

3, Baba, T., Shima, Y., Mimura, J., Oshima, M., Fujii-Kuriyama, Y., and Morohashi, K. Involvement of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in maintenance of seminal vesicle through sexually different target gene expression. Sexual Development in press

3. その他  
なし

## 2. 学会発表 (招待講演)

1, T. Komatsu, H. Ogawa, Morohashi K. Regulation of Ad4BP/SF-1 by SUMO. The 4th International Nuclear Receptor Meeting in Japan (Osaka), Feb 1-2, Organizer, 2007

2, K Morohashi. From Ad4BP/SF-1 to cell and tissue differentiation. Society for Endocrinology BES 2007, March 5-8, Birmingham, UK, Asia and Oceania Medal lecture

3, Ken Morohashi, Molecular mechanism of sex differentiation. International Conference on Molecular Biology of Life Sciences 2007. Nov. 19-21, Malang, Indonesia, Plenary Session

4, 諸橋 憲一郎 シンポジウム 循環器領域における性差医療「性分化の分子メカニズム」第55回日本心臓病学会(東京) 9月10-12日、2007年

## 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

# Yeast two-hybrid systemを用いた StARおよびDAX-1相互作用因子同定の試み

藤枝 憲二、向井 徳男、鈴木 滋  
旭川医科大学小児科

## 【研究要旨】

先天性副腎過形成症 (CAH)の中でも重症型を呈するリポイドCAHは日本人に比較的多く発症することが知られており、多くは StAR タンパク (steroidogenic acute regulatory protein)の異常が、一部にコレステロール側鎖切断酵素 (P450<sub>scc</sub>)の異常が原因となることが報告されている。しかしながら、リポイドCAHの症例においてこのどちらにも異常が認められないケースがあるため、リポイドCAHの新たな病因候補として StAR タンパクと相互作用する因子を新たに探索・同定し、疾患との関連や、ステロイド産生・コレステロール輸送に関連した機能について検討することを目的とした。一方、X連鎖性先天性副腎低形成症の原因遺伝子として同定されている DAX-1 (NR0B1)は、副腎のみならず生殖腺の分化・形成において重要な働きを有する一方、ステロイド産生においても重要な転写因子である。そのため、DAX-1 と相互作用する因子を新たに同定し、疾患との関連や、ステロイド産生における機能について検討することを目的とした。作製したヒト副腎由来 cDNA ライブラリーに対して、yeast two-hybrid systemを用いたスクリーニングを行った。その結果、StARについては3個、DAX-1については79個の陽性クローンを同定し、現在さらなる検証を行っている。

## A. 研究目的

先天性副腎過形成症 (CAH)の中でもコルチゾール、アルドステロン、性ステロイドホルモンすべてが欠乏し、重症型を呈するリポイドCAHは日本人に比較的多く発症することが知られており (日本人CAHの約5%)、StARタンパクの異常が原因となることが報告されている。その後、コレステロールからプレグネノロンへのステロイド合成過程の律速段階に関わるコレステロール側鎖切断酵素 (P450<sub>scc</sub>)の異常症を Tajima らが同定している。し

かしながら、リポイドCAHの症例においてStARにもP450<sub>scc</sub>にも異常が認められないケースがあるため、リポイドCAHの新たな病因候補として StAR タンパクと相互作用する因子を新たに探索・同定し、疾患との関連や機能について検討することを目的として研究を進める。StARタンパクは、LDL受容体を介してステロイド産生細胞内に取り込まれたステロイド合成の基質であるコレステロールをミトコンドリア外膜からステロイド合成の場である内膜へと移送する機構に関係してい

ることが示されているが、その詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い。このことから StAR タンパクとの相互作用因子を同定することができれば、ステロイドホルモン産生に関連した細胞内コレステロール移送機構についても新たな知見を提供することが可能となる。

また、DAX-1(NROB1)は低ゴナドトロピン性性腺機能低下を合併する X 連鎖性先天性副腎低形成症の原因遺伝子として知られているが、ステロイドホルモン産生に関連する視床下部—下垂体—副腎/性腺の内分泌軸にそった発現からも単に副腎の分化形成に関わるだけではなく、これまで抑制性の転写因子としての機能を有することが報告されているが、結合する転写共役因子などを含めた転写調節機構や、細胞内核移行メカニズムについては不明な点が残されている。このため、DAX-1 との相互作用因子を同定し、ステロイドホルモン産生の調節機構における新たな知見が得られる可能性がある。

## B. 研究方法

ヒト副腎組織から抽出された RNA (total RNA および mRNA) を購入し、それらを鋳型として cDNA 合成を行って、ヒト副腎由来の cDNA ライブラリーを作製した。この cDNA ライブラリーを yeast two-hybrid system を用いて、全長および N 末端 62 アミノ酸を欠く (-N62) ヒト StAR との相互作用因子のスクリーニング、さらにヒト全長 DAX-1 との相互作用因子のスクリーニングを行う。尚、-N62 ヒト StAR タンパクは既にコレステロール輸送において十分な機能を有することが証明

されている。これら 2 種類のヒト StAR タンパクおよびヒト DAX-1 タンパクと相互作用すると考えられる陽性コロニーからライブラリープラスミドを抽出し、塩基配列を同定してデータベースと照合することでその因子を同定し、これまでに蓄積されている発現様式や機能についての情報を収集する。さらに、候補因子同定後には各タンパクと候補因子タンパクとのタンパク間相互作用の有無について、特異的抗体を用いた免疫沈降法の手法や、哺乳動物細胞を用いた two-hybrid アッセイにて検討する。

## C. 研究結果

StAR タンパクについて 1 次スクリーニングで得られた 295 個の陽性コロニーをの確認実験を繰り返し行った結果、最終的に 3 個の候補因子を同定した。現在はこの 3 個の候補因子についてそれぞれ全長および -N62 の StAR とのタンパク—タンパク相互作用の確認を *in vitro* translation で作成したタンパクについて特異的抗体を用いた免疫沈降法および哺乳動物細胞を用いた two-hybrid アッセイで検証中である。

一方の DAX-1 タンパクについては 1 次スクリーニングの結果 79 個の陽性コロニーを同定し、現在はさらなる確認実験を実施している。今後は候補因子について StAR タンパクの場合と同様にタンパク—タンパク相互作用の確認を他の方法論を用いて検証していく。既に転写共役因子として報告されている因子が陽性クローンの中に含まれており、有望な因子と考え、その発現様式や DAX-1 の転写調

節機能への影響について検討すべく、準備を進めている。

#### D. 考察

これまでに同定できた StAR 相互作用候補因子 3 個についてこれまでに得られている情報を検索した結果、ステロイド産生もしくはコレステロール輸送に関連した機能に関する情報はない。このため、タンパク間相互作用が確かめられた場合にはこれらの機能に関しての検討を加えていく必要がある。また、DAX-1 相互作用候補因子については絞込みを行うと同時に、有望因子についてはその発現様式や転写調節機能に対する効果を luciferase アッセイなどの手法を用いて検討していきたい。

#### E. 結論

ヒト副腎由来の RNA から合成した cDNA ライブラリーについて StAR タンパクとの相互作用因子の同定を目指し、yeast two-hybrid system を用いたスクリーニングを行ったところ、3 個の陽性クローンを同定したため、現在他の確認方法を用いてタンパク-タンパク相互作用の検

証・確認を進めているところである。また、DAX-1 タンパクとの相互作用因子の候補 79 個についてはさらなる相互作用の確認作業を行っており、今後、候補因子についての解析を進めていきたい。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

Okuhara K, Abe S, Kondo T, Fujita K, Koda N, Mochizuki H, Fujieda K, Tajima T: Four Japanese patients with adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism caused by DAX-1 gene mutations: Mutant DAX-1 failed to repress steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and luteinizing hormone  $\beta$ -subunit gene promoter activity. *Endocr. J.* in Press

#### 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

## 血中ステロイドプロフィール LCMSMS 法による

### 早産児・正期産児の新生児早期副腎機能解析

長谷川奉延、三輪雅之、池田一成  
慶應義塾大学医学部小児科

本間桂子  
慶應義塾大学病院中央臨床検査部

#### 【研究要旨】

早産児と正期産児の新生児早期における副腎胎生皮質ステロイド分泌を比較した。対象は、生後 3-5 日の早産児(在胎 32-35 週) 29 例、生後 3-6 日の正期産児(37-41 週) 103 例で、血清 100  $\mu$ l について、内標(安定同位体置換ステロイド)添加、有機溶媒抽出、ミニカラム分画、ピコリノールエステル誘導化、ミニカラム精製後、感度・特異性に優れた液体クロマトグラフタンデム質量分析(LCMSMS)により非抱合型 170Hpregnenolone、DHEA を分析した。Mann-Whitney 有意差検定の結果、170Hpregnenolone、DHEA は、早産児において正期産児より有意に高値であった。これは、早産児において、副腎胎生皮質がより残存しているという病理所見と矛盾しない。

#### 【背景】

胎児副腎は、内部に大部分をしめる胎生皮質と、外層に束状層および球状層に発達する永久皮質からなり、胎生 6 ヶ月にはステロイド分泌能を持ち、その後胎生 40w で満期出生まで副腎は増大すると報告されている(図 1)が、各層のステロイド分泌変化の詳細については不明である。新生児の副腎機能解析には、高濃度の胎生皮質由来ステロイド、低濃度の永久皮質束状層由来ステロイド、超低濃度の球状層由来ステロイドを高感度・高特異的に同時測定する必要があるが、免疫化学的測定法は検体量、特異性の点で問題があり、適用できなかつた。昨年、感

度・特異性に優れた液体クロマトグラフタンデム質量分析(LCMSMS)による血中ステロイドプロフィール測定法が確立されたので、今回新生児の副腎機能解析に臨床応用した

#### 【目的】

LCMSMS による血中ステロイドプロフィールにより、早産児・正期産児の新生児早期における副腎胎生皮質ステロイド分泌を比較する。

#### 【対象】

慶應義塾大学病院周産期母子医療センターにて出生し、保護者の同意を得た早

産児 29 例、正期産児 103 例。在胎週数、出生体重、採尿日を表 1 に示す。

### 【方法】

血清 100  $\mu$ l について、内標(安定同位体置換ステロイド)添加、有機溶媒抽出、ミニカラム分画、ピコリノールエステル誘導化、ミニカラム精製後、液体クロマトグラフトンデム質量分析(LCMSMS)により、170Hpregnenolone、DHEA を測定した(図 2, 3)。Mann-Whitney 順位和検定により、早産児と正期産児を比較した。

### 【結果】

早産児は、170Hpregnenolone、DHEA のいずれにおいても正期産児に比し有意に高値であった(図 4)。

### 【考察】

早産児では、正期産児に比し、胎生皮質ステロイド濃度が高いという今までの知見と一致した。今回対象の胎児副腎の大きさを超音波で確認をしていないが、早産児において、正期産児に比し胎生皮質がより残存しているという病理所見とも矛盾しない。

### 【結語】

感度・特異性に優れた液体クロマトグラフトンデム質量分析により、新生児早期の胎生皮質由来 170Hpregnenolone、DHEA の分泌が早産児において正期産児より有意に高いことを確認した。

### 【参考文献】

1) 笹野公伸. 副腎皮質. 発生、解剖.

小児内分泌学IV pp. 3-11

2) Ernest E. Lack. Embryology, Developmental Anatomy, and Selected Aspects. Pathology of the Adrenal Glands. pp.1-17 1990

### 【研究発表】

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

●三輪雅之、有光威志、本間英和、倉辻言、北東功、本間桂子、池田一成、長谷川奉延. 新生児血中ステロイドホルモン一斉測定による新生児副腎および性腺機能評価. 第 51 回日本未熟児新生児学会(口演). 大宮. 2006. 11. 27-28.

●三輪雅之、有光威志、本間英和、倉辻言、北東功、本間桂子、池田一成、長谷川奉延. 新生児血中ステロイドホルモン一斉測定による新生児副腎および性腺機能評価(第 2 報). 第 43 回日本周産期・新生児医学会(口演 0-165). 東京. 2007. 7. 8-10

●三輪雅之、有光威志、草野亮祐、本間英和、北東功、本間桂子、池田一成、長谷川奉延. 超低出生体重児の縦断的血中ステロイドホルモン一斉測定による副腎機能の推移. 第 52 回日本未熟児新生児学会(口演 99). 高松. 2007. 11. 24-26

●三輪雅之、有光威志、草野亮祐、本間英和、北東功、本間桂子、池田一成、長谷川奉延. 血中ステロイドホルモン一斉測定による SGA 児の副腎機能評価. 第 52 回日本未熟児新生児学会(口演 100). 高松. 2007. 11. 24-26

F. 知的財産の出願・登録状況

なし

図1 胎児副腎皮質層構造(笹野原著<sup>1)</sup>を改変)

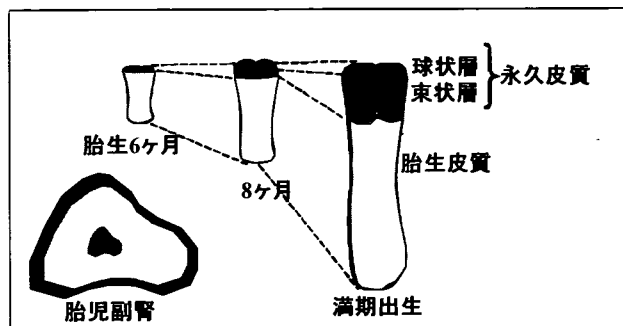


図4 早産児と正期産児の胎生皮質ステロイド分布

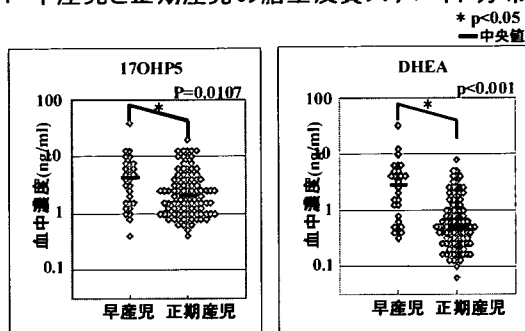


表1 対象

図2 方法

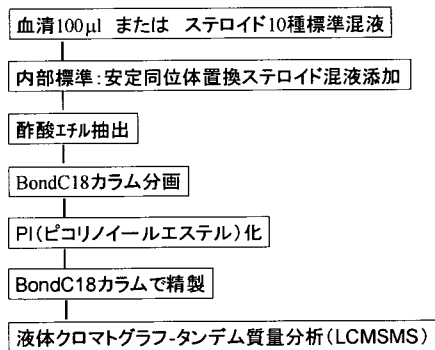
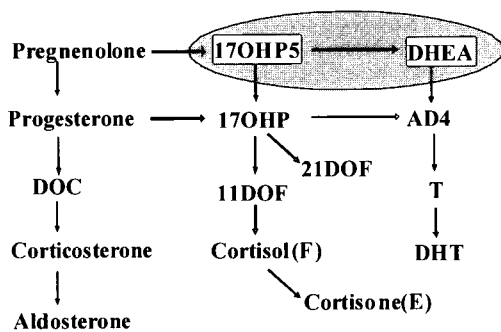


図3 検討項目



## 塩誘導性キナーゼ (SIK) による

### アルドステロン合成酵素遺伝子の発現調節に関する研究

岡本光弘  
帝塚山大学

#### 【研究要旨】

アルドステロン合成酵素 (CYP11B2) の遺伝子の発現はアンジオテンシン II や  $K^+$  イオンにより制御されている。これらの刺激は細胞内で  $Ca^{2+}$  や PKC シグナルを活性化させるが、CYP11B2 の遺伝子発現には  $Ca^{2+}$  が特に重要とされ  $Ca^{2+}$  で活性化される CaMK1 とその下流にある転写因子 CREB が関与するとされている。しかしその詳細な制御機構や時間依存的活性化の機構は不明な点が多い。今年度の研究では CYP11B2 の mRNA 発現を指標に  $Ca^{2+}$  シグナル伝達の時間依存的な調節と、副腎皮質球状層に発現する塩誘導性キナーゼ (SIK2) に関する検討を行った

#### A. 研究目的

アルドステロンは副腎皮質球状層から分泌されるステロイドホルモンで、その作用としては腎臓の尿細管から  $Na^+$ /H<sub>2</sub>O の再吸収、 $K^+$  の排泄を促進する。そのためアルドステロンは血中の  $Na^+$  や  $K^+$  などの電解質を一定に保ち、生体の体液量のバランスを保つという重要な役割を担っている。

アルドステロンはコレステロールを原料として合成され、ミトコンドリアに存在する CYP11B2 がその合成過程の律速かつ最終の段階を触媒する。したがって、アルドステロン合成量とアルドステロン合成酵素である CYP11B2 の mRNA の発現量 (転写量) は相関すると考えられている。したがって CYP11B2 遺伝子の発現調節機

構を明らかにする事は、アルドステロンの合成調節のみならずアルドステロンの作用である血圧の維持との関係を解明するのに重要である。

昨年度までの研究で、CYP11B2 の遺伝子発現には  $Ca^{2+}$  依存的な CaMKK の活性化、その下流の塩誘導性キナーゼ (SIK) ファミリーの活性化、そして CaMK の活性化が関与することが示唆された。CaMK は CREB のリン酸化レベルを高め、CYP11B2 の遺伝子発現を誘導する。一方、SIK ファミリー酵素は CREB の転写共役因子 TORC をリン酸化依存的に不活性化することで、CaMK 依存的 CYP11B2 の発現を抑制する。

SIK には 3 種の異なるアイソフォームが存在する。SIK1 は塩刺激で誘導され、CYP11B2 の  $Ca^{2+}$  依存的転写の起こる以前



に既に誘導されている。一方SIK2はCYP11B2が発現する副腎皮質球状層で発現しており、その発現様式を見るとCaMKKの下流でCYP11B2の遺伝子発現を抑制していても不思議ではない。またSIK3は恒常的に発現している。

今回はSIK2を特異的に阻害した条件を構築して、CYP11B2のCa<sup>2+</sup>依存的転写に影響が出るかどうかを検討した。

## B. 研究方法

細胞の培養およびCa<sup>2+</sup>による刺激

ヒト副腎球状層由来細胞 (H295R) は Opiti-MEM I Reduced-Serum Medium / 2% NuSerum1 で培養した。RNA の解析のために細胞を6穴プレートで培養し、約48時間後に semi-confluent に達した状態で BayK8644 10 μM で処理した。処理は2時間、6時間、16時間で行った。

RNA 抽出及び逆転写

処理後の H295R 細胞から、RNA を抽出した。抽出方法は、Qiasol Lysis 溶液 800 μl で細胞を完全に溶解し、400 μl のクロロホルムを加え、攪拌後に 12000rpm、5 分間遠心分離し上清の回収を行った。上清 350 μl を別のチューブに移し、EZ1RNA Universal Tissue Kit (Qiagen) を用いて、BioRobot EZ2 (Qiagen 社) によって RNA の抽出を行った。得られた RNA 1 μg を、トランスクリプター ファーストストランド cDNA 合成キット (Roshe) を用いて逆転写反応を行った。

リアルタイム PCR

逆転写後の cDNA を使用してシトクロム P450 11B2 の mRNA の発現レベルをリア

ルタイム PCR によって測定した。サンプル cDNA は 5 倍積を 5 μl、MastarMix を 20 μl の全量 25 μl で測定を行い、PCR の条件として、ステップ 1 を 94°C の 30 秒、ステップ 2 を 94°C の 20 秒、60°C の 20 秒、72°C の 20 秒を 42 サイクル行った。シトクロム P450 11B2 のプラスミド DNA を検量線 (1pg/μl、0.1pg/μl、0.01 pg/μl、0.001 pg/μl、0.0001 pg/μl) 作成に利用した。また、18S リボソーム RNA の増幅率も測定し、サンプル mRNA の増幅率を 18S リボソーム RNA の相対量として表すことにした。

SIK2 特異的阻害剤の検索

キナーゼインヒビターライブラリーは BioMol 社から購入した。その他のインヒビターは Sigma 社から購入した。合計約 200 の化合物から in vitro の IC<sub>50</sub> が μM 以下のものを選択し、培養細胞で利用可能な化合物を絞り込んだ。

## C. 研究結果

図 1 に示す免疫染色の結果、SIK2 はラット副腎球状層に発現しており特に皮膜直下で強い発現が観察された。そのパターンは CYP11B2 の発現パターンに似ている。

また、SIK2 のノックアウトマウスでは SIK2 の染色が見られないことから、SIK2 はマウス・ラットの副腎皮質球状層で発現していると結論した。

Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達経路による CYP11B2 の mRNA 発現制御における CaMKK は刺激直後には抑制的に、刺激後 4-6 時間で促進的に働く。前者は SIK ファミリーキナ

一ゼの活性化が関与するものと予想されるが、上述 SIK2 の発現パターンの観察から、SIK2 が CaMKK で活性化され抑制的に機能するものと予想される。そこで、SIK2 特異的阻害剤を検索し、その阻害剤存在下での CYP11B2 の発現状況に影響が現れるかどうかを検討した。

まず、SIK2 特異的阻害剤を検索する目的で 200 種類のキナーゼ阻害活性を有する化合物のスクリーニングを行った。フロボノイド等 IC<sub>50</sub> が 100nM 以下のものがスクリーニングされたが、そのほとんどは培養細胞ではたらかなかつたり、あるいは特異性が低かつた。

しかし、SIK が属するキナーゼファミリーの代表である AMPK 特異的阻害剤 CompoundC (CC: 図 2) と呼ばれる化合物は培養細胞内で特異的に SIK2 を阻害することが明らかとなつた。

CC は AMPK を特異的に阻害し、他の主なキナーゼを阻害しないと報告されている。CC の薬理作用には、肝臓でのインスリン反応性の減弱や脳に作用し食欲抑制に効果を発揮することが示されている。また脳で細胞死の減少を起こすことも報告されている。しかし、AMPK のノックアウトマウスの解析から、CC の薬理作用の多くは AMPK 以外の分子に作用している可能性も示唆されている。

培養細胞を利用した解析から、AMPK に対する EC<sub>50</sub> はかなり高く 10-20 $\mu$ M である。一方 SIK2 に対する効果を見ると、強制発現させた SIK2 でさえ EC<sub>50</sub> は 0.3 $\mu$ M であつた。さらに 1 $\mu$ M では完全に SIK2 シグナルを阻害した。この阻害活性は SIK1 や SIK3 に対しては観察されなかつ

た (図 3)。

そこで CC を利用して、ヒト副腎皮質培養細胞株 H295R における SIK2 の CYP11B2 の発現への影響を検討することにした。

図 4 に示す様に、CC は cAMP (フォルスコリン) および Ca<sup>2+</sup> (BayK) 刺激後の遅い誘導の修飾のみならず、早期の誘導を起こすことができなかつた。このことは副腎球状層で発現する SIK2 は CYP11B2 の制御には関与していないことを示唆する。

#### D. 考察と結論

Ca<sup>2+</sup> 依存的 CYP11B2 遺伝子の発現には CaMKK の活性化が重要である。CaMKK の活性は、刺激直後は抑制的に働き、刺激後数時間から誘導に転じる。SIK は CaMKK で活性化され、CYP11B2 の遺伝子発現に必須の転写因子 CREB をその共役因子 TORC を抑制することで負に調節する。SIK2 が CYP11B2 を発現する細胞で発現していることから、CaMKK 依存的転写抑制が SIK2 によるものかどうかの検討を行った。その結果、SIK2 を阻害した条件下で CYP11B2 の発現にまったく影響がないことが分かつた。一方、他の共役因子 PGC-1 の発現は影響を受ける。PGC-1 はミトコンドリアの種々の機能の維持に重要な転写調節因子である。CYP11B2 の遺伝子産物であるアルドステロン合成酵素もミトコンドリア内膜で働いている。このことは SIK2 は CYP11B2 の遺伝子発現のものには関与していないかもしれないが、細胞のアルドステロンの生合成機能のものには関与している可能性がある。今後ミトコンドリアの活性化状態も含めて

解明をすすめる、SIK ファミリー酵素とステロイド合成異常との関連を検討する必要がある。また他の SIK ファミリー酵素の関与も検討しなければならない。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Takemori H, Okamoto M: Regulation of CREB-mediated gene expression by salt inducible kinase

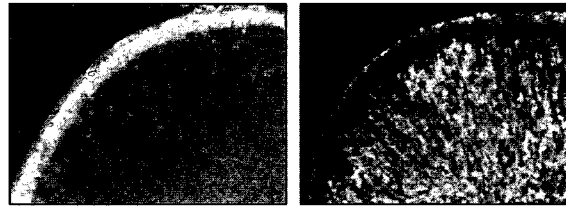
J Steroid Biochem Mol Biol. 108, 287-291 2008

2) Takemori H, Kanematsu M, Kajimura J, Hatano O, Katoh Y, Lin XZ, Min L, Yamazaki T, Doi J, Okamoto M: Dephosphorylation of TORC initiates expression of the StAR gene.

Mol Cell Endocrinol 265, 196-204 2007

3) Takemori H, Kajimura J, Okamoto M: TORC-SIK cascade regulates CREB activity through the basic leucine zipper domain. FEBS-J 274, 3202-3029 2007

(図) 1/2 枚



SIK2

CYP11B1/2

図 1 : ラット副腎皮質の SIK2 と CYP11B1/2 の発現 (矢印 : CYP11B2)

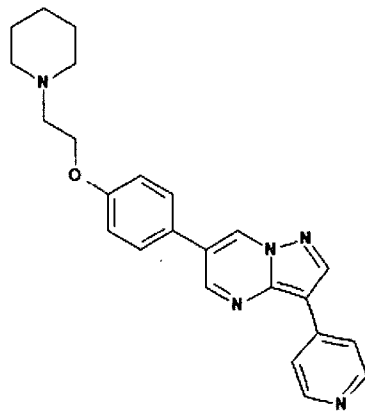


図 2 : CompoundC の構造

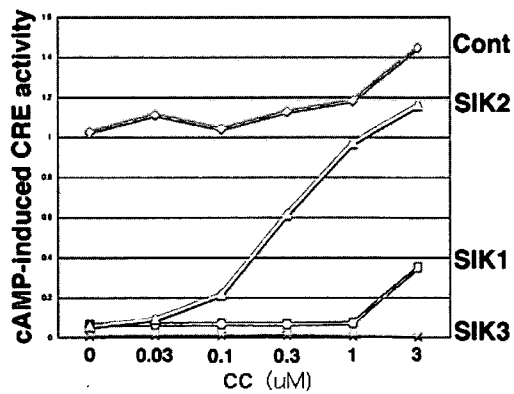


図 3 : CC による SIK2 の機能的阻害 (SIK2 活性は培養細胞内での cAMP 依存的 CRE-Luc 活性の阻害で評価した。)

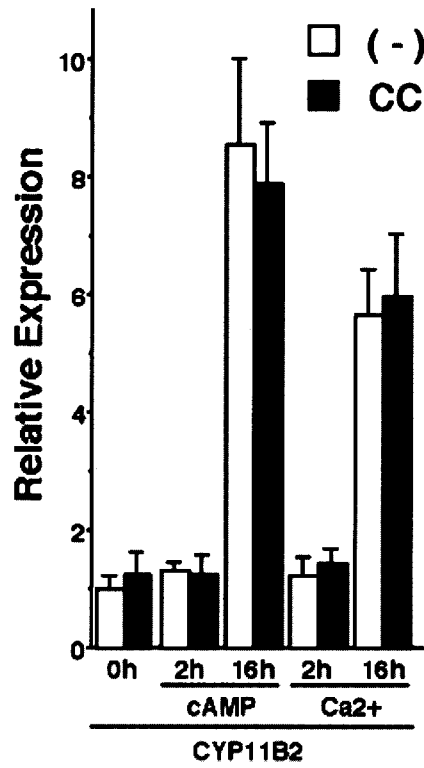


図 4 : CC の CYP11B2 遺伝子発現への影響

# コレステロール硫酸のステロイドホルモン産生の影響

菅原照夫

北海道大学大学院医学研究科連携研究センター

## 【研究要旨】

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR 蛋白質)はコレステロールのミトコンドリア内の移動に重要な役割をしている。コレステロール硫酸(CS)は副腎におけるステロイドホルモンの前駆体だけではなく、コレステロール生合成の抑制物質として働く。本研究は副腎皮質細胞のステロイドホルモン産生における CS の生物学的な役割を調べた。ヒト副腎癌細胞 H295R 細胞に種々の濃度の CS を培養液に添加して解析した。ステロイドホルモン合成は細胞のプレグネノロン産生量で評価した。50  $\mu$ g/ml 以上の CS ではプレグネノロンの量はコントロール群に比べて有意に減少していた。StAR 蛋白質の蛋白質レベルの解析にはウエスタンブロット解析が施行された。CS の濃度が50  $\mu$ g/ml以上では StAR 蛋白質は減少した。StAR 蛋白質の遺伝子の発現は RT-PCR 法により解析した。CS の濃度が50  $\mu$ g/ml 以上では StAR 遺伝子発現は有意に減少した。結論として、副腎皮質細胞では CS は StAR 蛋白質を調節することにより、ステロイドホルモンの生産に影響を与える。

## A. 研究目的

コレステロールからのステロイドホルモン生合成にはいくつかの段階を必要とする。合成の第一ステップはミトコンドリア内膜にあるチトクローム P450 側鎖切断酵素 (P450<sub>scc</sub>) によってコレステロールからプレグネノロンの変換である。Steroidogenic acute regulatory protein (StAR 蛋白質)はコレステロールのミトコンドリア内の移動に重要な役割をしている。StAR 蛋白質は先天性リポイド副腎過形成の原因因子のひとつであり、StAR 蛋白質がステロイドホルモンの合成律速因子であることは明らかにな

っている。コレステロール硫酸(CS)は副腎におけるステロイドホルモンの前駆体だけではなく、コレステロール生合成の抑制物質として働く。本研究は副腎皮質細胞のステロイドホルモン産生に関して、CS の生物学的な役割を調べることを研究の目的とした。

## B. 研究方法

### 細胞培養

ヒト副腎癌細胞 H295R 細胞を用いた。種々の濃度の CS を培養液に添加した。

### プレグネノロンの測定

培養液中のプレグネノロンは ELISA で

測定した。

#### ウエスタンブロット解析

細胞から抽出した蛋白質をもちいて、ウエスタンブロット解析した。抗 StAR 抗体をもちいて解析した。

#### RT-PCR 解析

細胞から抽出した mRNA をもちいて、逆転写反応をし、その後 PCR 反応により遺伝子を増幅した。

### C. 研究結果

ステロイドホルモン生産に対する CS の効果

H295R 細胞の培養液に CS を添加した。ステロイドホルモンの産生性を評価するためにプレグネノロン量を測定した。添加した CS 濃度が  $50 \mu\text{g/ml}$  以上ではプレグネノロンの産生量はコントロール群に比べて有意に減少していた。CS 添加状態でさらに  $5 \mu\text{g/ml}$  の 22-OH cholesterol を添加すると、ステロイドホルモンの産生は低下しなかった。

StAR 蛋白質発現に対する CS の効果

StAR 蛋白質レベルに対する CS の効果を調べるために、培養液細胞解中に CS を添加した H295R 細胞から RIPA buffer で細胞内蛋白質を抽出した。添加した CS の濃度が  $50 \mu\text{g/ml}$  以上では StAR 蛋白質の成熟体 (30kDa) は減少した。StAR 蛋白質の前駆体蛋白質 (37kDa) も  $100 \mu\text{g/ml}$  以上の CS を添加すると低下した。

StAR 遺伝子発現に対する CS の効果

StAR 蛋白質レベルが低下する機序を調べるために、RT - PCR を行い、StAR の mRNA の発現を調べた。StAR mRNA 量は  $50 \mu\text{g/ml}$  以上 CS を添加した細胞では

低下した。また、cAMP で刺激した細胞においても mRNA の発現は低下した。CS による StAR 蛋白質レベルの減少は StAR mRNA の減少によることが明らかとなった。

### D. 考察

ステロイドホルモン産生細胞では、LDL から供給されたコレステロールがステロイドホルモンの前駆体となる。CS を含んだ培養液でのステロイド産生細胞である H295R 細胞におけるプレグネノロン生産は CS が関与し、ステロイドホルモンの産生を低下させる。CS は細胞のステロイドホルモンの生産に関与する。

ステロイドホルモン産生細胞では CS が StAR 蛋白質の産生を調節することが考えられる。ステロイドホルモン産生細胞における StAR 蛋白質の発現レベルの調節機構を明らかにするために、CS による StAR プロモーター領域の解析をし、StAR 遺伝子発現の制御機構を明らかにする必要があると思われる。

### E. 結論

CS は StAR 蛋白質の mRNA 量を低下させて StAR 蛋白質を減少させ、細胞におけるステロイドホルモンの産生を調節する。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Ishihara, K., Warita, K., Tanida, T., Sugawara, T., Kitagawa, H., Hoshi, N. Does paternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affect the sex ratio of offspring? Journal of Veterinary

Medical Science, 69:347-352, 2007

2. Teruo Sugawara, Eiji Nomura and Nobuhiko Hoshi. Cholesterol sulphates affects production of steroid hormones by reducing StAR protein level in adrenocortical cells. J Endocrinology, 195: 451-458, 2007

3. Katsuhiko Warita, Kazutake Okamoto, Ken-ichiro Mutoh, Yoshihisa Hasegawa, Zhang-Peng Yue, Takanori Miki, Yoshiki Takeuchi, Hiroshi Kitagawa, Teruo Sugawara, Nobuhiko Hoshi. Activin A and eCG recover reproductive dysfunction induced by neonatal exposure to an estrogenic endocrine disruptor in adult male mice. Biol Reprod 78: 59-67, 2008

## 2. 学会発表

1. Teruo Sugawara, Nobuhiko Hoshi, Kenji Fujieda: Steroidogenic acute regulatory protein-binding protein is associated with apoptosis and controls steroidogenesis. (Poster) June 2-5, 2007, Toronto, Canada

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



## 続発性副腎皮質機能低下症患者の副腎髓質機能

笠山宗正、浅沼伸行、佐藤文三  
日本生命済生会附属日生病院総合内科

森田真也、大月道夫  
大阪大学大学院医学系研究科内分泌・代謝内科学

### 【研究要旨】

副腎皮質ホルモンが副腎髓質機能の維持に重要な役割を示す成績が報告されている。しかし、続発性副腎皮質機能低下症患者の副腎髓質機能については十分検討されていない。そこで、続発性副腎皮質機能低下症を含む下垂体機能低下症を合併する下垂体腺腫患者を対象に、インスリン低血糖刺激時のエピネフリン分泌とノルエピネフリン分泌について評価した。下垂体腺腫患者 23 例（非機能性腺腫およびプロラクチノーマ）のインスリン低血糖刺激時のエピネフリン分泌は、健常対象者に比して低下していた。インスリン低血糖刺激時の血漿エピネフリン頂値 $<400\text{pg/ml}$ をエピネフリン分泌低下症（重症型）と定義した場合、続発性副腎皮質機能低下症を合併する患者でその頻度が高かった。また、インスリン低血糖刺激時のコルチゾール頂値とエピネフリン頂値は正相関を示した。続発性甲状腺機能低下症・続発性性腺機能低下症・成長ホルモン分泌低下症・中枢性尿崩症の有無により、エピネフリン分泌低下症（重症型）を示す頻度は変わらなかった。以上の結果より、続発性副腎皮質機能低下症患者では副腎髓質機能低下を合併することが明らかとなった。

### A. 研究目的

21-ヒドロキシラーゼ欠損症の患者では副腎髓質機能の低下を認めることが報告され、正常な副腎髓質機能の維持に副腎髓質局所における高濃度のグルココルチコイドの必要性が示唆されるようになった（副腎皮質 - 髓質連関）。しかし、これら先天性副腎機能低下症の解析では、グルココルチコイドが、胎生期における副腎髓質の発生過程と発生後の過程のいずれにおいて重要であるかを明らかにす

ることは困難である。

原発性および続発性副腎皮質機能低下症の患者では、全身倦怠や食欲不振、消化器症状などの症状と共に、起立時のふらつき、脱水、低血圧、ショックなどの症状を呈することが知られている。これら循環器系の症状が、すべてグルココルチコイド欠乏やミネラルコルチコイド欠乏の症状として説明できるか否かは不明である。われわれは、副腎皮質機能低下症患者にみられるこれら循環器系の症状

に髄質ホルモンの低下が関与するのではないかと考えた。

続発性副腎皮質機能低下症患者の副腎髄質機能については、これまで十分検討されていなかった。そこで、続発性副腎皮質機能低下症を含むさまざまな下垂体機能低下症を合併する下垂体腺腫患者を対象として、インスリン低血糖刺激時の副腎髄質ホルモン分泌能を測定し、下垂体機能低下症（とりわけ続発性副腎皮質機能低下症）と副腎髄質機能との関連を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 対象患者

当院に入院した ACTH 産生腺腫、GH 産生腺腫、TSH 産生腺腫を除く下垂体腺腫患者のうち、本試験に同意が得られた患者 23 例（非機能性腺腫 18 例、プロラクチノーマ 5 例、男性/女性 7 例/16 例）を対象とした。試験実施時の平均年齢は 55 歳（20～76 歳）であり、BMI は  $24.3 \pm 2.9 \text{ kg/m}^2$  であった。

下垂体腺腫の診断は MRI の画像診断により、21 例においては経蝶頸骨洞手術または開頭手術により得られた組織診断により行った。試験実施時において 8 例が下垂体腺腫に対する手術の既往を有していた。

### 2. 方法

インスリン低血糖試験、LHRH 試験、TRH 試験における各種ホルモンの反応性、および各ホルモンの基礎値と 24 時間尿コルチゾール値の結果より、下垂体前葉機能の評価した。多尿（2.5-1/日以上）を示す症例では、水制限後の尿浸透圧値を

測定し尿崩症の診断を行った。

午前 8 時よりインスリン低血糖試験を実施した。試験 15 分前より臥位とし、速効型インスリン（0.1 unit/kg 体重）を静脈内注射した。注射前および注射後 15、30、60、90、120 分に採血し、エピネフリン、ノルエピネフリン、ACTH、GH、コルチゾールを測定した。

（倫理面への配慮）

対象患者に対しては本研究についての説明を行いその同意を得て実施した。

## C. 研究結果

### 1. 下垂体機能とホルモン補充療法

表 1 に対象患者の下垂体腺腫の最大径、低下ホルモン、ホルモン補充療法を示す。腫瘍の最大径は 11mm～70mm であった。23 例中 22 例が下垂体前葉または後葉機能低下症と診断された。このうち 4 例が汎下垂体前葉機能低下症と診断され、3 例が中枢性尿崩症と診断された。プロラクチノーマ患者は 5 例全例において性腺機能低下症を示していた。試験実施時には 23 例中 7 例がホルモン補充療法を受けており、このうち 3 例がヒドロコチゾン（10～20mg 朝食後）の、3 例が L-サイロキシン（25～75  $\mu\text{g}$  朝食後）の、3 例がデスモプレシンの投与を受けていた。プロラクチノーマ患者のいずれもがドーパミン作動薬による治療を受けていなかった。

### 2. インスリン低血糖刺激に対するカテコラミンの反応

インスリン低血糖試験時の血漿エピネフリンとノルエピネフリンの値を図 1 に示した。血漿エピネフリンの基礎値は健康対象者の基準値（ $<170 \text{ pg/ml}$ ）内であっ

たが、インスリン低血糖刺激に対する反応は、全例において低下していた。

一方、血漿ノルエピネフリンの基礎値は、23例中5例において基準値(150-570pg/ml)より低値であったが、他の18例では基準値内であった。インスリン低血糖時のノルエピネフリンの反応は正常例・低下例さまざまであった。

### 3. インスリン低血糖刺激に対するエピネフリン反応と下垂体機能低下症との関係

インスリン低血糖試験時のエピネフリン頂値 $<400\text{pg/ml}$ をエピネフリン分泌低下症(重症型)と定義し、下垂体機能低下症との関連について検討した。

続発性副腎皮質機能低下症患者では、副腎皮質機能低下症を有さない患者に比べてエピネフリン分泌低下症(重症型)と判定される患者が多かった(図2、表2)。一方、続発性甲状腺機能低下症、続発性性腺機能低下症、成長ホルモン分泌低下症、中枢性尿崩症を有する患者では、エピネフリン分泌低下症(重症型)と判定される頻度は、これら下垂体機能低下症のない患者と同等であった。

インスリン低血糖試験時のエピネフリン頂値とコルチゾール頂値は正相関を示した( $R=0.506$ ,  $P=0.014$ : 図3)。一方、エピネフリン頂値と成長ホルモン頂値( $R=0.072$ ,  $P=0.745$ )、血糖底値( $R=-0.147$ ,  $P=0.503$ )には相関を認めなかった。

### D. 考察

生体は、低血糖ストレスに対してグルカゴン、カテコラミン、成長ホルモン、

コルチゾールの各ホルモン分泌を促進し防御反応を示す。これらホルモンのうち前2者は低血糖ストレスに対する急性反応に主要な役割を果たしており、低血糖時の交感神経刺激症状は増加したカテコラミンによるものと考えられている。われわれは、下垂体機能低下症患者においてインスリン低血糖試験時の交感神経症状を発現する患者が少ないことに着目し、下垂体機能と低血糖ストレスに対するカテコラミン反応との関連について検討を行った。

その結果、下垂体腺腫患者23例全例において、インスリン低血糖刺激に対するエピネフリン分泌低下を認めることが判明した。エピネフリン分泌低下の程度は、続発性副腎皮質機能低下と密接に関連することが明らかとなった。一方、エピネフリン分泌低下は、他の下垂体ホルモンの低下とは関連を認めなかった。

続発性副腎皮質機能低下症を合併する患者7例のうち3例はヒドロコチゾンの補充療法を受けていたが、エピネフリン分泌低下は補充療法の有無とは無関係に認められたことから、ヒドロコチゾン補充療法によりエピネフリン分泌低下が改善することはないと考えられた。

副腎髄質のクロマフィン細胞の生存・維持とエピネフリン分泌能には、グルココルチコイドが重要な役割を果たすことが示されている。すでに、先天性疾患である21-ヒドロキシラーゼ欠損症やグルココルチコイド単独欠損症の患者では、運動・立位・寒冷刺激に対するエピネフリンの反応が低下していることが報告されている。これら先天性の副腎皮質機能

低下症の検討では、グルココルチコイドが副腎髄質の発生過程に重要であるのか発生後の過程に重要であるのかを明らかにすることはできなかった。今回の検討により、後天性の副腎皮質機能低下症においても副腎髄質機能低下を示すことが明らかとなった。

低血糖刺激時のエピネフリン分泌の低下に比して、対象患者のノルエピネフリン分泌低下は顕著でなかった。21-ヒドロキシラーゼ欠損症やグルココルチコイド単独欠損症の患者においてもノルエピネフリン分泌はほぼ正常と報告されている。交換神経節からのノルエピネフリン分泌能は、副腎髄質機能低下を代償するための生体の機能として保持されているのかもしれない。

現在のところ、「副腎髄質機能低下症」の疾患概念は提唱されていない。しかし、副腎皮質機能低下症患者において認められる起立時のふらつきや低血圧、ショックなどの循環器系の症状の少なくとも一部は、副腎皮質機能低下症に合併した「副腎髄質機能低下」によるものであるかもしれない。

#### E. 結論

続発性副腎皮質機能低下症を合併する下垂体腺腫患者では、インスリン低血糖に対するエピネフリン反応の著明な低下を認めた。副腎皮質機能低下症患者では、インスリン低血糖に対する防御反応が低下していると考えられる。また、副腎皮質機能低下症でみられる症状の少なくとも一部は、副腎髄質機能低下によるものである可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Otsuki M, Kasayama S, Morita S, Asanuma N, Saito H, Mukai M, and Koga M: Menopause, but not age, is an independent risk for fasting plasma glucose levels in non-diabetic women. *Menopause*, 14: 404-407, 2007.
- 2) Kasayama S, Morita S, Otsuki M, Asanuma N, Saito H, Mukai M, and Koga M: Independent association of insulin-like growth factor-I with dehydroepiandrosterone sulphate in women in middle adulthood. *Clin. Endocrinol.*, 66: 797-802, 2007.
- 3) Koga M, Otsuki M, Matsumoto M, Saito H, Mukai M, and Kasayama S: Negative association of obesity and its related chronic inflammation with serum glycated albumin but not glycated hemoglobin levels. *Clin. Chim. Acta*, 378: 48-52, 2007.
- 4) Koga M, Morita S, Saito H, Mukai M, and Kasayama S: Association of erythrocyte indices with haemoglobin A1C level in pre-menopausal women. *Diabet. Med.*, 24: 843-847, 2007.
- 5) Yamamoto H, Kurebayashi S, Kouhara H, Yoshiuchi K, Matsuhisa M, Yamasaki Y, and Kasayama S: Impacts of long-term treatments with testosterone replacement and pioglitazone on glucose and lipid metabolism in male patients with Werner's syndrome. *Clin. Chim. Acta*, 379: 167-170, 2007.
- 6) Morita, S., Otsuki, M., Izumi, M.,