

【総 説】

グルココルチコイドによる筋萎縮の分子機構

田中 廣壽、清水 宣明、吉川 賢忠

東京大学医科学研究所先端医療研究センター免疫病態分野

要約

グルココルチコイド (GC) 療法の副作用の一つであるステロイド筋症の病態として従来から異化作用が主体と考えられていたが、詳細は不明であり治療法もない。著者らは、骨格筋におけるグルココルチコイドレセプター (GR) の標的遺伝子を同定し、GCによる骨格筋萎縮の分子機構を栄養センシングの鍵分子であるmTORの抑制機構などを中心に明らかにした。同時に、GRとmTORの間の排他的相互作用を証明し、骨格筋量制御機構解明に新しい切り口をもたらした。以上の成果は、mTOR活性化によるステロイド筋症に有効な治療法の可能性を示すものであり、現在所属施設において臨床試験が準備されている。超高齢化社会を迎え、骨格筋萎縮は喫緊の国家的課題とも言え、様々な疾患に合併する筋萎縮の病態を解明し治療法を開拓する意義は大きいものとする。

キーワード: mTOR, glucocorticoid receptor, degradation, transcription, KLF15

1. はじめに

膠原病、関節リウマチなど炎症性疾患をはじめとした様々な疾患の治療において、グルココルチコイド (GC) 療法が導入されて60年を超える。薬量のGC投与時に多くの副作用が合併する。骨粗鬆症や胃潰瘍、糖尿病、高脂血症に関しては、その病態解明、診断、治療が著しく進歩している。その一方で、本稿で取り上げるステロイド筋症 (=GCによる筋萎縮~筋力低下が臨床的に問題となった状態) などはいまだに積極的医療介入対象となっていない。筋萎縮による運動機能の低下は、転倒リスク上昇-骨折-長期臥床-さらなる筋萎縮と運動機能低下、の悪循環を招き、運動器不安定症やロコモティブシンドロームの主要な原因の一つとなっているとともに、代謝障害や感染症の合併頻度を高めるなど、生活の質 (QOL) のみならず原疾患の予後をも悪化させることから、超高齢化社会を迎えるにあたっては喫緊の医学的課題である。

GCは副腎から分泌される内分泌ホルモンであり、従来から異化作用がGC筋萎縮の機序として信じられているが、その生理的意義や筋萎縮の詳細なメカニズムは不明のままであった。本稿では、ステロイド筋症、骨格筋量制御の分子機構を概観し、GCによる異化作用と筋萎縮の分子機構に関して我々の研究成果を中心に紹介したい。

〒108-8639

東京都港区白金台4-6-1

Phone:03-6409-2405

Fax:03-5449-5547

E-Mail: hirotnk@ims.u-tokyo.ac.jp

2. ステロイド筋症~GC筋萎縮の特徴と位置づけ

クッシング症候群の患者では中心性肥満とともに四肢筋の萎縮のために特徴的な風貌を呈する。薬量のGCが投与された場合も、程度の差こそあれ病理学的には筋萎縮は必発と考えられ、筋力低下が顕性化した場合「ステロイド筋症 (ミオパチー)」と称する。女性に多く、高用量GCの投与1~3ヵ月後に緩徐に発症することが多い。生化学的検査では血清クレアチンキナーゼ値も正常なことが多く特徴的な変化に乏しい。血清乳酸脱水素酵素は軽度上昇する (分画では I型または II型の増加)。ミオグロビン尿は認められない。尿中クレアチン排泄量が増加するため診断の一助となる。病理学的には筋生検で IIB線維に特異的な萎縮が見られる。多くはステロイド減量とともに回復するとされ、その対策として、原疾患の活動性に注意しながらGCを減量する、筋力低下を防ぐための適度な運動を行う、などがある¹⁾。しかし、筋力低下による日常生活障害を有する患者も少なくなく、今後、ステロイド筋症の実態調査や診断や治療に関するガイドライン整備も望まれる。

ここで、いわば随伴性筋萎縮である、敗血症、悪液質、飢餓、アシドーシス、糖尿病、慢性腎不全に伴う筋萎縮において、内因性GCの関与が明らかにされつつある^{2,4)}。また、担癌個体において筋萎縮への治療的介入が生命予後を改善させる可能性も示されている。したがって、GC筋萎縮の研究はステロイド筋症のみならず、筋萎縮を有する様々な病態の解明と治療法開発、予後改善にも貢献する可能性がある。

3. 骨格筋量の制御

横紋筋である骨格筋は体の40%前後を占め、姿勢の保

持、運動・移動能のみならず、栄養代謝においても重要な役割を果たしている。骨格筋は筋芽細胞の融合によって生じる巨大多核細胞である筋細胞（筋線維）から構成される。筋線維には現在7種類のタイプがあるとされているが、ミトコンドリアに富み主に酸化リン酸化によるエネルギーを利用して持続的な収縮をする遅筋（Type I、赤筋、ミオシン重鎖type I陽性）線維と、主に解糖によるエネルギーを利用して急速な収縮をする速筋（Type II、白筋、ミオシン重鎖type II陽性）線維に大別される。II型速筋線維の中でも典型的なものはIIbといわれ、IIaは遅筋と速筋の中間的な性質を有する。多くの筋肉ではこれらの線維がモザイク状に束になっており、部位ごとに構成は異なっている。例えばラット後肢のヒラメ筋はほとんど遅筋線維より構成され、腓腹筋、前脛骨筋では速筋線維の比率が増加する。

筋線維の周囲には筋サテライト細胞が存在し、筋線維が傷害されたときなどに増殖して新しい筋線維を補填する。筋サテライト細胞はミオスタチンによって抑制的に制御されており、ミオスタチン遺伝子に変異を有する動物では筋線維数が倍加するなど、骨格筋量が著増する表現型を呈する。しかし、最終分化した骨格筋細胞は非再生系組織細胞であり、成人では筋線維数は増えることはなく、骨格筋量は主に筋線維中のタンパク量によって規定されると考えてよい³⁾。

4. GC筋萎縮の分子生物学

(1) 筋萎縮の分子機構

成熟個体の骨格筋においては、筋線維タンパク質の合成（同化）プロセスと分解（異化）プロセスが、ホルモン、栄養物質、サイトカイン、酸素分圧あるいは物理的張力などの様々なシグナルによって精緻に調節され、これらのバランスによって適切な筋量と筋力の維持、他の組織に向けてのエネルギー供給、などが制御されている⁵⁾。例えば、肝臓や骨格筋自体から分泌されるIGF-1、あるいは筋線維内のAMP/ATP比低下、遊離アミノ酸、とくに分岐鎖アミノ酸（BCAA）（ロイシン、バリン、イソロイシン）による低分子量GTPase Rhebの活性化など、一般に良好な栄養状態を伝えるシグナルは、骨格筋において、翻訳制御の鍵因子として知られるキナーゼ複合体 mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) の活性化を誘導してタンパク質合成を促進し、同化を亢進する⁶⁾。骨格筋における異化～タンパク質分解亢進は、カテプシン系に加え、ユビキチン-プロテアソーム系（E3ユビキチンリガーゼ atrogin-1, MuRF1）とオートファジー系（LC3, Bnip3など）に関連する遺伝子の発現が誘導されることによる⁷⁾。それらの転写レベルの制御に関して、転写因子FoxOがマスターレギュレーターとして機能しているらしい。FoxOは通常リン酸化された状態で細胞質に存在するが、脱リン酸化されると核に移行し転写因子として機能する⁸⁻¹¹⁾。かかるタンパク質同化と異化のバランスが疾患などによって破綻し、後者が優位な状態が持続すると各筋線維の径が減少して筋萎縮が起こる。GCによる筋萎縮に関

し、1970年前後にハーバード大学のGoldberg博士らは、骨格筋においてGCはタンパク質の異化亢進と同化抑制をもたらし、筋萎縮を引き起こすことを明らかにした。その後、GCはmTORC1活性を抑制し、その下流のエフェクター分子であるS6K1、4EBP1のリン酸化も低下することが示された。これまで、多くの筋萎縮モデルにおいてFoxOの重要性が示されているが、GC筋萎縮においては、FoxOをmRNAレベルで増加させること、脱リン酸化を促進させること¹⁻³⁾、など、断片的な報告に留まっていた。

(2) GC筋萎縮の分子機構

GCの作用は、骨格筋を含めほぼ全ての組織に存在するリガンド依存性転写因子である核内レセプターの一つグルココルチコイドレセプター（GR）との結合を介して発現される（図1）。GRは1種類であり、その標的遺伝子のレパートリーが組織ごとに多様であるためにGCの生理作用は多岐にわたり、その発現の異常は副作用を含めた各組織の多様な病態と密接に関連する（図2）。筆者らはこれまでに、肝臓、腎臓、心臓において、GC-GRの組織特異的な作用機構とその生理的な意義を、DNAマイクロアレイと*in silico*プロモーター解析による新規GR標的遺伝子の同定法を駆使して解明してきた¹²⁻¹³⁾（図3）。以下に、骨格筋においてこの戦略を利用したGC筋萎縮の分子機構解明に関する研究成果を紹介する¹⁴⁾。

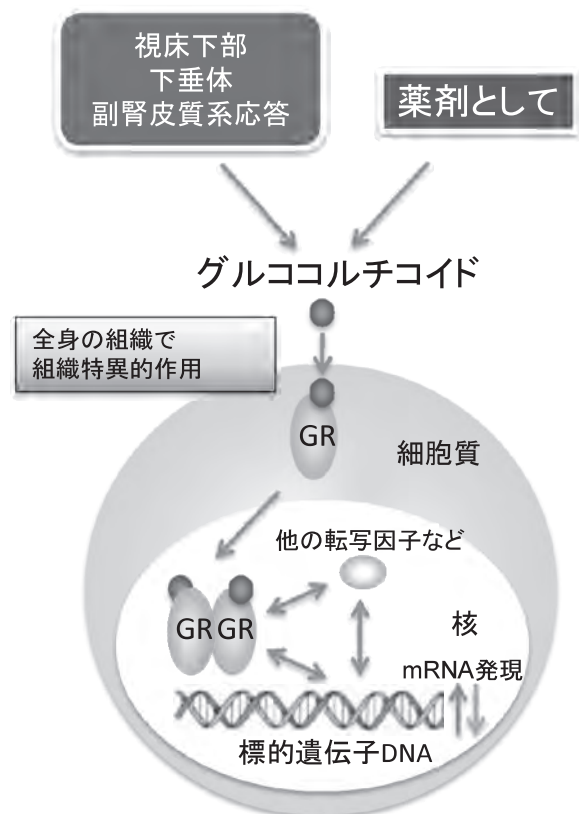


図1 GC作用の基本メカニズム

GCは、ほぼ全ての細胞に発現しているリガンド依存性転写因子、GCレセプター（GR）と結合して、GR標的遺伝子のmRNA発現を調節することにより作用を発揮する。

(i)骨格筋におけるGRの直接標的遺伝子REDD1とKLF15

ラット骨格筋において、GRの発現量はヒラメ筋に比してGC筋萎縮がより起きやすく速筋線維優位な腓腹筋や前脛骨筋において多い。そこで、腓腹筋を用いてREDD1とKLF15をGR標的遺伝子として同定した。REDD1は低酸素ストレスなどで発現が誘導され、その産物はmTORC1抑制制御因子であるTSC複合体を活性化することが知られている^{15, 16)}。筆者らは、GCがGRを介して転写レベルでREDD1のmRNA発現を亢進させること、REDD1遺伝子プロモーター上にGC応答配列(GRE)が存在することを証明した。したがって、GCによる筋萎縮の機序に、REDD1→mTOR抑制→タンパク合成低下が関与していることが推測される。一方、KLF15はKLFファミリーに属するCys-His型重鉛フィンガー構造を有する転写因子であり、心筋肥大を抑制する効果がすでに報告されているが¹⁷⁾、GCによる筋萎縮における意義は不明であった。

標的組織	GR標的遺伝子	グルココルチコイド(GC)の生理作用	アジソン病(GC欠乏)	クッシング症候群GC副作用(GC過剰)
中枢神経	CRH POMC Per-1, 2	ホルモン調節 空間認識 記憶・情動制御 概日リズム制御	無気力 不安 精神失調	老化 精神病
心血管	COX-2 SGK	心筋保護 血圧調節	起立性低血圧症	高血圧症
腎	ENaC, SGK	電解質制御	低Na・高K血症	低K血症
肝	PEPCK G6Pase, TAT IGF-1, Hes1 NTCP	糖・脂質代謝調節 胆汁酸輸送	低血糖	脂肪肝 高脂血症 糖尿病
胃・腸	ASBT ENaC	胃粘膜保護 胆汁酸輸送 電解質制御	嘔吐・下痢	胃潰瘍
骨格筋	MuRF-1 Myostatin	タンパク質 異化・同化制御	筋力低下	筋萎縮
骨	OPG-L Osteocalcin	骨リモデリング制御	骨痛	骨粗鬆症
脂肪	IRSs PEPCK	糖・脂質代謝調節	るいそう	肥満 糖・脂質代謝異常
免疫応答細胞 炎症局所	IL-2, 6, 8, 10 ICAM-1, LAM-1 E-selectin, iNOS Collagenase 1, IV Annexin-1 IκBα, IRF-3, GILZ	抗炎症作用 免疫制御	好酸球・ リンパ球増多	免疫不全

図2 各組織におけるGR標的遺伝子と組織特異的なGC作用

(ii) KLF15はatrogin-1とMuRF1の発現を活性化する

筆者らは、REDD1と同様の手順でKLF15もGRの直接の標的遺伝子であることを証明した。次に、KLF15を過剰発現させたラット前脛骨筋のmRNA発現プロファイルの解析より、KLF15の既知標的遺伝子分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素BCAT2^{18, 19)}のほか、atrogin-1, MuRF1, FoxO1, FoxO3のmRNA発現亢進を明らかにした。atrogin-1, MuRF1プロモーター上のFoxO結合配列近傍にKLF15がリクルートされる領域が存在した。FoxOの過剰発現によるatrogin-1, MuRF1の発現亢進がKLF15により増強されただけでなく、GR依存的なatrogin-1, MuRF1の発現亢進はsiRNAによるKLF15ノックダウンで著明に抑制された。したがってKLF15は骨格筋の異化プロセスにおいてFoxOと並び重要な転写因子であると言える。

(iii) GR-KLF15軸はBCAAの代謝亢進を介してmTORC1活性を抑制する

KLF15の標的遺伝子であるBCAT2はBCAA代謝における律速段階を担う酵素である。筆者らは、ラット前脛骨筋、培養筋管細胞において、KLF15はBCAT2の活性を亢進し細胞内のBCAA濃度を著明に低下させ、S6K1のリン酸化の減少すなわちmTORC1活性の低下を引き起こすことを示した。KLF15過剰発現は、ラット前脛骨筋線維の横断面積を減少させ、また培

養筋管細胞径を減少させた。この筋管細胞の萎縮は培養液にBCAAを加えmTORC1活性を回復させることによって著明に改善された。したがって、KLF15を介した転写制御は異化促進のみならず同化抑制においても重要であり、筋萎縮と密接な関わりを持つことが示された。

以上から、GRを中心とした転写ネットワークにおいて、KLF15とFoxOを介した異化促進機構および、KLF15(→BCAT2→BCAA低下)とREDD1→mTOR抑

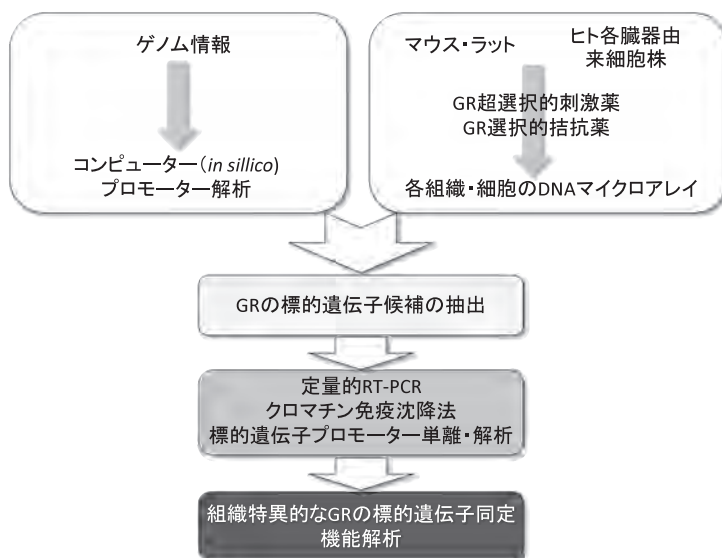


図3 DNAマイクロアレイとin silicoプロモーター解析による新規GR標的遺伝子の同定法

制を介した同化のシャットオフ機構が同時に作動して骨格筋代謝を同化から異化へ迅速かつ効率的にスイッチすることがわかった。すなわち、GC筋萎縮の分子基盤は、骨格筋におけるGR標的遺伝子群による多様かつ協調的な異化亢進と同化抑制である実態が鮮明になった。

(iv) 同化経路と異化経路の相互に排他的なクロストーク-mTORC1はGR依存的転写を抑制する

上記のごとく、骨格筋におけるGC-GRを介した異化経路はきわめて高効率であり、動物においては飢餓時における生存を担保するシステムとして合理的であろう。その一方で、その適切な、とくに負の制御も骨格筋量の維持にとって必須と考えられる。そこで筆者らは、栄養センシングによる同化経路活性化から異化経路を抑制する仕組みの存在を想定した。まず、培養筋管細胞においてmTORC1の特異的阻害剤ラパマイシンがGC依存的mRNA発現を増強することを確認した。そこで、mTORC1活性がGR機能を抑制するという仮説のもと、構成的活性化型Rheb変異体の遺伝子導入によるmTORC1の強制的活性化がGC-GR依存的遺伝子発現に及ぼす影響を、GR依存的レポーター遺伝子発現、内在性GR標的遺伝子mRNA発現、標的プロモーターへのGRおよびRNAポリメラーゼIIのリクルートメントの解析により検証した。その結果、mTORC1はGRの標的遺伝子プロモーターへのリクルートメント抑制を介してGC応答性遺伝子発現に拮抗することがわかった。したがって、mTORC1を活性化する同化シグナルは、機序は不明ではあるものの、GRを標的としてその下流転写ネットワーク全体を抑制し、異化プロセスを抑制するのみならずREDD1やBCAT2を介した同化抑制を解除することによって、骨格筋代謝を極めて効率よく異化から同化へ変換することが示唆された(図4)。

(v) mTORC1はステロイド筋萎縮の発症を抑制する

以上から、人為的なmTORC1の活性化がステロイド筋萎縮の発症を抑制する可能性が考えられた。ラットに合成GC、デキサメタゾンを連日5日間経腹腔投与し、ステロイド筋萎縮のモデルを作成したところ、GRの標的遺伝子プロモーター上へのリクルートメント、筋萎縮関連mRNAの発現亢進、速筋

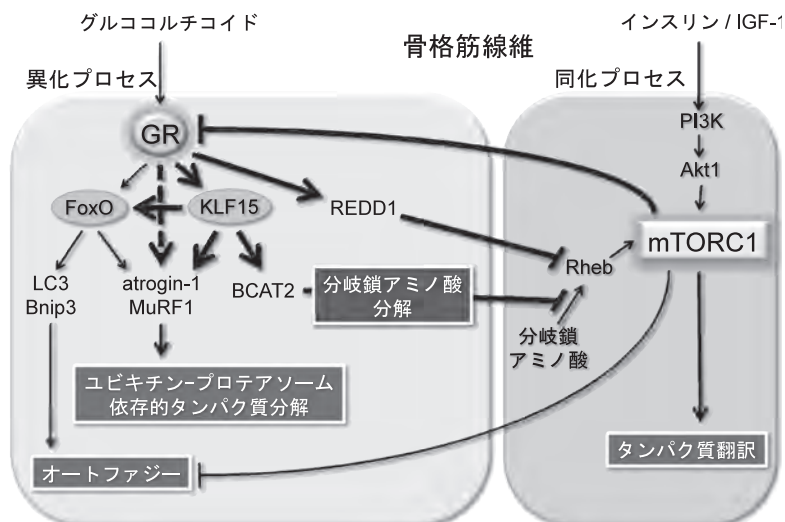


図4 筋線維におけるGRとmTORC1とのクロストーク (概念図)

GRと標的遺伝子産物である転写因子から構成される転写制御ネットワークは、それぞれ複数の機構を駆動してタンパク質分解を進めると同時に、mTORC1の活性化を抑制する。一方、mTORC1はGRを介した標的遺伝子の転写を抑制することで、この転写制御ネットワーク全体の活性を低下させつつ、翻訳を亢進する。

線維優位な腓腹筋のmTORC1活性低下、速筋線維特異的な横断面積の縮小、遅筋線維優位なヒラメ筋の重量変化を伴わない腓腹筋の重量減少、および握力の低下を認めた。この筋萎縮モデルにおいて、人為的mTORC1活性化の方法としてBCAAを用いたところ、デキサメタゾン投与直前のBCAA経口投与により、GRのリクルートメントから筋力低下までの上記全ての検査項目について著明な改善を認め、しかもこれらの効果はラパマイシンの投与によって完全にキャンセルされた(図5)。以上の結果は、骨格筋におけるGR-mTORC1クロストークの筋量・筋力制御における意義を動物個体レベルで実証したものと見える。

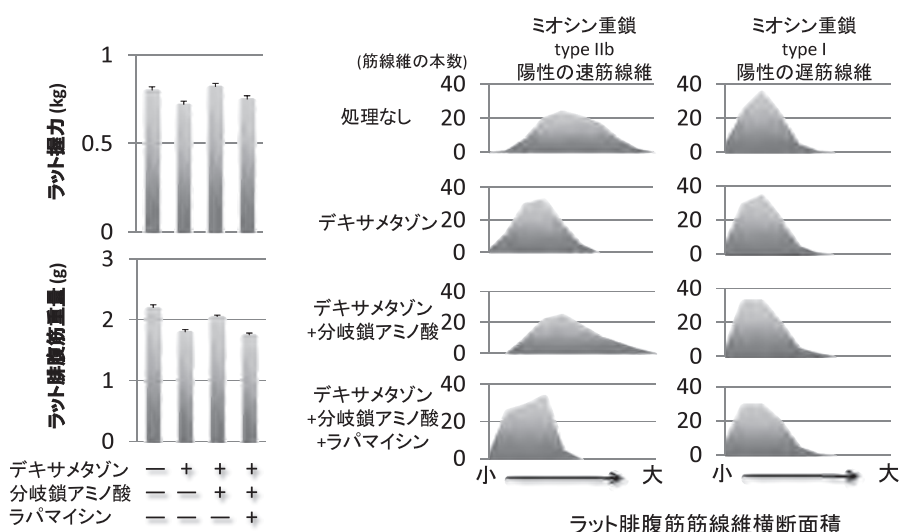


図5 GC筋萎縮モデルラットにおけるmTORC1活性化療法の効果

握力、腓腹筋重量、速筋線維の横断面積は、デキサメタゾン処理によって減少した。分岐鎖アミノ酸投与によって認められたこれら検査項目の著明な改善は、ラパマイシンによってキャンセルされた。一方、遅筋線維に対するこれらの影響はなかった。

5. おわりに

GCは骨格筋においてGRに始まる転写ネットワークを利用して生体エネルギー制御に本質的役割を果たしているが、疾患や治療などによって生理的制御範囲を逸脱した結果筋萎縮がおり、生体に不利益が生じるのであろう。今回紹介したGR-mTORC1相互作用は、飢餓などのストレス下において迅速かつ効率的に栄養を骨格筋から肝臓などの臓器に再分配する仕組みとして進化の過程で獲得されてきたと思われる。組織間の精緻なネットワークを基盤にした分業体制を有する高等生物において、特定の組織に備蓄したエネルギーを必要に応じて他の組織に分配するシステムは生命維持にとって不可欠といえる。運動器障害によって医学的治療や介護を要する状態（運動器不安定症、ロコモティブシンドロームと称される）を呈する人口は確実に増加が見込まれており、来るべき超高齢化社会を見据えた筋萎縮への対策は喫緊の課題である。現在、今回の成果を基盤に開発したmTORC1活性化療法の臨床応用を目指してステロイド筋萎縮患者を対象とした臨床試験の準備を進めている。最近、筋ジストロフィー患者の筋を用いた検討から、GCは、筋線維近傍に存在して筋再生に重要な役割を持つサテライト細胞を増加させる作用を有することも示唆されている。骨格筋におけるGCの役割に関して、筋細胞再生の面からも今後検討が進むであろう。

参考文献

- 1) Pereira RM, Freire de Carvalho J. Glucocorticoid-induced myopathy. *Joint Bone Spine*. 2011;78(1):41
- 2) Menconi M, Fareed M, O'Neal P, et al. Role of glucocorticoids in the molecular regulation of muscle wasting. *Crit Care Med*. 2007;35:S602.
- 3) Schakman O, Gilson H, Kalista S, Thissen JP. Mechanisms of muscle atrophy induced by glucocorticoids. *Horm Res*. 2009;72 Suppl 1:36.
- 4) Hu Z, Wang H, Lee IH, et al. Endogenous glucocorticoids and impaired insulin signaling are both required to stimulate muscle wasting under pathophysiological conditions in mice. *J Clin Invest*. 2009;119:3059.
- 5) Hoffman EP, Nader GA. Balancing muscle hypertrophy and atrophy. *Nat. Med*. 2004;10:584.
- 6) Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2004;124:471.
- 7) Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)*. 2008;23:160.
- 8) Sandri M, Sandri C, Gilbert A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*. 2004;117:399.
- 9) Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*. 2004;14:395.
- 10) Zhao J, Braut JJ, Schild A, et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab*. 2007;6:472.
- 11) Mammucari C, Milan G, Romanello V, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*. 2007;6:458.
- 12) Yoshikawa N, Nagasaki M, Sano M, et al. Ligand-based gene expression profiling reveals novel roles of glucocorticoid receptor in cardiac metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296:E1363.
- 13) Tokudome S, Sano M, Shinmura K, et al. Glucocorticoid protects rodent hearts from ischemia/reperfusion injury by activating lipocalin-type prostaglandin D synthase-derived PGD2 biosynthesis. *J Clin Invest*. 2009;119:1477.
- 14) Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, et al. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell Metab*. 2011;13:170.
- 15) Wang H, Kubica N, Ellisen LW, et al. Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. *J Biol Chem*. 2006;281:39128.
- 16) DeYoung MP, Horak P, Sofer A, et al. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev*. 2008;22:239.
- 17) Fisch S, Gray S, Heymans S, et al. Kruppel-like factor 15 is a regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:7074.
- 18) Gray S, Wang B, Orihuela Y, et al. Regulation of gluconeogenesis by Kruppel-like factor 15. *Cell Metab*. 2007;5:305.
- 19) She P, Reid TM, Bronson SK, et al. Disruption of BCATm in mice leads to increased energy expenditure associated with the activation of a futile protein turnover cycle. *Cell Metab*. 2007;6:181.

Molecular mechanism for glucocorticoid-induced muscle atrophy

Hirotohi Tanaka, Noriaki Shimizu, Noritada Yoshikawa

Division of Clinical Immunology
Advanced Clinical Research Center
Institute of Medical Science
University of Tokyo

Summary

The dynamic balance between anabolic and catabolic processes in skeletal muscle is critical for the determination of muscle mass and systemic energy homeostasis. Recently, we identified KLF15 gene as a direct target of the glucocorticoid receptor (GR), and demonstrated that KLF15 participates in muscle catabolism via the transcriptional regulation of E3 ubiquitin ligases, atrogen-1 and MuRF1. Moreover, KLF15 affects the mammalian target of rapamycin (mTOR) through branched-chain amino acid (BCAA) degradation and negatively modulates myofiber size. We also showed that REDD1 is another GR target gene affecting mTOR activity. mTOR activation inhibits GR-mediated transcription by suppressing GR recruitment onto target genes, strongly suggesting a mutually exclusive crosstalk between mTOR and GR. Pharmacological activation of mTOR with BCAA attenuated GR-mediated gene expression, leading to the substantial restoration of muscle atrophy in glucocorticoid-treated rats. These results provide a novel insight into how muscle cells determine their mass via the coordinated interaction of the catabolic hormone signal and the anabolic nutritional machinery.

Key words: mTOR, glucocorticoid receptor, degradation, transcription, KLF15