

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790888

研究課題名 (和文) グルココルチコイド応答性遺伝子発現の HEXIM1 を介した

組織特異的制御機構の解析

研究課題名 (英文) Tissue-specific mechanisms of glucocorticoid-responsive

gene expression via HEXIM1

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)：骨格筋量の制御における副腎皮質グルココルチコイド作用の機構と生理的・病態生理的な意義を、ステロイドホルモンによる遺伝子発現制御を介した筋線維タンパク質分解機構と、栄養状態のセンシングを介した筋線維タンパク質合成機構のクロストークを基軸として解明した。さらに、ステロイド副作用である筋量・筋力低下 (筋萎縮) と、これに伴う全身エネルギー貯留管理の破綻を是正する治療・予防法開発の分子基盤を構築した。

研究成果の概要 (英文)：We identified that a mutually exclusive crosstalk between catabolic processes provoked by the adrenal glucocorticoid signal and anabolic processes conducted by nutrition sensing plays a central role in regulating skeletal muscle mass, establishing a molecular basis for developing a therapeutic approach for maintaining muscle mass. Our results suggest that this crosstalk underlies not only pathogenesis of steroid side effects including muscle atrophy but also maintenance of systemic energy homeostasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：グルココルチコイド、骨格筋、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、分岐鎖アミノ酸、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。また GC 製剤は臨床応用後 50 年を超え、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、未解決の副作用も多い。例えば、GC 服用後に骨格筋量、筋力の低下 (筋

萎縮) で悩む患者さんは決して少なくなく、しかも積極的な医療介入も行われていない実態が判明している。骨粗鬆症や胃潰瘍、糖尿病、高脂血症など、いくつかの GC 副作用の病態解明、診断、治療が著しく進歩している一方で、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得られていない。すなわち各組織における GC 副作用の分子機構の背景となる、「生理的濃度の GC が担っている生理的役割とその制御機構」につい

ての理解は、これまでの膨大な研究によっても充分とはいえない。したがって特に組織特異的な 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。

骨格筋量制御は、GC を介した全身のエネルギー代謝調節と密接に関連している。すなわち、筋線維（筋細胞）のタンパク質合成（同化）によって蓄えられたエネルギーは、飢餓ストレスに応じたタンパク質分解（異化）過程を経て全身へ供給される。これらの制御の破綻による筋萎縮は、様々な疾患に合併して「生活の質」を低下させ、原疾患の予後をも悪化させる。運動器障害によって医学的治療や介護を要する状態、運動器不安定症・ロコモティブ症候群を呈する人口は確実に増加が見込まれており、来るべき超高齢化社会を見据えた筋萎縮への対策は喫緊の課題であるといえる。

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萎縮（ステロイド筋症）に観察される筋線維の縮小機構の理解と密接に関連しながら進展してきた。成熟個体の骨格筋量は筋線維タンパク質の異化と同化のバランスによって調節されており、GC はタンパク質異化の亢進と同化の抑制をもたらす。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、筋異化の鍵因子として転写因子 FoxO が同定された。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 atrogen-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るが、詳しい機序は不明である。一方、筋同化の鍵因子として 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 mammalian target of rapamycin complex 1 (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、 O_2 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。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、REDD1 の発現制御機構における GC 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る。

研究代表者らは、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核内レセプター、グルココルチコイドレセプター (GR) の組織特異的な機能制御機構を解析するため、ヒトの様々な組織由来細胞株より新規 GR 結合因子を探索し、hexamethylene-bis-

acetamide (HMBA)-inducible protein in human vascular smooth muscle cells 1 (HEXIM1) を同定した。HEXIM1 は、血管平滑筋細胞などの分化を誘導することが知られている薬剤 HMBA によって発現が誘導されるが、その機能は未知であった。ここで研究代表者らは、HEXIM1 が核内で多くの因子と複合体を作っているタンパク質であり、GR を含む転写因子による遺伝子転写活性化を抑制することを世界に先駆けつきとめた。さらに、HEXIM1 は GC 依存的な、GR の標的遺伝子プロモーターへのリクルートメント、GR と転写共役因子 transcriptional intermediary factor 2 との核内相互作用、RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) の転写開始点付近へのリクルートメントを抑制することを明らかにした。内在性 HEXIM1 タンパク質の発現量は組織によって幅広い差異があるため、各組織における特異的な GC 応答性遺伝子発現制御機構に HEXIM1 の GR 機能制御活性が関与する可能性が考えられた。

GR 標的遺伝子産物には、転写因子など新規の mRNA 発現制御にも関与するタンパク質が多く見られ、GC による遺伝子発現制御には、二次的、三次的な転写制御が多段階のネットワークを形成して複雑に関わっていると考えられている。このことは、各組織において GR が直接発現を制御する標的遺伝子の同定を困難にしており、組織特異的な GC 作用機構の究明の障害となっている。さらに HEXIM1 による GR 応答遺伝子発現の制御には、標的遺伝子特異性が観察されたため、HEXIM1 を含めた様々な因子、生体シグナルによる GR 機能調節機構を解析するにあっても、各組織における GR 標的遺伝子の網羅的な同定法の開発は避けて通れない課題となった。

2. 研究の目的

GR 標的遺伝子を網羅的に同定する方法論を確立し、様々な組織においてその実用性を検証すること。同定された標的遺伝子産物の機能を解析すること。および並行して、これら遺伝子発現の GC-GR を介した制御機構を、HEXIM1 がここに与える影響とともに詳細に解析すること。以上により、ステロイドホルモンシグナルを介した遺伝子発現制御へ干渉する生体シグナルを解明し、かかるシグナル間クロストークが組織および個体において果たしている生理的役割を解明することを目指すこととした。またさらに、薬理量のグルココルチコイド投与などによる、このクロストークの攪乱や破綻を原因とした疾患の分子基盤を究明するとともに、その予防・治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

ラット新生仔心筋由来初代培養細胞を、GR

アゴニスト、ミネラルコルチコイドレセプターアゴニスト、およびアンタゴニストの単独と組み合わせによって処理し、mRNA 発現の時相変化を DNA マイクロアレイにより解析した。また、得られた標的遺伝子候補のゲノム情報から、ヒト、マウス、ラットに保存された GR 結合 DNA 配列を抽出した。クロマチン免疫沈降により GR および RNAPII のリクルートメント変化を解析し、また遺伝子工学的に単離したプロモーター領域の機能をレポーターアッセイにより解析した。さらに、得られた GR 標的遺伝子の機能を、siRNA およびノックアウトマウス、ならびに組換えアデノウイルスおよび組換えアデノ随伴ウイルスによる過剰発現によって解析した。

上記で確立した GR 標的遺伝子同定手法をラット個体の骨格筋（腓腹筋、ヒラメ筋、前脛骨筋）に適用し、骨格筋における新規 GR 標的遺伝子を探索するとともに、その遺伝子産物の機能を、培養筋芽細胞、培養筋管細胞、個体ラット、マウスにおいて上記実験系により解析した。

GC 過剰によるステロイド筋症ラットモデルを作成し、上記解析結果から考えられた分子機構の検証を行うとともに、かかる機構の理解に基づく GC 副作用予防治療法の開発を行った。

4. 研究成果

(1) 内性 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、アンタゴニスト RU486 ならびに、DNA マイクロアレイ、in silico プロモーター解析を利用して GR 標的遺伝子同定法を開発した (Yoshikawa N, et al., Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009; ほか)。さらに、心筋において GR 標的遺伝子として同定したシクロオキシゲナーゼ 2 が、虚血再灌流障害モデルにおける GC の心筋保護作用に寄与していることを発見した (Tokudome S, et al., J Clin Invest. 2009; ほか)。

(2) GR の発現量、GC 依存性 mRNA 発現亢進のいずれもが、ヒラメ筋より速筋線維優位な腓腹筋において大きいことをラットにおいて示した。これらの骨格筋における GR 標的遺伝子候補を (1) の GR 標的遺伝子同定法を用いて複数抽出した。GR 発現量と相関した GC 依存性 mRNA 発現亢進を呈した遺伝子のうち、そのプロモーター領域に GR 結合 DNA 配列が未だ同定されていない REDD1 と KLF15 に着目した。KLF15 は心筋肥大を抑制する効果が知られている転写因子である。これらの遺伝子のプロモーター領域の配列相同性から、種間で保存された GC 応答性 DNA 配列 (GRE) の候補を見出し、レポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降法を用いて骨格筋特異的 GR 標的遺

伝子であることを明らかにした (Shimizu N, et al., Cell Metab. 2011; ほか)。

(3) KLF15 を過剰発現させたラット前脛骨筋の mRNA 発現プロファイルの解析より、KLF15 の既知標的遺伝子 BCAT2 のほか、atrogin-1, MuRF1, FoxO1, FoxO3 の mRNA 発現亢進を明らかにした。また atrogin-1, MuRF1 プロモーター上に KLF15 がリクルートされる領域を同定したところ、近傍に FoxO, GR の結合配列が存在し、これら転写因子による協調的な転写制御が示唆された (図 1)。FoxO の過剰発現による atrogin-1, MuRF1 の発現亢進が KLF15 により増強されただけでなく、GR 依存性 atrogin-1, MuRF1 の発現亢進は siRNA による KLF15 ノックダウンで著明に抑制された。したがって KLF15 は骨格筋の異化プロセスにおいて FoxO と同様に重要な鍵分子であると言える。

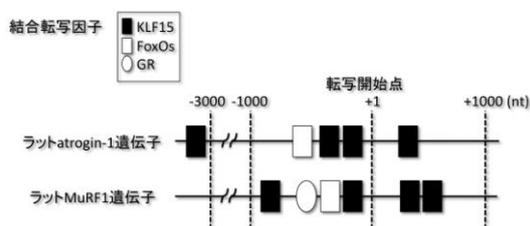


図 1. ラット atrogin-1, MuRF1 遺伝子の構造。転写開始点 (+1) 付近に KLF15, FoxOs, GR 結合配列が存在しており、これら転写因子による協調的な転写制御が示唆される。nt: ヌクレオチド。

(4) KLF15 の標的遺伝子 BCAT2 は BCAA 代謝における最初の反応を担う酵素である。BCAT2 ノックアウトマウスの血漿中 BCAA 濃度は野生型マウスの 10 倍以上認められることから BCAT2 活性は生体内 BCAA 濃度の制御に決定的な役割を持っていると考えられる。ここでラット前脛骨筋、培養筋管細胞において、KLF15 は BCAT2 の活性を亢進し細胞内の BCAA 濃度を著明に低下させ、S6K1 のリン酸化の減少すなわち mTORC1 活性の低下を引き起こすことを示した。KLF15 過剰発現は、ラット前脛骨筋線維の横断面積を減少させ、また培養筋管細胞の太さを低下させた。しかもこの筋管細胞の萎縮は、培養液に BCAA を加え mTORC1 活性を回復させることによって著明に改善された。したがって、KLF15 を介した転写制御は異化促進のみならず同化抑制においても重要であり、筋萎縮と密接な関わりを持つことが示された (図 2)。以上から、GR を中心とした転写ネットワークにおいて、KLF15 と FoxO を介した異化促進機構および、KLF15 (→ BCAT2 → BCAA 低下) と REDD1 を介した能動的な同化のシャットオフ機構が同時に作動して骨格筋代謝を同化から異化へ迅速かつ効

率的にスイッチすることがわかった。すなわち、GC 筋萎縮の分子基盤は、骨格筋における GR 標的遺伝子群による多様かつ協調的な異化亢進と同化抑制である。

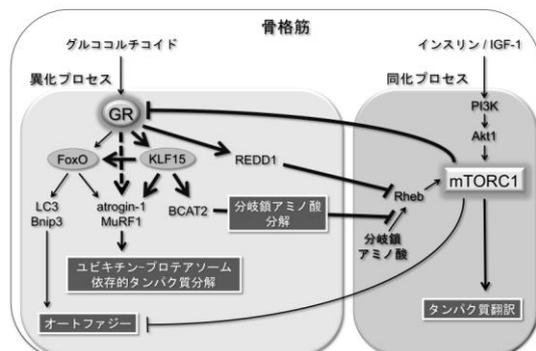


図 2. 筋線維における GR と mTORC1 とのクロストークの概念図。GR と標的遺伝子産物である転写因子から構成される転写制御ネットワークは、それぞれ複数の機構を駆動してタンパク質分解を進めると同時に、mTORC1 の活性化を抑制する。一方、mTORC1 は GR を介した標的遺伝子の転写を抑制することで、この転写制御ネットワーク全体の活性を低下させつつ、翻訳を亢進する。

(5) 培養筋管細胞において mTORC1 の特異的阻害剤ラパマイシンが GC 依存的 mRNA 発現を増強することを発見した。そこで、mTORC1 活性が GR 機能を抑制するという仮説のもと、構成的活性型 Rheb 変異体の遺伝子導入による mTORC1 の強制的活性化とラパマイシンによる強制的不活性化がそれぞれ GC-GR 依存的遺伝子発現に及ぼす影響を、GR 依存的レポーター遺伝子発現、内在性 GR 標的遺伝子 mRNA 発現、標的プロモーターへの GR および RNAPII のリクルートメントの解析により検証した。その結果、mTORC1 は GR の標的遺伝子プロモーターへのリクルートメント抑制を介して GC 応答性遺伝子発現に拮抗することがわかった。したがって、mTORC1 を活性化する同化シグナルは、GR を標的としてその下流転写ネットワーク全体を抑制し、異化プロセスを抑制するのみならず REDD1 や BCAT2 を介した同化抑制を解除することによって、骨格筋代謝を極めて効率よく異化から同化へ変換することが示唆された(図 2)。

(6) 以上から、人為的な mTORC1 の活性化がステロイド筋萎縮の発症を抑制する可能性が考えられた。ラットに DEX を連日 5 日間経腹腔投与し、ステロイド筋萎縮のモデルを作成したところ、GR の標的遺伝子プロモーター上へのリクルートメント、筋萎縮関連 mRNA の発現亢進、速筋線維優位な腓腹筋の mTORC1 活性低下、速筋線維特異的な横断面積の縮小、

遅筋線維優位なヒラメ筋の重量変化を伴わない腓腹筋の重量減少、および握力の低下を認めた。人為的 mTORC1 活性化の方法としては BCAA を用いた。BCAA の組成、投与経路、投与量、投与タイミングは mTORC1 活性を指標に最適化し、DEX 投与直前に BCAA を経口投与した。その結果、上記の、GR のリクルートメントから筋力低下までの全ての評価項目について著明な改善を認め、しかもこれらの効果はラパマイシンの投与によって完全にキャンセルされた(図 3)。以上の結果は、骨格筋における GR-mTORC1 クロストークの筋量・筋力制御における意義を動物個体レベルで実証したものと見える。

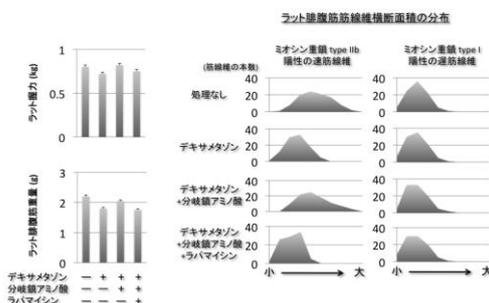


図 3. GC 筋萎縮モデルラットにおける mTORC1 活性化療法の効果。握力、腓腹筋重量、速筋線維の横断面積は、DEX 処理によって減少した。分岐鎖アミノ酸投与によって認められたこれら検査項目の著明な改善は、ラパマイシンによってキャンセルされた。一方、遅筋線維に対するこれらの影響はなかった。

(7) 組織間の精緻なネットワークを基盤にした分業体制を有する高等生物において、特定の組織に備蓄したエネルギーを必要に応じて他の組織に分配するシステムは生命維持にとって不可欠といえる。本研究における発見はかかる生体調節における骨格筋の役割を示したものである。すなわち、骨格筋における GR-mTORC1 のクロストークは、mTORC1 が良好な栄養状態を感知している時には同化優位の状態を作りエネルギー源の効率的な備蓄に貢献する。一方、飢餓ストレス時などの栄養状態の悪化に対しては骨格筋を異化優位の状態に傾け、他の組織へエネルギーを迅速に供給する(図 4)。したがって、GC は骨格筋において GR に始まる転写ネットワークを利用して生体エネルギー制御に本質的役割を果たしているといえる。その一方、疾患や治療などによって GC 濃度が生理的制御範囲を逸脱した場合に筋萎縮が顕著となり、生体に不利益が生じるのであろう。

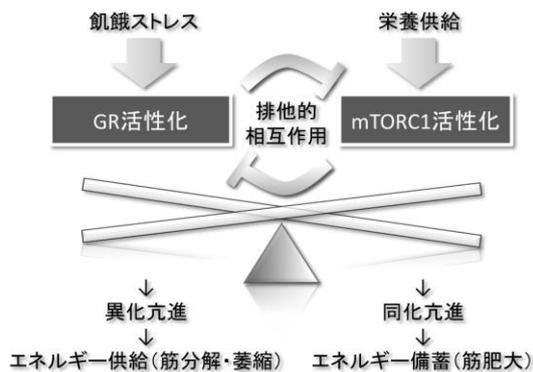


図 4. 骨格筋 GR-mTORC1 クロストークの生理的な意義。栄養センサーmTORC1は、良好な栄養状態を感知して同化優位の状態をつくり、筋線維タンパク質の形でエネルギーを備蓄する。一方、栄養状態の悪化に際しては、GRを中心とした転写制御ネットワークがmTORC1活性を抑制しつつ、異化を促進してエネルギーを供給する。GR-mTORC1 クロストークは、これら同化と異化のバランス調節の中心的役割を担う機構であると考えられる。

(8) 本研究は、骨格筋を例に、GRの標的遺伝子の網羅的探索がGCのはたらきや副作用のメカニズム解明へのブレイクスルーとなりえ、またその治療法確立にきわめて有効な手段であることを示したといえる。今後、この手法が多くの臓器に応用されることによって、GCの副作用が克服されGC療法が進歩することが期待される。

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3件)

(1) Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell Metab.* 2011;13(2):170-182. 査読有

(2) Tokudome S, Sano M, Shinmura K, Matsuhayashi T, Morizane S, Moriyama H, Tamaki K, Hayashida K, Nakanishi H, Yoshikawa N, Shimizu N, Endo J, Katayama T, Murata M, Yuasa S, Kaneda R, Tomita K, Eguchi N, Urada Y, Asano K, Utsunomiya Y, Suzuki T, Taguchi R, Tanaka T, Fukuda K. Glucocorticoid protects rodent hearts from ischemia/reperfusion injury by activating lipocalin-type prostaglandin D synthase-derived PGD2 biosynthesis. *J*

Clin Invest. 2009;119(6):1477-1488. 査読有

(3) Yoshikawa N, Nagasaki M, Sano M, Tokudome S, Ueno K, Shimizu N, Imoto S, Miyano S, Suematsu M, Fukuda K, Morimoto C, Tanaka H. Ligand-based gene expression profiling identifies critical role of glucocorticoid receptor in rat neonatal cardiomyocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296(6):E1363-E1373. 査読有

[学会発表] (計11件)

(1) 清水宣明, 吉川賢忠, 丸山崇子, 竹鼻健司, 伊藤尚基, 武田伸一, 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による転写因子KLF15の骨格筋特異的発現活性化の意義. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010.12.7.

(2) 丸山崇子, 吉川賢忠, 清水宣明, 佐野元昭, 福田恵一, 森本幾夫, 田中廣壽. 心筋細胞におけるグルココルチコイド受容体の役割の解明. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010.12.7.

(3) 吉川賢忠, 清水宣明, 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誘導性筋萎縮の分子機構の解明(1). 第18回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 名古屋, 2010.11.27.

(4) 清水宣明, 吉川賢忠, 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誘導性筋萎縮の分子機構の解明(2). 第18回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 名古屋, 2010.11.27.

(5) Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Tagata Y, Takehana K, Maruyama T, Takeda S, Morimoto C, Tanaka H. Crosstalk between glucocorticoid response and nutritional sensor in skeletal muscle. Satellite symposium "Nuclear Receptors" in ICE 2010, Kyoto, Japan, 2010.3.31.

(6) Yoshikawa N, Sano M, Tokudome S, Shimizu N, Nagasaki M, Imoto S, Miyano S, Fukuda K, Morimoto C, Tanaka H. The roles of glucocorticoid receptor on cardiac metabolism. 14th International Congress of Endocrinology. Kyoto, Japan, 2010.3.29.

(7) Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Tagata Y, Takehana K, Maruyama T, Takeda S, Morimoto C, Tanaka H. Crosstalk between glucocorticoid response and nutritional sensor in skeletal muscle. 14th International Congress of Endocrinology. Kyoto, Japan, 2010.3.29.

(8) 吉川賢忠, 長崎正朗, 井本清哉, 宮野悟,

徳留さと、佐野元昭、福田恵一、清水宣明、森本幾夫、田中廣壽。グルココルチコイド受容体は心筋におけるアミノ酸代謝、プロスタグランジン産生を抑制する。第 17 回日本ステロイドホルモン学会学術集会，福岡，2009. 11. 14.

(9) 清水宣明，吉川賢忠，丸山崇子，森本幾夫，田中廣壽。in vivo におけるグルココルチコイド応答性遺伝子の HEXIM1 を介した発現制御。第 17 回日本ステロイドホルモン学会学術集会，福岡，2009. 11. 14.

(10) 吉川賢忠，清水宣明，森本幾夫，田中廣壽。HEXIM1 はグルココルチコイド受容体 (GR) の hinge (D) 領域に結合して GR の転写活性を抑制する。第 82 回日本内分泌学会学術総会，前橋，2009. 4. 23.

(11) 清水宣明，吉川賢忠，森本幾夫，田中廣壽。グルココルチコイド (GC) 応答性遺伝子発現の HEXIM1 による組織特異的制御機構。第 82 回日本内分泌学会学術総会，前橋，2009. 4. 23.

[その他]

オンライン総説

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/2232>

清水宣明，吉川賢忠，田中廣壽。骨格筋におけるグルココルチコイド受容体と栄養センサー mTOR とのクロストーク。ライフサイエンス新着論文レビュー。2011.

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：30396890