

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07053

研究課題名(和文) エストロゲン受容体機能のリン酸化による制御：肥満や神経変性疾患予防への応用

研究課題名(英文) Regulation of estrogen receptor function by phosphorylation: application to obesity and neurodegenerative disease prevention.

研究代表者

進藤 佐和子 (Shindo, Sawako)

明治薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：50795987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エストロゲン受容体(ER) 機能のリン酸化による制御として神経変性発症との関連性を明らかにするため、ER のセリン216をアラニンに置換した非リン酸化ER 発現マウス(Esr1S216A)を用いて、野生型(WT)マウスと比較した実験を遂行した。WTマウス脳ミクログリアに発現するER はセリン216がリン酸化している。神経変性発症の評価として行動薬理実験を行い、Esr1S216Aマウスでは神経変性症状が若齢期から認められた。また、炎症誘発実験においてEsr1S216Aマウスでは、炎症型ミクログリアの活性が長時間持続することが示唆され、慢性炎症が神経変性症状につながると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エストロゲンは、ER を介して脂質代謝制御や神経保護など多様な生理作用を示すことから、肥満や神経変性疾患にエストロゲン-ER 系が防御的に働くと考えられているが、詳細な機序は明確ではない。ER のセリン216のリン酸化がエストロゲン依存的な活性を抑制せずに多くの遺伝子発現を制御する。本研究では、ミクログリアにおいてリン酸化ER 発現が高く、非リン酸化ER 発現ミクログリアでは活性の持続による慢性炎症状態になることを見出した。ミクログリアに発現するER のセリン216の非リン酸化が脳神経細胞に影響を与え、特定疾患の原因になると証明できれば、将来的にその治療法の開発にも関われると考える。

研究成果の概要(英文)：To clarify the relationship between estrogen receptor (ER) phosphorylation and the onset of neurodegeneration, we performed experiments using non-phosphorylated ER -expressing mice (Esr1S216A) in which serine 216 of ER was replaced with alanine, and compared them with wild-type (WT) mice. Serine 216 of ER expressed in microglia of WT mice is phosphorylated. Behavioral pharmacological experiments were conducted to evaluate the onset of neurodegeneration, and neurodegenerative symptoms were observed in Esr1S216A mice from a young age. In addition, inflammation-induced experiments suggested that the activity of inflammatory microglia persisted for a long time in Esr1S216A mice, suggesting that chronic inflammation leads to neurodegenerative symptoms.

研究分野：分子生物学、毒性学、衛生薬学

キーワード：エストロゲン受容体 リン酸化 ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

エストロゲン受容体 (ER) やアンドロゲン受容体 (AR)、グルココルチコイド受容体 (GR) などの核内受容体の多くは、ホルモンなどの脂溶性低分子の結合に応答して遺伝子発現を制御する。この古典的なシグナル伝達は、核内受容体に対応するリガンドによって活性化され、標的遺伝子の制御領域に位置する DNA の認識領域に結合することによって遺伝子の転写活性化に主に関わると考えられてきた。しかし近年、翻訳後修飾の1つであるリン酸化が核内受容体の機能制御に重要な役割を果たすことが示唆されている。核内受容体の構造は大きく5つの異なるドメインに分割することができるが、中でもシグナル伝達に重要な転写活性化領域とリガンド結合領域におけるリン酸化の意義に関する研究が多くなされている。一方で、核内受容体は2つのZincフィンガーを介してDNAに結合するが、この間に存在するERのセリン212は、全46種のヒト核内受容体のうち実に41種で保存されていることから、核内受容体機能に重要な役割を果たしているのではないかと考え、DNA結合領域のリン酸化に着目した。そして、マウスの好中球や脳ミクログリアといった免疫細胞内のERは、当該セリン残基(マウスではセリン216)がリン酸化された状態で発現していることを明らかにした。CARやFXR、RXRなど、他の核内受容体についても、対応するアミノ酸のリン酸化が機能制御に重要な役割を果たす可能性が報告されている。常在性マクロファージ(脳ミクログリア、肝臓クッパー細胞など)の免疫応答にERが関与する可能性は報告されているが、免疫系におけるERの役割やERの活性化機構はほとんど分かっていない。以上のことから本研究では、免疫細胞におけるERの機能発現にDNA結合領域のリン酸化が何らかの役割を果たすか否かを解決のために、非リン酸化ER (*Esr1^{S216A}*) マウスを作製し、その表現型を野生型マウスと比較することで、ERの役割とリン酸化の意義を明らかにする。

2. 研究の目的

非リン酸化ER (*Esr1^{S216A}*) マウスでは、肥満(脂肪蓄積)や高血糖、脳ミクログリアの活性化などの表現型が認められた。本研究では、肥満や神経変性発症にER機能のリン酸化による制御が関わっているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

精神疾患および神経変性疾患に関する検討のため、野生型(WT)および*Esr1^{S216A}*雄性マウスを用いて行動薬理試験(オープンフィールド試験(自発活動量判定)、ロータロッド試験(運動学習機能判定))を行った。マウス組織のマクロファージの浸潤は、4 μm のパラフィン切片を作製し、マクロファージマーカーF4/80抗体を用いた免疫染色を行い観察した。炎症性サイトカインの発現は、RT-qPCRを用いて、炎症性/抗炎症性サイトカインの放出はELISAを用いて測定し解析した。成熟マウスの凍結脳組織、生後2日のマウスから調整した初代グリア細胞、生後7日のマウスから調整した脳スライスを用いたミクログリアおよび脳細胞の極性変化や形態変化の評価には、蛍光染色を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 3ヶ月齢頃から12ヶ月齢のマウスの神経変性発症の検討として行動薬理実験を行った。オープンフィールド試験では、*Esr1^{S216A}* マウスにおいて不安傾向が認められたが、歩行能力に違いは認められなかった。一方、ロータロッド試験では、*Esr1^{S216A}* マウスの落下時間は有意に短くなり、神経変性症状が若齢期から進行する結果となった。また、神経変性疾患をはじめ多くの疾患には慢性的な炎症が関与することが周知されているため、組織学的解析により*Esr1^{S216A}* マウスの脳以外の脂肪組織、肝臓など様々な臓器においてWTマウスと比較して免疫細胞(主にマクロファージ)の浸潤について観察したが、*Esr1^{S216A}* マウスの著しい組織学的変化やマクロファージの浸潤に影響は認められなかった。また、肥満についても検討を行ったが、*Esr1^{S216A}* マウスの体重増加の傾向は認められたが、有意な結果は得られなかった。若齢期から脂肪の蓄積よりも筋肉と思われる硬い質感があり、その結果体重増加傾向につながっている可能性があり、*Esr1^{S216A}* マウスの新たな表現型と考えられた。

(2) 野生型および変異型ERを過剰発現させたマウスミクログリア細胞(BV2)において、リポ多糖(LPS)刺激下による炎症性サイトカイン(IL-1 および IL-6)の発現レベルは経時的に

増加したが、リン酸化 ER (S216D) 変異体と非リン酸化 ER (S216A) 変異体発現 BV2 細胞では変化が認められなかった。しかし、WT と *Esr1^{S216A}* マウスから得られた初代グリア細胞 (ミクログリアとアストロサイト混合細胞) を用いて、LPS による刺激下、炎症性サイトカイン (IL-6) および抗炎症性サイトカイン (IL-10) の放出の結果は、リン酸化 ER 発現ミクログリアが存在する WT において、炎症性サイトカインの発現が *Esr1^{S216A}* と比較して有意に低く、時間経過後の抗炎症性サイトカインの発現は有意に高かった。これらの結果より、炎症誘発下において脳細胞同士のネットワークを介した炎症応答にリン酸化 ER が関与していることが考えられた。

(3) 脳細胞は、ミクログリアの他に神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが存在するため、脳内細胞間相互作用を正確に評価できる大脳スライス培養系を構築した。本手法では、脳内と同じ細胞構成でありながら、様々な分子生物学的手法を利用可能であり、同一個体から複数枚のスライスを調製できることから、マウス個体による差をなくした状態でも評価することが可能な系である。WT と *Esr1^{S216A}* マウスの脳スライス培養を用いて LPS による炎症性サイトカイン発現レベルの比較検討を行った。その結果、炎症性サイトカインの発現に時間的に差異が認められた。ミクログリアには極性があり、炎症が亢進する際のミクログリアは、主に炎症型 (M1) になっており、その後、抗炎症型 (M2) への極性の変化が重要となる。炎症誘発時の M1 型が持続する状態の M1>M2 となることで神経変性疾患はじめ様々な疾患に影響を与えるとされている。M1 型ミクログリアマーカーとなる iNOS 抗体による蛍光染色により、LPS 処理後 6 時間の WT と *Esr1^{S216A}* マウスの脳スライスでは、iNOS 発現ミクログリアが顕著に増加したが、LPS 処理 24 時間で iNOS 発現が低下した WT スライスと比較して、*Esr1^{S216A}* スライスでは iNOS 発現ミクログリアは増加状態のままであり、M1 型ミクログリアとして維持されていることが示唆された。そのため、非リン酸化 ER 発現ミクログリアの存在下では、脳内は慢性炎症となり神経変性疾患へとつながる可能性が考えられた。

これらの結果より、ER のセリン 216 のリン酸化は、ミクログリア活性の制御に関わり、炎症応答においても炎症型から抗炎症型ミクログリアへの極性変化に寄与する可能性が示唆された。そのため、生体内ミクログリアに存在する ER のセリン 212/216 が非リン酸化していることが、神経変性のリスクの 1 つになる可能性が考えられ、ER のリン酸化を調節することが疾患予防において重要になるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shindo Sawako, Chen Shih-Heng, Gotoh Saki, Yokobori Kosuke, Hu Hao, Ray Manas, Moore Rick, Nagata Kiyoshi, Martinez Jennifer, Hong Jau-Shyong, Negishi Masahiko	4. 巻 18
2. 論文標題 Estrogen receptor phosphorylated at Ser216 confers inflammatory function to mouse microglia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12964-020-00578-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Shindo Sawako, Kakizaki Satoru, Sakaki Toshiyuki, Kawasaki Yuki, Sakuma Tsutomu, Negishi Masahiko, Shizu Ryota	4. 巻 248
2. 論文標題 Phosphorylation of nuclear receptors: Novelty and therapeutic implications	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 108477 ~ 108477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pharmthera.2023.108477	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 進藤佐和子, 黄 基旭, 永田 清
2. 発表標題 ミクログリアに発現するエストロゲン受容体 のリン酸化が脳の炎症抑制に関与する
3. 学会等名 フォーラム2020 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 進藤佐和子, 黄 基旭, 永田 清
2. 発表標題 炎症応答におけるリン酸化エストロゲン受容体 の役割
3. 学会等名 第59回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 進藤佐和子
2. 発表標題 エストロゲン受容体機能のリン酸化による制御：ER S216A導入マウスを用いた解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔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