

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860035

研究課題名(和文) グルココルチコイド受容体の炎症制御における分子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Research on the inflammatory regulation mechanism of glucocorticoid receptor

研究代表者

松島 隆英 (Matsushima, Takahide)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・プロジェクト助教

研究者番号：40636560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：グルココルチコイド(GCs)製剤は難治性炎症性疾患に対して強力な抗炎症作用を有すが、GCs製剤の長期的利用は糖尿病、高血圧、骨粗しょう症などの誘発や薬剤耐性といった副作用の問題を多く残している他、その抗炎症メカニズムにも不明な点が多い。本研究においてはGCsが標的となるグルココルチコイド受容体(GR)の転写活性に着目し、GCs-GRによる抗炎症メカニズムを明らかにするのを目的とし、ルシフェラーゼアッセイとヒト遺伝子ライブラリーを用いたGRの転写調節因子のスクリーニングを実施し、GRの転写活性に関わるコファクターを含めた分子ネットワークを明らかにすべく研究を進めた。

研究成果の概要(英文)：Glucocorticoids (GCs) are the most commonly used anti-inflammatory drugs against refractory inflammatory disease. Despite the enormous efforts in elucidating the glucocorticoid-induced anti-inflammatory response, the control mechanism of overactive inflammatory response by GCs is not understood. GCs are known to exert their anti-inflammatory effects by binding to glucocorticoid receptor (GR), leading to the expression regulation of pro- and anti-inflammatory regulators. This study focused the transcriptional activity of GR and performed the high-throughput screening of the GR transcriptional activator with luciferase assay and human cDNA expression library (6000 clone) for purpose of elucidating the control mechanism of overactive inflammatory response by GCs. From our screening, some genes were predicted as GR transcriptional activators including cofactor.

研究分野：生化学、分子生物学

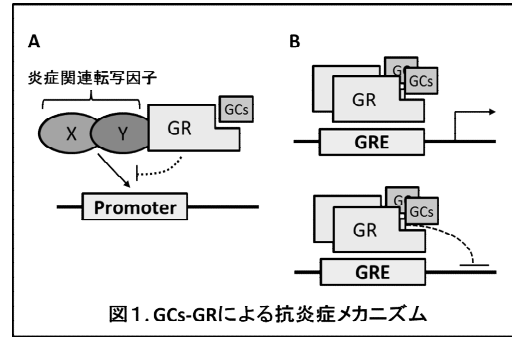
キーワード：グルココルチコイド 炎症

### 1. 研究開始当初の背景

グルココルチコイド(GCs)製剤は1940年頃から自己免疫疾患を含む様々な炎症性疾患に対する抗炎症薬として用いられており、難治性炎症性疾患に対して強力な抗炎症作用を有する。またGCsは正常な組織においても糖代謝、タンパク質合成などを様々な生理調節を担う重要なホルモンの一種である。そのため強力な抗炎症作用を持ちながら、残念ながらGCs製剤の長期的利用は糖尿病、高血圧、骨粗しょう症などの誘発や薬剤耐性といった副作用の問題を多く残しており、副作用を軽減したGCs製剤の開発が今なお活発に進められている。その一方でGCsの抗炎症メカニズムやその発生学的な意義についても実際にはその詳細はいまだ未知の部分が多い。

GCsの機能発現について明確に明らかとなってきたことは、GCsが標的となるグルココルチコイド受容体(GR)に結合し、GCs-GR複合体が核内に移行することで機能を発揮するという点である。さらにその詳細な機構については主に2つの分子機構が考えられている。核内に移行したGRがモノマーの状態では炎症関連遺伝子を転写制御するNF- $\kappa$ BやAP-1などの転写因子と結合し、転写阻害を行う機構(図1A)。GRがダイマー化し、ゲノム上のグルココルチコイド受容体結合領域(GRE)に結合し、炎症関連遺伝子の転写抑制あるいは抗炎症関連遺伝子の転写を行う機構が考えられている(図1B)。これら2つの分子機構については1990年頃まで炎症関連遺伝子の転写抑制という点において前者のモノマーによる分子機構が強く支持されてきた。しかし近年の解析から関節リウマチや敗血症といった一部の炎症性疾患においてはGRのダイマー化による特に遺伝子転写活性化機構が主なGCs-GRの抗炎症メカニズムであることが明らかとなってきた。これら知見よりGCs-GRダイマーの転写活性が再度着目され、以降はGRの下流遺伝子の同定が世界的に積極的に進められてきた。現在までにGCs-GRの下流遺伝子として抗炎症関連遺伝子を含めGILZを代表に数十種類ほどの遺伝子が誘導されることが報告されている。しかし一方でコファクターを含めたGRの転写調節機構における分子ネットワークについてはその存在が想定されるにも関わらず、STAT5やAP-1などの報告が数報あるのに留まっている。そのため、いまだその全体像は明らかにされておらず、新たな創薬ターゲットという点においてGRを中心としたコファクター群による遺伝子転写調節機構の解明、とりわけ抗炎症関連遺伝子の転写機構の解明が期待されている。これら背景から本研究においてはGCs-GRによる抗炎症メカニズムを明らかにすること、そして新たな抗炎症薬の創薬ターゲット探索を目的として『GRの転写調節機構』に着眼し、それに関わるコファクターを含めた分

子ネットワークを明らかにすべく研究を進めた。



### 2. 研究の目的

本研究においてはGCsの抗炎症メカニズムの分子ネットワークの解明のために大きく分けて、1) GRの転写調節因子候補の探索、2) 候補因子のGCs-GRの抗炎症メカニズムへの寄与についての解析、3) 創薬ターゲットとしての候補因子の評価の3つのステップについて段階的に研究を進めていった。

すでに私は本研究に先駆けて『1) GRの転写調節因子候補の探索』として、GRの遺伝子転写能においてほとんど明らかになっていない「活性化因子」の探索のためにハイスループットスクリーニングを実施した。GR結合エレメント(GRE)の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したレポーターベクターと各ヒト遺伝子ライブラリー(約6000遺伝子をノンバイアスで選択)をHEK293T細胞に遺伝子導入を行い、デキサメタゾン(Dex)依存的にルシフェラーゼ活性を上昇させる因子のスクリーニングを実施した。3次スクリーニングまで実施した結果、GRの転写活性化因子として既存の因子以外に核タンパク質が11種、代謝酵素が6種、受容体が1種、その他機能未知の遺伝子9種、計27遺伝子が新規に同定された。

そこで本研究では同定された因子を中心に『2) 候補因子のGCs-GRの抗炎症メカニズムへの寄与についての解析』として培養細胞や初代培養免疫細胞を用いたin vitroの系にて解析を進め、GCs-GRの抗炎症メカニズムへの寄与の高い候補因子について絞込み、そして『3) 創薬ターゲットとしての候補因子の評価』として作製したマウスを用いた炎症性疾患モデルでの解析を進めていき、GCs-GRの抗炎症メカニズムへの寄与するコファクター因子群の生理的機能の解明とGRに代わる創薬ターゲットとして可能性を評価すことを目標として研究を進めた。

### 3. 研究の方法

本研究においてはGCs-GRの抗炎症メカニズムを明らかにすること、そして新たな抗炎症薬の創薬ターゲット探索を目的として『GRの転写調節』に着眼し、GRのコファクターを含めた分子ネットワークを明らかにすべく研究を進めた。この目的のために本

研究においては大きく分けて、1) GR の転写調節因子候補の探索、2) 候補因子の GCs-GR の抗炎症メカニズムへの寄与、3) 創薬ターゲットとしての候補因子の評価の3つのステップについて段階的に研究を進めた。特に本研究に先駆けて実施した遺伝子機能ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングアッセイにおいてすでに GR の転写活性化因子として既存因子以外に 27 遺伝子を実験的に同定した。そこで本研究においてはこれら因子を中心に各因子の組織特異性、細胞内局在、GR との結合と言った分子生物学的解析を進め、さらに shRNA の導入による候補遺伝子のノックダウンの際の LPS 刺激下におけるマクロファージ細胞の細胞死の抑制について評価を行った。GCs-GR の抗炎症メカニズムへの関与が示唆された因子について 5-6 因子を目安にノックアウトマウス・細胞の作製も試みた。

#### 4. 研究成果

(1) GR 調節候補因子の GR 結合性と組織特異性

ルシフェラーゼアッセイをベースとしたハイスループットスクリーニングアッセイにより同定された 27 遺伝子の GR 転写調節候補因子について、まず GR との結合性を確認した。各因子の HA 融合発現ベクターを作製し、HEK293T 細胞に発現させてデキサメタゾン (Dex) 存在下で培養し、共役免疫沈降法にて GR との結合を確認した (図 2)。明確な結合が認められる因子として、「MSANTD3 (A)」および「ESX1 (E)」が同定された。

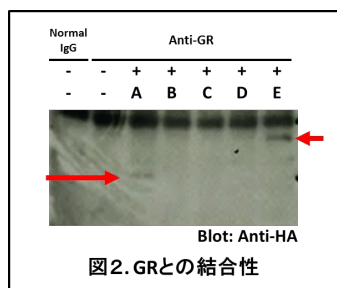


図2. GRとの結合性

さらに MSANTD3 についてはマウスマクロファージ細胞への LPS 刺激において一過的な発現が確認されたため、以降はこの MSANTD3 に着目して解析を進めた。

MSANTD3 についてはその機能についてほとんど報告がないため、まずは組織分布を GR と比較してみた (図 3)。その結果、肝臓やリンパ球などでは発現が弱いものの、概ね GR と同様にユビキタスに発現していることが明らかとなった。

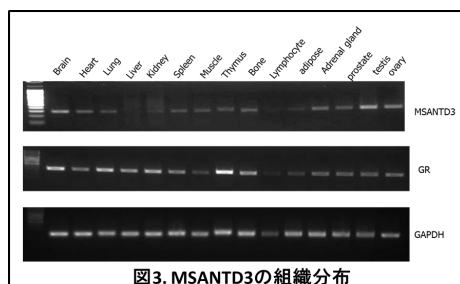


図3. MSANTD3の組織分布

(2) GR-MASANTD3 複合体の転写活性

次に GR の転写活性に MSANTD3 がどう関与するか確かめるために、まず GR のドメイン欠損体を作製し、MSANTD3 と共発現で GR の転写活性がどのように変化するか検証した。GR は大きく 3 つのドメインから成り、DNA と結合する DBD ドメインと GCs と結合する LBD ドメイン、そして GR の転写活性を調節しているといわれている AF-1 ドメインが存在する。各ドメインの欠損体を作製し、各ドメイン欠損体と MSANTD3 ベクターを HEK293T 細胞に発現させてデキサメタゾン (Dex) 存在下で培養した。またコントロールとして GR ドメイン欠損体とコントロールベクターを共発現させた細胞を準備し、GR の転写活性に関してはハイスループットスクリーニングアッセイに使用した GR 結合エレメント (GRE) の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したレポーターベクターも同時に遺伝子導入してルシフェラーゼアッセイにて検証を行った。

解析の結果、MSANTD3 は GR の AF-1 ドメインを介して GR の転写活性を制御していることが明らかとなった (図 4)。AF-1 はリン酸化を受けることで GR の転写活性を担っていることが知られているが、その調節機構は不明な点も多い。今回の結果は MSANTD3 がその制御に関わっていることが考えられる。今後は MSANTD3 の GR 転写活性化における詳細なメカニズムを明らかにするために GR の AF-1 領域のリン酸化を中心に解析を進める。

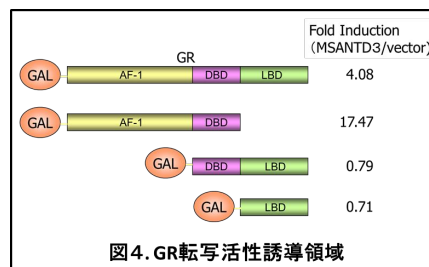


図4. GR転写活性誘導領域

(3) GR 調節候補因子のストレス応答性

GR は免疫機能だけではなく様々な細胞環境 (細胞ストレス) において、種々の遺伝子発現制御を担っている。そこでその制御候補因子である MSANTD3 についても同様な機能があると推察し、様々な細胞ストレス化における MSANTD3 の発現変化、および細胞内局在変化について解析を進めた。

発現変化については前述のように MSANTD3 についてはマウスマクロファージ培養細胞 Raw264.7 およびマウス骨髄由来マクロファージ細胞 BMDM において LPS 刺激下で一過的な発現が確認された。さらに飢餓状態における細胞内局在を確認したところ、通常では核内に局在を認めていたのが、飢餓状態において核内および細胞質で凝集体 (foci) を形成することが明らかとなった。この凝集体がどのような機能を持つかは定かでないが、GR は飢餓状態においても種々

の遺伝子発現制御を担っていることが報告されていることから、MSANTD3 は免疫反応だけでなく飢餓状態においても自身の局在を変化させることで GR の調節を行っていることが示唆された。このような劇的な局在変化による GR の転写活性の制御ははまだ報告がなく、今後の詳細な解析を行っていく。

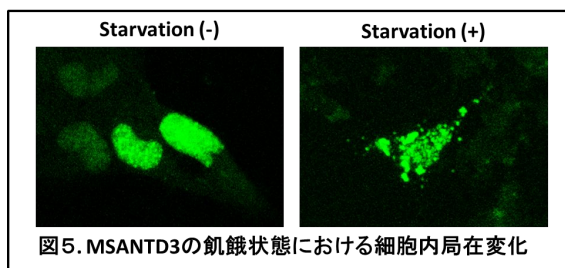


図5. MSANTD3の飢餓状態における細胞内局在変化

(4) GR 調節候補因子のノックダウンによる細胞の Cell viability への影響

GCs-GR の抗炎症メカニズムの代表的な表現型に GCs による末梢血 T 細胞のアポトーシスの誘導という表現型が知られている。そこで MSANTD3 に対する shRNA をヒト急性リンパ芽球性白血病・T リンパ球様細胞 CCRF-CEM に導入し、Dex 依存的なアポトーシスの表現型を解析することで MSANTD3 の GCs-GR の抗炎症メカニズムへの寄与について評価を行った(図6)。

解析の結果、既存の報告のように GR の shRNA の導入によりコントロール shRNA (sh lacZ) 導入と比較して CCRF-CEM 細胞の Dex 依存的なアポトーシスの抑制が認められた。一方で MSANTD3 の shRNA を導入した細胞では低濃度の Dex に対して GR の shRNA と同様に Dex 依存的なアポトーシスの抑制が認められたが、高濃度の Dex に対してはその効果は認められなかった。この知見により、MSANTD3 は GCs-GR の抗炎症メカニズムに部分的に調節している可能性が強いことを示唆した。

本研究ではこれまでの知見を参考に、ノックアウトマウスを作製し、MSANTD3 の治療ターゲットとしての有効性を評価する予定であったが、残念ながら研究期間に解析に使用できるマウスを得ることができなかった。現在、ノックアウトマウスの作製を急ぐと共にノックアウト細胞を作製し、MSANTD3 の治療ターゲットとしての有効性を評価する予定である。

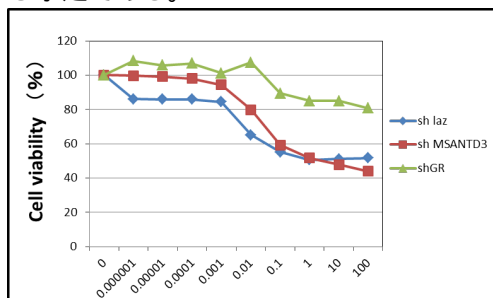


図6. MSANTD3のノックダウンによるDex依存的アポトーシスへの影響

## 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 2件)

Kataoka K, Matsushima T, Ito Y, Sato T, Yokoyama S, Asahara H

“Bhlha9 regulates apical ectodermal ridge formation during limb development.”

雑誌 “J Bone Miner Metab.” 2017 掲載決定、査読有

doi: 10.1007/s00774-017-0820-0.

Kayama T, Mori M, Ito Y, Matsushima T, Nakamichi R, Suzuki H, Ichinose S, Saito M, Marumo K, Asahara H

“Gtf2ird1-Dependent Mohawk Expression Regulates Mechanosensing Properties of the Tendon.”

雑誌 “Mol Cell Biol.” 2016 vol36, p1297-309. 査読有

doi: 10.1128/MCB.00950-15.

[学会発表](計 8件)

松島隆英 他

“ヒト型双腕ロボットを用いたクロマチン免疫沈降解析”

第39回日本分子生物学会、2016年12月1日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

Takahide Matsushima, Naoki Goshima, Hiroshi Asahara

“The high-throughput microscopy screening system with genome-wide cDNA expression libraries”

Visual-JW2016, 2016年10月17日, Hotel Hankyu Expo Park (大阪府、吹田市)

松島隆英、五島直樹、浅原弘嗣

“新規 DAMPs タンパク質のスクリーニングと機能解析”

第3回日本リウマチ学会ベーシックリサーチカンファレンス、2016年10月14日、富士ソフト アキバプラザ(東京都、千代田区)

松島隆英、五島直樹、浅原弘嗣

“新規 DAMPs タンパク質のスクリーニングと機能解析”

第88回日本生化学会、2015年12月2日、神戸国際展示場(兵庫県、神戸市)

松島隆英、五島直樹、浅原弘嗣

“新規 DAMPs タンパク質のスクリーニングと機能解析”

第2回日本リウマチ学会ベーシックリサーチカンファレンス、2015年10月2日、東京大学(本郷)医学部教育研究棟鉄門記念講堂(東京都、文京区)

松島隆英

“遺伝子ライブラリーとロボットシステムを利用したハイコンテツスクリーニングの取り組み”

第 51 回血管研究会、2014 年 10 月 30 日、東京医科歯科大学 MD タワー(東京都、文京区)

松島隆英、五島直樹、浅原弘嗣

“新規 DAMPs タンパク質のスクリーニングと機能解析”

第 87 回日本生化学会、2014 年 10 月 18 日、京都国際会館(京都府、京都市)

松島隆英

“ハイスループットスクリーニング顕微鏡を用いたシステム医学的アプローチ”

BioJapan、2014 年 10 月 17 日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

松島隆英、浅原弘嗣

“エクソソームと miRNA “

科学評論社 リウマチ科、2015 年 vol54、p468-472

〔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

<https://www.tmdusystemsbiomedicine.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島 隆英 (MATSUSHIMA, Takahide)

東京医科歯科大学

大学院医歯総合研究科・プロジェクト助教

研究者番号：40636560

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

浅原 弘嗣 (ASAHARA, Hiroshi)