

平成 21年 3月 31日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790254
 研究課題名(和文) 核内受容体の組織・細胞内局在の系統的解析
 研究課題名(英文) Systemic analysis of tissue and subcellular localization of nuclear receptors
 研究代表者 大橋 瑠子(OHASHI RIUKO)
 新潟大学・医歯学系・助教
 研究者番号：20447600

研究成果の概要：ヒト、ラット、マウス組織における核内受容体の組織局在の同定を完了した。HepG2細胞における染色性を各核内受容体で系統的に検討した結果、殆どの核内受容体は核質に発現するが、RORは核小体のgranular component、LXRはdense fibrillar componentにと異なる局在を示すことが判明した。さらに、LXRについて詳細な局在および機能をHepG2細胞を用いて進めた。その結果、LXRがリボゾームRNA転写において重要な役割を担う分子であることが判明した。より詳細な解析を加えつつ、これらの成果について一部は論文を完了し、他のデータについても論文投稿準備中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：核内受容体、組織細胞内局在、HNF4、LXR、病理学

1. 研究開始当初の背景

核内受容体ファミリーは低分子脂溶性物質をリガンドとする転写因子群であり、ヒトにおいては48種類存在する。エストロゲン受容体(ER)などのホルモン受容体のほか、急性前骨髄性白血病に関与することで知られるレチノイン酸受容体(RAR)や、マクロファージの脂質代謝と抗炎症作用に関わるLXR、PPARなどが存在する。多くの受容体が広く炎症、代謝、発癌などに関わり創薬分野

で最近注目されている。しかし、特異性の高い抗体はごくわずかであったため、核内受容体の発現解析に関してはmRNAレベルの研究が多く、その組織発現や細胞内局在については不明な点が多い。

申請者はこれまでに、東京大学先端科学研究センターシステム生物医学ラボラトリー(児玉研)、ペルセウスプロテオミクス社と共同で、パキユロウイルス発現系を用いて48種類の核内受容体全てに対し新規抗体の作製を行い、うち26受容体31種類について発

疫染色にも使用可能な特異的抗体を作製することに成功した。その後、平成 16 年度新潟大学プロジェクト推進経費(若手研究者奨励研究)を得て、作製した抗体を用いて、ヒト動脈硬化巣のマクロファージやヒト末梢血単球由来マクロファージでの LXR タンパクの発現を検討した(Watanabe Y et al.: Expression of the LXRalpha protein in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(3):622-627, 2005)。HNF4 には P1・P2 各プロモーター由来のアイソフォームが存在するが、各正常臓器、各臓器の癌毎に各プロモーター由来 HNF4 の発現パターンが異なっており、転移性癌においては各プロモーター由来アイソフォームのパターンを調べることで原発臓器を予測可能であること(Tanaka T et al. Dysregulated expression of P1 and P2 promotor-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha in the pathogenesis of human cancer. *J. Pathol.* 208(5):662-672, 2006)、そして、ヒト大腸癌の中には P1 プロモーター由来 HNF4 の発現が低下している症例が存在し、そのような症例では肝転移のリスクが高いこと(Oshima et al. Down-regulated P1 promoter-driven HNF4 expression in human colorectal carcinoma is a new prognostic factor against liver metastasis. *Pathol. Int.* 2007)などを報告してきた。また、平成 18 年度新潟大学プロジェクト推進経費(若手研究者奨励研究)を得て、大腸正常粘膜および大腸癌において、LXR、ROR の 3 受容体が核小体内に局在し、癌組織では全ての症例において免疫組織学的に上記 3 受容体の発現面積が正常組織よりも上昇していることを確認した(未発表)。現在免疫染色を行うことのできない核内受容体に対する抗体について順次開発中である。

2 . 研究の目的

本研究は、細胞内核内微小構造に対する抗体および核内受容体抗体と、パラフィン切片蛍光多重染色法、最新型高性能共焦点レーザー顕微鏡を用いたイメージング技術を駆使して、ヒトを中心とする哺乳類の各臓器について核内受容体の組織・細胞内局在を系統的に明らかにすることを目的とする。また、特殊な局在を示す受容体については、リガンドや薬物の投与が、核内受容体そのものや、核内受容体と相互作用する相手分子の細胞内局在に対してどのような影響をおよぼすかについて解析し、機能的側面についても分子生物学的解析を行なう。

3 . 研究の方法

まず、ヒト正常臓器に対して、各核内受容体抗体を用いて発現臓器、発現細胞のスクリーニングを行う。さらに細胞内・核内の微細構造に対する抗体との重染色により、各受容体の詳細な局在を明らかにする。必要に応じ RT-PCR、western blot による発現解析を行いデータの裏づけを行う。機能に反映しうる詳細な局在が判明した受容体については、機能的側面について分析を深める。最終的には、それまで得られたデータをもとに、プロテオミクス研究の基礎となる発現データベース作製を行う。

4 . 研究成果

(1) ヒト、ラット、マウス組織における核内受容体の組織局在の同定

29 種類の核内受容体について、各臓器における組織細胞内局在の解析を完了し、現在投稿準備中である。特にヒト・マウス肝臓、膵臓については細胞特異的な局在について詳細な検討を行なった。その結果のひとつとして、糖尿病の原因遺伝子の一種である HNF4 は従来多くの他グループの RNA イベルでの検討により膵ラ氏島のインスリン産生細胞(細胞)において発現を認めるとされてきたが、当研究での組織学的解析により HNF4 の発現はインスリン産生細胞(細胞)よりもグルカゴン産生細胞(細胞)でより強く発現することが判明するなど、興味深いデータが得られ、論文発表した。

(2) 特徴的な局在を示した核内受容体の細胞内局在検討

HepG2 細胞における染色性を全ての核内受容体抗体について系統的に検討し、さらに western blot で検討した結果、12 種類の抗体で特異性が明らかになった。現在も 11 種類の抗体の特異性検討を進行中である。殆どの核内受容体は核質に発現するが、核内微小器官に対する特異的抗体を組み合わせた蛍光多重染色により、LXR は核小体内の微細構造の中でも、dense fibrillar component に異なる局在を示すことが判明した。

(3) 核内受容体 LXR の局在と機能の分子生物学的解析

LXR について詳細な局在および機能を HepG2 細胞を用いて進めた。その結果、LXR がリボゾーム RNA 転写において重要な役割を担う分子であることが判明した。

通常細胞培養環境下では HepG2 細胞において LXR は核小体形成タンパク fibrillarin およびリボゾーム転写関連分子 UBF とそれぞ

れ共局在しているが、Actinomycin D を用いてリボゾーム転写を担当する RNA polymerase I の活性を特異的に阻害すると、核小体の形成が阻害され fibrillar in や UBF の核小体から放出されると同時に LXR も核小体内から核質へと移行する現象が観察された。LXR の合成リガンドを用いて HepG2 細胞内在性の LXR に対して刺激するとリボゾーム転写が促進され、RT-PCR 法にてリボゾーム前駆体の発現が上昇した。また、HepG2 細胞およびマウス肝臓を用いた免疫沈降法により内在性の LXR とリボゾーム転写関連分子 UBF との間に細胞内相互作用が見られた。

上記内容は、2009年5月1日～3日に京都で開催される第98回日本病理学会総会にて発表予定である。また、今後、より詳細な検討を進め、論文投稿予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

1. Takegoshi S, Jiang S, Ohashi R, Savchenko AS, Iwanari H, Tanaka T, Hasegawa G, Hamakubo T, Kodama T, Naito M. Protein expression of nuclear receptors in human and murine tissues. *Pathol Int.* 59(2): 61-72, 2008. 査読有

2. Kazawa T, Kawasaki T, Sakamoto A, Imamura M, Ohashi R, Jiang S, Tanaka T, Iwanari H, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Naito M. Expression of liver X receptor alpha and lipid metabolism in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophage. *Pathol Int.* 59(3): 152-60, 2008. 査読有

3. Sumi K, Tanaka T, Uchida A, Magoori K, Urashima Y, Ohashi R, Ohguchi H, Okamura M, Kudo H, Daigo K, Maejima T, Kojima N, Sakakibara I, Jiang S, Hasegawa G, Kim I, Osborne TF, Naito M, Gonzalez FJ, Hamakubo T, Kodama T, Sakai J: Cooperative interaction between Hepatocyte Nuclear Factor 4 α and GATA transcription factors regulates ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8, *Molecular and Cellular Biology* 27(12): 4248-4260, 2007. 査読有

4. Oshima T, Kawasaki T, Ohashi R, Hasegawa G, Jiang S, Umezumi H, Aoyagi Y, Iwanari H,

Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T, Naito M: Down-regulated P1 promoter-driven HNF4 α expression in human colorectal carcinoma is a new prognostic factor against liver metastasis. *Pathol Int* 57: 82-90, 2007. 査読有

5. Sakamoto A, Kawasaki T, Kazawa T, Ohashi R, Jiang S, Tanaka T, Iwanari H, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Naito M: Expression of liver X receptor α in fetal macrophages in rats. *J Histochem Cytochem* 55: 641-649, 2007. 査読有

[学会発表](計2件)

1. 姜淑英、竹越聡、大橋瑠子、岩成宏子、内藤眞 肝構成細胞における核内受容体の発現. 第97回日本病理学会総会 2008/5/15～17 金沢

2. 國井亮祐、長谷川剛、山本尚、梅津哉、姜淑英、大橋瑠子、内藤眞、渡辺健寛 肺線癌における TTF-1(Thyroid Transcription Factor-1)の発現例、非発現例の検討. 第97回日本病理学会総会 2008/5/15～17 金沢

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大橋 瑠子(OHASHI RIUKO)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：20447600

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし