

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15416

研究課題名(和文) 高齢閉経時における皮膚局所の性ステロイド産生の意義と概日時計による時間制御の検討

研究課題名(英文) Circadian regulation of sex steroids in aged skin after menopause

研究代表者

土居 雅夫 (Masao, Doi)

京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20432578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、時計遺伝子によって制御される新規のステロイド合成律速酵素3 $\beta$ -HSDを見出し、それが皮膚の性ステロイド産生器官である皮脂腺に発現することをヒトおよびマウスにおいて見出した(MCE 2014; MCE 2015)。またこの酵素は時計遺伝子によって制御されるだけでなく、核内オーファン受容体NGF1Bを介して刺激選択的な制御を受けることも明らかにした(EJ 2015)。閉経後の女性にとって皮膚で産生されるステロイドは重要な性ステロイドの供給源となる。我々が見出した3 $\beta$ -HSDの発現制御をさらに見極めることによって皮膚の重要な環境適応機構の一端が明らかになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We found that the circadian clock regulates expression of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/5 $\alpha$ -4 isomerase (3 $\beta$ -HSD), a rate-limiting enzyme of de novo steroid synthesis, and demonstrated that its expression occurs in the sebaceous gland, a sex steroid producing organ in the skin (MCE 2014; MCE 2015). Molecular characterization revealed that expression levels of this enzyme are regulated not only by the circadian clock, but also through stimulus-selective induction of the orphan nuclear receptor, nerve growth factor-induced clone B (EJ 2015). Cutaneously produced steroids are an important source of sex steroids for post-menopausal women. Further investigation into the regulated expression of 3 $\beta$ -HSD may elucidate an important component of the environmental adaptation mechanism of the skin.

研究分野：内分泌学

キーワード：概日時計 皮膚 性ステロイド ステロイド合成律速酵素

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚はヒトにおいて最も強靱な概日時計機能をもつ臓器の1つである。また皮膚は、性ステロイドの産生器官でもあり、特に、閉経後の高齢女性にとって皮膚内で産生されるステロイドは重要な性ステロイドの供給源となる。しかし、その想定される重要性にもかかわらず、皮膚局所で産生される性ステロイドの生理的意義やその産生制御メカニズムに関する分子レベルの研究はこれまで殆ど何もなされてこなかった。

## 2. 研究の目的

皮膚で産生される局所ステロイドの生理的役割やその制御機構を知るためには皮膚に存在するステロイド合成酵素を同定しその役割を明らかにすることが重要となる。

このような背景の中、我々は最近、時計遺伝子によって制御される新型のステロイド合成律速酵素(3 $\beta$ -HSD)を見出し、それが皮膚では皮膚の付属器官である皮脂腺に特異的に発現することをヒトおよびマウスにおいて見出した(Doi et al, Nat Med, 2010; Yamamura et al, Mol Cell Endocrinol, 2014; Doi et al, J Clin Endocrinol Metab, 2014; Ota et al, Mol Cell Biol, 2014)。つまり、この酵素を介して産生される局所性の性ステロイドによって皮膚の生理機能が制御される可能性が考えられた。

本研究では上記の可能性を検証するため、この酵素の発現制御機構を詳しく調べるとともに、その生理的役割を明らかにするための遺伝子欠損マウスの作製を行った。

## 3. 研究の方法

我々が本研究で着目する3 $\beta$ -HSD(正式名称:3 $\beta$ -水酸化ステロイド脱水素酵素)は、生体内で産生される全てのステロイドホルモンの合成に必須の酵素である(鎌水ら, Medical Science Digest, 2015; 土居ら, 腎臓内科・泌尿器科, 2015)。

マウスの3 $\beta$ -HSD酵素ファミリーには型から型まで構造のよく似た6種類のサブタイプが存在するが、皮膚においては型のHsd3b6のみが発現する(Yamamura et al, Mol Cell Endocrinol, 2014)。つまり、皮膚に内在するこの単一の酵素サブタイプを欠損させれば皮膚局所で産生される種々のステロイドホルモンは全て合成できなくなると想定される。この特性に着目して我々は今回Hsd3b6欠損マウスの作製を行った。

ヒトの場合、マウスのHsd3b6に相当する酵素サブタイプはHSD3B1である。Hsd3b6とHSD3B1は歴史上の発見の順番がそれぞれの種において異なるため名称番号が異なるが機能上のホモログ分子である。

重要なことに、ヒト・マウスどちらの場合

においてもこの酵素サブタイプの発現は皮膚の皮脂腺細胞の他に副腎のアルドステロン産生細胞にも認められるという共通の特徴がある(Doi et al, Nat Med, 2010; Doi et al, J Clin Endocrinol Metab, 2014)。そこで我々はヒトの副腎ステロイド産生細胞株H295Rを用いてヒトHSD3B1遺伝子の発現制御機構を調べ、それに類似する機構がヒトの皮膚の皮脂腺細胞にも存在するかどうかを調査することを行った。

## 4. 研究成果

成果1: 皮膚3 $\beta$ -HSD酵素欠損マウスの作製  
相同組換えによる遺伝子ターゲティング法を用いてマウスHsd3b6遺伝子ノックアウト胚性幹細胞を作製し、それを用いてホモの遺伝子欠損マウスを樹立した。

生体内で産生される全てのステロイドはコレステロール、もしくは硫酸デヒドロエピアンドロステロンを基質に合成されるが、3 $\beta$ -HSDはそのどちらの合成経路にも関わる必須の酵素である。つまり、皮膚に内在する単一の3 $\beta$ -HSD酵素サブタイプであるHsd3b6を無くせば皮膚で産生される種々のステロイドは全て合成不能となると想定される。

今後、皮膚局所で産生されるステロイドの生理的意義を解明する上で、今回作製した上述の遺伝子欠損マウスが生体レベルでの解析に役立つと期待される。

成果2: 核内受容体NGF1Bによる刺激選択的な3 $\beta$ -HSDの発現制御の発見

アンジオテンシンII(AngII)およびカリウム(K<sup>+</sup>)は、副腎で産生されるアルドステロンの合成を増強する重要な生理活性物質である。我々は、ヒトの副腎ステロイド産生細胞株H295Rを実験材料に用い、HSD3B1遺伝子の発現がAngIIには急速に応答して上昇するが、K<sup>+</sup>刺激には全く応じないことを見出した(Ota et al, Mol Cell Biol, 2014; Yarimizu et al, Endocr J, 2015)。背後のメカニズムを調査したところ、AngIIによるHSD3B1の誘導には核内受容体NGF1Bの新規合成が必要であること、一方で、NGF1B蛋白質はK<sup>+</sup>では誘導されないためHSD3B1はK<sup>+</sup>刺激に応答しないことがわかった(Yarimizu et al, Endocr J, 2015)。つまり、HSD3B1の発現制御には刺激選択性があり、その制御を核内受容体のNGF1Bが司ることを示すことができた。

重要なことに、ヒトの皮膚の皮脂腺細胞にもこのNGF1Bが時計遺伝子とともに発現することを我々は明らかにした(Tanioka et al, J Invest Dermatol, 2009; Azmahani et al, J Steroid Biochem Mol Biol, 2014)。皮膚に内在する概日時計は、周期的な環境変化(紫外線や乾燥の変動)にさらされる皮膚が外部環境に適応するための必須の機構と考えられる。我々が見出した3 $\beta$ -HSDの発現制御をさらに見極めることによって皮膚の重

要な環境適応機構の一端が明らかになる可能性がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計8件)

Doi M, Murai I, Kunisue S, Setsu G, Uchio N, Tanaka R, Kobayashi S, Shimatani H, Hayashi H, Chao HW, Nakagawa Y, Takahashi Y, Hotta Y, Yasunaga J, Matsuoka M, Hastings MH, Kiyonari H, and Okamura H: Gpr176 is a Gz-linked orphan G-protein-coupled receptor that sets the pace of circadian behaviour. *Nature Commun.* 7, 10583 (2016)  
DOI: 10.1038/ncomms10583

Yamaguchi Y, Okada K, Mizuno T, Ota T, Yamada H, Doi M, Kobayashi M, Tei H, Shigeyoshi Y, and Okamura H: Real-time recording of circadian Per1 and Per2 expression in the suprachiasmatic nucleus of freely moving rats. *J. Biol. Rhythms.* 31, 108-111 (2016)  
DOI: 10.1177/0748730415621412

Yarimizu D, Doi M, Ota T, and Okamura H: Stimulus-selective induction of the orphan nuclear receptor NGFIB underlies different influences of angiotensin II and potassium on the human adrenal gland zona glomerulosa-specific 3 $\beta$ -HSD isoform gene expression in adrenocortical H295R cells. *Endocr. J.* 62, 765-776 (2015)  
DOI: 10.1507/endocrj.EJ15-0211

Konosu-Fukaya S, Nakamura Y, Satoh F, Ono Y, Felizola SJ, Ise K, Maekawa T, Takeda K, Katsu K, Fujishima F, Kasajima A, Watanabe M, Arai Y, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE, Doi M, Okamura H, and Sasano H: 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in human aldosterone-producing adenoma. *Mol. Cell. Endocrinol.* 408, 205-212 (2015)  
DOI: 10.1016/j.mce.2014.10.008

土居雅夫, 岡村均:  
生体リズムを調節するGPCR  
*医学のあゆみ* 256, 15984-15989 (2016)

鎌水大介, 土居雅夫, 岡村均:  
概日リズム異常による高血圧  
*Medical Science Digest* 18, 394-397 (2015)

土居雅夫, 岡村均:

新しいアルドステロン症の病理診断  
*腎臓内科・泌尿器科* 2, 404-409 (2015)

薛元瑞, 土居雅夫, 岡村均:  
中枢時計とエネルギー代謝制御  
*内分泌・糖尿病・代謝内科* 41, 36-42 (2015)

#### [学会発表](計13件)

Masao Doi and Hitoshi Okamura:  
Identification of a new class of GPCR signalling that tunes the central clock. Asian Forum on Chronobiology in 2015, Sapporo, Japan, Sept 7, 2015

Masao Doi and Hitoshi Okamura:  
Identification of a new class of GPCR signalling that tunes the central clock. Gordon Research Conference, Chronobiology, Girona, Spain, June 30, 2015

Daisuke Yarimizu, Masao Doi, and Hitoshi Okamura: Stimulus-selective induction of the orphan nuclear receptor NGFIB underlies different influences of angiotensin II and potassium on the adrenal gland zona glomerulosa-specific 3 $\beta$ -HSD isoform gene expression in human adrenocortical H295R cells. The 8th International Aldosterone Forum in Japan, Yokohama, Japan, May 30, 2015

Masao Doi and Hitoshi Okamura:  
Identification of a new class of GPCR signalling that tunes the central clock. The 16th Servier-IGIS symposia, Nice, France, April 10, 2015

土居雅夫, 岡村均: 視交叉上核ニューロンの概日振動を調節するGz共役型オーファン受容体の同定. BMB2015 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会、神戸、2015年12月4日

Hiroyuki Shimatani, Masao Doi, Hitoshi Okamura: Time-dependent recruitment of circadian negative regulators PER and CRY to the target gene promoter. BMB2015 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会、神戸、2015年12月1日

Genzui Setsu, Masao Doi, Hitoshi Okamura: Agonist-independent basal activity of Gz-linked orphan GPCR. BMB2015 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会、神戸、2015年12月1日

村井伊織, 土居雅夫, 岡村均: 生体中枢時計を調律する新規オーファンGPCRの同定. 第22回日本時間生物学会年会, 東京, 2015年11月22日

Masao Doi, Hitoshi Okamura: Identification of a new class of GPCR signaling that tunes the central clock. 第22回日本時間生物学会年会, 東京, 2015年11月21日

岡村均, 山口賀章, 土居雅夫, Fustin JM, 阿部学, 崎村健司: 生体リズム研究の為に視交叉上核発現物質のノックアウトマウスの作成. 2015年度包括脳ネットワーク冬のシンポジウム福岡, 2015年12月17日

Sumihiro Kunisue, Masao Doi, Hitoshi Okamura: Identification of a new class of GPCR signaling that tunes the central clock. 第32回内分泌代謝学サマーセミナー, 福岡, 2015年7月10日

Genzui Setsu, Masao Doi, Hitoshi Okamura: Identification of Gz as a mediator of orphan GPCR constitutive activity. 第32回内分泌代謝学サマーセミナー, 福岡, 2015年7月10日

Sumihiro Kunisue, Masao Doi, Hitoshi Okamura: The orphan G-protein coupled receptor GPRS has an agonist-independent basal activity to reduce cAMP synthesis in a pertussis toxin-insensitive manner. 第38回日本神経科学大会, 神戸, 2015年7月29日

〔図書〕(計2件)

土居雅夫:  
哺乳類の生物時計  
光と生命の事典(日本光生物協会編) 朝倉書店 pp. 198-199 (2016)

土居雅夫:  
視交叉上核ニューロンの概日振動を調節する Gz 共役型オーファン受容体の同定  
ブレインサイエンスレビュー2016 クバプロ pp281-297

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/system-b>

iology/doimasao/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土居 雅夫 (DOI, Masao)  
京都大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号: 20432578

(2) 連携研究者

岡村 均 (OKAMURA, Hitoshi)  
京都大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号: 60158813

Fustin Jean-Michel  
京都大学・大学院薬学研究科・特定講師  
研究者番号: 50711818

笹野 公伸 (SASANO, Hironobu)  
東北大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 50187142

中村 保宏 (NAKAMURA, Yasuhiro)  
東北大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 80396499

椛島 健治 (KABASHIMA, Kenji)  
京都大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 00362484

(3) 研究協力者

鎌水 大介 (YARIMIZU, Daisuke)

中川 優紀 (NAKAGAWA, Yuuki)

辻花 光次郎 (TSUJIHANA, Kojiro)

村井 伊織 (MURAI, Iori)