

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：24601  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010 ～ 2012  
 課題番号：22591015  
 研究課題名（和文） 新たに見出した雌マウス副腎皮質が大量に産生するプロゲステロンの産生機序と役割  
 研究課題名（英文） The production mechanism and role of progesterone in female mouse adrenal cortex.  
 研究代表者  
 秦野 修（HATANO OSAMU）  
 奈良県立医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：40164850

## 研究成果の概要（和文）：

雌マウス副腎皮質では、その最内層の副腎髄質との境界領域において、コルチコステロン合成酵素を発現しない層が存在することを見出した。この層においてはCYP11B1/B2、及びCYP21の発現を認めなかったが、プロゲステロン産生に至るまでのステロイドホルモン合成酵素群は、調べた限りにおいて全て発現していた。又、この層はアロマターゼ欠損の雌マウスにおいては見出されなかったことから、この層の形成におけるエストロゲンの関与が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

In the adrenal cortex of female mice, we found the zone in which CYP11B1/B2 and CYP21 could not be detected. This zone is contiguous to adrenal medulla. In the zone, steroid hormone producing enzymes which are involved in the production of progesterone were expressed. In aromatase-deficient female mice, the contiguous region to adrenal medulla expressed CYP11B1(/B2), suggesting the role of estrogen in the formation of this zone.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌学

## 1. 研究開始当初の背景

副腎皮質と性腺は、哺乳動物における主要なステロイドホルモン産生器官であり、研究代表者は両原基が共通の原基から分化することを見出した。性腺原基は精巣、卵巣へ分化し、著しい性差を生じるが、もう一方の副腎皮質における性差の研究報告はごく限ら

れており、副腎皮質のステロイドホルモン産生における雌雄の違いに関しては、殆ど明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、これまで殆ど明らかにされてい

ない副腎皮質のステロイドホルモン産生における雌雄の違いを見出す目的で行った。

雄、雌マウス副腎におけるコルチコステロン合成酵素の組織分布を調べたところ、性成熟雌マウスにおいて、副腎髄質との境界領域に、コルチコステロン合成酵素を発現しない層が存在することを見出した。この層は、同週齢の雄マウスには存在しなかった。そこで、この層における他のステロイドホルモン産生酵素群の発現解析を行うとともに、この性差の形成機序と役割を調べる目的で、雄、雌副腎におけるステロイドホルモン含有量や、エストロゲン合成酵素である aromatase の欠損マウスにおける影響、培養細胞を用いてエストロゲンがステロイドホルモン産生酵素群の発現へ影響するかについて解析した。

### 3. 研究の方法

#### 免疫組織化学法

マウス副腎の凍結切片(6 $\mu$ m)を、種々のステロイドホルモン合成酵素群 (CYP11A, 3 $\beta$ -HSD, CYP21, CYP11B1/B2 等) に対するウサギ抗体と Cy3 標識抗ウサギ2次抗体で赤色に可視化し、同時に、副腎髄質特異的な tyrosine hydroxylase に対するマウス抗体と Alexa488 標識抗マウス2次抗体 (Molecular probes) で副腎髄質を緑色に可視化した。

Aromatase 欠損マウスについても同様の解析を行った。Aromatase 欠損マウスは、藤田保健衛生大学・原田信広教授より御供与いただいた。

#### 培養細胞におけるステロイドホルモン合成酵素群 mRNA の発現へのエストロゲンと forskolin の影響

H295R 細胞 (ヒト副腎皮質球状層由来) において、エストロゲン (17 $\beta$ -estradiol, 100 nM)、及び/もしくは、forskolin (20 $\mu$ M) 添加後、12 時間後に mRNA を抽出 (Qiagen, EZ1-kit)、cDNA 作成 (Roche, Transcriptor) の後、リアルタイム PCR 法 (Invitrogen, Express-Syber ER) で、内在性のステロイドホルモン合成酵素 mRNA 発現への影響を調べた。

#### ステロイドの抽出と定量

マウス副腎と血清からクロロホルムを用いてステロイドを抽出した。内部標準として DOCA とデキサメサゾンを加えた。その標品を順相セップカラムを1回、逆相セップカラムを2回通して、ステロイドを分画した。更に HPLC (Shimadzu LC-20AD) による分画を行った後、マススペクトル法で計測した。マススペクトル法は APCI-LC/MS (Atmospheric

Pressure Chemical Ionization: 大気圧イオン化) 法を用いた。ステロイドの同定と定量は、クロマトグラム保持時間とマススペクトル分子量ピークからステロイドの同定を行い、そのピーク面積の測定から定量を行った。

### 4. 研究成果

性成熟・未交尾雌マウスにおいては、副腎皮質と髄質との境界領域に、雄には存在しない X-zone が存在するが、本研究では、この領域にほぼ相当して、プロゲステロン産生に至る酵素群 (CYP11A や 3 $\beta$ -HSD 等) は発現するが、コルチコステロン産生に参与する CYP11B1/B2 や CYP21 を発現しない層を見出した。この層は同週齢の雄マウスには存在しなかった。この結果は、この層においてプロゲステロン産生が行われていることを示唆するものであった。そこで、実際の副腎内プロゲステロン量をマススペクトル法で計測したところ、雌マウス副腎は雄マウス副腎に比べて、プロゲステロン量が多い結果を得た。又、未交尾雌マウス副腎におけるプロゲステロンは妊娠雌マウス副腎より多い結果を得た。

一方、aromatase 欠損マウスにおいては、雌マウス副腎皮質におけるこの層が見出せず、副腎髄質に隣接する領域まで CYP11B1 (/B2) が発現していた。この結果は、この層の形成には、エストロゲンが関与することを強く示唆した。

そこで、培養細胞 (ヒト副腎球状層由来 H295R 細胞) において、エストロゲン (17 $\beta$ -estradiol) 添加による、内在性のステロイドホルモン合成酵素 mRNA 発現量への影響をリアルタイム PCR 法で調べたところ、エストロゲン単独投与ではコルチコステロン合成に参与する CYP11B1 mRNA 量が増加するが、エストロゲンに加えて forskolin を添加したところ、CYP11B1 mRNA 量は減少した。一方、CYP11A, 3 $\beta$ -HSD, CYP11B2 mRNAs においては、エストロゲン添加による大きな変化を認めなかった。これらの結果は、女性ホルモンであるエストロゲンが、cAMP 上昇時 (糖質コルチコイド合成刺激時) において、コルチコステロン産生を減少させることを示唆しており、雌マウス X-zone にほぼ相当してコルチコステロン合成が行われないことへの関連が示唆された。

これらの結果によって、マウス副腎皮質におけるステロイドホルモン産生に雌雄差が存在することが明らかになった。

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 6 件)

- (1) Downregulation of SIK2 expression promotes the melanogenic program in mice. : Horike N, Kumagai A, Shimono Y, Onishi T, Itoh Y, Sasaki T, Kitagawa K, Hatano O, Takagi H, Susumu T, Teraoka H, Kusano KI, Nagaoka Y, Kawahara H, Takemori H.

*Pigment Cell Melanoma Res.* 23(6): 809-819 (2010)

査読有り DOI : 10.1111

- (2) Phosphorylation of the CREB-specific coactivator TORC2 at Ser(307) regulates its intracellular localization in COS-7 cells and in the mouse liver. : Uebi T, Tamura M, Horike N, Hashimoto YK, Takemori H.

*Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299(3): E413-425 (2010)

査読有り DOI: 10.1152

- (3) SIK2 is a new key regulator for neuronal survival after ischemia via TORC1-CREB. : Sasaki T, Takemori H, Yagita Y, Terasaki Y, Uebi T, Horike N, Takagi H, Susumu T, Teraoka H, Kusano K, Hatano O, Oyama N, Sugiyama Y, Sakoda S, Kitagawa K.

*Neuron* 69(1): 106-119 (2011)

査読有り DOI: 10.1016

- (4) cAMP stimulation of StAR expression and cholesterol metabolism is

modulated by co-expression of labile suppressors of transcription and mRNA turnover. : Jefcoate CR, Lee J, Cherradi N, Takemori H, Duran H.

*Mol Cell Endocrinol.* 336: 53-62 (2011)

査読有り DOI: 10.1016

- (5) Involvement of SIK3 in Glucose and Lipid Homeostasis in Mice. : Uebi T, Itoh Y, Hatano O, Kumagai A, Sanosaka M, Sasaki T, Sasagawa S, Doi J, Tatsumi K, Mitamura K, Morii E, Aozasa K, Kawamura T, Okumura M, Nakae J, Takikawa H, Fukusato T, Koura M, Nishi M, Hamsten A, Silveira A, Bertorello AM, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Tomonaga T, Naka T, Ikegawa S, Tsumaki N, Matsuda J, Takemori H.

*PLoS One* 7(5):e37803. (2012)

査読有り DOI: 10.1371

- (6) 坂東真一, 秦野修, 窪田宜夫, 大西健. 植物由来天然生理活性物質フィトケミカルの放射線増感作用.

*放射線生物研究*, 47: 193-210 (2012)

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 伊東祐美、上尾達也、熊谷彩子、早坂直人、秦野修、竹森洋.

塩誘導性キナーゼSIKはコレステロール代謝の新たな制御分子である.

SIK is a new regulator of cholesterol metabolism.

第 33 回日本分子生物学会年会・第 83

回日本生化学会大会合同大会

2010 年 12 月 9 日 神戸

- (2) 竹森洋、上尾達也、熊谷彩子、伊東祐美、秦野修、早坂直人、中村和臣、小浦美奈子、松田潤一郎。

塩誘導性キナーゼ SIK は核内受容体の反応性を決定する。

第 18 回ステロイドホルモン学会

2010 年 11 月 27 日 名古屋

- (3) Ken Ohnishi, Shin-ichi Bando, Noboru Kubota, Hiroshi Takemori, Osamu Hatano.

Screening of flavonoids sensitizing radiation sensitivity of cancer cells.

14th International Congress of Radiation Research.

2011 年 8 月 30 日, Warsaw, Poland.

- (4) Shin-ichi Bando, Osamu Hatano, Hiroshi Takemori, Nobuo Kubota, Ken Ohnishi.

Screening of phytochemicals sensitizing heat sensitivity of cancer cells.

The 11<sup>th</sup> International Congress of Hyperthermic Oncology & The 29<sup>th</sup> Japanese Congress of Thermal Medicine (ICHO&JCTM 2012).

2012 年 8 月 29 日, Kyoto, Japan.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秦野 修 (HATANO OSAMU)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40164850

### (2) 研究分担者

竹森 洋 (TAKEMORI HIROSHI)

独立行政法人医薬基盤研究所・その他部局等・プロジェクトリーダー

研究者番号：90273672

研究分担者

西 真弓 (NISHI MAYUMI)

奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40295639

### (3) 連携研究者

野中泰樹 (NONAKA YASUKI)

大阪青山大学・健康科学部・教授

研究者番号：80156215

連携研究者

太田 美穂 (OHTA MIHO)

相愛大学・人間発達学部・教授

研究者番号：90132935

連携研究者

大西 健 (OHNISHI KEN)

茨城県立医療大学・保険医療学部・教授

研究者番号：50152195