

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18708

研究課題名(和文)ミトコンドリア蛋白MGARPが関わるステロイドホルモン産生細胞の恒常性維持機構

研究課題名(英文)Role of the mitochondrial protein MGARP in steroidogenic cell survival

研究代表者

西島 義博(Nishijima, Yoshihiro)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：80453710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年ミトコンドリア蛋白であるMGARPが、ステロイドホルモン産生細胞の機能に積極的に関与していることを示す報告が集積されてきたが、これらの細胞の生存性維持へのMGARPの関与については知られていない。また神経細胞では低酸素下でMGARP発現が正に調節されるが、ステロイドホルモン産生細胞ではこの調節は未検討である。本研究により、MGARPがステロイドホルモン産生細胞の細胞生存性維持に関与し、またMGARP発現は低酸素誘導性転写因子HIF-1の制御下にあることが示唆された。細胞生存性維持におけるMGARPの詳細な役割や、HIF-1によるMGARP発現調節機序については、さらに検討を要する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、新たなMGARPの機能としてステロイドホルモン産生細胞の生存性維持作用が明らかとなり、今後のステロイドホルモン研究に新たなフィールドを開拓したといえる。またヒト胎児副腎皮質細胞モデルであるNCI-H295A細胞において、MGARP発現が低酸素誘導性転写因子HIF-1の制御下にあることが示唆されたことで、胎盤機能不全等で慢性的低酸素下におかれるヒト胎児副腎皮質でのステロイドホルモン産生について、本細胞がin vitroモデルとなる可能性が開かれた。

研究成果の概要(英文)：The mitochondrial protein MGARP is abundantly expressed in steroidogenic cells with a few exceptions. An increasing number of studies suggest an important role of MGARP in steroidogenic cell function. However, a role for MGARP in steroidogenic cell survival is unknown. MGARP is regulated by hypoxia in neurons, the phenomenon of which is not known in steroidogenic cells. The results indicate that MGARP is likely involved in steroidogenic cell survival and that MGARP expression may be under control of HIF-1. Further studies are warranted for detailed mechanisms involved in MGARP-mediated steroidogenic cell survival and HIF-1-mediated MGARP expression.

研究分野：産婦人科学

キーワード：MGARP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MGARP/OSAP は卵巣特異的新規遺伝子探索の過程で Hennebold らにより発見された (Endocrinology, 2000)。申請者らの研究室ではこれまでに Hennebold 博士との共同研究で、MGARP がマウスおよびヒトにおいて胎盤以外のステロイドホルモン産生組織のミトコンドリア選択的に発現していることを明らかにした (Endocrinology, 2009)。またマウス副腎皮質 Y-1 細胞において MGARP 発現抑制を行ったところ、cAMP 刺激下のプロゲステロン産生が有意に減少すると共に、ミトコンドリアの断片化像と核周囲への凝集集積像が認められた。加えてミトコンドリア量の指標であるミトコンドリア DNA コピー数/核 DNA コピー数の相対比が有意に減少した。

ステロイドホルモンの de novo 生成では、細胞膜や小胞体等に存在するコレステロールが何らかの形でミトコンドリアに取り込まれ、外膜から内膜に移動し、CYP11A1 の作用をうけプレグネノロン(P5)が合成され、いくつかのプロセスを経てコルチゾール等が合成される。この過程には Mt 外膜から内膜への移行を促進するステロイド産生急性調節蛋白 (StAR) や、個々が特異的な細胞内局在を有するステロイドホルモン産生酵素 (CYP11A1 や 3 HSD など) が関与している。こうしたステロイドホルモン産生促進蛋白群は、ACTH やゴナドトロピンの主要なセカンドメッセンジャーである cAMP 投与により発現が増強するのが特徴である。しかしながら、上記の研究において MGARP は cAMP による発現制御を受けていなかった。そこで我々は MGARP のステロイドホルモン産生における役割は限定的で、ミトコンドリア量や形態の制御を通じた間接的なものではないかと考えていた。しかし最近報告された 2 つの研究はこの推察に全く反するものである。Jinn らは MGARP が小胞体からミトコンドリアへのコレステロールの運搬に重要な働きを示すことを明らかにした (Cell Metabolism, 2015)。2016 年には、MGARP がステロイドホルモン合成に必要な全遺伝子を制御する転写因子である Ad4BP/SF-1 の標的遺伝子であることが ChIP-seq 解析により明らかにされた (馬場、諸橋ら：第 24 回日本ステロイドホルモン学会、2016)。

また MGARP はマウス神経細胞において通常はほとんど発現していないが、低酸素下では転写因子 Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) の蛋白発現が増強し、MGARP がこの標的遺伝子として発現し、軸索の末梢へのミトコンドリア移動に関与することが示された (Li Y, et al., JCB 2009)。マウス不死化顆粒膜細胞株では、中等度の低酸素下で HIF-1 発現が増強し、ミトコンドリアでのコレステロール運搬を促進する Star 蛋白の発現増強を介してプロゲステロン産生が増加することが報告されている (Kowalewski MP et al., MCE 2015)、ステロイドホルモン産生における HIF-1 の役割に関する知見はまだ乏しく、MGARP との関連性を本研究で究明したい。なおヒト副腎皮質 NCI-H295A 細胞株に塩化コバルト添加で低酸素模倣状態 (HIF-1 蛋白安定化) とすると、MGARP mRNA 発現が 3~4 倍に増強する予備実験結果を得ている。

ミトコンドリアは、細胞種や環境、分化程度、病的状態により大きさや構造が動的に変化する。常態では個々の融合 (fusion) と分裂 (fission) のバランスを制御して、網状のネットワーク構造を維持している。酸化ストレス等により機能が低下し膜電位が低下したミトコンドリアは、autophagy の一型である mitophagy の標的となる。一方、膜電位の保たれたミトコンドリアは fusion しやすい。膜電位低下が拡がるとアポトーシスが引き起こされる。膜透過性遷移孔 (MPTP) が開きミトコンドリア内外膜間腔にある cytochrome C (cyt C) やアポトーシス誘導因子 (AIF) などの蛋白、Ca²⁺、活性酸素種などが細胞質中に放出され、caspases が活性化されアポトーシスがおこる。Fusion は抑制、fission が促進され、ミトコンドリアは断片化やクリスタ再構築といった形態的变化を生じる。Y-1 細胞における MGARP 発現抑制では、1) ミトコンドリアのネットワーク構造が壊れ断片化像や核周囲への凝集集積像が認められたこと、2) 予備実験で cyt C の細胞質への放出を示唆する Western blot の所見が得られたことから、我々は MGARP がミトコンドリアの機能や形態の恒常性維持に関与し、アポトーシスを抑制する働きがあるのではないかと推察しており、本研究で追求する予定である。

2. 研究の目的

MGARP はステロイドホルモン産生細胞のミトコンドリアに選択的に発現する。ミトコンドリアのコレステロール輸送への関与や、性腺や副腎の主要転写因子 Ad4BP/SF-1 の標的遺伝子であることなど、近年 MGARP に関する重要な知見が示されてきており、本蛋白がステロイドホルモン産生細胞の機能維持に積極的に関与していることが示唆される。また神経細胞では HIF-1 で MGARP 発現が正に調節されるが、ステロイドホルモン産生細胞ではこの調節は知られていない。そこで本研究では 2 種類のステロイドホルモン産生株を用いて、MGARP の HIF-1 による発現調節、および細胞生存性維持における MGARP の役割を検討する。

3. 研究の方法

ステロイドホルモン産生細胞株であるヒト胎児副腎皮質モデル細胞株である NCI-H295A 細胞およびヒト顆粒膜細胞モデルである KGN 細胞を用い、以下を検討した。

(1) MGARP の細胞内局在

蛍光免疫染色により検討した。ミトコンドリアマーカーとしては ATP5A1 に対する抗体を用いた。

(2) 低酸素模倣下での MGARP の発現挙動の検討

NCI-H295A 細胞に対して塩化コバルト(0.1mM)添加を行い疑似低酸素状態とし、MGARP と低酸素下の転写に關与する Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)の発現挙動について Western blot で解析した。また一部の実験は、HIF-1 阻害剤である Echinomycin(1nM)の共存下でも行った。KGN 細胞においても同様の塩化コバルト添加実験を行い、MGARP mRNA 発現を TaqMan リアルタイム PCR 法で検討した。

(3) ステロイドホルモン産生細胞の生存性維持における MGARP 関与の検討

MGARP 発現を特異的 siRNA 添加により一時的に発現抑制させ、以下を検討した。MGARP 発現抑制は Western blot で確認した。

細胞生存性の変化: MTS アッセイ、ATP アッセイ

Mt 膜電位変化: Mito-ID 膜電位 / 細胞毒性測定キットにて測定

アポトーシス: Annexin V フローサイトメトリー解析

4. 研究成果

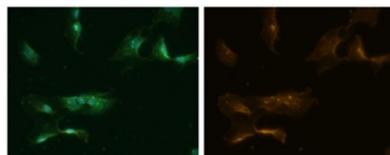
(1) MGARP の局在

KGN 細胞株を用いて蛍光免疫染色により MGARP の細胞内局在を検討した。

図に示すように MGARP はミトコンドリアマーカーである

蛍光免疫染色

MGARP (緑)
ATP5A1 (Mt マーカー; 赤)



ATP5A1 と co-localize することが確認され、顆粒膜細胞株 KGN 細胞においてもミトコンドリアに MGARP が蛋白発現していることが示された。同様の結果は NCI-H295A 細胞でも示された。

(2) 低酸素模倣下での MGARP の発現挙動の検討

神経細胞では MGARP は低酸素刺激で HIF-1 を介し発現制御されているが、ステロイドホルモン

産生細胞では HIF-1 による

MGARP の発現調節は検討

されていない。今回

NCI-H295A 細胞に対して

塩化コバルト(0.1mM)添加

を行い疑似低酸素状態

とすると、HIF-1 蛋白

発現は 6 時間後には

4-5 倍、24 時間後には

20 倍以上に著明に増強

することが Western blot

で確認できた。この条件下で、

ステロイドホルモン産生細胞

特異的に発現する MGARP 発現

を見てみると、6 時間後には

2 倍、24 時間後には 6 倍

発現が増強した。またこの

MGARP 蛋白発現の増強は

HIF-1 阻害剤である

Echinomycin(1nM)の共存下

ではほぼ完全に抑制された。

また KGN 細胞において

同様の実験を行った結果、

塩化コバルト添加 6 時間後

において MGARP mRNA の

8 倍以上の発現増加が認め

られた(右上図)。また反応

の陽性対照である GLUT-1 と

MGARP とでは発現増強の

経時変化が異なることが注

目され、今後の検討課題と

考えられた。

(3) ステロイドホルモン産生細胞の生存性維持における MGARP 関与の検討

MGARP mRNA 基礎レベルが高値であった NCI-H295A 細胞においては、特異的 siRNA による MGARP

発現抑制により 72 時間後には細胞

生存性を示す MTS 吸光度が 20% 減少し、

ミトコンドリア膜電位が低下し、アポ

トーシスを示す Annexin V 陽性細胞数

が約 3 倍増加した。一方、MGARP mRNA

基礎レベルが NCI-H295A 細胞の約 1/10

であった KGN 細胞では、特異的 siRNA

による MGARP 発現抑制は明らかに確認

でき、MGARP 発現抑制(48h)で ATP 産生

は低下した(右図)。しかし MTS アッセイ

やミトコンドリア膜電位測定、Annexin V

フローサイトメトリー解析では変化が見られ

なかった。

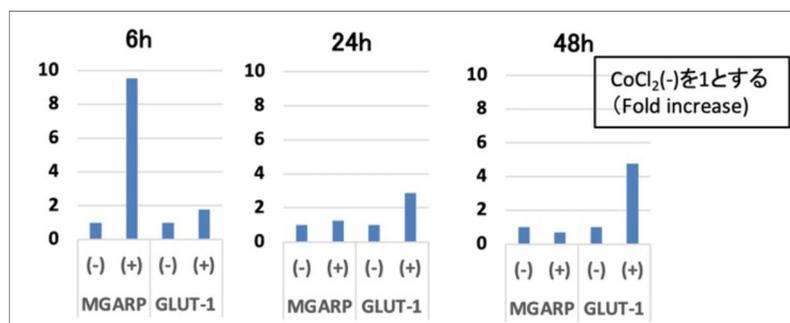
このように、NCI-H295A 細胞と KGN 細胞

とでは、MGARP の局在や HIF-1 による調

節など共通する部分も認められたが、

MGARP 基礎レベルでかなりの差が認め

られ、細胞全体の恒常性維持(生



で確認できた。この条件下で、ステロイドホルモン産生細胞特異的に発現する MGARP 発現を見てみると、6 時間後には 2 倍、24 時間後には 6 倍発現が増強した。またこの MGARP 蛋白発現の増強は HIF-1 阻害剤である Echinomycin(1nM)の共存下ではほぼ完全に抑制された。また KGN 細胞において同様の実験を行った結果、塩化コバルト添加 6 時間後において MGARP mRNA の 8 倍以上の発現増加が認められた(右上図)。また反応の陽性対照である GLUT-1 と MGARP とでは発現増強の経時変化が異なることが注目され、今後の検討課題と考えられた。

MGARP は我々がマウス副腎 Y-1 細胞でプロゲステロン産生に關与することを報告したミトコンドリア蛋白であり、ヒト胎児副腎皮質ではステロイドホルモン産生層である胎児層に主に発現する。したがって低酸素下で HIF-1 がステロイドホルモン産生を制御し、これに MGARP が關与している可能性がある。一方、NCI-H295A 細胞の親戚株である NCI-H295R 細胞では HIF-1 の増強は軽微に留まった。副腎皮質研究に頻用される NCI-H295R 細胞と比較し、低酸素の影響の検討には NCI-H295A 細胞がより適切であると考えられた。

(3) ステロイドホルモン産生細胞の生存性維持における MGARP 関与の検討

MGARP mRNA 基礎レベルが高値であった NCI-H295A 細胞においては、特異的 siRNA による MGARP

発現抑制により 72 時間後には細胞

生存性を示す MTS 吸光度が 20% 減少し、

ミトコンドリア膜電位が低下し、アポ

トーシスを示す Annexin V 陽性細胞数

が約 3 倍増加した。一方、MGARP mRNA

基礎レベルが NCI-H295A 細胞の約 1/10

であった KGN 細胞では、特異的 siRNA

による MGARP 発現抑制は明らかに確認

でき、MGARP 発現抑制(48h)で ATP 産生

は低下した(右図)。しかし MTS アッセイ

やミトコンドリア膜電位測定、Annexin V

フローサイトメトリー解析では変化が見られ

なかった。

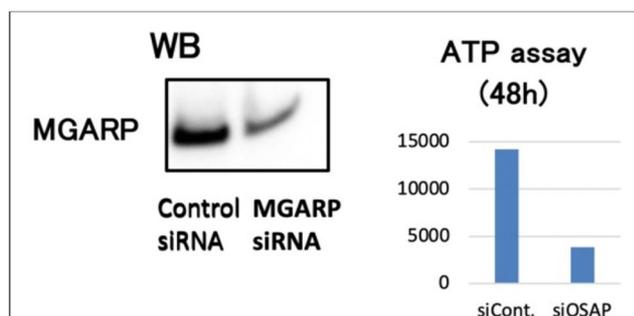
このように、NCI-H295A 細胞と KGN 細胞

とでは、MGARP の局在や HIF-1 による調

節など共通する部分も認められたが、

MGARP 基礎レベルでかなりの差が認め

られ、細胞全体の恒常性維持(生



このように、NCI-H295A 細胞と KGN 細胞とでは、MGARP の局在や HIF-1 による調節など共通する部分も認められたが、MGARP 基礎レベルでかなりの差が認められ、細胞全体の恒常性維持(生

存やアポトーシス抑制)への寄与程度についてはかなり異なることが示唆された。このような差異が細胞の由来臓器の違いによるのか、それとも MGARP 基礎発現量の違いによるのかについては、今後さらに検討を要すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------