

学位論文の要旨

| | | | |
|-------|----|----|------|
| 学位の種類 | 博士 | 氏名 | 三浦貴徳 |
|-------|----|----|------|

学位論文題目

Functional Modulation of the Glucocorticoid Receptor and Suppression of NF- κ B-dependent Transcription by Ursodeoxycholic Acid

(ウルソデオキシコール酸によるグルコルチコイド受容体の機能調節およびNF- κ B依存性遺伝子転写の抑制機序に関する研究)

共著者名 大内田 理佳、吉川 賢忠、岡本 健作、牧野 雄一、
中村 哲也、森本 幾夫、牧野 勲、田中 廣壽

掲載学会誌名 The Journal of Biological Chemistry Volume. 276,
No. 50, Issue of december 14, pp47371-47378,
2001.

<目的>

ウルソデオキシコール酸 (UDCA) は、親水性胆汁酸製剤であり、原発性胆汁性肝硬変症などの炎症性肝疾患に有効な薬剤である。従来よりUDCAは、その利胆作用および肝細胞保護作用によって肝細胞障害を軽減すると考えられてきたが、最近免疫調節薬としてのUDCAの作用が注目されてきている (引用文献1)。ここで、グルコルチコイド (GC) は、生体の恒常性維持に必須のホルモンであるとともに、アレルギー、自己免疫疾患あるいは炎症性疾患治療薬としてきわめて重要である。GCは、核内受容体ファミリーに属するホルモン依存性転写因子であるグルコルチコイド受容体 (GR) に結合し作用を発現する。GRはhsp90と複合体を形成し細胞質に存在するが、GCと結合後hsp90を解離して核へ移行、標的遺伝子上のグルコルチコイド応答性配列に結合後 transcription intermediary factor 2 (TIF2) などの転写共役因子、基本転写因子などとともに転写開始複合体を形成して転写を活性化すると考えられている (転写促進作用)。ここで、NF- κ Bは、免疫および炎症反応に関与する様々な遺伝子転写を調節する転写因子であり、主にp65/RelAとp50からなるヘテロダイマーである。NF- κ Bは、細胞質でI κ -Bと複合体を形成して存在するが、TNF- α などの刺激によってI κ -Bはリン酸化をうけたのち蛋白分解を受け、NF- κ Bは核へ移行し標的遺伝子を発現させる。GRはNF- κ Bによる遺伝子発現を負にも調節していることが明らかとなっており (転写抑制作用)、その作用抑制機序として、I κ -B α の蛋白合成誘導、GRとNF- κ Bの蛋白—蛋白相互作用などが報告されている (参考論文3)。したがって、GCはNF- κ Bを標的とした抗炎症薬、

免疫抑制薬として治療上有用であると考えられるが、糖尿病、骨粗鬆症などの副作用のためその使用が制限されてきた。すなわち、GCのもつ抗炎症作用などの薬理作用は主に転写抑制作用によって、代謝あるいは内分泌学的作用は主に転写促進作用によってひきおこされるが、従来の合成グルココルチコイドは、GRの転写促進作用と転写抑制作用をともに発現させるため、様々な副作用を惹起すると考えられる。すでにUDCAがGRに直接結合することなくGRを核移行させ、その転写抑制作用をより選択的に発現することを示唆する結果を得ており（参考論文2）、UDCAは作用分離型GR作動薬のプロトタイプと考えられる。したがって、本研究はUDCAによるGR活性化の作用機序を解明し、新たなGRを介した治療薬の開発の基盤となることを目的とする。

<材料・方法>

1) 試薬

UDCAおよびデキサメサゾン（DEX）を使用した。GR、hsp90、TIF2、p65、p50、I κ B α に対する抗体はそれぞれPA1-512、3B6と3G3、sc-6264、sc-372、sc-1190、sc-371を用いた。リン酸化されたI κ B α に対するpaxillineに対する抗体を用いた。

2) プラスミド

Aequorea victoria 由来のgreen fluorescent protein（GFP）とGR、ミネラルコルチコイド受容体（MR）、プロゲステロン受容体（PR）、アンドロゲン受容体（AR）のキメラ蛋白発現プラスミドを用いた。TIF2発現プラスミド、Gal4のDNA結合領域（DBD）とGRのリガンド結合領域（LBD）の融合蛋白、VP16の活性化領域（VP16AD）、Gal4応答性レポータープラスミドとしてそれぞれpSG5-TIF2、pCMX-Gal4-GR LBD、pCMX-VP16AD、pCMX-GALpx3-Lucを用いた。GAL4のDBDとNF- κ B p65、p65のN末端、C末端とのキメラ蛋白およびVP16ADとTIF2のnuclear receptor interaction domain（NID）のキメラ蛋白の発現プラスミドとしてpCMX-GAL4-p65/1-549、pCMX-GAL4-p65/1-285、pCMX-GAL4-p65/285-549 pCMX-VP16AD-TIF2/NIDをそれぞれ作成し使用した。グルココルチコイド応答性レポータープラスミドpGRE-Luc、NF- κ B応答性レポータープラスミドとしてそれぞれpGRE-Luc、pNF- κ B-Lucを用いた

3) 細胞

COS7細胞、CV-1細胞は10%牛胎児血清を添加したDulbecco's modified Eagle 培地で培養した。CHO-K1細胞はHam's F-12培地で培養した。

4) 免疫蛍光法によるGRの検出

細胞を8ウェルプレート上で培養した後、4%パラホルムアルデヒドで固定した。既報のごとく

(参考論文2) PA1-512とインキュベート後、ビオチン化ロバ抗ラビットIgG抗体、FITC標識ストレプトアビジンとそれぞれ反応させた。GR特異的蛍光は蛍光顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

5) レポータープラスミド導入による転写活性の測定

GR発現プラスミド、pGRE-LucあるいはpNF- κ B-Lucをリポフェクション法により一過性に導入し、DEX、UDCAあるいはphorbol 12-myristate acetate (PMA) の存在・非存在下で培養後細胞抽出液を調整し、ルシフェラーゼ活性を既報のごとく測定した。(参考論文1)。

6) GFPキメラ蛋白を用いたGRの細胞内局在の解析

リポフェクション法によりGFPで標識したGRあるいはその変異体をCOS7細胞に一過性に発現させた後種々の条件で培養し、GFPの蛍光を指標にGRの細胞内局在を倒立蛍光顕微鏡を用いて経時的に観察した。GFP標識GRが主に細胞質にある細胞をN<C、細胞質と核にほぼ同程度存在するものをN=C、核に優位に存在するものをN>C、ほぼ核のみに存在するものをNと分類し、細胞内局在の定量的解析を行った。

7) 免疫沈降法によるhsp90とGRの複合体量の検討

GFP-GRあるいはその変異体をCOS7細胞に一過性に発現させた後、細胞抽出液を採取し、3G3を用いて免疫沈降法を行い、抗GFP抗体と3B3を用いたウエスタンブロット法により蛋白量を解析した。

<成績>

1) UDCAのGRおよびGal4-GRLBDの細胞内局在に与える影響。

UDCAはGFP-GRを核へ移行させたが、その効果はMR、PR、ARには認められなかった。さらに、UDCAはGal4-GRLBDをも核移行させた。

2) GRのC末端欠失変異体を用いたUDCAの作用部位の検討。

UDCAはDEXと同様にGFP標識GRを核へ移行させた。つぎに、変異体GFP-GR-(1-765)、(1-750)、(1-740)、(1-730)の発現プラスミドを作成しその細胞内局在を検討した。GFP-GR-(1-765)、(1-750)、(1-740)はDEXによっては核移行しないが、UDCAによって核へ移行した。一方、GFP-GR-(1-730)の細胞内局在はUDCAおよびDEXによる影響を受けず、免疫沈降法による検討でも、hsp90との結合がやや弱いことが明らかとなった。

4) GRの細胞内局在、転写調節能に与える転写共役因子の作用

DEXにより誘導されたグルココルチコイド応答性遺伝子発現はTIF2を共発現させることによって増

加したが、UDCA存在下ではGRの転写促進作用は認めず、TIF2によっても変化しなかった。また、DEXによってGAL4-GRLBDの転写促進作用は増加し、さらにVP16AD-TIF2/NIDを共発現させるとその作用が増強したが、UDCAによる転写促進作用は認めなかった。つぎに、GRとTIF2の細胞内局在を二重染色法を行い検討した。DEXによってGRはTIF2と重なるように点状分布を示したが、UDCA存在下ではGRは核内に均一に存在した。

5) UDCAのGRを介したNF- κ Bの抑制作用およびその機序の検討。

UDCA、DEXはGR存在下でNF- κ B応答性遺伝子発現を抑制したが、GR-(1-750)を発現させた時はUDCAのみに抑制効果を認めた。p65の細胞内局在を免疫蛍光法によって検討したが、UDCAはp65の核移行を抑制しなかった。ウエスタンブロット法による検討では、PMAによって、p65、p50の蛋白量は変化せず、I κ -B α はすみやかにリン酸化されその蛋白量は減少したが、UDCA存在下においてもほぼ同様の結果を示した。さらに、UDCAはGRとともにGAL4-p65/285-549を発現させたときに、GAL4-p65/1-549を発現させたときと同等にレポーター遺伝子発現を抑制したが、GAL4-p65/1-285を使用した時にはその効果を認めなかった。

<考案>

UDCAはGRを特異的に核へ移行させ、さらにGAL4-GR LBDおよびGRのC末端欠失変異体を用いた検討により、UDCAのGRにおける作用部位のひとつがLBDであり、LBDにおけるUDCAの作用部位はDEXと比較して広い範囲であることが推定された。

つぎにUDCAによるGRの転写調節作用を検討したが、UDCAによって活性化されたGRはTIF2と相互作用できず、転写促進作用を発現しないことが明らかとなった。一方、UDCAはNF- κ Bの活性化経路には影響を与えずNF- κ Bによる遺伝子発現をGR存在下で負に制御した。ここで、UDCAは転写共役因子との相互作用に必要なC末端を欠失したGR変異体においても、NF- κ Bの抑制効果を示したことから、I κ -B α の誘導や、転写共役因子の競合による作用ではないと考えられる。さらに、ワンハイブリッドアッセイによる検討の結果、UDCAによって活性化されたGRは、p65のC末端を標的としてNF- κ Bの機能を抑制することが明らかとなった。近年、脂溶性胆汁酸が核内受容体であるFXRのリガンドとして作用することが示されたが(引用文献2)、親水性胆汁酸であるUDCAは細胞膜を通過できないため、直接GRと相互作用することはできないと考えられる。したがって、UDCAは、細胞膜に作用しならかの細胞内情報伝達機構を介してGRを核移行させると考えられるがその詳細は不明である。しかし、すでに様々な薬剤や熱ショック等の刺激でGRがリガンド非依存性に核移行することが報告されており(引用文献3)リガンドによらないGRの機能制御は可能であると考えら

れる。したがって、UDCAによるGR活性化機序の解明は、全く新しいGRの作用分離の方法論の確立に寄与するものと考えられる。

<結論>

UDCAは、リガンドであるDEXとは異なる機序によってGRを活性化させる作用分離型GR制御薬のプロトタイプと考えられる。

<引用文献>

1. Makino, I., and H. Tanaka. 1998. From a choleric to an immunomodulator: historical review of ursodeoxycholic acid as a medicament. *J Gastroenterol. Hepatol.* 13:659-664.
2. Makishima, M., A.Y. Okamoto, J.J. Repa, Tu.H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J., and Shan, B. 1999. Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids. *Science* 284: 1362-1365.
3. Sanchez, E.R. 1992. Heat shock induces translocation to the nucleus of the unliganded glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 267: 17-20.

<参考文献>

1. Hirano, F., H. Tanaka, T. Miura, Y. Hirano, K. Okamoto, Y. Makino, I. Makino. 1998. Inhibition of NF- κ B-dependent transcription of human immunodeficiency virus 1 promoter by a phosphodiester compound of vitamin C and vitamin E, EPC-K1. *Immunopharmacology* 39: 31-38.
2. Tanaka, H., Y. Makino, T. Miura, F. Hirano, K. Okamoto, K. Komura, Y. Satoh, I. Makino. 1996. Ligand-Independent Activation of the Glucocorticoid Receptor by Ursodeoxycholic Acid. *J. Immunol.* 156:1601-1608.
3. 三浦 貴徳、吉川 賢忠、牧野 雄一、田中 廣壽. 2001. 作用分離型グルココルチコイドレセプター (GR) 作動薬開発の試みーウルソデオキシコール酸の作用機序の解明から. *ホルモンと臨床* 49冬期増刊号 : 93-98.

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 | 三浦 貴徳 |
| 審査委員長 谷口 隆信 ㊞ | | | |
| 審査委員 牧野 勲 ㊞ | | | |
| 審査委員 吉田 成孝 ㊞ | | | |
| 学位論文題目 | | | |
| Functional Modulation of the Glucocorticoid Receptor and Suppression of NF- κ B-dependent Transcription by Ursodeoxycholic Acid (ウルソデオキシコール酸によるグルココルチコイド受容体の機能調節及びNF- κ B依存性遺伝子転写の抑制機序に関する研究) | | | |
| 共著者名: 大和田 理佳、吉川 賢忠、岡本 健作、牧野 雄一、中村 哲也、森本 幾夫、牧野 勲、田中 廣壽 | | | |
| 掲載学会誌名: J. Biol. Chem. 276 (50) ; 47371-47378 : 2001. | | | |
| 審査結果要旨 | | | |
| <p>ウルソデオキシコール酸は親水性胆汁酸製剤であり、炎症性肝疾患に対して古くから用いられてきています。従来、ウルソデオキシコール酸の薬理効果はその利胆作用及び肝細胞保護作用によるものと考えられていましたが、最近その免疫調節作用に注目が集まっています。著者らは、ステロイドの免疫抑制作用との類似性からウルソデオキシコール酸とグルココルチコイド受容体との関連に着目し、結合部位、作用の相同性についてウルソデオキシコール酸とステロイドの間で詳細に比較検討を行い、結果を論文として報告しています。ステロイドには強力な抗炎症作用がありますが、代謝、内分泌に対する作用も併せ持っておりこれらが副作用となって問題になります。本論文の結果は、ステロイドの作用を分離した、純粋な抗炎症薬の可能性を示唆するものと考えられました。</p> | | | |

著者らは先ず、いくつかのステロイドホルモン受容体の核移行におけるウルソデオキシコール酸の効果を検討し、核移行促進はプロジェステロン受容体、アルドステロン受容体、アンドロジェン受容体には認められず、グルココルチコイド受容体に特異的な作用であることを示しています。次いで、この核移行作用は、ステロイドによる場合には受容体蛋白質のC末構造に厳密に依存するのに対し、ウルソデオキシコール酸の場合にはあまり影響を受けないこと、また、グルココルチコイド受容体の転写活性について、ステロイドでは転写活性の亢進が認められるのに対し、ウルソデオキシコール酸では転写活性は亢進しないという結果を示しています。このことはウルソデオキシコール酸の作用はグルココルチコイド受容体を介するけれどもステロイドとは異なり転写活性の亢進を伴わず、ステロイドの作用が分離されている可能性を示唆しています。更に、ステロイドの抗炎症作用に重要な機構であるNF- κ Bとの相互作用について検討し、ウルソデオキシコール酸はステロイドと同様に、グルココルチコイド受容体に作用してNF- κ Bとの複合体形成を促進し、NF- κ Bの転写活性を抑制することを実験的に示しています。NF- κ B転写活性の阻害は炎症反応の抑制につながる考えられ、ウルソデオキシコール酸はグルココルチコイド受容体に作用してNF- κ Bを阻害し抗炎症効果を現す一方、ステロイドとは異なりグルココルチコイド受容体自体の転写活性は亢進せず、副作用の出にくい抗炎症薬となる可能性を示しています。

以上この論文で述べられている実験結果並びに考察は、長年使用されてその有効性は認められていたにもかかわらず作用機序が不明であったウルソデオキシコール酸の抗炎症薬としての分子的な基盤を説明するものであり、将来において、ステロイドの抗炎症作用のみを取り出した新しい薬剤の開発につながるものと考えます。

申請者に対して諮問を行い、当該分野に関する申請者の知識/経験/見識は医学博士に相応しいものであると考えました。以上、論文/諮問による審査の結果、論文博士に値すると判定したことを御報告いたします。