

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23791050  
 研究課題名（和文） 骨格筋におけるグルココルチコイドレセプターと mTOR のクロストークの機構と意義  
 研究課題名（英文） Mechanism and significance of crosstalk between glucocorticoid receptor and mTOR in skeletal muscle  
 研究代表者  
 清水 宣明 (SHIMIZU NORIAKI)  
 東京大学・医科学研究所・特任研究員  
 研究者番号：30396890

研究成果の概要（和文）：グルココルチコイドレセプターは骨格筋において複数の転写因子の発現誘導を介して多彩な標的遺伝子の発現を制御すること、その結果引き起こされるタンパク質異化促進と同化抑制が、筋萎縮機構の両翼を担うことを示した。さらに、生理量を超えた分岐鎖アミノ酸の経口投与が、これら標的遺伝子群の転写活性化をプロモーターレベルで抑制し、グルココルチコイドによる筋萎縮の発症を予防することを動物個体レベルで実証した。

研究成果の概要（英文）：We showed that glucocorticoid receptor (GR) regulates expression of diverse genes in skeletal muscle through inducing the expression of multiple transcription factors. The target genes bring about both enhancement of catabolism and suppression of anabolism, causing skeletal muscle atrophy. Using animal models, we also showed that oral administration of branched-chain amino acids at a dose above physiological level suppressed transcriptional activation of the target genes via reducing the recruitment of GR onto promoters of the target genes and prevented development of skeletal muscle atrophy caused by a pharmacological dose of glucocorticoids.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学・分子生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：ミオパチー・筋萎縮・ロコモティブシンドローム・ステロイド副作用・栄養

## 1. 研究開始当初の背景

グルココルチコイド (GC) は副腎皮質から分泌され、広範な組織・細胞に対して影響を及ぼす生命維持に必須のステロイドホルモンであり、その分泌・代謝・シグナル伝達の異常が様々な病態と密接に関連する。しかし、現在までの膨大な研究によってもその作用機構の全貌は明らかではない。また、GC は臨床医学の広範な領域において主要な治療薬としての位置を占めているが、その多臓器において多岐にわたる副作用の根本的解決の糸口は見出されておらず、特に組織特異的な GC 応答の分子基盤に関する理解の進展の必

要性がますます高まっている。

骨格筋における GC 作用機構の解析は、GC 過剰により引き起こされる筋線維（筋細胞）の縮小による筋量と筋力の低下、すなわち筋萎縮の発症機構の理解と密接に関連しながら進展してきた (Munck A, Endocr Rev. 1984, 25-44; Schakman O, Horm Res. 2009, 36-41)。成熟個体の骨格筋量は筋線維タンパク質の分解と合成のバランスによって調節されており、GC はタンパク質分解の亢進と合成の抑制をもたらす (Glass DJ, Nat Cell Biol. 2003, 87-90; Sandri M, Physiol. 2008, 160-70)。多くの筋萎縮モデルに共通して発現が変化

する遺伝子の包括的解析から、筋分解の鍵因子として転写因子 Forkhead Box O (FoxO) が同定された (Sandri M, Cell 2004, 399-412; Stitt TN, Mol Cell 2004, 395-403)。FoxO 支配下の遺伝子には、骨格筋における二つの主要なタンパク質分解系である、ユビキチン-プロテオソーム系 (E3 ユビキチンリガーゼ atrogenin-1, MuRF1) とオートファジー系 (LC3, Bnip3) に関連する遺伝子が含まれている。GC がこれらの遺伝子、また FoxO を mRNA レベルで増加させることが報告されていたが、これらのプロモーター上に、多様な GC 作用の共通のプラットフォームとして機能するリガンド依存性転写因子である核内レセプター、グルココルチコイドレセプター (GR) が結合することが示されていたのは MuRF1 (Waddell DS, Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008, E785-97) のみであったなど、詳しい機序は不明であった。一方、筋合成のカギ因子として mTOR, Raptor などから構成されるセリン・スレオニンキナーゼ複合体 mTORC1 が知られている。mTORC1 は骨格筋の増殖因子であるインスリンや IGF-1、アミノ酸 [特に分岐鎖アミノ酸 (BCAA)], cAMP, O2 によってその活性が制御され、S6K1, 4E-BP1 のリン酸化を介してタンパク質翻訳を亢進する (Wullschlegel S, Cell 2006, 471-84)。低酸素や GC によって発現が誘導される遺伝子産物 REDD1 が 14-3-3 タンパク質を介して mTORC1 活性化因子 Rheb を抑制し、mTORC1 活性を減弱させることが示されたが (DeYoung MP, Genes Dev. 2008, 239-51)、REDD1 の発現制御機構における GC-GR 系の関与の詳細は不明であり、また GC による mTORC1 抑制における REDD1 の寄与の程度も不明であった。

## 2. 研究の目的

骨格筋量調節をはじめとした骨格筋 GC 作用機構の解明には、GR 標的遺伝子の包括的な同定とその機能解析が必須であると考えられた。そこで本研究では、骨格筋代謝、骨格筋量調節における内分泌ホルモンシグナルと栄養センシングのクロストークならびに GR とその下流転写因子ネットワークによる遺伝子発現制御の意義に関する理解を進展させ、グルココルチコイドが治療薬として用いられる際の副作用である筋萎縮を克服する方法の開発に貢献できる分子基盤を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 内在性 GC コルチコステロン、合成 GC デキサメタゾン (DEX)、GR 超選択的アゴニスト CVZ (Yoshikawa N, Mol. Endocrinol. 2005, 1110-24)、アンタゴニスト RU486 ならびに、DNA microarray, in silico プロモーター解析を利用して独自に開発した GR 標的遺伝子

同定法 (Yoshikawa N, Am. J. Endocrinol. Metab. 2009, E1363-73) により、マウス、ラット骨格筋において新規 GR 標的遺伝子の同定を試みた。

(2) 同定した GR 標的遺伝子を、動物骨格筋において組換えアデノウイルス感染により発現させ、その骨格筋量調節に関わる機能解析を行った。

(3) 生理量の内因性グルココルチコイドおよび、薬理量投与したグルココルチコイドが、マウス骨格筋 (腓腹筋、ヒラメ筋、前脛骨筋、長趾伸筋、足底筋) において惹起する遺伝子発現変化を同定し、それらの制御機構と生理的・病態生理的意義を、骨格筋特異的 GR ノックアウトマウスと対照マウスの比較により解析した。

(4) グルココルチコイド筋萎縮モデル動物において、骨格筋 mTORC1 活性を分岐鎖アミノ酸の経口投与によって一過性に上昇させることが、筋萎縮病態とその発症メカニズムに与える影響を解析した。

## 4. 研究成果

(1) マウス、ラット骨格筋において新規 GR 直接の標的遺伝子として転写因子 Krüppel-like factor 15 (KLF15) および REDD1 を同定した。

(2) ラット骨格筋への組換えアデノウイルス感染により発現させた KLF15 は、atrogenin-1, MuRF1 のプロモーターに結合し mRNA 発現を亢進したことから、KLF15 は GC による筋分解過程において FoxO と並ぶ重要な転写因子であることが示された。また、KLF15 の既知標的遺伝子 BCAT2 (Gray S, Cell Metab. 2007, 305-12) は、BCAA 代謝の律速酵素であり (She P, Cell Metab. 2007, 181-94)、骨格筋における KLF15 発現は BCAT2 の活性化を引き起こし、細胞内 BCAA 濃度を著明に低下させた。

(3) 骨格筋 GR は、生理量の内因性コルチコステロンによっても活性化され、KLF15、FoxO1, 3, の発現を誘導するとともに、これら下流転写因子と協調して GR 転写カスケードを形成し、多彩な標的遺伝子の転写を一括して制御することを示した。これら標的遺伝子群の機能は、タンパク質分解系、アミノ酸分解系、といった異化促進機能および、mTORC1 阻害によるタンパク質翻訳抑制系による同化抑制機能に大別され、骨格筋量を減少させる機構の両翼を担っていると考えられる。

(4) mTORC1 活性化は GR によるこれら標的遺伝子群の転写活性化をプロモーター結合レベルで抑制し、グルココルチコイドによる筋萎縮の発症を予防することを動物レベルで実証した。

## 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 3 件)

(1) 清水宣明, 田中廣壽. 加齢に伴う骨格筋量・筋力低下におけるグルココルチコイドシグナルの意義の究明. 健康医科学 28 83-91. (2013) 査読有

[http://www.my-zaidan.or.jp/download/kenko-r/pdf/kenko-28/R28\\_83-91.pdf](http://www.my-zaidan.or.jp/download/kenko-r/pdf/kenko-28/R28_83-91.pdf)

(2) Yoshikawa N, Shimizu N (equal first author), Maruyama T, Sano M, Matsuhashi T, Fukuda K, Kataoka M, Satoh T, Ojima H, Sawai T, Morimoto C, Kuribara A, Hosono O, Tanaka H. Cardiomyocyte-specific overexpression of HEXIM1 prevents right ventricular hypertrophy in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. PLoS One 7(12) e52522. (2012) 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0052522

(3) Toyokawa G, Cho HS, Iwai Y, Yoshimatsu M, Takawa M, Hayami S, Maejima K, Shimizu N, Tanaka H, Tsunoda T, Field H, Kelly JD, Neal DE, Ponder BA, Maehara Y, Nakamura Y, Hamamoto R. The histone demethylase JMJD2B plays an essential role in human carcinogenesis through positive regulation of cyclin-dependent kinase 6. Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.) 4 2051-2061. (2011) 査読有 doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0290

[学会発表] (計 22 件)

(1) 清水宣明, 吉川賢忠, 丸山崇子, 栗原明子, 馬艶霞, 松宮遼, 松橋智弘, 佐野元昭, 福田恵一, 田中廣壽. グルココルチコイドレセプターの骨格筋線維タイプ特異的な役割の解析. 第 86 回日本内分泌学会学術総会, 仙台市, 2013. 4. 26

(2) 田中廣壽, 清水宣明, 吉川賢忠, 丸山崇子, 松宮遼. 糖質コルチコイドと骨格筋. 第 86 回日本内分泌学会学術総会 (シンポジウム 2 ステロイドホルモン研究 Update). 仙台市, 2013. 4. 25

(3) Shimizu N, Yoshikawa N, Maruyama T, Kuribara A, Matsumiya R, Tanaka H. Physiological Regulation of Skeletal Muscle Mass via Glucocorticoid Receptor. Keystone Symposia 2013 "Nuclear Receptors and Friends: Roles in Energy Homeostasis and Metabolic Dysfunction" (Short Talk in the Plenary Session on Skeletal Muscle, Exercise and Diet), Alpbach, Austria, 2013. 4. 7

(4) Shimizu N, Yoshikawa N, Maruyama T, Kuribara A, Ma Y, Matsumiya R, Tanaka H. Glucocorticoid Receptor-dependent

Regulation of Skeletal Muscle Mass. The Molecular Medicine Conference 2012, Bangkok, Thailand, 2012.12.20

(5) Yoshikawa N, Shimizu N, Maruyama T, Ma Y, Matsumiya R, Matsuhashi T, Sano M, Fukuda K, Tanaka H. Glucocorticoid Receptor (GR)-dependent Gene Regulation in Skeletal Muscle. The Molecular Medicine Conference 2012, Bangkok, Thailand, 2012.12.20

(6) Tanaka H, Shimizu N, Yoshikawa N, Maruyama T. Tissue-specific Action of Glucocorticoids. The Molecular Medicine Conference 2012, Bangkok, Thailand, 2012.12.21

(7) 清水宣明, 吉川賢忠, 丸山崇子, 栗原明子, 田中廣壽. Glucocorticoid regulates metabolism of skeletal muscle proteins. 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012.12.11

(8) 清水宣明, 吉川賢忠, 丸山崇子, 伊藤尚基, 武田伸一, 田中廣壽. 骨格筋グルココルチコイドレセプターを介した骨格筋量の生理的調節. 第 20 回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 金沢, 2012.11.18

(9) 吉川賢忠, 清水宣明, 松宮遼, 佐野元昭, 松橋智弘, 福田恵一, 田中廣壽. 骨格筋量・代謝制御におけるグルココルチコイドレセプター (GR) の役割-骨格筋特異的 GR ノックアウトマウス解析. 第 20 回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 金沢, 2012.11.18

(10) Shimizu N, Yoshikawa N, Maruyama T, Tanaka H. Glucocorticoid receptor in myofibers physiologically regulates skeletal muscle mass. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, Kanazawa, Japan, 2012.11.17

(11) Yoshikawa N, Shimizu N, Matsumiya R, Sano M, Matsuhashi T, Fukuda K, Tanaka H. The Role of Glucocorticoid Receptor (GR) in Skeletal Muscle Metabolism—Analysis of Skeletal Muscle-specific GR Knockout Mice. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, Kanazawa, Japan, 2012.11.17

(12) 田中廣壽, 清水宣明, 吉川賢忠. 骨格筋萎縮の分子機構-骨格筋におけるグルココルチコイドレセプターと mTOR のクロストーク. 第 30 回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 2012.7.21

(13) 田中廣壽, 清水宣明, 吉川賢忠. 骨格筋におけるグルココルチコイドシグナルと栄養シグナルのクロストーク. 第 66 回日本栄養・食糧学会大会, 仙台, 2012.5.19

(14) 清水宣明, 吉川賢忠, 松宮遼, 松橋智弘, 佐野元昭, 福田恵一, 森本幾夫, 田中

廣壽. グルココルチコイドを介した骨格筋量制御機構の解析 (2). 第 85 回日本内分泌学会学術総会, 名古屋, 2012. 4. 21

(15) 吉川賢忠, 清水宣明, 松宮遼, 佐野元昭, 松橋智弘, 福田恵一, 森本幾夫, 田中廣壽. グルココルチコイドを介した骨格筋量制御機構の解析 (1). 第 85 回日本内分泌学会学術総会, 名古屋, 2012. 4. 21

(16) Shimizu N, Yoshikawa N, Tanaka H. Crosstalk between glucocorticoid and nutrition in skeletal muscle fibers Keystone Symposia 2012 "Nuclear Receptor Matrix: Reloaded" (Workshop 3: Hot Topics), Whistler, British Columbia, Canada, 2012. 4. 18

(17) 清水宣明, 吉川賢忠, 丸山崇子, 森本幾夫, 田中廣壽. 骨格筋における GR と mTOR のクロストーク. 第 4 回核内受容体・ホルモン研究会, 東京, 2012. 4. 6

(18) 清水宣明, 吉川賢忠, 田中廣壽. 副腎皮質グルココルチコイドと栄養による転写制御を介した骨格筋代謝制御機構. 文部科学省 科学研究費補助金「新学術領域研究」生命素子による転写環境とエネルギー代謝のクロストーク制御 (転写代謝システム)・転写研究会共催「若手ワークショップ@湯河原」, 熱海, 2012. 2. 10

(19) 清水宣明, 吉川賢忠, 丸山崇子, 森本幾夫, 田中廣壽. 骨格筋におけるホルモンセンシングと栄養センシングのクロストーク. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011. 12. 16

(20) 清水宣明, 吉川賢忠, 丸山崇子, 田中廣壽. 骨格筋におけるグルココルチコイドシグナルと栄養シグナルのクロストーク. 第 19 回日本ステロイドホルモン学会学術集会 (シンポジウム『ステロイド (核内) 受容体の新しい作用』), 福岡, 2011. 11. 26

(21) 松宮遼, 清水宣明, 吉川賢忠, 丸山崇子, 馬艶霞, 森本幾夫, 田中廣壽. 骨格筋におけるグルココルチコイドによる REDD1 と KLF15 遺伝子発現調節機構. 第 19 回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 福岡, 2011. 11. 26

(22) 清水宣明, 吉川賢忠, 丸山崇子, 田中廣壽. 骨格筋におけるステロイドホルモンシグナルと栄養シグナルのクロストーク. 日本ケミカルバイオロジー学会第 6 回年会, 東京, 2011. 5. 24

[図書] (計 1 件)

(1) 戸口田淳也, 池谷真 編, メディカルドゥ, 最新疾患モデルと病態解明, 創薬応用研究, 細胞医薬創製研究の最前線-最新疾患モデル動物, ヒト化マウス, モデル細胞, ES・iPS 細胞を利用した病態解明から創薬まで(遺伝子医学 MOOK 22 号).(清水宣明、田中廣壽、

分担執筆範囲:第 2 章 各種病態モデルと創薬研究 5.筋原性疾患 1)グルココルチコイド筋萎縮モデルラットを用いたグルココルチコイド副作用の克服に向けた取り組み)、120-125、2012

ISBN:4944157525

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 宣明 (SHIMIZU NORIAKI)  
東京大学・医科学研究所・特任研究員  
研究者番号: 3 0 3 9 6 8 9 0

### (2) 研究協力者

丸山 崇子 (MARUYAMA TAKAKO)  
東京大学・医科学研究所・学術支援専門職員

栗原 明子 (KURIBARA AKIKO)  
東京大学・医科学研究所・臨床検査技師  
伊藤 尚基 (ITO NAOKI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・大学院生

松橋 智弘 (MATSUHASHI TOMOHIRO)  
慶應義塾大学・大学院医学研究科・大学院生

馬 艶霞 (MA YANXIA)  
東京大学・大学院医学系研究科・大学院生

松宮 遼 (MATSUMIYA RYO)  
東京大学・医科学研究所・後期研修医