現を、Ad4BP/SF-1の発現と比較検討した。その結果、ヒト精巣及び卵巣でLRH-1は強く発現しており、一方で副腎においては発現が見られなかった。一方Ad4BP/SF-1は、ヒト副腎で強く発現しており、また精巣での発現も見られたが卵巣での発現は弱かった。これを、マウスのステロイドホルモン産生器官での遺伝子発現と比較すると、マウスではLRH-1はヒトの場合と同様、精巣及び卵巣にその発現が見られたが、やはり副腎では観察されなかった。これらの結果から、性腺系では、LRH-1は、Ad4BP/SF-1と同様ステロイドホルモン産生に重要な役割を担っていることが示唆された。

3. LRH-1のステロイド合成関連遺伝子群StAR, CYP11A, HSD3B2, CYP17に対する転写活性化能を、各遺伝子プロモーター領域を蛍光タンパク質の上流に組み込んだレポーターシステムを用いて、Ad4BP/SF-1のそれと比較検討した。その結果、LRH-1は一過性の発現では、Ad4BP/SF-1に比べて、HSD3B2を除いて著しく低い転写活性化能しか示さなかった。これは、LRH-1はAd4BP/SF-1に比べ、遺

伝子上流プロモーター領域の SF-1 サイトへの結合およびその活性化が弱いことを示している。

4. ヒト骨髄間葉系幹細胞株に、LRH-1 をトランスフェクトし、LRH-1 恒常発現細胞株を樹立した。この LRH-1 恒常発現細胞株を dibutyl-cAMP 存在下に7日間培養し、分化誘導を行い、ステロイド産生細胞特異的な分子マーカーである P450<sub>scc</sub> をはじめとする特異的遺伝子群の発現を RT-PCR により解析した。その結果、LRH-1 恒常発現細胞株は Ad4BP/SF-1 恒常発現細胞株と全く同様にステロイド合成酵素群を発現していた。さらに、ELISA によるステロイドホルモンパターンの解析でも、Ad4BP/SF-1 恒常発現細胞株と同様のステロイド産生能を示した。

#### D. 考察

Ad4BP/SF-1は、オーファン核内受容体に分類される転写因子で、ステロイドホルモン産生や性腺・副腎の発生分化に極めて重要な役割を果たしている。Ad4BP/SF-1とよく似た構造を持つもうひとつの転写因子LRH-1が存在し、これは従来肝臓での胆汁酸の合成に深く関与していることが知られていた。本研究では、LRH-1のステロイドホルモン産生への関与を、ステロイドホルモン産生器官における発現、ステロイドホルモン合成関連遺伝子群に対する転写活性化能、ヒト骨髄間葉系幹細胞からステロイドホルモン産生細胞への分化誘導能を、Ad4BP/SF-1のそれらと比較検討した。その結果、LRH-1はAd4BP/SF-1と同様、ヒト性腺で発

現しており、ステロイドホルモン合成関連遺伝子群の転写を活性化できることが明らかとなったが、これはAd4BP/SF-1と比較して著しく弱かった。一方、ヒト骨髄間葉系幹細胞からステロイドホルモン産生細胞への分化誘導能は、Ad4BP/SF-1と同等の活性を有しており、再生治療のためのステロイドホルモン産生細胞の作製にAd4BP/SF-1と同様に用いることが可能であることが示された。

#### E. 結論

本研究により、骨髄由来の間葉系幹細胞はin vivoならびにin vitroでステロイドホルモン産生細胞に分化する能力を有していることが示され、転写因子Ad4BP/SF-1およびLRH-1により分化誘導が可能であることが示された。この知見は、将来的な副腎ホルモン産生異常に関わる疾患への再生医療の可能性を示すものである。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ikeda, S., Nakamura, K., Kogure, K., Omori, Y., Yamashita, S., Kubota, K., Mizutani, T., Miyamoto, K., Minegishi, T.: Effect of Estrogen on the Expression of Luteinizing Hormone-Human Chorionic Gonadotropin Receptor Messenger Ribonucleic Acid in Cultured Rat Granulosa Cells. *Endocrinology*. (in press).

2) Yazawa, T., Uesaka, M., Inaoka, Y., Mizutani, T., Sekiguchi, T., Kajitani, T., Kitano, T., Umezawa, A., Miyamoto,



K. : Cyp11b1 is induced in the murine gonad by luteinizing hormone/ human chorionic gonadotropin and involved in the production of 11-ketotestosterone, a major fish androgen; conservation and evolution of androgen metabolic pathway. *Endocrinology* (in press).

3) Inaoka, Y., Yazawa, T., Uesaka, M., Mizutani, T., Yamada, K., Miyamoto, K. : Regulation of Nur77/NGFI-B gene expression in the rat ovary and in Leydig tumor cells MA-10. *Mol. Reprod. Dev.* 1-9, 2007.

4) Ogata-Kawata, H., Yamada, K., Uesaka-Yoshino, M., Kagawa, N., Miyamoto, K. : BS69, a corepressor interacting with ZHX1 is a bifunctional transcription factor. *Front. Biosci.* 12, 1911-1926, 2007.

## 2. 総説

1) 宮本 薫 : タンパク質間相互作用と転写制御. *生体の科学* 58(5), 380-382, 2007.

2) 稲岡齊彦、矢澤隆志、上坂美紀、水谷哲也、山田一哉、宮本 薫 : ラット卵巣およびMA-10細胞でのNGFI-B/nur77遺伝子の発現調節機構. *日本生殖内分泌学会雑誌* 2007, 12, 5-8.

## 3. 学会発表

1) 矢澤隆志、水谷哲也、稲岡齊彦、上坂美紀、山田一哉、梅澤明弘、宮本 薫 : 骨髄幹細胞からのステロイド産生細胞の作製. 第80回日本内分泌学会学術総会. 東京, 2007, 6.

2) 稲岡齊彦、矢澤隆志、水谷哲也、上坂美紀、山田一哉、宮本 薫 : 性腺系での

NGFI-B/nur77の発現調節機構. 第80回日本内分泌学会学術総会. 東京, 2007, 6.

3) Inaoka, Y., Yazawa, T., Uesaka, M., Mizutani, T., Yamada, K., Miyamoto, K. : Regulation of NGFI-B/Nur77 gene expression in the rat ovary and transcriptional regulation in Leydig tumor cells MA-10. 第25回内分泌・代謝学サマーセミナー. 淡路, 2007, 7.

4) Yazawa, T., Mizutani, T., Yoshino, M., Inaoka, Y., Umezawa, A., Miyamoto, K. : Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig adrenocortical cells. 第25回内分泌・代謝学サマーセミナー. 淡路, 2007, 7.

5) Yazawa, T., Miyamoto, K. : Differentiation of Adult Stem Cells into Steroidogenic Cells. Fourth Canada-Japan Bilateral Workshop on Human Reproduction & Reproductive Biology. 弘前, 2007, 7-8.

6) 宮本 薫 : 内分泌領域における再生医学. 第41回日本小児内分泌学会ランチョンセミナー. 東京, 2007, 11.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許許諾  
特になし

2. 実用新案登録  
特になし

3. その他  
特になし

(3) 副腎ホルモン産生異常に関連する  
基礎的・臨床的研究

# 副腎皮質の発生初期過程に関する研究

諸橋 憲一郎

九州大学大学院医学研究院

## 【研究要旨】

転写因子 Ad4BP/SF-1 は副腎皮質におけるステロイドホルモン産生能を制御し、同時に組織形成過程で重要な役割を担っている。これまでに我々は Ad4BP/SF-1 遺伝子の胎仔副腎エンハンサー配列を同定し、この配列を用い、Ad4BP/SF-1 を強制的に発現するトランスジェニックマウスを作成した。興味深いことに、このマウスには異所性に副腎皮質が形成された。この異所性副腎皮質形成のメカニズムを検討したところ、Ad4BP/SF-1 がサイクリン遺伝子の活性化を通じ細胞増殖を亢進させることが明らかになった。

## A. 研究目的

Ad4BP/SF-1 遺伝子の胎仔副腎皮質特異的発現を調節するエンハンサーを用い、異所性に副腎皮質が形成される。本研究においてはそのメカニズムの解明を目的とした。特に Ad4BP/SF-1 がどのようなメカニズムで副腎皮質の分化ならびに増殖に寄与するかを検討した。

質のマーカー遺伝子として一連のステロイドホルモン産生関連遺伝子の発現を *in situ hybridization* と免疫染色にて検討した。また、Ad4BP/SF-1 の強制発現と細胞増殖との関係を、Y-1 細胞を用いて検討した。特に G1 サイクリンであるサイクリン D1 と E1 の遺伝子発現に対する Ad4BP/SF-1 の効果を検討した。

## B. 研究方法

Ad4BP/SF-1 遺伝子の胎仔副腎皮質エンハンサーの制御下に Ad4BP/SF-1 自身を発現するプラスミドを作製した。このプラスミドを用いてトランスジェニックマウスを作製し、胎仔副腎皮質で Ad4BP/SF-1 を強制発現するマウスをえた。このマウスには異所性に副腎皮質様の組織の形成が認められたので、副腎皮

(倫理面への配慮)

本実験にはトランスジェニックマウスを用いるが、全ての動物実験は自然科学研究機構動物実験指針に従って行なわれた。なお本研究は自然科学研究機構実験動物委員会の承認を得たものである。同様に DNA 組み替え実験については、組み替え DNA 実験員会の承認を得たものである。

### C. 研究成果

本研究では、胎仔副腎皮質における Ad4BP/SF-1 の強制発現の影響を調べたところ、正常の副腎皮質以外に、より頭部側に副腎皮質様の細胞集団を検出した。副腎ステロイドホルモン産生に不可欠な P450C21 の発現を *in situ hybridization* にて検討したところ、この細胞に発現が検出された。従って、この結果は Ad4BP/SF-1 の強制発現が異所性副腎皮質の形成に寄与することを示すものであった。そこで、Ad4BP/SF-1 の発現の増加がいかなるメカニズムのもとに異所性副腎皮質の形成をもたらしたかを Y1 細胞を用いて検討した。Y-1 細胞において Ad4BP/SF-1 の発現を siRNA によって減少させると規則的な細胞周期の進行に影響が認められた。また細胞数の減少が認められた。そこで、サイクリン D1 と E1 遺伝子の発現に対する Ad4BP/SF-1 の影響を調べたところ、これら二つの遺伝子プロモータは Ad4BP/SF-1 によって正に調節されていること、またその上流領域に Ad4BP/SF-1 が結合していることが明らかとなった。

### D. 考察

遺伝子破壊マウスの表現型の解析から Ad4BP/SF-1 遺伝子は副腎皮質の形成には必須の転写因子であることが明らかになっていたが、そのメカニズムは不明であった。本研究では胎仔副腎皮質特異的エンハンサーを用い、胎仔副腎の細胞で Ad4BP/SF-1 を強制発現させることで、Ad4BP/SF-1 の副腎皮質形成における影響を検討した。その結果、正常の副腎以

外に異所性の副腎形成を確認した。次いで、Ad4BP/SF-1 が胎仔副腎の増殖に関与するかについて検討したところ、Ad4BP/SF-1 が細胞周期の制御を介して増殖の亢進に必要であることが示された。Ad4BP/SF-1 遺伝子破壊マウスにおける副腎皮質の消失の原因として、細胞増殖の制御異常を確認した。また、Ad4BP/SF-1 を発現する細胞ではこの因子が細胞増殖を制御していることが示された。

### E. 結論

Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現増加は異所性の副腎皮質の形成を可能とした。Ad4BP/SF-1 を発現する副腎皮質や生殖腺においては、Ad4BP/SF-1 が細胞増殖を制御することでこれらの組織形成に寄与する。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1, Kurokawa, H., Saito, D., Katoh-Fukui, Y., Ohta, K., Baba, T., Morohashi, K., and Tanaka, M. Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 16958-16963, 2007.

2, Ishimaru, Y., Komatsu, T., Kasahara, M., Katoh-Fukui, Y., Toyama, Y., Maekawa, M., Toshimori, K., A.S. Chandraratna, Morohashi, K., and Yoshioka, H. (\*; The last two authors equally contributed to this work.) Mechanism of asymmetric ovarian development in birds. *Development in press*