

な遺伝子の発現を検討したところ、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。

③免疫沈降には副腎皮質由来の Y1 細胞を用いて条件検討を行い、緩衝液、精製抗体濃度、固定核のソニケーション等の条件を決定した。次世代シークエンサーについては、数回の予備的実験を行い、我々が調製した DNA から理想的な結果が得られることを確認した。得られた塩基配列がゲノム中のどの領域に相当するのか、またどの領域に集積しているのかなどについて自動的に処理するシステムを構築した。予備的な実験結果からは、Ad4BP/SF-1 抗体を用いて回収した DNA 断片には Ad4BP/SF-1 の結合サイトが存在した。

#### 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、cre-recombinase を発現させることで胎仔副腎皮質の系譜を追跡したところ、初期の胎仔副腎皮質が成獣副腎皮質へと分化すること、すなわち初期の胎仔副腎皮質細胞が成獣副腎皮質の前駆細胞であることを明らかにした。しかしながら、そのような能力は次第に消失する。現在、成獣副腎皮質の幹細胞に関する二つの異なる研究成果が発表されているが、胎仔副腎皮質の初期の細胞から幹細胞が分離する可能性がある。

胎仔副腎の細胞における Ad4BP/SF-1 の強制発現が異所性の副腎形成を誘導するとの結果は興味深いものであった。以前、我々は Ad4BP/SF-1 が細胞増殖の制御に関わるサイクリン D1 と E1 遺伝子の発現を制御することを明らかにしていたが、今回の結果は Ad4BP/SF-1 の発現量がサイクリン D1 と E1

の発現を量依存的に活性化することで、最終的に細胞増殖を活性化することを示唆するものであった。一方、このような可能性の他に、Ad4BP/SF-1 の発現量の上昇が、本来は Ad4BP/SF-1 の発現が低いため副腎皮質に成り得ない細胞が Ad4BP/SF-1 の強制発現のために副腎皮質へと分化した可能性も考えなければ成らない。

本研究での条件検討によって、理想的な免疫沈降-次世代シークエンシス解析法を確立できた。今後、実際のサンプルを用いてデータを得てゆくところであり、これらのデータをもとに Ad4BP/SF-1 と副腎皮質細胞の増殖の関係に限らず、Ad4BP/SF-1 を中心とする副腎皮質の機能獲得の過程（分化の過程）を明らかにすることができると思われる。

#### E. 結論

①初期の胎仔副腎は成獣副腎の前駆細胞であるが、その能力は次第に失われる。

②Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現増加は異所性の副腎皮質形成を誘導した。Ad4BP/SF-1 を発現する副腎皮質においては、Ad4BP/SF-1 が発現量（遺伝子量）依存的に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。

③免疫沈降法と次世代シークエンサーによって、副腎皮質における Ad4BP/SF-1 の標的遺伝子の全体像を明らかにするための実験系を確立した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1, Zubair, M., Parker, K.L., and Morohashi, K. Developmental links between fetal and adult adrenal cortex revealed by lineage tracing. *Mol. Cell. Biol.* 28, 7030-7040, 2008
- 2, Sakai, N., Terami, H., Suzuki, S., Haga, M., Nomoto, K., Tsuchida, N., Morohashi, K., Saito, N., Asada, M., Hashimoto, M., Harada, D., Asahara, H., Ishikawa, T., Shimada, F., Sakurada, K. Identification of

- NR5A1 (SF-1/AD4BP) gene expression modulators by large-scale gain and loss of function studies. *J. Endocrinol.* 198, 489-497, 2008
- 3, Shima, Y., Zubair, M., Komatsu, T., Oka, S., Yokoyama, C., Tachibana, T., Hjal, T.A., and Morohashi, K. Pitx2 directly regulates Ad4BP/SF-1 gene transcription in the pituitary gonadotrope via interaction with the intronic enhancer. *Mol. Endocrinol.* 22, 1633-1646, 2008
  - 4, Sato, Y., Baba, T., Zubair, M., Miyabayashi, M., Toyama, Y., Maekawa, M., Owaki, A., Mizusaki, H., Sawamura, T., Toshimori, K., Morohashi, K., and Katoh-Fukui, Y. Importance of forkhead transcription factor Fkhl18 for development of testicular vasculature. *Mol. Repro. Dev.* 75, 1361-1371, 2008
  - 5, Baba, T., Shima, Y., Mimura, J., Oshima, M., Fujii-Kuriyama, Y., and Morohashi, K. Disruption of aryl hydrocarbon receptor (AhR) induces regression of the seminal vesicle in aged male mice. *Sex. Dev.* 2, 1-11, 2008
  - 6, Ishimaru, Y., Komatsu, T., Kasahara, M., Katoh-Fukui, Y., Toyama, Y., Maekawa, M., Toshimori, K., Chandraratna, R. A. S., Morohashi, K., and Yoshioka, H. Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos. *Development* 135, 677-685, 2008.
  - 7, Kojima, Y., Hayashi, Y., Mizuno, K., Sasaki, S., Fukui, F., Koopman, P., Morohashi, K., and Kohri, K. Up-regulation of SOX9 in human sex-determining region on the Y chromosome (SRY)-negative XX males. *Clin. Endocrinol.* 68, 791-799, 2008
  - 8, Hiramatsu, R., Matoba, S., Fujisawa, M., Kanai-Azuma, M., Tsunekawa, N., Kurohmaru, M., Morohashi, K., Wilhelm, D., Koopman, P., and Kanai, Y. A critical time window of Sry action in gonadal sex determination. *Development* 136, 129-138, 2009
  - 9, Yokoyama, C., Komatsu, T., Ogawa, H., Morohashi, K., Azuma, M., and Tachibana, T. Generation of rat monoclonal antibodies specific for Ad4BP/SF-1. *Hybridoma* 28, 113-119, 2009
  - 10, Zubair, M., Oka, S., Parker, K. L., and Morohashi, K. Transgenic expression of Ad4BP/SF-1 in fetal adrenal progenitor cells leads to ectopic adrenal formation. *Mol Endocrinol* 23, 1657-1667, 2009
  - 11, Ogawa, H., Komatsu, T., Hiraoka, Y., and Morohashi, K. Transcriptional suppression by transient recruitment of ARIP4 to sumoylated nuclear receptor Ad4BP/SF-1. *Mol Biol Cell* 20, 4235-4245, 2009
  - 12, Kusaka, M., Katoh-Fukui, Y., Ogawa, H., Miyabayashi, K., Baba, T., Sugiyama, N., Sugimoto, Y., Okuno, Y., Kodama, R., Iizuka-Kogo, A., Senda, T., Aizawa, S. and Morohashi, K. Abnormal epithelial cell polarity and migration of Emx2 KO embryonic gonads induced by ectopic EGFR expression. *Endocrinology* 151, 5893-5904, 2010
  - 13, Yokoyama, C., Katoh-Fukui, Y., Morohashi, K., Konno, D., Azauma, M. and Tachibana T. Production and characterization of monoclonal antibodies to germ cells. *Hybridoma* 29, 53-57, 2010
2. 学会発表  
(招待講演)  
2008年
- 1, Zubair, M., Parker, K.L., and Morohashi, K. Cell lineage analysis demonstrates a developmental link between mouse fetal and adult adrenal cells. 13th International Congress of Endocrinology 2008, Rio de Janeiro, Brazil Nov 9-12.
  - 2, Shima, Y., Miyabayashi, K., and Zubair, M.,

Morohashi, K. From tissue specific enhancers to mechanism of tissue differentiation. International Symposium for Sex Differentiation, Fukuoka, Japan. Sep 14-16.

3, Morohashi, K. Purification and analysis of a factor interacting with SUMOylated Ad4BP/SF-1. 13th Adrenal Cortex Conference, San Francisco. June 11-14.

2009 年

4, 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

5, 諸橋憲一郎、馬場崇、宮林香奈子、大竹博之、嶋雄一 教育講演:生殖腺の発生と性分化のメカニズム 第54回 日本生殖医学会(金沢) 11月22-23日

6, 諸橋憲一郎 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 第13回 小児内分泌研究会(函館) 7月4-5日

7, 諸橋 憲一郎 招待講演:性差を構成する遺伝子発現 第10回 旭川ウインターシンポジウム(旭川) 1月30日

2010 年

8, K. Morohashi Keynote Lecture; Molecular and

Cellular Mechanisms of Testis Differentiation Gordon Research Conference, 2010 Reproductive Tract Biology Andover, Andover, New Hampshire, USA, Aug 15-19

9, K. Morohashi, Z. Mohamad, T. Baba, K. Miyabayashi, H. Otake, Y. Shima Symposium; Common Steroidogenic Primordia in Gonadal and Adrenal Morphogenesis Lineage of Testicular Leydig cells and Adrenal Cortex 43rd Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction Milwaukee, USA, July 28-Aug 3

10, K. Morohashi The Keith Parker Memorial Lecture; Ad4BP/SF-1 as the key factor for steroidogenic cell development 14th Adrenal Cortex Conference San Diego, USA, June 16-18

11, Y. Shima, T. Baba, K. Miyabayashi, H. Otake, Y. Kurihara, K. Morohashi Transcriptomic analysis of fetal Leydig cells 第33回 日本分子生物学会、第83回 日本生化学会 神戸 12月7日-10日  
12, 諸橋 憲一郎 ステロイド産生細胞の発生 第28回内分泌代謝サマーセミナー 長崎 7月8日-10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

## ヒト副腎網状層の発育についての形態学および免疫組織学的検討

赤平 純一、 笹野 公伸

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理病態学講座病理診断学分野

### 【研究要旨】

【目的】 Adrenarche は人類に特徴的に認められる変化であるが、生後から成人早期までの間における、adrenarche 前後の副腎網状層（ZR）の形態変化は未だ解明されていない。本研究では、ZR の形態学および免疫組織学的変化と年齢の関係を検討することで、ZR の adrenarche における役割を解明することを目的とした。

【対象と方法】 東北大学病院および仙台医療センターにて解剖された計 252 例（1990-2007 年）から適格例 44 例を選び検討した。副腎皮質全層および ZR の厚さを年齢（0-3, 4-12, 13-20）により 3 群にわけて形態学的に計測し、3 $\beta$ HSD による免疫染色とともに評価した。また、Ki67、Bcl2 および 17 $\beta$ HSD5 による免疫染色を施行した。

【結果】 ZR は形態学的に 4 歳から認められはじめ、年齢増加に伴い厚くなった。男女ともに、13-20 歳の群では、4-12 歳より著しく増加した ( $p < 0.01$ )。また、副腎全体に占める ZR の割合は、男女共に 13-20 歳の群が 4-12 歳より高値であった ( $p < 0.01$ )。男女間には差はみられなかった。Ki67 陽性細胞は男性では、13-20 歳と比べ、他の二群の Labeling index (LI) が高かった ( $p < 0.05$ )。一方で女性は、4-12 歳の LI と比較して他の二群の LI が高かった ( $P < 0.05$ )。Bcl-2 陽性細胞は、年齢に関わらず束状層の外側に高頻度に認められた。HSD17B5 は、男女ともに 9 歳頃から ZR に認められ、ZR の厚さと正の相関が認められた。

【考察】 免疫組織学および形態学的に、ZR が年齢に伴い発育することが判明した。ZR の発育は皮質細胞の増殖とアポトーシスでバランスされ、また puberty にも関与することが示唆された。

### A. 研究目的

Adrenarche はホルモン動態からは副腎由来の dehydroepiandrosterone (DHEA) および DHEA-sulfate (DHEAS) の増加で特徴づけられる変化である。Adrenarche はヒトでは 6-8 歳前後で起こるとされており、DHEA の増加には副腎の三層（球状層 [ZG]、束状層 [ZF]、網状層 [ZR]）のうち ZR が関連するとされている。そのため、adrenarche には ZR の形態を含めた変化が推定されているが、これまでに出生前の胎児の状態からその形態像について経時的に観察した報告はみられない。一方で、adrenarche に

ついて性差が存在するかどうかについても十分に検討はされていない。本研究では、ZR の形態学的変化と年齢・性差を検討することで、ZR の adrenarche における役割を解明することを目的とした。またこれらの変化が生じる過程において、アポトーシスおよび細胞の増殖のバランスがどのように関わっているかについて、免疫組織学的に検討を行い、考察した。

### B. 研究方法

1990 年から 2007 年までに東北大学病院および国立仙台医療センターにおいて施行された 20

歳以下の剖検例 252 例のうち、死亡後 3 時間以内に解剖された症例、ステロイド剤を施用されていない症例、副腎に病変がない症例を選別し、44 例について検討した。

上記 44 例を 0-3 歳、4-12 歳、13-20 歳の 3 群に分けて、HE 標本上における ZR の厚さをマイクロメーターにより測定し、各群における差違、性別による差違について検討した。この際に、ZR の判別のため DHEA-ST (ZR に陽性) および  $3\beta$ HSD (ZG, ZF に陽性) に対する抗体 (条件は以下) を用いた免疫染色を併用した (図 1)。

アポトーシスおよび細胞増殖について検討するために、それぞれ Bcl-2, Ki67 を用いた免疫染色を施行した。Ki67 の評価にはラベリングインデックス (LI) を、Bcl-2 の評価には染色陽性の範囲を Allred score に準じた 6 段階にわけて評価した。

(倫理面への配慮)

症例はすべて匿名化して検索しており、研究計画は東北大学医学部倫理委員会に提出済みである。

### C. 研究結果

免疫染色を併用して形態学的に測定した ZR の厚さは、0-3 歳では男女ともに認められなかったが、その後男女とも 20 歳まではほぼ直線的に厚さが増加した。男女差は明確にはみられなかった (図 2)。

Ki67 による免疫染色では、男女ともに 4-12 歳の群で ZR に高発現が認められた (図 3)。

Bcl-2 の発現は、男女ともに、4-12 歳では ZF に高値で、13-20 歳では ZR に有意に高値に認められた (図 4)。

### D. 考察

形態学的には、ZR の厚さは 4~6 歳ころより始まることから、ZR の肥厚開始が adrenarche の開始にほぼ一致するものと推察された。Ki67 の結果より、年齢により副腎皮質の各層の増殖する層が異なることが示唆された。特に 4-12 歳では ZR の増殖が盛んであると考えられた。一方で Bcl-2 の発現より、4-12 歳の群では ZR が

アポトーシスに抵抗を有することが示唆され、細胞の増殖との相乗効果により、ZR の発育が促進されるものと考えられた。

以上の結果には男女差は明確には認められず、同様の傾向が認められた。

### E. 結語

いわゆる adrenarche の開始前後には副腎皮質網状層が形態学的に肥厚することが確認された。

この肥厚は網状層細胞の増殖と、アポトーシス抵抗性による相乗的变化であることが免疫組織学的に裏付けられた。

図1 副腎皮質網状層の形態学的測定方法

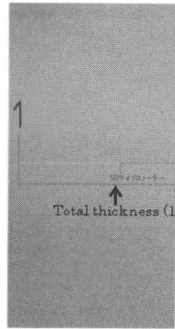
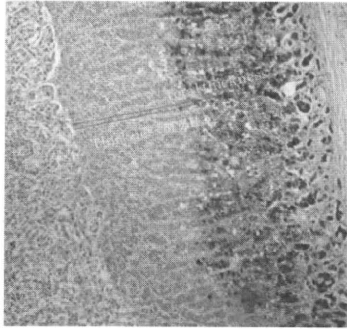


図2

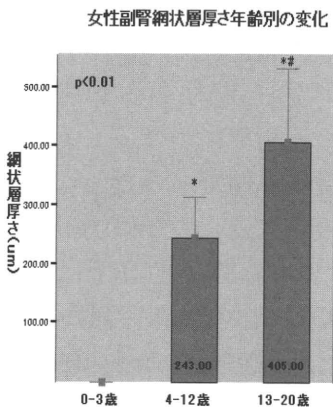
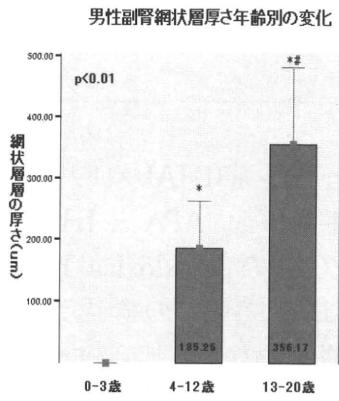


図3 副腎皮質における Ki67 の発現

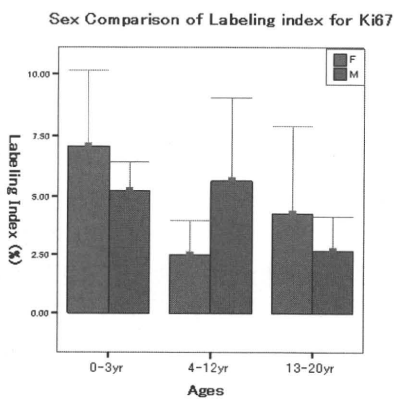
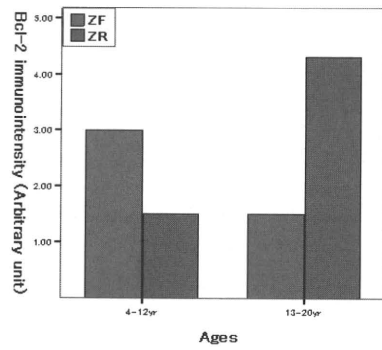
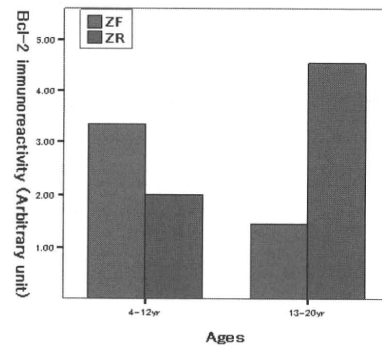


図4 副腎皮質における Bcl-2 の発現



## 原発性アルドステロン症における過形成副腎球状層における アンギオテンシンⅡ応答遺伝子発現の検討

中村 保宏、 笹野 公伸

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理病態学講座病理診断学分野

### 【研究要旨】

【目的】 原発性アルドステロン症の発症機序は、特発性アルドステロン症(IHA)及びアルドステロン産生性副腎皮質腺腫(APA)を背景としたアルドステロン過剰産生である。APA と IHA の最終鑑別診断では、IHA 球状層(ZG)の hyperplasia と APA の付随副腎 ZG での paradoxical hyperplasia の鑑別が重要であるが、両者でのアルドステロン産生や細胞増殖に関わる因子の発現はほとんど解明されていない。本研究では、アンギオテンシンⅡ(ATII)の応答遺伝子のうち上記の機能に関与する因子の発現程度を両者で検討することで、組織診断への有用性を模索することを目的とした。

【対象と方法】 東北大学病院にて手術で切除された IHA11 例、APA18 例、腎癌などで合併切除された正常副腎 20 例を対象とした。IHA、正常副腎、および APA の付随副腎における ZG および束状層(ZF)において、ATII 応答遺伝子でアルドステロン合成酵素の発現に関与する NGFIB および細胞増殖を調節する EGR1 の発現を免疫染色で比較検討した。

【結果】 NGFIB は、各群において ZG での発現が ZF に比べ有意に高値であった( $p<0.05$ )。APA の付随副腎や IHA の ZG での発現は正常副腎の ZG に比べ有意に高値であった( $p<0.05$ )。また、IHA の ZG での発現は APA の付随副腎 ZG に比べ有意に高値であった( $p<0.05$ )。EGR1 は、正常副腎では ZG での発現が ZF に比べ有意に高値であった( $p<0.05$ )が、他群では有意差は無かった。APA の付随副腎や IHA の ZG での発現が、正常副腎の ZG に比べ有意に低値であった( $p<0.05$ )。

【考察】 免疫組織学的に、EGR1 の発現低下が APA の付随副腎や IHA の ZG でみられており、レニン・アンギオテンシン系抑制の影響である可能性が考えられた。一方で、両者特に IHA の ZG では NGFIB の発現がレニン・アンギオテンシン系の抑制とは別の調節経路により誘導され、アルドステロン合成に関わる HSD3B2 や CYP11B2 の発現調節に関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

原発性アルドステロン症の発症機序は、特発性アルドステロン症(IHA)及びアルドステロン産生性副腎皮質腺腫(APA)を背景としたアルドステロン過剰産生である。APA と IHA の最終鑑別診断では、IHA 球状層(ZG)の hyperplasia と APA の付随副腎 ZG での paradoxical hyperplasia の鑑別が重要である。しかし、こ

れまでの研究では両 ZG 間での転写因子等の発現パターンについて十分解明されてはいない。本研究では、アルドステロン産生の調節因子の 1 つであるアンギオテンシンⅡ(ATII)に関連する因子の発現パターンの差が両者の病態の違いの原因となっている可能性を考え、それらを免疫組織学的に解明することを目的とした。

## B. 研究方法

東北大学病院にて手術で切除された IHA11 例、APA18 例、腎癌などで合併切除された正常副腎 20 例を対象とした。IHA、正常副腎、および APA の付随副腎における ZG および束状層(ZF)において、ATII 応答遺伝子でアルドステロン合成酵素の発現に関与する NGFIB および細胞増殖を調節する EGR1 の発現を免疫染色で比較検討した。これらの免疫染色の評価には H-score を使用した。この際に、ZG の判別のため C17 (ZF に陽性) および  $3\beta$  HSD (ZG, ZF に陽性) に対する抗体 (条件は以下) を用いた免疫染色を併用した (図 1)。

(倫理面への配慮)

症例はすべて匿名化して検索しており、研究計画は東北大学医学部倫理委員会に提出済みである。

## C. 研究結果 (図 2、3)

NGFIB、EGR1 とも副腎皮質細胞の核に発現していた。NGFIB は、各群において ZG での発現が ZF に比べ有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。APA の付随副腎や IHA の ZG での発現は正常副腎の ZG に比べ有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。また、IHA の ZG での発現は APA の付随副腎 ZG に比べ有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。EGR1 は、正常副腎では ZG での発現が ZF に比べ有意に高値であった ( $p < 0.05$ ) が、他群では有意差は無かった。APA の付随副腎や IHA の ZG での発現が、正常副腎の ZG に比べ有意に低値であった ( $p < 0.05$ )。

## D. 考察

EGR1 は ATII 応答遺伝子の 1 つであることから、APA の付随副腎や IHA の ZG における発現低下は、アルドステロン過剰産生による、レニン・アンジオテンシン系抑制の影響による可能性が考えられた。一方で、IHA の ZG では NGFIB の発現は APA の付随副腎や正常 ZG よりも亢進しており、これはレニン・アンジオテンシン系の抑制では説明できないことから別

な発現調節経路が存在し、アルドステロン合成に関わる HSD3B2 や CYP11B2 の発現調節に関与している可能性が示唆された。また APA 付随副腎の ZG でも、NGFIB の発現は低下していないことから、こちらでは HE 染色で認められる paradoxical hyperplasia の形成との関連が示唆された。

## E. 結語

IHA の hyperplasia や APA 付随副腎の ZG における ATII 応答遺伝子の発現パターン之差が、両者の病態の違いを理解する上で有用であると考えられた。



図1 3βHSDII、P450c17の発現

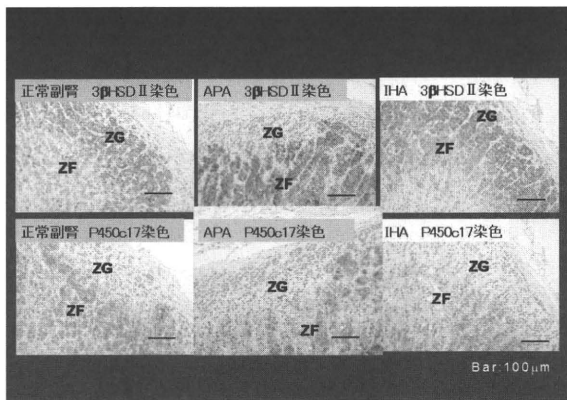


図2 NGFIBの発現

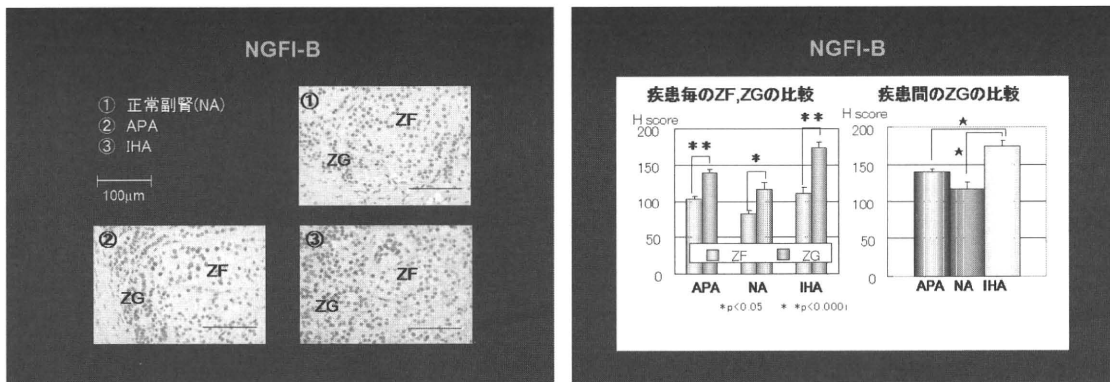
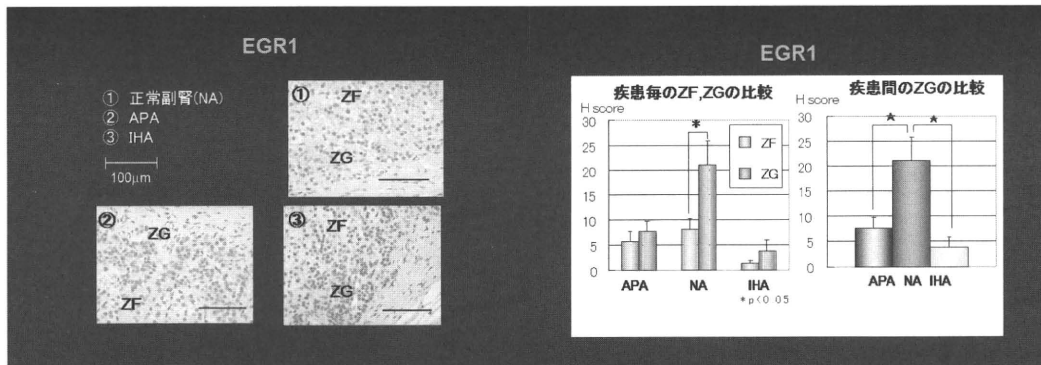


図3 EGR1の発現



## 原発性アルドステロン症での過形成副腎球状層における

### HSD3B2 の転写調節因子発現の検討

中村 保宏、 笹野 公伸

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理病態学講座病理診断学分野

#### 【研究要旨】

【目的】 原発性アルドステロン症の発症機序は、特発性アルドステロン症(IHA)及びアルドステロン産生性副腎皮質腺腫(APA)を背景としたアルドステロン過剰産生である。病理組織診断では、IHA 球状層(ZG)の hyperplasia と APA の付随副腎 ZG での paradoxical hyperplasia の鑑別が重要であるが、両者でのアルドステロン産生に関わる因子の発現はほとんど解明されていない。本研究では、これらの ZG において、アルドステロン合成に関与する酵素の 1 つである HSD3B2 の転写を調節する代表的な 4 調節因子の発現度を検討することで、原発性アルドステロン症の病態を解明することを目的とした。

【対象と方法】 東北大学病院にて手術で切除された IHA11 例、APA18 例、腎癌などで合併切除された正常副腎 20 例を対象とした。IHA、正常副腎、および APA の付随副腎における ZG および束状層(ZF)において、NGFIB, GATA-6, SF-1, DAX1 の発現を免疫染色で調べ、H-score にて比較検討した。

【結果】 IHA の ZG では、NGFIB, GATA-6, SF-1, DAX1 発現が正常副腎の ZG に比べ有意に高値であった( $P<0.05$ )。また NGFIB は APA の付随副腎 ZG に比べても有意に高値であった( $P<0.05$ )。APA の付随副腎 ZG では、GATA-6, DAX1 発現が正常副腎の ZG に比べ有意に高値であった( $P<0.05$ )。

【考察】 IHA の ZG や APA の付随副腎 ZG では、NGFIB, GATA-6, SF-1, DAX1 の発現度が、それらの病態の修飾因子となっていることが考えられ、うち IHA の ZG では、NGFIB 発現上昇がアルドステロン産生亢進の一要因となっている可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

原発性アルドステロン症の発症機序は、特発性アルドステロン症(IHA)及びアルドステロン産生性副腎皮質腺腫(APA)を背景としたアルドステロン過剰産生である。APA と IHA の最終鑑別診断では、IHA 球状層(ZG)の hyperplasia と APA の付随副腎 ZG でのアルドステロン合成に関与する酵素の 1 つである HSD3B2 の発現度の鑑別が重要である。しかし、これまでの

研究では両 ZG 間での HSD3B2 発現を調節する転写因子の発現パターンについて十分解明されてはいない。本研究では、これらの ZG において、アルドステロン合成に関与する酵素の 1 つである HSD3B2 の転写を調節する代表的な 4 調節因子である、GFIB, GATA-6, SF-1, DAX1 の発現度を検討することで、原発性アルドステロン症の病態を解明することを目的とした。

## B. 研究方法

東北大学病院にて手術で切除された IHA11 例、APA18 例、腎癌などで合併切除された正常副腎 20 例を対象とした。IHA、正常副腎、および APA の付随副腎における ZG および束状層 (ZF) において、NGFIB, GATA-6, SF-1, DAX1 の発現を免疫染色で比較検討した。これらの免疫染色の評価には H-score を使用した。この際に、ZG の判別のため C17 (ZF に陽性) および 3βHSD (ZG, ZF に陽性) に対する抗体 (条件は以下) を用いた免疫染色を併用した (図 1)。

(倫理面への配慮)

症例はすべて匿名化して検索しており、研究計画は東北大学医学部倫理委員会に提出済みである。

## C. 研究結果 (図 2-5)

NGFIB, GATA-6, SF-1, DAX1 のいずれも副腎皮質細胞の核に発現しており、各群において ZG での発現が ZF に比べ有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。APA の付随副腎や IHA の ZG での NGFIB, GATA-6, DAX1 の発現は正常副腎の ZG に比べ有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。IHA の ZG での SF-1 の発現は正常副腎の ZG に比べ有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。また、IHA の ZG での NGFIB 発現は APA の付随副腎 ZG に比べ有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。

## D. 考察

IHA の球状層では、NGFI-B, GATA-6, SF-1 の発現上昇が、HSD3B2 発現に関わっている可能性、およびこれらの因子の発現を DAX-1 が制御している可能性が示唆された。APA 付随副腎球状層では、NGFI-B, GATA-6 の発現が上昇して、HSD3B2 の発現低下の抑制に抗する可能性が示唆された。

## E. 結語

転写調節因子の発現パターンと、APA の付随副腎、IHA の ZG における HSD3B2 発現調節との一定の関連が示唆された。

## F. 研究発表

・口頭発表	212 件
・原著論文による発表	34 件
・それ以外の発表	0 件

## G. 知的所有権の出願、取得状況

- 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 3βHSDII、P450c17の発現

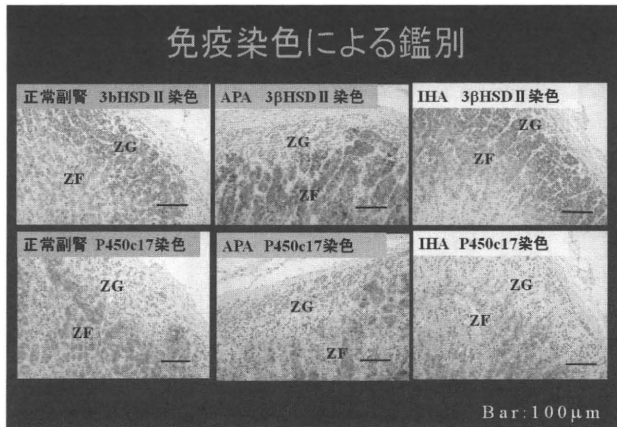


図2 NGFI-Bの発現

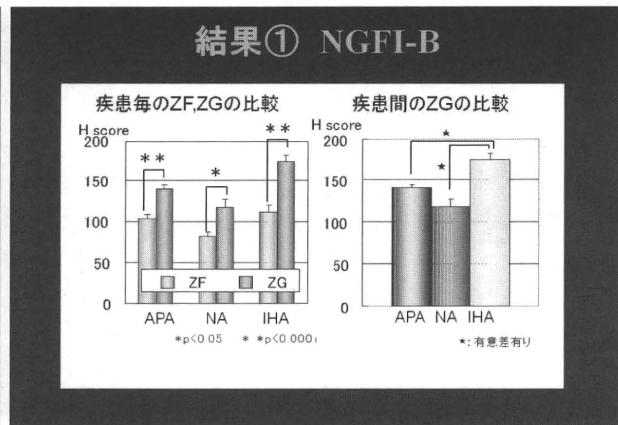
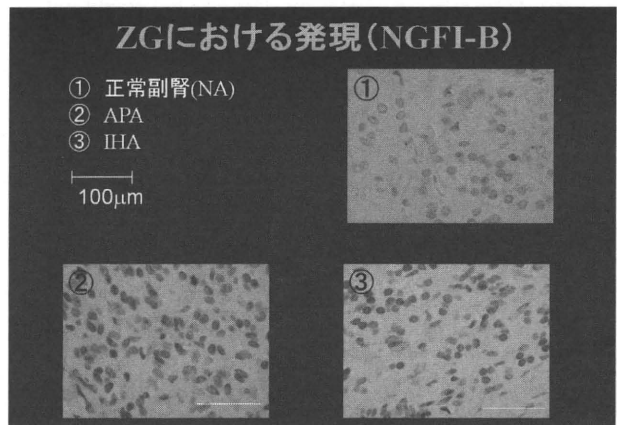


図3 SF-1の発現

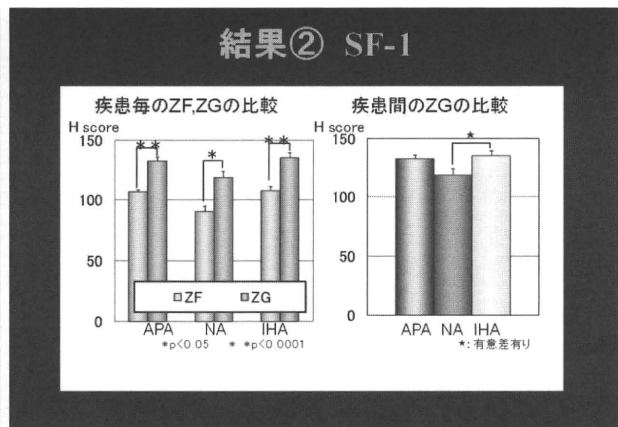
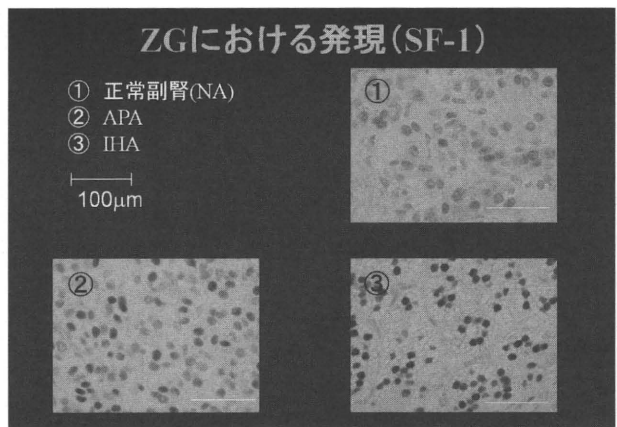


図4 GATA-6の発現

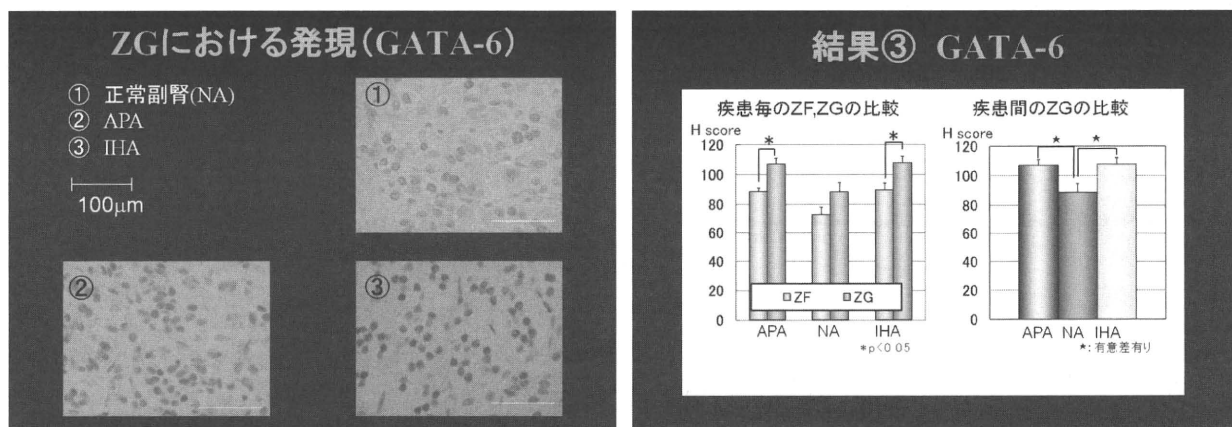
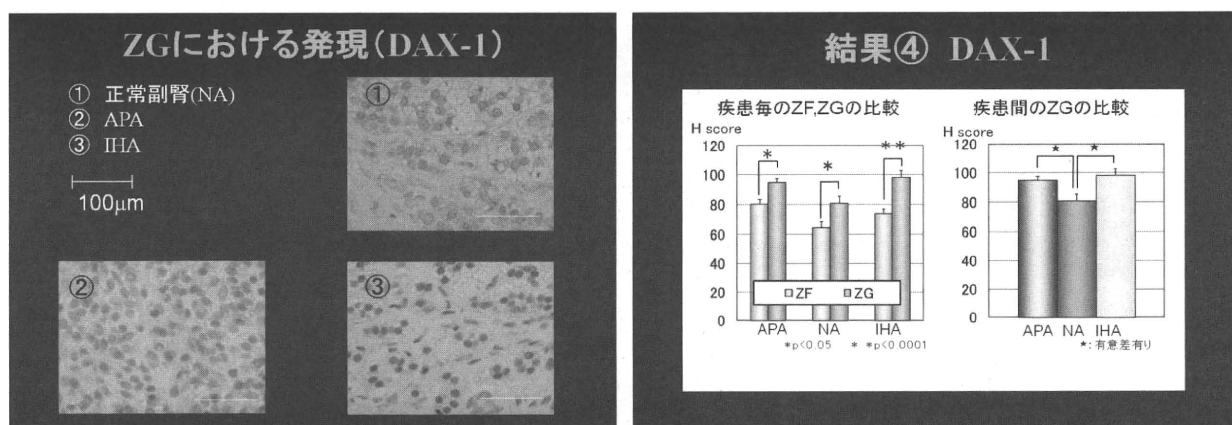


図5 DAX-1の発現





### (3) 副腎再生による新しい副腎不全治療法の開発

## 副腎皮質の再生機構の分子基盤の解明

研究分担者 宮本 薫  
福井大学医学部分子生体情報学 教授

### 【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。この3年間の研究成果として、NR5aファミリーであるSF-1およびLRH-1をヒト骨髄間葉系幹細胞に安定導入することで、ステロイドホルモン産生細胞への分化誘導が可能であることを明らかにした。またStAR遺伝子上流にSF-1が結合する新たなエンハンサー領域を同定し、SF-1結合に伴いこの領域がプロモーター領域とループ構造をとり、クロマチン構造変化を伴うエピジェネティックな修飾を受けていることを明らかにした。さらに分化誘導時のSF-1転写複合体を単離精製し、構成タンパク質を同定した。これらの中で、C/EPB $\beta$ はステロイドホルモン合成遺伝子上流に結合しSF-1と協調的に転写を活性化していることが明らかとなった。

### 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再生医療の開発が望まれる。私どもは、間葉系幹細胞を用いてSF-1およびLRH-1導入によりステロイドホルモン産生細胞へと分化誘導することに成功しているが、これまでの研究成果を進展させ、副腎皮質ホルモン産生細胞への分化メカニズムを明らかにすることで、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が本研究の目的である。

### B. 研究方法

1. SF-1およびLRH-1によるステロイド合成

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検討した。ステロイド合成関連遺伝子群として、主としてStAR, CYP11A, 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。

2. 上記ステロイド合成関連遺伝子に関して、そのプロモーター領域におけるDNAメチル化状態の変化を、バイサルファイト法を用いて解析した。ヒト骨髄間葉系幹細胞にLHR-1を安定導入した後8Br-cAMPにより刺激することでCYP11A1やCYP17等のステロイド合成酵素遺伝子を発現誘導し、これら遺伝子上流に存在するCpGのDNAメチル化状態を解析した。

3. ヒト間葉系幹細胞株hMSC-hTERT-E6/E7

に SF-1 を導入した細胞株と、親株を用いて、ChIP-on-chip 解析を行った。それぞれの細胞株から SF-1 により免疫沈降した染色体断片を調製し、全ゲノム増幅によりマイクロアレイ用プローブを作製した。マイクロアレイは全ゲノムタイリングアレイを用い、シグナルマップによる対数比解析により有意のシグナルをピックアップした。さらにマイクロアレイ解析により有意と判定された SF-1 結合サイトを、realtime-PCR を用いた ChIP 解析により確認した。

4. 3C(Chromosome Conformation Capture) アッセイにより、StAR 遺伝子上流エンハンサー領域とプロモーター領域とがループ構造を形成するかどうかを検証した。メチル化ヒストン抗体をはじめとする ChIP アッセイにより、エンハンサー領域を含む StAR 遺伝子上流のクロマチン構造変化を解析した。同様の手法で、ヒトステロイドホルモン産生細胞株 H295R 及び KGN 細胞を用いて、これらの細胞での StAR 遺伝子の発現調節とクロマチン構造変化を解析した。

5. ヒト間葉系幹細胞株 hMSC-hTERT-E6/E7 から Flag タグのついた SF-1 を安定的に発現する細胞株を樹立し、核抽出タンパク質からの SF-1 転写複合体の単離精製を行った。SF-1 転写複合体タンパク質を、Flag タグを用いた affinity chromatography により精製し、SDS-PAGE により各複合体構成タンパク質に分離したのち、LC-MS で同定した。

6. SF-1 複合体構成タンパク質の一つである C/EBP  $\beta$  と SF-1 との関連をゲノムワイドに ChIP-on-Chip により解析した。さらに C/EBP  $\beta$  と SF-1 のステロイドホルモン合成関連遺伝子における役割を、StAR, HSD3B2, CYP11A1 遺伝子上流域を用いたレポーターアッセイにより検証した。

## C. 研究結果

1. 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、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、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が、CYP17 プロモーターでは3か所の NR5A ファミリーコンセンサス配列に結合し転写を活性化していることが確認された。

2. LRH-1 の安定導入細胞株を cAMP により刺激すると CYP11A1 および CYP17 遺伝子発現は著しく増大し、ステロイドホルモン再生細胞へと分化する。この際の、これら遺伝子上流に存在する CpG のメチル化状態を解析したところ、CYP11A1 ではプロモーター近傍の DNA メチル化は LRH-1 導入や cAMP 刺激に関わらず低メチル化状態であり、変化は見られなかった。一方 CYP17 プロモーター近傍では、骨髄間葉系幹細胞ではすべてメチル化されていたが、LRH-1 導入だけは変化が見られなかったものの、cAMP の刺激により数か所の CpG で経時的に脱メチル化修飾を受けていた。この変化は LRH-1 を導入していない幹細胞親株に cAMP 刺激をくわえることでは生じないことから LRH-1 の発現が脱メチル化の誘導に必須であることが明らかとなった。

3. StAR 遺伝子上流の解析では、これまでのプロモーター領域に加えて、上流-15kb, -6kb, 及び-3kb 付近に SF-1 の結合領域を認めたが、このうち-15kb と-6kb の領域には強いエンハンサー活性を認めなかった。一方、-3000 から -3500bp 付近の SF-1 結合サイトは、極めて強いエンハンサー活性を示すことが明らかとなった。3C(Chromosome Conformation Capture) アッセイにより、StAR 遺伝子上流-3kb に存在するエンハンサー領域とプロモーター領域とがループ構造を形成していることが明らかとなった。また、このループ構造の形成には SF-1 の存在が必須であることを、siRNA を用いた SF-1 のノックダウンにより確認した。

4. Flag タグを付けた SF-1 を恒常的に発現し、ステロイドホルモン産生細胞へと分化した間葉系幹細胞から、新たな抽出法により SF-1 転写



複合体を含む核タンパク質を抽出した。Flag タグを用いた **affinity chromatography** により SF-1 転写複合体を精製し、SDS-PAGE により 30 種類以上の複合体構成タンパク質を分離した。さらに、それらをペプチド断片化した後 LC-MS で解析することにより同定することに成功した。複合体構成タンパク質には、転写共役因子、DNA 及び RNA 結合タンパク質、リモデリング因子や別の転写因子なども含まれていたが、それらの中から、cAMP 刺激により SF-1 との結合強度が増加していた C/EBP  $\beta$  に着目した。

5. C/EBP  $\beta$ 、SF-1 結合部位およびヒストン H3K4 ジメチル化領域の ChIP-on-Chip によるゲノムワイドな解析から、ゲノム上に SF-1 および C/EBP  $\beta$  が近接して結合しているサイトが多く存在し、それらの領域はヒストン H3K4 ジメチル化領域とよく一致していた。また、HSD3B2、StAR、CYP11A1 など多くのステロイドホルモン合成関連遺伝子上流に SF-1 および C/EBP  $\beta$  が同時に結合するサイトが存在することが ChIP assay により明らかとなった。さらにレポーターアッセイにより、これらのステロイドホルモン合成関連遺伝子群の転写が、SF-1 と C/EBP  $\beta$  の同時発現により強く活性化されることが明らかとなった。

#### D. 考察

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に関して、LRH-1 は SF-1 と同等の活性を示すが、その転写活性化能は SF-1 と比較してかなり低いことが判明した。一方、StAR 遺伝子上流に存在するコンセンサス配列に対しては、SF-1 よりもより強固に結合することが示唆された。さらに CYP17 遺伝子プロモーター領域では、LRH-1 の結合に伴いクロマチンの構造変化が生じており、cAMP 刺激をきっかけとして、DNA 脱メチル化反応が速やかに生じることが初めて明らかとなった。哺乳動物細胞における DNA 脱メチル化の機構は不明な点が多いが、本研究によりヒト骨髄間葉系幹細胞においても転写の活性化に

伴い速やかな脱メチル化が生じることが初めて示された。またその際、LRH-1 の発現が CYP17 遺伝子上流の脱メチル化に必須であることが示唆された。LRH-1 および SF-1 による StAR 遺伝子の発現誘導において、プロモーターに加え新たなエンハンサー領域が関与していることを初めて明らかにした。この新たなエンハンサー領域が、副腎ステロイドホルモン合成に関与する可能性も考えられる。

#### E. 結論

本研究により、骨髄由来の間葉系幹細胞は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 の導入によりエピジェネティックな変化を伴って分化誘導されることが示された。また SF-1 転写複合体には C/EBP  $\beta$  が含まれ、SF-1 と協調的にステロイドホルモン合成関連遺伝子の転写を活性化していることが明らかとなった。これら知見は、SF-1 および LRH-1 によるステロイドホルモン産生細胞への分化誘導メカニズムに迫るものであり、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。

#### G. 研究発表

##### 1)国内

口頭発表	20 件
原著論文による発表	0 件
それ以外 (レビュー等の発表)	2 件

そのうち主なもの

##### 論文発表

- ①矢澤隆志、梅澤明弘、宮本 薫：卵巣顆粒膜細胞における転写共役因子 PGC-1  $\alpha$  の役割。日本生殖内分泌学会雑誌 15, 29-34, 2010.
- ②矢澤隆志、梅澤明弘、宮本 薫：間葉系幹細胞からのステロイド産生細胞。特集・再生医療の将来と産婦人科。産科と婦人科 76(10),1189-1194, 2009.

## 学会発表

- ①水谷哲也, 宮本 薫: 卵巣における転写制御とエピジェネティクス. 第 55 回日本生殖医学会. 卵巣機能に関する基礎研究の進歩. 最近の知見から. 徳島, 2010, 11, 11-12.
- ②矢澤隆志: 卵巣ステロイドホルモン合成に関連する遺伝子発現調節機構の新知見. 第 15 回日本生殖内分泌学会学術集会. 卵巣機能調節における新知見. 千里, 2010, 11, 20-21.
- ③宮本 薫: 卵巣: ステロイド・転写調節など. 岡山大学研究開発委員会 第 4 ワーキング主催シンポジウム 分野・領域を超えた内分泌学・生殖内分泌学の研究ネットワークへ「少子化社会からの脱却をめざした分子内分泌標的制御とその応用」. 岡山, 2010, 12, 11.
- ④矢澤隆志, 稲岡齊彦, 水谷哲也, 宮本 薫: 転写共役因子 PGC-1 $\alpha$  の卵巣機能における役割. 第 82 回日本内分泌学会学術総会 公開シンポジウム 4 間脳下垂体性腺系の分子機構の新知識. 前橋, 2009, 4, 23-25.
- ⑤矢澤隆志: 間葉系幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の作製. 第 27 回内分泌代謝学サマーセミナー. シンポジウム 幹細胞研究の最前線. 福井, 2009, 7, 16-17.

## 2) 海外

口頭発表	7 件
原著論文による発表	8 件
それ以外 (レビュー等の発表)	1 件

## そのうち主なもの

### 論文発表

- ①Miyamoto, K., Yazawa, T., Mizutani, T., Imamichi, Y., Kawabe, S., Ju, Y., Umezawa, A.: Stem cell differentiation into steroidogenic cell lineages by NR5A family. *Mol. Cell. Endocrinol.* (in press).
- ②Yazawa, T., Kawabe, S., Inaoka, Y., Okada, R., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M.,

Umezawa, A., Miyamoto, K.: Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol. Cell. Endocrinol.* (in press).

③Mizutani, T., Yazawa, T., Ju, Y., Imamichi, Y., Uesaka, M., Inaoka, Y., Matsuura, K., Kamiki, Y., Oki, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Identification of a novel distal control region upstream of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene that participates in SF-1-dependent chromatin architecture. *J. Biol. Chem.* 285(36), 28240-28251, 2010.

④Yazawa, T., Inaoka, Y., Okada, R., Mizutani, T., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Orisaka, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol. Endocrinol.* 24(3), 485-496, 2010.

⑤Yazawa, T., Inaoka, Y., Mizutani, T., Kuribayashi, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Liver Receptor Homolog-1 regulates the transcription of steroidogenic enzymes and induces the differentiation of mesenchymal stem cells into steroidogenic cells. *Endocrinology* 150(8), 3885-3893, 2009.

⑥Inaoka, Y., Yazawa, T., Mizutani, T., Kokame, K., Kangawa, K., Uesaka, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Regulation of P450 oxidoreductase by gonadotropins in rat ovary and its effect on estrogen production. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 16:6(1), 62, 2008.

⑦Yazawa, 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* 149(4), 1786-1792, 2008.

⑧ 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.* 75(5), 931-939, 2008.

学会発表

①Miyamoto, K.: Mechanism of stem cell differentiation into steroidogenic lineage.

14th International Congress of Endocrinology. Kyoto, 2010, 3, 27-30.

②Miyamoto, K., Mizutani, T., Yazawa, T.: Stem cell differentiation into steroidogenic cell lineages by NR5A family. XIV Adrenal Cortex Conference and the Keith Parker Memorial Symposium. Adrenal growth and development. San Diego, 2010, 6, 16-18.

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

(4) 原発性アルドステロン症 (PA) の  
診断基準の策定と治療法の検討