

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659040

研究課題名（和文）

ラマン分光イメージングによるホルモン・受容体分子相関の細胞内機能分析

研究課題名（英文）

Steroid hormones and their receptor interaction by Raman spectrometer analysis

研究代表者

河田 光博 (KAWATA MITSUHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：60112512

研究成果の概要（和文）：脂溶性のステロイドホルモンと受容体の相関についてラマン分光スペクトル解析が可能かどうか、またその応用として、坐骨神経の軸索と脂溶性成分に富む髄鞘の区別化がラマンイメージングとしてとらえられるかどうか検討した。テストステロンとエストラジオールの特異的ラマンスペクトルを得たが、希釈液の水のスペクトルとピークが重なることが判明し、培養条件の基準化が課題として残った。坐骨神経の軸索と髄鞘は異なるラマンスペクトルを示したことから、両者の構造的違いを明瞭に可視化することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：We tried to investigate the interaction of steroid hormones and their receptor by Raman spectrometer analysis and challenged the possibility to visualize the discrimination of axon and myelin sheath of the sciatic nerve by this method. We got specific spectrum of estradiol and testosterone, but dilution protocol to apply for the in vitro study remains to be settled. Appropriate condition by Raman analysis to distinguish the axon and myelin was identified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞機能形態学

1. 研究開始当初の背景

脂溶性の低分子化合物であるステロイドホルモンがリガンドとしての作用を発揮するには、特異的な受容体と結合することが不可欠である。そのため、ホルモンのリガンド・受容体の分子間の結合様式を明らかにすることが、ホルモン分子作用の解明に直結する。申請者らは、これまでホルモン分子の作用機構の研究を進め、GFP分子イメージング法を中心にその受容体動態の詳細を明らかにし、構造と機能連関について知見を積み上げてきた。

近年、ラマン分光解析が材料工学などの分野で飛躍的に発展し、革新的テクノロジーとして物理化学領域に新たな成果を生み出している。ラマン分光とは、構成分子の原子結合に一定波長の光が入射した場合、原子の結合様式に依存して微弱な光が散乱する現象をいう。ラマン分光は分子固有の散乱光であるため、このラマン散乱光を捉えることで、その分子の同定が非標識的に可能となり、無機物から有機物に至る広範囲の物性分野での解析が進められている。一方、このラマン分光の非標識分子同定を生物学領域に応用

しようとする試みがなされてきたが、多様な分子が多岐にわたって関連しあう生細胞での研究は困難な点が多く、実用化には至らなかった。しかしながら、昨今の分子生物学手法の進展により、解析のターゲットとなる分子が純化物として実験操作できること、ラマン分光のXYZ走査型共焦点光学系の空間解像度が格段に向上したこと、さらに、UVラマン共鳴法の導入により原理応用の実現が可能となったことにより、ラマン分散光を生物試料に適用し、解析を踏み出すための十分かつ必要な条件が急速に整いつつある。これらの背景により、ラマン分光スペクトルを可視的に捉えるレーザー共焦点ラマン顕微鏡が創作され、生命科学研究への導入が始められようとしている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分子固有のラマン散乱光を指標に、脂溶性ステロイドホルモン（リガンド）とその受容体の分子相関について非標識的可視化を試み、従来のGFP分子標識法やオートラジオグラフィ、免疫細胞化学では明らかにされなかったホルモン・受容体の細胞内での結合様相について、ラマン分光イメージングがどの程度可能なのか、どのような条件で解析プロトコルを構築すれば良いのかなど、基本的項目について検討することである。また、その応用としてラマンイメージングを脂溶性成分に富む末梢神経組織標本に用い、髄鞘と軸索の区別にラマン解析が可能かどうかを検証する。

とくに本実験で用いるラマン顕微鏡による生細胞培養系の解析によって、小分子であるステロイドホルモンと、タンパクである受容体が、細胞内のどの部位で、どのような時間軸で結合し、どのように両者の離合が行われるのか、ホルモン・受容体機能の活性化・不活性化の分子メカニズムの解明に迫ることを長期的な目標にするが、これらの解析の基盤となる事項についてはまったく手探り状態であるため、現有の機器によってもたれされる計測結果がどの程度信頼性の高いものとなりうるのかを検索する。したがって、これらの基本的なパラメーターが計測し、それらの応用である生体組織でのラマン顕微鏡解析が可能となることを目指しての挑戦的な試みを行う。

本研究の斬新性・チャレンジ性は、ラマン分光イメージングの物性および組織への応用である。とくにステロイドホルモン固有のラマン散乱光を捉え、ホルモンと受容体の特定分子を非標識方法によってイメージングすることをとらえようとするところにある。物性工学などの材料分野で使用されているラマン分光解析技術の進歩は近年目覚ましく、微弱なシグナルであるラマン散乱光を検出

するためのシグナル検出デバイスの開発や光電子増倍管の改良、3次元XYZ走査型共焦点光学系などの空間解像度向上など、ハード面での革新的創出による新たなラマン顕微鏡（ラマン分光装置の市場で30年以上の実績を持つHORIBA Jobin Yvon社による顕微ラマン装置LabRAMファミリー）が利用できる状況である。このような最新技術が裏打ちされた装置を用い、生細胞イメージングに適用するモデル系として、本研究ではステロイドホルモン（エストロゲン、アンドロゲン、グルココルチコイド）とその特異受容体の関係について追究しようとしている。従来より、ホルモン・受容体の結合様相を検知するには、放射性同位元素を用いてホルモンそのものを標識する方法と、受容体を標識する方法とがある。後者においては、GFPなどの蛍光物質を付加させる方法と、特異的な抗体を用いて局在を検索する方法が確立している。しかしながら、これらの方法はすべて、ターゲットとなる分子を標識することが必要なため、標識に伴う制約が生じるとともに、実際の内因性分子の挙動、動態を正確に反映しているかは検討の余地が残るところである。申請者らの研究室では、GFPとその変異体を用いて標識したホルモン受容体の生細胞イメージングに関する高い実績を持っており、これらの蓄積された情報と、ラマン散乱光で得られる研究結果と比較することが可能である。

また、末梢神経系において神経軸索のまわりを髄鞘が覆っているが、髄鞘を形成するシュワン細胞は脂溶性ステロイドであるグルココルチコイドの受容体を発現しており、神経損傷の後にグルココルチコイド投与が軸索の再生を促すことが知られている。これらの実験モデルを用いて、末梢神経軸索と髄鞘のラマン分光イメージングの有用性を検索することが第二の目的である。

3. 研究の方法

生細胞でのラマン測定におけるステロイドホルモンとその受容体について時空間依存的解析、変異タンパク解析、リガンド解析を行なう。計画は以下のように段階的に遂行する。

- (1) ターゲットとなるステロイドホルモン受容体の合成・精製を行い、受容体およびホルモン（リガンド）のラマン散乱光を解析の後、おのおのの分子検知スペクトルを確立する。ステロイドホルモン受容体はNTD、DBD、LBDのそれぞれのドメインに分かれているが、可能な限り受容体タンパクの全長の生成をめざすが、それが困難な場合はこれらのドメインのうち、とくにLBDを生成、精製し、リガンドとの結合状況を解明する。

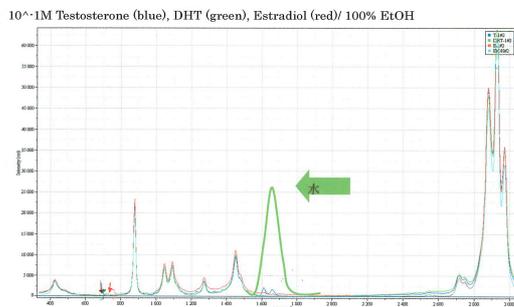
- (2) in vitro 系での実験モデル作成を念頭に、リガンド（エストラジオール、テストステロン）の培養液中でのラマン分光スペクトルを測定する。また、タンパクが溶解しているバッファのスペクトルをバックグラウンドとし、これに対するリガンドおよび受容体それぞれ特異的なスペクトルを収集する。ラマン計測による測定濃度閾値や、混合物によるピーク消失の可能性など、各サンプルのラマン散乱光スペクトルデータベース構築を行う。
- (3) ラマン測定には、レーザ波長、レーザ強度、共焦点ピンホールサイズ、分光スリットサイズ、測定スペクトル範囲、データ積算数、測定チャンバー形状など、多くの条件検討が必要であり、最適な条件を見出す。
- (4) ウィスター系ラット（雄）の坐骨神経を用い、コントロール、軸索を結紮して損傷し、その後時間経過とともに軸索が再生していく標本を作成する。また、再生過程において、グルココルチコイドを動物に腹腔内投与、または飲料水に溶かして投与し、その影響をラマン分光イメージングを用いて検証する。

4. 研究成果

(1) 培養系での実験

ラマン顕微鏡 (XploRA, HORIBA: スペクトル分解能 1.0 cm^{-1} @532nm、空間分解能 $1 \mu\text{m}$) を用い、ホルモンとしてステロイドホルモンの溶液中でのラマンスペクトルの解析、受容体タンパクの精製を行った。また、本顕微鏡での対物レンズ、レーザー波長、レーザー強度、共焦点ピンホールサイズ、分光スリットサイズ、測定スペクトル範囲、測定時間、データ積算数などの条件検討を試みた。

テストステロンとエストラジオールを水に溶かし、これらのラマン特異分光スペクトルを観察した。その結果、以下のスペクトルを得た。



この解析により、水のピークとテストステロンやエストラジオールの特異的なラマン分光スペクトル部分が完全にマスクされていることが判明した。これらの結果は水系の緩衝液を用いる実験モデルではリガンド

側からのラマン変化を観察することは困難であること、液体サンプル測定用の石英鏡ではなく、ステンレスウェルを用いて希少で希薄な液体サンプルを測定する系の確立が求められた。

(2) 組織標本系での実験

ホルマリン固定、マウント材料、カバーガラスなどによる影響を考慮し、坐骨神経標本においてシュワン細胞がグルココルチコイド受容体を発現していることもあり、軸索とシュワン細胞との関係についての特異的なラマンスペクトルを得るような条件設定を確立した。軸索と髄鞘の特異的ともとれるラマンスペクトルが得られたことから、坐骨神経の髄鞘形成が加速するような条件を作り、その条件下でラマンスペクトルを測定し、それぞれのスペクトルの検証を行った。

坐骨神経の長軸 (図1) に沿ったラマンスペクトル (図2) を用いると緑と赤で示される構造物が帯状に並んでおり、軸索と髄鞘の並びと一致するようなイメージを得た。

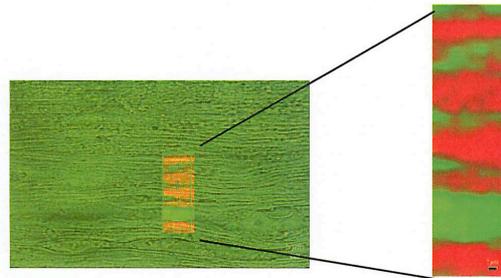
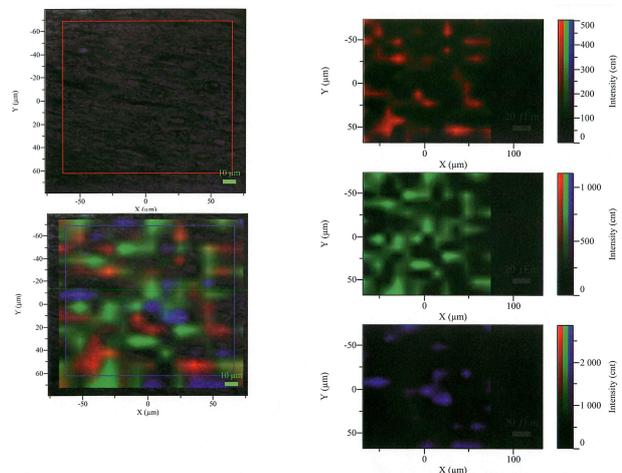


図1

図2

さらにマッピングの結果、 2900 cm^{-1} 付近のCH伸縮スペクトルに違いに注目して解析を行い、3種類のスペクトルをモデルとしてマップ内の成分分布をイメージング化した。モデリングの際のスペクトルは規格化している。これらから、軸索と髄鞘の区分を新たなイメージング技術で可視化することに成功した。



本実験の延長として、軸索再生に対するグルココルチコイド投与とそのラマンイメージングを行い、現在その解析結果を検討中である。

以上から、今後培養系でのリガンド添加の基本的条件の検討と、末梢神経組織標本における軸索と髄鞘の区別化が可能となったことから、軸索再生への新たなイメージング技術の確立が次のステップとして課題となった。

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 15 件)

- ①. Yoshida A, Morihara T, Matsuda K I, Sakamoto H, Arai Y, Kida Y, Kawata M, and Kubo T: Immunohistochemical analysis of the effects of estrogen on intraarticular neurogenic inflammation in a rat anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. *Connect Tissue Res*, 査読有, 53:197-206 (2012) doi:10.3109/03008207.2011.628059
- ②. Okamoto S I, Ikeda T, Sawamura K, Nagae M, Hase H, Mikami Y, Tabata Y, Matsuda K I, Kawata M, and Kubo T: Positive effect on bone fusion by the combination of platelet-rich plasma and a gelatin beta-tricalcium phosphate sponge: a study using a posterolateral fusion model of lumbar vertebrae in rats. *Tissue Eng Part A*, 査読有, 18:157-66 (2012) doi:10.1089/ten.tea.2011.0283
- ③. Sakamoto H, Takahashi H, Matsuda K I, Nishi M, Takanami K, Ogoshi M, Sakamoto T, Kawata M: Rapid signaling of steroid hormones in the vertebrate nervous system. *Frontiers in Bioscience*, 査読有, 17: 996-1019 (2012) doi:10.2741/3970
- ④. Matsuda K I, Mori H, Nugent B M, Pfaff D W, McCarthy M M, and Kawata M: Histone deacetylation during brain development is essential for permanent masculinization of sexual behavior. *Endocrinology*, 査読有, 152:2760-2767 (2011) doi:10.1210/en2011.0193
- ⑤. Katoh A, Fujihara H, Ohbuchi T, Onaka T, Hashimoto T, Kawata M, Suzuki H, Ueta Y: Highly visible expression of an oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene in the hypothalamus and posterior pituitary of transgenic rats. *Endocrinology*, 査読有, 152:2768-2774 (2011) doi:10.1210/en.2011.0006
- ⑥. Nishi M, Noriko H H, and Kawata M: Intranuclear dynamics of corticosteroid receptors and effects of proteasomal activity in cultured hippocampal neural cells. *Neurosci Lett*, 査読有, 494:65-69 (2011) doi: 10.1016/j.neulet.2011.02.058
- ⑦. Morisaki S, Kawai Y, Umeda M, Nishi M, Oda R, Fujiwara H, Yamada K, Higuchi T, Tanaka C, Kawata M, and Kubo T: In vivo assessment of peripheral nerve regeneration by diffusion tensor imaging. *J Magn Reson Imaging*, 査読有, 33:535-542 (2011) doi:10.1002/jmri.22442
- ⑧. Mori H, Matsuda K, Tsukahara S, Kawata M: Intrauterine position affects estrogen receptor alpha expression in the ventromedial nucleus of the hypothalamus via promoter DNA methylation. *Endocrinology*, 査読有, 151:5775-5781 (2010) doi: 10.1210/en.2010-0646
- ⑨. Morisaki S, Nishi M, Fujiwara H, Oda R, Kawata M, and Kubo T: Endogenous glucocorticoids improve myelination via Schwann cells after peripheral nerve injury: An in vivo study using a crush injury model. *Glia*, 査読有, 58:954-963 (2010) doi: 10.1002/glia.20977
- ⑩. Todoroki M, Ueta Y, Fujihara H, Otsubo H, Shibata M, Hashimoto H, Kobayashi M, Sakamoto H, Kawata M, Dayanithi G, Murphy D, Hiro H, Takahashi K, and Nagata S: Induction of the arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion transgene in the rat locus coeruleus. *Stress*, 査読有, 13:281-291 (2010) doi:10.3109/10253890903383406

[学会発表] (計 53 件)

- ①. 橋本隆, 松田賢一, 河田光博: 転写共役因子 SAFB2 による、エストロゲン受容体の動態と機能抑制. 第1回4大学連携研究フォーラム, 2011.12.9.京都.
- ②. 河田光博: アンドロゲン受容体の細胞内動態

と性機能への関与. 第11回日本抗加齢医学学会総会 2011. 5. 27-29. 京都

- ③. 河田光博: 性ホルモン作用と受容体、行動制御の分子メカニズム. 第34回日本神経科学大会, 2011. 09. 14-17. 横浜.
- ④. 河田光博: アンドロゲン受容体の細胞内動態. 第1回テストステロン研究会(第10回日本Men's Health医学会) 2010. 11. 28. 東京
- ⑤. Kawata M: Sexual Neuroendocrinology: Sex Steroid Hormone Receptor Dynamism, Distribution and Functional Significance. IBRO School of Neuroscience, 2010. 10. 3-15. Selangor Darul Ehsan, Malaysia.

[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]

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anat1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河田 光博 (KAWATA MITSUHIRO)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号: 60112512

(2) 研究分担者

松田 賢一 (MATSUDA KENICHI)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 40315932

辻村 敦 (TSUJIMURA ATSUSHI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 50236890

(3) 連携研究者

加来 奈津子 (KAKU NATSUKO)
堀場製作所元研究員、大阪大学免疫フロンティアセンター元特任助教

森崎 真介 (MORISAKI SHINSUKE)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 20627294