

テクニカルノート

感情障害患者の糖質コルチコイド受容体解析

信本政昭, 松原敏郎, 渡辺義文

山口大学医学部高次統御系・神経精神医学講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 感情障害, 糖質コルチコイド受容体, 鉱質コルチコイド受容体, アポトーシス

1. はじめに

糖質コルチコイドは, ステロイド製剤として臨床現場で日常的に利用されているにもかかわらず, 受容体を介した作用の分子生物学的解明は意外な程に進まぬまま今日に至っている. その未知の作用の一例として, 精神科領域疾患である感情障害との関連がある.

2. 古典的な糖質コルチコイド受容体の作用機序

糖質コルチコイド受容体には, glucocorticoid receptor (GR) の他に, 鉱質コルチコイド受容体を兼ねたmineralcorticoid receptor (MR) が存在し, 発現する臓器やその局在・細胞が異なるが, GRとMRが共に発現する細胞も存在する¹⁾. 両者は活性化されるとホモ二量体を形成して核内に移行し, 標的遺伝子のプロモーターにあるホルモン応答配列(GRE)に結合し転写を活性化させる(図1). こうして肝細胞の糖新生関連酵素や免疫細胞のサイトカインが誘導されることなどにより, 糖質コルチコイドの作用が発現すると考えられている.

3. 新しいGRの作用機序

GRにより転写が抑制される遺伝子のプロモーター領域にはGREとは異なる配列(nGRE)が存在し, 古典的なGRホモ二量体の結合を要さず, 他

の転写因子(AP-1, NFκ-B)との相互作用を介して転写抑制が起こると考えられている. MRにはこのような作用は知られておらず, 従って過剰な糖質コルチコイドによる視床下部-下垂体-副腎皮質(HPA)系へのフィードバック抑制は主としてコルチコトロピン遊離促進ホルモン(CRH)遺伝子²⁾やPOMC(ACTHの前駆体)遺伝子³⁾のプロモーター領域に存在するnGREを介した, GRによる転写抑制によるものと考えられている.

GRは核内での転写調節だけではなく, 細胞質内のシグナル伝達に関与する蛋白質群との相互作用^{4,5)}を介して(図1)アポトーシス(リンパ球⁴⁾, 海馬⁶⁾)や細胞防御(多核球⁷⁾, 心筋⁸⁾)を調節することが明らかにされつつある. 糖質コルチコイドが細胞種によりアポトーシスに働くか, 細胞防御に働くかを決定する機構は不明である. ヒトに限っては従来のGR(GRα)とは異なるisoform GRβの存在が知られており, GRβがリンパ球や多核球のアポト

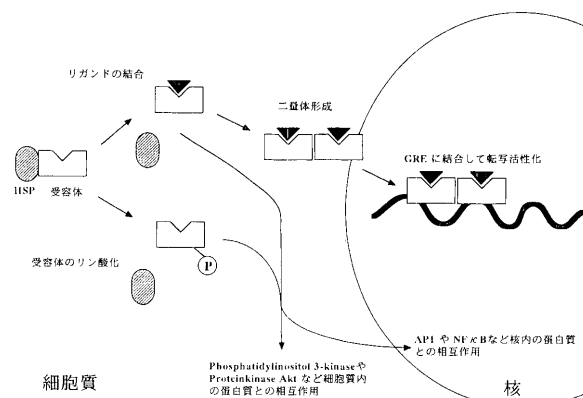


図1 GRの作用機序

平成15年1月14日受理

シスや細胞防御の調節に重要な働きをすることが示されている⁷⁾。GR Eへの結合能を除去し、他の蛋白質との相互作用機能のみを残したGRのノックインマウスの実験により、他の蛋白質との相互作用の方がGR Eに結合しての転写調節よりも生体存続にとり重要であることが示されており⁸⁾、今後の感情障害におけるGR機能の解析においてもこの点に着目した研究が必要であると思われる。

4. 感情障害とGR

心理的ストレスと感情障害との関連から、ストレスホルモンである糖質コルチコイドを感情障害と結びつける発想は自然であり、事実、HPA系のフィードバック抑制機能低下によると思われる高コルチゾール血症が感情障害患者に高率に見られている。一方、抗うつ薬がセロトニンやノルアドレナリン再取り込み阻害作用を有することなどを根拠に、モノアミン神経系の機能異常を感情障害の病態として追求する研究が積み重ねられてきている。近年、セロトニンやノルアドレナリンがcAMPやイノシトールリン脂質などの細胞内シグナル伝達経路を介して神経栄養因子(BDNF)の転写を促進させることが明らかになり⁹⁾、これまで別々に行われてきた糖質コルチコイドと神経伝達物質の研究が共にアポトーシスや細胞防御の調節という点で結びついた。加えて、作用機序が不明であった気分安定薬(リチウムや抗てんかん薬)においても細胞防御作用が報告されてきていることもあり¹⁰⁾、感情障害の成因にアポトーシスや細胞防御が大きく関わっていることが推察されている。感情障害の脳内責任部位の有力な候補の一つである海馬において過量の糖質コルチコイド負荷により錐体細胞の変性死滅が見られることや^{6,9,11)}、感情障害患者の神経画像において海馬の委縮が高率に見つかることは、感情障害の成因にアポトーシスや細胞防御が関与していることを支持していると思われる。

最近、身体疾患罹患時に出現する感情障害類似の症状(気分不良や倦怠感など)の発生メカニズムの研究から、末梢の炎症刺激を受けて脳脈絡叢などに局在するマクロファージ類似細胞から放出されるサイトカイン(インターロイキン1など)の脳内作用により感情障害類似症状がされることも明らかにさ

れている。さらにサイトカインは視床下部室傍核の細胞を刺激し、CRHを放出させHPA系を活性化することも明らかになっている¹²⁾。加えて、インターロイキン1にはGRの細胞質から核内への移行を阻害する作用も報告されており¹³⁾、GRが種々の脳内物質とダイナミックな機能関連を持ちつつ、感情障害の病態に重要な役割を果たすことが予想されている。

5. 感情障害患者のGR解析

感情障害患者に高率に存在するHPA系の異常は、臨床的にはデキサメタゾン-CRH試験の非抑制として検出されるが、そのデキサメタゾンは生体では選択的にGRと結合することから、研究対象となるのはコルチゾールと高い親和性を持つMRではなく、主としてGRである¹⁴⁾。末梢細胞と脳内のGR調節は類似(感受性に違いはあるものの、増減の方向性は一致)していることが分かっているため¹⁵⁾、感情障害患者の末梢細胞(血液より採取された単核球や多核球、歯肉や皮膚から採取された線維芽細胞)を材料とした研究が行われている。

5-1. GR数の解析

これまでの報告では感情障害におけるGRの親和性に変化は認められていない。従って、GRの結合能の変化はGR数の変化として解釈されている。GRの結合能測定には、細胞質分画を用いる方法と全細胞を用いる方法の2方法が行われている。全細胞を用いた実験法では細胞内総GRを対象とするため、活性化されている核分画のGRが内因性の糖質コルチコイドと遊離して細胞質に戻り、リガンドとの結合能を回復するよう一定時間細胞をステロイドフリーの環境で培養する必要がある。一方、細胞質分画を用いた実験法では細胞に何らの処理もすることなく、細胞質分画を抽出して結合実験を行う。

これまでの報告を通覧すると、細胞質分画を用いた実験法で感情障害患者のGR結合能の低下が報告されているのに対して^{16,17)}、全細胞を用いた実験法では感情障害患者のGR結合能の変化は報告されていない^{18,19)}。この2つの実験法による結果の違いの解釈として、(1)全細胞を用いた実験法では細胞をステロイドフリーの環境で培養する間にGRのア

ップレギュレーションが起こり、そのために感情障害患者のGR結合能の低下を検出することが出来なかった。(2)感情障害患者の細胞内の総GR数は対照群と比較して差はなく、細胞内局在が対照群と比較して核分画に多く偏在しているために細胞質分画を用いた実験法ではGR結合能の低下を認めたとという可能性が考えられている¹⁴⁾。インターロイキン1¹³⁾や β アドレナリン受容体アゴニスト²⁰⁾が細胞内のシグナル伝達系を介してGR蛋白質のリン酸化を行うことにより、GRの細胞質から核内への移行を調節する機構が存在するという事実は後者の可能性を支持するものと思われる。

5-2. 死後脳研究におけるGR解析

感情障害患者の死後脳のGR mRNA量を測定した研究では、対照群との差は認められていない²¹⁾。この結果は感情障害患者の細胞内総GR数には変化がなく、細胞内局在において核分画への偏在があるとする前述の仮説と矛盾しない。また、同研究では感情障害患者の死後脳にMR mRNA量の低下がいく例かあったことが報告されている。最近の受容体選択的アンタゴニストを用いた報告では、GRによるHPA系のフィードバック抑制に対してMRが補助的な役割をすることが示されており²²⁾、一部の感情障害患者の成因には、脳内MR発現量の低下によるHPA系機能異常が関与しているのかもしれない。

5-3. GR機能の解析

GRの機能解析の方法として、受容体アゴニスト、デキサメタゾンによるGR結合能の変化(ダウンレギュレーション)やリンパ球幼若化反応の抑制を見る方法が知られている。

一般にデキサメタゾン投与により単核球のGR結合能は低下するが、感情障害患者では結合能は低下しない傾向にある²³⁾。興味深いことに、感情障害患者の中でも、デキサメタゾン抑制試験で非抑制の患者では、GR結合能の低下が認められないとの報告がある²⁴⁾。またリンパ球幼若化試験においても、健常者やデキサメタゾン抑制試験で抑制を示す感情障害患者ではデキサメタゾン投与後に幼若化反応は低下するが、デキサメタゾン抑制試験で非抑制を示す感情障害患者では低下しない²⁴⁾。また、感情障害患者では高コルチゾール血症であるにもかかわらず、糖

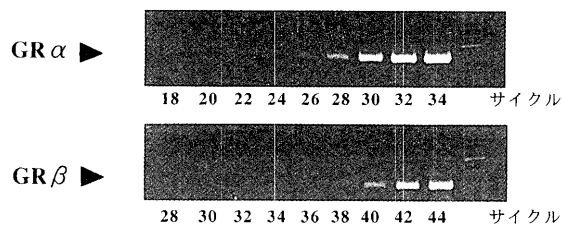
質コルチコイドで発現が促進されるはずのシアリルトランスフェラーゼの血中濃度が増加していないという報告もある²⁵⁾。このように感情障害患者においてはGR機能の低下が高率に認められるが、この機能低下はGR数の減少によるものではなく、サイトカインによるGRの核内移行の低下や細胞内局在の核への偏在が関与しているのではないかと考えられている¹⁴⁾。実際、一部の抗うつ薬ではGRの核内移行が促進されたと報告されている²⁶⁾。

6. 当科における感情障害患者のGR解析

感情障害患者のGR (GR α)機能低下は、前述のように核内移行障害などが想定されている。一方、内科領域では気管支喘息²⁷⁾や炎症性腸疾患²⁸⁾の研究から、ステロイド治療抵抗性として現れるGR α 機能異常はGR β 発現増加によるものと考えられている。GR β はヒトだけに存在するが、GR α とヘテロ二量体を形成してGR α の転写調節機能を阻害すると考えられている²⁹⁾。

我々は感情障害患者のGR α 機能異常にGR β 発現増加が関与しているかどうかを検討するため、患者の白血球より得られた総RNAをRT-PCR法で解析している(図2)。これまでの結果では感情障害患者にGR β mRNA発現増加は認められず、むしろ発現が低下している例が健常者に比して高率に見つかっている。このGR β 発現低下はデキサメタゾン-CRH試験の非抑制とは相関がなく、GR α 機能低下とは無関係のように思われる。最近transfectionにより発現されたヒトのGR β がマウ

共通の上流プライマーを用いたGR α とGR β の競合的RT-PCR法



既知量のGR α とGR β のcDNAを種々の量比で混合しPCR法を行った結果を標準曲線として用い、実験で得られたGR α の増加曲線とGR β の増加曲線のサイクル数の差を外挿してGR α /GR β 比を求めた。

図2

スの多核球のステロイド誘導性アポトーシスを阻害するだけに止まらず、ステロイド存在下で細胞防御の働きをすることが報告されている⁷⁾。我々は感情障害患者ではG R β 発現低下のために、高コルチゾール血症による感情調節細胞のアポトーシスが引き起こされやすいのではないかと考えている。

また、これまでのリガンド結合能の実験報告より感情障害患者でG R α の細胞内局在が核に多く偏在している可能性が示唆されてきたが、我々は白血球を界面活性剤により細胞膜と核膜を選択的に破壊して細胞質分画と核内分画を抽出し抗G R抗体を用いてウエスタンブロット法で検討している。

文 献

- 1) Joëls M, Vreugdenhil E. Corticosteroids in the brain. Cellular and Molecular actions. *Mol Neurobiol* 1998 ; **17** : 87-108.
- 2) Malkoski SP, Dorin RI. Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol Endocrinol* 1999 ; **13** : 1629-1644.
- 3) Drouin J, Sun YL, Chamberland M, Gauthier Y, De LA, Nemer M, Schmidt TJ. Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J* 1993 ; **12** : 145-156.
- 4) Amsterdam A, Tajima K, Sasson R. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids : implication to their anti-inflammatory action. *Biochem Pharmacol* 2002 ; **64** : 843-850.
- 5) Hafezi-Moghadam A. Cardiovascular protective effects of corticosteroids mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nature Med* 2002 ; **8** : 473-479.
- 6) Sapolsky R, Krey L, McEwen B. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number : implication for aging. *J Neurosci* 1985 ; **5** : 1222-1227.
- 7) Stricland I, Kisich K, Hauk PJ, Vottero A, Chrousos GP, Klemm DJ, Leung DYM. High constitutive glucocorticoid receptor β in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids. *J Exp Med* 2001 ; **193** : 585-593.
- 8) Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wassely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schütz. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 1998 ; **93** : 531-541.
- 9) 松本真知子, 吉岡充弘. セロトニン受容体, ノルアドレナリン受容体の機能・細胞内情報伝達. *日本臨床* 2001 ; **59** : 1450-1456.
- 10) Coyle JT, Manji HK. Getting balance : drugs for bipolar disorder share target. *Nature Med* 2002 ; **8** : 557-558.
- 11) 河田光博, 小澤一史, 西真弓, 伊藤隆雄, 胡中庭. グルココルチコイドとミネラルコルチコイドレセプターの脳内分布. *神経研究の進歩* 1998 ; **42** : 566-576.
- 12) Koonsman JP, Parnet P, Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour ; mechanisms and implications. *Trends Neurosci* 2002 ; **25** : 154-159.
- 13) Pariente CM, Pearce BD, Pisell TL, Sanchez CI, Po C, Su C, Miller AH. The proinflammatory cytokine, interleukin-1 alpha, reduces glucocorticoid receptor translocation and function. *Endocrinology* 1999 ; **140** : 4359-4366.
- 14) Pariente CM, Miller AH. Glucocorticoid receptors in major depression : relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry* 2001 ; **49** : 391-404.
- 15) Spencer RL, Miller AH, Stein M, McEwen BS. Corticosterone regulation of type I and type II adrenal steroid receptors in brain, pituitary, and immune tissue. *Brain Res* 1991 ; **549** : 236-246.
- 16) Sallee FR, Nesbitt L, Dougherty D, Nandagopal VS, Sethuraman G. Lymphocyte

- glucocorticoid receptor: Predictor of sertraline response in adolescent major depressive disorder (MDD). *Psychopharmacol Bull* 1995 ; **31** : 339-345.
- 17) Yehuda R, Boissoneau D, Mason JW, Giller EL. Glucocorticoid receptor number and cortisol excretion in mood, anxiety and psychotic disorders. *Biol Psychiatry* 1993 ; **34** : 18-25.
- 18) Rupprecht R, Kornhuber J, Wodarz N, Lugauer J, Gobel C, Riederer P, Beckmann H. Lymphocyte glucocorticoid receptor binding during depression and after clinical recovery. *J Affect Disord* 1991 ; **22** : 31-35.
- 19) Wassef AA, O'Boyle M, Gardner R, Rose RM, Brown A, Harris A, Nguyen H, Meyer WJ 3rd. Glucocorticoid receptor binding in three different cell types in major depressive disorder: Lack of evidence of receptor binding defect. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1992 ; **16** : 65-78.
- 20) Eickelberg O, Roth M, Lox R, Bruce V, Rudiger J, Johnson M, Block LH. Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by Beta2-adrenergic receptor agonists in primary human lung fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999 ; **274** : 1005-1010.
- 21) Lopez JF, Chalmers DT, Little KI, Watson SJ. Regulation of serotonin 1A, glucocorticoid and mineralcorticoid receptor in rat and human hippocampus: Implications for the neurobiology of depression. *Biol Psychiatry* 1998 ; **43** : 547-573.
- 22) Spencer RL, Kim PJ, Kalman BA, Cole MA. Evidence for mineralcorticoid receptor facilitation of glucocorticoid receptor-dependent regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Endocrinology* 1998 ; **139** : 2718-2726.
- 23) Wassef A, Smith EM, Rose RM, Gardner R, Nguyen H, Meyer WJ. Mononuclear leukocyte glucocorticoid receptor binding characteristics and down-regulation in major depression. *Psychoneuroendocrinology* 1990 ; **15** : 59-68.
- 24) Lowy MT, Reder AT, Gormley GJ, Meltzer HY. Comparison of in vitro and in vivo glucocorticoid sensitivity in depression: Relationship to the dexamethasone suppression test. *Biol Psychiatry* 1988 ; **24** : 619-630.
- 25) Maguire TM, Thakore J, Dinan TG, Hopwood S, Breen KC. Plasma sialyltransferase levels in psychiatric disorders as a possible indicator of HPA function. *Biol Psychiatry* 1997 ; **41** : 1131-1136.
- 26) Pariante CM, Pearce BD, Pisell TL, Owens MJ, Miller AH. Steroid-independent translocation of the glucocorticoid receptor by the antidepressant desipramine. *Mol Pharmacol* 1997 ; **52** : 571-581.
- 27) Gagliardo R, Vignola AM, Mathieu M. Is there a role for glucocorticoid receptor beta in asthma?. *Respir Res* 2001 ; **2** : 1-4.
- 28) Orii F, Ashida T, Nomura M, Maemoto A, Fujiki T, Ayabe T, Imai S, Saitoh Y, Kohgo Y. Quantitative analysis for human glucocorticoid receptor α/β mRNA in IBD. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 ; **296** : 1286-1294.
- 29) Oakley RH, Jewell CM, Yudt MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor β isoform. *J Biol Chem* 1999 ; **274** : 27857-27866.