

令和元年5月21日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08286

研究課題名(和文) 加齢による糖質コルチコイド合成系の変化と老化への影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of age-associated change of glucocorticoid production

研究代表者

安達 三美 (Adachi, Mimi)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：10323693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：加齢により、糖尿病などの糖質コルチコイド(Glucocorticoid: GC)の過剰分泌によって起こる病態が発症しやすくなる。そこで、老化によるGC産生系の変化と、老化への影響について検討した。(1)ヒト副腎皮質腫瘍細胞株(H295R細胞)を用いて細胞老化を惹起させると、GADD45Aおよびp38MAPKを介して、GC産生が亢進することを見出した。(2)血清中のGCが高齢マウスで高いことを見出した。また若いマウスで認められるGCの日内変動が、高齢マウスで消失することを見出した。加齢によるGC分泌系の攪乱により、老化そのものや、老化関連疾患の発症および進行が促進されることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、老化に伴い出現する新規の糖質コルチコイド分泌活性化メカニズムが発見され、その老化への関与が示唆された。したがって、糖質コルチコイド分泌脱制御が、炎症・活性酸素・ミトコンドリアの機能・小胞体ストレスに次ぐ、老化の原因の新たな役者として治療戦略のターゲットになることが期待される。加齢により罹患率が上昇する老化関連疾患すなわち、動脈硬化、耐糖能異常、脂質代謝異常症、免疫能低下、骨粗鬆症など、多くの疾患がそのターゲットになり得ることが期待されるため、広く成人疾患の治療戦略として波及することが期待され、学術的、社会的な意義は大変大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：Glucocorticoid production is regulated by adrenocorticotrophic hormone (ACTH) via the cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA) pathway in the adrenal cortex, but the changes in steroidogenesis associated with aging are unknown. (1)We reported that in human adrenocortical tumor cell line, H295R cells, which were induced to replicative or drug-induced senescence, glucocorticoid production and most of steroidogenic factors gene expression were increased. Further those are promoted through GADD45A and p38MAPK, but not through ACTH/PKA pathway. (2)We found that the amount of glucocorticoid in serum is higher in old mice, and that circadian rhythm is disappeared.

These results suggest that glucocorticoid production is changed associated with aging. It is possibility that deregulation of glucocorticoid production might play a key role in progression of aging and age-associated diseases.

研究分野：分子生物学、生化学、内科学、循環器内科学

キーワード：老化 糖質コルチコイド GADD45A p38MAPK HPA軸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

老化研究-老化現象や老化関連疾患の予防や治療の研究は、医学研究において最も注目を集めている分野の一つである。本研究の代表者は最近、老化副腎皮質組織（細胞）において糖質コルチコイド合成が上昇していることを見出した。副腎皮質から分泌されるステロイドホルモンの一つである糖質コルチコイドは、視床下部-下垂体-副腎皮質系（hypothalamus-pituitary-adrenal axis: HPA axis）によって制御されている。HPA axis は生体の恒常性を維持するうえで重要な役割を持ち、特にストレス応答の際に HPA axis が活性化されると視床下部から corticotropin releasing hormone (CRH) や vasopressin が産生・放出され、脳下垂体からの adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 放出を促進する。その結果、副腎皮質から糖質コルチコイドが分泌される(図 1)。HPA

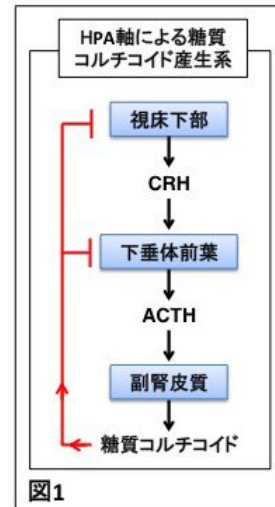


図1

軸は、厳密なフィードバック機構を有しており、糖質コルチコイドが過剰に産生されると、糖質コルチコイド受容体を介して、下垂体前葉の ACTH 産生細胞においてその産生・分泌が抑制される。同様に視床下部の CRH 産生細胞において、糖質コルチコイド受容体を介して CRH の産生・分泌も抑制される。この負のフィードバック機構によって、生体内の糖質コルチコイドの量が適切にコントロールされている(図 1)。

糖質コルチコイドは、糖新生や、抗免疫効果などの生理機能を持ち、分泌過多により耐糖能異常や免疫能低下などを引き起こすことで知られている。これらは、老化によって引き起こされやすくなる老化関連疾患でもある。また最近、加齢に伴う、うつ、不安、神経変性疾患、免疫、代謝性疾患の病理学的所見として、糖質コルチコイドや CRH 量の著しい増加が認められるなどの報告がなされており、HPA axis、糖質コルチコイドの老化における役割が、注目されつつある。糖質コルチコイド合成の適切なコントロールにより、予防や治療につながることを期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、「老化 副腎皮質組織（細胞）における糖質コルチコイドの合成の上昇 老化や老化関連疾患の促進」という仮説を検証し、老化による副腎皮質ホルモン-糖質コルチコイドの合成能が上昇するメカニズムを解析し、適切に制御する方法を探索することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト副腎皮質腺腫由来の細胞株 (H295R 細胞) に、DNA 損傷を惹起させるエトポシド (EP) で処理することにより、細胞老化を誘導する。細胞上清中の糖質コルチコイド濃度を LC/MS を用いて測定する。また細胞から RNA およびタンパク質を抽出し、DNA マイクロアレイ、マイクロ RNA アレイ、リアルタイム PCR、質量分析 (MALDI-TOF MASS, LC-MS)、ウエスタンブロット、蛍光免疫染色法を行う。

(2) 24 ヶ月齢以上の高齢マウスと 3~6 ヶ月齢の若いマウスから採血し、血清中の糖質コルチコイドの濃度測定を行う。また副腎から皮質の糖質コルチコイドを産生する束状帯を単離し、ステロイドホルモン合成関連因子や老化関連因子をはじめとした遺伝子、タンパク質の網羅的な解析を行う。採血および組織の摘出は、糖質コルチコイドの血中濃度がマウスで最も高い時間帯 (18-20 時) と、最も低い時間帯 (6-8 時) に行う。

#### 4. 研究成果

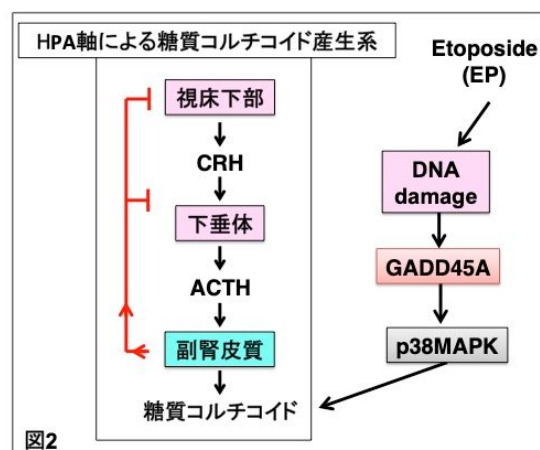
##### 1. 老化 H295R 細胞の研究

(1) H295R 細胞に、DNA 損傷を惹起させるため、EP を添加した。細胞培養液中のコルチゾール（糖質コルチコイド）の濃度が 4 倍に増加した。蛍光免疫染色法により、EP 処理 3 日後より、DNA 損傷マーカー  $\gamma$ H2AX の陽性細胞が出現し、同時にステロイド産生関連酵素の一つである CYP21A2 発現細胞も認められるようになった。 $\gamma$ H2AX 陽性細胞特異的に CYP21A2 集積が認められた。DNA マイクロアレイ、リアルタイム PCR により、ステロイド産生系酵素群（HSD3B2, CYP21A2, CYP17A1, CYP11A1, CYP17A1, CYP11B1, CYP11B2, Nurr1, Nur77）およびストレス因子である GADD45A の遺伝子発現の増加が認められた。したがって、H295R 細胞において、DNA 損傷により、コルチゾール産生系が活性化することが明らかになった。

(2) GADD45A 発現ベクターの導入により、HSD3B2、CYP21A2、CYP11B1、CYP11B2、Nurr1 の発現が増加した。また、GADD45A の siRNA により、EP 処理によって上昇したステロイド産生系酵素の遺伝子発現、コルチゾール産生、および CYP21A2 集積が抑制された。

(3) EP によって p38MAPK のリン酸化が惹起され、siGADD45A によって抑制された。EP によって活性化されたステロイド合成系は、p38MAPK の阻害剤（SB203580）によりほぼ完全に抑制された。ACTH によるステロイド産生系は PKA を介するが、EP によって活性化されるステロイド合成系の PKA 阻害剤（H89）による抑制は部分的であった。したがって、EP によるステロイド産生系の亢進は、HPA 軸非依存的なメカニズムが主であり、GADD45A p38MAPK が関与することが示唆された。

以上より、EP により細胞老化した副腎皮質細胞において、コルチゾールの産生分泌が、GADD45A p38MAPK を介して亢進することが明らかになった（2018 年 Scientific Reports に掲載、図 2）。この系は、HPA 軸非依存的であることから、ネガティブフィードバックが働かないことが予想され、老化した個体ではコルチゾール過剰状態が引き起こされることが危惧される。老化関連疾患の発症に、糖質コルチコイド産生の攪乱が関与する可能性が考えられた。そこでマウスの実験に着手した。



##### 2. マウスの研究

平成 30 年度からは、マウスの実験を行った。24 ヶ月齢以上の高齢マウスと 3-6 ヶ月齢の若いマウスの血清を採取して、コルチコステロン（マウスの主要な糖質コルチコイド）をはじめとしたステロイドホルモン、ACTH 濃度の解析を行った。若いマウスでは、コルチコステロンの血液中の濃度は、早朝低く、夕方高い。しかしこの日内変動が、高齢マウスでは消失することを見出した。副腎皮質各層・下垂体を摘出して、DNA マイクロアレイ、RT-qPCR にて遺伝子発現の比較解析、免疫組織学的解析を行い、メカニズムを検証中である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Tamamori-Adachi M, Koga A, Susa T, Fujii H, Tsuchiya M, Okinaga H, Hisaki H, Iizuka M, Kitajima S, Okazaki T: DNA damage response induced by Etoposide promotes steroidogenesis via Gadd45A in cultured adrenal cells. *Sci. Rep.* 8: 9636, 2018 DOI:10. 1038/s41598-018-27938-5 (corresponding author)
2. Susa T, Iizuka M, Okinaga H, Tamamori-Adachi M, Okazaki T: Without 1 $\alpha$ -hydroxylation, the gene expression profile of 25(OH)D<sub>3</sub> treatment overlaps deeply with that of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in prostate cancer cells. *Sci. Rep.* 8: 9024, 2018 DOI: 10.1038/s41598-018-27441-x.
3. Uchida K, Tanaka Y, Ichikawa H, Watanabe M, Mitani S, Morita K, Fujii H, Ishikawa M, Yoshino G, Okinaga H, Nagae G, Aburatani H, Ikeda Y, Susa T, Tamamori-Adachi M, Fukusato T, Uozaki H, Okazaki T, Iizuka M: An Excess of CYP24A1, Lack of CasR, and a Novel LncRNA Near the PTH Gene Characterize an Ectopic PTH-Producing an Ectopic PTH-Producing Tumor. *J. Endocr. Soc.* 1: 691-711, 2017 DOI: 10.1210/js.2017-00063.
4. Iizuka M, Susa T, Okinaga H, Tamamori-Adachi M, Okazaki T: Intrinsic ubiquitin E3 ligase activity of histone acetyltransferase Hbo1 for estrogen receptor  $\alpha$ . *Proc. Jpn. Acad., Ser. B Phys. Biol. Sci.* 93: 498-510, 2017 DOI: 10.2183/pjab.93.030.
5. Susa T, Ikaga R, Kajitani T, Iizuka M, Okinaga H, Tamamori-Adachi M, Okazaki T: Wild-type and Specific Mutant Androgen Receptor Mediates Transcription via 17 $\beta$ -Estradiol in Sex Hormone-sensitive Cancer cells. *J. Cell. Physiol.* 230: 1594-1606, 2015 DOI: 10.1002/jcp.24906.

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 安達(玉盛)三美他

加齢に伴い、HPA 軸によるネガティブフィードバック反応系が減弱し、糖質コルチコイド合成が促進される。第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 横浜

2. 菊山崇浩、安達(玉盛)三美他

腎臓遠位尿管細胞 mpkDCT 細胞を用いた *Cyp27b1* ノックアウト細胞の樹立と 25(OH)D<sub>3</sub> の生理活性の評価。第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 横浜

3. 久樹晴美、安達(玉盛)三美他

saposin D 欠損マウスの過剰飲水行動と口渴中枢を制御するタンパク質。第 91 回日本生化学会大会 2018 年 9 月 京都

4. 諏佐崇生、安達三美他

ヒト前立腺癌 LNCaP 細胞における 25(OH)D<sub>3</sub> のビタミン D<sub>3</sub> 活性の評価。第 91 回日本内分泌学会学術総会 2018 年 4 月 宮崎

5. 安達(玉盛)三美他

DNA 損傷刺激により、副腎皮質腫瘍細胞株 (H295R) においてコルチゾール分泌能が増大する。2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (Conbio2017) 2017 年 12 月 神戸

6. 諏佐崇生、安達三美他

ヒト前立腺癌 LNCaP 細胞において 25(OH)D<sub>3</sub> は 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の標的遺伝子と類似した遺伝子群を制御する。2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (Conbio2017) 2017 年 12 月 神戸

7. 久樹晴美、安達三美他

saposinD 欠損マウスの過剰飲水行動と GPR19 および Agt1R の関係 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (Conbio2017) 2017 年 12 月 神戸

8. 安達(玉盛)三美他

DNA damage response induces cell-autonomous steroidogenesis via GADD45a-p38MAPK in human

adrenocortical tumor H295R cells . ENDO2017 The Endocrine Society's 99 th Annual Meeting & Expo 2017年4月 Orlando, USA

9. 諏佐崇生、安達三美他

Transcriptional Repression of the Metallothionein Gene Family by  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  Is Mediated by Androgen Receptor in Prostate Cancer LNCaP Cells. ENDO2017 The Endocrine Society's 99 th Annual Meeting & Expo 2017年4月 Orlando, USA

10. 岡崎具樹、安達三美他

CYP24A1 Overexpression, Scarcity of Calcium-Sensing Receptor and Cell-specific Long Non-Coding RNA Characterize Gene Expression Pattern of Ectopic PTH-Producing Tumor in the Retroperitoneum. ENDO2017 The Endocrine Society's 99 th Annual Meeting & Expo 2017年4月 Orlando, USA

11. 安達(玉盛)三美他

DNA 損傷により、p38MAPK の活性を介して、副腎皮質腫瘍細胞株 (H295R) において自律的にコルチゾール分泌が促進する。第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 横浜

12. 飯塚眞由、安達三美他

ヒストンアセチルトランスフェラーゼ Hbo1 は、エストロゲン受容体に対する E3 リガーゼ活性を持つ。第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 横浜

13. 諏佐崇生、安達三美他

ヒト前立腺癌 LNCaP 細胞における DHT-AR へのクロストークを介したビタミン D3 による Metallothionein 遺伝子群の転写抑制機構の解析。第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 横浜

14. 久樹晴美、安達三美他

saposinD 欠損マウスの過剰飲水行動と Adropin および GPR19 の関係 2016 年第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 仙台

15. 安達(玉盛)三美他

DNA damage response induces cell-autonomous steroidogenesis via GADD45a-p38MAPK in human adrenocortical tumor H295R cells . ENDO2016 The Endocrine Society's 99 th Annual Meeting & Expo 2016年4月 Boston, USA

16. 諏佐崇生、安達三美他

Transcriptional Repression of the Metallothionein Gene Family by  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  Is Mediated by Androgen Receptor in Prostate Cancer LNCaP Cells. ENDO2016 The Endocrine Society's 99 th Annual Meeting & Expo 2016年4月 Boston, USA

17. 安達(玉盛)三美他

老化誘導ヒト副腎皮質腫瘍細胞株 (H295R) におけるステロイドホルモン合成メカニズムの解析。第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 神戸

18. 飯塚眞由、安達三美他

ヒストンアセチルトランスフェラーゼ Hbo1 による、エストロゲン受容体タンパク質の非定型的ユビキチン化。第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 神戸

19. 諏佐崇生、安達三美他

ヒト前立腺癌 LNCaP 細胞において、ビタミン D3 と DHT がアンドロゲン受容体情報伝達系を共有する分子機構。第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 神戸

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：岡崎 具樹  
ローマ字氏名：Okazaki, tomoki  
所属研究機関名：帝京大学  
部局名：医学部生化学講座  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：60203973

### (2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。