



Title	Differential regulation of $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type II and $17\alpha$ -hydroxylase/lyase P450 in human adrenocortical carcinoma cells by epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor
Author(s)	土居, 純子
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42560">https://hdl.handle.net/11094/42560</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	土居純子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学 位 記 番 号	第 16033 号
学 位 授 与 年 月 日	平成13年3月23日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	Differential regulation of $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type II and $17\alpha$ -hydroxylase/lyase P450 in human adrenocortical carcinoma cells by epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor (上皮細胞増殖因子および線維芽細胞増殖因子によるヒト副腎皮質ガン細胞の $3\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素IIおよびP450c17遺伝子の発現調節)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 岡本 光弘
	(副査) 教授 谷口 直之 教授 高井 義美

## 論文内容の要旨

## 【目的】

ステロイドホルモン生合成に対する上皮細胞増殖因子(EGF)の作用は中枢を介する間接作用であるこれまで考えられてきた。たとえばEGFはヒツジの視床下部に作用し副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRH)の分泌を促し、その結果下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)分泌が増加し、副腎皮質からのコルチゾール分泌が起こる。またラットにおいてもEGFが視床下部や下垂体に作用して副腎皮質のステロイドホルモン産生を間接的に増加させるという報告がある。一方、ヒトの副腎皮質組織にはEGFファミリーに属するTGF- $\alpha$ が存在することやEGF受容体が発現していることなど、EGFが副腎皮質に直接的に作用することを示唆する報告もある。本論文ではEGFおよび類似の細胞増殖因子である線維芽細胞増殖因子(bFGF)が副腎皮質のステロイドホルモン生合成に直接的な影響を及ぼすかどうか、そしてもし直接的に影響するならばその作用機序はどうなっているかを明らかにする目的で、ヒト副腎皮質ガン細胞由来のH295R細胞を用いて実験を行った。

## 【方法ならびに成績】

H295R細胞は、1%ITS、2%UltroserGを含むDMEM/F-12で培養した。EGF/bFGFやその他の試薬を添加する24時間前に培地を0.01%牛血清アルブミンを含む無血清培地に置き換えた。EGF/bFGF処理の24時間後に培地を回収し、ステロイドをHPLCで解析した。さらに細胞からRNAを抽出しノーザンプロット分析、あるいはRT-PCRと組み合わせたサザンプロット分析により、ステロイドホルモン生合成酵素遺伝子の発現を検討した。

H295R細胞をEGFあるいはbFGFで刺激するとコルチゾール分泌速度が特異的に上昇した。各種ステロイドは全てコレステロールから合成されるが、最初のステロイド中間体であるプレグネノロンがコルチゾールに転換する経路には、プレグネノロンの3位水酸基が $3\beta$ HSDによって脱水素された後17位がP450c17によって水酸化されるD4経路と、P450c17による水酸化反応の後 $3\beta$ HSDによる脱水素反応が起こるD5経路が存在する。このうちD5経路の場合、一部の反応中間ステロイドはP450c17によってさらにC17-20間が切断され最終的にデヒドロエピアンドロステロンに転換する。EGFおよびbFGFがコルチゾール分泌を特異的に上昇させることから、D4経路が特に活性化されていることが予想されるため、ステロイド合成酵素のmRNAの発現量を検討した。その結果、EGFおよびbFGFで処理すると $3\beta$ HSDのmRNAの発現が顕著に高まっていることが明らかとなった。一方、P450c17mRNAの発現は両増殖因子の添加により抑制された。その他のステロイドホルモン生合成酵素であるP450

scc、P450c21、P45011 $\beta$ 、P450aldoなどのmRNAの発現量は対照群と差はなかった。

EGF添加による、3 $\beta$ HSDのmRNA誘導の経時的变化を検討したところ、3 $\beta$ HSDmRNAはEGF添加後6時間から増加し始め、12時間で最大に達しその後徐々に減少した。bFGFで処理した場合、6時間後から増加しはじめるがその増加は36時間後も増加し続ける傾向にあった。一方、P450c17mRNA発現抑制に関してはEGFおよびbFGFともに処理後24時間で最低値に達した。

EGFおよびbFGFによる3 $\beta$ HSDとP450c17のmRNAの発現変動は比較的遅い反応であり、新たなタンパク合成を介することが示唆されたため、タンパク質合成阻害剤（シクロヘキシミド）を利用し検討した。その結果、EGFおよびbFGFによる3 $\beta$ HSDmRNA発現の誘導はシクロヘキシミドによって完全に阻害された。一方P450c17mRNAの発現はシクロヘキシミドによりむしろ促進された。さらに、各種プロテインキナーゼ阻害剤の効果を検討した結果、カルモジュリンキナーゼⅡ阻害剤（KN-93）は3 $\beta$ HSDmRNA及びP450c17mRNAの発現を抑制した。

#### 【総括】

1. EGFおよびbFGFの副腎皮質ステロイドホルモン合成に及ぼす効果は視床下部-下垂体系に対する間接的なもののかに副腎皮質細胞に直接的に作用し、コルチゾール分泌を促進させることを確認した。
2. EGFおよびbFGFは副腎皮質におけるステロイドホルモン合成酵素のうち3 $\beta$ HSDmRNA発現を顕著に促進した。一方P450c17mRNA発現を抑制した。すなわち、D4経路が活性化されていることが示唆された。
3. EGFおよびbFGFを介した3 $\beta$ HSDおよびP450c17遺伝子の発現にはシクロヘキシミド感受性因子が関与することが示唆された。この因子の有無によりEGFおよびbFGFによる3 $\beta$ HSD/P450c17遺伝子の発現量が逆転することから、副腎皮質における2種類のステロイド、つまりコルチゾールを代表とするコルチコステロイドとデヒドロエピアンドロステロンなどの副腎性アンドロゲン、の産生経路の方向を決定するうえで重要な役割を果たす可能性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

副腎皮質からのステロイドホルモンの分泌は視床下部-下垂体系による調節を受けているが、副腎皮質組織内で生じた上皮細胞増殖因子（EGF）や線維芽細胞増殖因子（FGF）などの細胞増殖因子がステロイド産生細胞に直接働いてホルモン分泌を微調整する可能性も示唆されている。学位申請者はこの可能性を確認する目的で、ヒト副腎皮質腫瘍由来のH295R細胞を用いて検討した。その結果EGFおよびFGFは3(OH) Steroid Dehydrogenase遺伝子の転写を特異的に活性化し、一方17-Hydroxylase遺伝子の転写を抑制することを見出した。またこの転写調節にはCaM Kinaseが関与すること、シクロヘキシミド感受性因子が関与することなどを見出した。この結果は副腎皮質細胞のデヒドロエピアンドロステロン産生代謝経路（△5経路）をコルチゾール産生代謝経路（△4経路）に変換するのに上記の細胞増殖因子が関与することを示唆している。したがって本論文は副腎皮質組織の発生におけるステロイド産生能の変動現象や、副腎皮質の層分化に伴うステロイド産生能の変動現象の分子機構を解明する上で重要な知見を与える物であり、博士（医学）の学位の授与に値すると考えられる。