

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 5 月 17 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590216

研究課題名（和文）エストロゲン受容体を介したミトコンドリア多様性とその融合・分裂増殖機構の解明

研究課題名（英文）mitochondrial multipotent functions regulated by estrogen receptor

研究代表者

菱川 善隆（HISHIKAWA YOSHITAKA）

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：60304276

研究成果の概要（和文）：マウス精巣のミトコンドリア動態についてミトコンドリアマーカ（pYFP-Mito）を用いて検討した。pYFP-Mito は精子形成細胞の細胞質に点状に分布する場合と細胞質全体に分布する場合があります、前者はミトコンドリア蛋白とエストロゲン受容体 β (ER β) が共局在し、後者はアポトーシス誘導蛋白 Bax と一致した。一方 ER β 発現を抑制すると高頻度に Bax 陽性細胞が出現した。以上より ER β を介した新たなホルモン依存的ミトコンドリア制御機構の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the correlation with the distribution of mitochondria and their components including ER β localization using a mitochondria vector (pEYFP-Mito), and small interfering RNA (siRNA) to knock down ER β transfected into mouse testes. Mitochondrial proteins and ER β were identical to pEYFP-Mito transfected cells. ER β siRNA assay revealed that the reduction of ER β induced the increased number of Bax positive cells. The change of mitochondrial location may be associated with germ cell apoptosis, potentially regulated by estrogen through ER β .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
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：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：ミトコンドリア・エストロゲン受容体・アポトーシス・RNA 干渉・精巣・エレクトロポーション・エストロゲン・免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

(1) エストロゲンはエストロゲン受容体 (ER) を介して様々な組織でミトコンドリア生理活性を変化させる。またミトコンドリアはエネルギー産生のみならず細胞死 (アポ

トーシス)、がん化或いは老化など多様な生命現象に関与する。同時にミトコンドリアの形態は融合・分裂増殖によりきわめてダイナミックに変化し、組織・細胞により多様性を持つ。

(2) エストロゲンやエストロゲン類似物質である所謂内分泌攪乱化学物質は精巣のアポトーシスを高頻度に誘導し、この誘導にはミトコンドリア内膜 OxPhos 群の構成蛋白であるチトクロームCや Bax の細胞質内への異常流出が関与する。

(3) 近年、ヒト乳がん細胞等で ER β がミトコンドリアに局在し ATP 産生並びにアポトーシス制御の両方に関与することが報告されている。しかしながら、ER を介したこれらのミトコンドリアの組織・細胞特異的な機能と形態を制御する機構は不明である。

2. 研究の目的

ミトコンドリアの機能と形態の多様性にエストロゲンとその受容体 ER β がどのように関与するかを様々な分化段階の細胞が認められるマウス精巣を用いて明らかにする。具体的な目的は以下の通りである。

(1) エストロゲン作用点の解析：ER 蛋白と mRNA 発現並びにエストロゲン反応エレメント (ERE) 転写活性について明らかにする。

(2) ミトコンドリアの細胞内局在と機能解析：YFP-Mito により精子形成細胞でのそれぞれの分化段階でのミトコンドリアの局在パターンを検討するとともに、ミトコンドリアマトリックス蛋白 SP-22、内膜構成蛋白 OxPhos、更にアポトーシス誘導に関与するチトクロームCと Bax 発現動態との関連について明らかにする。

(3) 様々な分化段階の精子形成細胞について DNA メチル化の差異を明らかにする。

(4) ER β の精巣での直接的な関与を示すために ER β の遺伝子抑制を行うことでミトコンドリアを介するアポトーシスとの関連を明らかにする。

3. 研究の方法

マウス精巣を用いてミトコンドリアマーカーである pYFP-Mito を電圧ポレーションにより直接導入し、精子形成過程でのミトコンドリアの局在変化を明らかにするとともに、siRNA を電圧ポレーションで精巣に導入することにより ER β 発現抑制がミトコンドリア関連アポトーシス誘導因子である Bax の発現とどのように関連するかを検討した。更に、これらの制御にエピジェネティック制御特に DNA メチル化の変化がどのように関与するかを具体的には以下の方法論を用いて検討した。

(1) 分子組織細胞化学による検出：ER β 、ミトコンドリア関連蛋白のマトリックスのマーカーである SP-22、内膜蛋白のマーカーである OxPhos の局在は免疫組織化学により検出した。アポトーシス関連蛋白としてアポトーシス誘導に関与する Bax ならびにチトクロームCについても免疫組織化学で検出した。更に mRNA については in situ ハイブリダイゼーションを用いた。ERE 転写活性はサウスウエスタン組織化学を用いた。

(2) HELMET 法による細胞レベルでのメチル化状態の検出：細胞個々のレベルでのメチル化の状態についてはメチル化 CCGG/GGCC 配列を切断できない HapII とメチル化に関係なく切断できる MspI の二つのイソシゾマーを用いて処理して個々の細胞での DNA メチル化状態を検出する HELMET 法を用いて検出した。

4. 研究成果

(1) ER β は精祖細胞と精母細胞に発現し、また ER β mRNA は in situ ハイブリダイゼーションにより同様に精祖細胞と精母細胞に発現を認めた。一方、もう一つの受容体である ER α は間質のライディッヒ細胞に発現した。ERE 結合活性は、精祖細胞と精母細胞さらには間質のライディッヒ細胞に認められた。これらのことより精巣でのエストロゲンの作用点としての ER は精子形成細胞では特に ER β が中心であることが判明した。

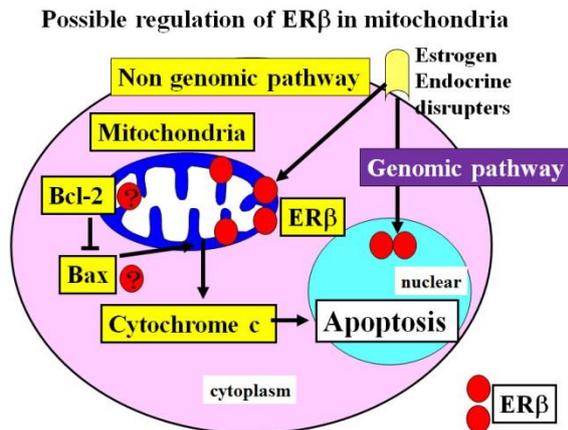
(2) 正常精子形成細胞では、YFP-Mito は精祖細胞と精母細胞の細胞質に点状に出現し、ミトコンドリアマトリックス蛋白 SP-22、ミトコンドリア内膜蛋白 OxPhos、ER β 発現と一致したが、精子細胞には YFP-Mito は認められなかった。Bax 陽性アポトーシス細胞では、YFP-Mito、OxPhos、ER β の細胞質への再分布による共局在が認められた。

(3) RNA 干渉により ER β 遺伝子発現を抑制した場合には正常並びにコントロール精巣と比較して高頻度に Bax 陽性細胞の出現を認めた。また、高濃度エストロゲン投与により Bax 陽性アポトーシス細胞の顕著な増加と YFP-Mito と ER β の細胞全体での共発現を認めた。

(4) 正常精巣での DNA メチル化修飾状態について histo enzyme-linked detection of methylation (HELMET) 法を用いて解析した。その結果、精子形成細胞の分化段階で DNA メチル化状態が多様であり、細胞分化により変化することを明らかにした (Song et al. Acta Histochem. Cytochem. 44:183-190, 2011)。

以上の結果より、精巣では ER β は正常では

ミトコンドリアを介したアポトーシスを抑制する一方で、エストロゲン暴露によりアポトーシスを誘導し、ER β を介した non genomic pathway としての新たなホルモン依存的ミトコンドリア制御機構の存在の可能性が示唆された（下図参照）。また一方で、精子形成過程においてエピジェネティックな制御機構が関与する可能性が示唆された。



本研究により組織・細胞内のミトコンドリアは一樣ではなく機能的に多様性を持つことが判明し、その制御機構にはエストロゲンとその受容体 ER β が重要な働きをすることを明らかにした。更に細胞の分化制御にエピジェネティックな制御機構も重要な働きをすることが判明した。今後、ミトコンドリア内での ER β の局在について超微形態レベルで更に詳細な検討が必要であり、アポトーシス誘導蛋白 Bax のみならず抑制系に働く Bcl-2 ファミリーのミトコンドリアでの局在との関連についても検討していく必要があると考えている。

今後の展望として、将来的には様々ながん組織やミトコンドリア病などでの細胞内異常ミトコンドリアをターゲットとした個々の細胞レベルでの治療戦略への応用や老化の制御機構の解明にも貢献していきたいと考えている。

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 12 件）

1. Chojookhuu N, Sato Y, Nishino T, Endo D, Hshikawa Y Koji T. : Estrogen-dependent regulation of sodium/hydrogen exchanger-3 (NHE3) expression via estrogen receptor β

in proximal colon of pregnant mice. *Histochem. Cell Biol.* 137:575-587, 2012. (査読有)

2. Kitamura M, Nishino T, Obata Y, Furusu A, Hishikawa Y, Koji T, Kohno S. : Epigallocatechin gallate suppresses peritoneal fibrosis in mice. *Chemico-Biological Interactions* 195: 95-104, 2012. (査読有)

3. Song N, Liu J, An S, Nishino T, Hishikawa Y, Koji T. : Immunohistochemical analysis of histone H3 modifications in germ cells during mouse spermatogenesis. *Acta Histochem. Cytochem.* 44: 183-190, 2011. (査読有)

4. Kakugawa T, Mukae H, Hishikawa Y, Ishii H, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Fujii T, Koji T, Kohno S: Localization of HSP47 mRNA in murine bleomycin - induced pulmonary fibrosis. *Virchows Arch.* 456 (3): 309-331, 2010. (査読有)

5. Hishikawa Y, An S, Yamamoto-Fukuda T, Shibata Y, Koji T. : Improvement of in situ PCR by optimization of PCR cycle number and proteinase K concentration: Localization of X chromosome-linked phosphoglycerate kinase-1 gene in mouse reproductive organs. *Acta Histochem. Cytochem.* 42: 15-21, 2009. (査読有)

6. Yamamoto-Fukuda T, Hishikawa Y, Shibata Y, Kobayashi T, Takahashi H, Koji T. : Pathogenesis of middle ear cholesteatoma; a new model of experimentally induced cholesteatoma in mongolian gerbils. *Am. J. Pathol.* 176: 2602-2606, 2010. (査読有)

7. Abo T, Nagayasu T, Hishikawa Y, Tagawa T, Nanashima A, Yamayoshi T, Matsumoto K, An S, Koji T. : Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in rat tracheal cartilage: Possible involvement in wound healing of the damaged cartilage. *Acta Histochem. Cytochem.* 43: 89-98, 2010. (査読有)

8. Kakugawa T, Mukae H, Hishikawa Y, Ishii H, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Fujii T, Koji T, Kohno S. : Localization of HSP47 mRNA in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Virchows Arch.* 456: 309-315, 2010. (査読有)

9. Yamamoto-Fukuda T, Takahashi H, Terakado M, Hishikawa Y, Koji T. : Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in noncholesteatomous and cholesteatomous chronic otitis media. *Otol. Neurotol.* 31: 745-751, 2010. (査読有)

10. Tokunaga T, Naruke Y, Shigematsu S, Kohno T, Yasui K, Ma Y, Chua KJ, Katayama I, Nakamura T, Hishikawa Y, Koji T, Yatabe Y, Nagayasu T, Fujita T, Matsuyama T, Hayashi H. : Aberrant expression of interferon regulatory factor 3 in human lung cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397: 202-207, 2010. (査読有)

11. Matsumoto K, Nagayasu T, Hishikawa Y, Tagawa T, Yamayoshi T, Abo T, Tobinaga S, Furukawa K, Koji T. : Keratinocyte growth factor accelerates compensatory growth in the remaining lung after trilobectomy in rats. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 137: 1499-1507, 2009. (査読有)

12. Shirendeb U, Hishikawa Y, Moriyama S, Win N, Thu MMM, Mar KS, Khatanbaatar G, Masuzaki H, Koji T. : Human papillomavirus infection and its possible correlation with p63 expression in cervical cancer in Japan, Mongolia, and Myanmar. *Acta Histochem. Cytochem.* 42: 181-190, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 31 件)

1. 菱川善隆, 小路武彦 : マウス精巣でのエストロゲン受容体 α と β の分子組織細胞化学的解析. 第 89 回日本生理学会大会. 2012, 3, 29-31, 松本.

2 日野真一郎, 菱川善隆 : 小胞体膜貫通型 E3 ユビキチンリガーゼ HRD-1 のマウス小腸における発現検討. 第 117 回日本解剖学会総会. 2012, 3, 28, 甲府

3. 日野真一郎, 菱川善隆 : マウス小腸における小胞体膜貫通型 E3 ユビキチンリガーゼ HRD-1 の免疫組織化学的検討. 第 53 回日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会. 2011, 12, 3, 熊本

4. 日野真一郎, 菱川善隆 : 小胞体膜貫通型 E3 ユビキチンリガーゼ HRD-1 結合因子の同定. 日本解剖学会第 67 回九州支部学術集会. 2011, 10, 22, 宮崎

5. 菱川善隆, 宋 寧, 小路武彦 : 精子形成過程に於けるエストロゲン受容体 β のミトコンドリア動態への関与. 第 52 回日本組織細胞化学会総会. 2011, 9, 24-25, 金沢

6. Song N, Hishikawa Y, Koji T. : Differentiation-dependent changes of DNA methylation in neonatal and adult mouse testis. 第 52 回日本組織細胞化学会総会. 2011, 9, 24-25, 金沢.

7. 菱川善隆, 小路武彦 : 精子形成過程に於けるミトコンドリア関連蛋白エストロゲン受容体 β 動態の解析. 第 67 回日本顕微鏡学会学術講演会. 2011, 5, 16-18, 福岡.

8. 宋 寧, 菱川善隆, 西野友哉, 小路武彦 : マウス精子形成過程における 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) のエピジェネティック因子への効果. 第 88 回日本生理学会大会/第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会. 2011, 3, 29 (誌上開催.)

9. Chojookhuu N, Sato Y, Hishikawa Y, Nishino T, Koji T. : Pregnancy-dependent expression of estrogen receptor β in mouse large intestine. c/第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会. 2011, 3, 30 (誌上開催.)

10. Kitamura M, Furusu A, Obata Y, Nishino T, Hishikawa Y, Koji T, Kohno S. : Epigallocatechin gallate suppresses the progression of peritoneal fibrosis in methylglyoxal induced peritoneal fibrosis model in mice. 43rd Annual Meeting of ASN. 2010, 11, 18-21, Denver, USA.

11. 北村峰昭, 古巢 朗, 西野友哉, 小畑陽子, 森 篤史, 浦松 正, 新里健暁, 菱川善隆, 小路武彦, 河野 茂 : マウス腹膜線維症モデルに於ける (-) -エピガロカテキンガレート of 線維化抑制効果について. 第 16 回日本腹膜透析医学会学術集会・総会. 2010, 11, 6-7, 大分.

12. 梅根隆介, 菱川善隆, 小路武彦 : Cell renewal 系としての小腸上皮細胞のメチル化動態の解析. 日本解剖学会第 66 回九州支部学術集会. 2010, 10, 9, 福岡.

13. Chojookhuu N, 佐藤陽子, 西野友哉, 菱川善隆, 小路武彦 : Pregnancy-dependent expression of estrogen receptor β in mouse large intestine. 第 42 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. 2010, 9, 24-25,

三島.

14. 菱川善隆, 小路武彦: In situ PCR 法の新展開とその応用. 第 42 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. 2010, 9, 24-25, 三島.

15. 北村峰昭, 古巢 朗, 西野友哉, 小畑陽子, 森 篤志, 浦松 正, 新里健暁, 菱川善隆, 小路武彦, 河野 茂: マウス腹膜線維症モデルにおける (-)-エピガロカテキンガレートの線維化抑制効果についての病理組織化学的検討. 第 51 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 2010, 9, 4-5, 東京.

16. Song N, Hishikawa Y, Sato Y, Koji T. : Effect of 5-aza-2' deoxycytidine (5-aza-dC) on epigenetic modifications in spermatogenic cells of mouse. 第 51 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 2010, 9, 4-5, 東京.

17. 菱川善隆, 宋 寧, 安 樹才, 佐藤陽子, 西野友哉, 小路武彦: ラット小腸 cell renewal 系での細胞増殖・分化過程における DNA メチル化動態の解析. 第 51 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 2010, 9, 4-5, 東京.

18. 北村峰昭, 古巢 朗, 西野友哉, 小畑陽子, 森 篤史, 浦松 正, 新里健暁, 菱川善隆, 小路武彦, 河野 茂: マウス腹膜線維症モデルにおける (-) -エピガロカテキンガレートの線維化抑制効果についての検討. 第 53 回日本腎臓学会学術総会. 2010, 6, 16-18, 神戸.

19. 菱川善隆, 宋 寧, 佐藤陽子, 安 樹才, 小路武彦: HELMET 法を用いたラット小腸上皮組織での DNA メチル化状態の解析. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2010, 3, 28-30, 盛岡. Acta Anat Nippon. 85(suppl); 140.

20. Yamamoto-Fukuda T, Terakado M, Hishikawa Y, Koji T, Takahashi H.: Effect of in vivo over-expression of KGF by electroporatively transfected KGF cDNA on the histology of external auditory canal in a SD rat. 33rd MidWinter Meeting of the Association for Research in Otolaryngology. 2010, 2, 6-10, Anaheim, USA.

21. Akiyama N, Yamamoto-Fukuda T, Sato Y, Hishikawa Y, Koji T, Takahashi H.: Usefulness of the transplantation of isolated middle ear mucosal epithelial cells mixed with hydrogel for the

promotion of mucosal regeneration in the middle ear of wistar rat. 33rd MidWinter Meeting of the Association for Research in Otolaryngology. 2010, 2, 6-10, Anaheim, USA.

22. Hishikawa Y, Koji T. : Apoptosis related distribution of mitochondrial components assessed by fluorescence-immunohistochemistry with laser scanning microscopy in mouse spermatogenic cells. Myanmar Health Research Congress 2010. 2011, 1, 10-14, Yangon, Myanmar.

23. Nishino T, Hishikawa Y, Koji T. : Epigallocatechin gallate suppresses the progression of peritoneal fibrosis in methylglyoxal induced mouse model; quantitative enzyme-immunohistochemical study. Myanmar Health Research Congress 2010. 2011, 1, 10-14, Yangon, Myanmar.

24. 菱川善隆, 小路武彦: 転写調節因子の組織化学. 第 51 回日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会. 2009, 12, 5, 北九州.

25. Hishikawa Y, Koji T. : Mitochondrial redistribution and its possible relation to germ cell apoptosis through estrogen receptor beta in mouse testis. The 9th China-Japan Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry, 2009, 11, 4-7, Nanning, China.

26. 菱川善隆, 安 樹才, 小路武彦: KGF/FGF-7 の in vivo 投与によるラット肝再生過程への関与. 第 65 回日本解剖学会九州支部学術集会. 2009, 11, 7, 沖縄.

27. Song N, Hishikawa Y, Sato Y, Koji T. : Differentiation stage-specific changes of DNA methylation and histone H3 modifications in mouse spermatogenesis. 第 50 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 2009, 9, 26-27, 大津.

28. 菱川善隆, 宋 寧, 佐藤陽子, 小路武彦: HELMET 法を用いたマウス小腸上皮における DNA メチル化状態の解析. 第 50 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 2009, 9, 26-27, 大津.

29. 菱川善隆, 小路武彦: 乳癌における KGF/FGF-7 とその受容体のアポトーシス制御機構への関与. 第 41 回日本臨床分子形態学会

総会・学術集会. 2009, 9, 4-5, 神戸.

30. 浦松 正, 古巢 朗, 小畑陽子, 西野友哉, 阿部克成, 蔵重智美, 廣瀬弥幸, 宮崎正信, 船越 哲, 菱川善隆, 宮崎 徹, 小路武彦, 河野 茂: 脳卒中自然発症高血圧ラット (SHRSP) 腎におけるオルメサルタンとアゼルニジピンのapoptosis inhibitor of macrophage (AIM)発現制御を介した腎保護効果の検討. 第18回日本Cell Death学会学術集会. 2009, 8, 1-2, 長崎.

31. 菱川善隆, 宋 寧, 小路武彦: 生殖細胞アポトーシスでのミトコンドリア動態並びに DNA メチル化修飾状態の解析. 第 18 回日本 Cell Death 学会学術集会. 2009, 8, 1-2, 長崎.

[図書] (計 3 件)

1. 刀祢重信・小路武彦・菱川善隆: 細胞死実験プロトコール: 株式会社 羊土社, 2011, 総 223 頁 (p. 30-p. 41)

2. 日本臨床分子形態学会編・菱川善隆・小路武彦: 病気の分子形態学: 学際企画 株式会社, 2011, 総 370 頁 (p. 66-p. 69)

3. 小路武彦・菱川善隆: 永遠の不死-精子形成細胞の生物学: 新・生命科学ライブラリー-医学とバイオ 6: サイエンス社, 2009, 総 143 頁 (p. 97-p. 116)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/anatomy>
1/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菱川 善隆 (HISHIKAWA YOSHITAKA)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号: 60304276

(2) 研究分担者

佐藤 陽子 (SATO YOKO)

山口大学・農学部・学術研究員

研究者番号: 50398963

小路 武彦 (KOJI TAKEHIKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 30170179

(3) 連携研究者

なし