

平成22年 5月28日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790158

研究課題名 (和文) 肝臓星細胞におけるレチノイドシグナルの役割

研究課題名 (英文) Role of retinoid signaling in hepatic stellate cells

研究代表者

目崎 喜弘 (MEZAKI YOSHIHIRO)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40431621

研究成果の概要 (和文)：肝臓星細胞はビタミン A 貯蔵細胞であり、肝障害の時に活性化してコラーゲンを分泌することから、肝線維化の責任細胞であると考えられている。我々はこれまでに、肝臓星細胞の活性化に伴ってレチノイン酸受容体 (RAR) α 蛋白質が転写後レベルで増加し、細胞質にドット状に局在することを明らかにしてきたが、本研究では、この RAR α 蛋白質の性状解析を行い、ドット状 RAR α 蛋白質が星細胞の新規活性化マーカーになる可能性を提案した。

研究成果の概要 (英文)：Hepatic stellate cells (HSCs) are known to be a site of vitamin A storage and play an important role in liver fibrogenesis, as they are activated on liver injury to produce collagens. We have revealed that HSCs become retinoid responsive after activation through post-transcriptional up-regulation of retinoic acid receptor (RAR) α gene expression and that these RAR α proteins showed a speckled distribution in the cytosol. We further analyzed these speckled RAR α proteins and proposed that insoluble, cytosolic speckled distribution of RAR α proteins in activated HSCs may represent a marker for HSC activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

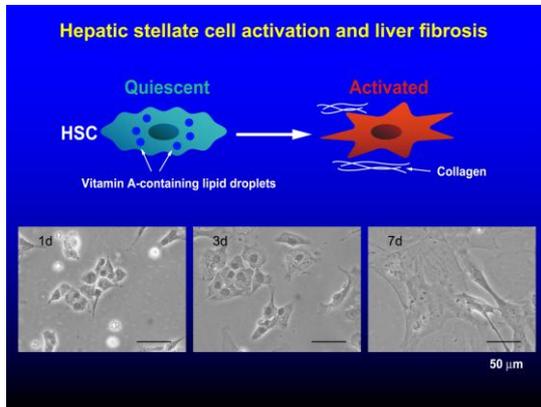
キーワード：ビタミン A、肝臓星細胞、レチノイン酸受容体、発現制御、遺伝子、蛋白質

1. 研究開始当初の背景

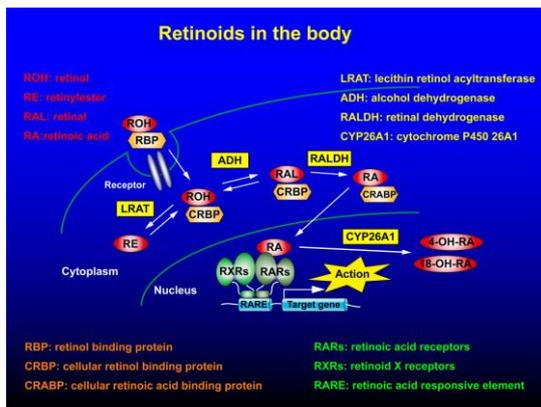
(1) ビタミン A は網膜において視物質として機能するのみでなく、細胞の増殖、分化、組織形成、あるいは癌細胞の増殖抑制、分化

誘導など広範な生命現象に関与することが知られている。このように重要な生理機能を担うビタミン A の 80% 以上は、肝臓の非実質細胞のひとつである星細胞 (伊東細胞、脂

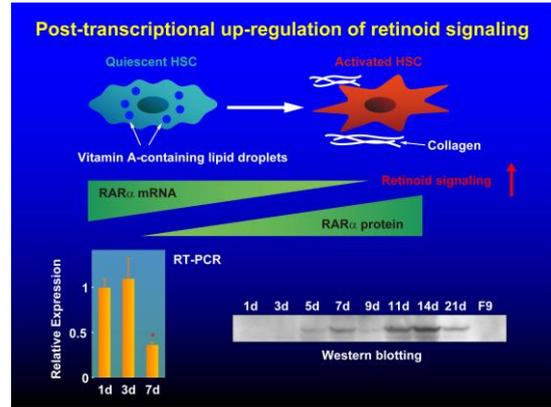
肪摂取細胞、ビタミンA貯蔵細胞、リポサイトとも呼ばれる)に貯蔵されている。星細胞はまた、肝線維化の責任細胞であると考えられている。この際、星細胞はビタミンA脂質滴を失いながら活性化し、筋線維芽細胞様に分化して、細胞外マトリックス成分であるコラーゲンを分泌するようになる。



(2) 一方ビタミンAの活性型代謝産物であるレチノイン酸は、核内レチノイン酸受容体(RARs)に結合して標的遺伝子の転写制御を行う。これまでに、肝臓星細胞の活性化に伴ってビタミンA脂質滴が消失すること、RARsのmRNAが減少することから、肝臓星細胞活性化の過程でレチノイドシグナルは減弱すると考えられてきた。一方で、活性化した肝臓星細胞がレチノイドに応答するという報告もあり、肝臓星細胞の活性化におけるレチノイドシグナルの働きには不明な点が多かった。



(3) これまでの研究で、我々は肝臓星細胞の活性化に伴ってRARsのmRNAの発現が減少する一方、RAR α と β の蛋白質の発現が増加することを明らかにしてきた。また、このとき発現が増加するRAR α 蛋白質は細胞質にドット状に局在することを明らかにしてきた。このような特殊な局在を示すRAR α 蛋白質はこれまでに知られていない。



2. 研究の目的

肝臓星細胞の活性化が肝線維化と関係する可能性が示されて以来、星細胞の活性化マーカーを探す多くの試みが進められてきた。今回我々は、細胞質にドット状に局在するRAR α 蛋白質が活性化星細胞のマーカーとなる可能性を検討した。

3. 研究の方法

古典的核移行シグナルは塩基性アミノ酸が連続して現れることで特徴付けられるが、ラットRAR α でそのような配列を検索したところDNA結合ドメイン(DBD)のC末側とリガンド結合ドメイン(LBD)に核移行シグナル候補配列が見つかった。そこで全長のRAR α やN末側およびC末側の断片を緑色蛍光蛋白質(GFP)と融合してヒト胎児腎臓由来の細胞株HEK293T細胞や肝臓星細胞に発現させて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。さらに全長RAR α のN末側核移行シグナル候補配列に存在する4つのリジン残基をアラニン残基に置換してHEK293T細胞や肝臓星細胞に発現させて局在を観察した。

既知の細胞内小器官とRAR α 蛋白質との共局在の有無を確認するため、ミトコンドリアをMitoTracker Deep Red 633により、エンドソームをOrganelle Lights Endosomes GFPにより、リソソームをOrganelle Lights Lysosomes RFPにより染色し、抗RAR α 抗体を用いた免疫染色と比較した。

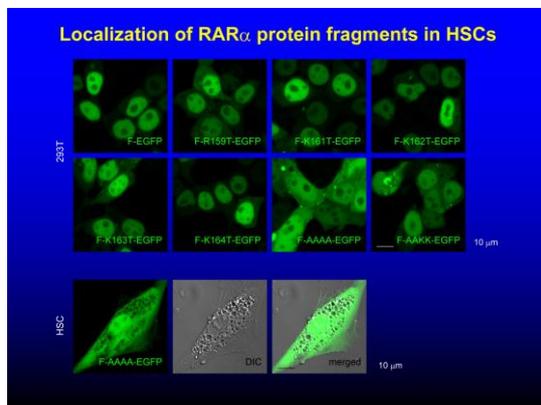
また、活性化した肝臓星細胞におけるRAR α 蛋白質の存在様式を探るため、活性化肝臓星細胞を細胞質蛋白質画分、膜蛋白質画分、核蛋白質画分、細胞骨格蛋白質画分に画分し、RAR α 蛋白質がどの画分に画分されるか調べた。

4. 研究成果

(1) RAR α 蛋白質の核移行シグナルはDNA結合ドメインに存在する

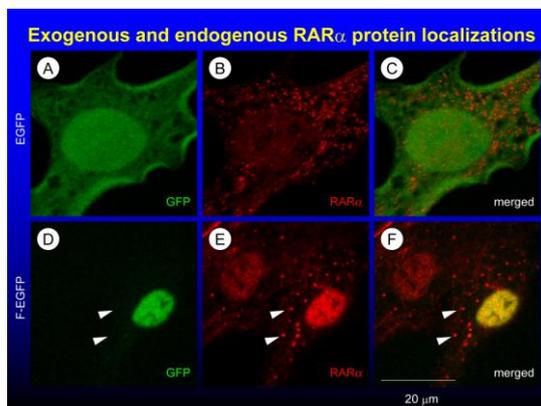
核内受容体はその名が示すとおり核に存在するリガンド依存的な転写制御因子であるが、活性化した星細胞ではRAR α 蛋白質は細胞質に局在した。そこでまず始めにRAR α

蛋白質の核移行シグナルについて調べることにした。古典的核移行シグナルは塩基性アミノ酸が連続して現れることで特徴付けられるが、ラット RAR α でそのような配列を検索したところ DBD の C 末側と LBD に核移行シグナル候補配列が見つかった。そこで全長の RAR α や N 末側および C 末側の断片を緑色蛍光蛋白質 (GFP) と融合してヒト胎児腎臓由来の細胞株 HEK293T 細胞に発現させたところ、全長および N 末側を発現させた場合に GFP のシグナルが核で検出されることが明らかとなった。さらに全長 RAR α の N 末側核移行シグナル候補配列に存在する 4 つのリジン残基をアラニン残基に置換して HEK293T 細胞に発現させたところ、GFP 融合タンパク質の核移行が阻害された。従ってラット RAR α の核移行シグナルは 161 から 164 番目のリジン残基であることが明らかとなった。



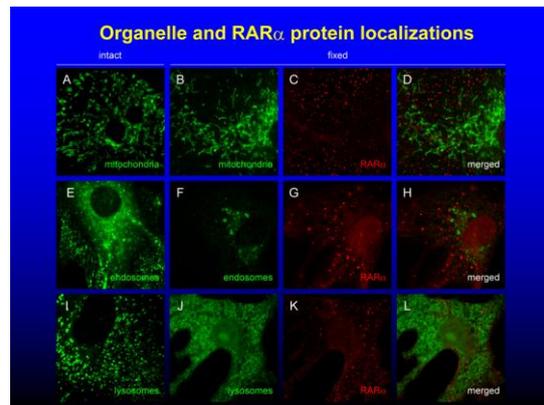
(2) 強制発現した RAR α 蛋白質は内在性 RAR α 蛋白質と異なる局在を示す

一方これらの発現ベクターを活性化肝臓星細胞に導入したところ、細胞内局在は HEK293T 細胞に導入した場合と同様であった。すなわち全長および N 末側の RAR α は核に移行した。GFP を融合した全長 RAR α を導入した後に RAR α 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、細胞質にドット状に局在する RAR α 蛋白質は、すべて内在性の (GFP 蛍光を持たない) RAR α 蛋白質から構成されていた。



(3) 活性化肝臓星細胞における RAR α 蛋白質は既知の細胞小器官と共局在しない

強制発現した RAR α 蛋白質がドット状の局在を示さなかったため、内在性の RAR α 蛋白質を用いて研究を進めることにした。ミトコンドリア、エンドソーム、リソソームなどの細胞小器官は細胞質でドット状の局在を示すが、抗 RAR α 抗体を用いた免疫染色により、RAR α 蛋白質とは共局在しないことが明らかとなった。



(4) 活性化肝臓星細胞において RAR α 蛋白質は大部分不溶性である

活性化肝臓星細胞を細胞質蛋白質画分、膜蛋白質画分、核蛋白質画分、細胞骨格タンパク質画分に分画したところ、RAR α 蛋白質は細胞骨格蛋白質画分に分画された。また、活性化肝臓星細胞を非イオン性界面活性剤 (1%NP-40)、弱いイオン性界面活性剤 (0.5% sodium deoxycholate)、強いイオン性界面活性剤 (0.1% SDS) で順に処理することによって、RAR α 蛋白質の可溶性を検討したところ、RAR α 蛋白質は非イオン性界面活性剤に完全に不溶であり、これら 3 種の界面活性剤 (RIPA buffer に相当する) 存在下においても 65% が不溶性であることが明らかとなった。

(5) まとめ

これまで RAR α が肝臓星細胞の活性化マーカーとして示されることはなく、RAR α の mRNA が肝臓星細胞の活性化につれて減少することから、RAR α はむしろ静止期のマーカーであると考えられてきた。今回我々は、RAR α 蛋白質の発現が、活性化星細胞において転写後レベルで増加すること、および、増加した RAR α 蛋白質の多くは不溶性であることを明らかにした。これらの性質により、これまで RAR α が活性化星細胞のマーカーとして同定されてこなかったと考えられる。さらに、この不溶性の蛋白質は細胞質でドット状に存在することも明らかにした。したがって、細胞質でのドット状の分布も活性化星細胞の有効なマーカーとなると考えられた。

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2件)

①Mezaki Y, Yamaguchi N, Yoshikawa K, Miura M, Imai K, Itoh H, Senoo H. Insoluble, speckled cytosolic distribution of retinoic acid receptor alpha protein as a marker of hepatic stellate cell activation in vitro. *J. Histochem. Cytochem.* 査読有、Vol. 57, 2009, pp. 687-699.

②目崎喜弘、森井真也子、吉川究、山口典子、三浦光隆、今井克幸、蛇口達造、妹尾春樹、肝臓星細胞(ビタミンA貯蔵細胞)の活性化とレチノイン酸受容体の機能、ビタミン、査読有、83巻、pp. 570-579.

〔学会発表〕(計7件)

①目崎喜弘 ほか、肝臓のビタミンA貯蔵細胞におけるレチノイン酸受容体の局在と機能解析、第115回日本解剖学会総会・全国学術集会、2010年3月29日、盛岡

②目崎喜弘 ほか、レチノイド研究の潮流と展望、日本レチノイド研究会第20回学術集会2009年11月21日、東京

③目崎喜弘 ほか、活性化した肝臓星細胞におけるレチノイン酸受容体 α 蛋白質の解析、第61回日本細胞生物学会大会、2009年6月2日、名古屋

④目崎喜弘 ほか、活性化肝臓星細胞におけるレチノイン酸受容体 α 蛋白質の性状解析、日本ビタミン学会第61回大会、2009年5月31日、京都

⑤目崎喜弘 ほか、ラット肝臓星細胞におけるレチノイン酸受容体 α 蛋白質の発現と週齢との関係、第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、2009年3月29日、岡山

⑥目崎喜弘 ほか、Rat hepatic stellate cells acquire retinoid responsiveness after activation in vitro、第14回国際肝臓類洞壁細胞シンポジウム、2008年9月3日、トロムソ

⑦目崎喜弘 ほか、活性化した肝臓星細胞におけるレチノイン酸受容体の機能解析、日本ビタミン学会第60回大会、2008年6月14日、仙台

6. 研究組織

(1)研究代表者

目崎 喜弘 (MEZAKI YOSHIHIRO)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40431621

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：