

氏 名	村山 友樹
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	博甲第 9234 号
学位授与年月	平成31年4月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Glucocorticoid receptor による Clock 複合体を介した Rev-erb $\alpha$ (Nr1d1) の抑制性転写制御メカニズム
主 査	筑波大学教授 博士（薬学） 本間 真人
副 査	筑波大学教授 博士（医学） 竹越 一博
副 査	筑波大学准教授 博士（生物科学） 村谷 匡史
副 査	筑波大学講師 博士（医学） 中馬越 清隆

## 論文の内容の要旨

村山友樹氏の博士学位論文は、種々の疾患に用いられる Glucocorticoids (GC) の Rev-erb $\alpha$  (Nr1d1) 発現抑制作用に Glucocorticoid receptor (GR) が circadian locomotor output cycles kaput (Clock) と複合体を形成して Ebox に結合することの関与を明らかにしたものである。その要旨は以下のとおりである。

GC は臨床上非常に重要な薬剤であり、種々の疾患に広く使用されているが、同時に副作用もしばしば問題となり、その軽減は重要な課題である。GC のレセプターである GR は様々な転写活性を持つ転写因子であり、GC の薬理作用の多くはこの転写活性を介して発現しているが、そのメカニズムの詳細は不明である。著者は GR の新しい転写制御メカニズムを明らかにすることができれば、GC の作用増強や副作用軽減につながると考えており、本研究では糖・脂質代謝および時計遺伝子と関連の深い Nr1d1 に着目して GR による新規転写制御メカニズムの解析を行っている。

【対象と方法】著者は、副腎切除マウスを用いて GR リガンドであるデキサメタゾン (DEX) 投与による遺伝子発現の変化をマイクロアレイによって解析し、発現変動する遺伝子の網羅的検索を行っている。すなわち DEX 投与により発現変動が大きく、再現性の高い遺伝子に着目し、そのプロモーター領域における GR クロマチン免疫沈降の既報データを参照して、GR が直接ゲノムに作用すると考えられる新規の GR 転写制御メカニズムを有する可能性のある遺伝子の選定を試みている。またその機能については、マウスの肝臓における Nr1d1 の遺伝子発現の抑制効果を対象にプロモーター解析を行っている。解析の手法は培養細胞におけるルシフェラーゼアッセイに加えて in vivo Ad-luc 法を用いて生体でのプロモーター解析も行っている。著者は、抑制性の制御は古典的な GR の結合配列 (GRE) による遺伝子発現調整ではないと考えており、特に GR と複合体を形成する蛋白に注目してメカニズムの解析を進めている。

【結果】著者は副腎切除術マウスに、DEX 投与すると肝臓における Nr1d1 の発現が抑制されることを確認している。また、in vivo Ad-luc 法によって、生体のマウス肝臓におけるプロモーター解析を行ったところ、DEX 投与が Nr1d1 のプロモーター活性を抑制していることを明らかにした。この現象は細胞においても認められ、Bmal/Clock の発現下において GR および DEX 依存性の Nr1d1 のプロモーター活性が抑制されることを、複数の細胞株で確認している。さらに、Nr1d1 プロモーター上の Ebox 領域のみに限定しても同様の抑制が認められることから、著者は、GR が Ebox 上で Nr1d1 を抑制していると予想している。また、すでに GR との関連が知られている抑制性の時計遺伝子である Per1 をノックダウンしてその影響を排しても同様の Nr1d1 抑制が残存することから Per1 以外を介した現象である可能性を推察している。

著者は免疫沈降実験によって Clock-GR 複合体の形成を細胞株およびマウス肝臓で検証し、核内ではリガンド依存性に複合体を形成していることを明らかにした。すなわちマウスの肝臓の核内における Ebox への GR の結合はリガンド依存性であり、Clock の Ebox への結合には影響しないことを確認している。これらの結果より、GR はマウスの肝臓においてリガンド依存性に核内移行し、Clock と蛋白-蛋白結合することによって Ebox 上に結合し、Nr1d1 の転写を抑制することを明らかにした。

【考察】GR の転写制御メカニズムはこれまでにいくつか報告されているが、著者は本研究結果から GR の転写抑制メカニズムは、「テザリング」として知られる他の転写因子との蛋白-蛋白結合による特異的配列に対する抑制効果であることを明らかにした。同様な様式は、これまでに AP-1 や NF- $\kappa$ B などの遺伝子でも報告されているが、著者は今回の GR と Bmal/Clock との複合体形成も新たにこのリストに入ると考えている。また GR と Clock 複合体以外の遺伝子の Ebox 上でも同様の転写制御メカニズムが想起されるが、本研究ではそこまでの検証に至らず、今後の課題であると述べている。

時計遺伝子はそれぞれの因子が複雑なフィードバックシステムを形成しているが、著者は、通常の GR の発現変動と Nr1d1 の発現変動は逆位相を取っており、互いに抑制効果により日内ループを形成していると考えている。また、ストレス時などの末梢臓器における日内リズムの変動を必要とするときには、GC の分泌によって時計周期を調整する生理学的な意義や他の臓器特異的因子による抑制メカニズムの関与についても言及している。時計中枢に関しては、肝臓と異なり視交叉上核ニューロンに GR が発現していないことから、著者は中枢の時計遺伝子はストレスなどの影響の少ない規則正しい日内リズムを形成することができる理由の一つとも考えている。

時計遺伝子の Nr1d1 は糖・脂質代謝にも関与する遺伝子であり、発現が減少すると中性脂肪の増加や肥満などに影響することから、著者はそのリガンドとなる物質は代謝疾患の治療薬として開発が期待されると考えている。本研究の結果から、著者は GCs の脂質代謝への副作用の一部は、Ebox 上での GR と Clock 複合体を介した Nr1d1 の抑制による可能性が考えられ、これらに介入することが、GC の副作用軽減につながると期待している。

【結論】GC の作用機序として、リガンド依存的に GR が Clock と核内で複合体を形成し、分子的な結合で直接 Ebox 上に結合することにより、時計遺伝子の Nr1d1 の発現を抑制するという新しい GR の転写制御メカニズムの関与をはじめて明らかにした。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

本研究は、転写因子を介した GC の薬理作用のうち時計遺伝子である Nr1d1 の発現抑制の分子機序について検討したものであり、リガンド依存的に発現した GR が核内で Clock と複合体を形成し、Ebox に結合することの関与を初めて明らかにしたものである。本知見は多様な薬理作用を有する GC の作用機序の一端を明らかにする上で有用であり、副作用解明との関連からも期待されるものである。

平成 31 年 2 月 27 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。