

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591098

研究課題名(和文) リアルタイムイメージングを用いた SERM の組織特異的作用メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analyses of tissue-specific action of SERMs using real-time imaging techniques

研究代表者

河手 久弥 (KAWATE HISAYA)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20336027

研究成果の概要(和文)：我々は、SERM の組織特異性を規定する分子メカニズムを明らかにするために、エストロゲン受容体(ER α)に GFP タンパク質を結合させて、様々な組織由来の細胞で発現させて、その細胞内局在を解析した。乳癌細胞株において、エストラジオール (E₂) 存在下では、ER α は核内で foci を形成するのに対して、RLX 存在下では、ER α は核小体に移行していた。この RLX による ER α の核小体移行は、他の組織由来の細胞株では認められなかった。蛍光抗体法を用いた実験より、内在性の ER α も RLX 存在下で核小体に移行することが明らかになった。ER α のヘリックス 12 にアミノ酸置換を導入した変異型 ER α を用いた解析より、このヘリックス 12 が ER α の核小体移行に必須であることが明らかになった。以上の結果より、ER α の核小体移行は RLX 特異的であり、RLX で誘導される乳腺上皮細胞の増殖抑制において重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the molecular mechanism underlying the tissue specificity of SERMs, we examined the intracellular localization of ER α using a green fluorescent protein (GFP)-tagged protein in culture cells from various tissues. Although ER α formed intranuclear foci in the presence of estradiol (E₂), RLX translocated ER α into the nucleoli in breast cancer cell lines. This phenomenon was not observed in cells from other tissues. Immunofluorescence staining revealed that endogenous ER α was also translocated into the nucleoli in the presence of RLX. Mutation analyses demonstrate that helix 12 of ER α is essential to the nucleolar translocation of ER α . These results suggest that translocation of ER α into the nucleoli is RLX-specific and is a key event for RLX-induced growth repression of mammary gland cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内分泌学

キーワード：核内受容体、ホルモン、共焦点顕微鏡、GFP、乳癌

1. 研究開始当初の背景

(1) SERM(Selective Estrogen Receptor Modulator:選択的エストロゲン受容体モジュレーター)は、組織によってエストロゲン作用を示したり、抗エストロゲン作用を示したりする化合物の総称である。SERMの組織特異性を決定するメカニズムとしては、SERMが結合したERにおける、転写活性化能や他のタンパク質との相互作用などの変化が、影響するという報告があるが、未だ不明な点が多い。

(2) 我々はこれまでに核内受容体と蛍光タンパク質ではGFP(Green Fluorescent Protein)との融合タンパク質を用いて、共焦点レーザー顕微鏡下で核内受容体の細胞内動態をリアルタイムで解析してきた。ERを含むステロイドホルモン受容体は、リガンド依存性に核内に細かい均一なfociと呼ばれる特徴的な核内分布を示す。この核内foci形成はステロイドホルモン受容体の転写活性化と関連する。

2. 研究の目的

GFP融合エストロゲン受容体(GFP-ER α)を様々な組織由来の細胞で発現させて、エストロゲンとSERMによるER α の細胞内動態の変化をリアルタイムイメージングで比較解析することによって、SERMの組織特異性の分子メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 様々な組織由来の細胞において、GFP-ER α を発現させ、エストロゲン(E₂)およびラロキシフェン(RLX)で処理して、共焦点レーザー顕微鏡でGFP-ER α が核小体に移行するかどうかを観察する。

(2) ERの細胞内局在とERのリガンド依存性転写活性化能との関係について、ルシフェラーゼアッセイを用いて検討する。

(3) SERMによるER α の細胞内動態の変化に関与するタンパク質を同定する。

4. 研究成果

(1) 様々な組織由来の細胞において、GFP-ER α を発現させて、細胞内動態を解析したところ、E₂処理では、ER α は核小体には局在せず、核内にfociを形成するのに対して、RLX処理では、ER α は乳癌細胞において核小体へ移行した。乳腺以外の組織由来の細胞では核小体移行は見られなかった(図1)。

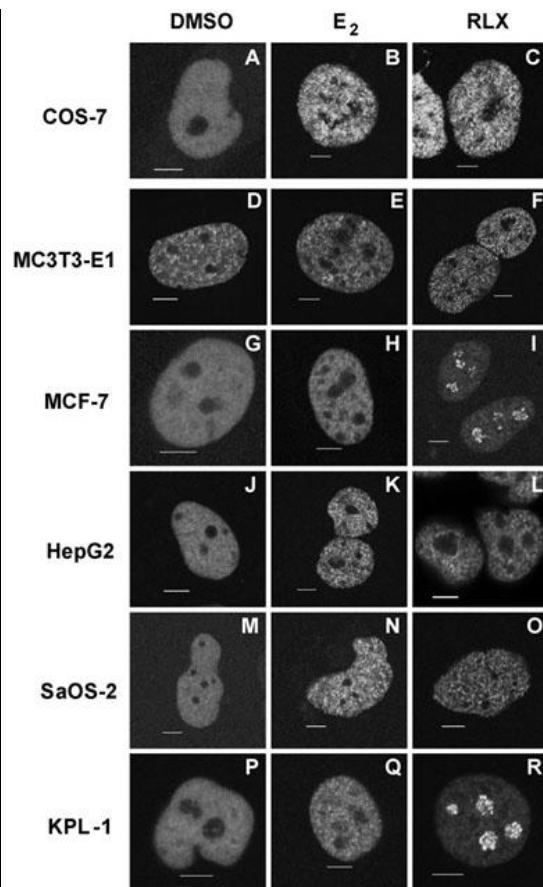


図1 様々な組織由来の細胞株における、エストロゲン(E₂)あるいはラロキシフェン(RLX)によるER α -GFPの細胞内局在

異なる組織由来の細胞(サル腎臓由来細胞株COS-7(A-C)、マウス骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1(D-F)、ヒト乳癌細胞株MCF-7(G-I)、ヒト肝臓癌由来細胞株HepG2(J-L)、ヒト骨肉腫細胞株SaOS-2(M-O)、ヒト乳癌細胞株KPL-1(P-R))にER α -GFPを発現させて細胞内局在を観察した。それぞれのリガンド処理(DMSO(左)、E₂(中央)、RLX(右))後に、局在を観察した。

(2) MCF-7細胞において、ER α はリガンドがない状態では核内にびまん性に分布し、E₂存在下では、核内に明瞭なfociを形成していた(図2A、B)。完全アンタゴニスト(ICI 162,780)および第1世代SERMのTAMで処理した場合は、ER α の蛍光シグナルは、ほとんどが核内に局在しており、RLX処理で見られるような核小体への局在は認められなかった(図2C-E)。このことから、ER α の核小体移行はラロキシフェンに特異的な現象であることが示唆された。

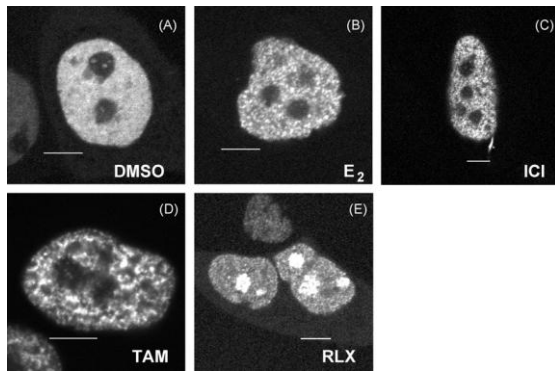


図2 ERα-GFPの核小体移行はRLX処理に特異的である。

MCF-7細胞でERα-GFPを発現させて、各種リガンドで3時間処理して、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(A) DMSO(ネガティブコントロール)、(B) E₂; 1 μM、(C) ICI; 1 μM ICI 182,780、(D) TAM; 1 μM、(E) RLX; 1 μM。バーの長さは5 μm。

(3) E₂存在下で行った機能的レポーターアッセイでは、ERαを介した転写活性化を認めるが、RLXはERαを介した転写活性化を用量依存的に阻害した(図3A)。図3Bに示すように、核小体の移行の程度は、RLXの濃度に直接相関していた。これらの結果より、RLXによるERαを介する転写活性化能の阻害は、受容体が核小体に移行することが原因ではないかと考えられた。

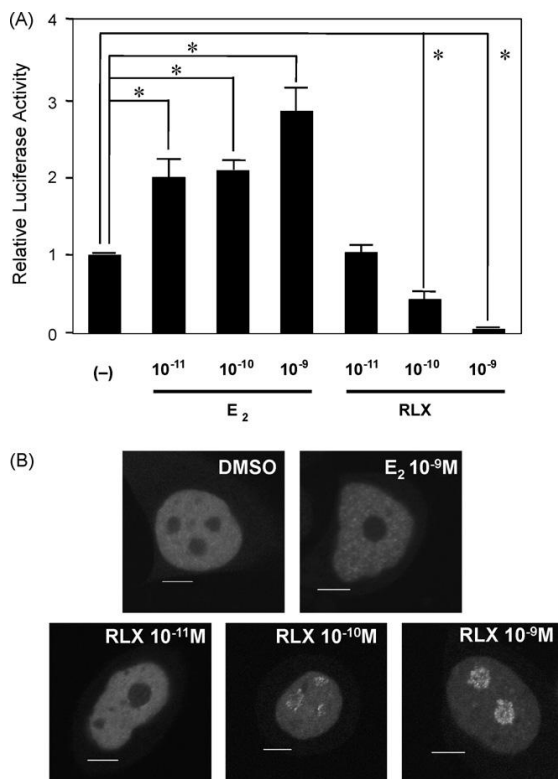


図3 RLXは用量依存的にERαを介する転写活性化を阻害する。

MCF-7細胞に、レポーターとして0.5 μg/wellのpA3-ERE2、内部コントロールとして2 ng/wellのpRL-CMV、0.3 μg/wellのERα発現ベクターをコトランスフェクションした。活性炭処理血清(10%DCS)を含むMEM培地に、DMSOあるいは様々な濃度のE₂、RLXを添加して20-24時間培養した後、細胞を溶かしてルシフェラーゼ活性を測定した。バーは、リガンド非存在下での活性との相対値で示している。また、3回の独立した実験より得られた平均値±標準偏差を示している。*P<0.05で有意差あり。(B) MCF-7細胞にERα-GFPを発現させて、10⁻⁹MのE₂および様々な濃度のRLXでそれぞれ3時間処理して、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。バーの長さは5 μm。

(4) 内在性のERαもRLX処理後に核小体へ移行するのかどうかを確認するために、抗ERα抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。E₂存在下では、ERα-GFPで行った実験と同様に、MCF-7細胞において、核に均一なfoci形成を認めた(図4A-C)。一方、RLX存在下では、内在性のERαは核小体に移行した(図4D-F)。乳腺以外の組織由来の細胞を用いた場合は、RLX依存性の核小体移行は認めなかった(図4G-L)。

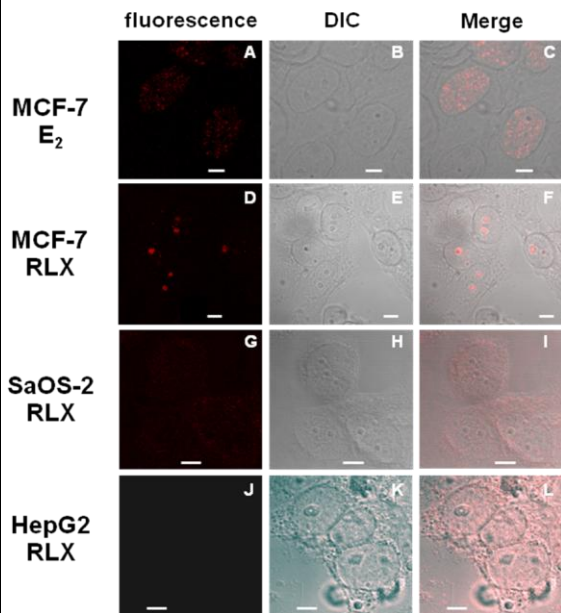


図4 内在性ERαのラロキシフェン誘導性の核小体移行。

MCF-7細胞(A-F)、SaOS-2細胞(G-I)、HepG2細胞を(J-L)をチャンバースライドにまいて24時間培養し、1 μMのE₂(A-C)、1 μMのRLX(D-L)で3時間処理した。細胞を固定し、抗ERα抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。蛍光画像(A, D, G, J)、微分干渉像(B, E, H, K)

を、共焦点レーザー顕微鏡を使って同時取得し、2つの画像を重ね合わせた(C、F、I、L)。

(5) 我々は、リガンド結合ドメインに位置する、ER α のコアクチベーター結合ドメイン内の536番目と539番目のロイシンを、それぞれアラニンに置換した2つの変異型ER α -GFP (ER α -L536A-GFP および ER α -L539A-GFP) を作製した(図5A)。野生型ER α では、RLX処理で核小体に強いシグナルを認めたが、2つの変異型ER α は、RLX処理後も核小体へ移行しなかった(図5B)。機能的レポーターアッセイを行ったところ、ヘリックス12にアミノ酸置換を入れることによって、RLX存在下でのERを介する転写活性が部分的に回復した(図5C)。以上の結果から、ER α のヘリックス12が、RLXで誘導されるER α の核小体移行に必須であることが明らかになり、ER α のヘリックス12と結合するタンパク質が核小体への移行に重要であると考えられた。

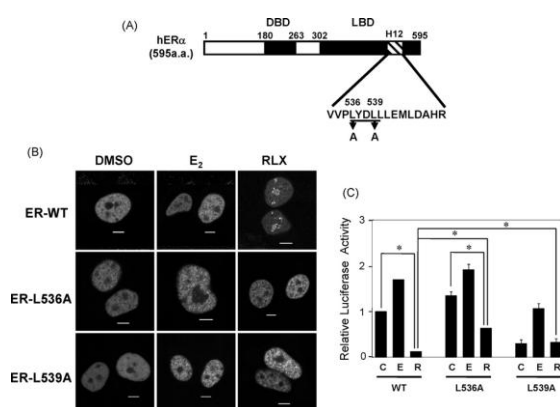


図5 RLXで誘導される核小体移行は、ER α のコアクチベーター結合ドメインに変異を導入することで阻害される。

(A) ヒトER α のドメイン構造。DBD、DNA結合ドメイン; LBD、リガンド結合ドメイン。下の図ではヘリックス12を拡大。この部位のロイシン残基(Leu536およびLeu539)をアラニンに置換した。(B) 野生型ER α と二つの変異型ER α (L536AおよびL539A)をそれぞれMCF-7細胞で発現させて、DMSO、1 μ MのE₂、1 μ MのRLXで処理後に蛍光画像を観察した。(C) 野生型ER α と変異型ER α の機能的プロモーターアッセイ。C, DMSO; E, E₂; R, RLX。

以上の結果より、ER α の核小体移行はRLX特異的であり、RLXで誘導される乳腺上皮細胞の増殖抑制において重要であることが示唆された。

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 Kawate H, Taketomi A, Watanabe T, 他 7 名 . Hypophosphatemic osteomalacia as a long-term complication after liver transplantation. Transplantation, 査読有, 91 巻 1 号, 2011, e6-e8.
- ② Kawate H, Ohnaka K, Adachi M, 他 5 名 . Alendronate improves QOL of post-menopausal women with osteoporosis. Clin Interv Aging, 査読有, 5 巻, 2010, 123-131.
- ③ Gushima M, Kawate H, Ohnaka K, Takayanagi R. Raloxifene induces nucleolar translocation of the estrogen receptor. Mol Cell Endocrinol, 査読有, 319 巻 1-2 号, 2010, 14-22.
- ④ 河手久弥, 高柳涼一、リアルタイムイメージングによるステロイドホルモン受容体の機能解析、内分泌・糖尿病・代謝内科、査読無、2010、30 巻 5 号、492-501.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Gushima M, Kawate H, Ohnaka K, 他 2 名 . Raloxifene induces nucleolar translocation of the estrogen receptor. The Endocrine Society's 92nd Annual Meeting, San Diego, USA, 2010.06.21.
- ② 河手久弥、具島三佳、大中佳三、他 2 名、リアルタイムイメージングによる性ステロイドホルモン受容体の機能解析。第 82 回日本内分泌学会学術総会、前橋、2009.04.25.
- ③ 具島三佳、河手久弥、大中佳三、他 2 名、ラロキシフェンで誘導されるエストロゲン受容体の核小体移行、第 16 回日本ステロイドホルモン学会、福井、2008.11.22.
- ④ 河手久弥、大中佳三、足立雅広、高柳涼一、ラロキシフェンで誘導されるエストロゲン受容体の核小体移行第 50 回日本老年医学会学術集会、千葉、2008.06.21.
- ⑤ 河手久弥、具島三佳、高柳涼一、ラロキシフェンで誘導されるエストロゲン受容体の核小体移行、第 81 回日本内分泌学会学術総会、青森、2008.05.

[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.med.kyushu-u.ac.jp/intmed3/>

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河手 久弥 (KAWATE HISAYA)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20591098

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高柳 涼一 (TAKAYANAGI RYOICHI)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：30154917