

## 学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	折 居 史 佳
学位論文題目			
Quantitative Analysis for Human Glucocorticoid Receptor $\alpha/\beta$ mRNA in IBD (炎症性腸疾患におけるヒトグルココルチコイドレセプター $\alpha/\beta$ mRNAの定量的解析)			
共著者名			
蘆田知史、野村昌史、前本篤男、藤城貴教、綾部時芳、今井伸二郎、斉藤裕輔、高後裕			
Biochemical and Biophysical Research Communications 掲載予定			
研究目的			
<p>                             グルココルチコイド（以下GC）は潰瘍性大腸炎(以下UC)の治療法として広く用いられるが、再燃例においてはしばしば不応例となる。cDNAのクローニングにより、ヒトグルココルチコイドレセプター(以下hGR)は二つのアイソフォーム、hGR<math>\alpha</math>とhGR<math>\beta</math>を持つことが知られている<sup>1)</sup>。hGR<math>\beta</math>はhGR<math>\alpha</math>の活性に対して dominant-negativeな阻害物質としての役割を果たしており、hGR<math>\beta</math>の相対的過剰発現がGC抵抗性の調節に寄与している可能性が示唆されている<sup>2)</sup>。                         </p> <p>                             われわれは、これまでhGR<math>\beta</math> mRNAがGC抵抗性UC患者の末梢血単核球(以下PBMC)においてGC感受性患者よりも有意に高率に検出されることを報告してきた<sup>3)</sup>。本研究ではhGR mRNAの選択的スプライシングの誘導因子やその経時的な変化を明らかにすることを目的として、炎症性腸疾患患者の末梢血単核球におけるhGR<math>\alpha/\beta</math> mRNAを定量PCRを用いて経時的に測定した。また、培養T細胞株や末梢血単核球をGCや種々のサイトカイン存在下で培養し、hGR<math>\alpha/\beta</math> mRNAの発現量を解析した。その結果、UC患者ではGC抵抗性症例でhGR<math>\beta</math> mRNAの発現量が有意に多いこと、またこのhGR<math>\beta</math> mRNAは繰り返す再燃によって発現が誘導され、そのメカニズムはIL-18などの炎症性サイトカインによることを明らかにした。                         </p>			
材料・方法			
<p>                             材料                              34人のUC患者、13人のCrohn病(以下CD)患者、19人の健常人の末梢血単核球を材料とした。UC患者の疾患活動性はcolitis activity index (以下CAI)にて評価し、採血時のCAIが5以上の患者を活動期とした。CDは血清CRPが0.3mg/dlより高い患者を活動性とした。UC患者のGC反応性は、20mg/dayのプレドニゾン投与によって4週以内に緩解導入された患者(CAIが4以下となった患者)をGC感受性と判定し、4週の治療によってもCAIが4以下とならなかったか、またはこの期間に手術を必要とした患者をGC抵抗性と分類した。                         </p> <p>                             PBMC中のhGR<math>\alpha</math>およびhGR<math>\beta</math> mRNAの定量                              PBMC中のhGR<math>\alpha</math>およびhGR<math>\beta</math> mRNAの発現は定量的RT-PCRにより測定した。PBMCからの全RNAは                         </p>			

AGPC法により抽出し、DNase処理し、oligo dT primerにより逆転写して、Light CyclerによりPCR法で解析した。PCR産物の増幅は二本鎖DNAに結合する蛍光色素であるSYBR Green Iを測定することにより観察した。同じcDNAから内部標準としてhuman Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH)を同時に増幅した。hGR $\alpha$ およびhGR $\beta$  mRNAを発現しているJurkat cell lineから合成したcDNAを段階的に希釈して増幅し外部標準とした。

PCR生成物の同一性と均質性は初期増幅プログラムの後のT<sub>m</sub>値解析により確認した。遺伝子配列を確認するために、ダイレクトシーケンシング法によりPCR生成物を解析した。

GC、サイトカインのhGR mRNA発現量に及ぼす影響の解析

hGR mRNA発現におけるサイトカインとGCの影響を調べるために、ヒトT細胞株であるCEM 1x10<sup>7</sup>個および健常人のPBMC 1x10<sup>8</sup>個を6穴培養プレートにまき、リコンビナントヒトTNF $\alpha$ 、IL-7、IL-1 $\beta$ 、IL-18を種々の濃度で添加し、10%FCS加RPMImediumで培養した。24時間後RNAを抽出し、定量的RT-PCRを行った。

統計学的検討

各群間のhGR $\alpha$ およびhGR $\beta$  mRNAの定量値、疾患活動性、罹病期間、GC総投与量などの臨床的指標に関する統計学的差異は、Mann-Whitney U testにより検定した。hGR $\alpha$ およびhGR $\beta$  mRNA発現と血清CRP、CAIとの関係は単回帰分析により解析した。長軸解析においては、hGR $\alpha$ およびhGR $\beta$  mRNAのレベルに関する有意差はWilcoxon's signed rank testにより検定した。p値0.05未満を統計学的有意差ありとした。

## 成績

定量的RT-PCRの最適化とその感度

Light Cyclerのシステムを用いることによって従来のアガロースゲル電気泳動法よりも、より高感度にhGR $\alpha$ およびhGR $\beta$ のPCR産物を増幅し検出することができた。測定感度は5copy/ $\mu$ lであった。外部標準として用いたコントロールcDNA内のhGR $\beta$ の実際のコピー数は特異的hGR $\beta$ 配列を持つベクターとの比較により、1 $\mu$ lのcDNA当たり8.9x10<sup>2</sup>コピーであることが判明した。このcDNAのhGR $\alpha$  : hGR $\beta$ 比はこのシステムでは621 : 1と計算された。

UC、CD患者および健常対照のPBMCにおけるhGR mRNAの発現

hGR $\alpha$  mRNAの発現量は活動性UC患者群、非活動性UC患者群、CD患者群および健常対照群で分布に差はなかった。これに対しhGR $\beta$  mRNAの発現量は活動性UC患者群において非活動性UC患者群および健常対照群よりも有意に高値であった。活動性UC患者群におけるhGR $\beta$ /hGR $\alpha$ 比も、他の群よりも有意に高値であった。年齢、性別およびGC総投与量は活動性UC患者群と非活動性UC患者群の各群に差はなかった。UC患者群におけるhGR $\alpha$ 、hGR $\beta$  mRNAの発現量とCAIまたは血清CRP値の間に有意な相関関係は認められなかった。

hGR $\beta$  mRNA発現とGC抵抗性との関係

対象症例のうち17例でGCに対する反応が評価可能であり、そのうち5例はGC抵抗性と分類された。hGR $\alpha$  mRNAにGC感受性および抵抗性各群で有意な差は認められなかった。これに対して、hGR $\beta$  mRNAはGC抵抗性群では感受性群に比べて高値であった。hGR $\beta$ /hGR $\alpha$ 比もまたGC抵抗性群では感受性群に比べて高値であった。各群の採血時の平均CAI値(GC抵抗性群 $11.0 \pm 4.2$ (SD)、GC感受性群 $7.5 \pm 1.2$ )や血清CRP値(GC抵抗性群 $0.47 \pm 0.019$ (SD)、GC感受性群 $0.75 \pm 0.38$ )に有意差はなかった。

#### hGR $\beta$ mRNAの発現に関する長軸解析

UC患者34人中22人のhGR $\alpha$ およびhGR $\beta$  mRNAの発現量の経時的変化を解析した。22症例中14症例に観察期間中の再燃を認めた。hGR $\beta$  mRNAの発現は再燃患者群において有意に増大していたが、非再燃患者群では有意な変化は認められなかった。観察期間中hGR $\alpha$ の発現は両群において変化しなかった。各群の初回および2回目採血時のCAIに差はなかった。期間中再燃患者群に投与されたGC投与量の平均値( $681 \pm 442.9$ mg)は、非再燃患者群の平均値( $222 \pm 138.7$ mg)の約3倍の量であった。しかしPBMC中のhGR $\beta$  mRNAの発現量はGCの総投与量および採血日投与量に単純には関連しなかった。

#### in vitro培養実験

培養T細胞株CEMや末梢血単核球をGCや種々のサイトカイン存在下で培養し、hGR $\alpha$ 、 $\beta$  mRNAの発現量を解析した。CEM細胞を10から1000nMのDEXを添加し24時間培養後、hGR mRNAを測定したが、hGR $\alpha$ 、 $\beta$  mRNA発現に変化は見られなかった。

最近、NF $\kappa$ Bの活性化を誘導するIL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ がhGR $\beta$  mRNAの発現量を増大させるとの報告が見られることから、われわれもTNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ および炎症性腸疾患において産生の亢進が報告されているIL-18、IL-7がhGR mRNAの発現に及ぼす影響を検討した。その結果、10ng/mlのIL-7がCEMにおけるhGR $\beta$ /hGR $\alpha$ 比を増大させた。さらに、1および10ng/mlのIL-18がhGR $\alpha$  mRNAは変化させずhGR $\beta$  mRNAおよびhGR $\beta$ /hGR $\alpha$ 比を有意に増大させた。CEM細胞と対照的に、IL-7とIL-18はPBMCにおいてhGR $\alpha$  mRNAの発現を有意に増大させた。PBMCにおいて100ng/mlのIL-18存在下でhGR $\beta$  mRNAの発現が誘導された。IL-7ではPBMC中のhGR $\beta$  mRNAの発現の誘導を確認できなかった。

#### 考按

本研究における解析の結果、以下の点が明らかになった。

- 1) hGR $\beta$  mRNAの発現量は活動性UC患者群において非活動性UC患者群および健常対照群よりも有意に高値であった。
- 2) UC患者において末梢血単核球のhGR $\beta$  mRNAの発現量およびhGR $\beta$ / $\alpha$ 比はCAIおよびCRP値と有意の相関を示さなかった。
- 3) UC症例においてhGR $\beta$  mRNA発現量、およびhGR $\beta$ / $\alpha$ 比はGC抵抗性群では感受性群に比べて有意に高値であった。
- 4) UC症例において経時的にhGR $\beta$  mRNAの発現量を比較した。その結果、hGR $\beta$  mRNAの発現量および

hGR $\beta$ / $\alpha$ 比は非再燃患者群に比べ再燃患者群において有意に増大していた。

5) hGR $\beta$  mRNAの発現量を増加させる因子を解析する目的で、dexamethasoneおよび各種の炎症性サイトカインの影響をin vitroで検討した。その結果、dexamethasoneの存在下で24時間培養してもT細胞株CEMのhGR mRNAの発現量に影響を及ぼさなかった。一方、炎症性腸疾患で産生の亢進が報告されているIL-18、IL-7はCEM細胞のhGR $\beta$  mRNAの発現を有意に増大させた。PBMCを用いた実験でもIL-18はhGR $\beta$  mRNAを誘導した。

これらの結果からhGR $\beta$  mRNAは、UCにおいては炎症の再燃時に増大するが、単にCAIやCRPなどの炎症の程度を表す指標と相関しないことから、hGR $\beta$ の増加は一般的な炎症マーカーではなく、また疾患重症度や血清炎症反応に影響を及ぼす貧血、二次感染などの因子で誘導されているのではないことが示唆された。hGR $\beta$ を誘導する因子としては本研究では炎症性腸疾患で産生亢進しているIL-18である可能性が示唆された。実際、患者血清を用いたpreliminaryな解析により、血清中のIL-18濃度とhGR $\beta$ 発現量は相関する傾向にあり、hGR $\beta$ / $\alpha$ 比とは有意の相関を示している。

また、UCのGC抵抗性患者群においてhGR $\beta$  mRNAが増大しているというわれわれの従来の研究が定量的RT-PCRにて確認された。従って、hGRの発現量の解析は、臨床的に炎症性腸疾患患者において、GC抵抗性を治療開始前に知る臨床検査として応用可能であることを示しており、今後、更に多数の症例の検討および蛋白レベルでの検討が必要であると考えられた。

#### 結論

炎症性腸疾患患者末梢血単核球におけるhGR $\alpha$ 、 $\beta$  mRNAの発現量を、最適化した定量PCR法を用いて解析した。その結果、ステロイド投与で治療効果の見られないUC患者で増加しているhGR $\beta$  mRNAは、繰り返す再燃によって増加し、その誘導因子として炎症性サイトカインの一つであるIL-18が重要な役割を担っている可能性を明らかにした。




#### 引用文献

- 1) Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635-641.
- 2) Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. (1996) The human glucocorticoid receptor isoform: expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem* 271, 9550-9559.
- 3) Honda M, Orii F, Ayabe T, Imai S, Ashida T, Obara T, Kohgo Y. (2000) Expression of Glucocorticoid Receptor  $\beta$  in Lymphocytes of Patients With Glucocorticoid-Resistant Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 118, 859-866.

#### 参考論文

- 1) Honda M, Orii F, Ayabe T, Imai S, Ashida T, Obara T, Kohgo Y. (2000) Expression of Glucocorticoid Receptor  $\beta$  in Lymphocytes of Patients With Glucocorticoid-Resistant Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 118, 859-866.
- 2) 折居史佳、垂石正樹、藤城貴教、野村昌史、綾部時芳、蘆田知史、齊藤裕輔、渡二郎、柴田好、並木正義、渡辺晴司、北川朋子、小池裕二、帰山雅人: Crohn病の同胞(姉弟)発生例. *日本消化器病学会雑誌* 91(1), 89-94.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	折居 史佳
<p>審査委員長 <u>油野民雄</u> </p> <p>審査委員 <u>高後 裕</u> </p> <p>審査委員 <u>牧野 勲</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Quantitative Analysis for Human Glucocorticoid Receptor <math>\alpha/\beta</math> mRNA in IBD          (炎症性腸疾患におけるヒトグルコルチコイドレセプター<math>\alpha/\beta</math> mRNA の定量的解析)</p>			
<p>グルコルチコイドは潰瘍性大腸炎の治療法として広く用いられているが、再燃例においてはしばしば不能となる。ヒトグルコルチコイドレセプターには<math>\alpha</math>と<math>\beta</math>の二つのアイソフォームがあり、<math>\beta</math>は<math>\alpha</math>の活性に対して dominant-negative な阻害物質としての役割を持つことが知られ、<math>\beta</math>の相対的過剰発現がグルコルチコイド抵抗性の調節に寄与している可能性が示唆されている。本研究は、炎症性腸疾患患者の末梢血単核球における<math>\alpha</math>および<math>\beta</math>レセプターの mRNA を定量 PCR を用いて測定し、また培養 T 細胞株や末梢血単核球のグルコルチコイドや種々のサイトカイン存在下で培養し両者の mRNA の発現量を解析することで、ヒトグルコルチコイド mRNA の選択的誘導因子やその経時的変化を明らかにすることを目的としたものである。</p> <p>その結果、1) <math>\alpha</math> の発現量は活動性および非活動性潰瘍性大腸炎群、クローン病群、健常対照群間で有意な差を示さないのに対し、<math>\beta</math> の発現量は活動性潰瘍性大腸炎群で他の群に比べ有意に高値を示すこと、またその際 <math>\beta/\alpha</math> 比も活動性潰瘍性大腸炎群で有意に高値を示すこと、2) 潰瘍性大腸炎のグルコルチコイド感受</p>			

性との関連では、抵抗性患者群で $\beta$ の発現量は有意に高値を示すこと、3)潰瘍性大腸炎の再燃との関連では、繰り返す再燃によって $\beta$ の発現が誘導されること、4)in vitro 培養実験により、 $\beta$ 発現のメカニズムはIL-18などの炎症サイトカインによること等を、明らかにした。

したがって本研究は、炎症性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎におけるグルココルチコイド療法について治療抵抗性メカニズムの一端を明らかにした点で、極めて重要な知見を含んでおり、今後の臨床研究に寄与するところが大きいことから、高く評価されると思われた。

なお各審査委員による論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的な解答が得られ、関連領域に関する十分な知識を有していることが示された。

以上の審査結果から、本審査委員会は本論文が博士（医学）の学位にふさわしいものと判定した。

最後に、本論文は、Biochemical and Biophysical Research Communications 誌に最近掲載されたことを付記する。