

11-Oandrosterone/pregnanediol 比 (図 2) が有用であった。

【H18】小児副腎癌と成人副腎癌の尿ステロイドプロフィール

小児副腎癌は、1) 成人副腎癌と同様 11 $\beta$ -hydroxylase 活性低下を示し(図 3)、2) 成人副腎癌より高頻度に 3 $\beta$ HSD 活性低下(図 4)、17, 20-lyase 活性亢進を示す傾向(図 5)を認めた。以上の成績は、副腎癌が、腺腫と異なり、細胞内ステロイド酵素発現にムラのある細胞群の集まりであるという病理報告と矛盾しない。また、小児副腎癌における 3 $\beta$ HSD 活性低下、17, 20-lyase 活性亢進は DHEA 産生性の一因である可能性が示唆された。

【H19】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

胎生皮質由来非抱合型 17 $\alpha$ Hpregnenolone、DHEA は、早産児において正期産児より有意に高値で、早産児において、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かった(図 6)。(注：21 $\alpha$ OH $\cdot$  PORD 患者血清検体の収集がすすまず、当初の目標である backdoor pathway 証明には至らなかった。しかし、早産児・正期産児の新生児早期の副腎機能を解析することにより、Backdoor pathway が存在すると思われる胎生期のステロイド分泌の特徴を明らかにした。)

## 5. 結論

尿ステロイドプロフィールによる P450 oxidoreductase 異常症(PORD)の生化学的診断法の確立、小児副腎癌および成人副腎癌のステロイド分泌動態の解明、血中ステロイドプロフィールによる早期産児・正期産児の新生児早期副腎機能解析を行い、機器分析によるステロイド一斉分析の有用性を確認した。

図1 尿 Pregnanetriolone による新生児・乳児 PORD スクリーニング

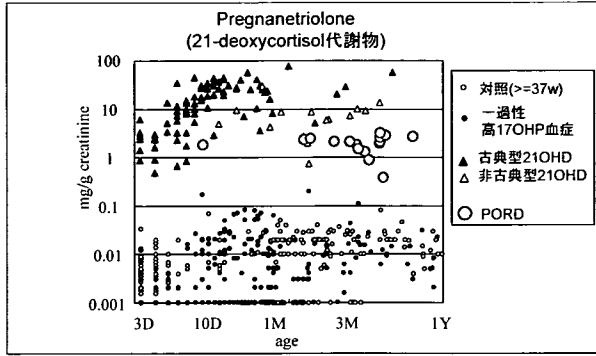


図4 副腎癌の3βHSD 活性指標

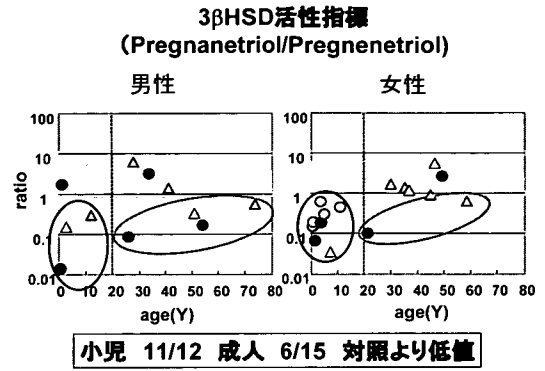


図2 11-OHandrosterone / Pregnanediol 比による新生児乳児 PORDと21OHD の鑑別診断

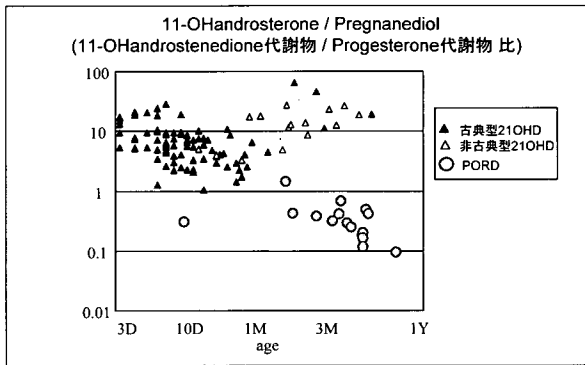


図5 副腎癌の17,20-lyase 活性指標

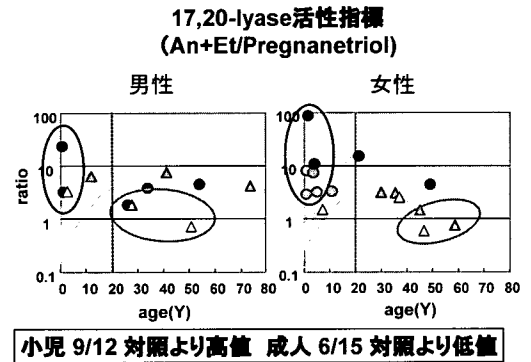


図3 副腎癌の11β-hydroxylase 活性指標

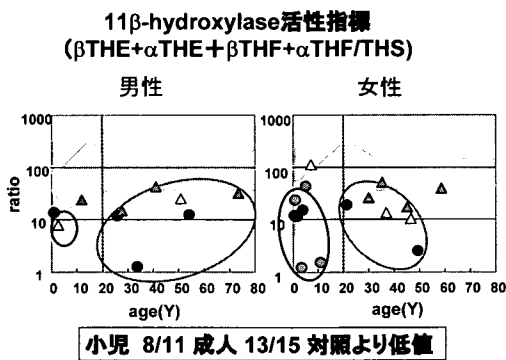
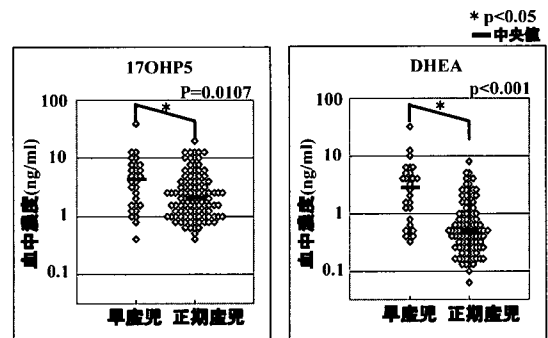


図6 早産児と正期産児の胎生皮質ステロイド分布



## 塩誘導性キナーゼ (SIK) 機能不全時のステロイド合成酵素の発現異常

岡本光弘  
帝塚山大学

### A. 研究目的

副腎皮質におけるステロイド合成酵素の遺伝子発現は主に、下垂体から分泌される副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) によって制御されている。ACTH が副腎皮質細胞の表面膜にある受容体に結合すると、細胞内2次メッセンジャーとして cAMP が合成される。細胞内の cAMP 濃度が上昇すると cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) が活性化され、PKA は次に標的遺伝子上流にある cAMP 応答配列 (CRE) に結合している転写因子 CREB 等の活性化を引き起こす。リン酸化された CREB は転写共役因子と結合して、その結果標的遺伝子のプロモーター活性が上昇する。

我々はナトリウムあるいはカリウム負荷をしたラットの副腎皮質において特異的に誘導される新しいセリン・スレオニンキナーゼ SIK (Salt-inducible kinase) を単離した (1)。SIK はN-末端側にキナーゼ領域を持ち、その一次構造は SNF1/AMPK ファミリーと相同性が高い。その後の研究の結果 SIK は副腎皮質由来の Y1 細胞株を ACTH で刺激すると迅速に誘導されることが分かった。また ACTH による SIK 誘導のシグナル伝達は cAMP/PKA カスケードを介すること、SIK は cAMP/PKA で活性化された CRE を抑制するが、そのためには SIK のタンパク質リン酸化活性が必要であることも明らかになった (2)。SIK による CRE 抑制は、CREB/ATF ファミリーの転写共役因子 TORC をリン酸化し、その転写共役活性を抑制することによるものである (3-6)。実際、Y1 細胞において SIK を高発現させると、ACTH によるステロイド合成酵素遺伝子の誘導が抑制された (2)。しかし、SIK の機能不全状態でステロイド合成が攪乱されるかどうかは不明である。SIK には機能的に相補的に働く3種類のアイソフォームが存在しそれぞれ程度は異なるものの、副腎皮質で全てのアイソフォームが発現している。そしてこのことが、SIK 機能不全状態の解析を困難にしている。

そこで、図1に示す作業仮説を立て、SIK

上流不全の状態を作成し、アルドステロン合成酵素の遺伝子 (CYP11B2) 発現を指標に SIK ファミリー全体の機能を検討した。また、研究期間中に同定できた SIK2 特異的阻害剤を利用して CYP11B2 の発現への関与も検討した。

### B. 研究方法

LKB1 欠損細胞として HeLa 細胞を使用した。CREB 活性の指標として、アデノウイルスに CRE 配列を持つプロモーターとルシフェラーゼレポーター遺伝子を構築し、これを HeLa 細胞へ導入した。

キナーゼ活性は抗体で精製した SIK1 を基質と  $^{32}\text{P}$ -ATP の存在下で反応させ、基質への放射活性の取り込みを指標とした。LKB1 cDNA はインビトロジェン社の IMAGE クローンを利用した。

細胞の培養および  $\text{Ca}^{2+}$  の誘導

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 の解析には細胞を6穴プレートで培養し48時間後に semi-confluent に達した状態で BayK8644  $10\ \mu\text{M}$  処理した。処理は2時間、6時間、16時間を行った。

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  $800\ \mu\text{l}$  で細胞を完全に溶解し、 $400\ \mu\text{l}$  のクロロホルムを加え、攪拌後に  $12000\text{rpm}$ 、5分間遠心分離し上清の回収を行った。上清  $350\ \mu\text{l}$  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  $1\ \mu\text{g}$  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 からシトクロム 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 を 5 倍希釈したもの 5  $\mu$ l、MasterMix を 20  $\mu$ l の全量 25  $\mu$ l 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/ $\mu$ l、0.1pg/ $\mu$ l、0.01 pg/ $\mu$ l、0.001 pg/ $\mu$ l、0.0001 pg/ $\mu$ l) 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  $\mu$ M 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

SIK は LKB1 と呼ばれる上流キナーゼで活性化される。LKB1 が欠損した HeLa 細胞では SIK は全く活性を持たず、SIK の基質であり CREB の転写共役因子として働く TORC は脱リン酸化されたままである。そのため、HeLa 細胞は絶えず CREB が活性化された状態にある。HeLa 細胞で LKB1 を強制発現させると、SIK が活性化され、正常の CREB 依存的転写能が回復する。この時 3 種の全ての SIK アイソフォーム (SIK1-3) が活性化される。

SIK1-3 のうち SIK3 に関しては、LKB1 リン酸化部位をグルタミン酸に置換することで活性型 SIK3 を作成すること出来る。そこで、活性型 SIK3 を HeLa 細胞へ導入すると、活性型 SIK3 だけで正常な CREB 依存的な転写が回復した。このことは、CREB 依存的な転写制御に SIK が重要な役割を担っていることを示唆する。しかし、どの SIK が実際に機能しているかは不明のままである。

副腎皮質細胞株 H295R におけるステロイド合成酵素の遺伝子発現の多くは CREB-TORC 系で直接もしくは間接的に制御されている (図 2)。

すなわち、SIK が正常な遺伝子発現制御の秩序を保つ役割を担っている可能性が示唆される。しかし上に述べたように副腎皮質で

も SIK は 3 種類とも発現しているため、RNAi 等でそれぞれの SIK の発現抑制実験を行ってもはっきりとしたステロイド合成酵素の発現異常は検出できなかった。

そこで、SIK1-3 の全てを阻害するスタウロスポリンを利用してステロイド合成酵素の遺伝子発現が誘導されるかを検討した。その結果全ての SIK 活性が阻害された条件ではステロイド合成酵素の遺伝子が誘導される事実が明らかとなった (図 3)。

SIK の属するキナーゼファミリーには AMPK が存在する。AMPK は LKB1 以外にも Ca<sup>2+</sup> シグナル依存性の CaMKK でも同様に活性化される。そこで Ca<sup>2+</sup> で制御される CYP11B2 に着目し、CREB-TORC-SIK 経路の関与を検討した。

Ca<sup>2+</sup> シグナル伝達経路による CREB-TORC の活性化には 2 つの経路が考えられる。1 つはカルシニューリンによる TORC の脱リン酸化で、他方は CaMKK を介した経路である (図 1)。まずカルシニューリンと CaMKK にそれぞれ特異的な阻害剤を用いて CYP11B2 発現細胞 H295R における mRNA の発現を解析した。CaMKK の阻害剤 STO-609 (20  $\mu$  M)、カルシニューリン阻害剤 CsA (10nM) を加えて 30 分処理した後、それぞれ Ca<sup>2+</sup> で刺激した。Ca<sup>2+</sup> 刺激には K<sup>+</sup> チャンネルアゴニストの BayK8644 (10  $\mu$  M) を利用した。

図 4 の結果に示す様に、Ca<sup>2+</sup> による誘導時間が 2 時間の場合、対照に比べて BayK8644 のみでは CYP11B2 mRNA レベルは変化しないが、STO-609 処理した H295R 細胞の CYP11B2 mRNA の発現は増加した。

次に誘導時間が 6 時間の場合、BayK8644 による CYP11B2 mRNA の発現誘導が観察され、その程度は STO-609 でさらに増加した。反対に 16 時間後の場合、STO-609 は BayK8644 による CYP11B2 mRNA の発現誘導を阻害した。これらの結果、CYP11B2 の mRNA 発現は Ca<sup>2+</sup> 誘導初期では CaMKK によって阻害され、後期では亢進されることが示唆された。一方、CsA 処理した H295R 細胞では、CYP11B2 の mRNA の発現誘導は完全に阻害された。すなわち、カルシニューリンは Ca<sup>2+</sup> 依存的 CYP11B2 の発現に必須であることが明らかとなった。

これらの結果から、図 1 の作業仮説が大筋

であてはまると考えられる。次に SIK アイソフォームのどれが CaMKK で活性化されているかを検討した。上に述べたように、スタウロスポリンやその上流の CaMKK の阻害で SIK 活性を全面的に阻害すると、ステロイド合成酵素遺伝子発現に影響が見られるが、個々の SIK アイソフォームを抑制した実験では有意な変動は得られない。そこで個々の SIK についてそれぞれ特異的阻害剤があるものについて検討を行うことにした。

最終年度の研究から、SIK2 の阻害剤として、CompoundC と呼ばれる AMPK 特異的阻害剤がある。CompoundC の AMPK、SIK1、SIK2、SIK3 に対する培養細胞での EC<sub>50</sub> はそれぞれ、>10 $\mu$ M、~10 $\mu$ M、0.3 $\mu$ M、>10 $\mu$ M である。この結果から 1 $\mu$ M 濃度で使用すると SIK2 のみを特異的に阻害できる。

H295R 細胞を 1 $\mu$ M の CompoundC 存在下で cAMP と Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達系を刺激したが、CYP11B2 を始め、他のステロイド合成酵素の遺伝子発現には影響はなかった。このことは SIK2 を単独阻害しても、他のシグナル経路で制御が行われるか、SIK2 がステロイド合成に関わっていないかのどちらかを意味する。

#### D. 考察及び結論

本研究により SIK とその細胞内基質 TORC がステロイド合成酵素の遺伝子発現全般に関わっていることが証明できた。また Ca<sup>2+</sup>シグナルについては、新たにカルシニューリンや CaMKK の関与も示唆された。一方で、SIK アイソフォームの個々の関与を検討した結果、SIK2 が副腎球状層に発現しているにもかかわらず SIK2 による cAMP シグナルの阻害は CYP11B2 遺伝子の発現に影響を与えなかった。今後、副腎皮質ホルモン産生異常の解明には SIK2 以外の SIK ファミリーの阻害を検討する必要がある。

#### 参考文献

- 1) Wang ZN, et al: FEBS Lett 453:135-139,1999
- 2) Lin, X-z., et al: Mol. Endocrinol 15:1264-1276, 2001
- 3) Doi J, et al: J. Biol. Chem. 277:15629-15637, 2002
- 4) Takemori H, et al: J. Biol. Chem. 277: 42334-42343, 2002
- 5) Katoh Y, et al: Eur. J. Biochem. 271: 4307-4319 2004

6) Sreaton RA, et al: Cell 119: 61-74 2004

E. 知的財産権の出願・登録状況  
該当無し

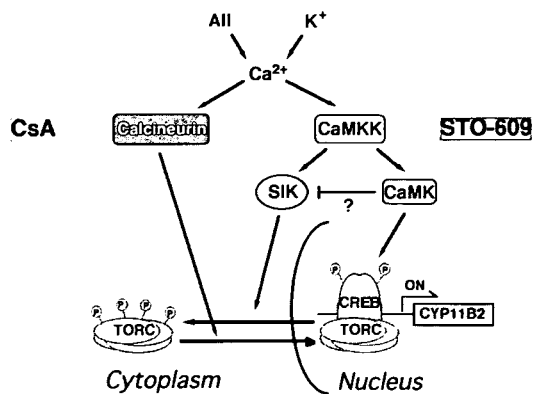


図1 : Ca<sup>2+</sup>依存性 CYP11B2 の発現制御の作業仮説  
 STO-609, CaMKK 特異的阻害 ;  
 CsA, カルシニューリン特異的阻  
 害剤

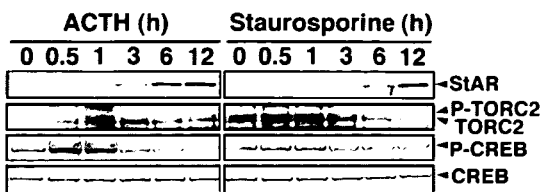


図3 : スタウロスポリンによる TORC2 の脱リン酸化と CREB リン酸化非依存的 StAR タンパクの誘導

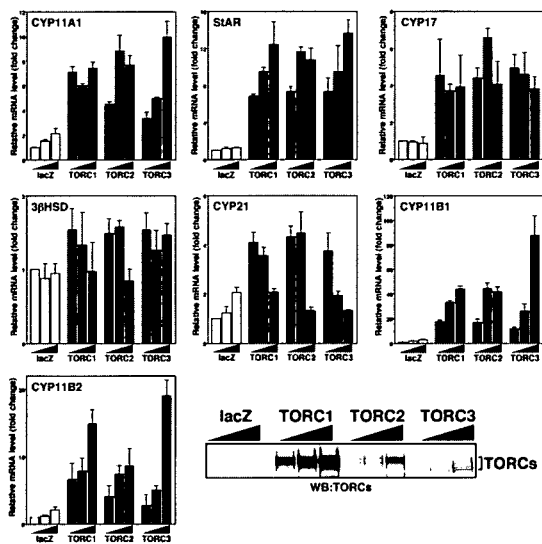


図2 : TORC の強制発現によるステロイド合成酵素の mRNA の誘導

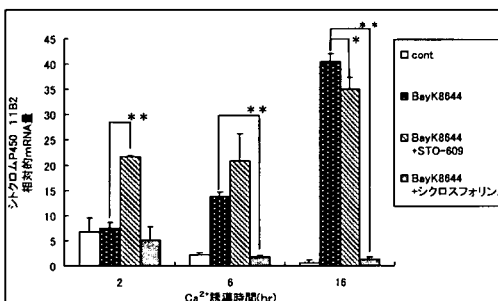


図4 : カルシニューリン、CaMKK を阻害した時の Ca<sup>2+</sup> 依存性 CYP11B2 の発現への経時的影響

# 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

## 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。StAR 蛋白質は 37kDa の前駆体で合成され、ミトコンドリアに輸送されて 30kDa の成熟蛋白質になる。

ステロイドスルファターゼ (STS) は小胞体に局在する蛋白質でステロイド硫酸を脱硫酸化する。STS の基質はコレステロール硫酸 (CS)、プレグネノロン硫酸、デヒドロエピアンドロステロン硫酸とエストロン硫酸などのステロイド硫酸である。STS は CS を脱硫酸化して遊離のコレステロールを産生し、StAR 蛋白質はコレステロールをミトコンドリアに輸送する。ステロイドホルモン産生に関する STS の効果はあまり良く知られていない。また、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。この研究はステロイド産生に関して、StAR 蛋白質に対する STS の効果を調べ、さらに 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

サル腎癌細胞 (COS-1 細胞) は理研の細胞バンクより給与されたものを用いた。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。

### 遺伝子

StAR 蛋白質発現ベクター (pStAR) および STS 発現ベクター (pSTS) をもちいた。F2 システム (チトクローム P450<sub>scc</sub> システム) はカリフォルニア大学、サンフランシスコ校のミラー博士によって供与された。

### 遺伝子導入

COS-1 細胞に FuGENE 6 をもちいて遺伝子導入した。遺伝子導入後、48 時間の培養をおこなった。

### 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 P450<sub>scc</sub>、抗 STS 血清および StAR 抗体をもちいて解析した。

### パルス-チェイス実験

COS-1 細胞に pStAR および pSTS を遺伝子導入し、[<sup>35</sup>S]メチオニン (0.4mCi/ml) でアイソトープラベルした。RIPA 緩衝液 (50mM Tris-HCl, 1% Nonidet p-40, 0.1% デオキシコール酸、0.1% SDS、150mM NaCl、1mMEDTA、1mMDTT、0.1mMPMSF、1x プロテイナーゼインヒビター) 400μl で細胞を溶解した。プロテイン G sepharose と StAR 蛋白質の血清あるいは抗 GAPDH 抗体とインキュベートした。RIPA バッファで洗浄後、SDS 電気泳動し、オートラジオグラフ解析をした。

### RT-PCR 解析

細胞から抽出した mRNA をもちい、逆転写反応の後 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 STS の効果  
COS-1 細胞に F2 システム、pStAR および pSTS を遺伝子導入した。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。F2、pSTS と pStAR を遺伝子導入するとプレグネノロン産生は増加した。

### StAR 蛋白質発現に対する STS の効果

StAR 蛋白質レベルに対する STS の効果を調べるために、遺伝子導入した COS-1 細胞のウエスタンブロット解析をした。STS が遺伝子導入されると StAR 蛋白質の前駆体蛋白質 (37kDa) と成熟体 (30kDa) の蛋白質レベルは増加した。

### StAR 蛋白質の代謝

StAR 蛋白質レベルの増加が蛋白質の寿命との関連性を調べるためにパルス-チェイス実験

を行った。pSTS で遺伝子導入されなかった COS-1 細胞 (A) と比較すると pSTS で遺伝子導入された COS-1 細胞 (B) における StAR 蛋白質の前駆体である 37kDa の蛋白質量の増加があり、代謝時間が延長した。StAR 蛋白質のレベルの増加は StAR 蛋白質の翻訳と StAR 蛋白質の前駆体である 37kDa の蛋白質の半減期が延長したためである。

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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。また、小胞体では遊離のコレステロールを供給するために STS が CS を脱硫酸化する。STS によって産生されたコレステロールの輸送経路は LDL と異なっている。COS-1 細胞のプレグネノロン生産の増加は STS に依存している。STS と StAR 蛋白質発現ベクターを COS-1 細胞に遺伝子導入すると、遊離のコレステロールの産生量の増加は StAR 蛋白質のコレステロール輸送能力を高めるかもしれない。

合成された 37kDa の StAR 蛋白質前駆体はミ

トコンドリアに移行し、ミトコンドリア内で 30kDa の成熟体となる。その機能はミトコンドリア外膜で作用する。ステロイドホルモン産生活性はミトコンドリアの輸送速度に依存している。STS が遺伝子導入された COS-1 細胞における StAR 蛋白質の半減期は STS が導入されていない COS-1 細胞に比べて延長している。StAR 蛋白質がコレステロールを結合し、そのために蛋白質の立体構造を変え、StAR 蛋白質の寿命を増やすかもしれない。実際、リガンドが結合することによって、核レセプターの立体構造が変わることが報告されている。StAR 蛋白質がその立体構造の変化のためにミトコンドリア外膜に滞在する時間が延長し、ステロイドホルモン生産を促進するかもしれない。

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

STS は StAR 蛋白質を増やして、ステロイドホルモンの生産を促進する。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. 知的財産権の出願・登録状況

なし



# グルココルチコイド代謝調節異常とメタボリックシンドロームおよび グルココルチコイド抵抗性発症との関連に関する研究

大関武彦、中川祐一、齋 秀二、藤澤泰子、李仁善、岡田周一、坂口公祥  
浜松医科大学小児科

## A. 研究目的

グルココルチコイドホルモンは生体にとって必須のホルモンであり、糖代謝をはじめとする様々な生理作用をもつことは周知のことである。また治療薬としてもネフローゼ症候群、喘息、膠原病等と幅広い分野で使用されている。

近年末梢組織におけるグルココルチコイドホルモン活性の亢進がメタボリックシンドローム発症と関連があることが明らかにされ、グルココルチコイドホルモンの代謝調節機序の重要性が高まっている。しかしながらグルココルチコイドホルモンの作用・代謝調節についてはいまだ不明な点が多い。

我々はグルココルチコイドホルモンの代謝調節の主要因子である 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11HSD) に着目し研究をすすめている。今回の3年間の研究期間のなかでは以下の点につき明らかにしていくことを目的とした。

1. 糖尿病合併妊娠における 11HSD 作用：  
糖尿病母体より出生した児が将来メタボリックシンドロームになりやすい原因
2. 11HSD type 1 のプロモーター活性調節機序
3. グルココルチコイド抵抗性の発症機序における 11HSD type 1 の作用

## B. 研究方法

### 1) 糖尿病合併妊娠と 11HSD 作用

8 週令の妊娠 1 日目のメスラットにストレプトゾトシン 25-35 mg/kg を尾静脈より投与し、糖尿病モデルラットを作成した。新生仔を出生体重により発育遅延群と正常発育群に分類した。その後 4、6、8、12 週と継時的に体重を計測した。

10 週令にて OGTT を施行し、12 週令時に肝臓、内臓脂肪を摘出した。肝臓、内臓脂肪における 11HSD type 1 の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。

### 2) 11HSD type 1 のプロモーター活性調節機序

11HSD type 1 のプロモーター P2(-1799 to +49 with respect to the transcription start at +1) を HepG2 細胞 (human hepatoma cell) にトランスフェクションし、デキサメサゾン (dex) を  $10^{-6}$ M 投与し、プロモーター活性に及ぼす影響につき解析した。C/EBP $\alpha$  およびグルココルチコイド受容体 (GR) も同時にトランスフェクションし、dex との相互作用等につき解析した。

### 3) グルココルチコイド抵抗性の発症機序における 11HSD type 1 の作用

グルココルチコイド抵抗性の発症機序と 11HSD type 1 との関連性につき急性リンパ性白血病 (ALL) のリンパ芽球細胞を用いた解析をおこなった。まずインフォームドコンセントにより了解を得られた 1-15 歳の ALL のリンパ芽球細胞を薬剤感受性試験によりグルココルチコイド抵抗性群と感受性群に分類した。Dex  $10^{-6}$ M を添加し 24 時間後に RNA を抽出し 11HSD type1 および GR $\alpha$  遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。

(倫理面への配慮)

浜松医科大学倫理規定にもとづき研究をすすめた。

## C. 研究結果

### 1) 糖尿病合併妊娠と 11HSD 作用

出生後の体重経過は 12 週令目までは標準栄養食では発育遅延群は正常発育群より低体重であった。OGTT の結果は発育遅延群ではインスリン分泌低下、正常発育群ではインスリン分泌の上昇を示した。肝臓および内臓脂肪における 11HSD type 1 の遺伝子発現は発育遅延群および正常発育群ともに正常対照群に比べ上昇を認めた。

### 2) 11HSD type 1 のプロモーター活性調節機序

dex は、C/EBP $\alpha$  をトランスフェクション

しない場合は、11HSD type 1 プロモーターに全く影響を及ぼさないが、C/EBP $\alpha$ をトランスフェクトした状態では、11HSD type 1 プロモーターを有意に上昇させた (3 fold activation compared to C/EBP $\alpha$  alone)。

11HSD type 1 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、11HSD type 1 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 11HSD type 1 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。

### 3) グルココルチコイド抵抗性の発症機序における 11HSD type 1 の作用

グルココルチコイド感受性のあるリンパ芽球では 11HSD type 1 遺伝子の発現を認め dex 投与により発現は増加した。dex の刺激のない状態ではグルココルチコイド感受性リンパ芽球もグルココルチコイド抵抗性リンパ芽球も 11HSD type 1 遺伝子の発現に関しては差を認めなかったが、dex 投与後にはグルココルチコイド感受性リンパ芽球では 11HSD type 1 遺伝子の発現は増加しており、反対にグルココルチコイド抵抗性リンパ芽球では著しい低下を認めた。GR $\alpha$  遺伝子の発現はグルココルチコイド感受性群とグルココルチコイド抵抗性群ともに増加を認めた。

## D. 考察

### 1) 糖尿病合併妊娠と 11HSD 作用

11HSD type 1 は生体内では主にグルココルチコイド活性を増加するように作用し、11HSD type 2 はグルココルチコイド活性を低下するように作用することが知られている。今回の解析にて母体の糖尿病の重症度により胎仔の発育に変化が生じること、その差は標準栄養食では 1 2 週令目までは変化が認められないことがわかった。しかし OGTT の結果は体重に変化が認められない時期において既に異常が生じていることを示すものであった。

肝臓および内臓脂肪における 11HSD type 1 の遺伝子発現は発育遅延群および正常発育群ともに正常対照群に比べ上昇を認

めていた。このことは糖尿病合併妊娠から出生した児は体質的に末梢組織におけるグルココルチコイド活性が増加していることを示すものであり、このことがメタボリックシンドロームに罹患しやすい原因であることが示唆された。

### 2) 11HSD type 1 のプロモーター活性調節機序

今回の検討では、C/EBP $\alpha$  の存在するときのみ、11HSD type 1 のプロモーター活性はグルココルチコイドによって上昇した。つまり C/EBP $\alpha$  の多い脂肪細胞では、グルココルチコイドが 11HSD type 1 の活性を促進し、C/EBP $\alpha$  の少ない状態では、11HSD type 1 の発現も少ないことが推測された。このことは、11HSD type 1 発現の組織特異性、部位特異性の説明のひとつとなることと思われた。

11HSD type 1 はグルココルチコイド活性を増加させる作用が主なものであるが今回の検討からグルココルチコイド自体が 11HSD type 1 の刺激因子であり、グルココルチコイドは 11HSD type 1 に対しフィードフォワードに作用することがわかった。このことはグルココルチコイド過剰状態になると末梢組織においては 11HSD type 1 が刺激されることにより活性型グルココルチコイドが増加することになり、グルココルチコイド過剰状態が増悪していくことを示しているものと思われた。

### 3) グルココルチコイド抵抗性の発症機序における 11HSD type 1 の作用

今回の検討によりグルココルチコイド抵抗性の発症に 11HSD type 1 の調節の異常が関与していることが示唆された。すなわち末梢組織において活性型のグルココルチコイドホルモンを増加させるように作用する 11HSD type 1 の発現がグルココルチコイドホルモンにより抑制をうけることがグルココルチコイド抵抗性の発症病因となっているものと思われた。この現象はグルココルチコイド感受性が亢進する時の調節とは逆の結果であり、興味深いものであった。

これまでグルココルチコイド抵抗性の発症に関しては受容体レベルでの解析がおこなわれていたが、抵抗性の発症機序の極一部を説明できるのみであった。我々の研究結果は抵抗性の発症病因として前受容体レベルの関与を明らかにするものであり、今後効果

的なグルココルチコイド療法確立へ応用できるものと思われた。

#### E. 結論

3年間の研究期間において糖尿病合併妊娠から出生した子供は体質的にストレスホルモンに対し末梢組織の感受性が過敏になっていることが示唆され、この状態がメタボリックシンドロームを発症しやすくしていることがわかってきた。今後はこの体質を発現しないようにするためのメカニズムの解明が重要な課題となるものと思われた。

またグルココルチコイド抵抗性・感受性亢進に11HSD type 1が関与していることが示唆された。この分野の研究を進めていくことがこれまで経験学的であったグルココルチコイド療法に学術的エビデンスをあたえ、メタボリックシンドローム等グルココルチコイドホルモンが関与している疾患の治療にも貢献できるものと思われた。

#### F. 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

# 新規球状層発現分子 Disabled-2 の役割、および コルチゾール産生代謝過程の遺伝的多様性に関する研究

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

## A. 研究目的

①副腎皮質球状層に特異的に発現する新規分子 Disabled-2 (Dab2) について、球状層細胞の分化や増殖との関連、ヒト副腎腫瘍における発現動態、などを明らかにする。②コルチゾール産生の最終ステップである 11 $\beta$  水酸化酵素遺伝子 (*CYP11B1*)、さらに局所のコルチゾール再活性化機構である 11 $\beta$ HSD タイプ 1 遺伝子 (*HSD11B1*)・ヘキソース 6 リン酸脱水素酵素遺伝子 (*H6PD*)、の多型と中間表現型・病態や疾患との関連を明らかにする。

## B. 研究方法

①ラット副腎の Dab2 発現に対する低 Na 食の影響を *in vivo* で検討するとともに、H295R 細胞で各種刺激に対する発現変動を検討。またヒト正常副腎・アルドステロン産生副腎腺腫(APA)などを対象に、摘出組織中の Dab2 mRNA 発現量を定量、*in situ hybridization* と免疫染色により分布についても検討。②正常・高血圧・糖尿病患者計 1500 例強を対象に、上記 3 遺伝子の多型と臨床指標との関連を分析。*CYP11B1* の一部多型については、ヘテロ接合サンプルを用いて産生の際である副腎組織における転写効率を推定。

## C. 研究結果

①Dab2 はラット副腎の球状層に限局し、低 Na により発現が増強した。ヒトアルドステロン産生腺腫組織にび漫性に存在し、非腫瘍部より高発現であった。H295R 細胞の Dab2 mRNA 発現はアンジオテンシン II (AII) や TPA で増加したが、高 K や (Bu)<sub>2</sub>cAMP では増加しなかった。

②*HSD11B1* intron 3 T/G 多型の G アリル頻度は高血圧群で高く、*H6PD* R453Q 多型の Q アリル頻度も高い傾向にあったが、*CYP11B1* の多型については有意なアリル頻度差は検出されなかった。内臓脂肪について、

*HSD11B1* T/G 多型の GG 型で TT 型より V (腹部内臓脂肪面積) 及び V/S (皮下脂肪面積) 比が低かった。また、*HSD11B1* T/G 多型の GG 型、及び *H6PD* R453Q 多型の RQ 型・QQ 型で、HDL コレステロールが高値であった。*CYP11B1* の R43Q 多型については、ヒト生体内での推定転写効率は R43 アリルで明らかに低かったが、定常発現レベルに対しては有意な genotype 効果は検出されなかった。中間表現型である尿中コルチゾール排泄量は予想通り RR 型で低かったが、血圧は予想とは逆に RR 型で高く、むしろ視床下部・下垂体を介したフィードバックによる overdrive の影響が示唆された。

## D. 考察

①副腎皮質細胞のアルドステロン産生性に対する Dab2 の役割が示唆され、その発現には PKC 活性化が重要であると考えられた。副腎皮質 Dab2 発現の AII によるコントロールは種を超えて観察され、ヒトアルドステロン産生腺腫における発現増加も明らかとなったが、アルドステロン産生への意義は今後の検討課題である。

②コルチゾールの産生から代謝に至る経路に存在する遺伝的なバリエーションが一部表現型に影響することが判明した。結果の一部は単純な予想とは逆の部分もあるなど、臨床現場にオーダーメイド医療を応用するに際しての貴重なデータとなるものと考えられる。いずれにせよ、グルココルチコイド作用は生命維持に欠かせないだけでなく、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ことが予想される。今回の後半 2 年間で検討した、合成の最終ステップ、レセプター前レベルの調節機構に加え、合成・作用に関わる *CYP17*・*NR3C1* について今後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?」、を明らかにする必要がある。

#### E. 結論

- ①副腎皮質の Dab2 発現は球状層特異的にアンジオテンシン II シグナルによって制御される可能性が強く示唆された。
- ②コルチゾール産生代謝経路の遺伝的バリエーションは、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. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

# 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

## 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。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。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。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。

また一方で、GR の転写制御メカニズムの解析が生体内でのグルココルチコイドのメカニズム解析の近道と考えられるが、その解析は驚くほど明らかにされていない。そこで、GR 転写制御メカニズム解析を始めることとした。

## 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、LH $\beta$ 、FSH $\beta$ 、TSH $\beta$ 、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ブ腫瘍細胞株である 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。

### 4: MR、GR の酸化還元反応に対する転写制御メカニズムの解析

MR と GR の酸化還元刺激に対する転写活性の変動を luciferase assay にて解析した。

### 5: 転写制御メカニズムの解析

酸化還元刺激による転写制御メカニズムの詳細の解析を培養細胞 293, A549 内で行った。

(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、LH $\beta$ 、FSH $\beta$ 、TSH $\beta$ 、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。

## 4: MR, GR の酸化還元反応に対する転写制御メカニズムの解析

MR に関しては aldosterone, hydrocortisone という生体内での二つのリガンド刺激下、GR に関しては GRE, AP-1RE, NF-kBRE という 3 種類のレポーター系上でのデキサメサゾン刺激下での解析を行った。刺激には酸化刺激として H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、還元刺激として CoCl<sub>2</sub> を用いた。MR においてはリガンドによる制御の違い、GR に関しては酸化刺激で活性が抑制され、還元刺激で増強されることが明らかとなった (Fig. 2, 3)。

## 5: 転写制御メカニズムの解析

特に GR 還元刺激による転写制御メカニズムに焦点を絞り、解析を行った結果、CoCl<sub>2</sub> 刺激下ではリガンド依存性に見られる核内 GR の分解が認められにくくなることが明らかになり、それに伴い、転写共役因子のプロモーター上へのリクルートが増えることを

突き止めることができた (Fig. 4)

## 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。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。

酸化還元刺激により、GR と MR の転写は制御されることが明らかになったが、その生理学的な意義はまだ明らかではない。その鍵を握るのは、さらにタンパク分解を含めた複雑な転写制御メカニズムの詳細を明らかにすることだと考えられる。

## 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。

また、GR の転写は酸化還元反応によって制御されており、その制御メカニズムは酸化刺激に対しては核外移行の促進であり、還元刺激においては GR の核内における分解制御の抑制であることが明らかになった。

## F. 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

# 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

## 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。そこで、その分子機構の詳細を明らかにし、グルココルチコイド作用調節における HEXIM1 の生物学的意義を解明することを目的とする。

## B. 研究方法

- 1) 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。
- 2) 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。
- 3) 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

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 *atplal*、*ace2* を用いた。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を呈する事が確認された。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。

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。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 $\gamma$ 、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 $\gamma$  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。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 $\alpha$ ) 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 $\alpha$  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。

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。グルココルチコイド標的遺伝子である *atplal*、*scnn1a*、*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 1) の遺伝子は肝臓には発現していないため、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 scnnla 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。一方、HEXIM1 のアンチセンス発現アデノウイルスを感染させた HepG2 細胞では atplal と scnnla の mRNA 発現はグルココルチコイドによって誘導された。

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、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 scnnla 遺伝子の腎臓選択的発現 (あるいは肝臓における発現の抑制) 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 scnnla 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。

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 2)、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

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。

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。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。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、scnnla 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。HEXIM1 のタンパク発現量は組織によって大きく異なっていることから、各組織のグルココルチコイド応答性遺伝子発現は HEXIM1 の発現量によって規定されている可能性も考えられる。

組織特異的グルココルチコイド応答性の制御に関して、GR 量、リガンドの細胞内代謝 (不活性化)、転写共役因子の組織特異的発現、ヒストン~クロマチンレベルにおける遺伝子の修飾、など、多くのメカニズムが提唱されている。しかし、いずれか単独のみでは複雑なホルモン応答のコントロールには不十分であり、HEXIM1 による制御を含めて、複数の調節系が精緻にグルココルチコイドに対する応答を制御し、細胞の合目的的応答や恒常性維持につながっているものと推測される。その一方で、HEXIM1 の発現量制御によるグルココルチコイド応答性制御は、核内における GR の標的遺伝子へプロモーターへのアクセスを阻害するというユニークなメカニズムを介していることから、グルココルチコイドの副作用の制御などへの応用も含め、薬理的視点からの研究の進展も望まれる。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ことによって、グルココルチコイドの臨床が発展する可能性がある。

#### 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。

HEXIM1 の発現量は組織ごとに大きく異なっているとくに、肝臓に比して腎臓では発現が低く、atplal、scn1la 遺伝子のグルココルチコイド応答性 mRNA 発現誘導の臓器差（肝臓では無く腎臓では誘導ある）との関連が示唆されるしたがって、HEXIM1 はその発現量によって組織のグルココルチコイド応答性を制御する機構の一つとして生理的意義を有すると考えられる

#### F. 健康危険情報

とくになし。

#### G. 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。 |
| その他       | なし。 |

図1 グルココルチコイド応答性遺伝子発現の組織差

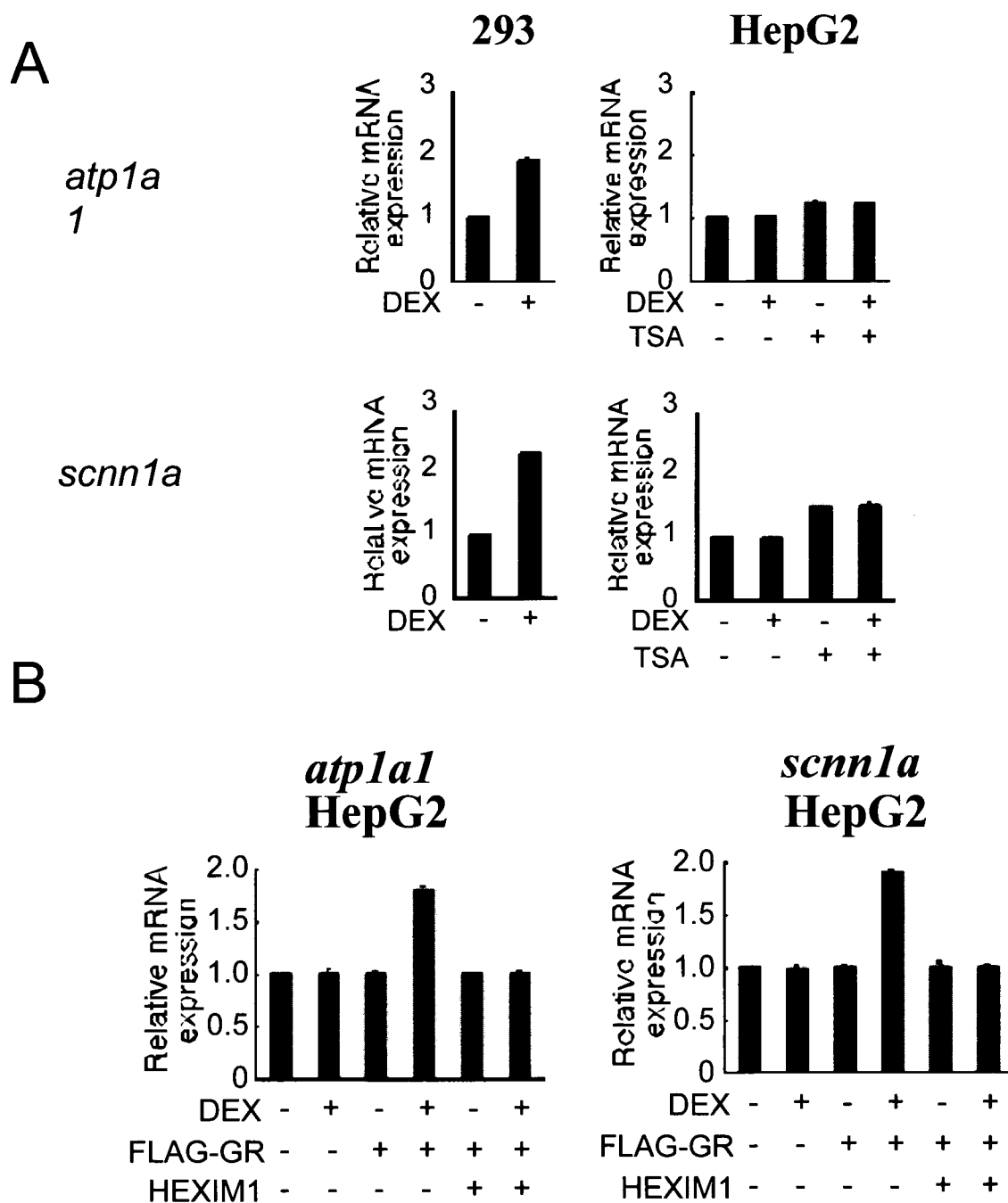


図2 *atp1a1* 遺伝子プロモーターへのGRのリクルートに与える  
 HEXIM1とその変異体の影響

