

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590255

研究課題名(和文) 肝再生過程でのエストロゲン受容体によるミトコンドリア形態変化と機能制御の解明

研究課題名(英文) Morphological and functional changes of mitochondria through estrogen receptors during liver regeneration

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝再生過程での女性ホルモンであるエストロゲンとその受容体によるミトコンドリアの形態変化と機能の制御機構を検討するために、ラット70%肝切除モデルを用いてミトコンドリア関連遺伝子群について分子組織細胞化学的に検討した。その結果、肝臓の細胞増殖活性は48時間がピークであり、同時にエストロゲン受容体が発現し、また、ミトコンドリア関連遺伝子であるTfamと肝細胞の再生に關与する特異的な幹細胞マーカーであるLinAも同時期に発現することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to evaluate the morphological and functional changes of mitochondria through estrogen and its receptors during liver regeneration. We used for 70% partial hepatectomized rat samples to perform the molecular histochemical analysis including immunohistochemistry, western blot, and PCR. As a result, the cell proliferating activity was the peak at 48 hours after partial hepatectomy. At the same period, estrogen receptor alpha, Tfam (mitochondria related gene) and LinA (specific stem cell marker in liver regeneration) were also expressed in the regenerative liver tissues. Therefore, estrogen receptor alpha may be involved in the mitochondrial function during liver regeneration.

研究分野：分子組織細胞化学

キーワード：ミトコンドリア エストロゲン 肝切除 肝再生 細胞増殖 エストロゲン受容体 ラット

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞の生と死を制御する重要な細胞内小器官である。

我々は、細胞死(アポトーシス)に関して、

(1) エストロゲン標的器官の精巣で、アポトーシス誘導に関与するチトクローム C や Bax の細胞質内への異常流出が関与すること

(2) 精子形成細胞に ER β 及びエストロゲン反応エレメント (ERE) が局在し、高濃度エストロゲン処理で高頻度にアポトーシスが誘導されること

(3) エストロゲン受容体 β (ER β) siRNA 処理精巣では Bax 陽性細胞が高頻度に誘導されること

を明らかにし、ER β が生殖細胞増殖・分化・細胞死に重要な働きをすることを示してきた。

一方で、ヒト乳がん細胞で ER β がミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア局在 ERE と結合しミトコンドリア関連タンパク質群の一連の発現を制御し ATP 産生並びにアポトーシス誘導の両方に関与することが報告されている。

また、生殖器官のみならず、ステロイド代謝の中心である肝臓でも、ER β を介して炎症を誘導するインターロイキン-6 (IL-6) 発現を抑制しアポトーシスを阻害することが報告されており、女性の肝がん発症率の低さとの関連からも注目されている。

更に、エストロゲン類似物質処理の肝臓で逆にミトコンドリア特異的活性酸素の減少を認め、エストロゲン作用は、組織・細胞により多様であることが判明している。

しかしエストロゲンと ER を介した肝臓に特異的なミトコンドリア形態と機能を制御する因子については未だ不明である。

2. 研究の目的

背景で示すように、ミトコンドリアは、エネルギー産生のみならず、細胞死、がん化、老化など様々な生命現象に関与する。また自身の融合・分裂増殖により極めてダイナミックに形態が変化する。一方、エストロゲンは、ER を介してミトコンドリア生物活性で中心的な役割を果たす核内転写因子 nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) 遺伝子のプロモーター領域にある ERE 配列に結合して、NRF-1 の発現制御を行い、直接的、間接的にミトコンドリア生理活性を変化させるが、このステロイド系によるミトコンドリアの形態・機能の制御機構は未だ不明である。

この為、ステロイド代謝の中心である肝臓での肝切除・再生系を用い、エストロゲンと ER が、ミトコンドリア特異的転写因子とその関連蛋白発現動態、核・ミトコンドリア DNA 修飾変化、ミトコンドリア融合・分裂増殖による形態変化にどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 正常成熟雌雄ラットを用いて、70%肝切除を行い、切除後 6、12、24、36、48、72、120、168 時間の試料を作製し (図 1)、以下の実験を行った。

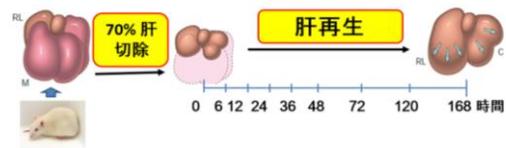


図 1 肝切除モデル作製

- ① 肝細胞増殖活性の指標としての proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の経時的な変化に関する検討。
- ② エストロゲン受容体 ER α 、ER β の肝細胞での発現動態の変化。
- ③ ミトコンドリア関連タンパク質群の発現動態変化。
- ④ ミトコンドリア生物活性で中心的な役割を果たす核内転写因子 nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) 遺伝子発現解析。
- ⑤ 肝細胞再生に関する特異的幹細胞関連遺伝子群の発現動態解析。

(2) エストロゲン誘導によるミトコンドリア形態変化解析のための in vitro モデルとしてヒト乳がん細胞 MCF7 を用いた以下の分子組織細胞化学的解析並びに電子顕微鏡形態解析を行った。

- ① ミトコンドリア融合・分裂に関与する特異的遺伝子群の発現動態変化に関する解析
- ② ER 遺伝子発現抑制によるミトコンドリア形態の変化に関する解析
- ③ 電子顕微鏡 (TEM) による形態変化解析

4. 研究成果

(1) 雄ラット肝臓での肝切除後の細胞増殖活性について PCNA を指標として経時的変化を検討したところ、切除後 24 時間から細胞増殖活性が上昇し 48 時間でピークとなった (図 2)。雌ラットでも同様に 48 時間でピークを示したが PCNA 陽性細胞は雄ラットに比べ高くなった。

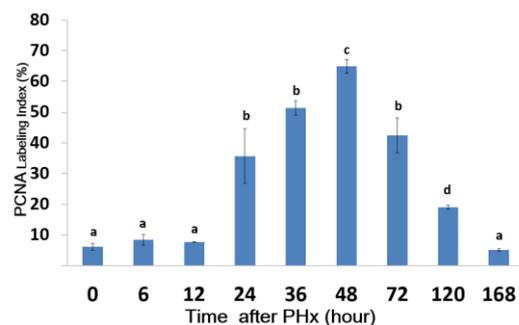


図 2 肝再生過程での細胞増殖活性

ER 発現について免疫組織化学とウエスタ

ンブロットで検討したところ、ER α の発現が、切除後36時間と48時間で高頻度に認められたことより、肝再生過程において、ER α が重要な働きをする可能性が示唆された(図3及び図4)。一方でER β の発現はほとんど認められなかった

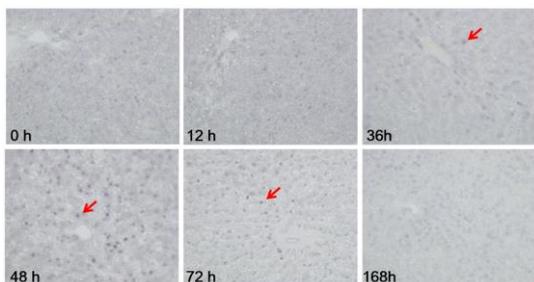


図3 ER α 発現動態(免疫組織化学)

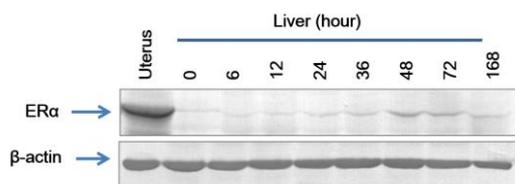


図4 ER α 発現動態(ウエスタンブロット)

更に、ER α 陽性細胞とPCNA発現との関連性について免疫組織化学で検討したところ、ER α 陽性細胞はPCNA陽性であった(図5)。

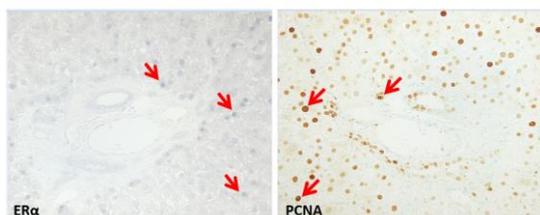


図5 ER α とPCNAの発現動態

以上の結果より、ER α は肝再生過程において、細胞増殖活性制御にも関与する可能性が示唆された。

一方、ミトコンドリア関連遺伝子群であるNRF1、Tfam、SOD、PDH、OXPHOSについて検討したところ、切除後24時間よりTfamの発現が増加したが、NRF1をはじめとするその他の関連遺伝子群の発現動態に顕著な変化は認められなかった。

一方で肝細胞の幹細胞マーカーであるLin28A及びLin28Bについて検討したところ、切除後48時間でLin28Aの発現を認めた(図6)

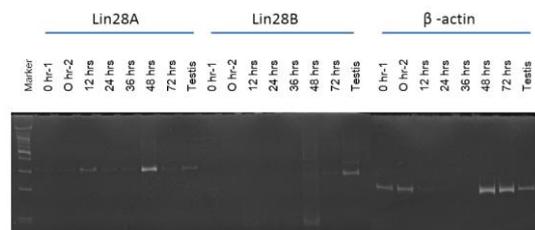


図6 Lin28A, Bの発現変化

(2) ヒト乳がん細胞MCF7を用いてエストロゲンによるミトコンドリア形態変化について解析した。

まず、エストロゲンにより誘導されるミトコンドリア関連遺伝子群についてエストロゲン処理によりスクリーニングを行ったところ mitochondrial elongation factor 1 (MIEF1)が誘導されることが明らかとなった(図7)。

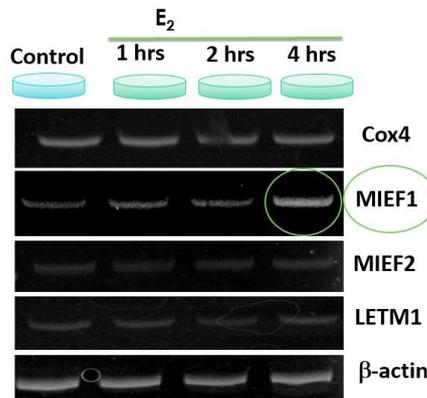


図7 エストロゲン処理によるミトコンドリア関連遺伝子群の誘導

次に、MIEF1の発現動態について免疫組織化学で検討したところ、MIEF1はミトコンドリアに局在しエストロゲン処理で発現動態が変化することが明らかとなった(図8、9)

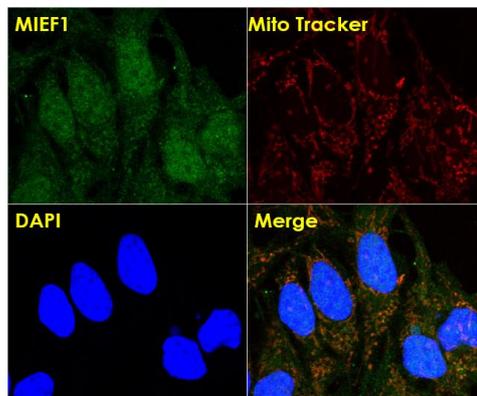


図8 MCF7でのMIEF1の局在

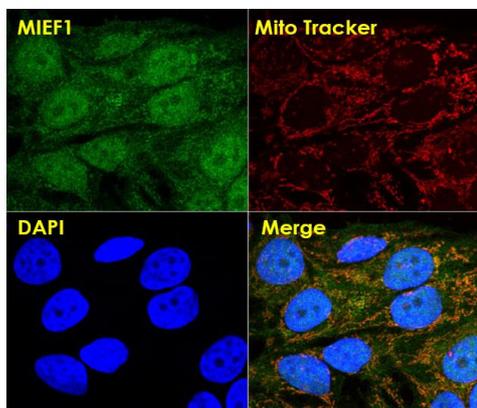


図9 エストロゲン処理によるMCF7でのMIEF1の局在

一方、電子顕微鏡を用いた超微形態学的解析を行ったところ多様な形態を示していることが判明し、今後、エストロゲン処理等による詳細な解析を行う予定にしている（図10）。



図10 MCF7でのミトコンドリア形態

以上の結果より、エストロゲンはミトコンドリアの形態制御に重要な働きをする可能性が示唆された。

近年、ミトコンドリア形態異常が、ホルモン感受性乳癌やメタボリックシンドローム（肥満、糖尿病、高血圧、高脂血症）などの生活習慣病、更には自己免疫性肝障害の発症機序等との関連で注目されている。

将来的には、本研上記疾患の病態生理に重要な働きをするエストロゲンの作用点としてのERが、ミトコンドリア遺伝子制御の中心であるNRF-1、TFAMの転写調節とDNA修飾を直接的に制御することで、ミトコンドリア形態変化を制御する機構について明らかにし、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がん治療への応用や、メタボリックシンドロームや種々のミトコンドリア病への応用、更にミトコンドリア異常遺伝子の関与も疑われる老化の制御機構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 7件）

- ① 日野真一郎、Choi Jookhuu N、菱川善隆、形態科学を基盤とした遺伝子解析法 -in situ hybridization 法を中心に、顕微鏡、査読有、Vol. 50, No. 1、2015 (in press)
- ② Choi Jookhuu N、Hino SI、Oo PS、Batmunkh B、Mohmand NA、Kyawa MT、Hishikawa Y、Ontogenetic changes in the expression of estrogen receptor β in mouse duodenal epithelium、Clinics and research in hepatology and gastroenterology、査読有、2015 (in press) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25726500>

- ③ Nakajima K、Shibata Y、Hishikawa Y、Suematsu T、Mori M、Fukuhara S、Koji T、Sawase T、Ikeda T、Coexpression of Ang1 and Tie2 in Odontoblasts of Mouse Developing and Mature Teeth-A New Insight into Dentinogenesis、Cytochem、査読有、47(1):19-25、2014、doi:10.1267/ahc.13043
- ④ Ueyama T、Sakaguchi H、Nakamura T、Goto A、Morioka S、Shimizu A、Nakao K、Hishikawa Y、Ninoyu Y、Kassai H、Suetsugu S、Koji T、Fritzscht B、Yonemura S、Hisa Y、Matsuda M、Aiba A、Saito N、Maintenance of stereocilia and apical junctional complexes by Cdc42 in cochlear hair cells、J Cell Sci、査読有、127:2040-2052、2014、doi:10.1242/jcs.143602.
- ⑤ Muraoka I、Takatsuki M、Sakai Y、Tomonaga T、Soyama A、Hidaka M、Hishikawa Y、Koji T、Utoh R、Ohashi K、Okano T、Kanematsu T、Eguchi S、Transplanted fibroblast cell sheets promote migration of hepatic progenitor cells in the incised host liver in allogeneic rat model、J Tissue Eng Regen Med、査読有、2013、doi:10.1002/term.1718.
- ⑥ 菱川善隆、形態科学を基盤とした遺伝子・タンパク質の発現・機能解析法の実践、宮崎医学会誌、査読有、37:79-87、2013
- ⑦ An S、Soe K、Akamatsu M、Hishikawa Y、Koji T、Accelerated proliferation of hepatocytes in rats with iron overload after partial hepatectomy、Histochem Cell Biol、査読有、138: 773-786、2012、doi:10.1007/s00418-012-0994-4.

〔学会発表〕（計 18件）

- ① Phyu Synn Oo、（菱川善隆）、ヒト乳がん細胞におけるMIEF1を介するミトコンドリア伸長におよぼすエストロゲンの効果、第120回日本解剖学会総会・全国学術集会、2015年3月21日、「神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）」
- ② 菱川善隆、Preventing Environmental Health In Arsenic contaminated area in Myanmar、MAMS seminar "Drinking water and Health"、2015年3月7日、「ヤンゴン（ミャンマー国）」
- ③ Phyu Synn Oo、（菱川善隆）、Mitochondria localization and morphology may be regulated by mitochondrial elongation factor 1 (MIEF1) through estrogen in MCF7、日本解剖学会第70回九州支部学術集会、2014年10月25日、「産業医科大学・ラマツィーニホール（福岡県・北九

- 州市)」
- ④ Phyu Synn Oo、(菱川善隆)、The possible role of MIEF1 in mitochondrial elongation by estrogen in MCF7、第46回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、2014年10月17日、「TKP市ヶ谷カンファレンスセンター(東京都・新宿区)」
- ⑤ Chojookhuu N、(菱川善隆)、Ontogenetic changes in the expression of estrogen receptor beta and estrogen related receptors in mouse duodenal epithelium、第55回日本組織細胞化学会総会、2014年9月27日、「松本市中央公民館・Mウィング文化センター(長野県・松本市)」
- ⑥ Chojookhuu N、(菱川善隆)、Developmental change of estrogen receptor beta and its possible role in mouse small intestinal function、Fourth International Conference CURRENT ADVANCES IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY、2014年6月19日、「ウランバートル(モンゴル国)」
- ⑦ Chojookhuu N、日野真一郎、(菱川善隆)、Developmental change of estrogen receptor beta and its possible role in mouse small intestinal function、日本解剖学会第69回九州支部学術集会、2013年11月2日、「鹿児島大学・鶴陵会館(鹿児島県鹿児島市)」
- ⑧ 日野真一郎、Chojookhuu N、(菱川善隆)、マウス消化管における E3 ユビキチンリガーゼ HRD1 の免疫組織化学的解析、日本解剖学会第69回九州支部学術集会、2013年11月2日、「鹿児島大学・鶴陵会館(鹿児島県鹿児島市)」
- ⑨ Chojookhuu N、(菱川善隆)、Estrogen-dependent transcriptional activity in developing mouse small Intestine、第54回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2013年9月27日、「航空会館(東京都港区)」
- ⑩ 日野真一郎、(菱川善隆)、骨・軟骨形成における OASIS および BFBF2H7 を介したタンパク質品質管理機構について、第54回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2013年9月28日、「航空会館(東京都港区)」
- ⑪ 菱川善隆、In situ hybridization 法の原理と基礎、第38回組織細胞化学講習会、2013年8月1日、「東京大学伊藤国際学術研究センター・伊藤謝恩ホール(東京都文京区)」
- ⑫ Chojookhuu N、日野真一郎、(菱川善隆)、Possible role of estrogen receptor beta in the development of mouse small intestine、第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013年3月30日、「サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県高松市)」
- ⑬ 日野真一郎、Chojookhuu N、(菱川善隆)、

- マウス消化管における小胞体貫通型ユビキチンリガーゼ HRD1 の発現検討、第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013年3月30日、「サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県高松市)」
- ⑭ 菱川善隆、精子形成過程でのミトコンドリア動態制御機構の関与、第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013年3月28日、「サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県高松市)」
- ⑮ 日野真一郎、Chojookhuu N、(菱川善隆)、小胞体貫通型 E3 ユビキチンリガーゼ HRD-1 のマウス消化管における発現検討、第54回日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会、2012年11月10日、「別府・豊泉荘・公立学校共済組合保養所(大分県別府市)」
- ⑯ 菱川善隆、in vivo エレクトロポーション法を用いた組織細胞化学的解析、第54回日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会、2012年11月10日、「別府・豊泉荘・公立学校共済組合保養所(大分県別府市)」
- ⑰ Chojookhuu N、(菱川善隆)、Estrogen regulates NHE3 expression via estrogen receptor β in proximal colon of pregnant mice、第14回国際組織細胞化学会議(ICHC)、2012年8月28日、「国立京都国際会館(京都府左京区)」
- ⑱ 日野真一郎、(菱川善隆)、Ubiquitin ligase HRD1 expression in the mouse intestine、第14回国際組織細胞化学会議(ICHC)、2012年8月28日、「国立京都国際会館(京都府左京区)」

[図書](計 1件)

- ① 菱川善隆、In situ hybridization 法の原理と基礎、組織細胞化学、査読無、2013、63-76、日本組織細胞化学会(編)、中西印刷。

[その他](計 1件)

- ① 菱川善隆、日野真一郎、Chojookhuu Narantsog、Phyu Synn Oo、In situ ハイブリダイゼーションの基礎と応用—実践編—、第39回組織細胞化学会(Wet Lab) 2014年8月8日、「滋賀医科大(滋賀県大津市)」

ホームページ等

宮崎大学医学部解剖学講座組織細胞化学分野

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/atomy1>

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

日野真一郎 (HINO, Shin-ichiro)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：00372699

高橋伸育 (TAKAHASHI, Nobuyasu)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20404436