

第9回杏林医学会研究奨励賞受賞報告

木内 善太郎

杏林大学医学部小児科学教室

Glucocorticoid (GC) は、免疫抑制・抗炎症作用を持つ薬剤として広く使用され、腎・膠原病、血液悪性腫瘍、アレルギー疾患など様々な疾患の効果的な治療薬剤として、60年間以上も使用されている。小児科においても日常診療で、ステロイド薬を使用する機会は多く、疾患によっては長期的使用を余儀なくされる場合もある。その感受性や抵抗性が患者によって異なる事や、変化する事も経験するが、その機序については不明な点が多く残されている。このいわゆるステロイド抵抗性の原因が解明されると、多くの患者へのステロイド治療の内容が大きく改善される。私はGCによりmRNAの発現が増加する遺伝子として同定されたglucocorticoid induced transcript1 (GLCCII)¹⁾に着目し、その蛋白機能を胸腺Tリンパ球にて初めて解明し報告した。

まずヒト full-length GLCCII cDNA を単離して Plasmid constructs を作成し、大腸菌に形質転換しリコンビナント GLCCII を精製した。これを家兎に免疫し血清を採取後、精製し抗GLCCII 特異抗体を作成した。また Plasmid を HEK-293 細胞に導入し GLCCII は 70kDa、HEK-293 細胞に発現させた GLCCII は 70kDa と 75kDa の分子量として同定された。GLCCII 永久発現細胞株とマウス胸腺単離 T 細胞を材料に特異抗体を用いて染色し、GLCCII は細胞質内蛋白で tubulin と同局在であった。WEHI 細胞では、Dexamethasone 濃度・時間依存性に GLCCII の mRNA と蛋白が増加した。この GLCCII の増加は、glucocorticoid receptor (GR) 拮抗剤 RU486 により阻害され GC-GR 複合体を介する経路が GLCCII の産生に必須である事が判明した。アミノ酸配列を基にデータベース解析した後、実際にリン酸化質量解析を行い、61 個ものリン酸化部位を同定した。マウス胸腺・腎 cDNA ライブラリーを prey とし yeast two hybrid screen を行い、リガンドは dynein-light chain 1 (LC8) である事が示された。LC8 は protein activated kinase 1 (PAK1) によりリン酸化される事でアポトーシスを起こす事が報告されている^{2,3)}。GLCCII, LC8, PAK1 の結合性を免疫沈降法で確認した後、この 3

者の in vitro リン酸化実験を行い GLCCII は PAK1 の LC8 リン酸化を阻害するリン酸化基質であることが判明した。WEHI 細胞に Glccil small hairpin RNA (shRNA) を導入し knock down し、アポトーシスマーカーである annexin-V と 7-AAD を用いてフローサイトメーターで解析した。その結果 GLCCII は胸腺 T 細胞でアポトーシスを阻害するよう機能している事が判明した。GLCCII を過剰発現している transgenic mice を作成し、体格は小さく胸腺は肥大化している事が分かった。

GC の薬理作用について GC-GR 複合体の下流の機序は不明な点が多い。GLCCII が細胞質内で強力なリン酸化基質として働く下流でのメディエーターの一つであり、この機能の違いが GC の感受性・抵抗性という薬理作用の個人差に関わる可能性がある。本研究にて GLCCII が増えるとステロイド抵抗性になる事が初めて明らかになり、今後、この GLCCII の発現を調節し得る低分子化合物を発見する事で、ステロイド抵抗性に対する創薬へつなげる可能性を秘めている。

今回の杏林医学会研究奨励賞の対象論文は、GLCCII is a novel protector against glucocorticoid-induced apoptosis in T cells. *FASEB J.* 2019. Jun;33 (6) :7387-7402. に掲載された。

謝辞

本受賞論文の作成にあたり、ご指導を頂きました小児科 楊國昌教授、ならびにご助力頂きました先生方に深く感謝を申し上げます。また、ご選考頂きました選考委員の先生方、杏林医学会の先生方、事務局の方々に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Chapman, M. S., Qu, N., Pascoe, S., Chen, W. X., Apostol, C., Gordon, D., and Miesfeld, R. L.: Isolation of differentially expressed sequence tags from steroid-responsive cells using mRNA differential display. *Mol. Cell. Endocrinol.* 108, R1-R7, 1995.

- 2) Vadlamudi, R. K., Bagheri-Yarmand, R., Yang, Z., Balasenthil, S., Nguyen, D., Sahin, A. A., den Hollander, P., and Kumar, R.: Dynein light chain 1, a p21-activated kinase 1-interacting substrate, promotes cancerous phenotypes. *Cancer Cell* 5, 575-585; erratum: 6, 101; 23, 421-422, 2004.
- 3) Song, C., Wen, W., Rayala, S. K., Chen, M., Ma, J., Zhang, M., and Kumar, R.: Serine 88 phosphorylation of the 8-kDa dynein light chain 1 is a molecular switch for its dimerization status and functions. *J. Biol. Chem.* 283, 4004-4013, 2008.