

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390285

研究課題名（和文）ゲノムワイドアプローチによる新しいグルココルチコイド作用の探索

研究課題名（英文）Exploration of novel glucocorticoid action via genome-wide approach

研究代表者

田中廣壽（TANAKA HIROTOSHI）

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：00171794

研究成果の概要（和文）：グルココルチコイド（以下 GC と略称）は膠原病、関節リウマチなど炎症性疾患をはじめとした様々な疾患の重要な治療薬である。しかし、薬理量投与時には多くの副作用が合併し、臨床的に大きな問題となることも少なくない。また、生理的な意義に関しても、とくに各臓器における標的遺伝子や役割は不明のままであった。本研究では、高効率的な GR 標的遺伝子探索法を開発し、心筋、骨格筋においてゲノムワイドの解析を行った。とくに骨格筋においては、新たな標的遺伝子 KLF15 と REDD1 を同定して、GC による筋萎縮の分子機構解明に寄与した。さらに、各組織特異的 GR 遺伝子破壊マウスを作成し、これらの臓器における GR の役割を明確にした。かかるアプローチにより、GC-GR 系の生体機能調節における意義を明らかできると考える。

研究成果の概要（英文）：

Adrenal glucocorticoids produce their hormone actions via a signal pathway involving ubiquitously expressed glucocorticoid receptor (GR), a prototypic member of the nuclear receptor superfamily, which acts as a ligand-dependent transcription factor. Upon binding glucocorticoids, GR translocates into the nucleus and binds the glucocorticoid response element (GRE) on the target gene promoters. Binding of liganded receptors with target DNA is followed by recruitment of mediators and coactivators to the proximity of the target DNA, resulting in RNA polymerase II (RNAPII) recruitment nearby transcription start sites and activation of transcription. In skeletal muscle, glucocorticoids elicit a variety of biological actions in metabolism of glucose, lipids, and proteins and contribute to metabolic homeostasis. On the other hand, glucocorticoids are used as a key drug for treatment of, for example, inflammatory disorders, hematologic malignancies, and allergic diseases, and prolonged oversecretion or exogenous administration of glucocorticoid drug gives rise to undesirable effects including muscle atrophy. given this, we decided to explore GR target gene via genome wide approach, especially in skeletal and cardiac muscles

In skeletal muscle, we confirmed that KLF15 and REDD1 are direct target genes of GR, playing important roles in mTOR inhibition and muscle atrophy via distinct pathways. Together with the results with cardiac muscles, we think that our genome wide approach will clarify the biological significance of GC-GR system and contribute to further understanding of human physiology and development of GC therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	3,200,000	96,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：内科学

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, 代謝学, 副腎皮質, 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイド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や恒常性維持に必須である。一方、GCは炎症性・自己免疫性疾患などの治療薬としても現在もなお重要な位置を占めている。1985年のグルココルチコイドレセプターGRのcDNA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が、GC作用の本質的理解にはほど遠く、クッシング症候群や薬理量GC投与時にはGC作用過剰が臨床的に問題となり、今もなおその根本的解決法は確立されていない。GRは核内レセプターの一つであり、リガンド依存性転写因子として標的遺伝子の発現を転写レベルで調節する。GRは1種類ですべての組織に発現しているゆえ、その多彩な作用の基盤は標的遺伝子発現の組織特異的制御にあることは論をまたない。しかし、GC作用を規定する組織側の因子、GRによる組織特異的遺伝子発現調節機構に焦点をあてた取り組みは十分ではなく、GC作用機構と副作用を含めた生体機能調節におけるその役割の詳細はいまだに不明である。

従来、GC内分泌学、臨床の主体は『ホルモン産生・作用の過剰/欠乏』であったが、最近、GCの『生理的濃度域にける生理機能や疾患病態への密接な関与』が再認識されつつある。たとえば、肝臓特異的GR遺伝子破壊(Cell Metab. 2008;8:212など)、肝臓選択的GR拮抗薬(Metabolism 2007 ;56:380)、により、耐糖能異常や脂肪肝が改善される。リンパ球や骨髄球系細胞においては、GR遺伝子破壊によってT細胞レセプター刺激やリポ多糖刺激により致死の炎症を発症する(Nat Med. 2003 ;9:1318、Blood 2007;109:4313)。また、敗血症時の骨格筋萎縮はGR拮抗薬によって改善する(Am.J.Physiol. 2006 ;290:R963)。このように、GC-GR系が多く of 生体機能調節機構の基盤的構成装置として重要な役割を果たし、

ある種の病態では治療標的にもなりうることは注目に値する。しかし、かかる視点からGCの役割に焦点をあてて新しい作用や役割を系統的に探索する取り組みは国内外においてまったくなされていない。

核内レセプター研究に関して、申請者はこれまでにGR、ミネラルコルチコイドレセプターMRの新たな機能調節機構の発見など多くの実績をあげている(Nature Med., 2011、など多数)。そして、独自に開発・確立した、GR超選択的リガンド(J.Biol.Chem., 2002 & Mol. Endocrinol., 2005)、GC-GR系の標的遺伝子をゲノムワイドにかつ高効率に同定する手法(Am.J.Physiol., 2009 & J.Clin.Invest., 2009)やCre-loxPアデノウイルスベクターを用いたGRあるいはGR siRNA組織特異的発現系(Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2005)、GR・RNA polymerase IIのクロマチン免疫沈降法(ChIP アッセイ)(Mol. Endocrinol., 2008)を用いてGR標的遺伝子を系統的に探索するとともにそれらの機能を解析し、GCの新たな役割の発見に成功した。たとえば、GCの抗炎症作用機構としてCOX-2遺伝子発現抑制は周知である。しかし、心筋においては、GCはGRを介してPLA2、COX-2、PGD合成酵素のmRNA発現を転写レベルで誘導し、PGD2産生を介して心筋保護的に働く(J.Clin.Invest., 2009)。この発見は同一遺伝子に対するGC作用にも組織差が存在することを証明した点でもGC内分泌学の既成概念を超えた、先駆的成果といえる。しかし、COX-2遺伝子のかかる組織特異的制御機構は未解明のままであり、臨床的意義の究明や治療法開発への展開を考える際には重要な検討課題である。また、肝臓と骨格筋、腎臓を比較した際、多くの遺伝子がGC-GR系によって各組織特異的な発現制御を受け、複数の代謝経路を合目的臓器相関に基づいて精緻に制御している実態も明らかになりつつある。すなわち、糖代謝に関して、GC-GR系は肝臓ではPGC-1などの共役因子とともに

に糖新生関連酵素の遺伝子発現を正に制御するが転写因子 Kruppel-like-factor15 (KLF15)の mRNA 発現は誘導しない。一方で、骨格筋においては GC-GR 系は KLF15 の mRNA 発現を転写レベルで強く誘導し、その標的遺伝子である分岐鎖アミノ酸アシル基転移酵素(BCAT2)、グルコース輸送担体 (GLUT4)などの発現増加を介してアミノ酸異化→アラニン産生の経路を増強する。これは GC の骨格筋萎縮作用に関連する新たな異化作用機構の存在を示すとともに、GC の糖新生作用の基盤に骨格筋のグルコース-アラニン回路による肝臓へのアラニン供給系の関与を示唆するものといえる (Am. J. Physiol., 2009)。ごく最近、飢餓時の血糖維持においてかかる KLF15 の役割が立証され (Cell Metab. 2007;5:305)、申請者らが見いだした骨格筋の GR-KLF15 軸が糖代謝異常治療法開発の新たな標的となりうる事が強く示唆される。その意味でも、今後、GR による KLF15 遺伝子の骨格筋特異的発現誘導機構の解明が待たれる。これらの研究結果は、申請者が蓄積してきた技術、方法論を結集した体系的アプローチが GC-GR 系の新しい役割を探索する上での確度かつ実効性を有することを実証するものである。その応用展開にあたっては、各々の標的遺伝子に関して、組織特異的発現制御機構などを詳細に解明していく要素還元的アプローチの重要性も明らかである。

GC-GR 系による組織特異的遺伝子発現制御機構に関して、申請者は、飛行時間型質量分析計を用いた解析によって、GR の共役因子を各組織由来サンプルを用いて網羅的に同定している。中でも、肝臓、骨格筋における代謝関連遺伝子発現に関与する共役因子群に関して、SRC-1、GRIP-1/TIF2、などに加えて、PGC-1、低分子核内 RNA 結合タンパク HEXIM1 の重要性を示す成績を蓄積している。PGC-1 に関しては、その共役因子活性に MAT-1 など他の分子との組織選択的あるいは遺伝子選択的な会合が重要であること (Cell Metabolism., 2007)、タンパク分解と核内局在によって精緻に機能制御を受けること (J.Biol.Chem., 2007)、を発見した。一方、HEXIM1 は、GR のヒンジ領域を介して結合するきわめて GR 選択性の高いネガティブレギュレーターであるとともに (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2005 & BBRC, 2008)、ある種の GR 標的遺伝子の組織・遺伝子選択的発現制御の鍵分子であることを明らかにしている (Mol. Endocrinol., 2008)。また、組織特異的発現パターンを示す共役因子も多く同定しており、現在、先の COX-2 や KLF15 遺伝子などを用いて GC-GR 系による組織特異的遺伝子発現調節機構解明をめざしている。

2. 研究の目的

1) 心筋における GC-GR->PLA2、COX-2、PGD 合成酵素遺伝子発現誘導->PGD2 産生増加の機序と心筋虚血時などにおける意義を明らかにする。とくに、新規治療法開発への展開に向けて、GR による心筋特異的 PLA2、COX-2、PGD 合成酵素遺伝子発現制御機構を解明する。

2) 骨格筋における GR による KLF15 遺伝子発現制御機構を解明し、骨格筋萎縮や糖代謝異常の治療法開発への基盤を構築する。

3) 各臓器における GR 標的遺伝子の網羅的同定、GR の共役因子の網羅的同定、GR 共役因子の発現制御機構と機能解析、GR 標的遺伝子の機能・組織特異的発現制御機構の解明という、申請者が独自に押し進めてきた体系的な研究を継続し、新たな GC-GR 系の役割をその分子機構とともに解明する。

3. 研究の方法

1) GR 標的遺伝子の網羅的同定

マウス、ラットに GC を腹腔内投与し、一定時間後に各組織を採取する。RNA 抽出後東レ 3D-gene chip を用いたマイクロアレイに供する。市販ソフトウェアを用いた変動遺伝子の抽出、クラスタリング、オントロジー解析、パスウェイ解析などのデータマイニングにより、各生体機能調節に関与する遺伝子の候補を抽出する。候補遺伝子は定量的 RT-PCR によって確認する。なお、GR 依存性の検証には、GR 拮抗薬 RU486 やすでに作成した GRsiRNA 発現アデノウイルスシステムなどを用いる (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005)。複数の組織のデータを比較検討し、候補遺伝子の中で GC-GR 系の新しい役割に関わると考えられる遺伝子をさらに抽出する。

2) GR の共役因子の網羅的同定

GR-GST 融合タンパクを発現、精製し、マウス、ラット各組織抽出液中の GR 結合タンパクをグルタチオンセファロースカラムを用いて回収し飛行時間型質量分析計 (TOF-mas) を用いて同定する。候補タンパクと GR の複合体形成の確認は、ショ糖密度勾配法、GST-pull down 法、免疫沈降法、Biacore 解析などを用いて行う。各 GR-共役因子複合体を標的遺伝子プロモーターに対応させるべく、ChIP-on-ChIP 解析を実施し、GR 結合遺伝子を網羅的に同定して 1) の結果と比較検討する。

3) 共役因子の発現制御機構と機能解析

発現制御機構 BAC クローンを用いて各遺伝子プロモーターを単離し、各種変異体作成後ルシフェラーゼ発現プラスミドに組み込

んでレポーターシステムを構築する。培養細胞にトランスフェクト後、各種薬剤で処理後ルシフェラーゼ活性を測定して調節領域を確定する。

タンパクレベルの制御 PGC-1 はユビキチン-プロテアソーム系にタンパク分解により寿命が制御される。そこで、ユビキチン化に必要な E3 リガーゼを同定し、タンパク分解の調節機構の詳細を解明する。

細胞内(核内)局在の解析 すでに構築した各々の変異体を含む GFP 融合蛋白発現系、組織化学・生化学的手法、共焦点レーザー顕微鏡を駆使して、核内局在の制御機構を明らかにする。

GR との複合体形成の制御 PGC-1、HEXIM1 が他のパートナーを排して GR と複合体を形成するメカニズムを解析する。

FLAG 標識 GR 発現アデノウイルスを各臓器由来細胞に感染させ、各種薬剤などで処理後核抽出液を採取して生化学的(ショ糖密度勾配、免疫沈降など)に複合体形成をモニタリングする。

機能解析 HEXIM1 に関して、各臓器組織における GR 標的遺伝子の発現に与える影響を Cre-loxP システムを利用した組織特異的 HEXIM1 遺伝子改変マウスを用いてマイクロアレイなどにより解析する。その際、HEXIM1 の各分子内機能を独立して評価可能な変異体を用いる。

4) GR 標的遺伝子の組織特異的発現制御機構とその機能の解明

1) で抽出した遺伝子群に焦点をあてて解析する。

組織特異的発現制御機構の解析 BAC クローンを用いて標的遺伝子プロモーターを単離し、各種変異を導入してルシフェラーゼレポーターシステムを構築する。細胞に制御因子の候補 (GR、PGC-1、HEXIM1 など) 発現プラスミドなどとコトランスフェクトし、各々の影響を測定する。候補因子のプロモーターへの結合は ChIP アッセイによる。候補転写因子の発現プラスミドは適宜前出半田教授から供給を受ける。

GR 標的遺伝子の機能と GC-GR 系の役割の解明

(i) 心筋における COX-2 の役割 ラット胎児心筋初代培養系を用いた細胞レベルの検討、ランゲンドルフ単離心還流系を用いた *ex vivo* の検討、冠動脈結紮虚血心筋モデルを用いた *in vivo* の検討、を行う。いずれの場合も、GC による COX-2 発現を RT-PCR、ウエスタンブロットで確認する (GR 依存性の評価は RU486、GRsiRNA 導入などによる)。プロスタノイド産生は、ELISA による。なお、GR、COX-2、PGD 合成酵素遺伝子を心筋特

異的に破壊したマウスを用いて GR->PLA2->COX-2->PGD 合成酵素->PGD2 の経路とその生理的重要性を虚血心モデルを作成して確認する。

(ii) 骨格筋における KLF15 の役割 GC 処理した、または、KLF15、KLF15 siRNA 発現アデノウイルスを感染させたマウス C2C12、ラット L6 細胞、マウスあるいはラット骨格筋を用いて、マイクロアレイによって遺伝子発現プロファイルを経時的に解析する。代謝に関してはアミノグラム解析を行う。また、筋萎縮との関連を、atrogin-1、MuRF1 mRNA 発現、アポトーシス/オートファジー(病理組織学的に評価)から検討する。骨格筋の病理組織学的検討や筋力測定は定法による。

4. 研究成果

1) GR 標的遺伝子の網羅的同定

従来の GR 標的遺伝子探索報告では他の核内レセプターとの交差反応性を有さないリガンドが使用されていない点が大きな問題であった。申請者はコルチバザール CVZ が GR 超選択的リガンドであることを見だし (J.Biol.Chem., 2002)、本研究に用いることことかかると克服した (Mol. Endocrinol., 2005 & Am. J. Physiol., 2009)。その結果、心筋、骨格筋、などにおいて多くの新規標的遺伝子を発見した。本研究では、とくに、心筋ではプロスタノイド合成系酵素、骨格筋では KLF15、REDD1、そして骨格筋萎縮関連遺伝子に焦点を当てた。

2) GR の共役因子の網羅的同定

TOF-mas を用いて GR の共役因子を探索し、HEXIM1 が臓器を超えて GR 機能を抑制的に制御する共役因子であることを確認した。さらに、GR-HEXIM1 複合体の構成と機能は 7SK などの snRNA によって制御されることを見いだした。

3) 共役因子の発現制御機構と機能解析

はすでに所有しており、HEXIM1 レポーターシステムを BAC クローンにて構築した。タンパクレベルの制御 HEXIM1 はユビキチン-プロテアソーム系による制御を受けることを見いだした。

細胞内(核内)局在の解析 PGC-1a、HEXIM1、いずれも特異な核内局在を示すことを見いだしていた。とくに、PGC-1a は核内において細顆粒状、斑状、2 種類の局在を示すことがわかった。

GR との複合体形成の制御 先に見いだした 7SK snRNA は HEXIM1 に結合し、HEXIM1 の GR へのアクセスを阻害した。

機能解析 HEXIM1 のドメイン解析を行った。すなわち、GR 結合領域と P-TEFb 結合領域などの機能を独立して評価可能な変異プラスミド発現系を作成して、GR 抑制と

P-TEFb 抑制が独立に制御可能であることを突き止めた。

4) GR 標的遺伝子の組織特異的発現制御機構とその機能の解明

組織特異的発現制御機構の解析

HEXIM1 は肝臓と腎臓における Na⁺-K⁺-ATPase 遺伝子 (atp1a1) の GR 応答性発現制御を抑制した。KLF15、REDD1 プロモーター-ルシフェラーゼレポータープラスミドを作成し、両プロモーター上の GRE を同定した。

GR 標的遺伝子の機能と GC-GR 系の役割の解明

(i) 心筋、骨格筋特異的 GR 遺伝子破壊マウス
ドイツ癌研究所の Schuetz 教授より供与された floxed GR マウスと myosin heavy chain promoter-、HSA-Cre 発現マウスとの交配により、各々、心筋、骨格筋特異的 GR 遺伝子破壊マウスを樹立した。また、floxed MR マウスを用いて心筋特異的 MR 遺伝子破壊マウスを樹立した。さらに、心筋特異的 GR/MR 両遺伝子を破壊したマウスも作出した。

(ii) 骨格筋 GR 遺伝子破壊マウスを用いた解析
骨格筋における GR とその標的遺伝子の意義を解明した。すなわち、かかるマウスでは通常の生育条件下で骨格筋量が 1.2 倍に増加していた。筋繊維の解析では、type IIb 繊維の増大が際だっていた。このマウスに合成 GC である dexamethasone を腹腔内投与して骨格筋における GR 標的遺伝子の発現を観察したところ、KLF15、REDD1、いずれも有意な変動を認めなかった。

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 4 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. 13(2):170-182, 2011

2. Mu SY, Shimosawa T, Ogura S, Wang H, Uetake Y, Kawakami-Mori F, Marumo T, Yatomi Y, Geller DS, Tanaka H, Fujita T. Epigenetic modulation of the renal β -adrenergic-WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension. Nat. Med. 17(5):573-580, 2011

3. Toyokawa G, Cho H-S, Iwai Y, Yoshimatsu M, Takawa M, Hayami S,

Maejima K, Shimizu N, Tanaka H, Tsunoda T, Field H, Kelly J, Neal D, Ponder B, Maehara Y, Nakamura Y, and Hamamoto R. The histone demethylase JMJD2B plays an essential role in human carcinogenesis through positive regulation of cyclin-dependent kinase 6. Cancer Prev. Res. 4(12):2051-2061, 2011

4. Fukazawa T, Maeda Y, Matsuoka J, Ono T, Mominoki K, Yamatsuji T, Shigemitsu K, Morita I, Murakami I, Tanaka H, Durbin ML, Naomoto Y. Targeting KRAS mutation-bearing lung cancer in vivo by pulmonary surfactant-adenovirus-mediated gene transfer. Anticancer Res. 30(12):4925-4935, 2010

[学会発表] (計 2 件)

1. 田中 廣壽
特別講演：ステロイド 2010 — 新薬開発と副作用克服に向けて
中部リウマチ学会総会
2010 年 9 月 4 日
ANA クラウンプラザホテル新潟

2. 田中 廣壽
特別講演：グルココルチコイドの新しい役割
第 28 回関東腎研究会
2009 年 7 月 4 日
関東倶楽部、東京

[その他]

ホームページ
<http://www.h.ims.u-tokyo.ac.jp/gairai/depts-03.html>

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・准教授
研究者番号：

(2) 研究分担者
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
(H23：連携研究者)

吉川 賢忠 (YOSHIKAWA NORITADA)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：70396878
(H23：連携研究者)