

原発性アルドステロン症における糖代謝異常

武田仁勇、米田 隆

金沢大学大学院臓器機能制御学(内分泌代謝内科)

【緒言】

1964年にConnら(1)が原発性アルドステロン症(PA)は耐糖能異常(IGT)が多いと報告して以来、報告者により異なるが10%-50%の割合で耐糖能異常または糖尿病を合併することが明らかにされている。PAにおけるIGTの成因の一つに低カリウム血症が上げられるが、低カリウム血症はPA患者の約20%にしか認められないため、カリウムを介さないアルドステロン(aldo)の血糖調節に対する何らかの作用が想定される(2)。我々は正カリウム血性PAにおいてスピロノラクトンを投与しその前後で糖代謝異常及びインスリン抵抗性を評価した。

【対象と方法】

正カリウム血症性PA患者25例(特発性アルドステロン症(IHA)21例,アルドステロン産生腺腫(APA)4例)を対象とした。Ca拮抗薬にて血圧のコントロールを計った後、スピロノラクトン25mgを3ヶ月投与しその前後で空腹時血糖(FBS)、インスリン(F-IRI),HOMA-Rを検討した。また75gブドウ糖負荷試験を行い Σ BS, Σ IRIを計算した。なおPAの診断は高血圧症患者に対し降圧薬非服用下で血漿アルドステロン(PAC)(pg/mL)/PRAを測定し200以上を示した症例にカプトプリル

負荷及びフロセミド立位負荷試験を行い、厚労省の診断基準に従い診断した。APAは副腎静脈サンプリングにより偏側の過剰産生を示した症例に対し、本試験終了後内視鏡的副腎摘出術を行い、組織学的に診断した。

【結果】

表1に年齢、血圧、血清カリウム値、腎機能、PAC、PRA、空腹時血糖、IRI、HbA1c、HOMA-Rの結果を示す。年齢、HOMA-RはIHAで高値であり、PACはAPAで高値であった。スピロノラクトン投与前後で血圧、血清カリウム値に有意の変動を認めなかった(図1)。空腹時血糖はスピロノラクトン投与前後で差がなかったが、IRI及びHOMA-Rはスピロノラクトン投与により有意に低下した(図2)($p < 0.05$)。75gブドウ糖負荷試験時の Σ BS, Σ IRIの結果を図3に示す。スピロノラクトン投与により両指標が有意に低下した($p < 0.05$)

【考案】

今回の結果からPAにおいて血圧及びカリウムを介さないaldoの糖代謝に対する作用が臨床的に明らかにされた。それではaldoと糖尿病にはどのような関係が存在するのであろうか。Campionら

(3)はaldoが脂肪細胞のインスリンレセプターに作用し、遺伝子発現を抑制し、インスリンとの結合能力を低下させたと報告している。aldoはカリウムを介して膵臓からのインスリン分泌に関与していることも考えられるが、PA患者においてカリウムを補充することによりインスリン抵抗性が改善されるかあきらかではない。aldoは心血管系において線維化を促進し臓器障害をもたらすが(4)、膵臓や肝臓、骨格筋組織においても線維化を促進しインスリン抵抗性や耐糖能異常を引き起こしている可能性も考えられる(2)。臨床的にもPAにおいてaldoと膵β細胞機能が負の相関を示したという報告(5)がなされている。PAでは耐糖能異常だけでなく脂質代謝異常や内臓脂肪増加などメタボリックシンドロームの合併も多いことがFalloら(6)により報告され、脂肪組織におけるaldoの作用も重要であると考えられる。我々は脂肪組織にはミネラルコルチコイドレセプターが存在することを前年の班会議で報告した。Krausら(7)はaldoは脂肪細胞においてuncoupling protein-1を抑制しインスリンによる糖の取り込みを抑制したと報告している。またHitomiら(8)は、平滑筋細胞を用いた検討であるが、aldoによりinsulin receptor substrate-1が抑制的に調節され、インスリンによる糖の取り込みが抑制されたと報告している。Aldoの心血管組織における臓器傷害は確立された概念であるが、臓器に対する直接作用以外にaldoの脂肪組織からのアディポサイトカインの分泌やインスリン抵抗性なども関与していることが考えられる。

【結語】

PAにおいてカリウム及び血圧を介さないIGTの存在が示唆された。アルドステロンの脂肪細胞における直接作用が想定される。

【文献】

- (1) Conn JW, Knopf RF, Nesbit RM. Clinical characteristics of primary aldosteronism from an analysis of 145 cases. *Am J Surg* 197; 159-172, 1964.
- (2) Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S et al. The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *TRENDS in Endocrinol Metab* 16:120-126, 2005.
- (3) Campión B, Maestro S, Molero N et al. Aldosterone impairs insulin responsiveness in U-937 human promonocytic cells via the downregulation of its own receptor. *Cell Biochem Funct.* 20: 237-245, 2002.
- (4) Takeda Y. Pleiotropic actions of aldosterone and the effects of eplerenone, a selective mineralocorticoid receptor antagonist. *Hypertens Res* 27:781-789, 2004.
- (5) Mosso LM, Carvajal CA, Maiz A et al. A possible association between primary aldosteronism and a lower β-cell function. *J Hypertens* 25: 2125-2130, 2007
- (6) Fallo F, Veglio F, Bertello C et al. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*

91: 454-459, 2006.

(7) Kraus D, Jäger J, Meier B et al. Aldosterone Inhibits Uncoupling Protein-1, Induces Insulin Resistance, and Stimulates Proinflammatory Adipokines in Adipocytes. *Horm Metab Res* 37:455-459, 2005.

(8) Hitomi H, Kiyomoto H, Nishiyama A et al. Aldosterone suppresses insulin signaling via the downregulation of insulin receptor substrate-1 in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 50:750-5. 2007.

【研究発表】

1. 武田仁勇、古くて新しい薬、抗アルドステロン薬. 金沢大学十全医学会雑誌 116: 93-97, 2007

2. 武田仁勇、血管平滑筋障害とアルドステロン. 医学のあゆみ 221: 743-746, 2007

3. 武田仁勇、食塩とアルドステロン. 血圧 14: 975-979, 2007

4. Takeda Y, Zhu A, Yoneda T, Usukura M, Takata H, Yamagishi M. Effects of aldosterone and angiotensin II receptor blockade on cardiac angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme 2 expression in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Am J Hypertens* 20: 1119-1124, 2007

5. Yoneda T, Takeda Y, Usukura M, Oda N, Takata H, Yamamoto Y, Karashima S, Yanazaki M. Aldosterone breakthrough during angiotensin II receptor blockade in

hypertensive patients with diabetes mellitus. *Am J Hypertens* 20: 1329-1333, 2007.

表 1. 臨床データ

	ALL	APA	IHA
No (men/women)	25(11/14)	4(1/3)	21(10/11)
Age (y)	59 ± 10	45 ± 9	63 ± 10 *
Systolic BP (mmHg)	126 ± 6	134 ± 5	124 ± 4
Diastolic BP (mmHg)	83 ± 8	83 ± 8	70 ± 8*
s-K (mEq/L)	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.4	4.2 ± 0.3
BUN (mg/dL)	16 ± 2.8	16 ± 2.1	17 ± 2.7
s-Cr (mg/dL)	0.8 ± 0.7	0.8 ± 0.3	0.9 ± 0.3
PAC (pg/mL)	143 ± 20	169 ± 18	139 ± 18*
PRA (ng/mL·h)	<0.2	<0.2	<0.2
FPG (mg/dL)	109 ± 14	109 ± 11	110 ± 9
F-IRI (m U/L)	9.2 ± 3.5	6.8 ± 2.2	10.0 ± 3.5
HbA _{1c} (%)	5.9 ± 0.8	6.0 ± 0.5	5.9 ± 0.7
HOMA-R	2.8 ± 1.0	2.2 ± 0.4	2.9 ± 1.0*

All values are mean ±SD. APA, aldosterone-producing adenoma; IHA, idiopathic hyperaldosteronism

BP, blood pressure; s-K, serum potassium; s-Cr, serum creatinine; PAC, plasma aldosterone concentration; PRA, plasma renin activity; FPG, fasting plasma glucose;

*:p<0.05 vs APA.

(図) 2/4 枚

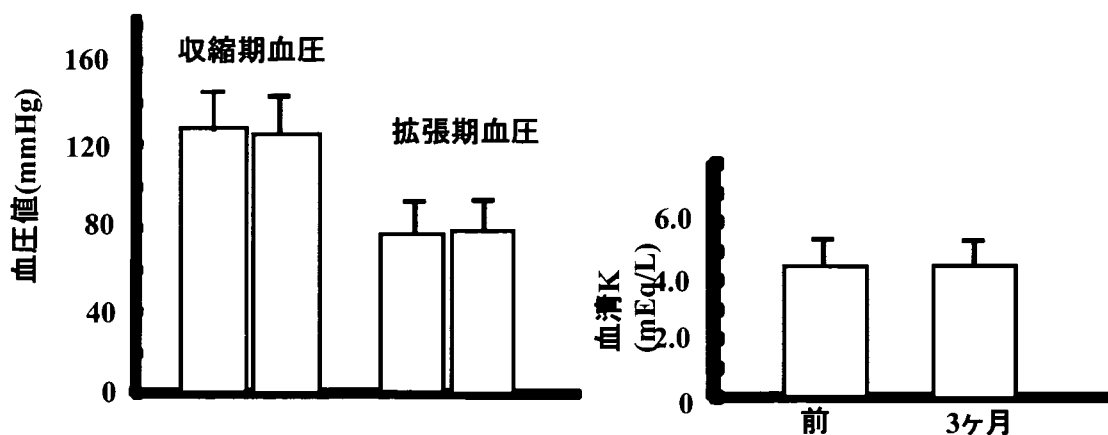


図1. スピロノラクトン投与前及び投与後の血圧、血清カリウム値の変動を示す。スピロノラクトン投与により有意の変動を示さなかった。

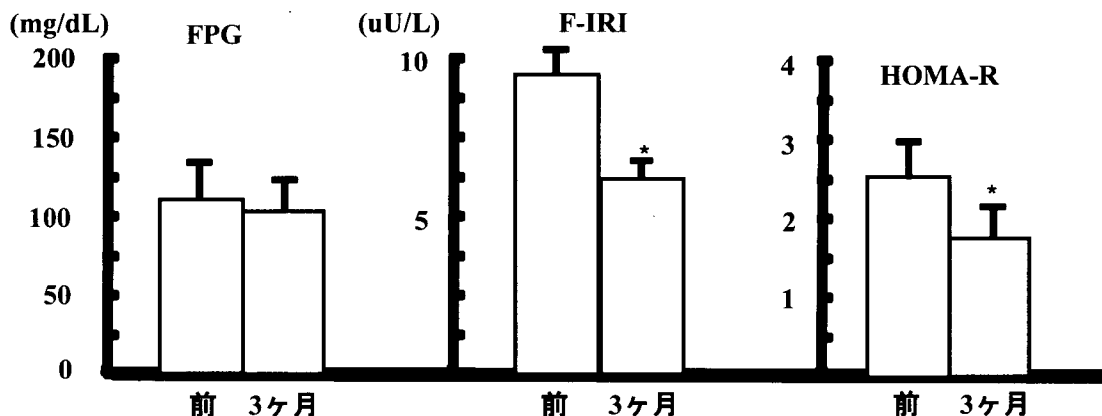


図2. スピロノラクトン投与前及び投与後の空腹時血糖(FPG)、空腹時インスリン(F-IRI)、HOMA-Rの変化を示す。スピロノラクトン投与によりF-IRI及びHOMA-Rは有意に低下した(*:p<0.05 vs 前)。

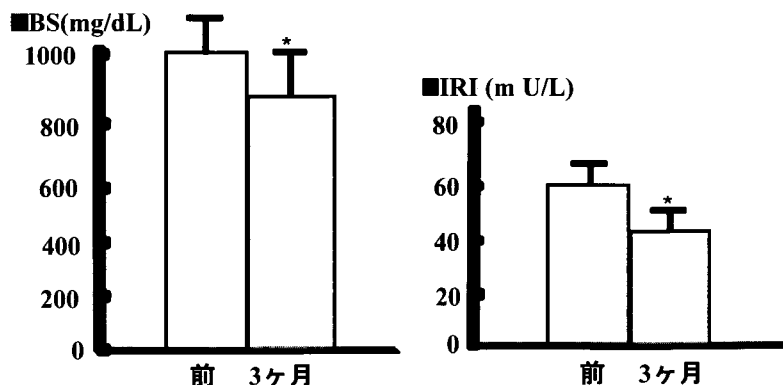


図3. スピロノラクトン投与前及び投与後の75gブドウ糖負荷時の■血糖(BS)及び■IRIの変化を示す。スピロノラクトン投与により■BS及び■IRIは有意に低下した(*:p<0.05 vs 前)。

アルドステロン作用の抑制因子としての NF- κ B の役割

柴田洋孝

慶應義塾大学医学部内科

【研究要旨】

アルドステロンの作用はミネラルコルチコイド受容体 (MR) を介した遺伝子転写調節により発揮され、MR に時間的、空間的に動員される転写共役因子が鍵となる。本年度は、MR 結合蛋白をヒト心臓 cDNA ライブラリーから酵母 two-hybrid 法によりスクリーニングした結果、アルドステロンによる MR 転写活性化を抑制する新規コリプレッサーとして NF- κ B を同定した。NF- κ B は、MR の N 末端の AF-1 ドメインに結合して、MR の N 末端と C 末端の結合を阻害することにより、内因性 MR 標的遺伝子の転写を抑制する。生体レベルでは、NF- κ B は、マウス腎臓の尿細管細胞の核に MR と共存を認め、アルドステロン処置により NF- κ B 自体の発現量も増加することを見いだした。以上より、NF- κ B はアルドステロン作用を抑制する新規コリプレッサーとして機能する因子であり、病態生理学的役割が今後解明する予定である

A. 研究目的

アルドステロンは、レニン-アンジオテンシン系およびカリウムにより副腎皮質での合成が調節されるミネラルコルチコイドであり、その作用は核内受容体ミネラルコルチコイド受容体 (MR, NR3C2) を介する。アルドステロン作用は、MR に多様な転写共役因子が時間的および空間的に結合することにより、ジェネティックおよびエピジェネティックな調節を受けているが、既報のステロイド受容体の転写共役因子の中では限られたものとの結合しか認めておらず、詳細な分子機構が不明である。昨年度の本研究班分担研究において、MR にタンパク質の SUMO 化修飾 E2 酵素 Ubc9 が特異的に結合して、アルドステロン作用を二元的に調節することを報告した。そこで、本年はヒト心臓 cDNA ライブラリーより

MR 特異的な結合蛋白のスクリーニングを行い、NF- κ B を同定しその機能解析を行った。その結果、NF- κ B はアルドステロン依存性の MR 作用を抑制する新規コリプレッサーであることが明らかとなった。

B. 研究方法

酵母 two-hybrid 法、免役共沈降法、Western blot、RNA 干渉法、クロマチン免疫沈降法、免疫組織化学、real time RT-PCR 法などは既報の方法で行った。

C. 研究結果

1. NF- κ B と MR の蛋白-蛋白相互作用
NF- κ B と MR の蛋白-蛋白相互作用を COS-7 細胞を用いた mammalian two-hybrid assay にて検討した結果、Gal4-NF- κ B、VP16-MR(1-597) 単独の時

と比べて、両者を共発現させた時に有意なレポーター活性の上昇を認めたことから、NF-YC はMR のN末端AF-1ドメインに結合することが示された(図1左)。さらに、全長のMRとNF-YCの結合を免疫共沈降法で検討した結果、有意な結合を認めた(図1右)。

2. NF-YCのMR転写活性に及ぼす影響

COS-7細胞を用いたtransient transfection assayを行うと、 10^{-8} M aldosteroneによるMR依存性の転写活性化は、NF-YCの過剰発現により用量依存性に抑制され、 10^{-7} M cortisol存在下では統計的に有意な抑制を示さなかった(図2左)。さらに、aldosteroneの濃度依存性を検討した結果、 10^{-9} M~ 10^{-7} Mのaldosterone存在下において、NF-YCはMR依存性転写活性を有意に抑制した(図2右)。

さらに、内因性MR標的遺伝子の発現への影響を検討するために、siRNAを用いて内因性NF-YCの発現量を減少させたところ、siRNA-Controlの導入時と比べて、 10^{-8} M aldosteroneにより誘導されたSgkおよびENaC mRNAレベルはさらに増加を認めた。したがって、内因性のNF-YCはMR標的遺伝子の転写抑制にはたらいっていることが示された(図3)。

D. 考察

本研究では、MRのアルドステロン依存性の転写コリプレッサーとしてNF-YCを同定した。NF-YCはMRのN末端のAF-1ドメインに結合して、リガンド依存性コリプレッサーとして機能することがレポーターアッセイおよび内因性MR標的遺伝子のreal time RT-PCR解析により証明された。

今回の検討では、cortisol存在下では統計的には有意なMR転写活性の抑制を示さなかったことから、aldosteroneによるMR AF-2活性に対

して特異的に作用することが示唆された。

高アルドステロン血症や食塩負荷によるMRの活性化が、脳卒中、心肥大などの心血管リスクとなることが明らかとなっており、スピロラクトンやエプレレノンなどのMR拮抗薬の有用性が報告されている中で、今後はリガンド以外によるMR活性化に関与する転写共役因子を明らかにしていくことにより、新しい治療法の確立が期待される。

E. 結論

アルドステロン作用を抑制するMRの新規コリプレッサーとしてNF-YCを同定した。高血圧などの病態におけるNF-YCの役割を今後明らかにすることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

論文

1. K. Yokota, H. Shibata, I. Kurihara, S. Kobayashi, N. Suda, A. Murai-Takeda, I. Saito, H. Kitagawa, S. Kato, T. Saruta, H. Itoh. Coactivation of the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by Ubc9. *J Biol Chem* 282:1998-2010, 2007.
2. P. Ye, B. Mariniello, F. Mantero, H. Shibata, W. E. Rainey. G protein-coupled receptors (GPCR) in aldosterone-producing adenomas (APA): a potential cause of hyperaldosteronism. *J. Endocrinol.* 195:39-48, 2007.
3. I. Saito, M. Mori, H. Shibata, H. Hirose, M. Tsujioka, H. Kawabe. Prevalence of metabolic syndrome in young men in Japan. *J Atheroscler Thromb* 14:27-30, 2007.
4. 柴田洋孝、伊藤 裕. メタボリックシンドロームとアルドステロン. *医学のあゆみ* 221(9): 747-751, 2007.

5. 柴田洋孝. ミネラルコルチコイド受容体によるアルドステロン作用調節—コアクチベーター、コリプレッサーの重要性. 医学のあゆみ 221(9): 703-708, 2007
6. 柴田洋孝、太田敦美、村田 満、伊藤 裕、河邊博史、齊藤郁夫. 高血圧症およびメタボリックシンドロームにおけるアルドステロンの役割. 慶應保健研究、25(1):31-35, 2007
7. 柴田洋孝. 薬剤誘発性高血圧. 血圧、14(7): 53-57, 2007.
8. 武田彩乃、柴田洋孝、須田徳子、横田健一、林 晃一、中川 健、村井 勝、本間桂子、笹野公伸、伊藤 裕. 腹腔鏡下片側副腎摘出術により改善を認めた ACTH 非依存性大結節性副腎皮質過形成(AIMAH)によるクッシング症候群の一例. 日本内分泌学会雑誌 83 (Suppl.): 55-57, 2007.
9. 須田徳子、武田彩乃、柴田洋孝、横田健一、篠村裕之、及川洋一、島田 朗、林 晃一、林 松彦、伊藤 裕. 多腺性自己免疫症候群 I 型に亜急性甲状腺炎を合併した一例. 日本内分泌学会雑誌 83(Suppl): 184-186, 2007.
10. 柴田洋孝、齊藤郁夫. 薬剤誘発性高血圧 Heart View, 11(4):62-65, 2007.
11. 柴田洋孝. 婦人科医に求められる高血圧のケア. 臨床婦人科産科, 61(7): 929-933, 2007
12. 柴田洋孝、伊藤 裕. 偽アルドステロン症の重症副作用への疾患別対応. 日本内科学会雑誌 96(4): 805-810, 2007.
13. 柴田洋孝. 画像検査からの診断へのアプローチ 副腎 診断と治療 95(2):258-264, 2007
14. 須田徳子、柴田洋孝、横田健一、武田彩乃、小林佐紀子、小西孝之助、中川健、村井 勝、本間桂子、鈴木 貴、笹野公伸、猿田享男、伊藤 裕. 術後にアルドステロン分泌過剰が顕在化したクッシング症候群の一例 ホルモンと臨床 2007 春季増刊: 137-143, 2007.

著書

1. 柴田洋孝. 副腎癌 内科学 (朝倉書店)、p.1411-1413, 2007
2. 柴田洋孝. 副腎偶発腫瘍 内科学 (朝倉書店)、p.1413-1415, 2007
3. 柴田洋孝. クッシング症候群 内分泌代謝専門医ガイドブック、診断と治療社、 p.164-168, 2007.
4. 横田健一、柴田洋孝、伊藤 裕. アジソン病 内分泌代謝専門医ガイドブック、診断と治療社、 p.177-181, 2007.
5. 柴田洋孝. アジソン病、急性副腎不全 (副腎クリーゼ) 今日の治療指針 2007 p.548-549, 2007

G. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|------|
| 1. 特許取得 | 特になし |
| 2. 実用新案登録 | 特になし |
| 3. その他 | 特になし |

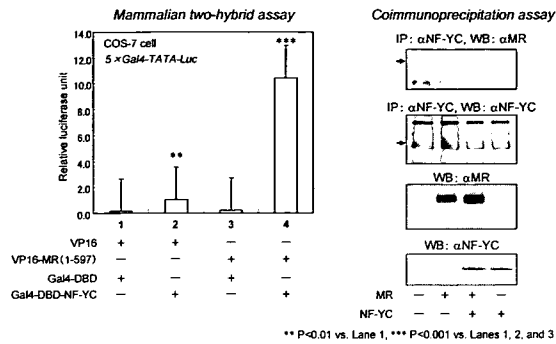


図1 MRとNF-YCの蛋白-蛋白相互作用
 (左図) Mammalian two-hybrid assay においてMR (1-597)とNF-YCが特異的に結合した。
 (右図) 免疫共沈降法において、全長MRとNF-YCは特異的に結合を認めた。

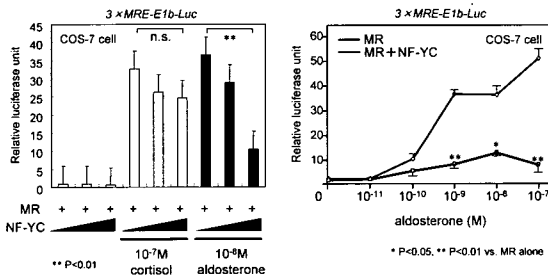


図2 MR転写活性に及ぼすNF-YCの役割
 (左図) 10⁻⁸M aldosteroneによるレポーター活性化に対して、NF-YCの過剰発現は用量依存性に抑制したが、10⁻⁷M cortisolの時は統計的には有意ではなかった。
 (右図) 10⁻⁹M~10⁻⁷M aldosteroneにおいて、MR転写活性化をNF-YCは抑制した。

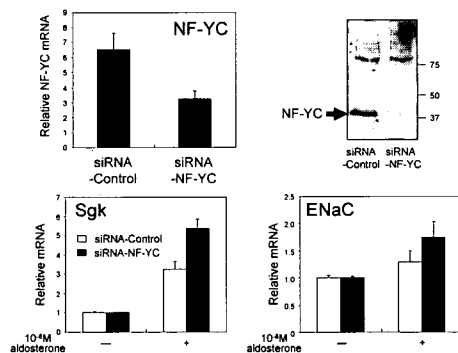


図3 内因性NF-YCによるMR標的遺伝子発現量への役割
 siRNA-NF-YCの導入により、NF-YC mRNAおよび蛋白レベルを減少させた時(図上段)、10⁻⁸M aldosteroneにより誘導されたSgk mRNAおよびENaC mRNAレベルはさらに増強された

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は核内受容体であるグルココルチコイドレセプター (GR) を介して生理作用を発揮する。我々は GR による炎症反応制御に着目して、酸化還元反応による GR の転写制御メカニズムの解析を行い、受容体の分解制御による転写活性制御メカニズムの存在を明らかにすることができた。今後は、更に炎症制御に関与する GR 複合体の精製同定に着手する予定である。

A. 研究目的

グルココルチコイドは核内受容体の一つであるグルココルチコイドレセプター (GR) を介してその生理機能が発揮されるが、その制御メカニズムはほとんど明らかにされていない。そこで、GR の転写制御メカニズムを解明することを試みた。

その中でも本年度は、炎症制御に関与するシグナルである酸化還元反応に着目して解析を行った。

B. 研究方法

GR には GRE (consensus GRE 系)、AP-1RE (AP1 転写系)、NF- κ BRE (NF- κ B 転写系) という 3 つの主要な転写活性制御系が存在する。そのそれぞれを使用したレポーターアッセイを行い、酸化還元刺激によるリガンド依存性の GR 転写制御の変動を明らかにする。次に、酸化、還元制御による転写制御メカニズムを明らかにし、転写共役因子のプロモーター上での挙動

との関連も同時に明らかにする。

(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) 酸化還元刺激による GR 転写活性の変化の確認

酸化刺激 (H₂O₂ 添加) と還元刺激 (CoCl₂ 添加) による GR の転写活性の変動を明らかにした。その結果、酸化刺激により GR の転写活性は低下し、還元刺激により活性は上昇することがあきらかになった (AP-1, NF- κ B に対しては GR の転写活性は抑制の方向であり、その二つのレポーター上では抑制の強さを検討した。(図 1))

2) 酸化刺激による GR 転写抑制メカニズムの確認

酸化刺激による GR の挙動を確認した結果、酸化刺激により核内 GR の量が減少することがあきらかになった。この変化は GR の点突然変異体 (C481S) を使用することにより確認することができた (図 2)。

3) 還元刺激による GR 転写活性メカニズムの解明

還元刺激による GR の挙動を確認した結果、GR の核外移行の変化がないにも関わらず、GR タンパク量のリガンド依存性の低下が見られなくなることが明らかになった。この変化は MG132 投与により改善することから還元刺激による GR タンパク量の安定はタンパク分解阻害による可能性が高いと考えら得た (図 3)。さらに、この GR のタンパク安定によってプロモーター上における GR の転写共役因子群の安定化も同時に明らかにすることができた (図 4)。

D. 考察

GR の転写制御メカニズムには他の核内受容体に比べて驚くほど不明な点が多い。その理由として核内 GR が非常に短時間で分解されること挙げられる。今回我々は、その GR タンパクの分解制御が GR の転写活性に関与することを明らかにできたことからこの分解を停止させることにより、未知の酸化還元に起因する転写共役因子の同定を可能にできる糸口をつかんだと考えられる。さらに今後は未知の転写修飾因子を同定することにより、様々な GR の生理作用が明らかになるものと考えられる。

E. 結論

GR の転写活性は酸化還元刺激によって制御されており、酸化刺激で低下し、還元刺激で上昇することが明らかになった。さらにその作用機序としては酸化刺激では核内 GR の核外への移行促進が、還元刺激においては GR タンパクの核内分解の抑制が存在することが明らかになり、核内 GR の量が転写活性制御を決める一つの重要なパラメーターであることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kitagawa, H., Yamaoka, I., Akimoto, C., Kase, I., Mezaki, Y., Shimizu, T. and Kato, S. A reduction state potentiates the glucocorticoid response through receptor protein stabilization. *Genes to Cells* 12, 1281-1287, 2007.
2. Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Ohtake, F., Igarashi, M., Takeyama, K., Nakamura, T., Mezaki, Y., Takezawa, S., Yogiashi, Y., Kitagawa, H., Yamada, G., Takada, S., Minami, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K. and Kato, S. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signaling suppresses PPAR- γ transactivation. *Nat. Cell Biol.* 9, 1273-1285, 2007.
3. Igarashi, M., Yogiashi, Y., Mihara, M., Takada, I., Kitagawa, H. and Kato, S. Vitamin K induces osteoblast differentiation through PXR-mediated transcriptional control of the Msx2

- gene. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7947–7954, 2007.
4. Kitagawa, H., Ray, W. J., Glantschnig, H., Nantermet, P. V., Yu, Y., Leu, C. T., Harada, S. I., Kato, S. and Freedman, L. P. A regulatory circuit mediating convergence between *nurrl* transcriptional regulation and Wnt Signaling. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7486–7496, 2007.
 5. Nakamura, T., Imai, Y., Matsumoto, T., Sato, S., Takeuchi, K., Igarash, K., Harada, Y., Azuma, Y., Krust, A., Yamamoto, Y., Nishina, H., Takeda, S., Takayanagi, H., Metzger, D., Kanno, J., Takaoka, K., Martin, T. J., Chambon, P. and Kato, S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor α and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 130, 811–823, 2007.
 6. Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., Fujii-Kuriyama, Y. and Kato, S. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562–566, 2007.
 7. 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. and 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.* 9, 604–611, 2007.
 8. 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. and Kato, S. A cell cycle-dependent co-repressor for photoreceptor cell-specific nuclear receptor function. *EMBO J.* 26, 764–774, 2007.
 9. Miyamoto, J., Matsumoto, T., Shiina, H., Inoue, K., Takada, I., Ito, S., Itoh, J., Minematsu, T., Sato, T., Yanase, T., Nawata, H., Osamura, R. Y. and Kato, S. Pituitary function of androgen receptor constitutes a glucocorticoid production circuit. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4807–4814, 2007.
 10. Kim, M.-S., Fujiki, R., Kitagawa, H. and Kato, S. $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced DNA methylation suppresses the human CYP27B1 gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 265–266, 168–173, 2007.
 11. Kim, M.-S., Fujiki, R., Murayama, A., Kitagawa, H., Yamamoto, K., Yamamoto, Y., Mihara, M., Takeyama, K. and 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.
 12. Yamaoka, K., Shindo, M., Iwasaki,

- K., Yamaoka, I., Yamamoto, Y., Kitagawa, H. and Kato, S. Multiple co-activator complexes support ligand-induced transactivation function of VDR. *Arch. Biochem. Biophys.* 460, 166-171, 2007.
13. Memezawa, A., Takada, I., Takeyama, K., Igarashi, M., Ito, S., Aiba, S., Kato, S. and Kouzmenko, A. P. Id2 Gene targeted crosstalk between Wnt and retinoid signaling regulates proliferation in human keratinocytes. *Oncogene* 26, 5038-5045, 2007.
14. Kimura, S., Matsumoto, T., Matsuyama, R., Shiina, H., Sato, T., Takeyama, K. and Kato, S. Androgen receptor function in folliculogenesis and its clinical implication in premature ovarian failure. *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 183-189, 2007.
15. Kato, S., Fujiki, R., Kim, M.-S. and Kitagawa, H. Ligand-induced transrepressive function of VDR requires a chromatin remodeling complex, WINAC. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 103, 372-380, 2007.
16. Matsumoto, T., Kawano, H., Shiina, H., Sato, T. and Kato, S. Androgen receptor functions in male and female reproduction. *Reproductive Med. Biol.* 6, 11-17, 2007.
17. Fuse, H., Korenaga, S., Sakari, M., Hiyama, T., Ito, T., Kimura, K. and Kato, S. Non-steroidal antiandrogens act as AF-1 agonists under conditions of high androgen-receptor expression. *Prostate.* 67, 630-637, 2007.
18. Sato, S., Kojima, M., Hanada, R., Kimura, A. I., Abe, T., Matsumoto, T., Iwasaki, M., Inose, H., Ida, T., Mieda, M., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Fujita, T., Kato, S., Kangawa, K., Shinomiya, K. and Takeda, S. Central control of bone remodelling by Neuromedin U: a mediator of the leptin-dependent regulation of bone formation. *Nat. Med.* 13, 1234-1240, 2007.
19. Aihara, K., Azuma, H., Akaike, M., Ikeda, Y., Sata, M., Takamori, N., Yagi, S., Iwase, T., Sumitomo, Y., Kawano, H., Yamada, T., Fukuda, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Sato, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Yoshimura, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Oomizu, A., Tsukada, M., Hayashi, H., Sudo, T., Kato, S. and Matsumoto, T. Strain-dependent embryonic lethality and exaggerated vascular remodeling in heparin cofactor II-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 117, 1514-1526, 2007.
20. Yokota, K., Shibata, H., Kurihara, I., Kobayashi, S., Suda, N., Murai-Takeda, A., Saito, I., Kitagawa, H., Kato, S., Saruta, T. and Itoh, H. Coactivation of the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by Ubc9. *J. Biol. Chem.* 282, 1998-2010, 2007.
21. Mezaki, Y., Yoshikawa, K.,

Yamaguchi, N., Miura, M., Imai, K., Kato, S. and Senoo, H. Rat hepatic stellate cells acquire retinoid responsiveness after activation in vitro by post-transcriptional regulation of retinoic acid receptor alpha gene expression. Arch. Biochem. Biophys. 465, 370-379, 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

図1：酸化還元反応によるGR転写活性の変動

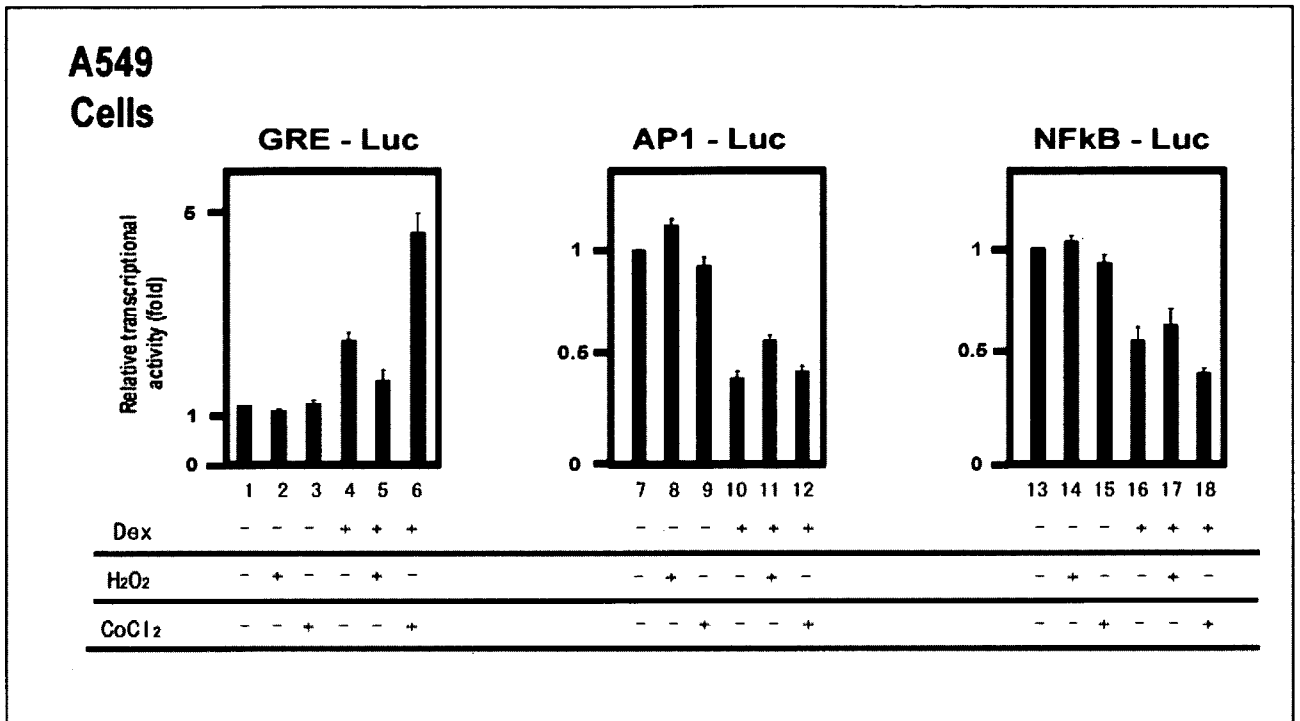
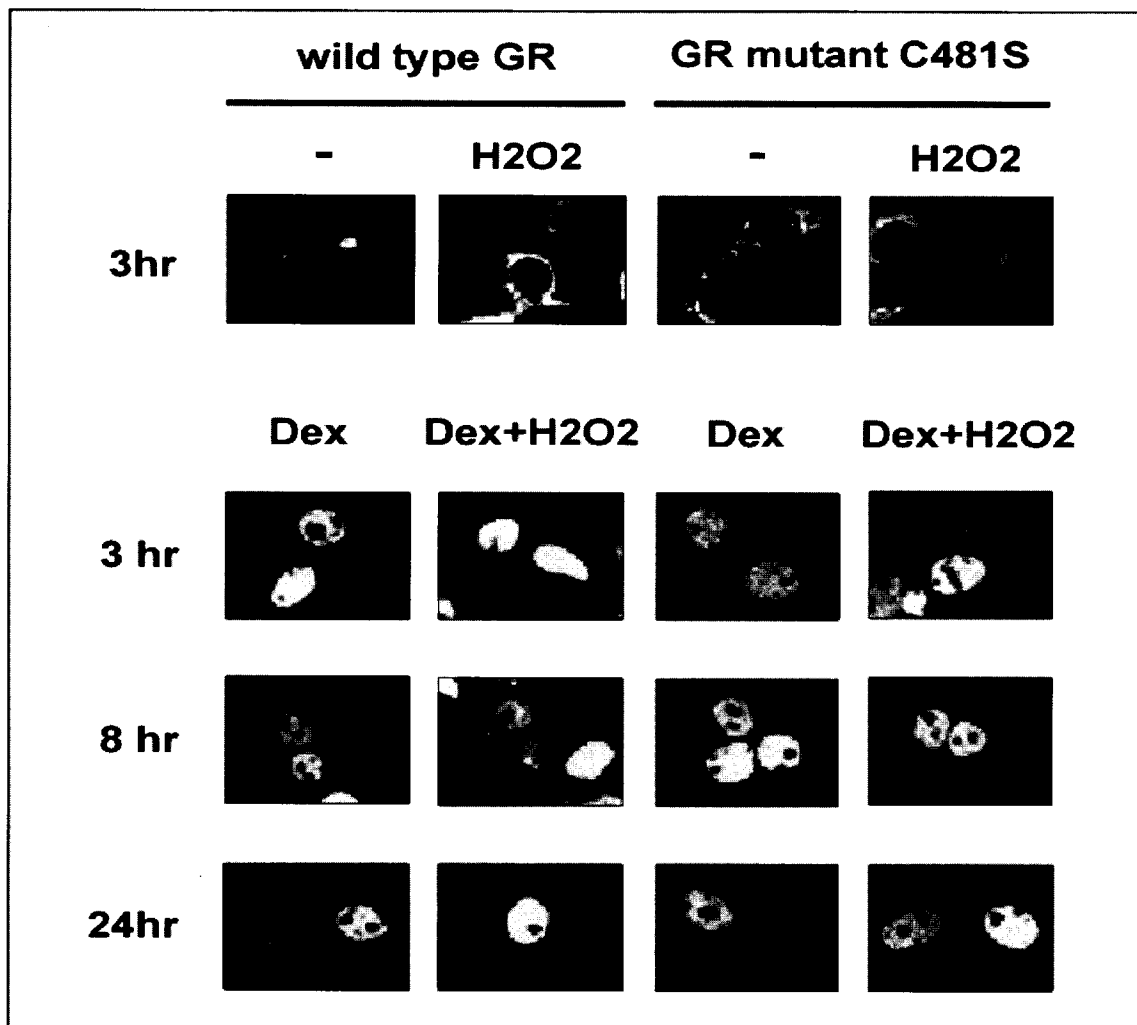


図2：酸化還元反応による核内GR量の変動



Cell: 293T cells

図3：還元刺激によるGRタンパク量変動

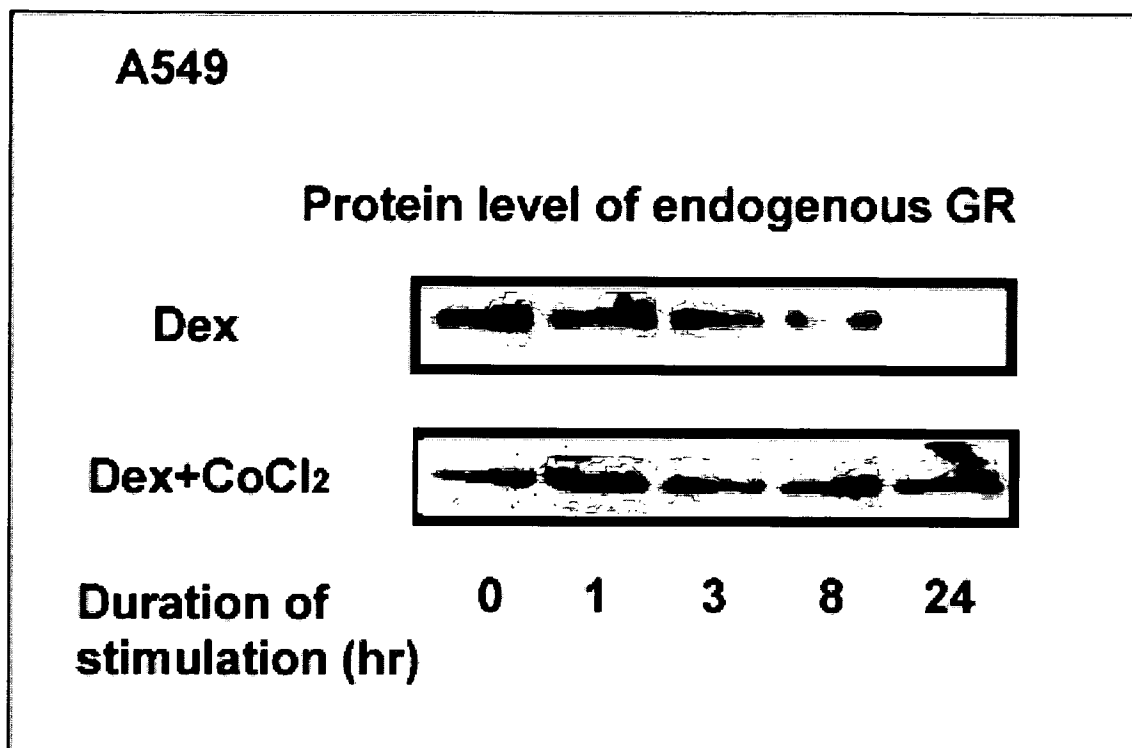
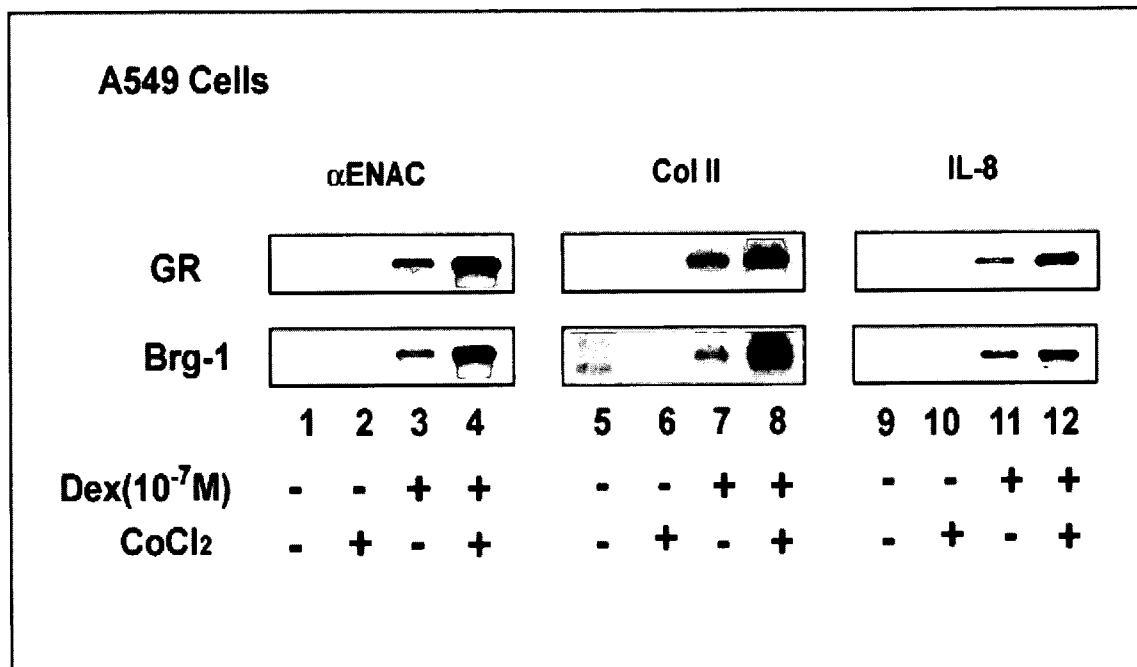


図 4 : 還元刺激による GR 転写修飾因子のプロモーター上での安定化



グルココルチコイド作用調節機構に関する研究 -HEXIM1 は 組織特異的グルココルチコイド応答性遺伝子発現に關与する

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 HEXIM1 によるグルココルチコイド応答性遺伝子発現の組織特異的制御機構を明らかにする。

B. 研究方法

1) 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。

2) 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。

(倫理面への配慮)

とくになし。

C. 研究結果

HEXIM1 の組織分布をウエスタンブロット法で調べると、肝臓などに多く腎臓には少なく、肝臓由来の HepG2 細胞と腎臓由来の 293 細胞においても同様の傾向があった (図 1)。グルココルチコイド標的遺伝子である *atpl1*、*scn11a*、*sgk1* の mRNA 発現に与えるグルココルチコイドの影響を観察すると、グルココルチコ

イドによる *atplal* と *scnn1* の mRNA 発現誘導は 293 細胞においては観察されるが HepG2 細胞では見られないことがわかった。しかも、HepG2 細胞ではヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるトリコスタチン A の添加によってもその抑制は解除されなかった (図 2A)。これらの遺伝子は肝臓においてグルココルチコイドによっては誘導されないため、グルココルチコイド応答性遺伝子の組織選択的発現誘導機構のモデルとなる。そこで、GR と HEXIM1 の発現量がこれらの遺伝子発現に与える影響を検討した。*atplal* と *scnn1a* の mRNA 発現誘導は GR の過剰発現によって回復するが、HEXIM1 を同時に過剰発現させると再び見られなくなった (図 2B)。一方、HEXIM1 の siRNA 発現アデノウイルスを感染させた HepG2 細胞では *atplal* と *scnn1a* の mRNA 発現はグルココルチコイドによって誘導された (図 3)。ここで、HEXIM1 は、P-TEFb 抑制、GR などの転写因子との直接の相互作用、という 2 つの様式によって転写を制御することが示唆されている。そこで、次に、HEXIM1 のいずれの機能が *atplal* と *scnn1a* 遺伝子の腎臓選択的発現誘導 (あるいは肝臓における誘導の消失) に関与しているかを検討した。HEXIM1 の各種変異体のうち、P-TEFb 抑制能を有さない 159-167A 変異体によってもグルココルチコイド応答性の *atplal* と *scnn1a* の mRNA が阻害されることから、少なくともその一部には GR との直接の相互作用を介していることが証明された (図 4)。最後に、*atplal* 遺伝子プロモーターと GR の結合に与える HEXIM1 の作用をクロマ

チン免疫沈降法によって解析した。デキサメタゾン添加 20 分後に核抽出液を採取し、抗 GR 抗体で免疫沈降した。コントロールの LacZ の発現の有無にかかわらず GR のプロモーターへの結合は増加した。しかし、野生型 HEXIM1 あるいは P-TEFb 結合活性を欠く 159-167A 変異体を過剰発現させた場合、GR の結合は観察されなかった。ここで、dBR+SV 変異体の場合は GR の結合は認められた (図 5)。以上から、HEXIM1 は GR との直接の相互作用を介して GR の標的遺伝子へのアクセスを阻害し、そのグルココルチコイド応答性発現誘導を負に制御していることが示唆された。

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。昨年度のクロマチン免疫沈降の結果はかかる結果を支持するものであり、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。今回、内因性グルココルチコイド応答性遺伝子の発現に関して上記の仮説を確認した。少なくとも *atplal*、*scnn1a* 二つの遺伝子に関して HEXIM1 が GR との直接の相互作用を介してそのグルココルチコイド応答性 mRNA 発現を阻害することがわかった。その際、細胞の GR と HEXIM1 の発現量がかかる調節に密接に関与している。