

転写活性化共役因子（コアクチベーター）病と考えられるアンドロゲン不応症

足立, 雅広
九州大学大学院医学研究院病態制御内科学（第三内科）

<https://doi.org/10.15017/7218254>

出版情報：福岡医学雑誌. 92 (7), pp.258-265, 2001-07-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



転写活性化共役因子 (コアクチベーター) 病と考えられる アンドロゲン不応症

九州大学大学院医学研究院病態制御内科学 (第三内科)
足 立 雅 広

Androgen-Insensitivity Syndrome as a Possible Coactivator Disease

N Engl J Med 343; 856-862, 2000

はじめに

アンドロゲン不応症 androgen insensitivity syndrome (AIS) は、遺伝的性は男性 (46XY) でアンドロゲンを十分に分泌する睾丸を有しているにもかかわらず、アンドロゲン作用機構の障害により種々の程度の男性化障害を呈する疾患で、ステロイドホルモン不応症の中では最も多い疾患である¹⁾。AIS は、男性化障害の強い順に、完全型睾丸性女性化症、不完全型睾丸性女性化症、Reifeinstein 症候群、男性不妊症の 4 型に分類されている。AIS の原因として、そのほとんどが、アンドロゲン受容体 (Androgen Receptor: AR) 遺伝子の異常 (伴性劣性遺伝) によるものである。AR 遺伝子の異常には、遺伝子全体もしくは部分的な欠損を生じるもの、AR とアンドロゲンとの結合能が消失あるいは低下するもの、標的遺伝子上流のアンドロゲン応答配列への AR の結合が障害されるものなど、現在まで 300 以上の AR 遺伝子異常を認めるアンドロゲン不応症症例が報告されている。

AR は、グルココルチコイド受容体 (GR)、エストロゲン受容体 (ER) などとともにステロイドホルモンレセプタースーパーファミリーに属する。AR は、リガンドであるアンドロゲンが結合すると、細胞質から核内に移行し、2 量体で標的遺伝子上流のアンドロゲン応答配列に結合し、TATA ボックスを標的とする基本転写因子群に転写のシグナルを伝達し、標的遺伝子の転写を活性化あるいは不活性化させる (図 1 A)。最近、

AR などの受容体と基本転写因子群間のシグナル伝達を橋渡しするものとして、転写共役因子 (コファクター) が同定され注目を集めている²⁾。転写共役因子には、転写を促進する働きを持つ転写活性化共役因子 (コアクチベーター) と、転写を抑制する転写抑制共役因子 (コリプレッサー) が存在する。AR は他のステロイドホルモン受容体同様に、N 端領域、DNA 結合領域、リガンド結合領域の 3 つの機能ドメインから構成される (図 1 B)。AR は、他の受容体同様に、N 末端側に activation function-1 (AF-1) と、C 末端側に activation function-2 (AF-2) という 2 ケ所の転写活性化領域を持つ。AF-1 領域、AF-2 領域それぞれに、基本転写因子に活性化シグナル伝達を仲介するコアクチベーターが結合する。

アンドロゲン不応症、甲状腺ホルモン不応症 (Refetoff 症候群) などのステロイドホルモン不応症において、受容体遺伝子に異常を認めない症例が存在し、その病因は不明であった。今回、臨床的には完全型睾丸性女性化症と診断されながら、AR 遺伝子に異常を認めない症例を経験した。本研究において、その AIS 症例において、AR の標的遺伝子に対する転写活性化能が特異的に低下していることを証明し、その転写活性化能の低下が、AR と基本転写因子群とのシグナル伝達を仲介するコアクチベーターの異常であることを明らかにした³⁾。

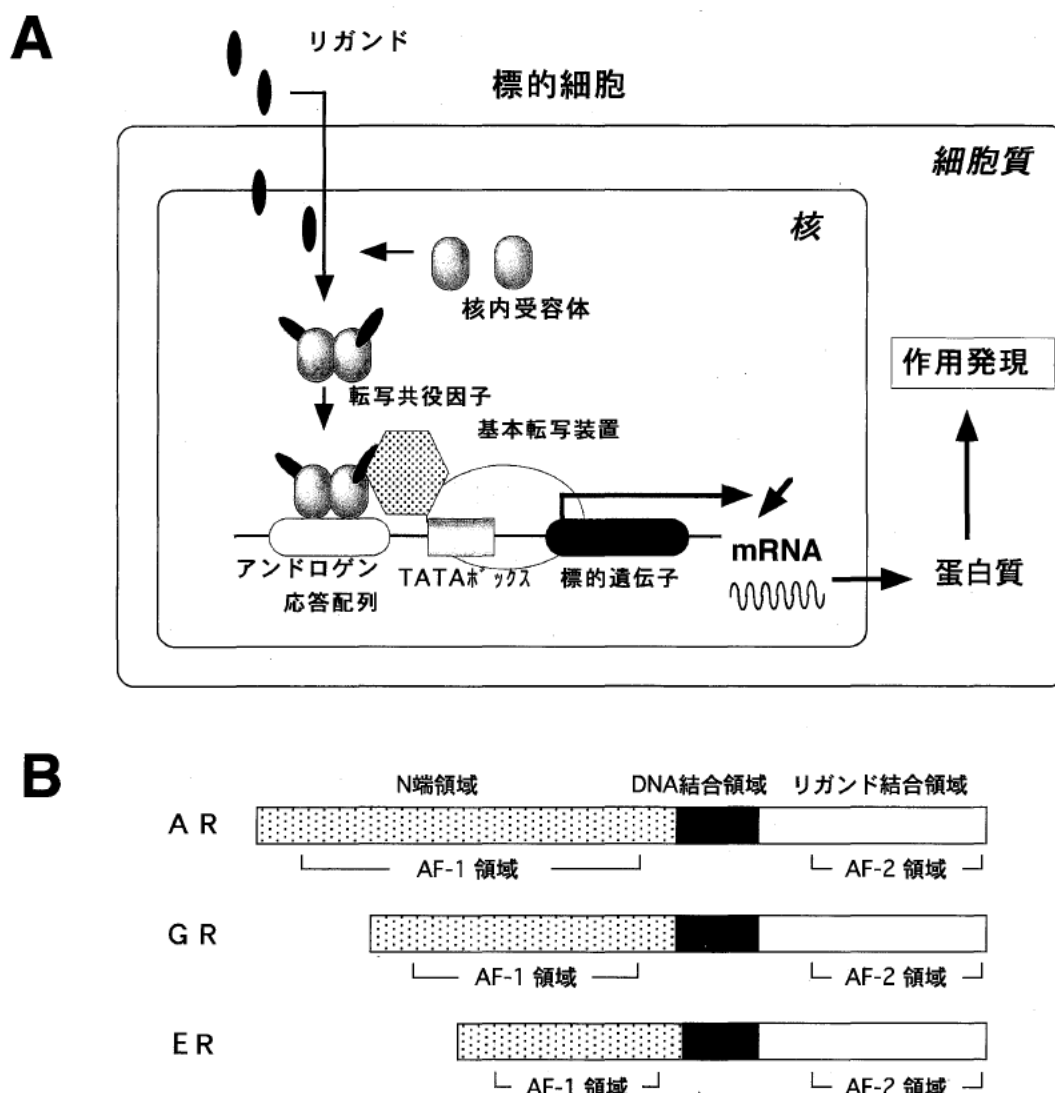


図1 A. アンドロゲンレセプター (AR) を介したアンドロゲンの分子作用メカニズム (概念図) B. AR の構造 (模式図) GR: グルココルチコイドレセプター ER: エストロゲンレセプター

症 例

症例: 19 歳, 女性

家族歴: 2 人の姉に異常なし, 血族結婚なし,

既往歴: 生後 10 ヶ月両側鼠径ヘルニア根治術

現症: 身長 167 cm, 体重 54 kg 体型, 性格は女性型。乳房の発育は良好であるが, 恥毛, 腋毛は認めない。外陰部は正常女性型で, 陰核肥大は認めず。膣は 6 cm にて盲端となり, 子宮腔部は触知しなかった。

CT, MRI にて子宮は欠如していた。両側とも外腸骨動脈の内側に精巣を認めた。核型は 46XY であった。内分泌学的検査にて, 血中テストステロン 557 ng/dl, 血中 DHT 49 ng/dl と, ともに正常男性の正常範囲であった。HCG 負荷に対する血中テストステロンならびに血中 DHT の反応は良好であった。以上臨床所見, 内分泌学的所見より, 本症例を完全型睾丸性女性化症と診断した。

アンドロゲン結合の解析: 患者培養陰部皮膚線維芽

細胞における、標識アンドロゲンアナログである $[^3\text{H}]$ mibolerone の結合能は、最大リガンド結合量は、9210 sites/cell (正常男性の平均値 ($\pm$ SD): 9305 $\pm$ 2030 sites/cell), 解離定数は、0.52 nM (正常男性の平均値 ($\pm$ SD): 0.56 $\pm$ 0.21 nM) であり、正常者と比較して異常を認めなかった。

AR 遺伝子の塩基配列の解析: 患者のゲノム DNA において、AR 遺伝子のエクソン領域、プロモーター領域、エクソン-イントロン境界領域に異常を認めなかった。調整した ARcDNA の塩基配列にも異常を認めなかった。

方 法

(1) 培養陰部皮膚線維芽細胞における AR の核内移行

AR とクラゲの発光蛋白である GFP (Green Fluorescent Protein) の融合遺伝子を作成し、本症例の培養陰部皮膚線維芽細胞に導入し、 10^{-7} M の DHT 添加後の AR の核内移行と安定性を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(2) 培養陰部皮膚線維芽細胞における AR, GR の転写活性能

本症例と、当科で経験した AR 遺伝子異常 (Cys⁵⁷⁹→phe) により、AR の標的遺伝子上流のアンドロゲン応答配列への結合能の低下のため完全型睾丸性女性化症をきたした症例⁹⁾と、正常者 5 例の培養陰部皮膚線維芽細胞に、AR あるいは GR の発現ベクターと、AR, GR 共通の応答配列を含む mouse mammary tumor virus (MMTV) プロモーターとルシフェラーゼ発現遺伝子を連結したレポーター遺伝子を導入し、それぞれのリガンドである 10^{-7} M DHT あるいは 10^{-7} M デキサメサゾンを添加後、ルシフェラーゼアッセイを行い、AR, GR のリガンド依存性転写活性能を測定し、比較検討した。また、本症例における AR の転写活性能の低下の原因が、AR の AF-1 領域か AF-2 領域によるものかを検討する目的で、PCR 法を用いて AR が AF-1, GR が AF-2 の AR/GR キメラ遺伝子、GR が AF-1, AR が AF-2 の GR/AR キメラ遺伝子、また AR, GR の AF-1 発現遺伝子 (C 端欠失遺伝子) あるいは AF-2 発現遺伝子 (N 端欠失遺伝子) を作成し、上記同様に各々変異受容体の転写活性能を測定し、

比較検討することで、AR 転写活性化領域の障害部位を検討した。

(3) 培養陰部皮膚線維芽細胞において既知のコアクチベーターが AR, GR の転写活性化能へ及ぼす影響

(1), (2) の検討において、本症例の病因が、コアクチベーターの異常と考えられたため、以下の検討を行った。本症例、正常者の培養陰部皮膚線維芽細胞に、AR あるいは GR の発現ベクターとともに、AR と関連する既知のコアクチベーターである、p300, SRC-1, TIF2, ARA70, SRA の発現ベクターを導入し、転写活性化能へ及ぼす影響を比較した。

(4) GST pull down analysis を用いた培養陰部皮膚線維芽細胞における AR AF-1 結合蛋白の検討

バキュロウイルス発現系を用いて、GST (Glutathion S Transferase) を融合させた AR AF-1, GR AF-1 蛋白を、昆虫細胞である Sf9 細胞に発現させ、精製した。 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンにて標識した本症例、正常者の培養陰部皮膚線維芽細胞、LNCaP 細胞、CV-1 細胞の細胞抽出物と、GST AR AF-1 あるいは、GST GR AF-1 を反応させ、互いに結合した蛋白質を精製後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、各細胞間における GST AR AF-1 あるいは、GST GR AF-1 結合蛋白を比較した。

結 果

(1) AR の核内移行の検討

本症例の培養陰部皮膚線維芽細胞において、AR-GFP 融合蛋白の核内移行の速度と安定性は、正常者と比較して異常を認めなかった。

(2) 培養陰部皮膚線維芽細胞における AR, GR の転写活性能の検討

AR 遺伝子に異常を認めた完全型睾丸性女性化症患者の AR の転写活性能は正常者と比較して差を認めなかったが、本症例においては、正常者と比較して約 9% 以下と低下していた (図 2 B)。GR の転写活性能は 3 者間に有意差を認めなかった (図 2 A)。

本症例の AR/GR キメラ受容体の転写活性能は、正常者と比較して約 12%~17% と低下していた (図 2 C)。GR/AR キメラ受容体の転写活性能は 3 者間に差を認めなかった (図 2 D)。

本症例の AR AF-1 の転写活性能は、正常者と比

- 正常者
 ■ 本症例
 ▨ アンドロゲン受容体遺伝子に異常を認めるアンドロゲン不応症の患者

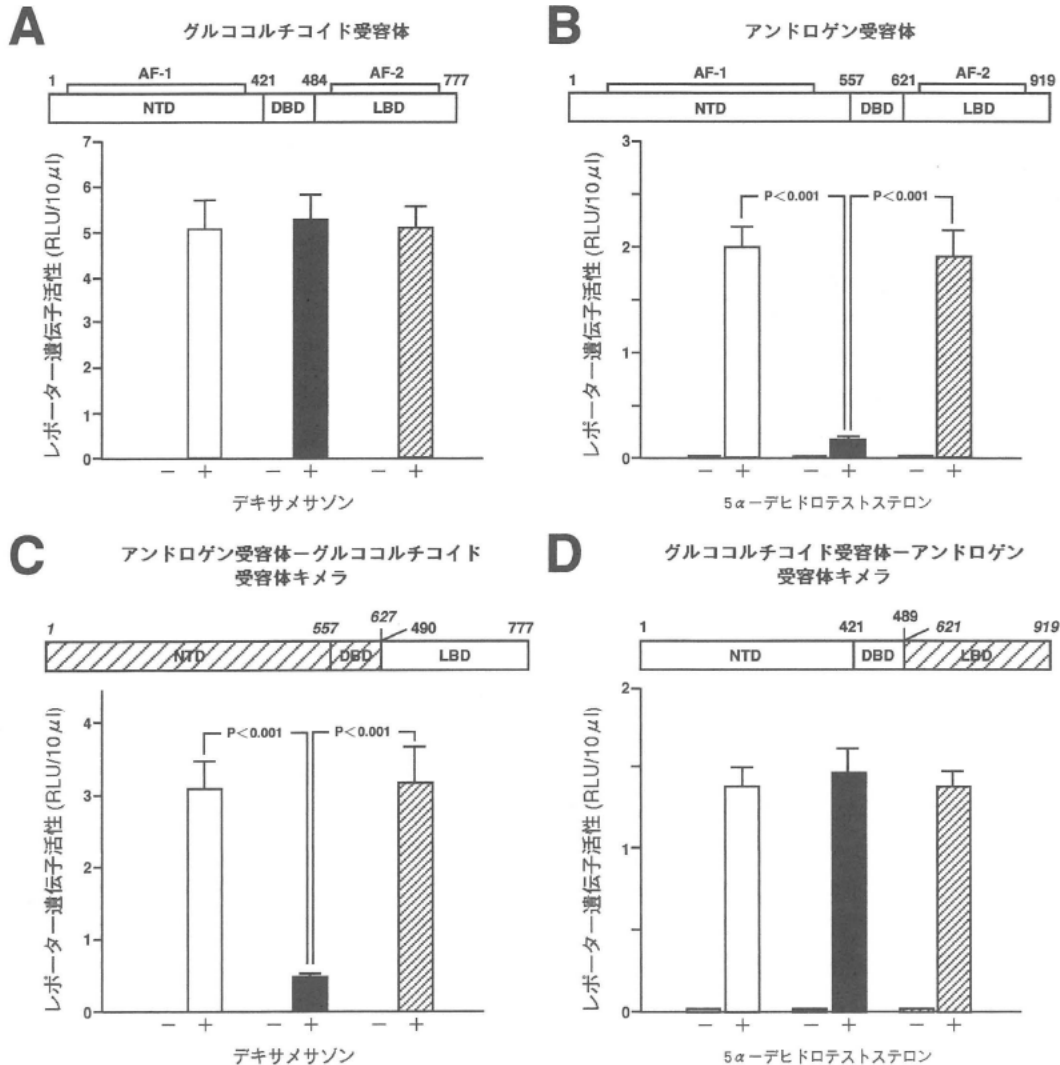


図 2 本症例, アンドロゲン受容体遺伝子に異常を認めた (Cys⁵⁷⁹→phe) 完全型睾丸性女性化症患者と 5 人の正常者から採取した培養陰部皮膚線維芽細胞における GR (A), AR (B), GR と AR のキメラ受容体 (C と D) によるリガンド依存性転写活性化能
 各々の実験は, 10^{-7} M の DHT あるいは 10^{-7} M のデキサメサゾン存在下 (+印) あるいは非存在下 (-印) にて行った。
 各々のグラフは平均値 (+SD) で示した。
 各々のグラフの上の図は受容体の構造を示す。キメラ受容体の図のイタリックの数字は AR, 非イタリックの数字は GR のアミノ酸の番号を示す。キメラ受容体の網掛けと空白の領域は, それぞれ AR と GR 由来であることを示している。
 NTD は, 受容体の N 末端領域, DBD は DNA 結合領域, LBD はリガンド結合領域を表している。

較して約20%と低下していた。GR AF-1, AR AF-2, GR AF-2の転写活性化能は、3者間において有意差を認めなかった。(結果は呈示していない)

(3) 既知のコファクターがAR, GRの転写活性化能に及ぼす影響

正常者の培養陰部皮膚線維芽細胞において、既知のコファクター(p300, SRC-1, TIF2, ARA70, SRA)の強制発現にて、AR, GRの転写活性化能の増加を認めた。しかし、本症例において、GRの転写活性化能は正常者同様に増加を認めたが、ARの転写活性化能は正常者の13%以下に低下したままで回復しなかった。

(4) AR AF-1 結合蛋白の解析

正常者の培養陰部皮膚線維芽細胞(図3AとBの3列目), LNCaP細胞(図3Aの7列目)とCV-1細胞(図3Aの9列目)の細胞抽出液中において、分子量90 kDaのAR AF-1結合蛋白が検出された。しかし、本症例の培養陰部皮膚線維芽細胞の細胞抽出液においては、この蛋白は検出されなかった(図3AとBの5列目)。また、検討したすべての細胞において分子量76 kDaのGR AF-1結合蛋白が検出された(図3Aの2, 4, 6, 8列目と図3Bの2, 4列目)。

考 察

本症例は、臨床的には完全型睾丸女性化症と診断されたが、培養陰部皮膚線維芽細胞におけるアンドロゲンの結合能は正常で、AR遺伝子に異常を認めず、またアンドロゲン結合後のARの核内移行や安定性に異常を認めなかった。本症例の培養陰部皮膚線維芽細胞におけるARの転写活性化能は、AR遺伝子異常に起因する完全型睾丸女性化症、正常者と比較すると、著明に低下していた。また、本症例において、GRの転写活性化能は障害されていないことより、本症例においてARと基本転写因子を結ぶAR特異的なシグナル伝達の障害が示唆された。ARとGRのキメラ受容体、N端、C端欠失遺伝子の転写活性化能を比較検討することで、本症例において、AR AF-2領域からの転写活性化シグナル伝達は正常であるが、AR AF-1領域からのシグナル伝達が障害されていることが証明された。この障害は、ARと相関する既知の転写共役因子の強制発現にても回復できなかった。GST pull down analysisにて、本症例において、90 kDaのAR AF-1

結合蛋白が欠失していた。以上より、AR AF-1と結合し基本転写因子群への転写活性化シグナルを伝達するAR特異的で、かつARの転写活性化に不可欠な未知のコアクチベーターが存在し、その異常が本症例の病因であると考えられた。

ARを含む核内受容体において、AF-2領域は各受容体間で相同性が高く、結合するコアクチベーターも重複している。それに対して、AF-1領域は各受容体間において相同性が低く、結合するコアクチベーターの解明も進んでおらず未知な部分が多い。今後、本研究で存在が証明されたAR AF-1, GR AF-1結合蛋白を同定することは、受容体のAF-1領域の作用機構を解明する上で重要だと考えられる。

本研究の結果、本症例は、ステロイドホルモン不応症の新しい疾患概念として、転写活性化共役因子(コアクチベーター)病であることを提唱する(図4)。その他のコアクチベーター病として、骨形成異常と精神遅滞を伴うRubinstein-Taybi症候群の原因として、CBP遺伝子の異常が報告されている⁹⁾。内分泌学的領域において、他のステロイドホルモン不応症や先天性副腎低形成と性腺機能低下症をきたすDAX-1異常症などの多数の疾患において、受容体遺伝子に異常を認めない症例が存在し、コファクター異常の可能性が考えられ、解析が進められている。また、前立腺癌や乳癌などのホルモン依存性の腫瘍においても、その腫瘍の増殖機構において、コアクチベーター、コリプレッサーが関与していることが示唆されている。今後の研究において、未知の転写共役因子の同定、各転写共役因子の生理学的役割や、疾患の病因への関与について解明されることが期待される。

謝 辞

本研究を評価して頂き、第3回福岡医学会賞を授与して頂いた、福岡医学会ならびに福岡医学会幹事の諸先生方に深く感謝を申し上げます。また、この研究を進めるにあたって、御指導を賜りました九州大学大学院医学研究院病態制御内科学(第三内科)、名和田 新教授、九州大学大学院医学研究院老年医学、高柳 涼一教授ならびに九州大学大学院医学研究院病態制御内科(第三内科)の諸先生方に深謝致します。

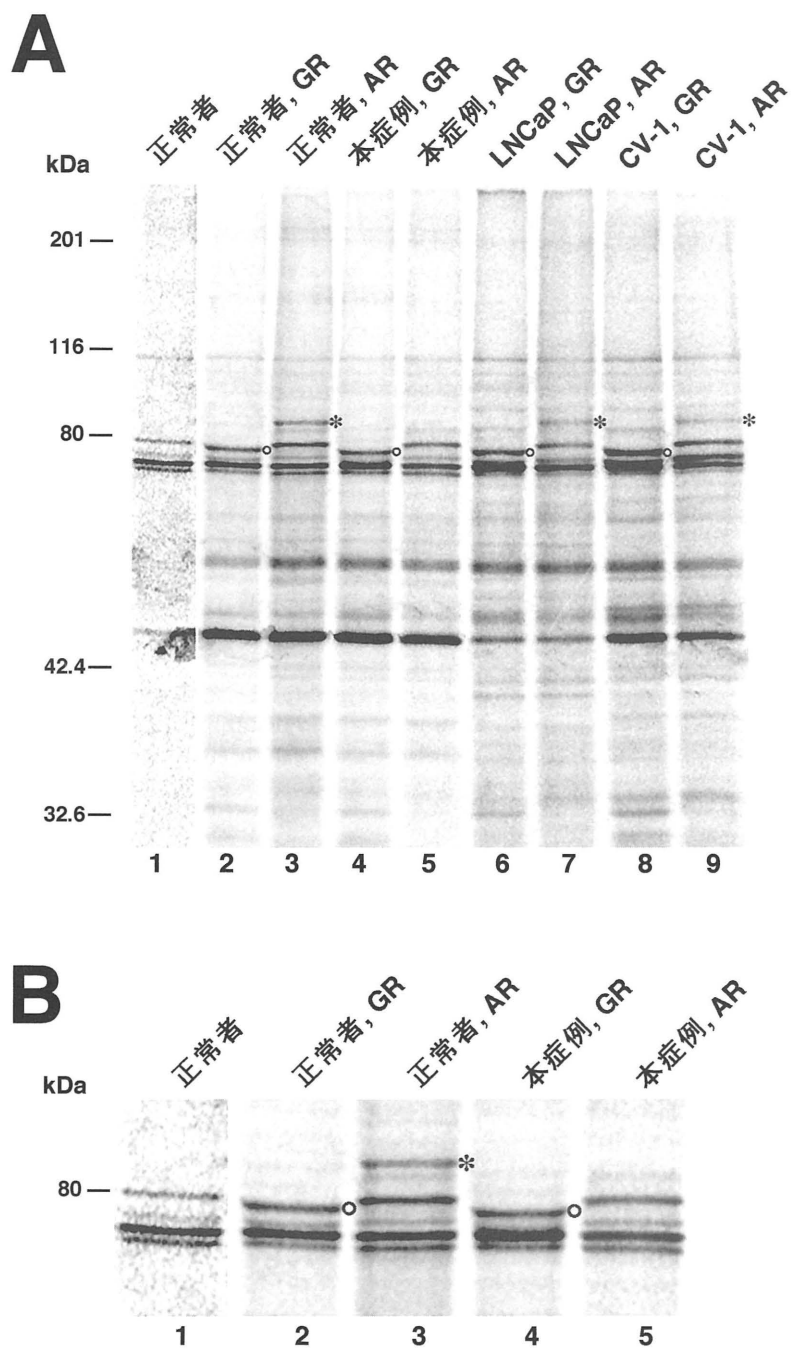


図3 GST pull down analysis による AR と GR の AF-1 領域に結合する蛋白の検討
 BはAの1から5列の拡大である。
 星印は AR の AF-1 領域と特異的に結合する分子量 90 kDa の蛋白を示し、丸印は GR の AF-1 領域と特異的に結合する分子量 76 kDa の蛋白を示す。

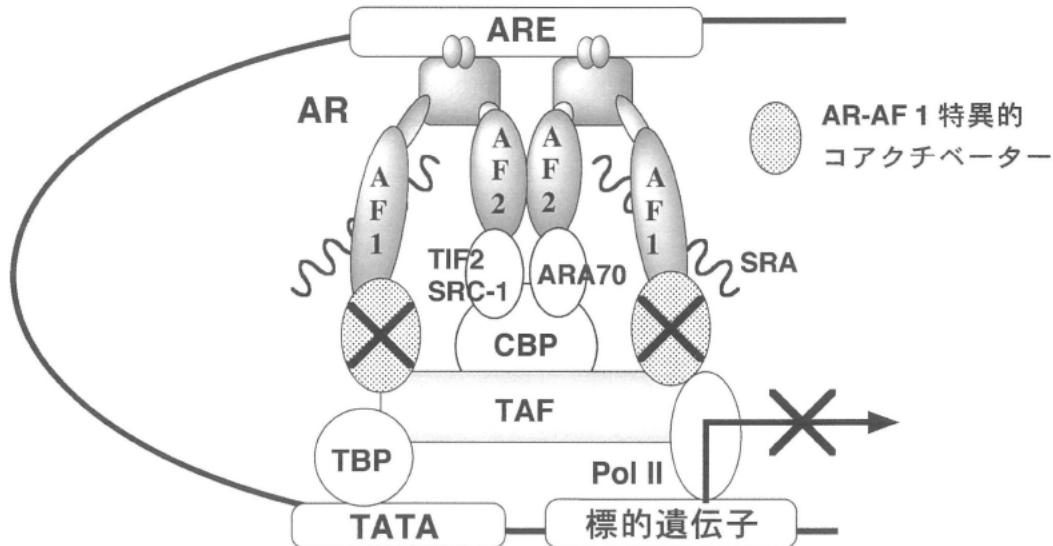


図4 アンドロゲン不応症におけるコアクチベーター病の概念

AR AF-1 特異的コアクチベーターの障害が本症例のアンドロゲン不応の原因と考えられた。

文 献

- 1) Adachi M, Takayanagi R, Tomura A, Imasaki K, Kato S, Goto K, Yanase T, Ikuyama S and Nawata H: Androgen-insensitivity syndrome as a possible coactivator disease. *N Engl J Med.* 343: 856-862, 2000.
- 2) Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS and Tung L: Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol.* 10: 1167-1177, 1996.
- 3) Imasaki K, Okabe T, Murakami H, Murakami H, Tanaka Y, Haji M, Takayanagi R and

Nawata H: Androgen insensitivity syndrome due to new mutations in the DNA-binding domain of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 120: 15-24, 1996.

- 4) Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RCM, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJB, Goodman RH, Peters DJM and Breuning MH: Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature.* 376: 348-351, 1995.

- 5) Quigley CA, de Bellis A, Marschke KB, el Awady MK, Wilson EM and French FS: Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev.* 16: 271-321, 1995.

著者プロフィール

足立 雅広（あだち まさひろ）

九州大学大学院医学研究院病態制御内科学（第三内科）

1992 年九州大学医学部卒業，同年九州大学医学部第三内科入局，1994 年九州大学大学院医学系研究科内科系専攻入学，1999 年福岡県立嘉穂病院内科（内科医長）現在に至る◇研究テーマ：アンドロゲン受容体の分子生物学的研究◇趣味：読書，野球

