

コルチコイドの多寡なくコントロールする適切な治療法は未だ確立されていない。

今回、全国疫学調査のサブ解析として、成人身長、成人期の肥満および成人期の副腎ホルモン補充療法について解析した。

B. 研究方法

2003年1月1日～2007年12月31日の5年間に於けるCAH二次調査回収例より、21OHD症例を抽出した。成人身長の解析には、骨端線閉鎖有りの症例を用い、成人期の高度肥満および副腎ホルモン補充療法の解析には20歳以上の症例を抽出した(図1)

調査表での質問項目〔骨端線閉鎖時の身長および年齢、高度肥満(肥満度50%以上あるいはBMI30以上)の有無、グルココルチコイド(GC)の種類および投与量、フルドロコルチゾン(FC)投与の有無〕について解析した。各調査項目の欠損データは項目毎に除外した。

21OHDの病型は、塩喪失型(SW)、単純男化型(SV)、非古典型(NC)のいずれであるかの情報を得た。

2群間の量的データの解析には、Student t testあるいはMann-Whitney U testを用い、質的データの解析には χ^2 検定を用いた。3群間の解析ではOne-way ANOVAを用いた。また、2変量の関連については、単変量解析を行った。いずれの解析も、 $p<0.05$ を有意差ありとした。

C. 研究結果

【成人身長・高度肥満】

表1に、男女別の成人身長を示す。男性 $161.4 \pm 6.5\text{cm}$ ($-1.6 \pm 1.1\text{SD}$)、女性 150.8 ± 5.7 ($-1.4 \pm 1.1\text{SD}$)であり、両者に有意差を認めなかった。病型別の解析では、男性では、NCの症例は今回の解析には含まれなかったが、SWとSV間で有意差はなかった。一方、女性においては、NCは2例と少ないものの、成人身長 $-3.2 \pm 0.2\text{SD}$ とSWおよびSLよりも有意に低かった($p<0.05$)。高度肥満の有無による成人身長は、男女とも有意差を認めなかったが、高度肥満のない方が身長は高い傾向にあった。新生児マススクリーニング(MS)の開始前後において、男女とも有意差を認めなかったが、MS開始後の方が男女とも高い傾向にあった。FC投与の有無で成人身長を比較すると、女子では有意差はないが、男子ではFC投与有りでは $162.7 \pm 6.4\text{cm}$ ($-1.4 \pm 1.1\text{SD}$)と、無しの $158.0 \pm 5.8\text{cm}$ (-2.2 ± 1.0)より有意に身長が高かった($p<0.05$)。

成人身長到達年齢は、男性 14.4 ± 2.4 歳(N=18)、女性 14.8 ± 2.3 歳(N=57)であり、両者で有意差はなかった。成人身長と到達年齢の単変量解析を行うと、男子は有意な正相関を認めたが($r=0.653$, $p<0.003$)、女子では相関は認められなかった($r=0.147$, $p<0.274$) (図2)。

高度肥満の割合は、男子23%、女子16%であり、両者で有意差は認められなかった。また、病型間での差も認められなかった(表2)。

【ホルモン補充療法】

GC、FC投与についての、有効回答率はそれぞれ、95.1%、92.4%であった。これらの症例の年齢は 28.6 ± 7.8 歳と40歳以下の症例が大半を占めていた。使用されているGC製剤の種類とその割合を、男女別、病型別あるいは高度肥満の有無別に表3に示す。GC製剤の種類は、男女間で有意差無く、ヒドロコルチゾン（HC）が最も多く、それぞれ47%、61%で使用されていた。また、HCおよび同様に生体内でcortisolとなる酢酸コルチゾン（CA）単独投与を併せてHC群とすると、その割合は、男性で58%、女性で64%であった。他の症例は、合成GC製剤の単剤投与かHC群との併用投与がなされていた。合成GCとして最も使用量の多かったものがデキサメサゾン（D）単独投与で、男性29%、女性15%であった。HCとDの併用量を含めると、Dの割合は男性31%、女性26%であった。その他の合成GCとして、プレドニゾロン（P）、ベタメサゾン（B）が投与されていた。病型別、高度肥満の有無別でGC種類に違いは認められなかった。

HC群とそれ以外の合成GCを含む群（合成GC群）での年齢分布を検討したところ、男女とも両者間で有意差はないものの、女性のHC群の中央値は24歳、GC群の中央値は29歳とHC群で若い傾向にあった。

次にGCの投与量に違いがあるか、単剤投与の症例に限り、男女別、病型別、高度肥満の有無別あるいはFC投与の有無別に比較検討した（表4）。HCの投与量

は中央値で男性22.5mg、女性20.0mgであり、有意差を認めなかった。DおよびPも男女とも有意差を認めなかった。CAは症例数が少なかったが、男性37.5mg、女性11.25mgと男性で有意に投与量が多かった（ $p < 0.05$ ）。病型別あるいはFC投与の有無別では各GC製剤とも、投与量に違いは認められなかった。高度肥満の有無別では、高度肥満なしの方が有意にHC投与量は多かった。

FCが投与されている症例の割合を男女別、病型別に表5に示す。FC投与例は男性62%、女性67%で有意差は認めなかった（表5）。病型別では、SWでFC投与量は78%と有意に高率であったが（ $p < 0.0001$ ）、SVにおいても41%の症例にFCが投与されていた。NCは6例と症例数は少ないが、FC投与例はなかった。

病型毎にFCの投与の有無別でのGC製剤の投与量を検討すると、SWにおいて、FCが投与されている症例では、HCおよびD投与量の中央値はそれぞれ、20mg、0.38mgとSVの30mgおよび0.5mgより有意に少なかった（ $p < 0.05$ ）（図4）。

D. 考 察

成人身長は、近年のメタアナリシスの結果-1.38SD（JCEM 95: 4161-72, 2009）とほぼ同様であったが、MS開始前後で有意差は認められず、MSは成人身長改善に寄与しておらず、満足できる成人身長とはなっていないことが明らかとなった。今回の解析において、成人身長との関連が認められた事項は男女で相違が

あった。すなわち、男子においては、FC投与群は有意に高身長であること、成人身長到達年齢が高いほど、高身長である一方、女子においては、NC群は有意に低身長であることであった。これまでの報告では、FC投与でGC投与量の減量が可能となり、そのことが成人身長の改善に寄与することが示唆されている。今回、FC投与によりGC投与量は有意に低いが、成人身長改善には性差があることが示唆された。男子では、成人身長到達年齢が健常者より早かった一方、女子ではその傾向がないことも身長の性差に関連しているものと思われた。このことは、21OHDの思春期発来に性差があることが示唆され、今後小児期の治療についての詳細な解析が必要であろう。病型毎に身長予後については、これまでもNCで低身長傾向が強いことが報告されている。今回は例数が少ないため、今後の検討が必要である。高度肥満の有無と成人身長に関連は認められなかったが、高度肥満の頻度は一般人口に比し高いことが明らかとなった。肥満はGC過量投与に伴う可能性が示唆されているが、今回は高度肥満とGC投与量に影響を受けてはいなかった。しかし、BMI25~30に該当する肥満例としては検討できていない。これらの症例の解析が、今回、高度肥満例でHC投与が少なかったが、それが真に肥満の影響を受けているかを知る上でも、今後必要である。

成人期のGC補充療法は、多様であり、約60%はHC単独治療が行われ、残りは何らかの合成GCが使用されていた。投与量

としては、ほぼ推奨されている投与量であった。生殖年齢の女性では合成GCよりHCが推奨されているが、今回の検討では、HC群と合成GC群で有意差はないが、HC群は年齢が若い傾向にあった。しかしながら、40歳以下の症例がほとんどであり、高年齢者を含めた調査が必要である。高度肥満の有無で、GC製剤に違いはなかった。

E. 結 論

今回、日本の成人21OHD患者の身長、高度肥満の有無、GCおよびFC投与の実態を明らかにした。

F. 研究発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

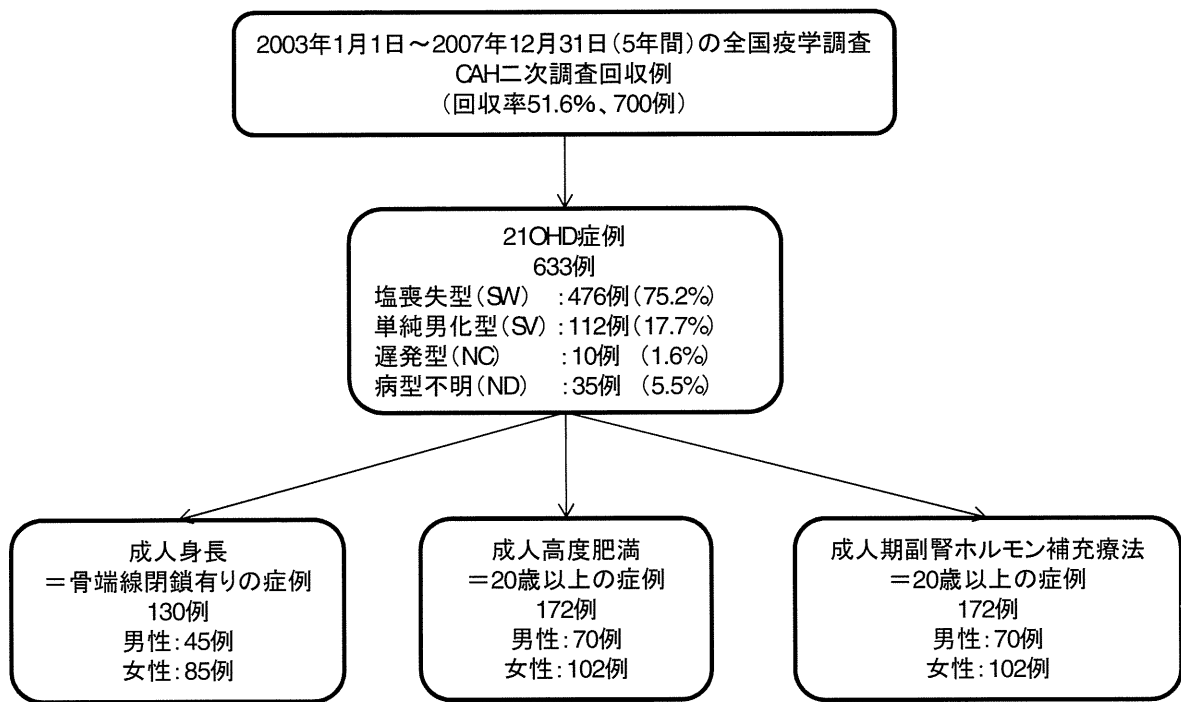


図1 対象症例

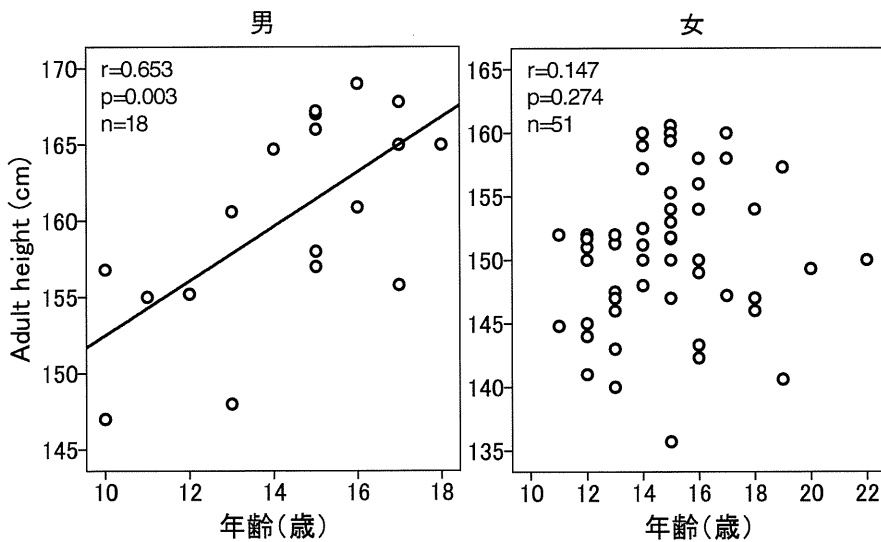


図2 成人身長と成人身長到達年齢の相関

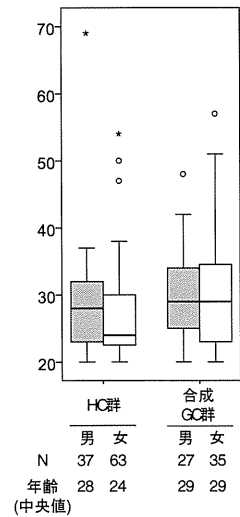


図3 HC群と合成GC群の年齢分布

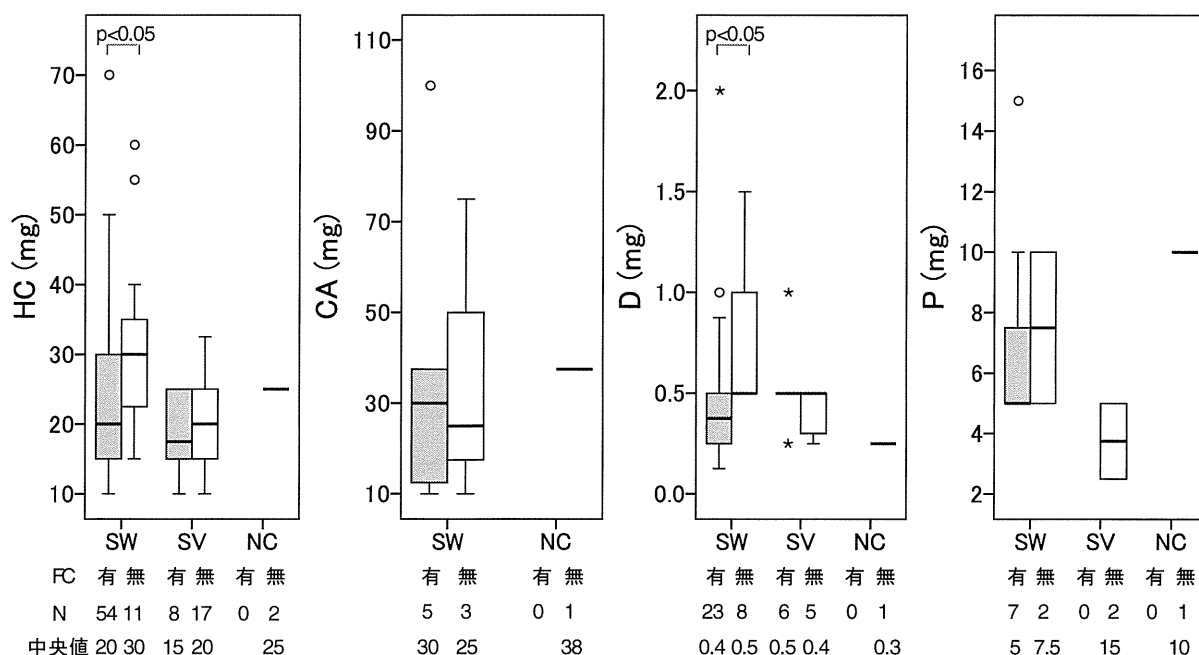


図4 フルドロコルチゾン (FC) 投与の有無による各病型でのGC製剤とその投与量

表1 成人身長

		N	身長 (cm)	身長SD score			N	身長 (cm)	身長SD score
男性	合計	35	161.4±6.5	-1.6±1.1	女性	合計	78	150.8±5.7	-1.4±1.1
病型	SW	28	161.5±6.3	-1.6±1.1	病型	SW	57	151.2±5.2	-1.3±1.0
	SV	7	160.8±8.0	-1.7±1.4		SV	19	150.7±6.6	-1.4±1.3
	NC	0	—	—		NC	2	141.0±1.4	-3.2±0.3**
高度肥満	有	6	162.3±5.4	-1.5±0.9	高度肥満	有	9	148.1±6.5	-1.9±1.1
	無	25	161.5±7.0	-1.6±1.2		無	69	151.2±5.5	-1.3±1.0
MS	開始前	21	160.5±6.4	-1.8±1.1	MS	開始前	45	150.1±5.9	-1.5±1.1
	開始後	14	162.7±6.7	-1.4±1.2		開始後	33	151.8±5.4	-1.2±1.0
FC投与	有	25	162.7±6.4	-1.4±1.1*	FC投与	有	62	151.0±5.0	-1.3±0.9
	無	10	158.0±5.8	-2.2±1.0		無	17	151.5±8.1	-1.3±1.5

*p<0.05 FC投与有 vs. 無 (男性)

**p<0.05 NC vs. SW or SV (女性)

表2 高度肥満の有無

男女別		病型別			全体
男	女	SW	SV	NC	
23%	16%	19%	23%	0%	19%
(14/61)	(14/90)	(23/119)	(7/30)	(6/6)	(28/151)

表3 GC製剤の種類

	合計	HC	CA	D	B	P	HC+D	CA+D	HC+B	HC+P	
性別	男	64 (100%)	30 (47%)	7 (11%)	13 (20%)	0 (0%)	3 (5%)	7 (11%)	0 (0%)	1 (2%)	3 (5%)
	女	98 (100%)	60 (61%)	3 (3%)	15 (15%)	1 (1%)	5 (5%)	11 (11%)	1 (1%)	0 (0%)	2 (2%)
病型	SW	124 (100%)	69 (56%)	8 (6%)	23 (19%)	1 (1%)	4 (3%)	12 (10%)	1 (1%)	1 (1%)	5 (4%)
	SV	34 (100%)	20 (59%)	0 (0%)	5 (15%)	0 (0%)	2 (6%)	6 (18%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)
	NC	6 (100%)	2 (33%)	1 (17%)	1 (17%)	0 (0%)	2 (33%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
高度肥満	有	27 (100%)	12 (44%)	2 (7%)	3 (11%)	1 (4%)	0 (0%)	7 (26%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (7%)
	無	125 (100%)	73 (58%)	6 (5%)	24 (19%)	0 (0%)	7 (6%)	11 (9%)	0 (0%)	1 (1%)	4 (3%)

表4 GC製剤の投与量

		HC(mg)	CA (mg)	D (mg)	P (mg)
性別	男	22.5 (10-70) [n=36]	37.5 (25-100) [n=5]*	0.50 (0.25-1.0) [n=19]	5.0 (5.0-10) [n=6]
	女	20 (5-60) [n=58]	11.3 (10-30) [n=4]	0.50 (0.15-2.0) [n=27]	7.5 (5.0-15) [n=6]
病型	SW	25 (10-70) [n=67]	27.5 (10-100) [n=8]	0.5 (0.12-2) [n=34]	5.0 (5.0-15) [n=9]
	SV	20 (10-30) [n=25]	-	0.5 (0.25-1.0) [n=11]	5.0 (2.0-10) [n=3]
	NC	25 (25, 25) [n=2]	37.5 [n=1]	0.25 [n=1]	10 [n=1]
高度肥満	有	20 (10-50) [n=17]**	17.5 (10, 25) [n=2]	0.35 (0.20-2.0) [n=10]	5.0 (5.0, 5.0) [n=2]
	無	25 (10-70) [n=72]	37.5 (10-100) [n=5]	0.5 (0.12-1.0) [n=33]	7.5 (2.0-15) [n=10]
FC投与	有	20 (10-70) [n=64]	30 (10-100) [n=5]	0.4 (0.12-2.0) [n=31]	5.0 (5.0-15) [n=7]
	無	25 (5-60) [n=35]	30 (10-75) [n=4]	0.5 (0.25-1.5) [n=15]	5.0 (2.0-10) [n=5]

*p<0.05 男vs. 女 (CA)、 **p<0.05 高度肥満有 vs. 無 (HC)

表5 FC投与の有無

男女別		病型別			全体
男	女	SW	SV	NC	
62%	67%	78%	41%	0%	19%
(43/69)	(66/98)	(99/127)	(14/34)	(6/6)	(28/151)

p<0.0001 SW vs. SV

**(3) 副腎低形成症の基盤研究としての
副腎発生・分化機構の基礎研究**

「SF-1/Ad4BP誘導性ステロイド産生細胞の
アルドステロン産生について」

研究分担者 柳瀬 敏彦 福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科
研究協力者 田中 智子 同 上
明比 祐子 同 上

【研究要旨】

我々はこれまでの研究で、間葉系幹細胞にSF-1/Ad4BPを遺伝子導入し、ACTH・LH応答性を有するステロイド産生細胞へ形質転換することを明らかにした。このステロイド産生細胞は、培地中に副腎ステロイドと性腺ステロイドを分泌し、アルドステロン産生も検出されたがCYP11B2 cDNAは検出されなかった。本研究において間葉系幹細胞におけるアンジオテンシン II 受容体1型 (AT1)の発現を認めたため、SF-1/Ad4BP誘導性ステロイド産生細胞をアンジオテンシンII (AngII) にて刺激したところ、AngIIによってSF-1/Ad4BP誘導性ステロイド産生細胞の培地中のコルチコステロン、アルドステロン、コルチゾール、テストステロン濃度が増加した。間葉系幹細胞におけるCYP11B2 cDNA はリアルタイムPCRにて検出され、SF-1/Ad4BPの遺伝子導入のみではその発現量に変化を認めなかったが、AngII によってCYP11B2 の発現誘導を認めた。AngIIによるアルドステロン産生亢進はAT1阻害薬によって消失した。これらの結果より、SF-1/Ad4BP誘導性ステロイド産生細胞は AngII-AngII 受容体経路によりステロイド産生が調節されていることが判明した。

A. 研究目的

間葉系幹細胞は主に骨髄や脂肪組織中に存在する成体幹細胞で多分化能を有する。SF-1/Ad4BPはステロイド合成酵素の発現を調節する転写因子で副腎、性腺、下垂体の発生・分化におけるマスターレギュレーターである(1-5)。我々はこれまでの研究で、ウイルスベクターを用いてSF-1/Ad4BPを間葉系幹細胞に遺伝子導入し、ACTHおよびLH応答性を有するステロイド産生細胞へ形質転換することを

明らかにした(6-8)。このSF-1/Ad4BP誘導性ステロイド産生細胞は、培地中に副腎ステロイド (コルチコステロン、アルドステロン、コルチゾール、DHEA) と性腺ステロイド (テストステロン、エストラジオール) を分泌し、ステロイド合成酵素 (StAR, CYP11A1, 3 β -HSD2, CYP21A2, CYP17A1, 17 β -HSD3, CYP19A1) が発現誘導された。SF-1/Ad4BP誘導性ステロイド産生細胞のアルドステロン分泌は、EIA法とLC-MS/MS法によって検出されたが、

CYP11B2 cDNAはリアルタイムPCR法で検出されなかった。生体内においてアルドステロンは副腎球状層から分泌され、アンジオテンシンII (Ang II)、ACTH、KClなどが分泌を刺激する。リアルタイムPCR および ウエスタンブロットの結果、間葉系幹細胞においてアンジオテンシン II受容体1型 (AT1) が内因性に発現していることを確認した。本研究では、SF-1/Ad4BP誘導性ステロイド産生細胞を Ang II にて刺激し、ステロイド産生への影響について検討した。

B. 研究方法

1. 間葉系幹細胞

ヒト骨髄単核球 (Lonza社)を間葉系幹細胞用培地 (Invitrogen 社) にて4週間培養し、接着細胞を実験に用いた。

2. レンチウイルスの作製

レンチウイルスベクタープラスミド (CSII-EF-RfA-IRES2-Venus) (理研バイオリソースセンターより供与)の EF1 α プロモーター下流にヒト SF-1/Ad4BP cDNA を組み込み CSII-EF-hSF-1 プラスミドを作製した。293T 細胞へ CAG-HIV-g/p、CMV-VSV-G-RSV-Rev および CSII-EF-SF-1 または CSII-EF をコトランスフェクションし、培養3日目の培地を回収しウイルス液とした。力価はフローサイトメーターにて決定した Venus 陽性細胞率と感染時に用いた間葉系幹細胞の細胞数より算出した。

3. ウイルス感染とAngII刺激

24-well collagen type 1 plate の1

ウェルあたり 1x10⁴ 間葉系幹細胞を播種し、Multiplicity of infection (MOI) =20にて一晩感染後、培地交換した。感染より3日目と6日目に培地交換し、11日目に0、0.1、1、10 nM AngII を含む培地にて細胞を刺激し、13日目に培養上清を回収した。このとき細胞より total RNA を調整した。

4. ステロイドホルモン産生

EIAキット (Cayman chemical社)にて、培地中のコルチコステロン、アルドステロン、コルチゾール、テストステロン濃度を定量した。また細胞より total RNA を精製し、RT後、リアルタイムPCR にてステロイド合成酵素の発現量について検討した。各遺伝子の発現量は、 β -actinの発現量に対する相対発現として算出した。

C. 結果

1. 間葉系幹細胞におけるAT1の発現とSF-1/Ad4BP導入によるAT1発現への影響について

間葉系幹細胞におけるAT1の発現をリアルタイムPCRにて検討した結果、5ドナー骨髄由来間葉系幹細胞および1ドナー由来脂肪組織由来間葉系幹細胞において、AT1の発現を検出した(図1)。間葉系幹細胞におけるAT1 mRNAの発現レベルは胎盤の100分の1程度であった。LV-MOCK, LV-SF1をMOI=20にて感染し、AT1タンパクの発現をウエスタンブロットにて検討した結果、LV-MOCK, LV-SF1感染細

胞にAT1タンパクの発現が検出され、MOCKとSF-1で同程度であった。LV-SF1のウイルス量をMOI=0、12.5、25、50、100、200にて感染後、リアルタイムPCRにてAT1の発現レベルを検討した結果、MOI=50、100、200にてAT1 mRNA 発現レベルの増加を認めた。

2. SF-1/Ad4BP誘導性ステロイド産生細胞へのAngII の影響

LV-SF1 感染細胞培地中のコルチコステロン、アルドステロン、テストステロン、コルチゾール濃度はLV-MOCK感染細胞と比較して増加を示し、LV-SF1感染細胞をAngIIにて48時間刺激した結果、培地中のコルチコステロン、アルドステロン、コルチゾール、テストステロンがさらに増加した。3.4 nM ACTHも同様にLV-SF1感染細胞のステロイド分泌を亢進したが、50 mM KClは影響しなかった(図2)。LV-MOCK感染細胞の培地中ステロイド濃度はAngIIによって変化しなかった。このときリアルタイムPCR法にてアルドステロン合成酵素CYP11B2発現を解析した結果、LV-MOCK およびLV-SF1感染細胞においてCYP11B2 cDNAは検出され、発現レベルはMOCKとSF-1で同程度であった。LV-MOCK 感染細胞におけるCYP11B2発現は、AngIIによって変化しなかったが、LV-SF1感染細胞をAngIIにて刺激した結果、CYP11B2の発現量が顕著に増加した。CYP11B2

は、3.4 nM ACTHによっても誘導され、50 mM KCl 刺激では誘導されなかった(図2)。酵素CYP11B1 cDNAは、LV-MOCK感染細胞では検出されず、LV-SF1感染細胞によって発現誘導した。LV-SF1感染細胞におけるCYP11B1の発現は、ACTHおよびKClによって増加したが、AngII刺激では検出されなかった。AT1ブロッカー、Losartan はLV-SF1感染細胞におけるAngIIによるアルドステロン産生の増加をキャンセルした(図3)。また、Losartan 投与時のアルドステロン濃度は、AngII刺激なしのLV-SF1感染細胞のアルドステロン濃度より低値であった。

D. 考 察

間葉系幹細胞におけるレニン-アンジオテンシン系の発現はこれまでに報告されており、脂肪細胞への分化誘導をAngII はAT1を介して抑制的に作用することが示されている(9)。本研究において骨髄間葉系幹細胞におけるAT1の発現を検討し、間葉系幹細胞におけるAT1の発現を確認した。PCRレベルではAT2の発現も検出されたが、間葉系幹細胞においてはAT1の発現が優位であった。タンパクレベルではLV-SF1感染(MOI=20)によってAT1の発現は変化しなかったが、AT1の mRNA発現量は、LV-SF1のdose に依存して増加傾向を示した。AT1 遺伝子の上流にはSF-1結合部位が予測されるため、AT1はSF-1の標的遺伝子の可能性が考えられる。

ACTH受容体やLH受容体がSF-1導入によって発現誘導されるのと同様に(6)、AT1の発現が、SF-1によって誘導されるかどうか今後の検討が必要である。

間葉系幹細胞におけるAT1の発現が確認されたので、AngII刺激によるステロイド産生への影響について解析した結果、AngIIはLV-SF1感染細胞のステロイド産生を亢進した。AngIIと同様にACTHもステロイド産生を亢進したが、KClでは変化しなかった。骨髄由来間葉系幹細胞におけるATP依存性カリウムイオンチャンネルの発現パターンは骨芽細胞への分化誘導によって変化することが報告されているが(10)、アルドステロン産生に関連するカリウムイオンチャンネルの発現パターンについては不明である。AngIIによるステロイド産生亢進は、AT1ブロッカーLosartanとの同時投与でキャンセルされたため、AngIIによるステロイド産生亢進はAT1を介すると考えられる。

AngIIによるアルドステロン産生の亢進は、AngIIシグナル下流でCYP11B2の発現が誘導されたためと推定される。本研究においてLV-SF1感染細胞におけるCYP11B2の発現は、リアルタイムPCRにて検出されたが、発現レベルはMOCKと同程度を示した。CYP11A1などのステロイド合成酵素はSF-1の導入によって誘導されるが、CYP11B2はSF-1の導入のみでは発現誘導されず、AngIIによって顕著に誘導された。球状層やH295R細胞ではSF-1はCYP11B2遺伝子の転写調節のAd5に結合し転写抑制に働き、Ad5

にはNR2FやNR4Aファミリーが結合することで転写を促進すると考えられている。AngIIは、細胞内カルシウム濃度を増加させカルモジュリン-CaMKシグナルを活性化し、転写因子ATF1、CREBがリン酸化されて転写調節領域(Ad1)に結合してCYP11B2の転写を促進すると考えられている(11)。間葉系幹細胞では内因性のSF1は発現しておらず、LV-MOCK感染細胞をAngII刺激してもCYP11B2は誘導されなかった。しかし、LV-SF1感染細胞ではAngIIによって顕著な発現誘導を示したことから、間葉系幹細胞におけるCYP11B2の発現誘導には、SF-1とAngIIが必要と考えられるが、CYP11B2の転写促進機序については今後の検討が必要である。

E. 結論

SF-1/Ad4BP誘導性ステロイド産生細胞のステロイド産生は、AngII-AT1経路によって調節されることが示唆された。

参考文献

1. Omura T, Morohashi K 1995 Gene regulation of steroidogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 53:19-25
2. Morohashi KI, Omura T 1996 Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. *Faseb J*

- 10:1569-1577
3. Parker KL, Schimmer BP 1997 Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 18:361-377
 4. Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen WH, Nachtigal MW, Abbud R, Nilson JH, Parker KL 1994 The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* 8:2302-2312
 5. Luo X, Ikeda Y, Parker KL 1994 A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481-490
 6. Tanaka T, Gondo S, Okabe T, Ohe K, Shirohzu H, Morinaga H, Nomura M, Tani K, Takayanagi R, Nawata H, Yanase T 2007 Steroidogenic factor 1/adrenal 4 binding protein transforms human bone marrow mesenchymal cells into steroidogenic cells. *J Mol Endocrinol* 39:343-350
 7. Gondo S, Okabe T, Tanaka T, Morinaga H, Nomura M, Takayanagi R, Nawata H, Yanase T 2008 Adipose tissue-derived and bone marrow-derived mesenchymal cells develop into different lineage of steroidogenic cells by forced expression of steroidogenic factor 1. *Endocrinology* 149:4717-4725
 8. Gondo S, Yanase T, Okabe T, Tanaka T, Morinaga H, Nomura M, Goto K, Nawata H 2004 SF-1/Ad4BP transforms primary long-term cultured bone marrow cells into ACTH-responsive steroidogenic cells. *Genes Cells* 9:1239-1247
 9. Matsushita K, Wu Y, Okamoto Y, Pratt RE, Dzau VJ 2006 Local renin angiotensin expression regulates human mesenchymal stem cell differentiation to adipocytes. *Hypertension* 48:1095-1102
 10. Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Veh RW, Wagner W, Derst C 2011 KATP channels in mesenchymal stromal stem cells: strong up-regulation of Kir6.2 subunits upon osteogenic differentiation. *Tissue Cell* 43:331-336
 11. Hattangady NG, Olala LO, Bollag WB, Rainey WE 2011 Acute and chronic regulation of aldosterone production. *Mol Cell Endocrinol*

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Gao R, Zhao L, Liu X, Rowan B, Wabitsch M, Edwards DP, Nishi Y,

- Yanase T, Yu Q, Dong Y
Methylseleninic Acid is a Novel
Suppressor of Aromatase Expression.
J Endocrinol. in press.
- 2) Bao B, Jiang J, Yanase T, Nishi Y,
Morgan JR Connexon-mediated cell
adhesion drives microtissue
self-assembly. *Faseb J.* 2011 25(1):
255-264.
- 3) 明比祐子、柳瀬敏彦 特集：安心・安
全なステロイド療法 副腎不全におけ
る副腎ホルモン補充療法 臨床と研究
88：43-49、2011
- 4) 柳瀬敏彦、竹之下博正、明比祐子 男
子性腺機能低下症の鑑別診断と治療
Medicina 11：1938-1941、2011
- 5) 柳瀬敏彦、永石綾子、明比祐子 特集：
これからの高齢者医療 <高齢者の特
性を理解する・生理機能の加齢変動>
内分泌・代謝機能の加齢変動 内科
108：957-959、2011
- 6) 高柳涼一、明比祐子、柳瀬敏彦 内分
泌線腫瘍 -基礎・臨床研究のアップ
デート- Subclinical Cushing症候群
の新しい診断基準日本臨床 69 (増刊
号2) 727-731、2011
- 7) 明比祐子、柳瀬敏彦 内分泌腺腫瘍
内分泌生理学的調節機構 副腎 日本
臨床 69 (増刊号2) 90-94、2011
- 8) 柳瀬敏彦、明比 祐子 アジソン症候
群 中山書店「症候群ハンドブック」
Pp 412、2011
- 9) 柳瀬敏彦 内分泌画像検査・診断マ
ニュアル 先天性副腎過形成 診断と
治療社 (東京) Pp182-183、2011
- 11) 柳瀬敏彦 内分泌画像検査・診断マ
ニュアル アジソン病 診断と治療社
(東京) Pp 181、2011
2. 学会発表
- 1) 柳瀬敏彦 教育講演17「グルココルチ
コイドの作用と副作用：ステロイド性
糖尿病を中心に」 第84回日本内分泌
学会学術総会 (神戸) 2011.4.21-23
- 2) 柳瀬敏彦 教育講演7 「糖尿病診療
のピットフォール：内分泌性糖尿病の
病態」第54回日本糖尿病学会年次学術
集会 (札幌) 2011.5.19-21
- 3) 野見山 崇、柳瀬敏彦 シンポジウム
2「核内受容体と内分泌・代謝疾患アッ
プデート」動脈硬化病変を制御する核
内オーファン受容体NR4A3/NOR1
第84回日本内分泌学会学術総会 (神
戸) 2011. 4.21-23
- 4) 柳瀬敏彦、明比祐子 クリニカルア
ワー2「副腎不全の治療」QOL、ホル
モン動態から見たステロイド補充療法
のEBM 第84回日本内分泌学会学術総
会 (神戸) 2011. 4.21-23
- 5) 明比祐子、高柳涼一、柳瀬敏彦 クリ
ニカルアワー「サブクリニカルクッシ
ング症候群の診断基準と予後」副腎性
サブクリニカルクッシング症候群診断
基準再評価の試み 第84回日本内分泌
学会学術総会 (神戸) 2011. 4.21-23
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。) 該当なし

ステロイド産生細胞分化・再生に関する研究

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】

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。これまでの研究成果として、SF-1だけでなく同じファミリーに属する転写因子LRH-1をヒト骨髄間葉系幹細胞に導入しcAMP処理することによりステロイドホルモン産生能を持つ細胞株を得ることを報告した。本年度は幹細胞からステロイド産生細胞への分化誘導系を用いて、新たなSF-1標的遺伝子の同定を試みた。ゲノムワイドのChIP-on-chip assayおよびマイクロアレイによる網羅的発現解析により、分化誘導に伴うステロイドホルモン合成に関わると想定される新たなSF-1標的遺伝子を同定した。本年度は、そのうちヘム合成の律速酵素であるALAS1に着目して解析を行った。

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自律的な分泌調節が可能な再生医療の開発が望まれる。私どもはこういった観点に立って、幹細胞からフィードバック機能を備えた副腎皮質ホルモン産生細胞の作製を試みている。骨髄間葉系幹細胞は成体から比較的容易に採取できること、さらにES細胞ほどではないにしろ様々な細胞に分化しうることから再生医療への

応用に適した幹細胞である。本研究の目的は、骨髄間葉系幹細胞を用いて副腎皮質ホルモン産生細胞を創り出すと同時に、その分化メカニズムを分子レベルで明らかにすることである。本年度は、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過程における、新たなSF-1標的遺伝子を検索することで、新たなステロイドホルモン合成関連遺伝子の同定を目指した。

B. 研究方法

1. ヒト間葉系幹細胞にMycタグの付いたSF-1を導入しステロイドホルモン産生細胞へと分化誘導した。この細胞を用いて、Myc抗体によるゲノムワイ

ドのChIP-on-chip assayを行い、分化誘導に伴うSF-1結合部位を同定した。さらにDNAマイクロアレイを用いた網羅的発現解析により、分化誘導に伴う、遺伝子発現変化を解析した。

2. ChIP-on-chip assayおよび遺伝子発現解析の結果より、新たなSF-1標的遺伝子を同定し、その中からALAS1に着目し、その遺伝子発現調節機構を解析した。
3. ALAS1遺伝子上流約5kbを用いてLuciferaseによるレポーターアッセイを行い、ALAS1遺伝子の発現調節を解析した。
4. ステロイドホルモン産生細胞株であるKGN細胞およびH295R細胞を用いて、SF-1およびLRH-1の強制発現およびknock-downを行い、ALAS1発現におけるNR5Aファミリーの関与を解析した。
5. 転写共役因子であるPGC-1aのALAS1遺伝子発現における役割を明らかにするため、SF-1との協調作用をレポーターアッセイを用いて解析した。
6. ALAS1のステロイドホルモン産生における役割を明らかにするために、ステロイドホルモン産生細胞であるKGN細胞およびY1細胞を用いて、ALAS1遺伝子発現をknock-downし、ステロイド産生の初期産物であるプロゲステロン産生をELISA法により測定した。

C. 研究結果

1. Luciferaseレポーターアッセイの結果、ALAS1遺伝子上流3.5 kb付近に存在する2か所のSF-1結合サイトが、ALAS1遺伝子の発現に重要であることが明らかとなった。このサイトには、SF-1だけでなくもう一つのNR5AファミリーであるLRH-1も結合することが明らかとなった。
2. 一方、LRH-1が発現する肝臓由来の細胞であるHepG2においては、これらのSF-1サイトにLRH-1は結合せず、またALAS1の転写も活性化されなかった。
3. PGC-1aはSF-1およびLRH-1のステロイドホルモン合成関連遺伝子群に対する転写活性化能を著しく増強するが、同様にALAS1遺伝子のSF-1による活性化を強く増強した。
4. ステロイドホルモン産生細胞でのALAS1遺伝子発現をknock-downすると、細胞からのプロゲステロン産生が抑制された。

D. 考察

ALAS1は、ヘム合成の律速酵素であり、各組織においてP450酵素などの補因子となるヘムを供給するために必須の遺伝子である。全身の組織で必要とされるため、ハウスキーピング遺伝子と考えられているが、本研究によりステロイドホルモン産生細胞においては、NR5Aファミリーの標的遺伝子として、ステロイドホルモン合成酵素にヘムを供給しているものと思われる。このように、ハウスキー

ピング遺伝子と考えられている遺伝子群においても組織特異的な転写調節機構が存在することが示された。このことは、肝臓由来のHepG2細胞においては、NR5Aファミリーによる転写活性化が生じないことから支持される。

一方、様々な転写因子の共役因子として働くPGC-1 α は、ALAS1遺伝子発現においても、SF-1の作用を著しく増強した。これは多くのステロイドホルモン合成酵素遺伝子がPGC-1 α により同様の発現調節を受けることと共通している。

これらの事から、ステロイドホルモン産生組織においてはALAS1もステロイドホルモン合成関連遺伝子群として共通の転写調節を受けていると推察される。またALAS1のknock-downにより、ステロイドホルモンの初期産物であるプロゲステロンの産生が減少したことからも、ALAS1が新たなステロイドホルモン合成関連遺伝子であることが示された。

E. 結 論

本研究により、ヘム合成の律速酵素であるALAS1がステロイドホルモン産生組織においては、新たなNR5Aファミリーの標的遺伝子の一つとしてステロイドホルモン産生に関わっていることが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

① Soneda, S., Yazawa, T., Fukami,

M., Adachi, M., Mizota, M., Fujieda, K., Miyamoto, K., Ogata, T. : Proximal promoter of the cytochrome P450 oxidoreductase gene: Identification of microdeletions involving the untranslated exon 1 and critical function of the SP1 binding sites. *J Clin Endocrin Metab.* 96(11), 1881-1887, 2011.

② Yazawa, 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.* 336, 127-132, 2011.

③ Hatanaka, A., Chen, B., Sun, J.Q., Mano, Y., Funakoshi, M., Kobayashi, H., Ju, Y., Mizutani, T., Shinmyozu, K., Nakayama, J., Miyamoto, K., Uchida, H., Oki, M.: Fub1p, a novel protein isolated by boundary screening, binds the proteasome complex. *Genes & Genetic Systems* (in press)

2. 総 説

① Miyamoto, K., Yazawa, T., Mizutani, T., Imamichi, Y., Kawabe, S., Kanno, M., Matsumura, T., Ju, Y., Umezawa,

- A.: Stem cell differentiation into steroidogenic cell lineages by NR5A family. *Mol. Cell. Endocrinol.* 336, 123-126, 2011.
- ② 水谷哲也、宮本 薫：ステロイド合成律速因子であるコレステロール輸送タンパク質StARの新たな転写調節機構。生化学。83(5)、388-391、2011。
- ③ 水谷哲也、宮本 薫：クロマチン高次構造変換解析による転写調節領域の同定。日本生殖内分泌学会雑誌。16、27-29、2011。
- ④ 矢澤隆志、梅澤明弘、宮本 薫：卵巣におけるステロイドホルモン合成に関わる遺伝子群の転写調節機構。日本生殖内分泌学会雑誌。16、5-8、2011。
- ⑤ 宮本 薫：卵胞発育とエピジェネティクス—StAR遺伝子を中心として—。特集 卵と卵胞の発育・成熟、卵胞の発育と成熟(4)。HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY. 18(4)、55-60、2011。
- ⑥ 矢澤隆志、宮本 薫：万能細胞由来のステロイドホルモン産生細胞の創出。医学のあゆみ。239(14)、1445-1450、2011。
3. 学会発表
(シンポジウム)
- ① 宮本 薫：卵巣顆粒膜細胞における転写因子とその調節機構。第84回日本内分泌学会学術集会。教育講演9。神戸、2011.4.21-23。日本生殖内分泌学会雑誌。87(1)、140、2011。
- ② 矢澤隆志：幹細胞を用いたステロイドホルモン産生機構の解明。平成23年度日本動物学会中部支部大会。公開シンポジウム1：生殖とステロイドホルモン。福井、2011.7.30-31。抄録集、13、2011。
- ③ 矢澤隆志：幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の作製。第29回内分泌代謝学サマーセミナー。第7回内分泌学会若手発表。仙台、2011.7.7-9。
- ④ 矢澤隆志：ステロイドホルモン産生の分子機構の解明。平成23年度動物学会奨励賞受賞講演。日本動物学会第82回旭川大会。旭川、2011.9.21-23。予稿集、24、2011。
- ⑤ 水谷哲也：卵巣におけるクロマチン構造変換を介した転写調節機構。第16回日本生殖内分泌学会学術集会。性腺における新たな転写制御とエピジェネティクス。東京、2011.11.19。抄録集、18、2011。
- (一般演題)
- ① Mizutani, T., Ju, Y., Imamichi, Y., Matsumura, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Osaki, T., Minamino, N., Umezawa, A., Miyamoto, K. : Transcriptional regulation of steroidogenic-related genes by SF-1 through its dependent alternations of chromatin structure. *Experimental Biology* 2011. Washington, DC., 2011, 4, 9-13.
- ② 水谷哲也、具 云峰、今道力敬、松村

- 健大、矢澤隆志、河邊真也、菅野真史、松浦かおる、上木康衣、梅澤明弘、尾崎 司、南野直人、宮本 薫：SF-1によるクロマチン構造変換を介した新たな転写調節機構。第84回日本内分泌学会学術集会。神戸、2011.4.21-23、日本生殖内分泌学会雑誌。87(1)、282、2011。
- ③ 矢澤隆志、稲岡齊彦、河邊真也、水谷哲也、今道力敬、梅澤明弘、宮本薫：ES細胞からのステロイドホルモン産生細胞への分化誘導。第84回日本内分泌学会学術集会。神戸、2011.4.21-23、日本生殖内分泌学会雑誌。87(1)、283、2011。
- ④ 今道力敬、水谷哲也、具 云峰、松村健大、矢澤隆志、河邊真也、菅野真史、梅澤明弘、小亀浩一、寒川賢治、宮本 薫：転写因子SF-1の新たな標的遺伝子の同定。第84回日本内分泌学会学術集会。神戸、2011.4.21-23、日本生殖内分泌学会雑誌。87(1)、329、2011。
- ⑤ 具 云峰、水谷哲也、今道力敬、松村健大、矢澤隆志、河邊真也、菅野真史、宮本 薫：新たなSF-1標的遺伝子ALASの転写調節とステロイドホルモン産生に対する役割。第84回日本内分泌学会学術集会。神戸、2011.4.21-23、日本生殖内分泌学会雑誌。87(1)、330、2011。
- ⑥ 松村健大、今道力敬、水谷哲也、具 云峰、矢澤隆志、河邊真也、菅野真史、梅澤明弘、赤木好男、宮本 薫：転写因子SF-1によるGSTA3の転写調節について。第84回日本内分泌学会学術集会。神戸、2011.4.21-23、日本生殖内分泌学会雑誌。87(1)、360、2011。
- ⑦ 菅野真史、矢澤隆志、河邊真也、宇佐美陽子、水谷哲也、今道力敬、具 云峰、松村健大、藤枝重治、宮本 薫：ES細胞特異的LRH1の発現調節機構の解析。平成23年度日本動物学会中部支部大会。福井、2011.7.30-31、抄録集、17、2011。
- ⑧ 河邊真也、矢澤隆志、菅野真史、宇佐美陽子、水谷哲也、今道力敬、具 云峰、松村健大、宮本 薫：転写因子LRH-1の卵巣特異的転写調節機構。平成23年度日本動物学会中部支部大会。福井、2011.7.30-31、抄録集、40、2011。
- ⑨ 宇佐美陽子、矢澤隆志、河邊真也、菅野真史、山崎由希子、水谷哲也、今道力敬、具 云峰、松村健大、宮本薫：電子伝達体p450オキシドレダクターゼの転写調節機構。平成23年度日本動物学会中部支部大会。福井、2011.7.30-31、抄録集、39、2011。
- ⑩ 今道力敬、水谷哲也、具 云峰、松村健大、矢澤隆志、河邊真也、菅野真史、宮本 薫：ヒト顆粒膜細胞由来KGN細胞におけるFDAX1およびFDXR遺伝子の転写制御機構。第16回日本生殖内分泌学会学術集会。東京、2011.11.19、抄録集、26、2011。
- ⑪ 具 云峰、水谷哲也、今道力敬、松村健大、矢澤隆志、河邊真也、菅野真史、宮本 薫：ヘム合成律速因子

- ALAS1の新たな転写調節機構と機能解析。第16回日本生殖内分泌学会学術集会。東京、2011.1.19.抄録集、30、2011。
- ⑫ 松村健大、今道力敬、水谷哲也、具云峰、矢澤隆志、菅野真史、河邊真也、稲谷大、赤木好男、宮本薫：ステロイドホルモン産生細胞におけるGSTA3の転写調節について。第16回日本生殖内分泌学会学術集会。東京、2011.1.19、抄録集、31、2011。
- ⑬ 河邊真也、矢澤隆志、菅野真史、宇佐美陽子、水谷哲也、今道力敬、具云峰、松村健大、宮本薫：卵巣顆粒膜細胞における転写因子LRH-1の転写調節機構。第36回日本比較内分泌学会大会。東京、2011.11.23-26。
- ⑭ 矢澤隆志、河邊真也、菅野真史、宇佐美陽子、水谷哲也、今道力敬、具云峰、松村健大、宮本薫：排卵におけるアンドロジェンの役割。第36回日本比較内分泌学会大会。東京、2011.11.23-25。
- ⑮ 今道力敬、水谷哲也、具云峰、松村健大、矢澤隆志、河邊真也、菅野真史、梅澤明弘、宮本薫：転写因子SF-1によるFDX1およびFDXRの転写制御。第34回日本分子生物学会年会。横浜、2011.12.13-16。
- ⑯ 松村健大、今道力敬、水谷哲也、具云峰、矢澤隆志、菅野真史、河邊真也、梅澤明弘、稲谷大、赤木好男、宮本薫：Glutathione S-transferase A3(GSTA3) プロモーター領域における転写制御。第34回日本分子生物学会年会。横浜、2011.12.13-16。
- ⑰ Ju, Y., Mizuani, T., Imamichi, Y., Matsumura, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Delta-aminolevulinate synthase 1(ALAS1) is a novel steroidogenic factor-1 (SF-1) target gene important for steroidogenesis. 第34回日本分子生物学会年会。横浜、2011.12.13-16。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 許取得（出願中）

特願2011-284430（H23.12.26）体外受精におけるヒト成熟卵子マーカー