

グルココルチコイドによる遺伝子発現調節機構解明と
新規抗炎症薬・免疫抑制薬の創成

(課題番号 09557044)

平成9年度～平成10年度科学研究費補助金（基盤研究(B)(2)）
研究成果報告書

平成11年2月

研究代表者 田中廣壽

(旭川医科大学医学部助教授)

【はじめに】 臨床医学において、グルココルチコイド薬は炎症性疾患、アレルギー・自己免疫疾患、悪性腫瘍など、きわめて多くの疾患の治療に際し現在もなお中心的な位置を占めている。しかし、グルココルチコイド療法には、1) 組織選択性・特異性がないこと、2) 副作用が必発であること、などの致命的な欠点が存在する。これは、グルココルチコイド受容体（以下、グ受容体）が組織によらず一種類であり、従来の合成グルココルチコイド薬はグ受容体との結合を指標にアゴニステイック作用の面からスクリーニングされたための、いわば当然の帰結といえる。

リガンド依存性転写制御因子であるグ受容体はグルココルチコイド薬と結合後核に移行し、標的遺伝子の近傍に存在する受容体特異的エンハンサーDNA配列との結合を介して標的遺伝子の発現を転写レベルで調節するとされてきた。私達は一貫してグ受容体による転写調節機構解明に取り組み、グ受容体を介した情報伝達は従来のモデルよりは複雑であり、他の情報伝達系とのクロストークなどによって多様に調節されることを世界に先駆けて明らかにしてきた (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991, *J. Biol. Chem.* 1993, *Endocrinology*, 1995、など)。実際に、グルココルチコイドの抗炎症・免疫抑制作用はグ受容体と転写因子AP-1・NF-kBの負の相互作用の面からも理解されている。すなわち、多くのサイトカインや接着分子の遺伝子発現はAP-1・NF-kBによって正に制御されており、グルココルチコイドはAP-1・NF-kBの作用を抑制して最終的に抗炎症効果・免疫抑制作用を現わすと考えられている。私達もかかる視点からグルココルチコイドの慢性関節リウマチにおける治療的意義を究明し (*Mol. Pharmacol.* 1994)、核内におけるグ受容体とこれらの転写因子の相互作用によってグルココルチコイドの作用が規定されることを明らかにした。換言すれば、AP-1、NF-kBを標的とした抗炎症・免疫抑制療法を考えたとき、いかに効率的にグ受容体を核に移行させるかがまず重要となる。一方、炎症局所において組織の酸化還元 (=レドックス) 制御系が破綻し強い酸化ストレスが生じることが知られている。私達は、酸化ストレスによってグ受容体のリガンド結合・核移行、そして標的遺伝子の転写調節活性が抑制されることを世界で初めて明らかにした (*BBRC* 1993, *Mol.*

Pharmacol. 1994, 1995, & 1996, *J. Clin. Invest.* 1996)。したがって、グルココルチコイドの抗炎症・免疫抑制作用を論じる上で、特に転写因子との相互作用を考えた際、グ受容体の核移行のレドックス制御は必須の検討課題である。次に、最近、核におけるグ受容体の転写調節機能もリガンドによって多様に調節されることが注目されている。すなわち、グ受容体による転写増強効果はみられず、抗AP-1作用が優位となるような、いわばドミナントネガティブ型リガンドが理論的には存在することが明確になり、グルココルチコイドの作用副作用分離に新たな展開を生む可能性がある。実際、私達も、胆汁酸製剤であるウルソデオキシコール酸はグ受容体を核移行させるものの正の遺伝子転写活性はきわめて弱いことを発見した (*J. Immunol.*, 1996)。さらに、この場合、MHC class II遺伝子発現を強く抑制することから、かかるドミナントネガティブ型リガンドのプロトタイプと考えられる。

以上のように、私達は、グ受容体を介した遺伝子発現が他の情報伝達系との緊密なクロストークを介して実に多様に調節され、複雑な生体機能調節に対応していること

を世界でも一早く報告してきた。同時に、私達の成績は、グ受容体以降の情報伝達経路は多面的に制御可能であり、かかる知見の発展的集積が抗炎症薬・免疫抑制薬創成に新展開をもたらす可能性が高いことを示唆している。

【目的】グ受容体を介した情報伝達経路の分子生物学的理解をさらに深め、新規抗炎症薬・免疫抑制薬創成の基盤となる、グ受容体以降の情報伝達系を多様にかつ選択的に調節する薬理学的方法を確立することを目的とする。具体的には、

- 1) 数十万種に及ぶ化合物ライブラリーから目的薬剤の候補を効果的経済的にスクリーニングするためのシステムの構築、
 - 2) グ受容体とAP-1、NF- κ Bをはじめとした他の転写因子の相互作用におけるリガンドの役割の解明と新規化合物によるかかる相互作用の修飾、
 - 3) グ受容体のレドックス制御機構の解明と酸化還元活性を有する新規化合物の作用の解析、
- を期間内に達成する。

【特色など】グルココルチコイド薬は約50年にわたり臨床医学に貢献してきたが、いまだに作用副作用の分離は達成されておらず、アゴニストの中からより理想的な薬剤を見い出そうとする従来の創薬方法論には限界がある。本研究は、私達のグ受容体以降の情報伝達系に関する先駆的知見に端を発し、従来とはまったく異なる視点から、かつ、分子細胞生物学的スクリーニング系によって新規薬剤を開発しようとするものである。独自の、しかもきわめて経済的な一次スクリーニング系（研究方法として後述）をはじめとした実験系はすでに当研究室で確立され稼働している。また、プロトタイプともいふべき化合物・薬剤は発見済みであり、その改良に向けて企業との協力体制もすでに構築されていることも本計画の実現性を高いものになっている（国内特許2件取得）。最終的に新薬開発に到達した場合、必然的に両刃の剣であったグルココルチコイド療法に革新をもたらし、炎症性疾患、アレルギー・自己免疫疾患、悪性腫瘍患者の予後を大きく改善することは疑いない。

【研究経過・成果】

[1] 化合物ライブラリーからの一次スクリーニング系の確立

・生細胞を用いてgreen fluorescent proteinで標識したグ受容体の核移行を検出するシステムを構築した。かかるシステムは他の転写因子の機能解析にも応用可能であることを証明した。

[2] グ受容体とAP-1との相互作用に対するリガンドの役割の解明

グ受容体を活性化するウルソデオキシコール酸がグ受容体依存性に転写因子AP-1応答性遺伝子発現を抑制することを明らかにした。

[3] グ受容体のレドックス制御機構の解明と酸化還元活性を有する新規化合物の作用の解析

グ受容体のリガンド結合・核移行、そして標的遺伝子の転写調節活性のレドックス制御の分子機構を明確したとともに、新規抗酸化剤EPC-K1によるグ受容体制御法を開発し、抗炎症療法の改良に貢献しつつある。

以上から、本研究計画が企図した『G受容体の分子生物学からの創薬』の根幹は構築されたと思われる。今後、このシステムを用いてさらに多くの化合物をスクリーニングし、理想的抗炎症薬を開発したい。

【研究組織】

研究代表者：田中廣壽（旭川医科大学医学部助教授）

研究分担者：阪上亨宏（千寿製薬創薬研究所グループマネージャー）

【研究経費】

平成9年度	2,300千円
平成10年度	1,600千円
計	3,900千円

【研究発表】

(1) 学会誌など

1. 英文総説

Hirotoishi Tanaka, Yuichi Makino
Thioredoxin in the endocrine response to stress.
Vitamins and Hormones, Academic Press,
(in press)

Hirotoishi Tanaka
Molecular Pharmacology of Glucocorticoids, in "Molecular and Genetic
Approaches to Diseases", Y. Niho, ed., Kyushu Univ. Press,
1998, pp. 75-84.

Hirotoishi Tanaka, Yuichi Makino, Kensaku Okamoto, Noritada Yoshikawa, Isao
Makino.
Redox regulation of glucocorticoid hormone action.
In "*Redox Regulation of Cell Signaling and its Clinical Applications*", eds. J.
Yodoi, L. Packer, Marcel Dekker Inc.,
(in press)

Isao Makino, Hirotoishi Tanaka
From a cholectic to an immunomodulator
J. Gastroenterol. Hepatol. 1998;13:659-664.

2. 英文原著

Shin-ichi Hayashi, Kyoko Hajiro-Nakanishi, Yuichi Makino, Hidetaka Eguchi,
Junji Yodoi, and Hirotoishi Tanaka.
Functional susceptibility of estrogen receptor by redox change with
reference to a role of thioredoxin as a mediator.
Nucleic Acids Res. 1997;25:4035-4040

Fuminori Hirano, Hirotoishi Tanaka, Takanori Miura, Yoshiko Hirano, Kensaku
Okamoto, Yuichi Makino, Isao Makino.
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.
Immunopharmacol. 1998;39:31-38.

Kensaku Okamoto, Hirotoishi Tanaka, Yuichi Makino, Isao Makino.
Restoration of the glucocorticoid receptor function by the phosphodiester
compound of vitamin C and vitamin E, EPC-K1 via a redox-dependent
mechanism.
Biochem. Pharmacol. 1998;56:79-86.

Masaki Hiramoto, Noriaki Shimizu, Kotaro Sugimoto, Jianwei Tang, Hirotoishi
Tanaka, Isao Makino, Hiroshi Handa.
Nuclear-targeted suppression of NF- κ B activity by the novel quinone

derivative E3330
J. Immunol. 1998;160:810-819

Fuminori Hirano, Hirotoshi Tanaka, Yoshiko Hirano, Masaki Hiramoto, Hiroshi Handa, Isao Makino, Claus Scheidereit.

Functional interference between Sp1 and NF- κ B through the same DNA binding site.

Mol. Cell. Biol. 1998;18:1266-1274

Fuminori Hirano, Mirra Chung, Hirotoshi Tanaka, Naoki Maruyama, Isao Makino, David Moore, Claus Scheidereit.

Alternative splice variants of I κ B β establish differential NF- κ B signal responsiveness in human cells.

Mol. Cell. Biol. 1998;18:2596-2607

Yuichi Makino, Noritada Yoshikawa, Kensaku Okamoto, Kiichi Hirota, Junji Yodoi, Isao Makino, Hirotoshi Tanaka.

Direct association with thioredoxin allows redox regulation of the glucocorticoid receptor function.

J. Biol. Chem., 1999;274(5): 3182-3188

Pekka Kallio, Kensaku Okamoto, Sullyan O'Brien, Pilar Carrerol, Yuichi Makino, Hirotoshi Tanaka, Lorenz Poellinger

Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α
EMBO J, 1998 17 (22): 6573-6586

Kensaku Okamoto, Hirotoshi Tanaka, Hidesato Ogawa, Yuichi Makino, Kazuhiko Umesono, Isao Makino.

Redox regulation of nuclear import of the glucocorticoid receptor.

J. Biol. Chem., in press

Kunimasa Yan, Akihiko Kudo, Hiroshi hirano, Takashi Watanabe, Tetsuya Tasaka, Saeko Kataoka, Noriko Nakajima, Yukino Nishibori, Toru Shibata, Takao Kohsaka, Eiji Higashihara, Hirotoshi Tanaka, Hidehiro Watanabe, Toshihiko Nagasawa, Shouichi Awa.

Subcellular localization of glucocorticoid receptor protein in the human kidney glomerulus.

Kidney International, in press

3. 邦文総説など

田中廣壽

ステロイド作用の調節因子

現代医療 1997;29(9):2363-2369

田中廣壽、府川悦士、川上隆子、牧野勲
バセドウ病とビタミンD
診断と治療 1997;85(7): 1168-1172

三浦貴徳、田中廣壽、牧野勲
第4章 肝胆膵、第4項 胆道疾患
認定医・専門医のための内科学レビュー' 97
総合医学社、東京、115-119, 1997

三浦貴徳、牧野雄一、田中廣壽
ステロイド（糖質コルチコイド） - 薬物療法の現状と課題
治療学 1997;30(2):259-262

牧野雄一、岡本健作、田中廣壽
ステロイド療法
リウマチ科 1997;17(3):242-250

田中廣壽
ひとアジュバント病
今日の治療指針 1997年版 (volume 39)
監修：日野原重明、阿部正和、総編集：稲垣義明、多賀須幸男、尾形悦郎
責任編集：石井明、他
p 615、医学書院（東京）、1997

田中廣壽、牧野雄一、三浦貴徳、岡本健作、平野史倫、牧野勲
ウルソデオキシコール酸（UDCA）によるMHCクラスII抗原遺伝子発現の抑制
臨床胆汁酸研究の進歩, pp 26-29
臨床胆汁酸研究会、編、1997

田中廣壽
悪心・嘔吐
図説 看護学学習辞典
学研, pp 105-107, 1997

田中廣壽
肝・胆道機能検査
図説 看護学学習辞典
学研, pp 195-196, 1997

田中廣壽
自己免疫疾患
図説 看護学学習辞典
学研, pp 404-406, 1997

諏訪昭、平形道人、浜信昭、石山香恵、天野宏一、田中廣壽、藤巻純子、三森経世、稲田
進一、秋月正史
回腸潰瘍穿孔と皮膚脂肪織炎を併発した成人皮膚筋炎の一例
日本臨床免疫学会雑誌 1997;20(1):60-66

田中廣壽、牧野雄一、岡本健作、三浦貴徳、平野史倫、牧野勲
MHCクラスII抗原遺伝子発現に及ぼすウルソデオキシコール酸 (UDCA) の影響
肝胆膵 1997;34(1): 37-40

青島優、田中廣壽、牧野勲
胆汁うっ滞
Annual Review 消化器1997;:45-49

田中廣壽、岡本健作、牧野雄一、小村景司、吉川賢忠、牧野勲
Green fluorescent protein (GFP) - グルココルチコイド受容体 (GR) キメラ蛋白発現
系を応用した免疫抑制薬のスクリーニング系の開発
臨床薬理 1997;28(1):389-340

田中廣壽
混合型クリオグロブリン血症 (Meltzer症候群)
疾患・症状別 今日の治療と看護
監修：水島 裕。南江堂 (東京)、p 683、1997

田中廣壽
Cogan 症候群
疾患・症状別 今日の治療と看護
監修：水島 裕。南江堂 (東京)、p 683、1997

田中廣壽
結節性紅斑
疾患・症状別 今日の治療と看護
監修：水島 裕。南江堂 (東京)、p 684、1997

田中廣壽

ひとアジュバント病

疾患・症状別 今日の治療と看護

監修：水島 裕。南江堂（東京）、p 684、1997

三浦貴徳、川上隆子、府川悦士、田中廣壽、牧野勲

少量アスピリン投与中に出血性脳梗塞を発症した抗リン脂質抗体陽性全身性エリテマトーデス

神経内科 1997;47(4):409-412

田中廣壽

特集：核内レセプター研究の最前線

『グルコルチコイドレセプターの機能』

医学のあゆみ、1998;186 (10):689-693

岡本健作、田中廣壽、吉川賢忠、牧野雄一、牧野勲

グルコルチコイド受容体 (GR) 核移行のレドックス制御

ホルモンと臨床 増刊号 1998;:

田中廣壽、牧野勲

エタノールと肝細胞におけるATL-derived factor / Thioredoxin遺伝子発現

BIOClinica 1998 ; 13(11) : 929-931

田中廣壽

グルコルチコイドの作用機構と膠原病におけるプレドニゾン使用の現状と将来

日本リウマチ財団ニュース 1998, No. 42、夏号

田中廣壽、半田宏、高山千利

転写因子NF- κ Bによる遺伝子発現機構の解明と抗NF- κ B薬開発に関する研究

臨床薬理の進歩' 98 別刷、pp119-121.

田中廣壽、岡本健作

グルコルチコイドレセプターの細胞内局在

神経研究の進歩、1998 ; 42(4) : 558-565

田中廣壽

膠原病の臨床

医薬ジャーナル、1998 ; 34(5) : 75-81.

田中廣壽

Chiari-Frommel syndrome

診断と治療 1998;86 (suppl) 症候群辞典, p 426.

田中廣壽

Climacteric syndrome

診断と治療 1998;86 (suppl) 症候群辞典, p 427.

田中廣壽

Conn's syndrome

診断と治療 1998;86 (suppl) 症候群辞典, p 428.

田中廣壽

Reiter syndrome

診断と治療 1998;86 (suppl) 症候群辞典, p 675.

田中廣壽

結節性紅斑症候群

診断と治療 1998;86 (suppl) 症候群辞典, p 660.

田中廣壽

高齢者の薬物療法の一般的注意 - 代謝性医薬品

耳鼻咽喉科・頭頸部外科 70(5), 173-177, 1998

三浦貴徳、田中廣壽、牧野勲

胆汁うっ滞

Annual Review 消化器1998, pp 279-282, 中外医学社

三浦貴徳、田中廣壽、牧野勲

肝・胆道の生理と病態、症状、検査法

『クリニカルファーマシーのための医学概論』、医薬ジャーナル社、1998, in press

青島優、田中廣壽、牧野勲

Ethanolによる肝細胞のATL-derived factor / Thioredoxin遺伝子発現の誘導

『アルコールと医学生物学 - アルコール性臓器障害研究の新しい展開』、アルコール
医学生物学研究会、編、pp 117-120、1998

田中廣壽、伊藤正春、牧野勲

AIHに対するUDCA療法

Medicina 1998;35(1):71-73

田中廣壽

今日の治療指針 1999

アナフィラキシーショック、医学書院 1999, 604-605.

田中廣壽

NF- κ Bによる遺伝子発現機構とその人為的制御

臨床免疫 1999; 印刷中

府川悦士、田中廣壽、牧野勲

胆汁酸による肝細胞障害とアポトーシス

消化器病セミナー1999; 印刷中

吉川賢忠、野村嘉伸、田中廣壽

全身性エリテマトーデスとサイトカイン

リウマチ科 1999, 印刷中

田中廣壽、牧野勲

特集：慢性肝疾患最近の動向

II. 慢性肝疾患の基礎 『肝と免疫』

TOKYO TANABE QUARTERLY 1999;43:38-45

三浦貴徳、田中廣壽

胆汁うっ滞

Annual Review 消化器 1999, 287-291, 中外医学社

(2) 口頭発表 (主なもの)

Karolinska Institutet Internal Seminar

7月3日、Stockholm, Sweden, Department of Cell and molecular Biology,
Medical Nobel Institute, Karolinska Institutet

Redox regulation of intracellular dynamics of the glucocorticoid receptor

○Hirotoshi Tanaka

Helsinki University Internal Seminar

6月30日、Helsinki, Finland, Institute for Biomedicine, Helsinki University
Intracellular dynamics of the glucocorticoid receptor

○Hirotoshi Tanaka

III International Congress of Pathophysiology

6月28日－7月3日、Lahti, Finland, Lahti Cultural Centre

Symposium: Redox and Signal

Redox regulation of the glucocorticoid receptor: crosstalk between cellular redox system and glucocorticoid-mediated gene expression

Hirotoishi Tanaka

第21回 日本分子生物学会

12月16－19日、横浜市、パシフィコ横浜

エストロゲンレセプターのレドックス制御機構の変異体を用いた解析

中西京子、江口英孝、田中廣壽、林慎一（埼玉県立がんセンター研究所）

第20回 細胞情報伝達系北海道研究会

10月3日、札幌市、札幌パークホテル

シンポジウム『酸素による遺伝子発現の制御』

田中廣壽

第19回 日本炎症学会

9月3、4日、東京都、京王プラザホテル

シンポジウム『グルココルチコイドレセプターシステムを標的とした分子薬理的創薬』

田中廣壽

第19回 日本炎症学会

9月3、4日、東京都、京王プラザホテル

雷公藤抽出物、GTWのシクロオキシゲナーゼ-2発現抑制作用

杜 金行、川合真一、前川浩太郎、西田信一、吉川賢忠、岡本健作、田中廣壽、水島裕

第71回 日本内分泌学会

6月4－6日、福岡市、アクロス福岡

シンポジウム：核内レセプター研究の新展開

『グルココルチコイド受容体システムのダイナミズム』

田中廣壽