

IV. 分担研究報告書

(1) 先天性副腎酵素異常症の生化学・遺伝子
診断システムの構築と病態の解明

“早産児の胎生皮質ステロイド分泌動態
—尿ステロイドプロフィール GCMS 法による横断的解析—”

研究分担者	長谷川 奉延	慶應義塾大学医学部	小児科	准教授
研究協力者	本間 桂子	慶應義塾大学病院	中央臨床検査部	
	小山 雄平	慶應義塾大学医学部	臨床検査医学	
	三輪 雅之	慶應義塾大学医学部	小児科	
	池田 一成	慶應義塾大学医学部	小児科	

【研究要旨】

早産児胎生皮質ステロイド分泌ピークの有無・時期・高さが、在胎週数・生後週数・修正週数のいずれに依存するのか検討した。対象は神経学的異常・内分泌学的異常・ステロイド治療のない、在胎週数 25-36 週の日本人早産児 314 例の生後 0-21 週（修正 25-44 週）の随時尿 874 件。胎生皮質ステロイド分泌能の指標として、尿中 DHEA 代謝物 6 種を GCMS 法により測定(mg/g creatinine)し、6 種の和(D-MS)を算出したのち、在胎週数別に生後週数または修正週数別中央値を求め有意差検定した。その結果、早産児の胎生皮質ステロイド分泌ピークの有無・時期・高さは各々、在胎週数、修正週数、在胎週数に依存していることが示唆された。

【背景】胎生期から乳児期の胎生皮質ステロイド分泌動態は、あらかじめプログラムされた胎生皮質の成長および退縮と、出生後の環境による変化を反映すると考えられる。早産児は、胎生中期から後期にかけて出生することから、その胎生皮質ステロイド分泌動態を解析することは、プログラミングと環境による変化を知る上で、重要なてがかりになると考える。今までの知見をまとめると、在胎 37 週以上の正期産児においては、胎生皮質ステロイド分泌は、生後 2 カ月ほどで著明に低下することが知られている。その原因は、胎生皮質が出生後アポトーシスを起こして退縮するためと考えられている。これに対し、在胎 36 週以下の早産児においては、胎生皮質ステロイド分泌は、

1) 出生後も高分泌を持続し、修正 40 週を過ぎてから低下するとの報告より、胎生皮質退縮のタイミングは、生後週数ではなく修正週数に依存すると考えられている。

2) 出生時 在胎週数が少ないほど高分泌であることから、胎生皮質分泌量は、在胎週数と強く関係すると考えられている。

3) 超未熟児を縦断的に解析すると、出生後一時的増加（分泌ピーク）を認める記載があり、我々も経験している。

【目的】早産児胎生皮質ステロイド分泌ピークの存在・時期・高さが、在胎週数・生後週数・修正週数（在胎週数+生後週数）のいずれに依存するのか明らかにす

る。

【対象】 在胎週数 25-36 週の日本人早産児 314 例。保護者の同意を得られた症例のうち、神経学的異常・内分泌学的異常・ステロイド治療、在胎週数に比し出生体重の小さい SGA および大きい LGA 児を除外した。検体は生後 0-21 週（修正 25-44 週）の随時尿 874 件（表 1）。

【方法】 胎生皮質ステロイド分泌能の指標として、GCMS 法により測定した尿中 DHEA 代謝物 6 種の和(mg/g creatinine) について、①在胎週数別（2 週ごと）6 群を各々生後週数別（2 週ごと）11 群に、②在胎週数別 6 群を各々修正週数別（2 週ごと）11 群に分け、各群の中央値を算出した（表 2）。各群の有意差検定は、Mann-Whitney U test および Kruskal-Wallis rank test により行った。分泌ピークの群は、同じ在胎週数の 11 群の中で、中央値が最大、かつ、より早期の中央値最小の群より有意に ($p < 0.05$) 高い分布を示す群と定義する。

【結果】

- 1) 分泌ピークは、①②いずれも、35-36w を除く 5 つの在胎週数群において存在した(図 1,2,表 3)。
- 2) 分泌ピークの時期は生後週数別検討では 4-11 週(8 週間)に、修正週数別検討では 35-40 週(6 週間)の間に存在し(図 3)、分泌ピークの現れる期間は修正週数別に検討した方が短かった。
- 3) 分泌ピークの高さは、生後週数別・修正週数別いずれの検討においても、在胎週数が早いほど高かった(図 4)。

【考察】

(I) 早産児の胎生皮質ステロイド分泌ピークについて

1) ピークが存在したのは、在胎 33-34 週以下の群だったので、ピークの存在は在胎週数に依存すると推測された。

2) ピークの時期は、生後 4-11 週、修正 35-40 週の間であり、修正 37-38 週に集束していたので、生後週数より修正週数に依存すると推測された。

3) ピークの高さは、在胎週数が少ないほど高く、在胎週数に逆比例していたので、在胎週数に依存すると考えられた。

(II) 今回観察した早産児の胎生皮質ステロイド分泌ピークは、今まで知られていた胎生皮質ステロイドの分泌低下期の前に、分泌増加期が存在することを示唆したものとする。

過去の知見をまとめると、胎生皮質ステロイドは、在胎週数が少ないほど出生時の分泌量は高い、在胎 40 週で出生すると速やかに低下する、一方早産児では生後週数に依存して分泌低下が起こるのではなく、修正週数に依存して分泌低下が起こると考えられてきた(図 5)。今回の検討より、在胎 34 週以下の早産児では、胎生皮質ステロイドが、修正 40 週まで出生時の高値を維持するのではなく、修正 35-40 週をピークとして、出生時を大きく上回る高濃度まで分泌増加し続けた後、低下することが明らかになった。分泌増加の成因は不明だが、在胎週数の少ない未熟性の高い児ほど、胎生皮質ステロイドの増加率が高く、修正 40 週に至っても正期産児より著明に胎生皮質ステロイドが高いことから、プログラムされた胎生皮質の成長というより、出生後の環境に対応するために、胎内環境より

多く分泌された ACTH によるのではないかと推測する。

【今後の課題】

正期産児を含め、修正 50 週まで週毎の胎生皮質ステロイドデータを蓄積することにより、胎生期から乳児期の胎生皮質ステロイド分泌動態をさらに明確にしたい。

【結語】

早産児の尿中 DHEA 代謝物とを、在胎週数別に出生から修正 44 週まで横断的に解析した。その結果、早産児の胎生皮質ステロイド分泌ピークの有無および高さは在胎週数に、時期は生後週数より修正週数に依存していることが示唆された。

【参考文献】

Homma K, Hasegawa T, Masumoto M, Takeshita E, Watanabe K, Chiba H, Kurosawa T, Takahashi T, Matsuo T. Reference Values for Urinary Steroids in Japanese Newborn Infants: Gas Chromatography / Mass Spectrometry in Selected Ion Monitoring. *Endocrine Journal* 2003; 50: 783-792

【研究発表】

1. 論文発表なし

2. 学会発表

1) Keiko Homma, Yuhei Koyama, Masayuki Miwa, Mariko Hida, Kazushige Ikeda, Mitsuru Murata, Tomonobu Hasegawa.: Activity of fetal

adrenal in Japanese preterm infants using urine steroid profile by gas chromatography / mass spectrometry. The 8th Joint Meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPEP, SLEP, JSPE, New York City, Sept. 9-12, 2009

表 1 対象

在胎週数	症例数	尿検体数
25-26w	18 (M7, F11)	148
27-28w	13 (M5, F8)	119
29-30w	14 (M10, F4)	123
31-32w	23 (M11, F12)	106
33-34w	54 (M32, F22)	124
35-36w	192 (M100, F92)	254
all	314 (M165, F149)	874

表 2 対象の分類方法

在胎週数: 25-26, 27-28, 29-30, 31-32, 33-34, 35-36週
生後週数: 0-1, 2-3, 4-5, 6-7, 8-9, 10-11, 12-13, 14-15, 16-17, 18-19, 20-21週
修正週数: 25-26, 27-28, 29-30, 31-32, 33-34, 35-36, 37-38, 39-40, 41-42, 43-44週

図 2. DHEA 代謝物と中央値

修正週数変化

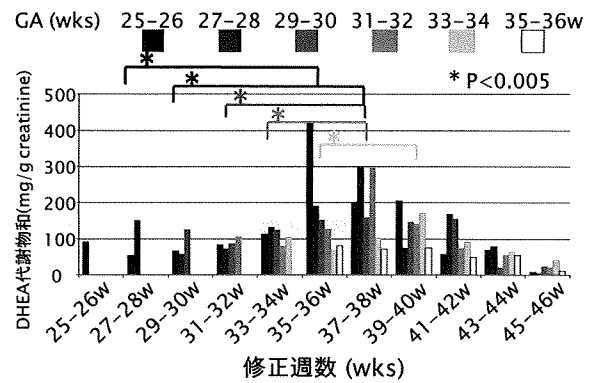


表 3. 分泌ピークの有無

在胎週数	25-26	27-28	29-30	31-32	33-34	35-36
生後週数別	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
修正週数別	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)

図 1. DHEA 代謝物と中央値

生後週数変化

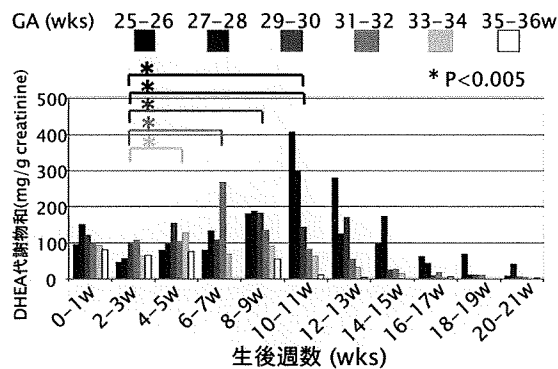


図 3. 在胎週数別 分泌ピークの時期

生後週数と修正週数の比較

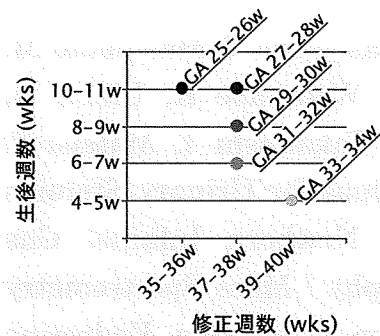


図 4. 在胎週数別 分泌ピークの高さ

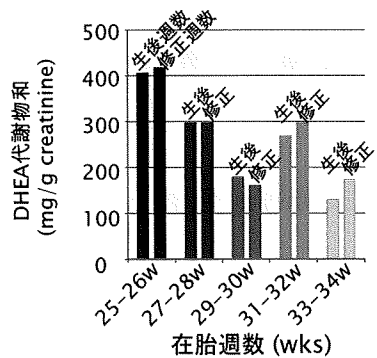
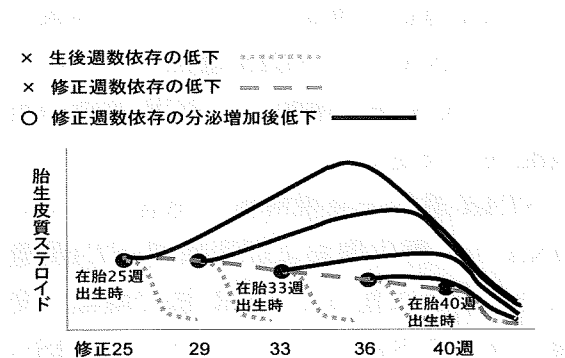


図 5. 早産児の胎生皮質ステロイド分泌ピーク模式図



胎生皮質ステロイド分泌ピークは、胎生週数に依存して、胎生週数が増えるにつれて高くなる。修正週数に換算すると、胎生週数25週出生児の分泌ピークは、胎生週数36週出生児の分泌ピークとほぼ同等である。

胎生皮質ステロイド分泌ピークの高さは、胎生週数に依存して、胎生週数が増えるにつれて高くなる。修正週数に換算すると、胎生週数25週出生児の分泌ピークは、胎生週数36週出生児の分泌ピークとほぼ同等である。

胎生皮質ステロイド分泌ピークの高さは、胎生週数に依存して、胎生週数が増えるにつれて高くなる。修正週数に換算すると、胎生週数25週出生児の分泌ピークは、胎生週数36週出生児の分泌ピークとほぼ同等である。

胎生皮質ステロイド分泌ピークの高さは、胎生週数に依存して、胎生週数が増えるにつれて高くなる。修正週数に換算すると、胎生週数25週出生児の分泌ピークは、胎生週数36週出生児の分泌ピークとほぼ同等である。

胎生皮質ステロイド分泌ピークの高さは、胎生週数に依存して、胎生週数が増えるにつれて高くなる。修正週数に換算すると、胎生週数25週出生児の分泌ピークは、胎生週数36週出生児の分泌ピークとほぼ同等である。

胎生皮質ステロイド分泌ピークの高さは、胎生週数に依存して、胎生週数が増えるにつれて高くなる。修正週数に換算すると、胎生週数25週出生児の分泌ピークは、胎生週数36週出生児の分泌ピークとほぼ同等である。

胎生皮質ステロイド分泌ピークの高さは、胎生週数に依存して、胎生週数が増えるにつれて高くなる。修正週数に換算すると、胎生週数25週出生児の分泌ピークは、胎生週数36週出生児の分泌ピークとほぼ同等である。

胎生皮質ステロイド分泌ピークの高さは、胎生週数に依存して、胎生週数が増えるにつれて高くなる。修正週数に換算すると、胎生週数25週出生児の分泌ピークは、胎生週数36週出生児の分泌ピークとほぼ同等である。

胎生皮質ステロイド分泌ピークの高さは、胎生週数に依存して、胎生週数が増えるにつれて高くなる。修正週数に換算すると、胎生週数25週出生児の分泌ピークは、胎生週数36週出生児の分泌ピークとほぼ同等である。

胎生皮質ステロイド分泌ピークの高さは、胎生週数に依存して、胎生週数が増えるにつれて高くなる。修正週数に換算すると、胎生週数25週出生児の分泌ピークは、胎生週数36週出生児の分泌ピークとほぼ同等である。

優性遺伝形式をとる非古典的 StAR 欠損症の発症機序の解明

研究分担者 勝又 規行

国立成育医療センター 小児思春期発育研究部 成長障害研究室長

【研究要旨】

ヒトにおいて、StAR のミトコンドリア移行シグナルは *in vivo* の StAR 活性に必須である。StAR 欠損症には、臨床的の多様性が認められるばかりでなく、遺伝的にも多様性が認められる。

A. 研究目的

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) をコードする *STAR* 遺伝子異常は先天性副腎リポイド過形成症の原因であり、本症患者は、生後早期からの副腎不全症状に加え、46,XY 個体でも女性型の外性器を呈するとされてきたが、2006 年に Baker らにより、幼児期に発症する副腎不全と正常男性型の外性器を呈する男児で *STAR* 遺伝子異常が同定され (Baker BY, et al. *J Clin Endocrinol Metab*, 91:4781-4785, 2006)、StAR 欠損症には臨床的多様性が存在することが明らかになった。本研究では、非古典的 StAR 欠損症と考えられる男子で *STAR* 遺伝子変異を同定し、その機能を解析して、発症機序の解明を行った。

B. 研究方法

対象: 16 歳男子。外性器は正常男性型。新生児期に、色素沈着と血中 ACTH、PRA 高値があり、先天性副腎不全症と診断。11 歳から二次性徴が認められたが、

その進行は停滞。

STAR 遺伝子解析: 患者および両親のゲノム DNA から *STAR* 遺伝子の各エクソンを PCR 法で増幅し、PCR 産物の塩基配列を決定した。

STAR 遺伝子発現解析: 患者のゲノム DNA から野生型および変異型 *STAR* 遺伝子を全長に亘って PCR 法で増幅、発現プラスミドにクローニングし、COS-1 細胞で発現して、*STAR* mRNA をノーザンブロット法、RT-PCR 法で、StAR 蛋白をウエスタンブロット法で解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析研究は、施設の倫理審査委員会で承認された説明書・同意書を用いて同意を得た後に行った。

C. 研究成果

STAR 遺伝子解析: 患者は *STAR* 遺伝子の IVS1-2A>G 変異のヘテロ接合体。両親の *STAR* 遺伝子には変異なし。

STAR mRNA 解析 (図 1): ノーザンブロット法では、野生型遺伝子を発現させた細胞では 1.8 kb、変異型遺伝子を発

現させた細胞では 1.7 kb の *STAR* mRNA が検出された (図 1A)。RT-PCR 法では、野生型遺伝子を発現させた細胞では 737 bp、変異型遺伝子を発現させた細胞では 623 bp の PCR 産物が増幅された (図 1B)。PT-PCR 産物の塩基配列を決定したところ、野生型遺伝子の PT-PCR 産物では正常のスプライシングが確認されたのに対して、変異遺伝子の RT-PCR 産物では第 2 エクソンが欠失していた (図 1C)。

ウエスタンブロット解析 (図 2) : whole cell lysate を用いた解析では、野生型遺伝子を発現させた細胞では 37 kDa の前駆体および 30 kDa の成熟型 StAR が検出されたのに対して、変異型遺伝子を発現させた細胞では 30 kDa の変異 StAR のみが検出された (図 2A)。細胞分画を用いた解析では、野生型遺伝子を発現させた細胞では 37 kDa の前駆体および 30 kDa の成熟型 StAR はおもにミトコンドリア分画に検出されたのに対して (図 2B)、変異型遺伝子を発現させた細胞では 30 kDa の変異 StAR はおもにサイトゾル分画で検出された (図 2C)。

D. 考察

StAR は StAR-related lipid transfer (START) 蛋白ファミリーのプロトタイプであり、その N 末端側にミトコンドリア移行シグナル、C 末端側にコレステロール結合能を有する START ドメインをもつ 37 kDa の前駆体として合成され、ミトコンドリアに移行後にプロセッシングを受け 30 kDa の成熟型となる。StAR は、ステロイドホルモン産生細胞でコレステロールをミトコンドリア内膜に移送

する働きをもつ。StAR によりミトコンドリア内膜に移送されたコレステロールは、そこに局在するコレステロール側鎖切断酵素によってプレグネノロンに転換される。この転換反応がすべてのステロイドホルモン産生の第一段階であるため、*STAR* 遺伝子異常のために StAR の機能が損なわれると、すべてのステロイドホルモンの産生が低下し、古典的 StAR 欠損症である先天性副腎リポイド過形成症あるいは非古典的 StAR 欠損症を発症する。古典的および非古典的 StAR 欠損症は常染色体劣性遺伝形式をとり、*STAR* 変異のヘテロ接合体は無症状であるとされてきた。

今回、非古典的 StAR 欠損症と考えられる男子で同定した *STAR* 遺伝子の IVS1-2A>G 変異は、これまでに報告がなく、新規の変異である。患者は本変異のヘテロ接合体であるが、両親の *STAR* 遺伝子には変異が同定されないことから、本変異は患者で *de novo* に起こった変異と考えられる。さらに、患者ではヘテロ接合性 IVS1-2A>G 変異以外に *STAR* 遺伝子変異を認めないことから、本家系における非古典的 StAR 欠損症は、これまでの報告と異なり常染色体優性遺伝形式をとると考えられる。

IVS1-2A>G 変異は、第 1 イントロンのスプライス受容部位のコンセンサス配列を損なうので、スプライシング異常をきたすと予想される。ノーザンブロットおよび RT-PCR 解析の結果は、野生型 *STAR* 遺伝子を発現した細胞では *STAR* mRNA は正常にスプライシングを受けるのに対して、変異型遺伝子を発現した細胞では *STAR* mRNA は第 2 エクソンをスキップする異常なスプライシングを

受けることを示している。したがって、IVS1-2A>G 変異は、スプライシング変異であると結論できる。

第 2 エクソンを欠失した変異 *STAR* mRNA からは、第 2 エクソンがコードするコドン 22 から 59 までを欠失する変異 StAR 蛋白 ($\Delta E2$ StAR) を生じると予想される。ウェスタンブロット解析の結果は、野生型 *STAR* 遺伝子を発現した細胞では、StAR 前駆体は、ミトコンドリアに移行して正常にプロセシング受けるのに対して、変異型 *STAR* 遺伝子を発現した細胞では、 $\Delta E2$ StAR はミトコンドリア移行シグナルを欠如するために、サイトゾルに留まることを示している。*In vitro* の検討で、StAR の N 末端側の 62 個のアミノ酸を欠如させても、ステロイドホルモン産生増強活性が野生型 StAR と同等に認められることが報告されている(Arakane F, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:13731-13736, 1996)。したがって、 $\Delta E2$ StAR もコレステロール結合能は保持していると考えられる。一方、遺伝子改変マウスを用いたレスキュー実験で、N 末端を 42 個欠如させた StAR は、野生型 StAR よりも活性が低いことが報告されている(Sasaki, G. et al. *Mol Endocrinol* 22:951-964, 2008)。

以上の所見から、今回報告した患者のステロイドホルモン産生低下の機序は以下のように考えられる。すなわち、患者のステロイド産生細胞では、野生型 StAR は、ミトコンドリアに移行後に、プロセシングを受け、分解される一方、 $\Delta E2$ StAR は、コレステロール結合能を保持しているが、ミトコンドリア移行シグナルを欠如するため、ミトコンドリアへの移行、分解を免れ、サイトゾルに貯

留する。そのため、患者のステロイド産生細胞のサイトゾルでは、 $\Delta E2$ StAR が大半を占めるようになり、野生型 StAR によるコレステロールの結合あるいはそのミトコンドリア内膜への移送を競合阻害するため、ステロイドホルモン産生能が低下し、優性遺伝性 StAR 欠損症を発症すると考えられる。

今回の研究で明らかになった優性遺伝性 StAR 欠損症は、ヒトにおいて StAR の *in vivo* の活性にはミトコンドリア移行シグナルが必須であることを意味するばかりでなく、StAR 欠損症には遺伝的にも多様性が認められることも意味し、遺伝相談を行う上でも重要であると考えられる。

E. 結論

ヒトにおいて、StAR のミトコンドリア移行シグナルは *in vivo* の StAR 活性に必須である。StAR 欠損症には、臨床的に多様性が認められるばかりでなく、遺伝的にも多様性が認められる。

F. 研究発表

学会発表

Katsumata N, Hori N, Hasegawa T. Novel and de novo splicing mutation in the STAR gene in a male patient with nonclassic StAR deficiency: Mutant StAR lacking the N-terminal mitochondrial targeting signal may cause an autosomal dominant form of nonclassic StAR deficiency. 91th Annual Meeting of the Endocrine Society, Washington, DC, USA, June 10-13, 2009.

石井智弘, 堀尚明, 天野直子, 綾美咲, 柴田洋孝, 伊藤裕, 勝又規行, 長谷川奉延. 非古典型先天性リポイド副腎過形成症の成人期精巣機能. 第 82 回日本内分泌学会学術総会、前橋、4 月 23-25 日、2009.

勝又規行, 堀尚明, 長谷川奉延. 優性遺伝形式をとる非古典的 StAR 欠損症の発症機序の解明. 第 43 回日本小児内分泌学会学術集会、宇都宮、10 月 1-3 日、2009.

謝辞

本研究にご協力いただいた、慶應義塾大学医学部小児科・長谷川奉延先生、堀尚明先生、抗ヒト StAR 抗体を供与してくださった Pennsylvania 大学・Jerome F. Strauss III 先生に深謝いたします。

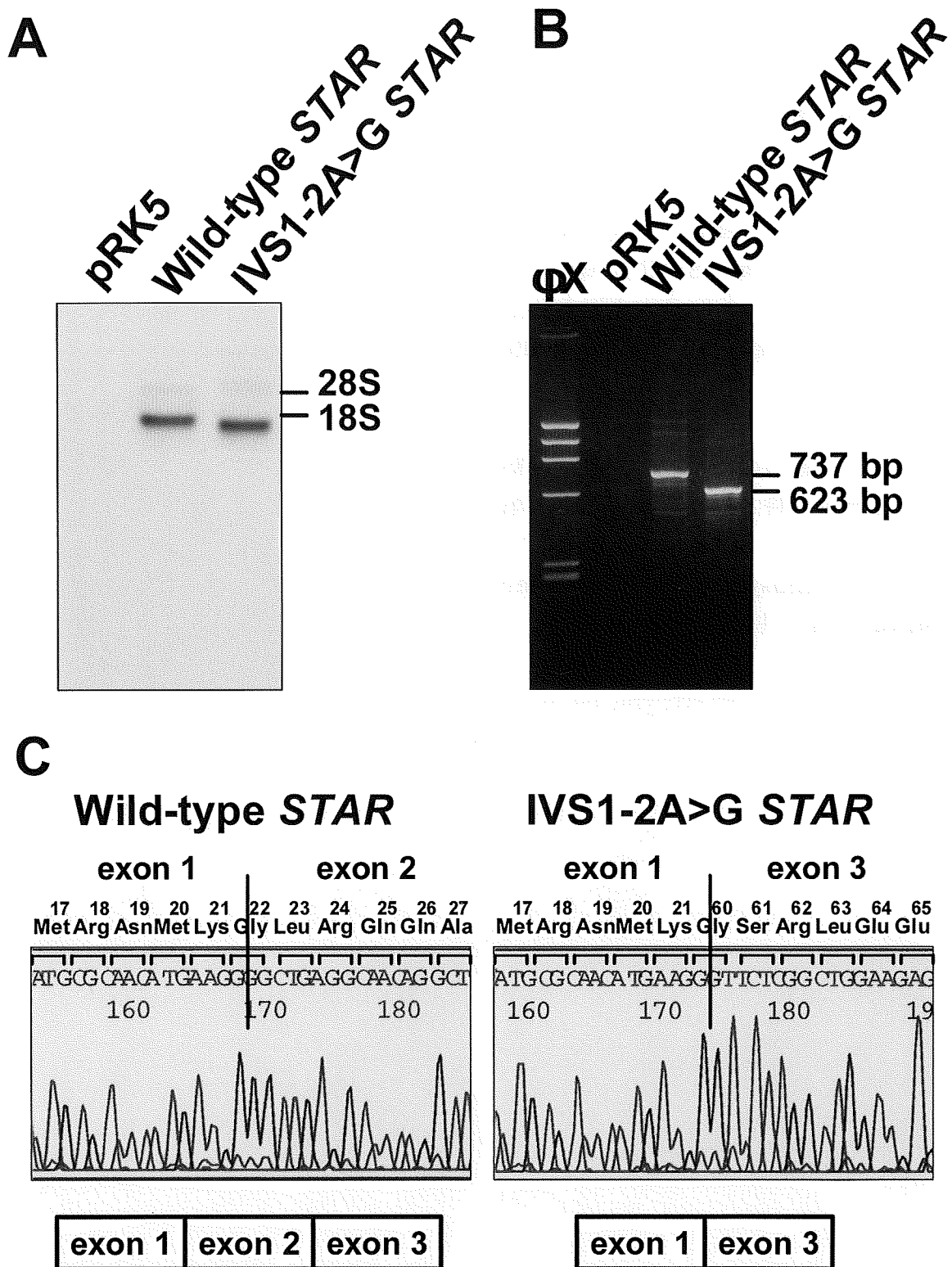


図 1. *STAR* mRNA 解析。A, ノーザンブロット解析。B, RT-PCR 解析。C, RT-PCR 産物のシーケンス解析。

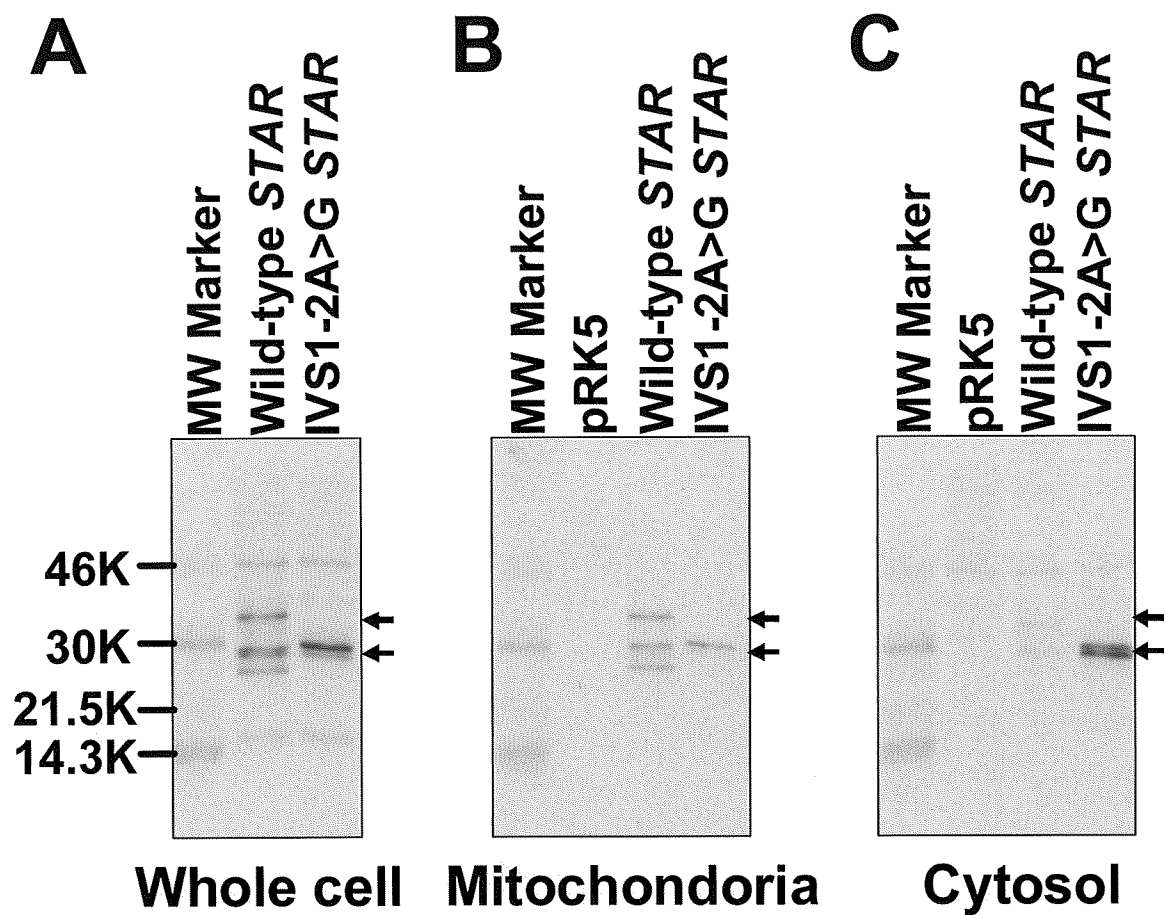


図2. ウェスタンブロット解析。A, whole cell lysate を用いた解析。B, ミトコンドリア分画を用いた解析。C, サイトゾル分画を用いた解析。矢印は StAR 蛋白の位置を示す。

(2) 副腎の発生・分化機構の解明

副腎皮質の発生初期過程に関する研究

研究分担者 諸橋 憲一郎 九州大学大学院医学研究院 教授

【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、同時に副腎形成過程で重要な役割を担っている。昨年到我々は Ad4BP/SF-1 遺伝子の胎仔副腎皮質における発現を誘導する塩基配列（胎仔副腎エンハンサー配列）を用いることで、Ad4BP/SF-1 を胎仔副腎において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、このマウスには本来の副腎より頭部側の腹腔内に、本来の副腎以外に新たな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について検討した。この異所性副腎皮質は成獣期にも存在するが、本来の副腎皮質と同様に胎仔（胎児）型から成獣（成人）型へと転換した。副腎発生の初期過程における細胞分裂を調べたところ、副腎細胞数の増加を説明するような細胞分裂の増加は観察できなかった。このことは、本研究で調べた時期より更に早い時期に分裂が亢進していたか、もしくは野生型であれば Ad4BP/SF-1 発現量が少ないため副腎皮質として分化しない細胞に Ad4BP/SF-1 を強制発現したために副腎皮質として運命決定された細胞が存在するか、を示唆する。いずれの可能性においても、このトランスジェニックマウスでは副腎皮質の分化の極めて初期に副腎皮質の増大が完了していることが分かった。

A. 研究目的

体を構成するすべての組織と同じように、副腎もまた一定の大きさを保っている。本研究では Ad4BP/SF-1 遺伝子の強制発現量が副腎皮質増大させることから、そのメカニズムを検討した。

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、胎仔副腎皮質における細胞増殖を BrdU の取り込みによって調べた。

（倫理面への配慮）

本実験にはトランスジェニックマウスならびに遺伝子破壊マウスを用いるが、

全ての動物実験は九州大学動物実験指針に従って行なわれた。なお本研究は九州大学実験動物委員会の承認を得たものである。同様に組み替え DNA 実験については、組み替え DNA 実験委員会の承認を得たものである。

C. 研究成果

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。一方、これらの異所性副腎皮質は胎仔期から成獣期にかけて存在する。正常の副腎の皮質では胎仔期から成獣に至る過程で、胎仔副腎皮質から成獣副腎皮質に置き換わることが知られている。そこで、この異所性副腎皮質についても同様に胎仔副腎皮質から成獣副腎皮質に置き換わるかについて検討したところ、正常の副腎皮質と同様に異所性副腎皮質も胎仔型から成獣型へと転換していることが分かった。胎仔副腎皮質から性樹副腎皮質への転換には Dax-1 の関与が示されている。そこで、胎仔副腎における Dax-1 の発現と胎仔副腎皮質エンハンサーによって発現する GFP の分布を調べた。その結果、胎仔期に GFP 発現を消失する Ad4BP/SF-1 陽性の副腎細胞において Dax-1 の発現が亢進していることが確認された。これらの細胞は胎仔副腎皮質の外層に位置し、

将来の成獣副腎皮質を構成する細胞と考えられる。

次いで、BudU ラベル実験を行い、副腎脂質の細胞分裂を調べた。その結果、胎齢 12.5 日、14.5 日では胎仔副腎皮質の細胞分裂の亢進が認められなかった。そこでより早い時期、胎齢 11.5 日と 10.5 日について検討した。この時期の副腎皮質はまだ生殖腺を構成する細胞と一つの細胞集団を形成しているが、本研究で用いているマウスは胎仔副腎皮質細胞のみに GFP を発現することから、両者の区別が可能である。GFP と BrdU の免疫染色によって胎仔副腎皮質の分裂を検討したが、このような早い時期においても細胞分裂の亢進は認められなかった。

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必須の転写因子であること、また Ad4BP/SF-1 の発現量が副腎皮質の大きさを規定していることが明らかになっていた。しかしながら、Ad4BP/SF-1 がどのような機能を発揮することで副腎皮質の形成を制御しているかは不明であった。

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。副腎皮質の増大は副腎皮質の細胞分裂が亢進したことによって引き起こされたと推測し、胎仔副腎皮質の細胞分裂を測定した。しかしながら、極めて早期の胎仔副腎から胎生後期の副腎皮質について検討した

ところ、期待した細胞分裂の亢進を認めることができなかつた。この結果は、以下の二つの可能性を示唆する。①本研究で調べた時期より更に早い時期に既に分裂が亢進しており、その後は通常の分裂に戻ったため本実験では分裂の促進が認められなかつた。②副腎皮質の細胞系列の決定にはAd4BP/SF-1が不可欠であり、かつ一定の濃度のAd4BP/SF-1の存在が必要であると考えられる。トランスジェニックマウスにおいては本来低濃度のAd4BP/SF-1が存在する領域の細胞においても一定量のAd4BP/SF-1が発現してしまったため、本来の領域を越えてより多くの細胞が副腎皮質として運命決定された。いずれの可能性においても、本研究で使用したトランスジェニックマウスでは副腎皮質の分化の極めて初期に副腎皮質の増大が完了していることが分かつた。

このようにして異所性に構築される胎仔副腎が正常の副腎皮質と同様に成獣副腎へと変化するかについて調べたところ、胎仔副腎エンハンサーの活性を失うもののAd4BP/SF-1を発現する細胞へと変化していることが分かつた。成獣副腎皮質において機能するエンハンサーは未だ同定されていないが、成獣副腎皮質細胞はこのような性質を持つはずであり、異所性に形成された副腎皮質も成獣副腎へと転換していることが強く示唆された。

E. 結論

Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現増加によって異所性の副腎皮質形成を誘導することが可能であるが、この副腎皮質の形成(増大)は副腎形成の極めて早い時期に終了

する。異所性に敬された副腎皮質も胎仔型から成獣型へと転換する。

F. 研究発表

論文発表

- 1, A critical time window of Sry action in gonadal sex determination. R. Hiramatsu, S. Matoba, M. Fujisawa, M. Kanai-Azuma, N. Tsunekawa, M. Kurohmaru, K. Morohashi, D. Wilhelm, P. Koopman, Y. Kanai *Development* **136**, 129-138, 2009
- 2, Generation of rat monoclonal antibodies specific for Ad4BP/SF-1. C. Yokoyama, T. Komatsu, H. Ogawa, K. Morohashi, M. Azuma, and T. Tachibana *Hybridoma* **28**, 113-119, 2009
- 3, Transgenic expression of Ad4BP/SF-1 in fetal adrenal progenitor cells leads to ectopic adrenal formation. M. Zubair, S. Oka, K. L. Parker, and K. Morohashi *Mol Endocrinol* **23**, 1657-1667, 2009
- 4, Transcriptional suppression by transient recruitment of ARIP4 to sumoylated nuclear receptor Ad4BP/SF-1. H. Ogawa, T. Komatsu, Y. Hiraoka, and K. Morohashi *Mol Biol Cell* **20**, 4235-4245, 2009

学会発表

(招待講演)

- 1, Fifth international Symposium on the biology of vertebrate sex determination. April 20-24, Kona, Hawaii, USA, Invited Speaker
Molecular mechanisms for the

functions and structures of tissue specific enhancers. Y. Shima, T. Baba, K. Miyabayashi, M. Zubair, K. Morohashi

2, 第54回 日本生殖医学会(金沢) 11月22-23日

教育講演: 生殖腺の発生と性分化のメカニズム

諸橋憲一郎、馬場崇、宮林香奈子
大竹博之、嶋雄一

3, 第13回 小児内分泌研究会(函館) 7月4-5日

ステロイドホルモン産生組織の分とAd4BP/SF-1遺伝子の組織特異的エンハンサー選択

諸橋憲一郎

4, 第10回 旭川ウインターシンポジウム(旭川) 1月30日

招待講演: 性差を構成する遺伝子発現

諸橋 憲一郎

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

3. その他

なし

Yeast two-hybrid system を用いた

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】

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、2種の候補因子を同定し、検証を行った。DAX-1 の転写抑制作用に与える影響などについての検討を行った結果、残念ながらこれまでのところ有意な変化は見出せていない。今後、他のプロモーターを用いた検討を続けるとともに、それらの発現様式などについても検討していきたい。

A. 研究目的

先天性副腎低形成症にはさまざまな原因が同定されているが、X連鎖性の主要原因として DAX-1 異常症が知られ、低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の合併や、精巣での精子形成障害が報告されている。発症時期の多くは新生児期～乳幼児期であるが、成人になってから発症する例もあり幅広く、DAX-1 異常症の表現型は臨床的に多様であることが明らかになってきた。

DAX-1 は核内ホルモン受容体スーパーファミリーに属する抑制性の転写因子だが、未だ生体内リガンド不明のオーファン受容体に分類される。N 端側には典型的な Zn フィンガータイプの DNA 結合領域が存在せず、約 3 回の繰り返し配列を有するのが特徴である。

遺伝子異常により転写活性に影響を及ぼす、核内移行に影響するなどの機能異常が報告されているが、作成されたノックアウトマウスの表現型はヒトの症状とは一部乖離していた。また、ステロイドホルモン産生に関連する視床下部一下垂体—副腎/性腺の内分泌軸に沿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、ステロイド産生においても重要な役割を有する因子である。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、相互作用因子についてもいくつか報告がなされているが、疾患との関連については現在のところ不明であり、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、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と考え、この DAX-1 との新たな相互作用因子の同定を目的とする。

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、ヒト全長 DAX-1 との相互作用因子のスクリーニングを行った。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 DAX-1 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。さらに、有望な候補因子については DAX-1 の転写抑制作用に及ぼす影響について、培養細胞を用いたルシフェラーゼアッセイによる StAR および LH β の両遺伝子プロモーターの転写活性に関して検討した。

C. 研究結果

DAX-1 タンパクについては 1 次スクリーニングの結果約 80 個の陽性コロニーを同定し、さらなる確認実験を実施したところ 27 種の候補に絞られた。各候補因子についてタンパク-タンパク相互作用の確認を GST pull-down 法を用いて検証した結果、4 因子が陽性となった。それぞれの因子についてその発現様式やタンパク機能などの報告をデータベースから抽出し、再検討した結果、転写共役因子 NCoA6 と、転写調節因子 PCBP1 が有望と考えられたため、この 2 種の因子について DAX-1 機能に関する影響の有無をルシフェラーゼアッセイにて検討した。その結

果、StAR および LH β のプロモーターの転写活性に有意な影響・変化は見出せなかった。

D. 考察

DAX-1 相互作用候補因子についての検討により有望因子として同定できたのは 2 種類のタンパクであった。これらのタンパクが DAX-1 の転写調節機能に対する効果を有するか否かについて DAX-1 が転写抑制効果を有することが知られている StAR および LH β のプロモーターアッセイをルシフェラーゼアッセイの手法を用いて検討したが、これまでのところ有意な影響を見出すことができなかった。今後は他のプロモーターを用いた検討を続けると共に、それらの発現様式などについても検討していきたい。

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 DAX-1 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、最終的には 2 種類の因子が候補としてあがった。DAX-1 の転写抑制機能に対する影響については、少なくとも StAR、LH β の 2 種のプロモーターアッセイで検討したが、これまでのところ有意な変化は見出せていない。今後、他のプロモーターを用いた検討を続けるとともに、それらの発現様式などについても検討していきたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) Tajima T, Fujiwara F, Fujieda K: A novel heterozygous mutation of steroidogenic factor-1 (SF-1/Ad4BP) gene (NR5A1) in a 46, XY disorders of sex development (DSD) patient without adrenal failure. *Endocr J.* 56(4):619-624, 2009