

京都大学	博士（薬科学）	氏名	山崎 文義
論文題目	アルドステロン合成系酵素HSD3B1の発現調節機構に関する研究		
（論文内容の要旨） アルドステロンは副腎皮質球状層で産生されるステロイドホルモンであり、腎臓に作用してナトリウムイオンの再吸収を促進し、体液量を増加させることで、血圧を上昇させる。アルドステロンの合成は、Renin-Angiotensin-Aldosterone系（RAA系）のAngiotensin II (AngII)によって調節されている。一方で副腎皮質球状層の異常によってアルドステロンが過剰分泌されることがある。このような病態は、原発性アルドステロン症といわれ、高血圧症の5%～15%を占めている。 当研究室では、時計遺伝子であるCry1, Cry2の両遺伝子欠損マウスの副腎皮質の球状層において、ステロイドホルモン合成に関わる酵素HSD3B6が過剰発現し、その結果から高アルドステロン血症による食塩感受性高血圧を示すことを明らかにした。このことから、生体リズムの異常と高血圧を関係づける重要因子としてHsd3b6が明らかとなったが、この遺伝子とRAA系との関係は明らかにされていなかった。そこで、本研究ではマウスのHsd3b6に対応するヒトのホモログ遺伝子HSD3B1について解析を行い、この遺伝子がヒトの副腎皮質球状層由来の培養細胞であるH295R細胞において、AngIIにより調節されることを解明し、さらにその転写調節のメカニズムを明らかにした。 第1章 AngII刺激によるHSD3B1およびアルドステロン合成酵素群の発現解析 まずHSD3B1がAngIIによって遺伝子発現が誘導されるか検討するために、H295R細胞をAngII刺激し、経時的な遺伝子発現変動プロファイルを解析した。このときアルドステロン合成に関わると知られているSTAR、CYP11A1、CYP11B1、CYP11B2、CYP21B1およびHSD3B2についても同様に発現変動プロファイルを解析した。この結果、AngII刺激によってHSD3B□□ familyであり副腎皮質に発現すると知られていたHSD3B2ではなく、HSD3B1の遺伝子発現が誘導されることが明らかになった。また、HSD3B1の遺伝子発現は4時間後にピークを迎え、他のアルドステロン合成に関わる遺伝子に比べて急性誘導を受けることが明らかとなった。 AngII刺激によるHSD3B1遺伝子発現の誘導が、AngII 受容体であるAT₁, AT₂を介するかを検討するために、それぞれの受容体の特異的阻害剤であるCV-11974およびPD-123319を用いた。その結果、CV-11974処理によってHSD3B1の遺伝子発現の誘導が消失することから、AT₁を介しその下流でHSD3B1の遺伝子発現の誘導を起こしていることが明らかになった。			

第2章 *HSD3B1*の転写調節メカニズムの解析

*HSD3B1*のプロモーターを調べたところ、転写開始点近傍に核内受容体であるNGFIB familyの結合配列（NGFIB-response elements, NBRE）及びSTAT6結合配列の存在することを見出した。STAT6はリン酸化を受けて二量体化し活性化すること、NGFIB familyはImmediate early geneであり、新規のタンパク合成を必要とすることに着目し、タンパク質合成阻害剤であるCycloheximide（CHX）を用いて、*HSD3B1*のAngII刺激後の経時的な遺伝子発現変動プロファイルを解析した。その結果、CHX処理によってAngIIによる*HSD3B1*の遺伝子発現の誘導が完全に消失することが認められ、NGFIB familyによる関与が示唆された。またこのときH295R細胞においてNGFIB遺伝子のAngII刺激後の経時的な発現変動プロファイルを解析したところ、実際に急速なmRNAの誘導を確認することができた。そこで、NGFIBのタンパク質レベルの変動をウェスタンブロット解析によって追跡したところ、NGFIBタンパク質はAngII刺激後4時間でピークを迎え、そのタイムコースは*HSD3B1*のmRNAの発現のピークと一致することがわかった。またさらに、NGFIBタンパク質が実際に*HSD3B1*のプロモーター上のNBREに結合するかどうかをゲルシフトアッセイによって検討したところ、AngII刺激によって誘導されたNGFIBタンパク質は確かに*HSD3B1*遺伝子プロモーター上のNBREに結合することが確認できた。

以上の結果より、*HSD3B1*がRAA系によって調節される遺伝子であり、その発現誘導にNGFIBが関わっていることが明らかになった。副腎皮質において球状層特異的に*HSD3B1*が発現しアルドステロン合成に関わることから、高アルドステロン血症の治療に*HSD3B1*特異的な阻害剤が有効だと考えられ、今後の開発が期待される。*HSD3B1*やNGFIB familyが原発性アルドステロン症のうちでも病因が明らかでない特発性アルドステロン症の発症に関わっている可能性がある。今後、副腎皮質球状層におけるAngIIのシグナル伝達機構を詳細に解析することで、特発性アルドステロン症の発症機構が明らかとなることが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

生体リズムはほぼ全ての生物が保持する、きわめて基本的な生物機構である。しかし、グローバリズムの席卷する現代、我々は明暗リズムが破壊された環境下で生活することになり、その結果、多くのヒトは知らず知らずのうちに、生体リズムに変調をきたしている。リズム異常が高血圧を引き起こすことは疫学的には従来より指摘されてきたが、その明確な分子機構は全く不明であった。それは、生体リズムという現象が、つい最近に至るまで、近代科学が説明できない神秘のベールに覆われていたからであった。

この状況は、1997年に哺乳類の遺伝子が発見されることで一変した。本研究は、時計遺伝子である *Cry1*, *Cry2* の両遺伝子を欠損させ生体リズムの全く消失させたマウスが食塩負荷時、高アルドステロン血症による食塩感受性高血圧を示すことを示した先行研究を受けて、時計遺伝子に制御される新酵素 *HSD3B1* が、体内における主要な血圧制御機構であるレニンアンギオテンシンアルドステロン系の指令をどのように受けるのかを、分子レベルで検索した研究である。

その結果、ヒトの副腎皮質球状層由来の培養細胞である *H295R* 細胞においては、アンギオテンシン II は AT_1 受容体を介して *HSD3B1* 遺伝子を誘導することを明らかにした。さらに、その発現誘導に転写因子 *NGF1B* が関与していることが明らかとなった。この研究は、細胞内の時計遺伝子に制御される酵素が、血圧制御システムによる制御も受けることを分子レベルで示したはじめての研究で、今後の高血圧研究への展開が期待される。

本研究は、プレグネノロンをプロゲステロンに変換するステロイド合成の必須の段階の新酵素が、レニンアンギオテンシンアルドステロン系に組み込まれており、その転写制御機構を明らかにした初めての論文である。よって本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 23 年 2 月 21 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降