

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 31 日現在

機関番号：32643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659179

研究課題名（和文）PTH関連蛋白の恒常的発現の分子基盤—核内受容体、ヘッジホッグ、ERBB2

研究課題名（英文）Molecular basis of constitutive expression of PTHrP protein—Nuclear receptor, Hedgehog and ERBB2

研究代表者

岡崎 具樹 (OKAZAKI TOMOKI)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：60203973

研究成果の概要（和文）：

PTHrP(副甲状腺ホルモン関連蛋白)が、複数のステロイドホルモンによる転写抑制を受ける際に一部共通したメカニズムが存在する。核内受容体(NR)と、ヘッジホッグシグナル経路、および PTHrP と ERBB2 癌遺伝子の相互間に存在するクロストークに関わるプレーヤーを主に転写因子レベルで解析した。

研究成果の概要（英文）

There is a common, at least in part, mechanism whereby PTHrP gene is negatively regulated by various steroid hormones. We analyzed molecular players involved in the crosstalk among nuclear receptors, hedgehog signal and ERBB2 oncogene expression when PTHrP gene is expressed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌学

1.研究開始当初の背景

核内ホルモンの受容体 NR は、種々の生命現象に深く関わると同時に、前立腺癌、乳癌や、動脈硬化・糖尿病・高血圧そして骨粗鬆症等の病態および治療にも重要な役割を担う。この過程では、一定のレパートリーを有した、種々の NR に結合する転写共役因子群が精緻な調節機構を形成する。近年、この NR を介する転写に共通に存在する機構の全貌が明

らかになってきたが、その大半は NR による転写促進系であり、転写抑制系については未だ散発的な報告があるのみである。転写促進系では遺伝子発現の制御が数 10 から数 100 倍の変化を伴うことが多いのに対し、抑制系では高々 2~3 倍といったように変化の幅が小さく解析がより困難であることがその一因であろう。マイクロアレイ法が広く普及するようになって、エストロゲンやアンドロゲ

ン、グルココルチコイドによって発現促進される遺伝子群が網羅的に解析されるようになったが、発現の抑制についてはこの方法で必ずしも広範にカバーできないことも、この変化幅の小ささが関与している。この種、変化幅の少ないが生理的に重要な機構の解明には、現時点ではアレイ法でもノーザンブロット法でもなく、下に記すように我々が用いている正確なコントロール実験を駆使した上でのリアルタイム-RT-PCR法が最も有効な方法の一つである。さて、遺伝子転写促進機構では、ある一定の DNA 応答配列(NRE) 周辺で、ホルモン-NR 結合体と種々の転写共役因子が(脱)アセチル化、(脱)メチル化など種々のクロマチン修飾を動的に行っている。それに対して NR を介する転写抑制の研究は、ホルモン非存在下におけるコレプレッサー・HDAC 複合体による、転写促進の前駆状態をプライミングする抑制機構(active repression)の研究が主流を占めてきた。しかし NR による遺伝子発現の中核を構成するフィードバックの分子機構、すなわち生体の恒常性を保つ機構の根幹に遺伝子発現抑制があることは論を待たない。実際に、ホルモン存在下の遺伝子発現抑制機構も、各 NR または各 NRE (NR 反応性 DNA 配列)について種々の報告がなされるようになってきており、その中でも、ダイマーでなく、モノマーの NR が 6~7 塩基対を中心とするいわゆるハーフサイト DNA 配列に結合するという普遍的な仮説が提示されている。先に述べたエストロゲン応答マイクロアレイや、プロゲステロン→PR、ヘム→Rev-ERB といった NR を介するリガンド存在下の転写抑制の系でも、このハーフサイトによる制御の報告が集積してきている。しかし、転写抑制のそもそもの前提である、刺激が入らない状態での一定量の転写発現量の維持にかかわる、すなわち転写に対するオンの機構が何によってもたらされているかが、各遺伝子、各刺激(ホルモン)ごとに異なっていることが、これ以上の、「転写抑制系における普遍的な分子機構」の解明を困難にしている。

2. 研究の目的

では、PTHrP 遺伝子ではこのオンの状態を何がもたらしているのだろうか?本研究では PTHrP 遺伝子の転写抑制機構の詳細を明らかにすることによって、逆にこのオン、すなわち PTHrP 遺伝子の恒常的発現の本態に迫ることを目的とする。

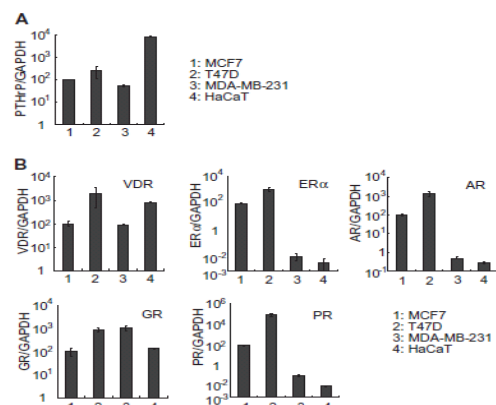
3. 研究の方法

乳癌・前立腺癌の各種培養細胞株における PTHrP 遺伝子発現に対する、1, 25 水酸化ビタミン D3、17 β エストラジオール、ジヒドロテ

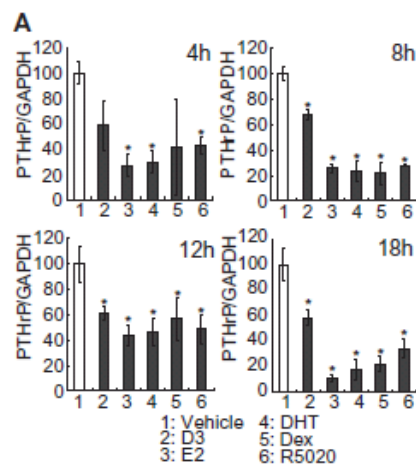
ストステロン、デキサメサゾン、プロゲステロン受容体アゴニスト R5020 の各種核内(ステロイド)ホルモンによる転写抑制の時間的経過と用量関係を real-time PCR 法を駆使し検討すると同時に、各核内受容体やヒストン修飾蛋白の抗体を用いたクロマチン免疫沈降法をおこない、この転写抑制に関わる核内転写共役因子の動態を解明する。

4. 研究成果

(1) 各種培養細胞における核内受容体 mRNA (VDR, ER α , AR, GR そして PR) ---乳がん細胞(MCF-7, T47D, MDAMB231)と皮膚ケラチノサイト(HaCaT)における発現を GAPDH mRNA を対照として示す。

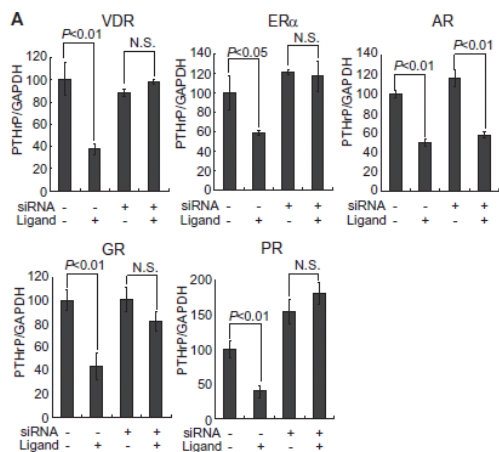


(2) 各種ホルモンによる PTHrP mRNA 発現抑制の時間的経過 (MCF-7 細胞)

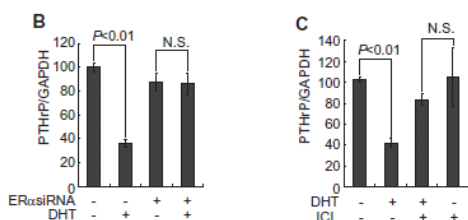


(3) 核内受容体に対する siRNA 導入で DHT 以外の核ホルモンの PTHrP mRNA 抑制作用は消

える。



(4) DHT を介する PTHrP mRNA の転写抑制抑制は SiAR でなく siERα の導入で消失する。



このことから MCF7 細胞における ERα と AR の核内情報伝達経路は共有されていることが示唆された。

(5) これらのホルモンによる PTHrP mRNA の転写抑制はヒストン脱アセチラーゼ阻害薬の TSA で共通に解除された。

(6) 各核内受容体抗体をもちいた ChIP アッセイにより、これらの受容体はいずれも、ヒト PTHrP 遺伝子転写開始点上流 8kbp 付近に存在する DNA 配列と結合した。

(7) ERBB2 mRNA もまた PTHrP とほとんど同様なステロイドホルモンによる転写抑制を受ける。

(8) PTHrP の転写は Hh シグナルの Smo-Gli を遮断するサイクロパミンで抑制される。

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 2 件)

①Kajitani T, Tamamori-Adachi M, Okinaga H, Chikamori M, Iizuka M, Okazaki T. Negative regulation of parathyroid hormone-related protein expression by

steroid hormones. Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有 407:472-478, 2011

②Nakajima K., T. Okazaki, T. Okamoto, H. Kimura, K. Takano, and K. Sato. Genes up- or down-regulated by high calcium medium in parathyroid tissue explants obtained from patients with primary hyperparathyroidism. Endocrine J. 査読有 57:153-159, 2010

[学会発表] (計 1 件)

① T Kajitani, M Iizuka, M Tamamori-Adachi, T Okazaki Proteasome Inhibitor, but Not Cycloheximide, Commonly Alleviates Suppression of PTHrP Expression Mediated by Several Steroid Hormones in Breast Cancer Cells, 2011 年 6 月 6 日, ボストン(コンベンションセンター), American Endocrine Society Meeting Endo2011 P3-17

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 具樹 (OKAZAKI TOMOKI)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：60203973

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者