

## 博士学位論文

### 学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 藤木 純平

学 位 の 種 類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第4項に該当

学位論文の題目 ステロイド局所生合成における硫酸化ステロイドの役割とその  
代謝制御に関する研究

#### 審 査 委 員

主査 教 授 岩野 英知（獣医生化学）

副査 教 授 寺岡 宏樹（獣医薬理学）

副査 教 授 北村 浩（獣医生理学）

## 学位論文要旨

### ステロイド局所生合成における 硫酸化ステロイドの役割とその代謝制御に関する研究

酪農学園大学大学院獣医学研究科  
獣医生化学教室 藤木 純平

ステロイドホルモンは主にグルココルチコイド、アンドロゲンおよびエストロゲンに分類され、コレステロールを基質とし多段階の酵素反応を経て合成される。代表的なグルココルチコイドであるコルチゾールは副腎において、性ステロイドであるテストステロンやエストラジオールは、それぞれ精巣、卵巣において合成されることが古典的に知られている。分泌されたステロイドは血液循環を介して標的臓器に作用し、生体内の恒常性維持、ストレス応答や妊娠生理において内分泌因子として機能する。一方で、近年、局所的に生合成される非古典的なステロイド合成経路が知られるようになり、局所型ステロイドの生合成とその機能に関する知見が蓄積されている。そこで第 I 章では、局所型ステロイド合成系として、げっ歯類の骨格筋におけるグルココルチコイド合成について調べた。マウス骨格筋由来筋芽細胞である C2C12 を材料とした解析の結果、C2C12 筋芽細胞は、コレステロールからのステロイドホルモン合成に関わる Cyp11a1 の発現を欠くことが分かった。一方で、ステロイド合成の前駆物質としてプレグネノロン硫酸抱合体を利用する新たな生合成経路を持つことを明らかにした。ステロイド硫酸抱合体は、古典的にステロイドの不活化体として体外へ排泄されると信じられてきたが、これらの結果はヒト妊娠期に見られる“feto-placental unit”のように、硫酸化ステロイドが局所型ステロイド生合成における前駆物質の供給フォームであることを意味する。また、第 II 章におけるラット肝臓での硫酸化ステロイド合成能の検討から、げっ歯類の肝臓における硫酸抱合反応が、局所型ステロイド生合成経路の前駆物質を供給することが考察された。硫酸化ステロイドの細胞内への取り込みには特定のトランスポーターが必要であることから、取り込み臓器に選択性を付与する点で、硫酸抱合体を供給フォームとして用いることは合理的であると考えられる。

硫酸化されたステロイドはトランスポーターを発現する特定臓器に取り込まれ、脱抱合されることでステロイド合成に供される。一方で、代表的な環境ホルモンのビスフェノール A (BPA) やビスフェノール F (BPF) も硫酸抱合体へ代謝される。つまり、抱合体親和性トランスポーターと脱抱合酵素を豊富に発現している胎盤は、BPA や BPF の曝

露リスクが高い臓器であると考えられる。そこで第 4 章では胎盤に着目し、BPA や BPF の胎盤ステロイド合成経路に対する毒性発現機構を調べた。ヒト胎盤由来細胞である BeWo を BPA や BPF で刺激すると、*CYP11A1* と *TSPO* の発現が転写レベルで抑制され、胎盤におけるプロジェステロン合成のかく乱が示唆された。また、BPA や BPF は特定の micro RNA の発現を減少させ、その標的である FBXW7 の翻訳を促進した。また、胎盤細胞での FBXW7 の基質候補として、*CYP11A1*、*TSPO* の転写制御を担う Sp4 が示唆された。胎盤由来プロジェステロンは T 細胞のサイトカイン産生を変化させ、妊娠時の免疫寛容形成の一端を担う。また、胎児においてコルチゾルに変換され、胎児臓器の発達に寄与する。これらのことから、胎盤由来プロジェステロン生合成のかく乱が、ビスフェノール類の着床不全や次世代影響に関連していることが考えられた。

第 5 章では、トリプルネガティブ乳がん (triple negative breast cancer, TNBC) でのエストロゲン受容体 (estrogen receptor, ER)  $\alpha$  による抗腫瘍作用の分子メカニズムに迫った。TNBC 細胞では ER $\beta$  からのシグナルが細胞周期制御因子の遺伝子発現を抑制し細胞周期を G2/M 期で停止させることが分かった。一方で、抗腫瘍因子として認知される FBXW7 が TNBC 細胞での G2/M 期の遷移に働くことが見出された。すなわち、ER $\beta$  シグナルが FBXW7 に対して拮抗的に作用することが明らかになった。FBXW7 の ER 経路における役割を解明するため、TNBC である MDA-MB-231 細胞で FBXW7 をノックダウンしたところ、硫酸化エストロゲンの細胞内取り込みに関わる *OATP4A1* や脱抱合を担う *STS*、さらに ER $\beta$  をコードする *NR3A2* の発現が増加した。以上の結果から、TNBC では FBXW7 が硫酸化ステロイドの取り込みや再賦活化、そして受容体を介したシグナル伝達までを包括的に制御していることが見出された。これらの知見を基に、FBXW7 が抑制する ER $\beta$  シグナルを標的とした TNBC の新たな治療戦略の構築が期待される。

本研究では、ステロイド局所生合成経路における硫酸化ステロイドの役割を見出し、TNBC 細胞の FBXW7 がステロイドの生合成や代謝に関わる遺伝子発現制御の鍵分子であることを示した。しかしながら、他の細胞でのステロイド生合成における FBXW7 の役割は未知である。今後、古典的ステロイド合成経路や局所型ステロイド合成経路における FBXW7 の機能を詳細に解明することで、ステロイド内分泌学の新たな側面を切り開くことが期待される。ステロイドは妊娠生理や生殖発生に限らず、免疫細胞との相互作用や細胞の分化、増殖にも働く。したがって、ステロイド生合成および代謝の制御機構を解明することで、免疫疾患や感染症などの幅広い疾患制御に貢献することが期待される。

# 論文審査の要旨および結果

## 1 論文審査の要旨および結果

審査は、1)体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2)科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

### 論文の概要について

本研究では、内分泌作用のあるステロイドホルモンについて、特に「ステロイド局所合成経路」や「ステロイドの代謝（特に硫酸化）に関する分子メカニズム」について幅広く研究を展開し、新しい知見を証明し、まとめたものである。第I章、第II章においては、骨格筋における局所型ステロイド合成と肝臓における硫酸抱合の意義について調べ、第III章では、胎盤のステロイド合成系に与えるビスフェノールAの毒性機構を明らかにした。さらに第IV章では、硫酸化ステロイド代謝におけるFBXW7（ユビキチン・プロテアソーム系の分子の1つ、タンパク質の分解に関わる）の新しい役割を検証し、乳腺腫瘍に対する新規治療戦略の可能性を見いだした。

### 研究の背景と目的

生体内で産生され、様々な生体の恒常性を調節するステロイドホルモンは、主に副腎や性腺において産生されることが古くから知られている。近年、神経細胞において局所的にステロイドが合成され、近隣の細胞にオートクライン、パラクラインにて作用し、生体の高次機能を調整していることが明らかとなっている。また、ステロイドホルモンの代謝には、化学物質の排泄を担う抱合代謝（グルクロン酸抱合、硫酸抱合など）が関わっていることも古くから知られているが、これらは不必要となったステロイドの排泄のためだけでなく、ステロイドなどの再利用にも使用される代謝経路であることも示されてきている。このような背景をもとに、本研究は、古くから明らかとなっているステロイドの合成、代謝システムについて、異なる角度から掘り下げることで、新しい知見を見いだすことに成功した。また、そのステロイドの合成代謝経路が環境からの化学物質により影響する機序、さらには乳腺腫瘍における腫瘍選択的な作用薬としての可能性を示すことに成功した。以下、各章の目的について記す。

第I章：骨格筋における局所ステロイドの合成を明らかにする

第II章：ステロイド代謝について、肝臓でのステロイド硫酸抱合の意義を精査する

第III章：胎盤のステロイド合成系に与えるビスフェノールAの毒性機構を明らかにする

第IV章：乳腺腫瘍における硫酸化ステロイドの作用機序の解明と治療への可能性を探る

### 研究の成果

本研究の成果を以下にまとめる。

1. マウスの骨格筋由来の株化筋芽細胞を用いた解析の結果、コレステロールからのステロイドホルモン合成経路を欠くものの、ステロイド合成の前駆物質としてプレグネノロン硫酸抱合体を利用する新たな生合成経路によりコルチコステロンを合成することが明

らかとなった。これは、硫酸化ステロイドが排泄のためではなく、ステロイド合成における前駆物質の供給フォームであることを示している。

2. 硫酸化ステロイドの産生場所として、これまで報告のある副腎以外に、特にげっ歯類では肝臓がその産生場所であることを示した。
3. 内分泌かく乱物質のビスフェノール A (BPA) などにより、胎盤ステロイド合成系が攪乱される機序の一端を明らかにした。その機序は、特定の micro RNA の発現低下とそれに伴うタンパク質の分解を制御する FBXW7 が関与することを明らかにした。
4. 乳癌細胞を用いて、FBXW7 の役割を精査し、エストロゲン受容体を標的とした硫酸化ステロイドの抗腫瘍作用の分子メカニズムを明らかにした。

## 研究の評価

本研究は、古典的なステロイドの合成系ならびにステロイドの代謝系について、新たな視点による検証を行い、筋肉細胞におけるステロイドの局所合成とその意義、さらにステロイド硫酸抱合体の再利用経路を明らかにすることができた。このような機序の解明において、定説を検証しつつ実験結果の中から独自の考察を導き出すという申請者の能力を十分に評価できる。さらに、胎盤ステロイド合成に対する BPA による毒性発現機序を解明する過程において見いだした FBXW7 の役割を解明し、それら知見から乳癌細胞に対する新規治療戦略への可能性を追求した点も独創的で評価できる。今後、さらなる検証により論理を固め、ハイレベルな研究展開を大いに期待できる。

## 学位論文の一部を公表した論文

1. Fujiki J, Maeda N, Sato M, Ieko T, Inoue H, Iwasaki T, Iwano H, Yokota H (2018) Corticosterone biosynthesis in mouse clonal myoblastic C2C12 cells. *Steroids* (138) 64 - 71

## 参考論文＜自身が筆頭著者または共著者である論文＞

1. **Fujiki J**, Nobori H, Sato A, Sasaki M, Carr M, Hall WW, Orba Y, Sawa H (2018) Single amino acid mutation in dengue virus NS4B protein has opposing effects on viral proliferation in mammalian and mosquito cells. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 71(6) 448 - 454
2. **Fujiki J**, Nakamura T, Furusawa T, Ohno H, Takahashi H, Kitana J, Usui M, Higuchi H, Tanji Y, Tamura Y, Iwano H (2018) Characterization of the Lytic Capability of a LysK-Like Endolysin, Lys-phiSA012, Derived from a Polyvalent Staphylococcus aureus Bacteriophage *Pharmaceuticals* 11(1)
3. Ieko T, Inoue S, Inomata Y, Inoue H, **Fujiki J**, Iwano H (2019) Glucuronidation as a metabolic barrier against zearalenone in rat everted intestine *The Journal of Veterinary Medical Science* 82(2) 153 - 161
4. Nishi K, Gondaira S, Okamoto M, Nebu T, Koiwa M, Ohtsuka H, Murai K, Matsuda K, **Fujiki J**, Iwano H, Nagahata H, Higuchi H. (2019) Effect of Mycoplasma bovis on expression of inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases mRNA in bovine synovial cells. *Veterinary immunology and immunopathology* 216 (109920)
5. Ieko T, Sasaki H, Maeda N, **Fujiki J**, Iwano H, Yokota H Analysis of Corticosterone and Testosterone Synthesis in Rat Salivary Gland Homogenates *Frontiers in Endocrinology* 10 (479)
6. Temuujin U, Tserendorj A, **Fujiki J**, Sakoda Y, Tseren-Ochir EO, Okamatsu M, Matsuno K, Sharav T, Horiuchi M, Umemura T, Chultemdorj T (2019) The first isolation and identification of canine parvovirus (CPV) type 2c variants during 2016–2018 genetic surveillance of dogs in Mongolia. *Infection, Genetics and Evolution* 73(73) 269 - 275 2019
7. Iwano H, Inoue Y, Takasago T, Kobayashi H, Furusawa T, Taniguchi K, **Fujiki J**, Yokota H, Usui M, Tanji Y, Hagiwara K, Higuchi H, Tamura Y Bacteriophage (2018) ΦSA012 Has a Broad Host Range against Staphylococcus aureus and Effective Lytic Capacity in a Mouse Mastitis Model. *Biology* 7(1)

以上のことから、藤木 純平氏は、博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

## 2 最終試験の結果

審査委員 3 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2020年6月17日

### 審査委員

|    |     |    |    |
|----|-----|----|----|
| 副査 | 教 授 | 岩野 | 英知 |
| 副査 | 教 授 | 寺岡 | 宏樹 |
| 副査 | 教 授 | 北村 | 浩  |