

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19714

研究課題名（和文）グルココルチコイド作用を分ける新規転写制御機構の解明および副作用軽減法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the novel transcriptional regulatory mechanism to separate glucocorticoid actions.

研究代表者

吉澤 達也（Yoshizawa, Tatsuya）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・准教授

研究者番号：40313530

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、SIRT7（老化・様々な代謝・がんの調節因子として重要な役割を担っているサーチュインの一つ）を欠損させた細胞やマウスを用いて、SIRT7がグルココルチコイド（GC）による骨格筋の萎縮と骨量減少に重要な役割を果たしていることを見出した。一方、GCによる抗炎症作用はSIRT7がなくても保たれることを見出した。さらに、SIRT7がGC受容体（GR）のリジン残基のスクシニル化修飾を取り除くことを発見した。今後、SIRT7によるGRの転写制御機構を解明することで、薬理的GC副作用を軽減する方法や薬剤の開発に向けたシーズとなることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子のアセチル化以外のアシル化修飾において、その役割・重要性・制御機構の大部分が未解明である。したがって、GRの新規スクシニル化修飾およびその転写制御機構の解明は、GC作用の研究分野を超えて多くの生命現象に関わる研究であり学術的に大きな意義を持つ。副作用を軽減させた選択的GR調節薬の開発が世界的に進められているが、未だに十分な効果・成果を得られていない。本研究による新規GR転写制御機構の解明が将来の選択的GR調節薬の開発に大きく貢献できるばかりか、SIRT7やスクシニル化GR結合因子などが創薬ターゲットとなる可能性が高く、ステロイド療法の研究分野を大きく変革・発展させるポテンシャルがある。

研究成果の概要（英文）：By using knockout cells and mice for SIRT7 which is the member of Sirtuins (SIRT1-7 in mammals) regulating a wide variety of biological process, we revealed that SIRT7 play an important role for the glucocorticoid-induced osteopenia and osteoporosis. On the other hand, the loss of SIRT7 didn't affect the anti-inflammatory actions of glucocorticoids. Furthermore, we discovered that SIRT7 remove succinyl moieties from glucocorticoid receptor (GR). Finally, further studies of SIRT7-GR axis will have significant implications for the development of novel drugs attenuating the side effects of steroids.

研究分野：運動器代謝学

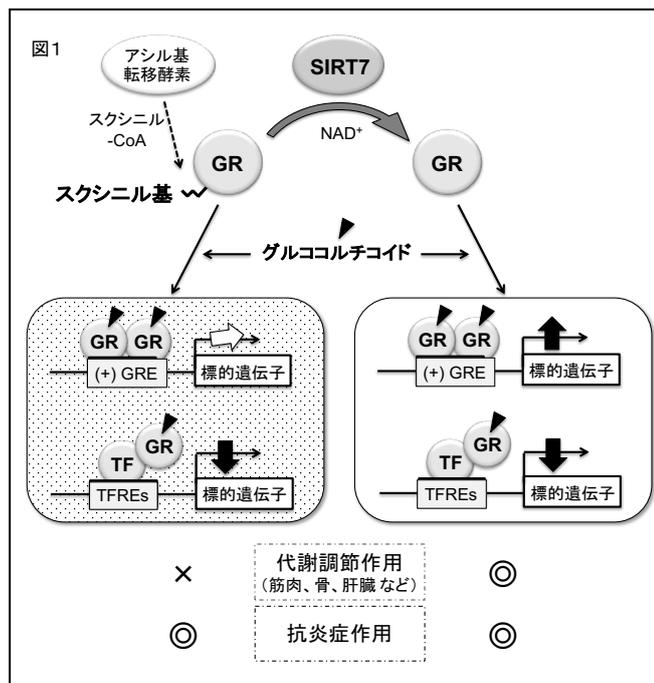
キーワード：グルココルチコイド サーチュイン 骨格筋

### 1. 研究開始当初の背景

グルココルチコイド (GC) は、免疫系・代謝・神経系など広範な作用をもつステロイドホルモンである。免疫系では、強い抗炎症作用と免疫抑制作用をもつため、多くの免疫疾患の治療に用いられているが、副作用として糖尿病・高血圧・肥満・骨粗鬆症・筋疾患などの代謝異常を引き起こすことが知られている。

GCは、細胞質にあるグルココルチコイドレセプター (GR) に結合すると核内へ移行し、二量体を形成して標的遺伝子のGC応答配列 (GRE) に結合することにより転写を活性化する。さらに、GRは他の転写因子 (TF) に直接結合することにより転写を抑制することができる。この機構により、GCは転写因子NF- $\kappa$ B等による炎症関連遺伝子群の発現促進を強力に抑制している (図1右側)。従来の報告から、抗炎症作用は主に転写抑制に起因し、副作用とされる各代謝に対する作用は概ね転写活性化に起因すると考えられており、両者の作用を分けるGRの転写制御機構の研究や、副作用を軽減する薬剤の開発が活発に進められている。しかし、現在でも未だに十分な成果を得られてはならず、当該分野を大きく変革・発展させる研究が期待されている。

応募者は、遺伝子発現制御因子の機能をマイクロな分子から個体レベルに至るまで研究し、遺伝子発現制御因子の新規機能の発見や新しい概念を提唱してきた。近年では、脱アセチル/アシル化酵素SIRT7の研究から、転写因子の翻訳後アシル化修飾の制御は、単なる転写のON/OFFではなく、転写因子の作用の一部のみを厳格に調節することを見出している。例えば、SIRT7が転写因子Osterix (OSX) を脱アシル化および脱プロピオニル化することで転写を活性化し、骨芽細胞の分化を促進するが、OSXの細胞増殖促進作用には影響しないことを明らかにした (*Nat Commun* 2018)。また、SIRT7が転写因子PPAR $\gamma$ 2の382番目リジンのアセチル化修飾を取り除くことで、脂肪酸合成など一部の遺伝子群の発現を増加させるが、脂肪細胞分化など他のPPAR $\gamma$ 2の作用には影響しないことを明らかにした (*J Diabetes Investig* 2021)。そして最近、老齢マウスの皮膚創傷治癒の研究において、*Sirt7*欠損 (KO) マウスでは野生型 (WT) マウスに比べて創傷治癒が促進されることを発見した (未発表)。WTマウスでは老化に伴い皮膚でのグルココルチコイド産生が亢進し、創傷治癒が著しく遅延することが報告されており、SIRT7はグルココルチコイド作用発現に重要な役割を果たすのではないかと、さらにはSIRT7がGRのアシル化を調節するのではないかと考えるに至った。



### 2. 研究の目的

応募者は最近、*Sirt7*KO由来の培養細胞では、GCによる代謝調節作用 (筋萎縮などの副作用) が著しく損なわれるが、抗炎症作用は保たれることを見出した (未発表: 図1左側)。さらに、GRが新規の翻訳後修飾であるスクシニル化を受けており、SIRT7がこれを取り除くことを見出した (未発表: 図1上部)。

そこで本研究では、SIRT7を足がかりに、GC作用を分ける新規GR転写制御機構の解明を目的とし、薬理的GC副作用を軽減する方法や薬剤の開発に向けたシーズとなることを目指す。

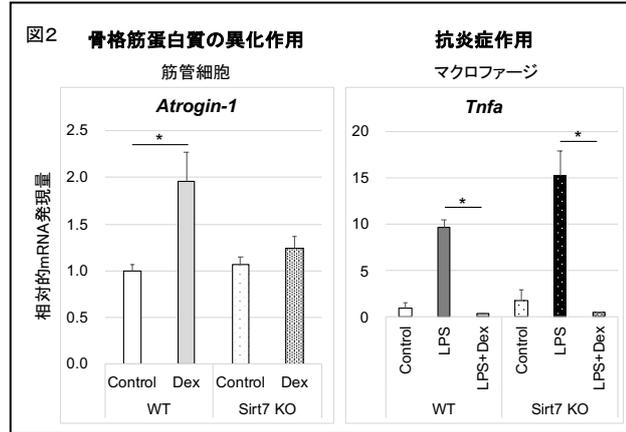
### 3. 研究の方法

#### (1) *Sirt7*KOマウスを用いたGC作用の解析

WT培養筋管細胞において、合成GCのデキサメタゾン (Dex) は分解系のユビキチンリガーゼ Atrogin-1の遺伝子発現を促進するが、*Sirt7*KO培養筋管細胞においては、促進しなかった (図2左)。一方、LPS依存的な炎症性サイトカインTNF $\alpha$ の遺伝子発現上昇がDexにより抑制される

作用は、WTと*Sirt7*KO培養マクロファージにおいて同程度であった（図2右）。

そこで、*Sirt7* KOマウスを用いて、GCの抗炎症作用および代謝調節作用を詳細に解析する。具体的には、WTと*Sirt7*KOマウスにDexを14日間毎日投与し、骨格筋の萎縮、骨量の低下、皮膚の菲薄化等について解析する。我々は既に少数のマウスを用いた1回目の解析を始めており、*Sirt7* KOマウスではDexによる骨格筋量の低下がほぼ起こらないことを確認できており、引き続き複数回の詳細な解析を進める。また、抗炎症作用については、TPA誘発性皮膚炎などの炎症モデルを用いて検討する。さらに、SIRT7により調節されるGR標的遺伝子を詳細に解析するため、上記実験系の各組織・細胞を用いたRNA-Seq解析により網羅的遺伝子発現解析を行う。



## (2) スクシニル化による新規GR転写制御機構の解析

SIRT7がGC作用を分ける機能を持つことが判明したため、SIRT7によるGRの制御を解析したところ、SIRT7がGRに結合し、GRのスクシニル化を取り除くことを発見した（図3）。スクシニル化はヒストン・細胞質の酵素・ミトコンドリアタンパク質などによく見られるが、転写因子についてはほとんど明らかにされていない。

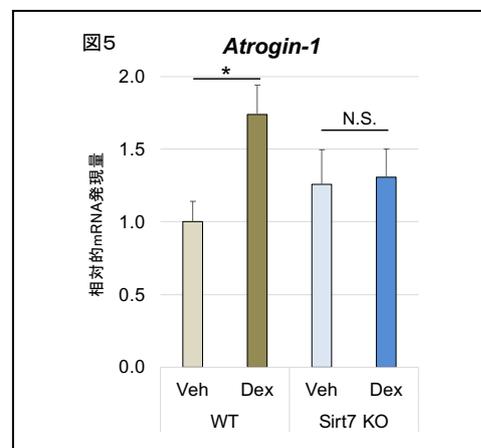
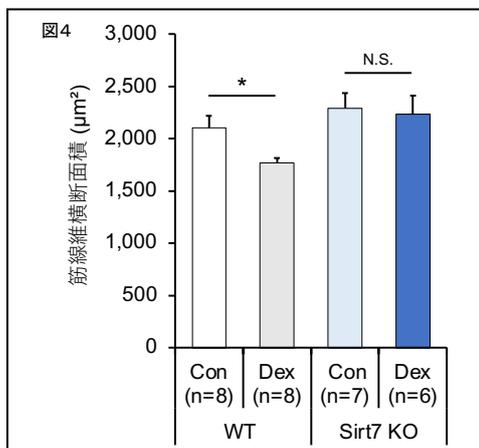
そこで、スクシニル化による新規GR転写制御機構の解明を行う。具体的には、スクシニル化リジン残基の特定、スクシニル化模倣（標的リジンのグルタミン酸への置換）と非アシル化模倣（アルギニン置換）GR発現プラスミドの作成、これら模倣体GRを用いた細胞内局在・タンパク質安定化・クロマチンへの結合・転写共役因子群との結合・転写活性/抑制化能の解析を行う。さらに、スクシニル化GRに特異的に結合する因子の網羅的スクリーニングや、CRISPR-Cas9システムを用いた内在性GRへのスクシニル化模倣体導入に着手する。



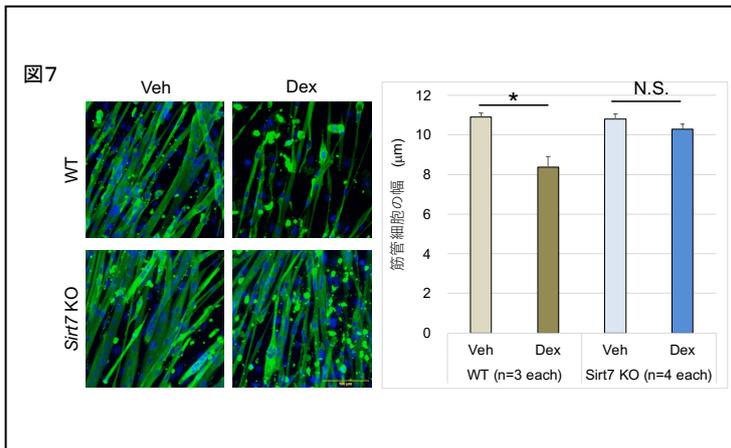
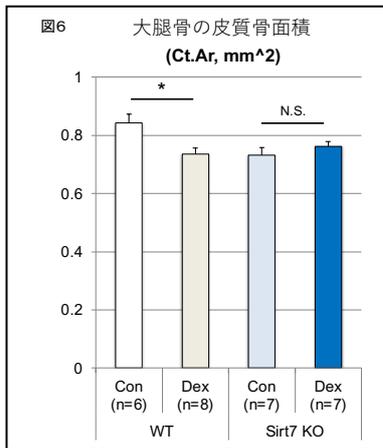
## 4. 研究成果

(1) WTマウスと*Sirt7*KOマウスにGCを14日間毎日投与し、骨格筋の萎縮について解析した。その結果、WTマウスではGCにより骨格筋の萎縮が見られたのに対し、*Sirt7* KOマウスでは骨格筋の萎縮が有意に抑制されていた（図4）。

また、筋萎縮関連遺伝子の発現を解析した結果、WTマウスではGCによるAtrogin-1の発現増強が見られたが、*Sirt7* KOマウスではGCによるAtrogin-1の発現増強が著しく抑制されていた（図5）。



さらに、μCTによる大腿骨の解析により、WTマウスではGCにより皮質骨面積の低下が見られたのに対し、*Sirt7* KOマウスでは骨量の低下が有意に抑制されていた（図6）。



次に、WTマウスと *Sirt7* KOマウス由来のサテライト細胞を筋細胞分化させた後にGCを添加し、筋細胞の萎縮を計測した。その結果、WTではGCにより筋細胞の幅が減少したが、*Sirt7*KOではほとんど減少しないことを確認した (図7)。

(2) GRの転写活性をWTと *Sirt7*KO細胞で検討したところ、*Sirt7*KO細胞ではGREを介したGRの転写活性が低下していることが明らかとなった。GRのスクシニル化リジン残基特定のため、GRを4つの部分に分割してSIRT7との結合部位をプルダウン法と免疫沈降法により解析したが、複数の部分に弱い結合が見られてしまい、結合部分を特定できなかった。また、分割したそれぞれのGRではスクシニル化自体も認められなかった。分割したGRでは、細胞内の局在やアシル化酵素との結合が全長GRと異なり、アシル化やSIRT7との結合が見られなかった可能性が考えられた。

そこで、質量分析法にて全長GRのスクシニル化リジン残基の特定を試みたが、現在のところ検出には至らなかった。

### (3) まとめ

我々は、SIRT7を欠損させた細胞やマウスを用いて、SIRT7がGCによる骨格筋の萎縮と骨量減少に重要な役割を果たしていることを見出した。一方、GCによる抗炎症作用はSIRT7がなくても保たれることを見出した。リウマチ患者などでは長期ステロイド投与が避けられないため、副作用を軽減させた選択的GR調節薬の開発が世界的に進められているが、最初の薬剤から30年経った現在でも未だに十分な効果・成果を得られてはいない。本成果は、SIRT7の阻害薬がステロイドの副作用を軽減する薬剤として大きな可能性があることを示したものである。

さらに我々は、*Sirt7*KO細胞ではGREを介したGRの転写活性が低下すること、また、SIRT7がGRのリジン残基のスクシニル化修飾を取り除くことを発見した。残念ながら、健康上や研究環境の変化などの理由で当初の計画が大幅に遅れたことにより、GRのスクシニル化リジン残基の特定およびその後の解析には至らなかった。ヒストンの様々な翻訳後修飾は遺伝子発現制御機構を考える上で常識的な概念となったが、転写因子のアセチル化以外のアシル化修飾において、その役割・重要性・制御機構の大部分が未解明である。したがって、GRの新規スクシニル化修飾およびその転写制御機構の解明は、GC作用の研究分野を超えて多くの生命現象に関わる研究であり非常に大きな意義を持つといえる。今後、SIRT7によるGRの転写制御機構を詳細に解明することで、薬理的GC副作用を軽減する方法や薬剤の開発に向けたシーズとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------