
グルコルチコイド作用調節機構に関する研究

(課題番号：05670833)

→ 平成6年度科学研究費補助金

一般研究(C)

研究成果報告書

平成7年2月

研究代表者 田中廣壽

(旭川医科大学医学部講師)

研究組織

研究代表者： 田 中 廣 壽 （旭川医科大学医学部講師）

研究経費

平成5年度	170千円
平成6年度	40千円
計	210千円

研究発表

(1) 学会誌などの論文発表

1. Makino Y, Tanaka H, Makino I.
Paradoxical derepression of the collagenase gene expression by anti-rheumatic gold compound aurothiomalate.
Mol Pharmacol 1994;46:1084-1089
2. Takiyama Yu, Tanaka H, Takiyama Yo, Makino I.
The effects of hydrocortisone and RU486 (Mifepristone) on iodide-uptake in porcine thyroid cells in primary culture.
Endocrinology 1994;135:1972-1979.
3. Tanaka H, Hirano F, Nomura Y, Makino Y, Fukawa E, Makino I
Relative glucocorticoid potency revisited.
Rheumatol Int 1994;14:9-12.
4. Fukawa E, Tanaka H, Makino Y, Hirano F, Akama H, Kawai S, Makino I
Homologous down-regulation of the glucocorticoid receptor down-modulates cellular hormone responsiveness in human histiocytic lymphoma U937 cells.
Endocrine J 1994;41:623-630.
5. Makino Y, Tanaka H, Nakamura K, Fujita M, Akiyama K, Makino I
Arthritis in a patient with psoriasis after interferon alfa therapy for chronic hepatitis C
J Rheumatol 1994;21:1771-1772.

6. Sekio Nagakawa, Tsuyoshi Yokoi, Hirotohi Tanaka, Yasuro Kawaguchi, Tomonobu Shirasaka, Tetsuya Kamataki.
Occurrence of autoantibody to protein disulfide isomerase in patients with hepatic disorders.
J. Toxicological Sciences. 1994;19:163-169.
7. Hideto Akama, Hirotohi Tanaka, Tadashi Yoshida, Hideto Kameda, Shin-ichi Kawai.
Glucocorticoid-unresponsive fever in a patient with Weber-Christian disease.
Br. J. Clin. Prac. 1994;48(3):161-162.
8. 府川悦士、田中廣壽、牧野勲
メラトニン
臨床検査増刊号 ホルモンと生理活性物質 1994;38(11):282-284
9. 田中廣壽、平野史倫、牧野勲
胆汁酸と消化器病 - 最近の進歩
胆汁酸と細胞内情報伝達
消化器病セミナー 1994;56:51-62
10. 三浦貴徳、田中廣壽
膠原病の免疫療法 - 理論と実践
炎症と免疫 1994;2(1):80-87
11. 市川陽一、山田秀裕、田中廣壽、吉田正
全身性エリテマトーデスに対するシクロフォスファミド・パルス療法
リウマチ 1994;34(3):675-683
12. 田中廣壽
自己免疫疾患の治療と分子生物学
- 糖質コルチコイド薬
Modern Physician 1994;14(12):1523-1525
13. 平野史倫、田中廣壽、牧野雄一、三浦貴徳、野村嘉伸、牧野勲
肝細胞における内因性胆汁酸の主要組織適合抗原(MHC) class I遺伝子発現
調節機構
日本組織適合性学会誌 1994;1(1):45-46

(2) 口頭発表

1. 府川悦士、牧野雄一、野村嘉伸、稲場守、三浦貴徳、平野史倫、田中廣壽、牧野勲
メラトニン受容体とGTP結合蛋白質との機能的共役に関する検討
第61回北海道ホルモン同好会
2月19日、札幌市、ホテルニューオータニ札幌

2. 田中廣壽、平野史倫
ウルソデオキシコール酸(UDCA)の作用機構に関する研究
第80回日本消化器病学会総会、クリニカルフォーラム
4月22日～24日、神戸市、神戸国際会議場ほか

3. 田中廣壽、牧野雄一、府川悦士、三浦貴徳、野村嘉伸、稲場守、平野史倫、牧野勲
E3330によるグルココルチコイドレセプター(GR)の翻訳後修飾とグルココルチコイドホルモン(GC)作用の増幅
第67回日本内分泌学会学術総会
6月1日～3日、長崎市、長崎市公会堂ほか

4. 田中廣壽、牧野雄一、府川悦士、野村嘉伸、三浦貴徳、稲場守、平野史倫、牧野勲
金製剤とコラゲナーゼ(COL)遺伝子発現調節
第91回日本内科学会講演会
4月14日～16日、新潟市、新潟県民会館ほか

5. 田中廣壽、牧野雄一、三浦貴徳、平野史倫、府川悦士、野村嘉伸、稲場守、牧野勲
胆汁酸とグルココルチコイドレセプターの転写調節活性
第30回日本肝臓学会総会
7月8日～9日、旭川市、旭川市民文化会館

6. 田中廣壽、牧野雄一、府川悦士、三浦貴徳、野村嘉伸、稲場守、平野史倫、牧野勲
コラゲナーゼ遺伝子発現における金製剤とステロイド剤の相互作用
第38回日本リウマチ学会総会
4月27日～29日、東京都、日本都市センター、全共連ビル

7. 田中廣壽、牧野雄一
グルココルチコイド受容体と遺伝子発現調節
第67回日本内分泌学会秋季学術大会、シンポジウムIV
『受容体研究最近の進歩』
11月16日～17日、広島市、広島国際会議場

8. 田中廣壽、牧野雄一、牧野勲、広田喜一、淀井淳司
グルココルチコイドレセプター(GR)機能のレドックス制御
第24回日本免疫学会総会・学術集会、
ワークショップ10『細胞内シグナル伝達機構』
11月29日～12月1日、京都市、国立京都国際会館
9. 田中廣壽
ステロイド大量療法に理論的裏付けはあるのか
- グルココルチコイドレセプター(GR)機能の翻訳後修飾とグルココルチコ
イド応答性遺伝子発現について
第2回ステロイドホルモン研究会
11月19日、東京都、全共連ビル
10. 田中廣壽
RAの薬物療法
日本医師会生涯教育講座学術講演会
9月2日、旭川市、旭川パレスホテル
11. 平野史倫、田中廣壽、牧野雄一、府川悦士、三浦貴徳、野村嘉伸、
稲場守、牧野勲
主要組織適合抗原 (MHC) class II発現に及ぼすDexamethasone (DEX) の
抑制調節機構の検討
第38回日本リウマチ学会総会
4月27日～29日、東京都、日本都市センター
12. 平野史倫、田中廣壽、牧野雄一、府川悦士、三浦貴徳、野村嘉伸、
稲場守、牧野勲
肝細胞における内因性胆汁酸の主要組織適合抗原 (MHC) class I 発現調
節機構
第30回日本肝臓学会総会
7月8日～9日、旭川市、旭川市民文化会館
13. 平野史倫、田中廣壽、牧野雄一、三浦貴徳、野村嘉伸、牧野勲
肝細胞における内因性胆汁酸の主要組織適合抗原 (MHC) class I 遺伝子
発現調節機構
第3回日本組織適合性学会総会
7月20日～22日、浜松市、フォルテ
14. 平野史倫、田中廣壽、野村嘉伸、牧野勲
内因性胆汁酸による主要組織適合抗原 (MHC) class I 遺伝子発現調節機
構の解明
第36回日本消化器病学会総会
10月31日～11月2日、仙台市、仙台国際センター

15. 平野史倫、田中廣壽、岡本健作、牧野雄一、三浦貴徳、野村嘉伸、
牧野勲
内因性胆汁酸による主要組織適合抗原（MHC）class I 遺伝子発現調節機構
の解明
第24回日本免疫学会総会・学術集会
11月29日～12月1日、京都市、国立京都国際会館
16. 牧野雄一、田中廣壽、府川悦士、三浦貴徳、野村嘉伸、稲場 守、
平野史倫、牧野 勲
Jaccoud型関節炎を呈したSLEの1例
第10回 北海道膠原病談話会
3月5日、札幌市、住友商事・フカミヤ大通ビル
17. 牧野雄一、田中廣壽、府川悦士、三浦貴徳、野村嘉伸、稲場 守、
平野史倫、牧野 勲
IL-1によるコラゲナーゼ遺伝子発現に対する金製剤の効果の検討
第38回 日本リウマチ学会総会
4月27日～29日 東京都、日本都市センター
18. 牧野雄一、田中廣壽、府川悦士、三浦貴徳、野村嘉伸、稲場 守、平野
史倫、牧野 勲
金イオンによるグルココルチコイドレセプター（GR）の翻訳後修飾と
グルココルチコイドホルモン（GC）作用の抑制
第38回 日本リウマチ学会総会
4月27日～29日 東京都、日本都市センター
19. 牧野雄一、田中廣壽、府川悦士、三浦貴徳、野村嘉伸、稲場 守、
平野史倫、牧野 勲
金属イオンによる核レセプターを介した細胞内情報伝達機構の調節に関する
研究
第67回 日本内分泌学会学術総会
6月1日～3日 長崎市、長崎市公会堂
20. 牧野雄一、平野史倫、三浦貴徳、府川悦士、野村嘉伸、稲場 守、田中
廣壽、牧野 勲
ウルソデオキシコール酸 (UDCA) による転写調節因子AP-1(c-Fos/c-Jun)の
発現制御
第30回 日本肝臓学会総会
7月8日～9日 旭川市、旭川市民文化会館
21. Yuichi Makino, Hirotohi Tanaka, and Isao Makino.
Repression of the glucocorticoid receptor function by heavy metal ions.
IX International Congress on Hormonal Steroids
Sep. 24-29, Dallas, Hyatt Regency Dallas at Reunion.

概要

グルココルチコイドは副腎皮質より分泌される生体代謝・ストレス応答に必須のホルモンである。また、グルココルチコイドは炎症性疾患、自己免疫性疾患などの治療薬としても臨床上きわめて汎用されている。ここで、グルココルチコイドは標的臓器に存在するDNA結合性遺伝子転写調節因子であるグルココルチコイド受容体と結合後その作用を発現するとされ、したがって、標的臓器におけるかかる受容体の量とホルモン作用の間には密接な関連があることが想定されてきた。しかし、細胞のグルココルチコイド応答性制御機構の詳細は現在も不明な点が多い。さらに、グルココルチコイド受容体は組織を問わず一種類であるためグルココルチコイドの主作用、副作用、あるいは薬理作用の分離は原理的に不可能であると信じられてきた。

以前、リポコルチンに関連した一連の研究のごとく、GCによって抗炎症作用を有する生理活性物質の合成が誘導され、例えば、フォスホリパーゼA2などの作用を抑制する、という仮説が提唱されこの問題がいきなり解決するかに思えた。だが、最近のGC受容体に関する分子生物学的研究によってGCはかなり多様な作用機構によって抗炎症作用を発現することが判明しつつある。そこで、GCの作用機構を概説し本研究の意義を明確にしたい。

1. GCの作用機構

GCは細胞膜を拡散によって通過後細胞質内に存在するGC受容体と会合する。GC受容体は、本来、数種の熱ショック蛋白(hsp90など)と分子シャペロンを形成し非活性型として存在する。GCと結合後GC-GC受容体複合体となり(このプロセスを生化学的に活性化と称することがある)核に移行する。核内でGC-GC受容体複合体は二量体を形成して標的遺伝子上の特定の塩基配列(GRE)と結合しその転写速度を調節して、mRNA、蛋白の合成を制御することによって作用を発現すると考えられてきた。しかし、最近、GC作用機構を理解するにあたり、かかる古典的モデルに加えて遺伝子転写レベルにおける蛋白-蛋白相互作用の重要性が指摘されつつある。GC-GC受容体複合体がTBP(TATA box binding protein)などの基本的転写調節因子と相互作用を行なう際、非DNA結合性の蛋白(アダプターなどと呼ばれている)の介在を要することを示唆する成績が、特に酵母などの実験系から出されている。ここで、ステロイドホルモン受容体は一つの遺伝子ファミリーを形成し、例えば甲状腺ホルモン受容体、レチノイン酸受容体、ビタミンD3受容体では細胞

内のRXRと命名された同じファミリーのメンバーを加えてホモあるいはヘテロ二量体を形成することでリガンドの作用に多様性あるいは組織選択性を付加している可能性が示されている。GC受容体に関し、かようなヘテロ二量体を形成することを示した実験はないが、今後、アダプター蛋白の同定を含め、急速な展開を見せそうな研究領域といえる。さらに、GC受容体と相互作用を行なうことが明らかとなった転写因子にAP-1、NF- κ B、CREBなどがある。われわれも、GC作用の発現（この場合、ホルモン応答性遺伝子のON-OFF、の意）を規定する因子に興味を持ち、以下のモデルを提唱した。すなわち、ホルモン応答性遺伝子の転写調節領域にはもともと負の転写因子が結合しており、いわば正の転写因子であるGC-GR複合体の量が機能的にかかる負の転写因子の量を越えたときに転写が開始される、というものである。おそらく、この負の転写因子とGC受容体は競合的にDNAに結合しており、GC受容体とDNAの結合が優位になるとTBPなどの基本的転写因子とGC受容体が機能的に相互作用可能となるのではないかと想像される。このような負の因子をヒトで同定できればホルモン応答性を遺伝子特異的に制御することに直結すると考えられ、今後の臨床応用も期待される。また、従来のモデルではGC受容体はリガンドであるGC非存在下では細胞質中に恒常的に存在していることを前提にしていた。しかし、われわれの最近の成績ではGC受容体はリガンド非存在下でもかなりダイナミックに細胞内を、特に細胞質-核間を動き回ることを示している。かかる現象の生物学的意義は今後の検討を待たねばならないが、いずれにせよ、GC作用機構の古典的理解を改めなくてはならないと考えさせる報告は多い。

2. GCの抗炎症作用

GCを免疫系、炎症に作用することを期待して投与する場合、多くはその抑制作用を利用している。したがって、先述のリポコルチンのごとき抗炎症蛋白の合成が促進される可能性に加えて、免疫系あるいは炎症において重要な役割を演じる様々なサイトカインなどの生理活性物質の合成・作用を抑制するGCの機構が注目されている。特に、これらの物質の合成は多くは遺伝子転写レベルでAP-1、NF- κ Bなどの転写因子によって正の調節を受けているためGC受容体とこれらの転写因子間の相互作用がさかんに研究されている。ここではそのうちの代表的なものを述べてみたい。

(1) 転写因子との相互作用

コラゲナーゼ遺伝子発現はIL-1、

TNF α などの炎症性サイトカインによって誘導されGCによって逆に抑制される。IL-1、TNF α によるコラゲナーゼ遺伝子発現誘導は主に転写因子AP-1を介した作用であり、事実、コラゲナーゼ遺伝子プロモーター上にAP-1結合DNA配列の存在が示されている。ここで、AP-1は細胞内癌関連遺伝子c-fos、c-junの産物であるFos、Junが各々のロイシンジッパー構造で結合した主にヘテロ二量体である。しかし、コラゲナーゼ遺伝子プロモーター上にはいわゆるGREあるいは負のGRE(nGRE)は存在せず、GCによるコラゲナーゼ遺伝子発現抑制機構は不明であった。1990年、Herrlichらのグループによる報告に端を発し、GC受容体がAP-1と蛋白レベルで相互作用することによってAP-1による転写制御に拮抗することが判明した。この際、GC受容体のDNA結合領域はAP-1作用の抑制に必須であるがGC受容体自身はDNAと結合せず、蛋白-蛋白相互作用によることが間接的に示されている。実際、AP-1によって誘導を受ける遺伝子はきわめて多く、かかる機序はGCの負の作用機構として重要と考えられ、今後ますます臨床的検討が加えられていくであろう。さらに、AP-1はT細胞活性化後IL-2の転写開始の際にも必須の転写因子といえる。すなわち、T細胞の細胞質中に存在する非活性化型転写因子NF-ATpは活性化AP-1と会合後核に移行しIL-2遺伝子プロモーター上のNF-AT応答性DNA配列に結合してIL-2遺伝子の転写を正に誘導する。したがって、GCによるT細胞機能の抑制はかかるIL-2転写抑制作用と関連が深いのもかもしれない。また、最近、ほとんどすべての細胞で発現あるいは誘導されるNF-kBもGC受容体と相互作用することが示された。NF-kBも、AP-1同様、免疫グロブリン遺伝子をはじめとした多くの遺伝子の発現制御に密接に関連しており、今後の研究の展開が楽しみである。したがって、GC作用機構がこれらの転写因子との相互作用の面からより明らかにされればGC受容体分子を何らかの方法で修飾することによって、GCを用いないGC療法ともいえる、新たな治療法開発に直結するかもしれない。

3. その他のトピックス

最近、IL-1の作用機構に関して興味深い報告がある。IL-1の受容体には少なくとも二種類あり、一方がIL-1結合後細胞内に情報を伝達するいわば機能的IL-1受容体であるのに対し(IL-1A受容体)、他方はIL-1結合能力はあるもののIL-1作用を伝搬しないいわばdecoy targetであるというものである(IL-1B受容体)。なんとGCはかかるIL-1B受容体発現を正に誘導するらしい。したがって、decoy targetを増やすことでIL-1の作用を相対的に減弱させる可能性があり、臨床応用への発展も期待される。

また、GCが血管内皮細胞における接着分子であるICAM1の発現を抑制することも報告され、やはり、GCの抗炎症作用との関連が注目されている。

4. まとめ

従来、GC受容体は一種類であり、したがって、薬剤としてリガンドを投与した際は作用副作用の分離は理論的に不可能であると考えられていた。

しかし、GCの抗炎症機構に関する最近の報告をまとめてみると、その作用機構が分子レベルでかなりの多様性をもって解明されつつあることに気がつく。また、GCの作用を媒介するGC受容体に関する理解も急速に深まっている。したがって、今後、GC療法の原理を応用した選択性の高い免疫抑制あるいは抗炎症療法が開発されることを確信している。

研究目的

本研究は生体におけるグルココルチコイドホルモン応答性調節機構を、

- 1) グルココルチコイド受容体遺伝子の発現調節機構、
 - 2) グルココルチコイド受容体と転写因子の相互作用、
 - 3) グルココルチコイド作用発現におけるグルココルチコイド受容体と転写因子の意義、
- から解明することを目的とする。

研究結果・考案

1) グルココルチコイド受容体遺伝子がグルココルチコイドによって負の調節を受けることを確認した(論文4)。かかるグルココルチコイド受容体のdown-regulationとグルココルチコイドに対する生体の感受性には密接な関連が存在した(論文4)。グルココルチコイド受容体遺伝子自体の発現調節機構を組換えDNA実験などによって解明する目的ですでにプロモーターを含むヒトグルココルチコイド受容体遺伝子をクローニングした。

2) 研究者は、R.M.Evans、K.R.Yamamoto、M.Karin、P.Herrlichらと相前後して、グルココルチコイド依存性の遺伝子発現がグルココルチコイド受容体と他の核内蛋白との蛋白-蛋白相互作用を介して多様な調節を受けることを明かにした(*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991, *J. Biol. Chem.* 1993)。最近、中でも、プロテインキナーゼAの核内メディエーターである転写因子CREBとグルココルチコイド受容体の相互作用の生理的意義の一部を明確にした(論文2)。また、グルココルチコイドの抗炎症・免疫抑制作用にグルココルチコイド受容体と転写因子AP-1(c-fos/c-jun)・NF- κ Bの負の相互作用が重要であることも判明しつつあり(論文1)、かかる転写因子の相互作用と病態との関連は現在最もホットな研究領域の一つである。一方、研究者はグルココルチコイド受容体蛋白自体が、AP-1・NF- κ Bなどの報告と同様に、重金属・酸化ストレスなどによって修飾を受け、その遺伝子転写調節活性に変化を生じうることを報告した(*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993、論文1、投稿中)。すなわち、グルココルチコイド依存性遺伝子発現はその受容体蛋白あるいは相互作用する転写因子などの核内蛋白の翻訳後修飾によっても制御される。

3) グルココルチコイド受容体の細胞内における翻訳後修飾機構と機能の関連を検討した。現在までに、グルココルチコイド受容体において酸化ストレスによりDNA結合部分のシステインが酸化されDNA結合能を失うことが判明した(投稿中)。一方、転写因子によっては酸化ストレスに抵抗性のものもある。したがって、細胞は、あるいは遺伝子発現は細胞外からのストレスに対してきわめて多様な応答を転写因子群の修飾によって行っていることが示唆された(投稿中)。

結語

グルココルチコイドホルモンに対する生体の応答が他の転写因子・細胞内情報伝達系あるいは細胞内環境の変化（酸化還元状態など）によってきわめて多様な調節を受けうることを明かにした。本研究成果は細胞レベルにおけるグルココルチコイドあるいはストレス応答の制御機構の概念に画期的な進歩をもたらすものとする。さらに、かかる知見の発展的集積はグルココルチコイド作用のきわめて多彩な制御法開発、ひいては、グルココルチコイドの作用副作用の分離法開発にも直結する可能性が大であり、臨床医学的貢献度も高いと考える。

将来の展望

今後、

- 1) グルココルチコイド受容体遺伝子発現に重要な転写因子の同定、
- 2) CREB、AP-1、グルココルチコイド受容体相互作用の分子機構の理解
— グルココルチコイド受容体中の相互作用に重要なドメインの同定、
- 3) ストレス応答とグルココルチコイド受容体の酸化還元制御の関連の究明、
を具体的目標にしている。