

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591347

研究課題名(和文)慢性炎症疾患制御に向けた新規核内受容体機能の解析

研究課題名(英文) Investigation for the nuclear receptor functions to cure clonic inflammatory syndrome

研究代表者

佐藤 隆史 (Sato, Takashi)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：70344934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は体内で分泌されているさまざまなホルモンが、生活習慣病の原因となる代謝臓器の炎症を制御するメカニズムの解明を目的として行った。研究内容としては、ホルモンの細胞内での作用に不可欠な受容体タンパク質を持たないマウスでの異常を解析すると同時に炎症を起こした細胞に対するホルモンの効果を検討した。研究を行った結果、男性ホルモンが細胞レベルで複雑に作用することで炎症を抑える働きを持つ可能性を見いだした。この成果をもとに高齢男性のホルモン分泌低下と生活習慣病の発症の関係を今後さらに研究していく。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the mechanisms of hormonal action to regulate inflammation in metabolic organs which cause metabolic diseases. The research, we investigated the effect of the hormone on cell inflamed at the same time to analyzed the abnormality in mice lacking the receptor proteins essential for action of the hormone. As a result of research, it has been found possibility that androgen action repress inflammation via complex cellular process. And we are going to study the relationship between the onset of metabolic diseases and hormone secretion decline of older men.

研究分野：内分泌学 分子生物学

科研費の分科・細目：内分泌学

キーワード：慢性炎症 アンドロゲン 核内受容体 KOマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病関連疾患はその増加傾向の深刻化から研究が進み、病態に関しての理解も深まりつつある。これら多くの疾患の大半は組織の慢性炎症がその基盤となることが知られている。

このような中でこれらの疾患の主病態は、脂肪などの組織へのマクロファージ浸潤による慢性炎症が深く関与していることが明らかとなっている。この病態では、代謝器官での様々な炎症性サイトカインの産生や細胞内ストレスが持続し、それに伴う細胞の機能低下並びに代謝制御シグナルの破綻を引き起こす。近年この慢性炎症の病態解明および制御法の開発にむけた研究が精力的に進められているが、そのメカニズムは未だ不明である。従来の「慢性炎症」治療法開発のための研究は細胞外環境の改善法開発や、細胞内シグナル制御などを中心になされてきた。しかし、炎症と肥満を担う標的遺伝子に共通部分が多いこと、さらに近年の網羅的な核内エピゲノム解析の発展とともに両者に共通のエピゲノム制御メカニズムの存在が示唆されるに至り、その制御を担い、かつ創薬標的にもなりうる核内エピゲノム制御因子の同定とその機能解析が待たれる。このような背景の中で、生活習慣病の重要な仲介因子であるエネルギー代謝と炎症制御の両方を担う代表的な標的核内因子として核内受容体が注目されている。既に PPAR、LXR などのいくつかの核内受容体は両者を担う非常に重要な創薬標的として注目されている。

(2) 臨床においては「慢性炎症性疾患」に対して抗炎症薬を使用するのが一般的であるが、個々の慢性炎症性疾患における抗炎症薬の効果は限られるのが現状である。そこで、生活習慣病を含めた個々の病態のメカニズムに根ざした新しい治療法開発が望まれる。現在、自己免疫疾患を含む様々な炎症性疾患の治療抗炎症薬としてグルココルチコイドが頻繁に用いられる。本薬剤は難治性炎症性疾患に対する強力な抗炎症作用を有するが、副作用の問題から長期利用には問題が残されている。グルココルチコイドの作用メカニズムは、核内受容体 GR による炎症制御転写因子 AP-1 や NF- κ B のリガンド依存性の転写抑制であることが知られているが、その詳細なメカニズム解析が困難を極めていたため、その改良による長期慢性炎症疾患治療法開発は進んでいない。

(3) 近年の臨床疫学調査の結果から、生活習慣病は男性の更年期に発症頻度が高いこと、さらにはアンドロゲン分泌量の低下とこれら疾患の発症頻度と相関するという臨床的報告が多いことなど、年齢に依存するだけでなく性特有の発症頻度や病態を呈することが知られている。そこで、性ホルモンの作

用が慢性炎症病態を制御する効果を持つ可能性が示唆されている。しかしながら、現在までこのような慢性炎症病態における性ステロイドホルモンの作用機序は未だ明確にされていない。さらに、本研究者が作出した雄 ARKO マウスは遅発性の肥満と耐糖能異常といった顕著な代謝異常を呈する。現在までそのメカニズムに関しては、様々な検討が加えられてきたが、メカニズムは未だ明らかになっていない。特に、組織特異的な ARKO マウスの解析知見は少なく、個々の代謝組織における AR の機能は解明されていない。一方、核内受容体を介した脂溶性ホルモンの作用メカニズムは古くからさまざまな観点から研究が進んでいる。中でも近年では、他のクラスの転写因子との分子間相互作用によるより、その作用を発揮する詳細なメカニズムが明確にされてきた。そこで、慢性炎症制御の一端を担うとされるさまざまな転写制御因子とのシグナルクロストークを介した組織特異的な AR の機能の解明は、その可能性が大いに期待される。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、性ホルモンの作用が慢性炎症に何らかの役割を持つ可能性を考え、性ホルモン受容体を介した内分泌制御のメカニズムを解析することを目的としている。研究代表者自身が作製したアンドロゲン受容体 (ARKO) は遅発性肥満の発症することや、インスリン抵抗性やレプチン抵抗性といった代謝異常を呈するが明らかになっている。そこで、慢性炎症制御の一端を担うとされる小胞体ストレス応答系 (UPR システム) を介した転写制御因子とステロイドホルモンのシグナルクロストークを *in vivo*, *in vitro* 双方の実験で明らかにする。

(2) 慢性炎症の制御には主にマクロファージの組織への浸潤と、組織側の細胞やその他の免疫細胞におけるシグナル伝達が炎症における浸潤マクロファージの機能制御により規定されると考えられている。本研究はこれらの組における核内受容体の機能に着目した研究を行うため KO マウスの解析を行うことにした。一方、抗炎症薬であるグルココルチコイド受容体 (GR) の KO マウスは性ステロイドホルモンの作用は、内分泌系全体の変化などの二次的な効果をもたらす。そこで本研究では、グルココルチコイド受容体 (GR) ならびに AR の組織特異的な KO マウスにおける代謝異常や炎症における表現型を解析し、両核内受容体を介した慢性炎症制御機構の解明を試みる。さらに *in vitro* では、マクロファージと脂肪細胞の共培養系による慢性炎症解析系を確立し、各種ホルモンの慢性炎症制御における効果の検討並びにそれを担う標的遺伝子の単離を行うことでホルモンの新規作用点の解明を試みる。

1. 研究の方法

(1) 代謝機能維持におけるアンドロゲンシグナルとUPRシステムのクロストーク解析
*in vivo*においてARKOマウスに小胞体ストレス軽減薬ケミカルシャペロンを投与し、代謝シグナルの異常に及ぼす影響並びに、そのシグナル伝達経路をウエスタンブロットなどを用いて解析した。また、リアルタイムPCRによりARKOマウスの代謝組織におけるUPRシステムの下流の標的遺伝子の発現の比較を行った。さらに、*in vitro*においてはルシフェラーゼレポーターアッセイにより、ARを介したアンドロゲン作用がUPRシステムの転写制御系に及ぼす影響を解析し、免疫沈降法によりUPRシステム転写因子とARの分子間相互作用を解析した。さらに、UPRシステム標的遺伝子の調節領域にARが相互作用しているか否かをChIP assayにより検討した。

(2) *in vivo*, *in vitro* 慢性炎症モデルを用いたステロイドホルモン受容体の機能解析
既存のGRflox, ARfloxマウスと組織特異的Cre-Tgマウスの自然交配により白色脂肪組織、マクロファージなどの組織に特異的なKOマウスの作製し、高脂肪食を12週間付加することで脂肪組織の慢性炎症を誘発した。これらのマウスは主に体重増加、耐糖能、インスリン感受性を解析した後、各種代謝組織や脂肪細胞と脂肪組織の間質細胞(Stromal vascular fraction; SVF)を分離した。これらはそれぞれRNAを抽出し、リアルタイムPCRを用いた遺伝子発現解析とマイクロアレイによる標的遺伝子探索に用いた。さらにSVF画分はFACSによる免疫細胞種の割合や細胞数をコントロール群とKOマウスで比較した。*in vitro*慢性炎症解析系は3T3-L1脂肪細胞とRAW細胞(マクロファージ)の共培養を行い、炎症性サイトカインやマクロファージの極性マーカー遺伝子群の発現をリアルタイムPCRで解析した。

4. 研究成果

(1) 本研究の目的の一つとして、慢性炎症の制御を制御するさまざまなシグナル伝達系と核内受容体を介したステロイドホルモンシグナルの相互クロストークの可能性を検討する。そこで既述の雄ARKOマウスにおけるレプチン抵抗性、インスリン抵抗性などの代謝シグナル伝達異常のメカニズムを解析する上で、代謝異常と慢性炎症の双方を引き起こす小胞体ストレスに着目し、性ホルモン欠乏と代謝疾患発症の接点として小胞体ストレス制御破綻が関与する可能性を考えた。まず、小胞体ストレス改善薬(ケミカルシャペロン)を雄ARKOマウスに投与することにより遅発性肥満が著しく改善された。さらに、雄ARKOマウスの視床下部を

解析したところ、UPR系転写因子により誘導されるシャペロン分子群の発現が有意に低下した(図1)。そこでARを介するアンドロゲンのシグナルと小胞体ストレス応答シグナル(UPRシステム)のシグナル間クロストークを*in vitro*で検討したところ、ARはリガンド依存的にUPR系転写因子(XBP-1, ATF6)と相互作用し、その標的遺伝子の発現を増強することが確認できた(図1)。また、ChIPにより、UPR系の標的であるBiP遺伝子プロモータ上にARが存在することが明らかとなった。以上の結果から、アンドロゲンはARを介し、小胞体ストレス応答配列(ERSE)の転写活性化能を増強することが明らかとなった。これらの結果から、代謝機能維持におけるアンドロゲンの作用の一部はARとUPRシステムとの転写レベルでのクロストークを介するものと考えられる。今後、雄ARKOマウスの異常の詳細に解析していく。

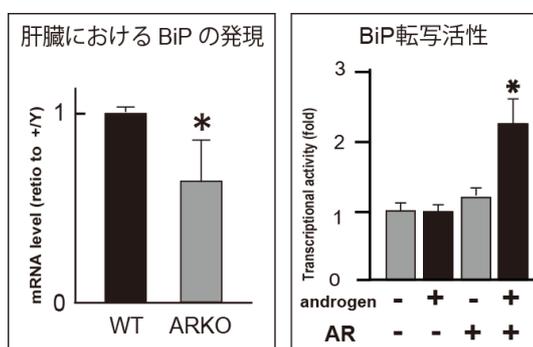


図1 アンドロゲンによるUPR標的遺伝子の制御

(2) 現在までに雄ARKOマウスは、耐糖能異常などの代謝機能の異常が確認されているものの、その直接的なメカニズムは明らかに出来ていない。そこで、代謝機能異常や全身並びに薬剤や耐糖能異常のメカニズムを解析した。まず、これら代謝機能にどの組織ARが重要であるかを解明するため、肝臓、膵臓、視床下部、脂肪組織、マクロファージに特異的なARKOマウスを解析したが、いずれの異常も確認できなかった。また、(1)のとおり、小胞体ストレスとアンドロゲンのシグナルクロストークを示唆する結果が得られたものの、雄ARKOマウスで見られる個々の代謝機能の改善にケミカルシャペロンは効果が無かった。また、数種の炎症性サイトカインの発現増加が確認されたが抗炎症剤の投与による代謝の改善が顕著でないため、代謝の異常との関連については未だ結論が得られていない。一方、雄ARKOではテストステロンの分泌不全を伴うため、各標的組織でのエストロゲンの産生低下が起ることが示唆されている。そこで、エストロゲンを投与にすることで代謝異常が改善するか否かを検討したところ、生理量程度のエストラジオールを8日間投与したら耐糖能が一部改善したため、雄ARKOマウスの異常の少なくとも一部はエストロゲン産生低下

に起因する可能性も考えられる。

(3) *in vitro* 慢性炎症解析系として3T3-L1脂肪細胞とRAW細胞(マクロファージ)の共培養の手法を確立した。この共培養においては、炎症性サイトカインの発現が強く誘導されるが、これらにARやGR、さらにはエストロゲン受容体のagonistを添加し、炎症における効果を検討した。GRのagonistであるデキサメサゾン(DEX)は予想通り炎症を有意に抑制した。これに加えARのagonistであるジデヒドロテストステロン(DHT)やテストステロンはTNF- α 、MCP-1などの数種の炎症性サイトカイン遺伝子の発現を抑制した。そこで、ルシフェラーゼレポーターアッセイによりMCP-1プロモーターにおけるARの転写抑制能を検討したところ、炎症シグナル系の転写調節部位にARが相互作用し、その転写を抑制することが明らかとなった。DHTやテストステロンの効果はGRのagonistに比べて弱いため、炎症に直接強く作用するのではなく、慢性炎症を制御するその他のさまざまなシグナル伝達系とクロストークする可能性が考えられ、ARにより制御を受ける新規標的遺伝子を、マイクロアレイなどを用いて探索している。

(4) 慢性炎症に対する核内受容体機能の*in vivo*解析系として、組織特異的なARとGRのKOマウスに高脂肪食を与え代謝異常と組織の炎症を解析した。その結果、マクロファージ特異的なGRKOマウスでは、代謝、炎症性サイトカインの発現、脂肪組織のマクロファージの細胞数のいずれもコントロール群との間に差は見られなかった。一方、このマウスにデキサメサゾンを投与すると、予想されたように腹腔マクロファージやSVFにおける炎症性サイトカインの発現抑制能が低下した。また、脂肪組織並びにマクロファージ特異的ARKOマウスをそれぞれ同様に解析したが、これらは耐糖能、脂肪組織での炎症のいずれにおいても異常は無かった。さらに、これらマウスにDHTの投与を行った実験でもその効果は確認されなかった。今後これら以外の組織に特異的なARKOマウスを解析し、代謝機能の制御におけるアンドロゲンの作用部位を特定する。一方、全身の雄ARKOマウスにおいてはSVFにおける炎症性サイトカインの発現を比較したところMCP-1の発現が正常マウスに比べ有意に高かった。この結果から、炎症を制御するいずれかの細胞種においてARが機能すると考えられ、その特定を急いでいる。

(5) 慢性炎症制御における核内受容体の作用点としては、さまざまな免疫細胞種の機能の制御が更なる可能性として考えられる。特に炎症の終熄を制御している好酸球には大いに注目しているが、この細胞種に特異的なCre発現マウスが存在しないため、本研究者

が長年行ってきた遺伝子組換えマウス作製手法を応用し、Eosinophil- peroxidase 遺伝子座にCreを挿入したノックインマウスを作製中である。現在、ノックインベクターの作製が完了しマウスの作製行程が進行中である。このマウスが完成次第、同様に組織特異的核内受容体KOマウスを用いた実験に用いる予定である。さらに、このマウスはあらゆる遺伝子の好酸球特異的なKOマウス作製に、好酸球による炎症修飾のさまざまな分子メカニズム解明に有用な実験資材として広く用いることが可能である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6件)

1. Sato T, Iwano T, Kunii M, Matsuda S, Mizuguchi R, Jung Y, Hagiwara H, Yoshihara Y, Yuzaki M, Harada R, Harada A. Rab8a and Rab8b are essential for several apical transport pathways but insufficient for ciliogenesis. *J Cell Sci.* 127, 422-431 (2014)
2. Sasaki T, Kikuchi O, Shimpuku M, Susanti V-Y, Yokota-Hashimoto H, Taguchi R, Shibusawa N, Sato T, Tang L, Amano K, Kitazumi T, Kuroko M, Fujita Y, Maruyama J, Lee Y-S, Kobayashi M, Nakagawa T, Minokoshi Y, Harada A, Yamada M and Kitamura T. Hypothalamic Sirt1 prevents age associated weight gain by improving leptin sensitivity in mice. *Diabetologia* 57, 819-831 (2013)
3. Orisaka M, Hattori K, Fukuda S, Mizutani T, Miyamoto K, Sato T, Tsang BK, Kotsuji F, Yoshida Y. Dysregulation of ovarian follicular development in female rat: LH decreases FSH sensitivity during preantral-early antral transition. *Endocrinology* 154, 2870-2880. (2013)
4. D'Angelo G, Uemura T, Chuang CC, Polishchuk E, Santoro M, Ohvo-Rekilä H, Sato T, Di Tullio G, Varriale A, D'Auria S, Daniele T, Capuani F, Johannes L, Mattjus P, Monti M, Pucci P, Williams RL, Burke JE, Platt FM, Harada A, De Matteis MA. Vesicular and non-vesicular transport feed distinct glycosylation pathways in the Golgi. *Nature* 501, 116-120 (2013)

5. Hashimoto Y, Muramatsu K, Sato T, Harada A.
Uncovering genes required for neuronal morphology by morphology-based gene trap screening with a revertible retrovirus vector. FASEB J. 26, 4662-4674 (2012)

6. Sato M, Yoshimura S, Hirai R, Goto A, Kunii M, Atik N, Sato T, Harada R, Shimada J, Hatabu T, Yorifuji H, Harada A
The role of VAMP7/TI-VAMP in cell polarity and lysosomal exocytosis in vivo. Traffic 12, 1383-93 (2011)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 発表者：佐藤隆史 男性ホルモンによる代謝機能制御機構の解析 日本農芸化学会 2011/3/27 日 京都女子大学(震災で非開催)

2. 発表者：佐藤隆史 男性ホルモンによる代謝機能制御機構の解析 第 84 回日本内分泌学会 2011/4/22 日 神戸国際会議場

3. 発表者：佐藤隆史 男性ホルモンによる代謝機能制御機構の解析 北関東医学会 群馬大学

4. 発表者：佐藤隆史 雄性個体の代謝機能制御におけるアンドロゲン作用機序 テストステロン研究会 福岡大学

5. 発表者：佐藤隆史 小胞体ストレス制御を介した新規アンドロゲン作用メカニズムの解析 第 34 回 日本分子生物学会 パシフィコ横浜

6. 発表者：佐藤隆史 男性ホルモンは小胞体ストレス制御により肥満を抑制する 日本農芸化学会 京都女子大学

7. 発表者：佐藤隆史 男性ホルモンは小胞体ストレス制御により肥満を抑制する 第 85 回日本内分泌学会 名古屋国際会議場

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 隆史 (SATOU TAKASHI)
群馬大学・生体調節研究所・准教授
研究者番号：70344934

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

()

研究者番号：