

図1  
KLF15発現アデノウイルスシステムのラット前脛骨筋への導入によるKLF15発現量の変化

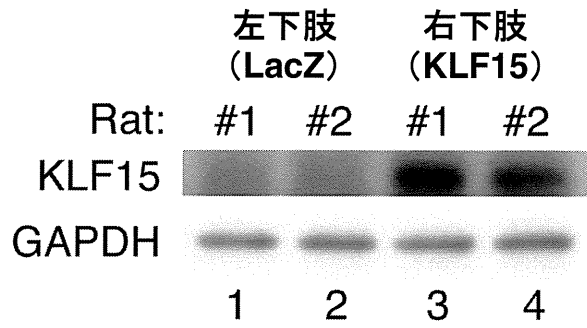
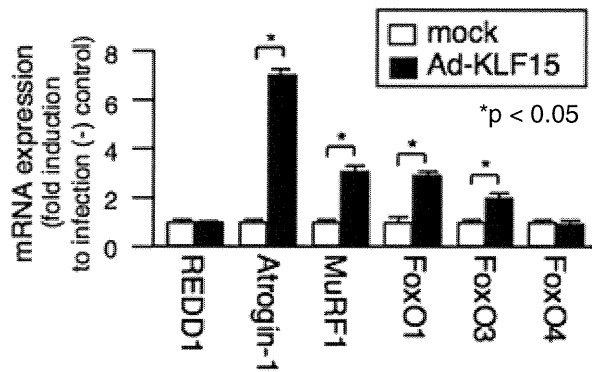


図2  
KLF15によるFoxOおよびatrogene mRNA発現量の変化



\*\*p < 0.05  
\*p < 0.05  
vs. DEX (-)

図3  
DEX依存的なatrogene mRNA発現のKLF15 ノックダウン (siRNA) による減弱

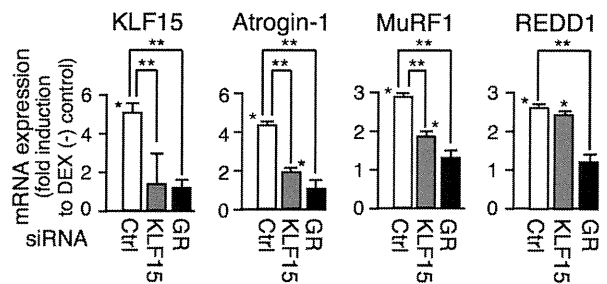


図4

FoxOとKLF15はatrogeneの発現を転写レベルで協調的に制御する  
 A, L6 myoblasts, B, ラット前脛骨筋

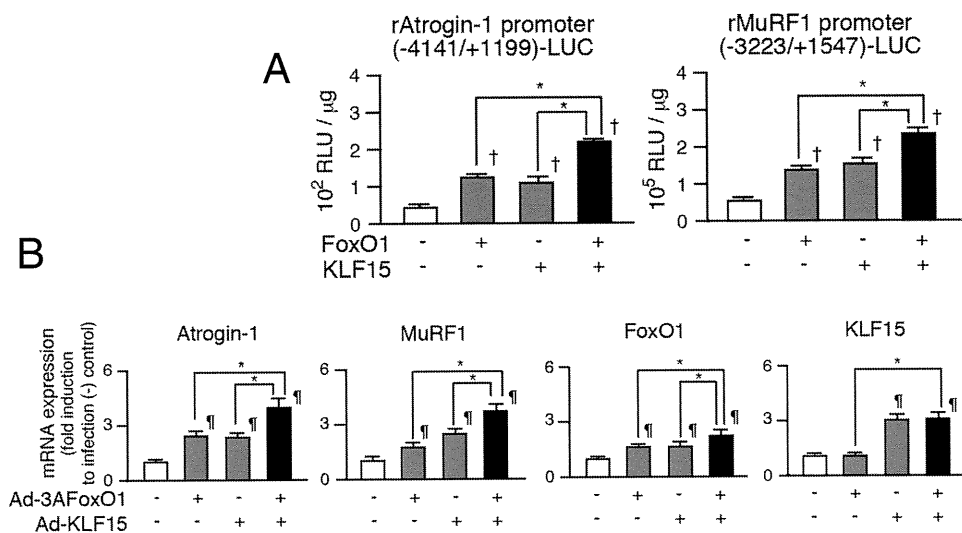


図5

mTOR活性化はGR応答性遺伝子発現を抑制する

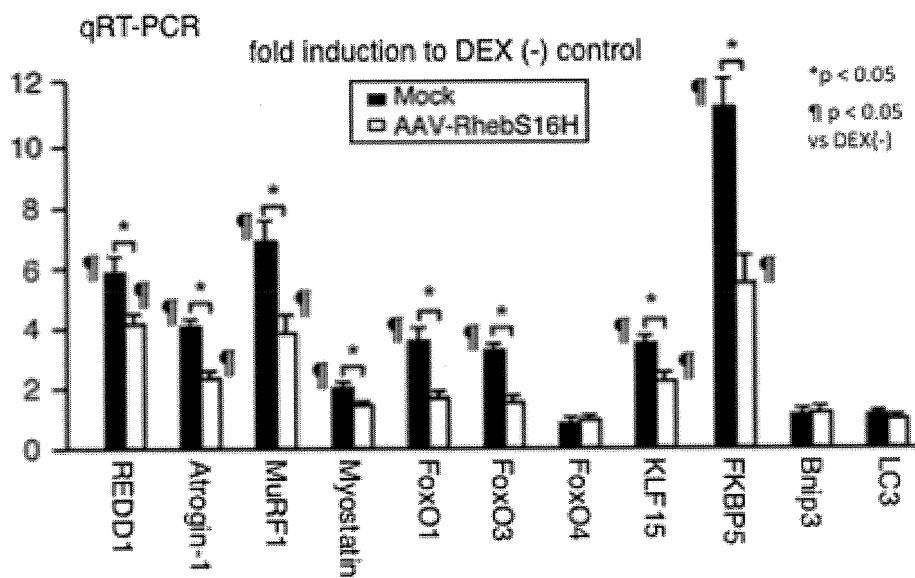


図6

分岐鎖アミノ酸BCAAはmTOR活性化を介してグルココルチコイドによる筋萎縮を抑制する

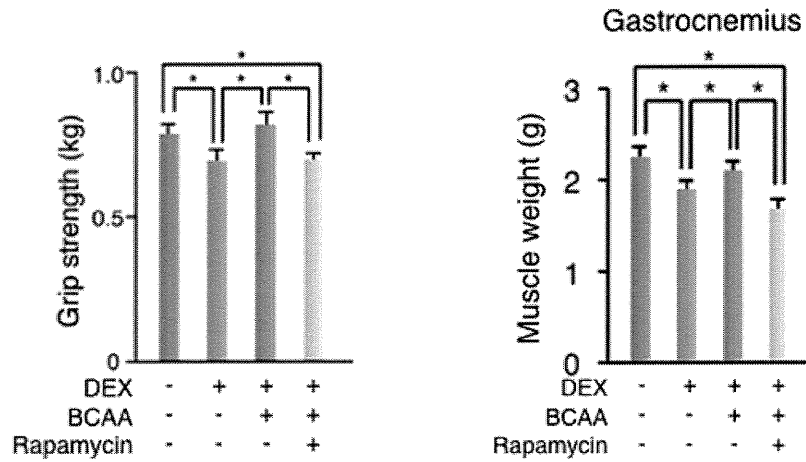
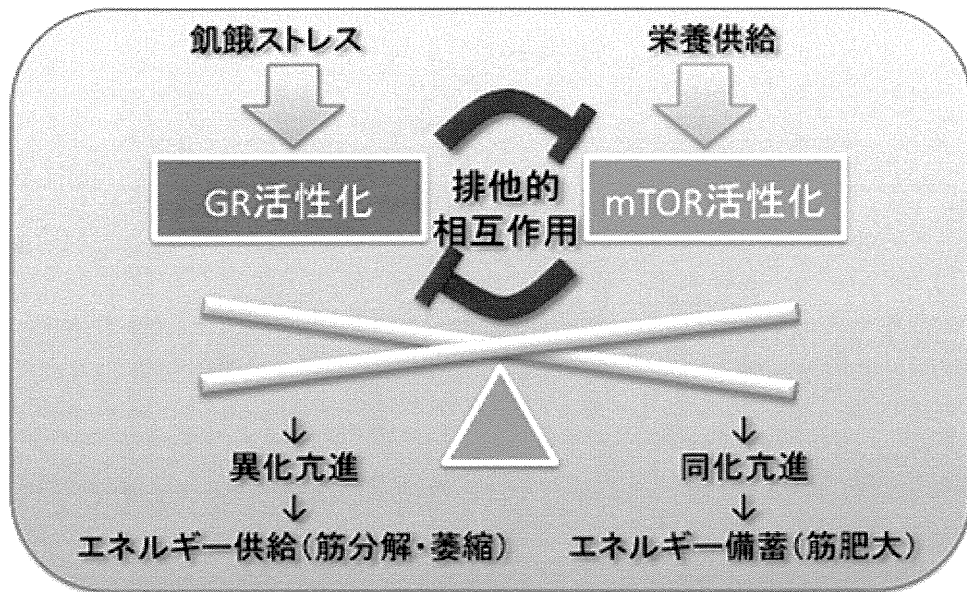


図7

骨格筋におけるGRとmTORのクロストーク (仮説)



## 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

研究分担者 加藤茂明 東京大学分子細胞生物学研究所・教授

### 【研究要旨】

FLAG-MR安定発現HEK293細胞から生化学的手法を用いて、MR相互作用因子の精製を行い、LC-MS/MSを用いて同定を試みた結果、新規MR相互作用因子p150が同定された。p150は、腎臓遠位尿細管及び大腸上皮においてMRと共局在を示し、両者はリガンド依存的に相互作用することが判明した。ルシフェラーゼアッセイではp150の過剰発現によりMR転写活性は約50%抑制された。反対にp150のRNAiにより内因性MR標的遺伝子ENaC  $\alpha$  およびSGK1の発現レベルが2倍以上上昇した。以上の結果からp150はMR転写活性を抑制する新規co-repressorであることが示唆された。p150を含む蛋白質複合体精製の結果、p150はMi-2/NuRD複合体のコンポーネントとして約1メガDaの複合体を形成し、MRとMi-2/NuRD複合体アダプターとして、少なくともヒストン脱アセチル化活性を介してMR標的遺伝子発現を負に制御することが判明した。

### A. 研究目的

ミネラルコイドは核内受容体の一つであるミネラルコルチコイドレセプター(MR)を介してその生理機能が発揮されるが、その制御メカニズムはほとんど明らかにされていない。そこで、MRの転写制御メカニズムを解明すべく、生化学的手法を用いてMR転写共役因子の精製を世界で始めて試みることにした。

### B. 研究方法

1) FLAGタグ付きMRを安定発現するHEK293細胞を樹立し、大量培養を

行った。そして、生化学的手法を用いて核抽出液を取得したのち、抗FLAG抗体アガロースビーズを用いて免疫沈降した。これらの手法により得られたサンプルは、SDS-PAGEに展開し染色後、ゲルを切り出し、トリプシン消化を行い、最終的にはLC-MS/MSを用いてMR蛋白質と結合する蛋白質の同定を試みた。

- 2) ラット腎臓および大腸において、MRと得られた因子の免疫染色を行った。
- 3) ルシフェラーゼ(LUC)法により、得られた因子をHEK293細胞に過剰発現させた時の、MR転写に及ぼす影響を

検討した。

- 4) 候補因子をRNAiによりノックダウンしたときのMR標的遺伝子SGKやENaCのmRNAをリアルタイムPCR法により定量することで、候補因子が内在性のMR標的遺伝子発現に及ぼす影響を観察した。
- 5) HEK293細胞を用いた免疫沈降法により、得られた因子とMRとの結合について検討した。
- 6) FLAGタグを付けたMR結合候補蛋白質p150を安定発現するHEK293細胞を樹立し、大量培養を行った。そして、生化学的手法を用いて核抽出液を取得したのち、抗FLAG抗体アガロースビーズを用いて免疫沈降した。得られたサンプルは、SDS-PAGEに展開し染色後、ゲルを切り出し、トリプシン消化を行い、最終的にはMALDI-TOF/MSを用いてMR候補蛋白質と結合する蛋白質複合体の同定を試みた。
- 7) HEK293細胞を用いてクロマチン免疫沈降法を行うことで、MR標的遺伝子ENaCプロモーターへの候補因子の動員やヒストンアセチル化修飾を観察した。そしてRNAiによる候補因子のノックダウンによるヒストン修飾に及ぼす影響を観察した。

(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

FLAG-MR安定発現細胞を用いた精製により、p150を同定した。P150はラット腎遠位尿細管および大腸上皮でMRと共局在していた。これらの因子の発現ベクターを作成し、ルシフェラーゼアッセイを行った結果、p150はMRのリガンド依存的な転写を抑制するco-repressorとして機能することが判明した。さらに、これらの因子をRNAiによりノックダウンした時の、MR標的遺伝子の変化を観察したりリアルタイムPCR法の結果、これらの因子はルシフェラーゼアッセイの結果同様にMR転写活性を抑制することが明らかとなった。

次にp150とMRとの相互作用を免疫沈降法で検討したところ、MRとリガンド依存性に結合することが示された。

一方、FLAGタグ付きp150安定発現HEK293細胞を樹立し、大量培養を行ったうえ、核抽出液を取得し、p150を含む蛋白質複合体の精製を行ったところ、Mi-2/NuRD複合体が同定された。そこでMR標的遺伝子ENaCプロモーターに存在するMR response elementに着目したChIPアッセイを行った。すると、p150はMi-2/NuRD複合体を動員するアダプターとして機能し、p150のノックダウン条件下では、Mi-2/NuRD複合体の動員も減少し、H3Acレベルも減少していることが観察された。

## D. 考 察

今回新たにミネラルコルチコイド依存性の転写制御メカニズムを明らかにすることができたが、まだMRの役割やその制御メカニズムを完全に明らかにできてはおらず、引き続き解析を進める必要がある。将来的には、高血圧発症の抑制に役立つと考えられる。

## E. 結 論

ミネラルコルチコイド依存性の転写制御メカニズムの一端を明らかにした。今後はさらにその詳細を明らかにするとともに、高血圧発症との関係などを明らかにしていきたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Fujiki, R., Hashiba, W., Sekine, H., Yokoyama, A., Chikanishi, T., Ito, S., Imai, Y., Kim, J., He, H.H., Igarashi, K., Kanno, J., Ohtake, F., Kitagawa, H., Roeder, R.G., Brown, M., Kato, S.: GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. Nature 2011; 480:557-560.

Yokoyama, A., Katsura, S., Ito, R., Hashiba, W., Sekine, H., Fujiki, R., Kato, S.: Multiple post-translational modifications in hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ . Biochem. Biophys. Res.

Commun. 2011; 410:749-753.

Kato, S., Yokoyama, A., Fujiki, R.: Nuclear receptor coregulators merge transcriptional coregulation with epigenetic regulation. Trends Biochem. Sci. 2011; 36:272-281.

## 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

**(6) 副腎腫瘍の成因や発生機序に関する  
基礎的研究**

「アルドステロン産生腺腫における  
カリウムチャンネルの変異に関する検討」に関する研究

研究分担者 宮森 勇 福井大学第三内科 教授

**【研究要旨】**

原発性アルドステロン症（APA）においてアルドステロン過剰分泌や腫瘍形成の分子学的な要因については未だ不明の点が多い。近年、カリウムチャンネルの一種であるKir3.4をコードするKCNJ5の遺伝子変異によりアルドステロン分泌が亢進する可能性が示唆されAPAの新たな成因として注目されている。今回、日本人におけるAPAのKCNJ5遺伝子異常を解析した。また、Somatic mutationの確認のため正常副腎組織でのKCNJ5遺伝子異常についても検討した。

**A. 研究目的**

原発性アルドステロン症（APA）においてアルドステロン過剰分泌や腫瘍形成の分子学的な要因については未だ不明の点が多い。近年、カリウムチャンネルの一種であるKir3.4をコードするKCNJ5の遺伝子変異によりアルドステロン分泌が亢進する可能性が示唆されAPAの新たな成因として注目されている。今回、日本人におけるAPAのKCNJ5遺伝子異常を解析した。また、Somatic mutationの確認のため正常副腎組織でのKCNJ5遺伝子異常についても検討した。

**B. 研究方法**

対象症例は2009年5月から2010年7月までに当科を初診し、アルドステロン産

生腺腫と病理診断が確定した6症例のうち、本研究に同意された5症例である。これらの症例について互いに血縁関係は確認されなかった。1症例は検体の保存状態が悪く、残りの4症例で検討された。いずれの症例も低カリウム血症を呈していた。

方法：4症例から摘出されたアルドステロン産生腺腫および同時に摘出された同側副腎正常部分よりRNAを抽出し、逆転写反応によりcDNAを作成した。Choiらにより報告されているKCNJ5遺伝子の異常発生部位であるコドン151、158、168を含む部位を下記のプライマーにて増幅し、塩基配列の決定を行った（表1）。  
（倫理面への配慮）

腺腫を含む摘出副腎組織の遺伝子解析についてあらかじめ本学倫理委員会で承認を得ており、患者の同意が得られた症



例について検討した。

## C. 結果

図1にシークエンスの結果を示す。正常副腎組織ではコドン151、158、168での異常は確認されなかった。腺腫組織の検討ではコドン151の最初の塩基がグアニンからアデニンあるいはシトシンにヘテロ接合性に変異しており、その結果、変異遺伝子でのアミノ酸はグリシンからアルギニンに置換されていた。また他の症例ではコドン168の2番目の塩基がチミンからグアニンにヘテロ接合性に変異しており、変異遺伝子でのアミノ酸はロイシンからアルギニンに置換されていた(表2)。これらの遺伝子異常はChoiらの報告と同じG151R変異とL168R変異であった。

## D. 考察

Kir3.4チャンネル分子において、151番目のグリシンと168番目のロイシンはヒト以外の種でも良く保存されており、またヒトでのその他のカリウムチャンネルでも特に151番目のグリシンはよく保存され、これらの部位がカリウムチャンネルの機能に重要であることをうかがわせる。また、チャンネルの構造では151番目のアミノ酸はselectivity filterのGYGモチーフに位置しているとともに、そのカルボニル基はチャンネル4量体の細孔に面しており、それぞれのチャンネル分子の同部位と非常に近接している。また、168番目

のアミノ酸は第2膜貫通部位に位置しており、その側差はGYGモチーフのチロシンと側差と近接している。

これらカリウムチャンネル分子の構造上重要な部位での変異はチャンネル4量体を構成した時にイオン浸透選択性が低下することが確認されている。Choiらは正常および変異KCNJ5遺伝子を形質導入した293T細胞において、G151R変異あるいはL168R変異で構成されたカリウムチャンネルは正常のものとは比べてNaイオンとKイオンの選択性が著しく低下していることを確認している。

これらの変異によりナトリウムイオンの選択性が低下したカリウムチャンネルは、副腎皮質球状層細胞においてアンジオテンシンIIなどの刺激がなくても膜電位を深く保つことができず、細胞を過分極の状態にすることで細胞増殖やアルドステロンの合成を促進し、アルドステロン産生腺腫の発生に関与すると考えられている(図2)。

今回の検討では、これまでの報告と比べて高い頻度でKCNJ5遺伝子の異常が確認された。対象症例数が少ないため比較は困難であるが、多症例の検討でもKCNJ5遺伝子異常が高頻度で確認されれば、アルドステロン産生腺腫の発生の主要因である可能性が高まるものと考えられた。

アルドステロン産生腺腫症例でのKCNJ5遺伝子異常の正確な頻度を確認するとともに、異常遺伝子による細胞増殖やアルドステロン合成分泌能を細胞学的に検討する必要があると考えられた。

また、カリウムチャネルはその他のホルモン合成・分泌にも深く関わっていることから、同様なカリウムチャネルの異常が様々なホルモン産生腫瘍の発生に関与している可能性も想定される。

原発性アルドステロン症家系において確認されているKNCJ5の遺伝子のT158部位での変異は認めなかった。正常副腎部分ではKNCJ5遺伝子変異は確認されなかった。

G151R変異とL168R変異の割合は半々であり、既報の欧米の成績（1対3とL168R変異のほうが多い）と異なる結果であった。今後、症例を増やし遺伝子変異と臨床像との対比についても解析したい。

## E. 結論

結語を示す。4症例のアルドステロン産生腺腫において、カリウムチャネルKir3.4をコードするKNCJ5の遺伝子のヘテロ接合型変異を確認した。検討を行った全症例からG151RあるいはL168Rの変異が確認され、これまでの報告以上にこの変異がアルドステロン産生腺腫の病因として重要である可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報（総括研究報告書にてまとめて記載）

なし

## G. 研究発表（2011.04.01～2012.03.31発表）

### 1. 論文発表

M.Fujii, I.Inokia, M.Sagaa, N.Morikawaa, K.Arakawaa, S.Inabaa, K.Yoshiokab, T.Konoshitaa, I.Miyamoria,\* Aldosterone inhibits endothelial morphogenesis and angiogenesis through the downregulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 expression subsequent to peroxisome proliferator-activated receptor gamma J Steroid Biochemistry and Molecular Medicine 2012 (in press)

### 2. 学会発表

なし（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

## H. 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

表1. 方法

- 4症例から抽出されたアルドステロン産生腺腫および同時に抽出された同側副腎正常部分よりRNAiso plus® (Takara) を用いてRNAを抽出。
- 抽出したRNAをReverTra Ace® (TOYOBO)を用いて逆転写を行いcDNAを作成したのち、*KCNJ5*遺伝子のコドン151、158、168を含む部位を下記のプライマーにて増幅し、塩基配列の決定を行った。

PCRプライマー: J5qPCR\_F 5' -GGTGACCTGGACCATGTTGGCG-3'  
 J5qPCR\_R 5' -CTTGGCAGGTCATGCCTGTGGC-3'  
 シークエンスプライマー: J5cDNA\_F 5' -CGACCAAGAGTGGATTCCCTT-3'

表2. 臨床像と遺伝子変異

	腫瘍径 (mm)	血清K (mEq/L)	レニン活性 (ng/ml/h)	アルドステロン濃度 (pg/ml)	mutation
APA1	19	2.6	0.4	228	G151R
APA2	16	2.4	0.5	282	L168R
APA3	14	2.9	0.3	363	L168R
APA5	10	3.5	0.1未測	676	G151R

図1. *KCNJ5*遺伝子変異

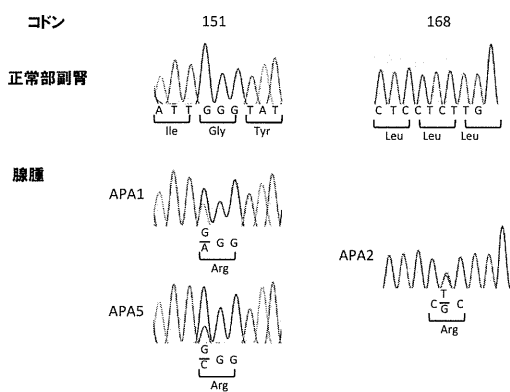
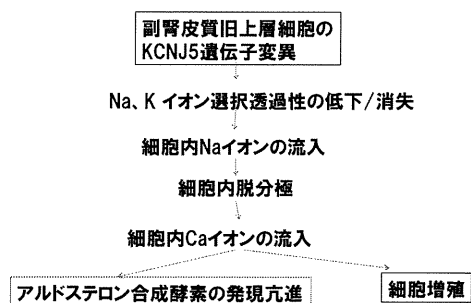


図2. カリウムチャネル異常によるアルドステロン症の発症機序



## 正常および腫瘍性副腎組織におけるMetabotropic/Ionotropic Glutamate Receptors type 3 (mGLUR3 and iGLUR3)発現の検討

研究分担者 笹野 公伸

研究協力者 中村 保宏

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】最近、アルドステロン産生性副腎皮質腺腫(APA)にて代謝型グルタミン酸受容体に属するglutamate metabotropic receptor 3 (GRM3)のmRNA発現上昇が証明された。また、イオン型グルタミン酸受容体の1つであるionotropic glutamate receptor 3(iGLUR3)は副腎髄質でその発現が報告されている。今回、我々は正常副腎皮質、副腎皮質腫瘍での両者の発現度を検討した。

【対象と方法】東北大学病院にて手術で切除された正常副腎および副腎腫瘍組織を対象とした。免疫組織化学的検索と定量RT-PCR法で解析を行った。

【結果】定量RT-PCRでは、iGLUR3のmRNA発現はNA、APA、CPAでは全症例に確認されたが、各群間の有意差はみられなかった。ACCでは5例中2例のみに確認された。GRM3のmRNA発現はNA11例、APA10例、CPA11例に確認されたが、APAでの発現量がNAに比べ有意に高かった( $P<0.05$ )。ACCでは全例で検出感度以下であった。免疫組織化学的検討では、iGLUR3蛋白はNAでは球状層(ZG)に特異的に観察された。腫瘍組織では、APA、CPA、NFAで部分的にみられたが、ACCでは確認されなかった。

【考察】以上の結果から、両者は正常副腎皮質、副腎皮質腫瘍に発現し、副腎組織での生理的、病理的役割に関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

近年、副腎腫瘍においてG-protein-coupled receptors (GPCRs)の過剰発現が報告されている。GPCRは細胞膜上で7回膜貫通部位を持つ受容体であり、様々な生理学的調節及び病理学的要因に関与している。最近、GPCRsに所属し代謝型グルタミン酸受容体の1つであるglutamate metabotropic receptor 3 (GRM3)の異所性発現がアル

ドステロン産生性副腎腺腫(APA)で報告された。また、イオン型グルタミン酸受容体の1つであるionotropic glutamate receptor 3(iGLUR3)が副腎髄質で発現していることが知られている。しかし、これまで正常副腎皮質および副腎腫瘍組織での両者の発現発現パターンについては十分解明されてはいない。本研究では、これらの発現度を上記副腎組織で検討することで、ヒト副腎組織でのこれらのグルタミン酸受容体の生理的、病理的機能

への関与を解明することを目的とした。

## B. 研究方法

東北大学病院にて腎癌などで合併切除された正常副腎(NA)5例、切除されたAPA5例、コルチゾール産生性副腎腺腫(CPA)9例、非機能性副腎腺腫(NFA)4例、副腎皮質癌(ACC)4例を対象とし、iGLUR3蛋白の発現について免疫組織化学的検討を行った。また、NA12例、APA11例、CPA13例、ACC5例を対象とし、定量RT-PCR法を用いてiGLUR3およびGRM3のmRNAs発現の解析を行った。

(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 (図1)

定量RT-PCRでは、iGLUR3のmRNA発現はNA、APA、CPAでは全症例に確認されたが、各群間の有意差はみられなかった。ACCでは5例中2例のみに確認された(図1)。GRM3のmRNA発現はNA11例、APA10例、CPA11例に確認されたが、APAでの発現量がNAに比べ有意に高かった( $P<0.05$ )。ACCでは全例で検出感度以下であった(図2)。免疫組織化学的検討では、iGLUR3蛋白はNAでは球状層(ZG)に特異的に観察された(図3)。腫瘍組織では、APA、CPA、NFAで部分的にみられたが、ACCでは確認されなかった

(図4)。

## D. 考察

グルタミン酸受容体は主に脳組織に発現し、神経伝達機能に関与していることが知られている。一方、脳以外の末梢組織や腫瘍細胞株に発現しているグルタミン酸受容体も報告されており、細胞との分化、増殖との関連が示唆されている。今回の検討では、iGLUR3やGRM3は、正常副腎組織のみでなく副腎皮質腫瘍組織でも発現していることが証明された。リガンドであるグルタミン酸は末梢血に十分量存在しており、これらの受容体を介して副腎細胞の分化や増殖、ステロイドホルモン産生に関わっている可能性が示唆された。今後は機能的な実験が必要と考えられた。

## E. 結語

iGLUR3やGRM3の発現パターンが、副腎組織での生理的、病理的役割に関与している可能性が示唆された。

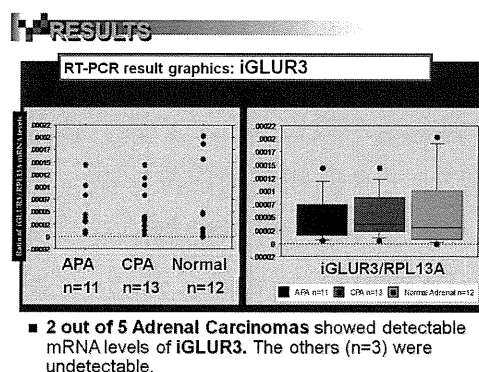


図1 iGLUR3mRNAの発現

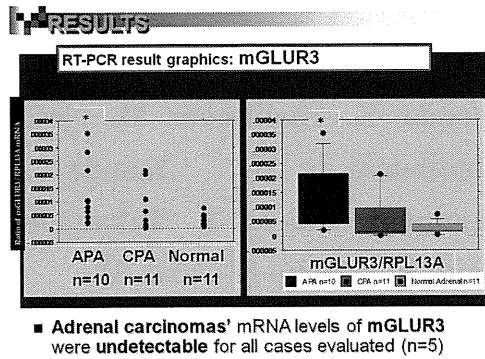


図2 GRM3mRNAの発現

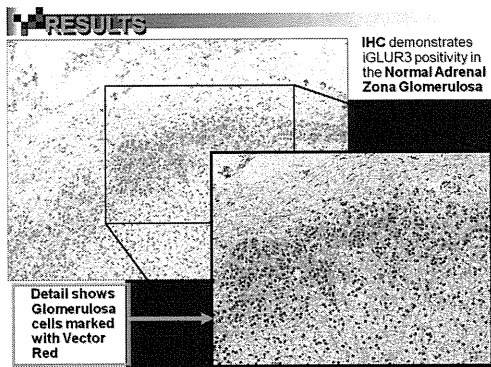


図3 正常副腎皮質でのiGLUR3蛋白の発現

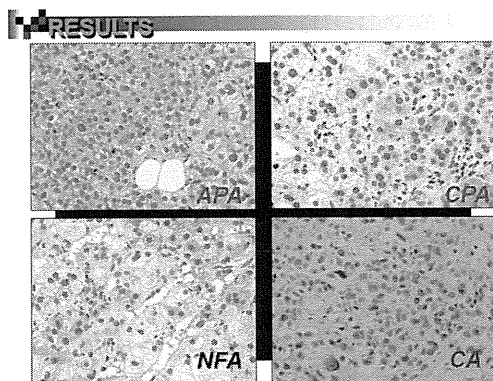


図4 副腎皮質腫瘍でのiGLUR3蛋白の発現

○研究発表

●論文発表

1. Morimoto R, Kudo M, Murakami O, Takase K, Ishidoya S, Nakamura Y, Ishibashi T, Takahashi S, Arai Y, Suzuki T, Sasano H, Ito S, Satoh F.

Difficult-to-control hypertension due to bilateral aldosterone-producing adrenocortical microadenomas associated with a cortisol-producing adrenal macroadenoma.

J Hum Hypertens. ;25(2):114-121. 2011 (原著)

2. Oka K, Suzuki T, Onodera Y, Miki Y, Takagi K, Nagasaki S, Akahira JI, Ishida T, Watanabe M, Hirakawa H, Ohuchi N, Sasano H.

Nudix-type motif 2 (NUDT2) in human breast carcinoma: A potent prognostic factor associated with cell proliferation.

Int J Cancer ;128(8):1770-1782. 2011 (原著)

3. Sasaki Y, Miki Y, Hirakawa H, Onodera Y, Takagi K, Akahira JI, Honma S, Ishida T, Watanabe M, Sasano H, Suzuki T.

Immunolocalization of estrogen-producing and metabolizing enzymes in benign breast disease: Comparison with normal breast and breast carcinoma. Cancer Sci;101,2286-2292,2010 (原著)

4. Suzuki T, Miki Y, Takagi K,

- Hirakawa H, Moriya T, Ohuchi N, Sasano H.  
Androgens in human breast carcinoma.  
Med Mol Morphol;43:75-81,2010 (総説)
5. Terui K, Sakihara S, Kageyama K, Nigawara T, Takayasu S, Matsubashi Y, Kon A, Yamamoto H, Ohyama C, Sasano H, Suda T.  
A case of adrenocortical oncocytoma occurring with aldosteronoma.  
J Clin Endocrinol Metab;95:3597-3598,2010 (症例)
6. Miki Y, Suzuki T, Abe K, Suzuki S, Niikawa H, Iida S, Hata S, Akahira J, Mori K, Evans DB, Kondo T, Yamada-Okabe H, Sasano H.  
Intratumoral localization of aromatase and interaction between stromal and parenchymal cells in the non-small cell lung carcinoma microenvironment.  
Cancer Res;70:6659-6669,2010 (原著)
7. Yamada S, Tanimoto A, Wang KY, Ding Y, Guo X, Shimajiri S, Sasano H, Sasaguri Y.  
Non-functional adrenocortical adenoma: A unique case of combination with myelolipoma and endothelial cysts.  
Pathol Res Pract;207:192-196, 2011 (症例)
8. Tsujimoto T, Takaichi M, Endo H, Yasuda K, Kishimoto M, Noto H, Gomibuchi H, Yasuda H, Yamamoto-Honda R, Takahashi Y, Kajio H, Sasano H, Noda M.  
A Patient With Diabetes and Breast Cancer In Whom Virilization Was Caused by a Testosterone-Producing Mature Cystic Teratoma Containing a Brenner Tumor.  
Am J Med Sci;341:74-77,2011 (症例)
9. Onodera Y, Miki Y, Suzuki T, Takagi K, Akahira JI, Sakyu T, Watanabe M, Inoue S, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H.  
Runx2 in human breast carcinoma: its potential roles in cancer progression.  
Cancer Sci.101:2670-2675,2010 (原著)
10. Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Ito K, Sasano H.  
Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human carcinomas.  
Mol Cell Endocrinol. 2010 Nov 9. [Epub ahead of print] (総説)
11. Uruno A, Matsuda K, Noguchi N, Yoshikawa T, Kudo M, Satoh F, Rainey WE, Hui XG, Akahira JI, Nakamura Y, Sasano H, Okamoto H, Ito S, Sugawara A. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  suppresses

- CYP11B2 expression and aldosterone production.  
*J Mol Endocrinol.* 46:37-49,2011  
 (原著)
- 12.Nakamura Y, Xing Y, Hui XG, Kurotaki Y, Ono K, Cohen T, Sasano H, Rainey WE.  
 Human adrenal cells that express both 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD3B2) and cytochrome b5 (CYB5A) contribute to adrenal androstenedione production.  
*J Steroid Biochem Mol Biol*:123:122-126,2011 (原著)
- 13.Wang T, Satoh F, Morimoto R, Nakamura Y, Sasano H, Auchus R, Edwards MA, Rainey W.  
 Gene expression profiles in aldosterone-producing adenomas and adjacent adrenal glands.  
*Eur J Endocrinol*;164:613-619,2011  
 (原著)
- 14.Hayakawa E, Yoshimoto T, Hiraishi K, Kato M, Izumiyama H, Sasano H, Hirata Y.  
 A rare Case of ACTH-independent Macronodular Adrenal Hyperplasia Associated with Aldosterone-producing Adenoma.  
*Intern Med.* 50:227-232, 2011 (症例)
- 15.Ishidoya S, Kaiho Y, Ito A, Morimoto R, Satoh F, Ito S, Ishibashi T, Nakamura Y, Sasano H, Arai Y.  
 Single-center Outcome of Laparoscopic Unilateral Adrenalectomy for Patients With Primary Aldosteronism: Lateralizing Disease Using Results of Adrenal Venous Sampling.  
*Urology.* 2011 Jul;78(1):68-73. 2011  
 (原著)
- 16.Miki Y, Abe K, Suzuki S, Suzuki T, Sasano H.  
 Suppression of estrogen actions in human lung cancer.  
*Mol Cell Endocrinol*;340(2):168-174. 2011 (総説)
- 17.Geisler J, Sasano H, Chen S, Purohit A.  
 Steroid Sulfatase Inhibitors: Promising New Tools for Breast Cancer Therapy?  
*J Steroid Biochem Mol Biol.* May;125(1-2):39-45. 2011 (総説)
- 18.Akishima-Fukasawa Y, Yoshihara A, Ishikawa Y, Watanabe N, Hiroi N, Akasaka Y, Sasano H, Ishii T, Yoshino G.  
 Malignant Adrenal Rest Tumor of the Retroperitoneum Producing Adrenocortical Steroids.  
*Endocr Pathol.* Jun;22(2):112-117. 2011 (症例)
- 19.Verma MK, Miki Y, Sasano H.  
 Aromatase in human lung carcinoma.  
*Steroids.* Jul;76(8):759-764. 2011 (総説)
- 20.Yoshida M, Hiroi M, Imai T,



- Kikumori T, Himeno T, Nakamura Y, Sasano H, Yamada M, Murakami Y, Nakamura S, Oiso Y.  
A case of ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia associated with multiple endocrine neoplasia type 1.  
*Endocr J.* 29:58(4):269-277,2011 (症例)
- 21.Hashimoto N, Kawamura Y, Nakamura T, Murawaki A, Nishiumi T, Hirota Y, Sakagushi K, Kurahashi T, Miyake H, Fujisawa M, Sasano H, Takahashi Y.  
A case of primary aldosteronism caused by multiple adrenocortical macronodules.  
*Intern Med.* 50:585-590, 2011 (症例)
- 22.Yoshida M, Sasano H, Kikumori T, Imai T, Murakami Y, Nakamura S, Ogawa K, Miyata M, Murakami M, Oiso Y.  
A case of subclinical Cushing syndrome due to primary pigmented nodular adrenocortical disease associated with adrenocortical adenoma.  
*Endocrine*;40(1):144-145. 2011 No abstract available (症例)
- 23.Hiraishi K, Yoshimoto T, Tsuchiya K, Minami I, Doi M, Izumiyama H, Sasano H, Hirata Y.  
Clinicopathological features of primary aldosteronism associated with subclinical Cushing's syndrome.  
*Endocr J*;58(7):543-551. 2011 (原著)
- 24.Demura M, Wang F, Yoneda T, Karashima S, Mori S, Oe M, Kometani M, Sawamura T, Cheng Y, Maeda Y, Namiki M, Ino H, Fujino N, Uchiyama K, Tsubokawa T, Yamagishi M, Nakamura Y, Ono K, Sasano H, Demura Y, Takeda Y.  
Multiple noncoding exons 1 of nuclear receptors NR4A family (nerve growth factor-induced clone B, Nur-related factor 1 and neuron-derived orphan receptor 1) and NR5A1 (steroidogenic factor 1) in human cardiovascular and adrenal tissues.  
*J Hypertens*;29(6):1185-1895.2011 (原著)
- 25.Nakamura Y, Satoh F, Morimoto R, Kudo M, Takase K, Gomez-Sanchez CE, Honma S, Okuyama M, Yamashita K, Rainey WE, Sasano H, Ito S.  
18-Oxocortisol Measurement in Adrenal Vein Sampling as a Biomarker for Subclassifying Primary Aldosteronism.  
*J Clin Endocrinol Metab*; (8):E1272-1278. 2011 (原著)
- 26.Brown KA, McInnes KJ, Takagi K, Ono K, Hunger NI, Wang L, Sasano H, Simpson ER.  
LKB1 expression is inhibited by estradiol-17 $\beta$  in MCF-7 cells.

J Steroid Biochem Mol Biol. 2011  
Jun 12. [Epub ahead of print] (原  
著)

27. Nakamura Y, Rege J, Satoh F,  
Morimoto R, Kennedy MR, Ahlem  
CN, Honma S, Sasano H, Rainey WE.  
Liquid chromatography-tandem  
mass spectrometry analysis of  
human adrenal vein corticosteroids  
before and after ACTH stimulation.  
Clin Endocrinol. 2011 [Epub ahead  
of print] (原著)

#### G. 知的所有権の出願、取得状況

- 1) 特許取得  
なし。
- 2) 実用新案登録  
なし。
- 3) その他

## CYP11B2遺伝子のNFATによる転写調節

研究分担者 岩崎泰正 高知大学保健管理センター  
研究協力者 西山 充 高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科  
田口崇文 高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科  
次田 誠 高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科  
中山修一 高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科  
高尾俊弘 高知大学医学部地域看護学

### 【研究要旨】

原発性および特発性アルドステロン症は高血圧症患者の5-10%を占めることが近年明らかとなり、その治療法の確立は急務である。副腎皮質におけるアルドステロン合成にはP450aldo が重要な役割を果たしているが、その蛋白をコードする遺伝子CYP11B2転写調節機序の詳細は未だ明らかでない。私共は同遺伝子の5' 転写調節領域約2Kbをクローニングし、副腎由来Y1細胞を用いて解析を行った。その結果、細胞内cAMP/PKA系の活性化はCYP11B2の転写活性を約3.5倍増加させた。一方、同遺伝子プロモーター上に2ヶ所の結合配列が存在するNFATを共発現させたところ、転写活性は約23倍と著明に増加した。以上の結果よりアンジオテンシンIIやKは少なくとも一部Ca<sup>2+</sup>/NFATシグナル伝達系を介してアルドステロン合成を調節している可能性が示唆された。NFAT阻害剤は、将来的にアルドステロン合成阻害剤として使用しうる可能性がある。

### A. 研究目的

近年の研究の進歩により、アルドステロンやコルチゾール過剰分泌を呈する各種副腎疾患発症の分子基盤が明らかになりつつある。副腎皮質ステロイドの合成は、主として合成酵素遺伝子・蛋白の発現レベルにより調節されている。このうちアルドステロン過剰は、高血圧のみならず種々の臓器障害の原因となることから、アルドステロン合成に関与する酵素遺伝子の転写調節機序を明らかにするこ

とは、病態解明や治療法確立の立場から、臨床的に重要な課題である。しかしアンジオテンシンIIや高カリウム刺激によるアルドステロン合成・分泌調節機構の詳細に関しては、未だ不明な点が残されている。

アルドステロン合成系では、副腎皮質球状層に発現するアルドステロン合成酵素P450aldo (CYP11B2遺伝子) の役割が重要である。今回私共はマウス副腎由来 Y1 細胞を用いた *in vitro* の系を用いてCYP11B2遺伝子の転写調節を検討

した。

## B. 研究方法

マウス副腎皮質由来 Y1 細胞に ACTH受容体 (MC4R) を恒常的に発現させた細胞株 (Y1A) を樹立した。またヒトゲノムより CYP11B2遺伝子の転写調節領域 (約2 kb) をクローニングし、レポーター遺伝子と結合したプラスミドを作成した。上記プラスミドを Y1A細胞に一過性に導入した状態で、活性型 protein kinase A (PKAcat) ないし nuclear factor of activated T-cells (NFAT) の共発現がCYP11B2転写活性に及ぼす効果を解析した。

## C. 研究結果

- 1) CYP11B2遺伝子転写調節領域には、従来から明らかにされている CRE, NURE (Nur-binding element), Ad4BP (SF1) 結合配列に加え、NFAT 結合配列が2ヶ所に認められた (図1)
- 2) cAMPの下流に位置するシグナル伝達因子 PKA (PKAcat) の共発現は CYP11B2遺伝子転写活性に対し最大約 3.5倍程度の促進効果を示した (結果省略)。
- 3) 一方  $Ca^{2+}$  依存性転写因子 NFAT (NFATp) の共発現は CYP11B1 遺伝子の転写活性を最大約23倍と著明に増加させた (図2)。
- 4) 従来より報告されている Nur77 (NGFI-B) および Nurr1共発現の

CYP11B2 遺伝子発現に対する効果は、本実験系では軽微であった(結果省略)。

## D. 考察

今回の私共の検討より、転写因子 NFATはCYP11B2遺伝子転写を強力に促進することが明らかとなった (20倍以上)。アンジオテンシンIIや高カリウム刺激は、副腎皮質球状層細胞の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させること、 $Ca^{2+}$  の増加は calmodulin/ calcineurin を介して NFATを脱リン酸化により活性化すること、またCYP11B2遺伝子の転写調節領域に、典型的なNFAT応答配列が2ヶ所存在すること、などの点を考慮すると、アンジオテンシンIIやカリウム刺激時のアルドステロン合成促進作用には、NFATの活性化を介したCYP11B2発現亢進が関与している可能性がある。

一方、臨床的にはACTHも正常副腎皮質細胞に発現するメラノコルチン受容体 (MC2R) を介して一過性にアルドステロン合成促進作用を発揮する。今回の私共の実験系において、MC2Rの下流に位置する cAMP/PKA の活性化 (PKAcatの過剰発現) がCYP11B2の発現を3倍以上増加させたことから、本シグナル系もアルドステロン合成に関与しているものと推察された。原発性アルドステロン症ではACTH依存性のアルドステロン産生亢進が指摘されており、この系の活性化が副腎皮質腫瘍細胞のアルドステロン過剰産生における直接的な駆動力となっている可能性もある。