

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790657

研究課題名 (和文) 心筋におけるグルココルチコイド作用機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of glucocorticoid hormone action in cardiac myocytes

研究代表者

吉川 賢忠 (YOSHIKAWA NORITADA)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70396878

研究成果の概要 (和文)：

心筋におけるグルココルチコイド (GC) 作用を、GC 受容体 (GR) とその標的遺伝子を基軸として詳細に究明し、その生理学的意義を明らかにすることを目的とした。心筋細胞における GC-GR 特異的標的遺伝子群を明らかにし、GR が心筋代謝調節のカギ分子であることを見いだした。特に、GR は転写因子 KLF15 の遺伝子発現を誘導し、心筋のアミノ酸代謝を制御することを明らかにした。また、心筋において GC はシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2)、フォスホオリパーゼ A2 (PLA2)、プロスタグランジン D2 合成酵素発現を協調的に誘導してプロスタグランジン D2 合成を促進させ、例えば虚血再還流後心筋障害に対し保護的に作用することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

To particularly define the role of glucocorticoid (GC)-GC receptor (GR) signaling in cardiac muscle cells, we applied a ligand-based approach involving the GR-specific agonist cortivazol (CVZ) and the GR antagonist RU-486 and performed microarray analysis using rat neonatal cardiomyocytes. Expression profiles of those genes highlighted numerous roles of glucocorticoids in various aspects of cardiac physiology, especially, cardiac metabolism. At first, we identified that glucocorticoids, via GR, induce mRNA and protein expression of a transcription factor Kruppel-like factor 15 and its downstream target genes. Moreover, we revealed that GC-GR-KLF15 axis modulates cellular branched-chain amino acid concentrations in cardiomyocytes. Second, GC-GR signaling promoted gene expression of the enzymes involved in the prostaglandin biosynthesis, including cyclooxygenase-2, phospholipase A2, and Lipocalin-type prostaglandin D synthase in cardiomyocytes. In the heart, PGD2 was the most prominently induced prostaglandin after exposure to CVZ and protected against cell death induced by anoxia/reoxygenation via the D-type prostanoid receptor and the ERK1/2-mediated pathway. Together, we may conclude that GR signaling should have distinct roles for maintenance of cardiac function, for example, in amino acid catabolism and prostaglandin biosynthesis in the heart.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌学

1. 研究開始当初の背景

グルココルチコイド (GC) は生体機能調節に必須の副腎皮質ステロイドホルモンであり、ほぼ全身の細胞に存在する GC 受容体 (GR) を介して標的遺伝子の発現を制御してその作用を発現する。近年、臓器あるいは組織特異的 GR ノックアウトマウスの解析が精力的にすすめられているが、いまだに多くの組織・臓器における GC-GR システムの作用機構は不明である。また、GC は、炎症性・自己免疫性疾患治療薬として汎用されているが、GC の副作用はいまだに克服されておらず、その原因遺伝子すら未同定であり、その作用機構の本質的解明が望まれている。

心臓において GC はエネルギー代謝調節に関与するとされ、一方で GC 過剰は冠状動脈硬化、心筋肥大、心筋症を惹起し、心不全の独立した危険因子とも考えられている。ここで、心筋には GR のみならずミネラルコルチコイド (MC) 受容体 (MR) が発現し、GC-GR、MC-MR システム間には作用の redundancy が存在すること、GR、MR のノックアウトマウスがいずれも生後まもなく死亡してしまうこと、などから、心筋における GC-GR 作用機構の解明は遅れていた。近年、MR 拮抗薬が心不全改善に有効であるという大規模臨床解析の結果が報告され内在性 GC の拮抗作用との関連も示唆されている。また、心筋特異的な GR トランスジェニックマウスでは房室ブロックが観察されるなど、心筋における GC-GR システムはいっそうの注目を集めており、その解明は生物学的のみならず臨床医学的にも重要な課題といえる。

2. 研究の目的

心筋における GC-GR の標的遺伝子を MC-MR システムと対比して網羅的に解析し、その制御機構を解明して、心筋における GC-GR 作用機構の意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラット初代心筋培養細胞をコルチバザール (CVZ, GR 選択的アゴニスト)、コルチコステロン (COR, 内因性 GC)、アルドステロン (ALD, 内因性 MC)、RU486 (RU, GR 選択的アンタゴニスト) を用いて、各々単独処理あるいは RU と共処理し、各細胞より全 RNA を調製し、DNA microarray 解析を行った。

遺伝子発現が有意に変化した遺伝子については、定量的 PCR で追試し、Gene Ontology による機能別、リガンド処理カテゴリー別に分類した。抽出した遺伝子について、アデノウイルスによる FLAG タグ付き GR、MR の過剰発現系、siRNA 発現系を用いて、GR、MR いずれを介した経路かを明確化した。GC-GR 系により発現が制御される遺伝子に関してはそのタンパク質発現の変化をウェスタンブロット法により解析した。

(2) (1) で同定した遺伝子のうち GC-GR 系によってその発現が制御される遺伝子について、アデノウイルスによる過剰発現系、siRNA によるノックダウン系を構築した。

(3) 心筋細胞のアミノ酸代謝、プロスタグランジン代謝に与える影響を LC-MS/MS、ELISA 法によるアミノ酸濃度測定、プロスタグランジン濃度測定により解析した。

(4) 野生型あるいは遺伝子改変マウス由来のランゲンドルフ灌流心における虚血再灌流心筋障害に与える GC の影響を超音波検査により、培養心筋細胞における細胞死に与える影響を細胞生存率蛍光アッセイにより解析した。

(5) 各種蛋白質リン酸化に与える影響をウェスタンブロット法により解析した。

4. 研究成果

(1) GR 選択的拮抗薬 RU486 と GR 選択的アゴニスト コルチバザール、GR 発現調節系を組み合わせ、高効率に GC-GR 制御系に選択的な標的遺伝子を抽出するシステムを確立し、心筋細胞における GC-GR 特異的標的遺伝子群を明らかにした。特に、GR は心筋代謝制御に重要な転写因子や各種酵素群の遺伝子発現を誘導していることが明らかになった (図 1)。

(2) GC-GR は心筋細胞肥大制御や肝糖新生に重要な転写因子 KLF15 の遺伝子発現を誘導し、KLF15 の標的遺伝子である分枝鎖アミノ酸転移酵素 BCATm の発現などを促進することにより、心筋のアミノ酸代謝を制御することを明らかにした (図 2)。

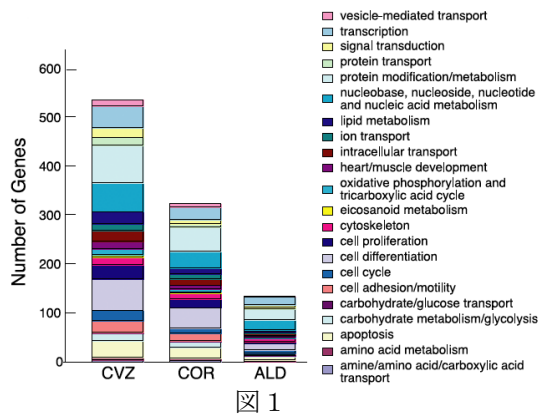


図 1

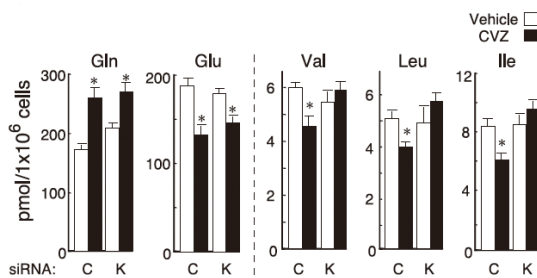


図 2 (si RNA C, Control; K, KLF15)

(3) GC の抗炎症作用の一部は GR によるシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2)、フォスホリパーゼ A2 (PLA2) の遺伝子発現抑制であるが、心筋細胞では GR はこれらの遺伝子発現をむしろ誘導することを明らかにした。さらに、心筋において GR は COX-2、PLA2、プロスタグランジン D 合成酵素の遺伝子発現を協調的に誘導し、プロスタグランジン D2 合成を促進することを明らかにした (図 3)。

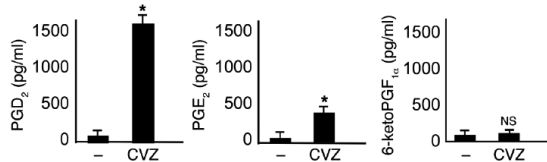


図 3

(4) GC は虚血再灌流後心筋障害に対して保護的に作用し、その作用は GR 拮抗薬、COX-2 阻害剤あるいはプロスタグランジン D 合成酵素のノックアウトにより消失したことから、GC-GR 制御系は PG 合成酵素代謝の調節により心筋細胞保護に働いている可能性が示された (図 4)。

(5) GC は Erk1/2 の活性化、心筋細胞のアポトーシス抑制などを介して虚血再灌流後心筋障害に対し保護的に作用することを明らかにした (図 5)。

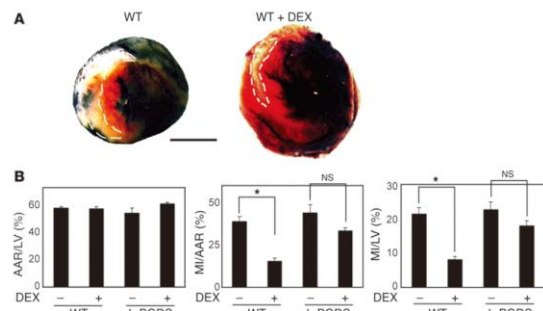


図 4

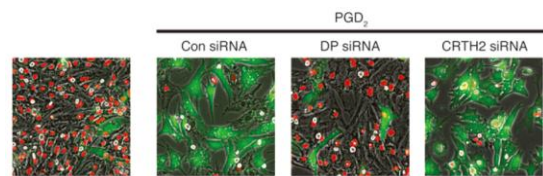


図 5 (DP, D-type prostanoid receptor)

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)

(1) Glucocorticoid protects rodent hearts from ischemia/reperfusion injury by activating lipocalin-type prostaglandin D synthase-derived PGD2 biosynthesis.

Tokudome S, Sano M, Shinmura K, Matsuhashi 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, Urade Y, Asano K, Utsunomiya Y, Suzuki T, Taguchi R, Tanaka H, Fukuda K.

J Clin Invest. 2009 Jun;119(6):1477-88.

(2) Ligand-based gene expression profiling reveals novel roles of glucocorticoid receptor in cardiac metabolism.

Yoshikawa N, Nagasaki M, Sano M, Tokudome S, Ueno K, Shimizu N, Imoto S, Miyano S, Suematsu M, Fukuda K, Morimoto C, Tanaka H.

Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 Jun;296(6):E1363-73.

[学会発表] (計 3 件)

(1) Ligand-based gene expression profiling reveals novel roles of glucocorticoid receptor in the cardiomyocytes.

14th International Congress of Endocrinology.

吉川賢忠、清水宣明、森本幾夫、田中廣壽、平成22年3月30日、東京

(2) 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制御する

吉川賢忠、清水宣明、森本幾夫、田中廣壽、
日本ステロイドホルモン学会、平成 21 年 11
月 14 日、福岡

(3) HEXIM1 はグルココルチコイド受容体
(GR) の hinge (D) 領域に選択的に結合し
て GR の転写活性を抑制する

吉川賢忠、清水宣明、森本幾夫、田中廣壽、
日本内分泌学会、平成 21 年 4 月 25 日、前橋

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉川 賢忠 (YOSHIKAWA NORITADA)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70396878

(2)研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3)連携研究者

無し ()

研究者番号：