

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17505

研究課題名(和文) グルココルチコイド受容体の代謝・概日リズム制御の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidating molecular mechanisms of metabolism and circadian rhythm regulation by glucocorticoid receptor

研究代表者

村山 友樹 (Murayama, Yuki)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：80869248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：GRとNr1d1の各リガンドを投与したマウス肝臓での網羅的な遺伝子発現解析を行うことにより、代謝調節と概日リズムとの新たな接点の発見と、GCsの副作用軽減や代謝疾患の改善に繋がる新たな治療法確立を目指して研究を行った。

GR・Nr1d1リガンド刺激効果のtranscriptome解析としてRNA-seq解析を行い、同時に各種ホルモン測定、肝臓中脂質の測定を行い、その結果を元にGRに拮抗的に作用するNr1d1遺伝子標的遺伝子の抽出を行った。そして当該遺伝子について、過剰発現およびノックダウンによる効果の検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

時計遺伝子とステロイドホルモンが関連を持つという側面から、ステロイド治療の副作用の軽減のために新たな分子メカニズムを探索した。特に時計遺伝子であり代謝にも関連のあるNr1d1との関連を元に、それぞれのリガンドを投与した実験を行い、それによる代謝パラメーターの変化や網羅的な遺伝子解析を行い、今後の治療につながる知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：By conducting comprehensive gene expression analysis in mouse livers treated with GR and Nr1d1 ligands, we aimed to discover a new molecular link between metabolic regulation and circadian rhythm, and establish new treatment methods that reduce side effects of GCs and improve metabolic diseases.

RNA-seq analysis was performed as a transcriptome analysis of GR / Nr1d1 ligand stimulation effect, and at the same time various hormones in the blood and lipids in the liver were measured, and based on these results, the Nr1d1 target gene that acts antagonistically to GR was extracted. Then, we verified the effect of overexpression and knockdown on the gene.

研究分野：代謝内分泌学

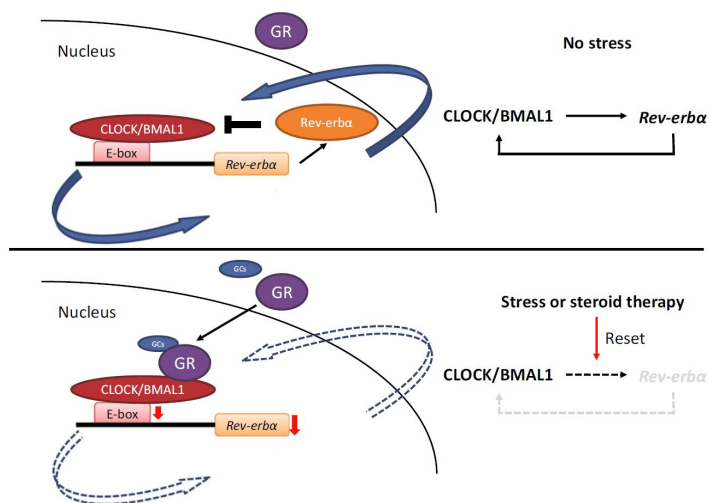
キーワード：グルココルチコイドレセプター ステロイド 時計遺伝子 代謝 脂質 血糖

1. 研究開始当初の背景

GCs は糖・脂質・タンパク質や電解質などの代謝調節、免疫系やストレス応答の制御に関わる副腎皮質から分泌される生存に必須のホルモンであり、臨床的には主に炎症の抑制を目的として膠原病や喘息などの治療薬として幅広い分野で使用されている。しかし投与量が多くなるほど不眠、脂質代謝・耐糖能異常といった副作用が表れ、これらの解決は临床上重要な課題となっている。GCs は核内受容体 GR のリガンドであり、GCs が GR に結合した際の詳細な遺伝子発現調節メカニズムやその下流標的の遺伝子群に関しては数多くの報告がなされているが、临床上での副作用の原因をはじめ未だ解明されていない作用メカニズムも多く存在する。

申請者は GCs の生理作用に関する未知のメカニズムや新たな治療法を追求する過程において、マウス肝臓において GCs ならびに GR が時計遺伝子の一つである Nr1d1 (別名: Rev-erba) のプロモーター領域に直接作用し発現を抑制することを新たに見出した(右図)。(Murayama Y et al. *FEBS Letters* 593, 423-432, 2019.)

GRはClock/Bmalを介してNr1d1(Rev-erba)の発現を抑制する

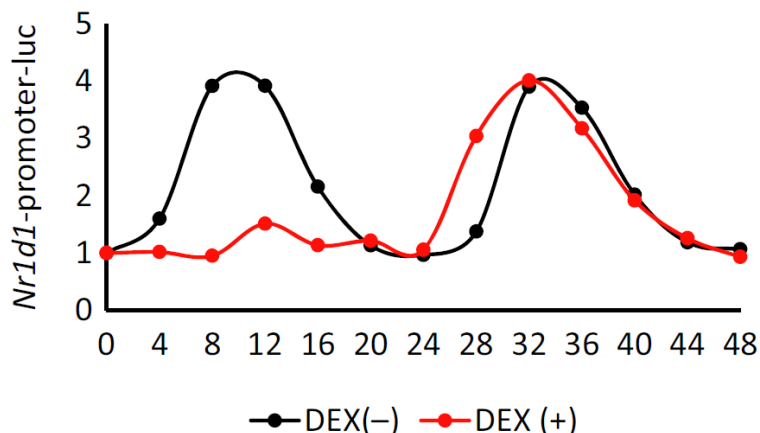


Murayama Y et al. *FEBS Letters* 593, 423-432, 2019.

Nr1d1 は生体での概日リズムを作り出す時計遺伝子の一つであり、その遺伝子発現は正確な日内変動を示し Clock や Bmal といった別の時計遺伝子によって制御されていることが報告されている。(Pleitner N et al. *Cell* 110, 251-260, 2002.) (Vitaterna MH et al. *Science* 264, 719-725, 1994.) 申請者は、GR が Nr1d1 の日内変動を担うプロモーター領域に存在する Ebox 上の Clock/Bmal 複合体に直接作用し、Nr1d1 遺伝子発現を抑制するという詳細なメカニズムを明らかにした。

内因性の GCs の分泌は日内変動を持っており時計遺伝子の調節に深く関与していることや、視床-下垂体-副腎系が末梢組織における概日リズムの同期に重要であることがよく知られている。申請者のマウスにおける GR リガンド投与実験においても、肝臓での Nr1d1 プロモーターの日内変動は投与直後完全に消失する(右図)。さらに Nr1d1 の合成リガンドを用いた研究より、Nr1d1 は肝臓において

GRリガンドであるデキサメタゾン投与により肝臓でのNr1d1プロモーター活性の日内変動は完全に消失する



Murayama Y et al. *FEBS Letters* 593, 423-432, 2019.

脂質代謝にも関わることが近年明らかとなっている。(Solt LA et al. *Nature* 29, 62-68, 2012) これらのことから、GR による Nr1d1 抑制作用は臨床上の GCs による副作用のメカニズムとも密接に関わることが想定される。

そこで本研究では、マウス肝臓における GR と Nr1d1 のそれぞれの下流制御遺伝子の重複と差異を明らかにすることで、**代謝調節と概日リズムとの新たな接点**を見出すことを学術的な問いとした。

2 . 研究の目的

本研究課題では、マウス肝臓においてGRとNr1d1のそれぞれの下流制御遺伝子を網羅的に解析することで、GR、Nr1d1各経路およびGRがNr1d1遺伝子発現を直接制御している意義を解明するとともに、治療薬としてのGCsの副作用軽減に繋がる適切な治療方法の創出を目的とした。

3 . 研究の方法

本研究課題では、GR と Nr1d1 の各リガンドを投与したマウス肝臓での網羅的な遺伝子発現解析を RNA-seq 法にて行い、各条件での遺伝子発現パターンの比較を行うことで、GR と Nr1d1 のそれぞれの下流制御遺伝子の重複と差異を明らかにし、GR により調節を受ける遺伝子の中で Nr1d1 刺激により拮抗的に制御可能な遺伝子を絞りこむ。これにより GCs の副作用軽減や代謝疾患の新たな治療法確立に向けた新規作用メカニズムと、代謝調節と概日リズムとの新たな接点を見出すことを目的とした。具体的には下記の3段階により進めた：

- [1] GR・Nr1d1 リガンド刺激効果の transcriptome 解析(RNA-seq 解析)
- [2] GR に拮抗的に作用する Nr1d1 標的遺伝子の抽出
- [3] 過剰発現・RNAi によるフェノタイプ解析

4 . 研究成果

[1] GR・Nr1d1 リガンド刺激効果の transcriptome 解析(RNA-seq 解析)

まず GR の合成リガンドであるデキサメタゾンと Nr1d1 の合成リガンドである SR9009 を単独投与したマウス群と併用投与したマウス群を用意した。各群マウス肝臓より RNA サンプルを採取し、RNA-seq 法にて網羅的な遺伝子発現解析を行った。同時に各群での血中脂質や血糖値、各種ホルモンの測定、肝臓中脂質の測定も実施した。内因性ステロイドホルモンの変動は想定通りであった。血糖値や中性脂肪、コレステロールの変化は想定と異なっていたが、SR9009 の投与による変動を認めていた。RNA-seq 法では 30 以上の遺伝子発現が DEX 投与と SR9009 投与で拮抗する方向に変動しており、目的の遺伝子である可能性が考えられた。

[2] GR に拮抗的に作用する Nr1d1 標的遺伝子の抽出

得られた RNA-seq 解析の結果を用いて各群間での遺伝子発現パターンの比較をバイオインフォマティクスツールを活用して行い、GR と Nr1d1 のそれぞれの下流制御遺伝子の重複と差異を見出し、GR に拮抗的に作用する Nr1d1 標的遺伝子候補の抽出を試みた。また各遺伝子の発現 qPCR 法にて RNA-seq の結果の妥当性と再現性の確認を行ったところ同様の結果を確認した。さらに、これらにより絞り込まれた各遺伝子が GR や Nr1d1 に直接的に制御されている標的遺伝子であるかの確認を、各遺伝子のプロモーターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイや ChIP 法での検証を試みた。

[3] 過剰発現・RNAi によるフェノタイプ解析

上記により絞り込んだ標的遺伝子に対し、アデノウイルスを用いて過剰発現とノックダウンについて肝臓での検討を行った。脂質代謝や概日リズムを中心に遺伝子変化を検証し、GR の作用に影響している可能性が示唆されたため、今後のそれらの遺伝子の発現調整メカニズムと意義について追求していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Satoh Aoi, Han Song-iee, Araki Masaya, Nakagawa Yoshimi, Ohno Hiroshi, Mizunoe Yuhei, Kumagai Kae, Murayama Yuki, Osaki Yoshinori, Iwasaki Hitoshi, Sekiya Motohiro, Konishi Morichika, Itoh Nobuyuki, Matsuzaka Takashi, Sone Hirohito, Shimano Hitoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 CREBH Improves Diet-Induced Obesity, Insulin Resistance, and Metabolic Disturbances by FGF21-Dependent and FGF21-Independent Mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100930 ~ 100930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.100930	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sekiya Motohiro, Matsuda Takaaki, Yamamoto Yuki, Furuta Yasuhisa, Ohyama Mariko, Murayama Yuki, Sugano Yoko, Ohsaki Yoshinori, Iwasaki Hitoshi, Yahagi Naoya, Yatoh Shigeru, Suzuki Hiroaki, Shimano Hitoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Deciphering genetic signatures by whole exome sequencing in a case of co-prevalence of severe renal hypouricemia and diabetes with impaired insulin secretion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12881-020-01031-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa Yoshimi, Wang Yunong, Han Song-iee, Okuda Kanako, Oishi Asayo, Yagishita Yuka, Kumagai Kae, Ohno Hiroshi, Osaki Yoshinori, Mizunoe Yuhei, Araki Masaya, Murayama Yuki, Iwasaki Hitoshi, Konishi Morichika, Itoh Nobuyuki, Matsuzaka Takashi, Sone Hirohito, Yamada Nobuhiro, Shimano Hitoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Enterohepatic Transcription Factor CREB3L3 Protects Atherosclerosis via SREBP Competitive Inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 949 ~ 971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2020.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kainoh Kenta, Takano Ryo, Sekiya Motohiro, Saito Kenji, Sugasawa Takehito, Ma Yang, Murayama Yuki, Sugano Yoko, Osaki Yoshinori, Iwasaki Hitoshi, Takeuchi Yoshinori, Yahagi Naoya, Suzuki Hiroaki, Miyamoto Takafumi, Nakagawa Yoshimi, Matsuzaka Takashi, Shimano Hitoshi	4. 巻 562
2. 論文標題 CtBP2 confers protection against oxidative stress through interactions with NRF1 and NRF2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 146 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Yoshinori, Yahagi Naoya, Aita Yuichi, Mehrazad-Saber Zahra, Ho Man Hei, Huan Yiren, Murayama Yuki, Shikama Akito, Masuda Yukari, Izumida Yoshihiko, Miyamoto Takafumi, Matsuzaka Takashi, Kawakami Yasushi, Shimano Hitoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 FoxO-KLF15 pathway switches the flow of macronutrients under the control of insulin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103446 ~ 103446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103446	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mehrazad Saber Zahra, Takeuchi Yoshinori, Sawada Yoshikazu, Aita Yuichi, Ho Man Hei, Karkoutly Samia, Tao Duhan, Katabami Kyoka, Ye Chen, Murayama Yuki, Shikama Akito, Masuda Yukari, Izumida Yoshihiko, Miyamoto Takafumi, Matsuzaka Takashi, Sugasawa Takehito, Takekoshi Kazuhiro, Kawakami Yasushi, Shimano Hitoshi, Yahagi Naoya	4. 巻 582
2. 論文標題 High protein diet-induced metabolic changes are transcriptionally regulated via KLF15-dependent and independent pathways	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 35 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.10.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 武内謙憲, 矢作直也, 會田雄一, 村山友樹, Saber Zahra Mehrazad, 何敏熙, 呼延宜人, 升田紫, 泉田欣彦, 島野仁
2. 発表標題 生体イメージングで迫る糖・脂質代謝に重要なKLF15遺伝子発現制御機構の解明
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 升田紫, 矢作直也, 武内謙憲, 和田亘弘, 呼延宜人, 李恩旭, Saber Zahra Mehrazad, 沢田義一, 村山友樹, 會田雄一, 西真貴子[辰巳], 泉田欣彦, 飯塚陽子, 位高啓史, 片岡一則, 島野仁, 門脇孝
2. 発表標題 多価不飽和脂肪酸(PUFA)によるSREBP-1特異的な抑制機序の解明
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 泉田欣彦, 和田亘弘, 呼延宜人, 鈴木卓也, 升田紫, 畠山裕康, 武内謙憲, Saber Zahra, 村山友樹, 會田雄一, 山崎悠理子, 梅原敏弘, 大竹啓之, 高橋倫子, 矢作直也, 島野仁, 山内敏正, 門脇孝
2. 発表標題 糖鎖認識メカニズムによる糖質・脂質エネルギー協調制御の解明
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 會田雄一, 矢作直也, 武内謙憲, 何敏熙, Zahra Mehrazad Saber, 呼延宜人, 村山友樹, 志鎌明人, 升田紫, 泉田欣彦, 関谷元博, 中川嘉, 松坂賢, 川上康, 島野仁
2. 発表標題 causal SNV探索を通じたApoA1遺伝子の新たな発現調節機構の解明
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村山友樹, 矢作直也, 武内謙憲, 會田雄一, 何敏熙, Mehrazad-Saber Zahra, 志鎌明人, 升田紫, 泉田欣彦, 宮本崇史, 関谷元博, 中川嘉, 松坂賢, 大崎芳典, 菅野洋子, 岩崎仁, 鈴木浩明, 川上康, 島野仁
2. 発表標題 グルコシルコリドによるGR-Bmal1/Clock複合体を介した時計遺伝子Nr1d1の抑制性転写制御機構
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木浩明, 松田えりか, 松田高明, 古田泰久, 村山友樹, 戒能賢太, 大崎芳典, 菅野洋子, 岩崎仁, 関谷元博, 矢作直也, 島野仁
2. 発表標題 機械学習を用いた原発性アルドステロン症病型診断の試み
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅野洋子, 中島里佳子, 大山真理子, 村山友樹, 大崎芳典, 岩崎仁, 関谷元博, 矢作直也, 鈴木浩明, 島野仁
2. 発表標題 亜急性甲状腺炎発症後パセドウ病が明らかになった2症例
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古田泰久, 大崎芳典, 山本由季, 大山真理子, 村山友樹, 菅野洋子, 岩崎仁, 関谷元博, 矢作直也, 鈴木浩明, 笹野公伸, 竹越一博, 島野仁
2. 発表標題 患側と考えられた副腎摘出後も改善が無く治療に苦慮した副腎髓質過形成の一例
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新田葉月, 村山友樹, 中島里佳子, 大山真理子, 大崎芳典, 菅野洋子, 岩崎仁, 関谷元博, 矢作直也, 鈴木浩明, 島野仁
2. 発表標題 成人後の治療自己中断中に糖尿病を契機に指摘された、POUF1/PIT-1遺伝子異常によると考えられる複合型下垂体機能低下症の一例
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Aita Y, Yahagi N, Takeuchi Y, Ho MH, Mehrazad-Saber Z, Huyan Y, Murayama Y, Shikama A, Masuda Y, Izumida Y, Sekiya M, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Kawakami Y, Shimano H
2. 発表標題 Elucidation Of Apoa1 Gene Regulatory Mechanism Through Searching Causal Single-Nucleotide Variants.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島里佳子, 高島佑典, 大崎芳典, 大澤真理子, 村山友樹, 菅野洋子, 岩崎仁, 関谷元博, 矢作直也, 鈴木浩明, 島野仁
2. 発表標題 高血糖高浸透圧症候群の経過中に急性動脈閉塞症を発症し、左下肢切断に至った1例
3. 学会等名 第58回日本糖尿病学会関東甲信越地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本なこ, 菅野洋子, 高島佑典, 中島里佳子, 大内奈美, 大澤真理子, 村山友樹, 大崎芳典, 岩崎仁, 関谷元博, 矢作直也, 鈴木浩明, 島野仁
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬使用中に甲状腺中毒症と副腎不全を合併した2症例
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武内謙憲, 矢作直也, 會田雄一, 村山友樹, Zahra Mehrazad Saber, 何敏熙, Karkoutly Samia, 陶都罕, 方波見京香, 志鎌明人, 升田紫, 泉田欣彦, 川上康, 島野仁
2. 発表標題 栄養素(ブドウ糖, アミノ酸, 脂質)の代謝と肝疾患と糖尿病 生体イメージングを用いたニュートリゲノミクスへのアプローチ
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 升田紫, 矢作直也, 武内謙憲, 和田亘弘, 呼延宜人, Zahra Mehrasad Saber, 沢田義一, 村山友樹, 會田雄一, 西真貴子[辰巳], 泉田欣彦, 位高啓史, 片岡一則, 島野仁, 門脇孝, 山内敏正
2. 発表標題 多価不飽和脂肪酸(PUFA)によるSREBP-1特異的な抑制機序の解明
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島里佳子, 岩崎仁, 高島佑典, 大内奈美, 松本なこ, 大澤真理子, 村山友樹, 大崎芳典, 菅野洋子, 関谷元博, 矢作直也, 鈴木浩明, 島野仁
2. 発表標題 当院におけるCOVID-19流行による糖尿病患者の血糖コントロールの変動について
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤未来, 村山友樹, 竹越一博, 大内奈美, 松本なこ, 中島里佳子, 大澤真理子, 菅野洋子, 大崎芳典, 岩崎仁, 関谷元博, 矢作直也, 鈴木浩明, 島野仁
2. 発表標題 血中遊離メタネフリン2分画の実臨床での精度の検証
3. 学会等名 第31回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相馬奈生, 村山友樹, 関谷元博, 菊池裕一, 大内奈美, 中島里佳子, 松本なこ, 大澤真理子, 大崎芳典, 菅野洋子, 岩崎仁, 矢作直也, 鈴木浩明, 加藤龍一, 島野仁
2. 発表標題 甲状腺機能亢進が疑われたIgMの干渉によるft3偽高値の一例
3. 学会等名 第31回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masuda Y, Yahagi N, Takeuchi Y, Aita Y, Murayama Y, Wada N, Huyen Y, Mehrazad Saber Z, Sawada Y, Shikama A, Izumida Y, Shimano H, Yamauchi T
2. 発表標題 Identification of PUFA-responsive domain on SREBP-1 as SCAP-independent C-terminal region.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------