

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390236

研究課題名(和文) グルココルチコイドによる生体機能の統合的調節に関する研究

研究課題名(英文) Study on homeostatic regulation by glucocorticoid

研究代表者

田中 廣壽 (TANAKA, HIROTOSHI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：00171794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋特異的グルココルチコイドレセプターGR遺伝子破壊マウスGRmKOを作成して以下の結果を得た。i. GRmKOでは骨格筋量は増大、ii. GRmKOは脂肪組織縮小、iii. GRmKOでは、骨格筋由来するアラニンの供給不足により肝臓のグルコース-アラニン回路を介した糖新生低下、FGF21産生亢進、iv. 高アラニン食飼育でGRmKOは脂肪組織重量増加。野生型マウスへの3-クロロアラニン投与により肝臓のFGF21 mRNA発現、血中FGF21増加。以上、生理的エネルギーフローの制御に関わる「骨格筋-肝-脂肪ネットワーク」を発見し、グルココルチコイド作用の解明に新展開をもたらした

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle has a pleiotropic role in organismal energy metabolism by storing protein as an energy source, or by excreting endocrine hormones. Muscle proteolysis is tightly controlled by the hypothalamus-pituitary-adrenal signalling axis via a glucocorticoid-driven transcriptional programme. We unraveled the physiological significance of this catabolic process using skeletal muscle-specific glucocorticoid receptor (GR) knockout (GRmKO) mice. These mice have increased muscle mass but smaller adipose tissues. Metabolically, GRmKO mice show a drastic shift of energy utilization and storage in muscle, liver and adipose tissues. The resulting depletion of plasma alanine serves as a cue to increase plasma levels of FGF21 and activates liver-fat communication, leading to the activation of lipolytic genes in adipose tissues. This skeletal muscle-liver-fat signalling axis may serve as a target for the development of therapies against various metabolic diseases, including obesity.

研究分野：内分泌学

キーワード：ホルモン ステロイド 転写因子 代謝 副腎皮質 遺伝子発現 副作用

1. 研究開始当初の背景

副腎皮質ホルモン GC は多くの臓器にきわめて多彩な作用を発現し、生体のストレス応答、恒常性維持には生命の維持に必須である。1985年のGRcDNAクローニング以降GC作用機構の理解は長足の進歩を遂げたものの、GC作用の本質的解明にはほど遠い。とくに、標的臓器における作用機構と臓器の果たす生理機能との関係、標的臓器間の機能的相互連関、に関しては不明のままであり、なぜ生存に必須であるかは今もって謎である。

核内レセプターの一つであるGRは、ほぼすべての組織に発現し、リガンド依存性転写因子として多くの遺伝子の発現を多彩な様式で制御する。GRは1種類であることから、GC作用のかかる特性は広義のエピゲノム制御の多様性による。しかし、実際にGR機能を規定する組織側のエピゲノム制御因子、GRによる組織特異的遺伝子発現調節機構を包括的に究明した研究は乏しく、GC-GR系の役割を統合生理学的に理解する試みはなかった。

従来GC内分泌学の主体は『ホルモン産生・作用の過剰/欠乏』であったが、最近、組織特異的GR遺伝子破壊マウスを用いた研究により、GCの生理的濃度域においてもGC-GR系が生体機能維持や疾患病態形成に本質的役割を果たしていることが明らかになりつつある。たとえば、肝臓特異的GR遺伝子破壊(Mol Endocrinol. 2004;18:1346, Cell Metab. 2008;8:212, Hepatology 2011;54:1398)から糖脂質代謝におけるGRの新たな役割が解明された。血球系においても、リンパ球、骨髄球系細胞のGR遺伝子破壊によって、各々、T細胞レセプター刺激、リポ多糖刺激により致死の炎症を発症する(Nat Med. 2003 ;9:1318 など)。また、GRは、妊娠、出産、授乳のみならず、児のストレス耐性形成にも必須である(Endocrinol. 2011;152:1652, Nat. Neurosci. 2009;12:342)。中枢神経系(扁桃体)のGRが標的遺伝子FKBP5を介して鬱病に関与していることも証明された(PLoS One. 2011;6(9):e24840, 2011)。ごく最近、申請者らも、食塩感受性高血圧にGRのエピゲノム制御と標的遺伝子発現が関わっていることを示した(Nature Med. 2011;17:573)。したがって、GC-GR系が標的遺伝子発現を介して基幹的生体機能調節経路に関わるという切り口からGC-GR系の役割を臓器機能のみならず多臓器連関を含めて体系的に解明することは、内分泌学に新展開を生むとともに、生命をシステムとして統合的に理解することに迫り、多くの疾患病態の理解や治療法開発にも貢献することも確実といえる。

申請者は一貫してGRを中心とした核内レセプターの研究を行い、これまでに多くの新規実験技術を開発・確立してきた。とくに、本申請の基盤となる要素技術として

下記 - がある。

・交差反応性のないGR超選択的リガンドの開発(J.Biol.Chem., 2002, Mol. Endocrinol., 2005)。

・GC-GR標的遺伝子の網羅的高効率同定法開発(Am.J.Physiol., 2009, J.Clin.Invest., 2009)。

・Cre-loxPアデノウイルスベクターを用いた組織特異的GRあるいはGR siRNA発現系とクロマチン免疫沈降法を用いたGR機能解析(Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2005, Mol. Endocrinol., 2008)。

・飛行時間型質量分析計を用いたGR共役因子の網羅的同定(Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2005)。

申請者は、これらの要素技術を駆使して、本申請の基盤となる

GR機能制御に関わるエピジェネティック制御因子の同定とかかる因子の機能制御機構と生理的意義の解明(J Biol Chem. 2007, Cell Metabolism., 2007, Nature Med. 2011)、各種標的臓器における新規GR標的遺伝子の機能と生理的意義の解明(Am.J.Physiol., 2009, J.Clin. Invest., 2009, Cell Metabolism., 2011)、に関して顕著な研究成果を得ている。とくに、心筋、骨格筋、という、従来注目度の低かったGCの標的臓器に焦点を当てた解析からGC-GR内分泌学の新しい展開が生まれ、パラダイムシフトをもたらしたことを強調したい。

すなわち、心筋では、GCにより誘導されるGR標的遺伝子としてPLA2、COX2、prostaglandin (PG)D合成酵素の遺伝子を同定し、PGD合成を介した心筋保護作用を報告した(J.Clin. Invest., 2009)。これらの遺伝子発現調節はリンパ球細胞などで提唱されているGCの抗炎症作用機序とは真逆であることは想定外であった。また、エピゲノム制御因子HEXIM1を心肥大に拮抗するカギ分子として見いだした(投稿中)。これらは、まさにGRの組織特異的エピゲノム制御の生体機能調節における重要性を示したものといえる。

骨格筋におけるGRの新規標的遺伝子KLF15とREDD1の同定と機能解析からも、GRの新たな生理的役割を発見している。KLF15は転写因子として、筋萎縮関連遺伝子atrogin-1、MuRF1の発現を誘導し、ユビキチンプロテアソーム依存性タンパク分解を亢進させる。また、分岐鎖アミノ酸(BCAA)分解の律速段階を制御するBCAT2遺伝子の発現誘導を介して骨格筋内BCAA量を減少させ栄養センサーであるmTOR活性を低下させる。REDD1もKLF15下流とは独立にmTOR活性を阻害し、タンパク合成を低下させる。一方、mTOR活性化は同化亢進とともにこれらのGR依存性遺伝子発現を抑制して異化に拮抗する。したがって、骨格筋において、GRとmTORの相互に排他的なクロストークが存在し、GC過剰によるそのバランスの破綻がGC療法に伴う

筋萎縮の分子機構であると提唱した(Cell Metabolism, 2011)。以上の成果は、半世紀にわたる難題であった GC の副作用～筋萎縮の臨床へ直接展開可能であることが特筆される。しかし、その実現のためには、mTOR 活性化療法の GC 筋萎縮患者に対する有効性の検証(橋渡し研究～臨床試験)、骨格筋における mTOR による GR 機能抑制機構の解明と GR 機能調節法の開発、が必須である。ここで、骨格筋における GC-GR 系と栄養センサー間の相互作用の存在は、骨格筋 GR が代謝制御において未知の役割を有する可能性を強く示唆するものであり、申請者はすでに骨格筋特異的 GR 遺伝子破壊マウスを樹立して基礎検討を開始している。これにより、代謝という多臓器連関に支えられたシステムにおける骨格筋 GC-GR 系の意義を明確にする。

2. 研究の目的

GR 機能制御に関わるエピジェネティック制御因子の同定とかかる因子の機能抑制機構と生理的意義の解明

各種標的臓器における新規 GR 標的遺伝子の機能と生理的意義の解明

mTOR 活性化療法の GC 筋萎縮患者に対する有効性の検証(橋渡し研究～臨床試験)、骨格筋における mTOR による GR 機能抑制機構の解明と GR 機能調節法の開発

代謝という多臓器連関に支えられたシステムにおける骨格筋 GC-GR 系の意義を明確にする。

3. 研究の方法

GR 機能制御に関わるエピゲノム制御因子の同定とかかる因子の機能抑制機構と生理的意義の解明

心筋、骨格筋におけるエピゲノム制御因子を、すでに確立した動物組織・培養細胞由来サンプルからの免疫沈降法(担体として SG ビーズを用いる)質量分析法によって網羅的に同定する。

心筋、骨格筋における新規 GR 標的遺伝子の機能と生理的意義の解明

ChIP-on-ChIP 法を用いて、GR 標的遺伝子を網羅的に同定する

mTOR 活性化療法の GC 筋萎縮患者に対する有効性の検証

骨格筋量制御における GC-GR と mTOR のクロストークの意義と筋萎縮治療標的としての妥当性を明らかにし、proof of principle を得る。

骨格筋における mTOR による GR 機能抑制機構の解明と GR 機能調節法の開発

SG ビーズ、質量分析法を用いて、GR-mTOR 複合体の構成成分を明らかにする。

代謝という多臓器連関に支えられたシステムにおける骨格筋 GC-GR 系の意義を明確にする

申請者は、mGRKO マウスでは糖脂質代謝に様々な変化が生じ、脂肪組織が激減していることに驚かされた。現時点では、血中インスリン・コルチコステロンに両群で差はなく、未知の骨格筋由来因子による作用を想定している。そこで、mGRKO マウスの解析を発展的に推し進め、骨格筋 GR による骨格筋-脂肪組織連関制御を解明する。

4. 研究成果

GR 機能制御に関わるエピジェネティック制御因子の同定とかかる因子の機能抑制機構と生理的意義の解明

GR 機能を mTOR 論文 6 抑制性に制御していることを見出した(論文準備中)。

各種標的臓器における新規 GR 標的遺伝子の機能と生理的意義の解明

骨格筋、心筋において GR の標的遺伝子を多数同定し、その機能を明らかにした。とくに、心筋においてはグルココルチコイドの代謝に与える作用、骨格筋においてはそのタンパク量制御の仕組みの解明と肝臓、脂肪との臓器連関を発見した(論文 2)。

mTOR 活性化療法の GC 筋萎縮患者に対する有効性の検証(橋渡し研究～臨床試験)

骨格筋臨床研究プロトコルを整備した(論文 6)。医師主導型臨床試験を実施し、平成 27 年 2 月に終了した(結果解析中)。

骨格筋における mTOR による GR 機能抑制機構の解明と GR 機能調節法の開発

mTOR-GR の複合体形成に関与するタンパクを質量分析を用いて網羅的に解析し、数種類の候補を得た(論文準備中)。

代謝という多臓器連関に支えられたシステムにおける骨格筋 GC-GR 系の意義を明確にする

骨格筋特異的 GR 遺伝子破壊マウス GRmKO を作成して以下の結果を得た。

- GRmKO では骨格筋量は増大→生体は恒常的に骨格筋の GC 依存性タンパク分解を利用
- GRmKO は脂肪組織縮小(クッシング症候群と対極の表現型)→クッシング症候群の中心性肥満などの病態形成に骨格筋 GC-GR 依存性タンパク分解によるエネルギーフローが重要。
- GRmKO では、骨格筋に由来するアラニンの供給不足により肝臓のグルコース-アラニン回路を介した糖新生低下、PPAR 活性化、FGF21 産生亢進 血中 FGF21 上昇、脂肪細胞における脂肪分解亢進。
- 高アラニン食飼育で GRmKO は脂肪組織重量増加(骨格筋量不変)。野生型マウスへのアラニン拮抗物質 3-クロロア

ラニン投与により肝臓の FGF21 mRNA 発現、血中 FGF21 増加。

- v. 「高アラニン食飼育下の GRmKO」を用いて、FGF21 産生・血中濃度、脂肪量(CTないしDXAで測定)を指標に、抗肥満薬・生活習慣病治療法をスクリーニング可能。

このように、申請者は、骨格筋 GR の役割に焦点を当てた研究から、生理的エネルギーフローの制御に関わる「骨格筋-肝-脂肪ネットワーク」を発見し、GC 作用の解明に新展開をもたらした(論文2)

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 8 件)

- 1 Tomoki Katayose; Satoshi Iwata; Naoki Oyaizu; Osamu Hosono; Taketo Yamada; Nam H Dang; Ryo Hatano; Hirotohi Tanaka; Kei Ohnuma; Chikao Morimoto
The Role of Cas-L/NEDD9 as a Regulator of Collagen-induced Arthritis in a Murine Model
Biochem Biophys Res Commun. In press.
- 2 Shimizu N, Maruyama T, Yoshikawa N, Matsumiya R, Ma Y, Ito N, Tasaka Y, Kuribara-Souta A, Miyata K, Oike Y, Berger S, Schütz G, Takeda S, Tanaka H. A Muscle-liver-fat signaling axis is essential for central control of adaptive adipose remodeling.
Nat Commun. 6,6693. doi:10.1038/ncomms7693
- 3 Matsumiya R, Hosono O, Yoshikawa N, Uehara M, Kobayashi H, Oda A, Matsubara E, Tanada S, Shintani Y, Nagayama K, Nakajima J, Tanaka H. A case with elevated serum IgG4 complicated by pericardial involvement with patchy ¹⁸F-FDG uptake in PET/CT – atypical presentation of IgG4-related disease?
Internal Med. In press
- 4 Yoshikawa N, Shimizu N, Ojima H, Kobayashi H, Hosono O, and Tanaka H. Down-regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor by HEXIM1 attenuates myocardial angiogenesis in hypoxic mice.
Biochem Biophys Res Commun. 2014;453(3):600-5.
- 5 Miyake Y, Tanaka K, Nishikawa T, Naruse M, Takayanagi R, Sasano H, Takeda Y, Shibata H, Sone M, Satoh F, Yamada M, Ueshiba H, Katabami T,

Iwasaki Y, Tanaka H, Tanahashi Y, Suzuki S, Hasegawa T, Katsumata N, Tajima T, Yanase T.

Prognosis of primary aldosteronism in Japan: results from a nationwide epidemiological study.

Endocr J. 61(1) : 35-40, 2014.

- 6 Hosono O, Yoshikawa N (equal first authors), Shimizu N, Uehara M, Kobayashi H, Matsumiya R, Kuribara A, Maruyama T, Tanaka H

Quantitative analysis of skeletal muscle mass in patients with rheumatic diseases under glucocorticoid therapy - comparison among bioelectrical impedance analysis, computed tomography, and magnetic resonance imaging.

Mod Rheumatol. 2015;25(2) :257-63

- 7 Yoshikawa N, Shimizu N, 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. 2012;7(12):e52522. doi: 10.1371/journal.pone.0052522.

- 8 Kondo S, Iwata S, Yamada T, Inoue Y, Ichihara H, Kichikawa Y, Katayose T, Souta-Kuribara A, Yamazaki H, Hosono O, Kawasaki H, Tanaka H, Hayashi Y, Sakamoto M, Kamiya K, Dang NH, and Morimoto C.

Impact of the integrin signaling adaptor protein NEDD9 on prognosis and metastatic behavior of human lung cancer.

Clin. Cancer Res., 2012;18(22):6326-38. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2162.

[学会発表](計 18 件)

1. 田中廣壽. これからのリウマチ膠原病診療とステロイド(特別講演). リウマチ地域連携研究会, 岡山, 2015.2
2. 田中廣壽. ステロイドの作用機序、使い方(特別講演). 第12回東京小児感染免疫懇話会, 東京, 2015.2
3. 田中廣壽. アミノ酸のチカラ ~ 骨格筋量と生体エネルギー代謝における役割を中心に~(特別講演). 第354回大阪大学臨床栄養研究会(CNC)・第45回大阪小児先進医療研究会セミナー, 大阪, 2015.2

4. 田中廣壽. ソリューション型研究とその橋渡し(特別講演). 第2回東京 GIO 研究会, 東京, 2015.1
5. 田中廣壽. リウマチ膠原病領域の最近の話題～ソリューション型研究とその橋渡し～(特別講演). 埼玉リウマチ膠原病を学ぶ会, 東京, 2014.11
6. 田中廣壽. ステロイドの使い方と副作用の対策～最近の話題を中心に～(特別講演). 第9回順天堂眼アレルギー研究会, 東京, 2014.9
7. 田中廣壽. 膠原病診療に関する最近の話題(特別講演). 第224回与謝医師会学術講演会, 宮津, 2014.9
8. 田中廣壽. いま骨格筋研究がおもしろい～ステロイドによる筋萎縮の分子機構解明とその仕組みの驚くべき生理的意義!～(特別講演). 第4回膠原病・リウマチセミナー in Kyoto, 京都, 2014.7
9. 田中廣壽. ステロイドと骨格筋代謝(特別講演). 第32回先進リウマチ医学研究会, 東京, 2014.6.
10. 田中廣壽. 骨格筋研究とその将来展望-ステロイド筋症を中心に(招待講演). 大塚製薬探索研セミナー, 徳島, 2013.11
11. 田中廣壽. 骨格筋研究とその将来展望-ステロイド筋症を中心に(招待講演). 第20回徳島骨代謝研究会, 徳島, 2013.11
12. 田中廣壽. これからのリウマチ膠原病診療とステロイド(特別講演). 第30回城南リウマチ研究会, 東京, 2013.11
13. 田中廣壽. 骨格筋研究の新展開(特別講演). 第25回神奈川腎懇話会(KKC), 横浜, 2013.9
14. 田中廣壽. ステロイド筋症-基礎と臨床(特別講演). 第5回筋炎ワークショップ, 東京, 2013.9
15. 田中廣壽. 骨格筋研究の新展開(特別講演). 第10回 Metabolic Syndrome Forum in Tokyo, 東京, 2013.7
16. 田中廣壽. 膠原病の難治性病態の克服とステロイド療法の革新に向けた取り組み(特別講演). 明石町リウマチ連携セミナー, 東京, 2013.5
17. 田中廣壽. リウマチ膠原病医によ

る核内受容体研究-膠原病の難治性病態の克服とステロイド療法の革新に向けた取り組み-(特別講演). 第5回核内受容体・ホルモン研究会, 東京, 2013.3

18. 田中廣壽. リウマチ膠原病治療とステロイド(特別講演). 大橋リウマチカンファレンス, 東京, 2013.1

〔図書〕(計14件)

1. 田中廣壽、清水宣明
筋肉とアミノ酸のチカラ - 骨格筋におけるタンパク質合成、分解の制御機構 40-45
【驚愕の代謝システム メタボロームの階層から解き明かす疾患研究の新たなステージ】(第1章)“思ってもみない”代謝制御ループ 生理からみる代謝制御ループ 筋肉とアミノ酸のチカラ 骨格筋におけるタンパク質合成、分解の制御機構 実験医学(編集:末松誠、杉浦悠毅)
羊土社、2014.9.
2. 田中廣壽
ステロイドの副作用と対策 835-837
今日の治療指針 2015年版(総編集:福井次矢、高木誠、小室一成)
医学書院、2015.1.
3. 田中廣壽
ステロイド投与の心得 2-6
一冊でわかるステロイド診療ガイド(編集:田中廣壽、宮地良樹、上田裕一、郡義明、服部隆一)
文光堂、2015.3.
4. 清水宣明、田中廣壽
ステロイドの作用機構 7-12
一冊でわかるステロイド診療ガイド(編集:田中廣壽、宮地良樹、上田裕一、郡義明、服部隆一)
文光堂、2015.3.
5. 細野治
妊娠時、授乳中 投与するときの注意 34-39
一冊でわかるステロイド診療ガイド(編集:田中廣壽、宮地良樹、上田裕一、郡義明、服部隆一)
文光堂、2015.3.
6. 細野治
高齢者に投与するときの注意 44-49
一冊でわかるステロイド診療ガイド(編集:田中廣壽、宮地良樹、上田裕一、郡義明、服部隆一)
文光堂、2015.3.
7. 小林弘

脂質代謝異常とその対策 178-183
一冊できわめるステロイド診療ガイド(編集:田中廣壽、宮地良樹、上田裕一、郡義明、服部隆一)
文光堂、2015.3.

8. 上原昌晃
消化管・肝障害とその対策 189-194
一冊できわめるステロイド診療ガイド(編集:田中廣壽、宮地良樹、上田裕一、郡義明、服部隆一)
文光堂、2015.3.

9. 松宮遼
ミオパチーとその対策 200-203
一冊できわめるステロイド診療ガイド(編集:田中廣壽、宮地良樹、上田裕一、郡義明、服部隆一)
文光堂、2015.3.

10. 吉川賢忠
(ア) 血液学的異常とその対策 207-209
(イ) 一冊できわめるステロイド診療ガイド(編集:田中廣壽、宮地良樹、上田裕一、郡義明、服部隆一)
(ウ) 文光堂、2015.3.

11. 吉川賢忠
(ア) ステロイド注射剤 264-268
(イ) 一冊できわめるステロイド診療ガイド(編集:田中廣壽、宮地良樹、上田裕一、郡義明、服部隆一)
文光堂、2015.3.

12. 吉川賢忠、田中廣壽
RAにおけるステロイドの功罪と新規ステロイド剤の開発への期待・218-228
リウマチ科(0915-227X)51巻2号
2014年2月

13. 松宮遼、清水宣明、吉川賢忠、丸山崇子、田中廣壽
[リウマチ性疾患にみられる筋病変と合併症]ステロイドミオパチーの診断と治療・463-470
リウマチ科(0915-227X)49巻4号
2013年4月

14. 田中廣壽、細野治、小林弘、吉川賢忠、松宮遼
[関節リウマチ - ケアからキュアを目指した治療]薬物治療とその留意点 ステロイド・1261-1265
日本臨床(0047-1852)71巻7号
2013年7月

[産業財産権]
出願状況(計 1件)

名称:代謝調節物質のスクリーニング法
発明者:田中廣壽、清水宣明
権利者:田中廣壽、清水宣明
種類:特許 2014-247262
番号:
出願年月日:2014年12月5日
国内外の別:国内

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ:

6. 研究組織
(1)研究代表者
田中 廣壽(TANAKA HIROTOSHI)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号:00171794

(2)研究分担者
なし()
研究者番号:

(3)連携研究者
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

吉川 賢忠(YOSHIKAWA NORITADA)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号:70396878