

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06412

研究課題名(和文) イヌの新規グルココルチコイド受容体スプライシングバリエーションの探索と機能解析

研究課題名(英文) Detection and functional analysis of novel canine glucocorticoid receptor splicing variants

研究代表者

松田 彬 (Matsuda, Akira)

岡山理科大学・獣医学部・准教授

研究者番号：90613969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではイヌにおいて7種類のグルココルチコイド受容体スプライシングバリエーションがmRNAレベルで存在することを明らかにした。そのうち少なくとも5種類については蛋白質レベルでもその存在が確認でき、更にそのうち2種類については細胞のグルココルチコイド感受性を変化させることを明らかにした。本研究成果を利用することでイヌの様々な疾患におけるグルココルチコイド感受性増強法の開発が進む可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルココルチコイドは抗炎症効果、免疫抑制効果、抗腫瘍効果などを持つが、長期間の使用では重大な副作用が発現するリスクがある。本研究ではイヌにおいてグルココルチコイド受容体に複数種類のスプライシングバリエーションが存在することを発見し、その機能の一部も明らかにすることができた。これまでイヌではその存在が知られていなかったスプライシングバリエーションであり、比較生物学上の重要な発見であると考えられる。また本研究成果を利用することでイヌの様々な疾患におけるグルココルチコイド感受性増強法の開発が進む可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, 7 canine glucocorticoid receptor splicing variants were detected at mRNA level. The 2 of them changed the sensitivity to glucocorticoid of canine mast cell tumor cells. The results of this study could promote researches on restoration of therapeutic sensitivity to glucocorticoids.

研究分野：獣医学

キーワード：グルココルチコイド グルココルチコイド受容体 スプライシングバリエーション 薬剤耐性 イヌ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グルココルチコイド製剤は強い消炎効果および免疫抑制効果を持ち、長年にわたり多くのアレルギー性疾患、自己免疫性疾患、腫瘍性疾患などに使用されてきた。一方、高用量投与や長期投与は易感染性、糖尿病、骨粗しょう症、白内障などの副作用発現の危険性を伴う。そのため段階的な減薬や休薬が望ましい。ヒト医療では疾患ごとにガイドラインが定められ、動物医療でもイヌにおける最大年間使用量が考案されている。しかし実際には目標とする減薬および休薬を達成することは難しく、標的組織における薬効を維持したままでの減薬を可能とする「グルココルチコイド感受性増強法」の確立が臨床現場で強く望まれている。

グルココルチコイドの効果は転写因子であるグルココルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor, GR) を介した遺伝子発現調節によるが、その詳細なメカニズムは不明なままに使用されてきた。グルココルチコイド感受性増強法の確立のためには GR シグナル経路の理解が不可欠である。近年その分子メカニズムを解明しようという機運が国内外で高まり、発表論文数も年々増加していることから、グルココルチコイドは古くて新しい研究対象といえる。

ヒトの GR には選択的スプライシングにより mRNA レベルで少なくとも 5 種類のスプライシングバリエーション (GR₁、GR₂、GR₃、GR-A、GR-P) が存在し、また翻訳開始位置によりタンパク質レベルではさらに細かく分類されることが報告されている。GR₁ が基本形であり通常は細胞質に存在するが、グルココルチコイドが結合すると核内へ移動し、DNA に結合して遺伝子発現を調節する。GR₂ 以外のスプライシングバリエーションはそれぞれグルココルチコイドへの結合性が異なるが、特に GR₃ はグルココルチコイドへ結合せず、GR₁ の機能を競合拮抗することが知られている。*in vitro* 研究および臨床研究で GR₃ の過剰発現がグルココルチコイド耐性を引き起こしている可能性が示唆されており、GR スプライシングバリエーションの学術的・臨床的意義は年々重要視されるようになってきた。

GR スプライシングバリエーションの発現比を変えることができれば、グルココルチコイド感受性を調節できる可能性が高いが、イヌでは GR スプライシングバリエーションの報告がなく、ヒト GR に相当するものが存在するかどうかを検証する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、イヌにおいてもヒトと同様に GR スプライシングバリエーションが存在し、その発現比の変化によって細胞のグルココルチコイド感受性が変化するという仮説を立てた。本研究の目的は、以下の 2 つを明らかにすることである。

- (1) イヌ GR にスプライシングバリエーションは存在するか
- (2) イヌ GR スプライシングバリエーションは通常型 GR の機能に影響を及ぼし、細胞のグルココルチコイド感受性を変化させるか

3. 研究の方法

(1) 新規イヌ GR スプライシングバリエーションの検出

代表的なイヌ由来細胞株である MDCK 細胞の total RNA を抽出し、RT-PCR によって cDNA を得た。過去の研究においてヒトとマウスでは GR スプライシングバリエーションの構造が大きく異なり、マウスではイントロン保持型のスプライシングバリエーション (マウス GR₃) が存在すると報告されている。そこでまずヒト GR₁ と同様のスプライシングバリエーションが存在するかどうかを検証するため、ヒト GR₁ から予測した塩基配列に対応するプライマーを用いて PCR を行った。次にマウス GR₃ と同様のイントロン保持型イヌ GR の第 1 エクソンに対応するプライマーおよび第 1 ~ 第 7 イントロンに対応するプライマーを用いて PCR を行った。

(2) 新規イヌ GR スプライシングバリエーションの塩基配列解析

検出した新規イヌ GR スプライシングバリエーションについて、高正確 PCR を行った後に制限酵素処理およびライゲーション処理を施してプラスミドベクターに挿入した。その後コンピテントセルの形質転換に使用し、コンピテントセルを培養した後に DNA を抽出した。抽出 DNA についてサンガーシーケンシングによる塩基配列解析を行った。

(3) 新規イヌ GR スプライシングバリエーションの遺伝子導入と検出

新規イヌ GR スプライシングバリエーションを動物細胞発現プラスミドに組み替えた。GR を発現していないことが知られている COS-7 細胞にエレクトロポレーション法により遺伝子導入を行い、6 時間後および 24 時間後にそれぞれ RNA と蛋白質を抽出した。RNA は RT-PCR を行った後に PCR にて、タンパク質はウェスタンブロット法にて解析を行った。

(4) 新規イヌ GR スプライシングバリエーションの機能解析

新規イヌ GR スプライシングバリエーションをグルココルチコイド高感受性であるイヌ肥満細胞腫細胞 (BR 細胞) にエレクトロポレーション法にて導入し、MTS 法により細胞増殖に及ぼす影響について検証した。

(5) イヌ肥満細胞腫のグルココルチコイド感受性との関連性

申請者が樹立したグルココルチコイド耐性細胞株である BR/DeR、MPT-1.1/DeR、MPT-3/DeR と、それぞれの親細胞株である BR、MPT-1.1、MPT-3 において新規イヌ GR スプライシングバリエーションの発現比を比較し、臨床的意義について検証した。

4. 研究成果

(1) 新規イヌ GR スプライシングバリエーションの検出

ヒト GR から予測したプライマーを用いて PCR を行い新規スプライシングの検出を試みたところ、予想されたバンドは検出されなかった。一方、マウス GR から予測したプライマーを用いた PCR では予想されたバンドが検出され、計 7 種類の新規イヌ GR スプライシングバリエーション (~) の存在が強く示唆された。これらのスプライシングバリエーションは開始コドンから通常の GR と同じエクソンが連結しているが、それぞれ第 1~第 7 イントロンを含むことが予想された。すべてのイントロンには終止コドンが含まれるため、通常のイヌ GR よりも短い蛋白質が産生されると予想された。

(2) 新規イヌ GR スプライシングバリエーションの塩基配列解析

新しく検出したイヌ GR スプライシングバリエーションについて、コンピテントセルを用いたクローニング後に塩基配列解析を行った。その結果、7 種類のスプライシングバリエーションすべてにおいて予想通り、各イントロン内に存在する終止コドンを含んでいることが判明した。

(3) 新規イヌ GR スプライシングバリエーションの遺伝子導入と検出

エレクトロポレーションを用いて新規イヌ GR スプライシングバリエーションを COS-7 細胞にそれぞれ遺伝子導入した。その結果、PCR では 7 種類 (新規イヌ GR スプライシングバリエーション ~) で、ウェスタンブロット法では 5 種類 (新規イヌ GR スプライシングバリエーション ~) で予想通りの位置にバンドが確認できた。これにより、新規イヌ GR スプライシングバリエーションはイントロンを含み、その中の終止コドンによって翻訳が止まり短い GR が産生されていると考えられた。ウェスタンブロット法で検出できなかった新規イヌ GR スプライシングバリエーションは抗体の認識部位の欠落によると考えられた。

(4) 新規イヌ GR スプライシングバリエーションの機能解析

各スプライシングバリエーションを BR 細胞にエレクトロポレーション法にて導入し、MTS 法により細胞増殖を測定したところ、新規イヌ GR スプライシングバリエーション および の過剰発現によりグルココルチコイドによる細胞増殖抑制効果が有意に減弱した。これは正常 GR からリガンド (グルココルチコイド) 結合部位が欠落したためにドミナントネガティブに機能したためと考えられた。

(5) イヌ肥満細胞腫のグルココルチコイド感受性との関連性

申請者が樹立したグルココルチコイド耐性細胞株である BR/DeR、MPT-1.1/DeR、MPT-3/DeR と、それぞれの親細胞株である BR、MPT-1.1、MPT-3 において新規イヌ GR スプライシングバリエーション および の発現比を比較したが、有意な変化は認められなかった。これらの細胞株は実験的に作成したグルココルチコイド耐性株であり、その耐性化メカニズムには新規イヌ GR スプライシングバリエーションは関連していなかった可能性がある。

本研究で得られた成果により、イヌにおいてもヒトやマウス同様に GR のスプライシングバリエーションが存在することが明らかになった。さらに、その発現比によって細胞のグルココルチコイド感受性に変化が生じる可能性が高いと考えられた。本研究成果はイヌの様々な疾患におけるグルココルチコイド感受性予測法やグルココルチコイド感受性増強法の開発などに有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuda Akira	4. 巻 -
2. 論文標題 Long-term in vitro glucocorticoid treatment induces glucocorticoid resistance in canine mast cell tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuda Akira, Mitsui Ikki, Shimizu Yuki, Kanda Teppei, Ohnishi Akihiro, Miyabe Masahiro, Itoh Yoshiki	4. 巻 82
2. 論文標題 Establishment and characterization of a canine sebaceous epithelial cell line derived from an eyelid mass	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1577 ~ 1584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.20-0179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuda Akira, Mitsui Ikki, Shimizu Yuki, Kanda Teppei, Ohnishi Akihiro, Miyabe Masahiro, Itoh Yoshiki	4. 巻 -
2. 論文標題 Establishment of a canine lens epithelial cell line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuda Akira, Hata Akihisa, Tanaka Akane, Matsuda Hiroshi	4. 巻 137
2. 論文標題 Canine mast cell tumour cells regulate tryptophan catabolism via the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Research in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 159 ~ 162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rvsc.2021.04.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa Sho, Meguri Natsuko, Koura Kazue, Koura Hiroyuki, Matsuda Akira	4. 巻 8
2. 論文標題 A Case of Canine Polyglandular Deficiency Syndrome with Diabetes Mellitus and Hypoadrenocorticism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary Sciences	6. 最初と最後の頁 43～43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vetsci8030043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松田彬
2. 発表標題 グルココルチコイド耐性をもつイヌ肥満細胞腫細胞株の作製
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関