ステロイドの作用機序と適切な使用法

— 新しいステロイド療法を求めて —

宮地幸隆・下条正子^{*1)}, 田中 孝^{*2)}

Mechanism of actions of glucocorticoid and appropriate methods of glucocorticoid administration

Blood, liver cytosol and nuclear levels of a synthetic glucocorticoid, betamethasone were measured by the specific radioimmunoassay after administration to rats. Betamethasone receptor in liver cytosol was also measured by the ³H-betamethasone binding assay.

Betamethasone levels in blood and liver cytosol reached peak levels 1 hour after oral administration and then decreased gradually. Nuclear betamethasone reached peak levels slightly later, compared to blood and cytosol betamethasone peaks. Betamethasone receptor in liver cytosol decreased in reversed relation to the increase in the nuclear betamethasone level.

Glucocorticoid receptor mRNA levels, in cultured HeLa cells were only marginally suppressed by cortisol 10⁻⁵M, while prednisolone and dexamethasone suppressed glucocorticoid receptor mRNA levels to 67% and 57% of the initial levels, respectively.

Dynamic changes in tissue levels of the orally administered glucocorticoids as well as the changes in glucocorticoid receptor and its mRNA expression may give insight into the understanding of the molecular mechanism of antiinflammatory glucocorticoid actions.

Rec. 12/19/1996, Acc. 1/24/1997, pp 511~516

Yukitaka Miyachi・Masako Simojo^{*1)}, Takashi Tanaka^{*2)}

key words : glucocorticoid, tissue levels, glucocorticoid receptor, glucocorticoid receptor gene, regulation of transcription

合成ステロイド、プレドニゾロンがグルココルチコイド療法の中核的な薬剤として多くの疾患に用いられ約 40 年が経過したが、その顕著な臨床効果と避けがたい副作用は使用当初と同様に現時点でも大きな問題である。

グルココルチコイドの作用が分子レベルで検討され、グルココルチコイドの genomic な作用とし

て、リポコルチンのような抗炎症性蛋白を誘導すること、IL-1 や TNF などのサイトカインの産生抑制を介して細胞性免疫や液性免疫を抑制し炎症反応を抑えること、炎症の進行拡大に関与する collagenase などの蛋白分解酵素を転写レベルまで調節していることが明らかとなった。また、近年 non-genomic な作用としてグルココルチコイドの膜作用が明らかとなり、ストレス反応で重要な働きをしていると思われる。

本報告では合成グルココルチコイド剤を投与した際の血中、組織内合成グルココルチコイドレベルの変動、グルココルチコイドレセプターの変動、グルココルチコイドレセプター mRNA の変動についての成績を述べる。

^{*1)} First Department of Internal Medicine, Toho University School of Medicine 東邦大学医学部第一内科学教室

^{*2)} First Department of Internal Medicine, Hiroshima University School of Medicine (Director, Tanaka Clinic) 広島大学医学部第一内科学教室 (現・タナカクリニック院長)

Offprint requests to : Yukitaka Miyachi, First Department of Internal Medicine, Toho University School of Medicine, 5-21-16 Omorinishi, Ota-ku, Tokyo 143, Japan

図 1

方 法

(1) 動物実験

体重 200~240 g の Wistar 系雄性ラットの両側副腎摘出後、オリエンタル固形食と水を投与し、0.4%の食塩水を補充し 3~4 日後に実験に用いた。胃管を通して 0.2, 2 mg の betamethasone を投与し、投与前、投与後 1, 3, 6, 24, 48 時間後に採血し、0.9%の生理食塩水で灌流後肝臓を摘出した。血液は血清に分離後 -20°C で冷凍保存した。肝臓をはさみで細切後 0.25 M sucrose, 3 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 内で homogenize し、4°C で 105,000G, 60 分間遠沈し上清を細胞質とした。肝細胞核は 4 倍量の上述の buffer 内で homogenize 後、700 G で 20 分間遠沈し、pellet を 2.5 M sucrose, 3 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 に resuspend し 40,000 G, 20 分間再遠沈した。Pellet は 0.25 M

sucrose, 50 mM Tris-HCl buffer に suspend し数層のガーゼで濾過後、700 G で 5 分間遠沈した pellet を核分画とした。

(2) Betamethasone の radioimmunoassay

Betamethasone-3-oxime をヒト血清アルブミンに conjugate し、家兎を免疫し得た抗 betamethasone 抗体と 1, 2, 4-³H-betamethasone を用いる radioimmunoassay¹⁾で血中、細胞質中および核内 betamethasone を測定した。

(3) Betamethasone receptor の測定

肝細胞質分画と 1, 2, 4-³H-betamethasone を用いる binding assay を行い Scatchard plot から binding capacity と binding affinity を求めた²⁾。

(4) Glucocorticoid receptor mRNA の発現

Glucocorticoid receptor が発現されていることを確認した HeLa 細胞の培養液中に異なった濃度の cortisol, prednisolone, dexamethasone

図 2

($1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-10}$ M) を添加し、1～24 時間培養後 Maniatis らの方法により RNA を抽出した³⁾。Dr. R. Evans により提供された human glucocorticoid receptor α (hGR α) cDNA (1.5 kb) を probe として Northern blotting を行い、glucocorticoids 投与後の glucocorticoid receptor mRNA の変動を検討した⁴⁾。

結 果

(1) Betamethasone 投与実験(図 1)

ラットに betamethasone 0.2, 2 mg 経口投与後、血中 betamethasone レベルは 1 時間に dose に応じた peak 値をとった後漸減し、24 時間以後には血中に認められない。肝細胞質中の betamethasone レベルも血中レベルとほぼ同様な変動を示し、投与後 1 時間後に peak 値を示した。核内 betamethasone レベルは betamethasone 0.2 mg 投与時には 1 時間後、2 mg 投与時にはやや遅れ 2～3 時間後に peak 値をとった後、血中および細胞質中の betamethasone と類似したパターンで減少した。

Betamethasone 投与後の肝細胞質内 glucocorticoid receptor は 1～6 時間後に control の 10% 以下とほとんど消失した後、betamethasone 0.2 mg 投与群では 24 時間後に、2.0 mg 投与後では 48 時間後にほぼ前値まで回復した。

Betamethasone 投与後血中、肝細胞質中に betamethasone のピークがみられる 1 時間後より glucocorticoid receptor はほぼ消失し、betamethasone 投与量が多いほど glucocor-

図 3

ticoid receptor が減少している時間が長くなる。核内 betamethasone は細胞質 glucocorticoid receptor と鏡像的な関係で推移する。

(2) Glucocorticoid receptor mRNA 発現実験(図 2, 3)

HeLa 細胞に 10^{-5} M から 10^{-10} M の cortisol, prednisolone, dexamethasone 添加後、glucocorticoid receptor mRNA レベルは用量依存性に減少し、 10^{-5} M の濃度で 24 時間には、control 群に対し dexamethasone 添加群で 57%, prednisolone 添加群で 67%, cortisol 添加群で 90% となった(図 2)。時間依存性の検討では、glucocorticoid receptor mRNA は cortisol 添加群では 1 時間後に control 群の 86% まで減少した後、8 時間後まで同じレベルを維持し、24 時間後にはほぼ control のレベルへ回復した。Prednisolone 添加群では 1 時間後には減少しはじめ、4 時間後に最低値となった後、24 時間後まで徐々に control レベルへ回復する傾向がみられた。Dexamethasone 添加群では、6～8 時間に最低値となった後、24 時間後までほぼ同じレベルを示した。

考 按

(1) Glucocorticoids 投与後の組織内 glucocorticoid レベルと glucocorticoid receptor および mRNA の発現抑制

ラットに betamethasone 経口投与後、betamethasone は血中へ速やかに吸収され、標的組織の細胞質へも速やかに移行する。一方、標的組織の細胞質中 glucocorticoid receptor は、血中

表 1 グルコルチコイドにより転写活性調節を受ける物質

亢進…	Tyrosine aminotransferase
	Mammary tumor virus (MTV)
	Protein inhibitor (α 1-Inhibitor III)
	Tリンパ球 apoptosis
	リソゾーム
	Moloney murine leukemia virus
抑制…	Osteocalcin
	Pro-opiomelanocortin
	Gonadotropin α -subunit
	Prolactin
	IL-6
	Gonadotropin releasing hormone
	Collagenase
	Glucocorticoid receptor
	Glucocorticoid receptor factor-1

および肝細胞質中に betamethasone の peak がみられる 1 時間後からほぼ完全に消失する。Glucocorticoid receptor 複合体は核内に移行していると思われるが、細胞質内に glucocorticoid receptor が消失している時間にほぼ一致して、核内に betamethasone を検出することができる。

Betamethasone 2 mg 投与 3 時間後の肝細胞核内 betamethasone は、約 14 ng/mg DNA または 17 ng/g wet tissue の peak 値を示す。この値は glucocorticoid receptor binding assay の Scatchard plot から計算した肝細胞質内の高親和性を示す betamethasone receptor の結合能と一致する。すなわち肝細胞質内に入った betamethasone はその一部が glucocorticoid receptor と結合し、結合した複合体は大部分が核内に入り DNA と結合すると思われる。Glucocorticoid receptor の複合体と DNA の結合は、種特異性と組織特異性が低くしかも低親和性で、結合部位数は glucocorticoid receptor 数よりはるかに多い。Glucocorticoid receptor 複合体と DNA の結合のすべてが生理的に意義があるとは考えにくく、DNA と結合した一部が特異性および親和性の高い結合に移ることも考えられる。

Glucocorticoid 剤の薬効の大部分がおそらく標的組織の glucocorticoid receptor を介すると考えられる。したがって glucocorticoid 剤を頻回

図 4 グルコルチコイドによるコラゲナーゼ遺伝子の発現抑制

図 5 グルコルチコイドによるオステオカルシン遺伝子の発現抑制

に大量投与しても、標的組織内の glucocorticoid receptor が回復していなければ、glucocorticoid 剤投与は無駄に投与している可能性が考えられる。また、耐性を得たリンパ球のように glucocorticoid receptor が存在しない病的組織では glucocorticoid 剤の効果が期待できない。

Glucocorticoid 療法において、血中 glucocorticoid 剤レベルと標的組織の glucocorticoid receptor レベルを測定することは、標的組織への効果もある程度推定でき、glucocorticoid 療法により科学性を与えると思われる。

HeLa 細胞を用いた *in vitro* 実験で glucocorticoids 添加後の glucocorticoid mRNA 発現をみると、cortisol, prednisolone, dexamethasone 投与後容量反応性に低下し、 10^{-5} M の濃度で control の 90%, 67%, 57% へおのおの低下した。Glucocorticoids 添加後の時間的变化では cortisol を添加した場合には、glucocorticoid rece-

ptor mRNA レベルは1時間後より認められたが軽度で早く回復し, dexamethasone 添加では強く長く抑制され, prednisolone 添加ではほぼその中間であった.

Glucocorticoids による glucocorticoid receptor mRNA 発現の down regulation の程度と持続時間は dexamethasone > prednisolone > cortisol の順であり, 各 glucocorticoid の生物学的作用の強さとはよく相関した.

ラットに betamethasone 投与 *in vivo* 実験では, 肝細胞質内 glucocorticoid receptor は binding assay ではほぼ消失しているのに対し, HeLa 細胞を用いる *in vitro* 実験では, dexamethasone 10^{-5} M の高濃度投与でも glucocorticoid receptor mRNA の発現はただか 50% までにしか低下しない. 両実験は *in vivo* と *in vitro*, ラットと HeLa 細胞と非常に異なった条件下であり, 一概に結論することはできない. しかし, glucocorticoid を大量投与しても glucocorticoid receptor mRNA の発現はゼロとはならず, glucocorticoid receptor は産生されつづけると思われるが, 存在する glucocorticoid により結合されてしまうことが示唆される.

(2) Glucocorticoid による転写活性調節

Glucocorticoid によりその作用に重要な働きをもつ glucocorticoid receptor の mRNA の発現が down regulation を起こすことを示した. Burnstein らは glucocorticoid により glucocorticoid receptor の down regulation をきたす sequence が, glucocorticoid receptor cDNA の +527 から +1,526 までの 1 kb に存在することを示した⁵⁾. LeClerc らは glucocorticoid receptor 遺伝子のプロモーター領域に結合し, glucocorticoid receptor の転写を抑制する human DNA binding factor (GRF-1) が glucocorticoid による glucocorticoid receptor の homologous down regulation を促進させることを示した⁶⁾. Glucocorticoid は GRF-1 mRNA 発現を促進するので, その結果として増加した GRF-1 により glucocorticoid receptor 遺伝子の転写が抑えられ, glucocorticoid receptor の down regulation

が生ずることを示している.

表 1 に glucocorticoid により転写活性調節を受ける物質を示す. 炎症と関係する血漿のプロテナーゼインヒビター (α_1 -Inhibitor III (α_1 I₃)) 産生はラット肝で glucocorticoid により調節されている. α_1 I₃ 遺伝子の機能 glucocorticoid response element (GRE) は転写開始部位 5'側 -168 から -151 bp の間に存在し, パリンドローム構造をとる⁷⁾.

Glucocorticoid は炎症時に活性化される collagenase などの蛋白分解酵素を抑え, 炎症の進展を阻止する働きをもっており, collagenase の活性化は AP-1 複合体により調節されている. AP-1 複合体はサイトカインの情報を核に伝えるが, collagenase 遺伝子上の AP-1 結合部位 TGAGTCA に結合し転写を促進する. Glucocorticoid receptor は AP-1 複合体と蛋白-蛋白結合し, 転写活性のない複合体を形成し, AP-1 の活性を抑え炎症時の collagenase 誘導を抑制する⁸⁾(図 4).

Glucocorticoid 投与時の骨粗鬆症の発現とオステオカルシンの関連が示されている. オステオカルシンは非コラーゲン性の主要な骨蛋白であり, VitD₃ により刺激され glucocorticoid により抑制される. オステオカルシン遺伝子のプロモーター領域に, VitD₃ の応答配列 -513 ~ -493 bp の TTGGTGACTCACC⁹⁾GGGTGAAC という二重のパリンドローム DNA sequence が存在している⁹⁾. Glucocorticoid receptor はオステオカルシン遺伝子の TATAbox にオーバーラップする部位に結合し, オステオカルシンの転写活性促進因子がプロモーター領域へ結合できないことになり, オステオカルシンの発現が抑制される(図 5).

近年 glucocorticoid による抗炎症作用が, サイトカインが接着分子の抑制を介することが示された. サイトカインが接着分子の発現を促進する nuclear factor κ B (NF- κ B) の作用は I κ B α により抑制される. Glucocorticoid は I κ B α 遺伝子の発現を促進し, I κ B α 蛋白を産生し, NF- κ B と結合し NF- κ B が核へ移行し NF- κ B 作用を抑制することが明らかとなった¹⁰⁾.

このように glucocorticoid は glucocorticoid receptor と結合後、炎症にかかわる多くの因子の転写活性を正または負の方向に調節することにより、抗炎症作用を示していると思われる。したがって、炎症に関する多くの物質の転写活性に及ぼす glucocorticoid の作用を検討することにより、glucocorticoid の分子レベルでの作用機序が明らかとなり、glucocorticoid 療法にさらに一層の科学的根拠を提供すると思われる。

文 献

- 1) Miyachi Y, Yotsumoto H, Kano T, Mizuchi A, Muto T, Yanagibashi K : Blood levels of synthetic glucocorticoids after administration by various routes. *J. Endocr.* 82 : 149-157, 1979.
- 2) Tanaka K, Kawamura H, Baba S, Miyachi Y : Betamethasone receptor levels following betamethasone administration. *Hiroshima J. Med. Science* 33 : 599-605, 1984.
- 3) Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J : Molecular Cloning—A Laboratory Manual (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.
- 4) Shimojo M, Hiroi N, Yakushiji F, Veshiba, Yamaguchi N, Miyachi Y : Differences in down-regulation of glucocorticoid receptor mRNA by cortisol, prednisolone and dexamethasone in HeLa cells. *Endocrine J.* 42 : 629-636, 1995.
- 5) Burnstein KL, Jewell CM, Cidlowski JA : Human glucocorticoid receptor cDNA contains sequences sufficient for receptor down-regulation. *J. Biol. Chem.* 265 : 7284-7291, 1990.
- 6) LeClerc S, Palaniswam R, Xie B, Govindan MV : Molecular cloning and characterization of a factor that binds the human glucocorticoid receptor gene and represses its expression. *J. Biol. Chem.* 266 : 17333-17340, 1991.
- 7) Abraham LJ, Bradshaw AD, Northemann W, Fey GH : Identification of a glucocorticoid response element contributing to the constitutive expression of the rat liver α_1 -inhibitor III Gene. *J. Biol. Chem.* 266 : 18268-18275, 1991.
- 8) Schüle R, Rangrajan P, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, Evans RM : Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62 : 1217-1226, 1990.
- 9) Morrison NA, Shine J, Fragonas JC, Verkest V, McMenemy ML, Eisman JA : 1, 25-dihydroxyvitamin D-responsive element and glucocorticoid repression in the osteocalcin gene. *Science* 246 : 1158-1161, 1989.
- 10) Sheiman RI, Cogswell PC, Lofguist AK, Baldain AS : Role of transcriptional activation of $I\kappa B\alpha$ in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 270 : 283-286, 1995.