

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591367

研究課題名(和文)ステロイドホルモン受容体の作用機構における分子モータータンパク質の役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of molecular motor proteins in the mechanism of action of steroid hormone receptor

研究代表者

河手 久弥(KAWATE, HISAYA)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20336027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：分子モータータンパク質であるミオシン(ミオシンV, VI, VIII)およびダイニンと、蛍光タンパク質であるGFPとの融合タンパク質を作成し、細胞内局在を検討したが、ステロイドホルモン受容体と共局在を示す所見は得られなかった。
新規SERMであるバゼドキシフェンは、ラロキシフェンと異なり、エストロゲン受容体(ER)の核小体移行を誘導しないが、ERを介する転写活性化の著明な抑制を認めた。
グルココルチコイド(GC)の脂肪細胞におけるインスリン抵抗性獲得のメカニズムとして、TXNIPの関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：1. Molecular motor protein myosins (myosin V, VI, VIII) and dynein were fused with fluorescent GFP proteins and intracellular localization of these fusion proteins were examined. However, colocalization of these molecular motor proteins with steroid hormone receptors has not been observed.
2. A new SERM, bazedoxifene, did not cause translocation of estrogen receptors into the nucleoli, which was observed after treatment with raloxifene. However, bazedoxifene markedly suppressed ER-mediated transcriptional activation as well as raloxifene.
3. It has been suggested that TXNIP is involved in the process of acquisition of glucocorticoid-induced insulin resistance in preadipocytes.

研究分野：内分泌学

キーワード：ステロイドホルモン 核内受容体

1. 研究開始当初の背景

アンドロゲン、エストロゲン、グルココルチコイドなどのステロイドホルモンは、細胞内にあるそれぞれの受容体に結合して、標的遺伝子の転写を調節する。アンドロゲン受容体 (AR) およびグルココルチコイド受容体 (GR) は、リガンド非存在下では、細胞質に均一に分布しているが、エストロゲン受容体 (ER) は核内に均一に分布している。受容体にリガンドが結合すると、受容体の構造変化が起こり、AR および GR は細胞質から核に移行して、核内で均一な細かい foci と呼ばれるパターンを取ることを、共焦点レーザー顕微鏡を用いた研究で明らかにしてきた。一方 ER は、リガンド非存在下では核内にびまん性に存在しているが、リガンドを加えると核内で AR や GR と同様に foci を形成する。

アンドロゲン不応症患者に認められたアミノ酸置換を有する変異型 AR は、この細胞質から核への移行および核内での foci 形成に障害を認め、受容体を介する転写活性化が認められなかった。また、骨粗鬆症治療薬として用いられている選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) の一つであるラロキシフェン (RLX) で処理すると、ER は、核質から核小体に移行して、転写活性化を失うことが明らかになった (図 1)。このように、受容体が細胞内で本来働くべき場所に移行できないと、ステロイドホルモン受容体はその作用を発揮できないことが示唆された。つまり、受容体を細胞内の適切な場所に運ぶ機構が、ステロイドホルモンの作用発現の上で極めて重要であると考えられる。

最近のプロテオーム解析などから、ステロイドホルモン受容体が、微小管やアクチンフィラメントなどの細胞骨格に関連するタンパク質と相互作用することが明らかになってきている。また、前立腺癌において、ミオシン VI が強発現していることが明らかになった。

近年、微小管やアクチンフィラメントは細胞骨格を形成するだけでなく、細胞内の物質輸送に大きな役割を果たしていることが明らかになってきた。これまでにミオシン V、VI やダイニンは、ステロイドホルモン受容体と相互作用して、受容体を介する転写活性化を制御することが示されている。

2. 研究の目的

リガンドが結合したステロイドホルモン受容体は、細胞内をダイナミックに移動し、核内の標的遺伝子に結合し、転写を調節する。この細胞内の局在変化の分子メカニズムは十分に解明されていない。最近、細胞骨格関連タンパク質で、細胞内の物質輸送に関するミオシンやダイニンが、前立腺癌で発現が

上昇することやステロイドホルモン受容体との相互作用することが報告されており、ホルモン依存性の発がんメカニズムに寄与している可能性が示唆されている。我々は、これらの細胞内の分子モータータンパク質に着目し、ステロイドホルモン受容体の転写活性化機構における細胞内分子モーターの役割を、画像解析を駆使して解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ステロイドホルモン受容体およびミオシンやダイニンなどの分子モータータンパク質を、異なる蛍光タンパク質 (GFP, CFP, DsRed など) でラベルしたものを、前立腺癌細胞や乳癌細胞などで発現させて、各種リガンドで処理をして、共焦点レーザー顕微鏡で画像を取得する。3次元画像の構築およびタイムラプス観察により、空間的・時間的解析を行い、リガンド依存的な受容体の細胞内局在変化を可視化して解析する。細胞内で共通の動態を示す場合は、免疫沈降などによる相互作用の確認や、受容体を介する転写活性化への影響を生化学的に解析する。また siRNA を用いて、目的の分子モータータンパク質の発現を低下させた場合の、受容体のリガンド依存細胞内動態変化への影響を調べる。

(2) 骨粗鬆症治療薬として用いられている新規 SERM バゼドキシフェン (BZA) が、細胞内で ER の局在に、どのように影響するかを解析した。ER と GFP の融合タンパク質を、乳がん細胞株である MCF-7 で発現させて、BZA 処理後の ER の細胞内局在を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。また、BZA 存在下での ER を介する転写活性化能を、ルシフェラーゼアッセイで評価した。

(3) ステロイド糖尿病発症の分子メカニズムを明らかにするために、グルココルチコイド (GC) で処理した脂肪前駆細胞におけるインスリン抵抗性関連遺伝子の発現を、リアルタイム PCR で解析した。GC 処理で発現上昇を認めた TXNIP 遺伝子に関して、脂肪前駆細胞におけるインスリン抵抗性への関与について、グルコースの取り込みおよびインスリンシグナル伝達に関する Akt などのリン酸化を検討した。

4. 研究成果

(1) 分子モータータンパク質であるミオシン (ミオシン V, VI, VIII) およびダイニンと、蛍光タンパク質である GFP との融合タンパク質を、細胞内でステロイドホルモン受容体と共発現させて、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析したが、両者が細胞内で共局在を示す所見は得られなかった。

(2) 新規 SERM である BZA 処理後の、ER の局在を乳癌細胞株で調べたところ、RLX 処理で観察された ER の核小体移行はほとんど認めず、核質に留まっていた (図 1)。ER を介する転写活性化は、RLX と BZA によって強く抑制されることから、二つの SERM は異なる分子メカニズムで、ER の転写活性化抑制に関与していることが示唆された (図 2)。

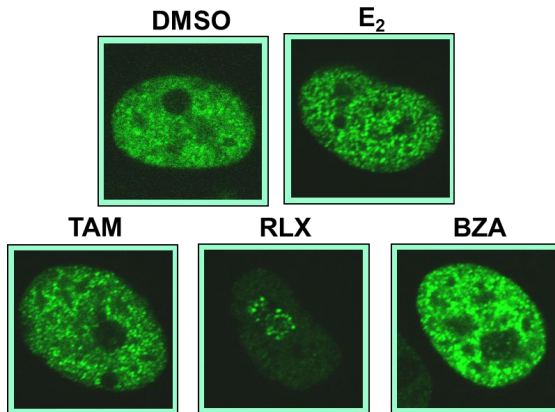


図 1. エストロゲン及び各種 SERM 処理後のエストロゲン受容体(ER)の局在乳癌細胞株 MCF-7 において、ER-GFP を発現させて、エストロゲン(E2)および各種 SERM で 30 分間処理し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。ラロキシフェン処理で核小体移行を認めるが、バゼドキシフェン処理では ER は核質に留まっていた。

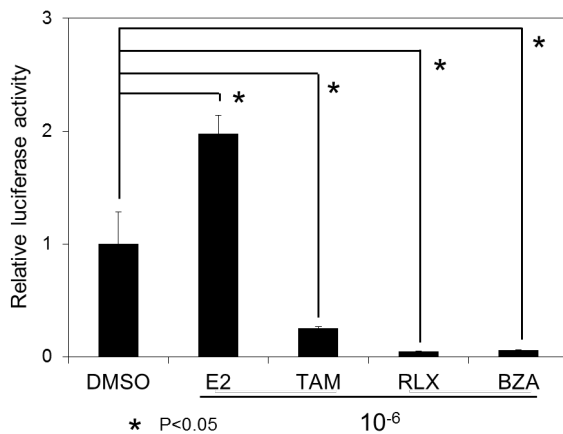


図 2. ラロキシフェンおよびバゼドキシフェンによるエストロゲン受容体を介する転写活性化の抑制

また、骨芽細胞様細胞株 MC-3T3-C1 細胞において、骨芽細胞分化に必要な Runx2 は、オステオカルシンの転写を促進するが、エストラジオールおよびタモキシフェンでは、Runx による転写促進は増強されるが、RLX および BZA では、オステオカルシンプロモーターの転写促進は著明に抑制された。RLX および BZA

は、破骨細胞だけでなく、骨芽細胞に対しても作用し、骨代謝を低下させていることが示唆された。

(3) グルココルチコイド(GC)で処理した脂肪前駆細胞において、インスリン抵抗性関連

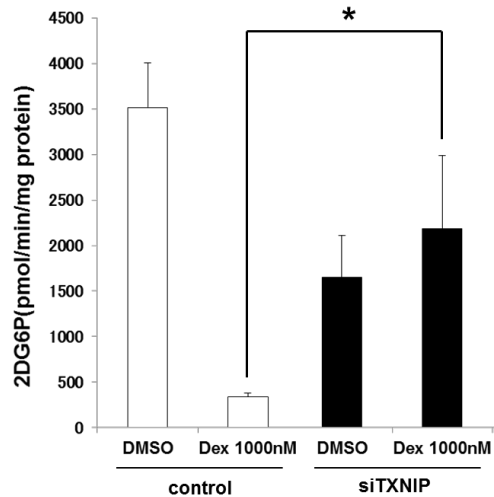


図 3. グルココルチコイド(デキサメタゾン)は、脂肪前駆細胞において、グルコースの取り込みを低下させるが、TXNIP をノックダウンすることにより、GC によるグルコース取り込み抑制が解除された。

遺伝子である TXNIP 遺伝子の発現上昇を認めた。糖尿病治療薬として用いられている GLP-1 アナログの投与で、GC による TXNIP の発現誘導がキャンセルされた。脂肪前駆細胞のグルコースの取り込みは、GC によって阻害されるが、siRNA を用いて TXNIP をノックダウンすると、GC によるグルコースの取り込み阻害が解除されることから、TXNIP が脂肪前駆細胞での GC によるインスリン抵抗性に寄与している可能性が示唆された(図 3)。一方、インスリンシグナル伝達に参与する Akt のリン酸化は、GC 処理後の脂肪前駆細胞において亢進していたことから、脂肪前駆細胞でのインスリン抵抗性獲得(グルコース取り込み阻害)に関しては、Akt を介さない経路が関与していることが示唆された。

(4) 副腎腫瘍からのコルチゾール自律分泌を認めるものの、典型的なクッシング徴候を認めないサブクリニカルクッシング症候群(SCS)患者では、非機能性副腎腫瘍患者と比較して、動脈硬化が進展していることを明らかにした。SCS 患者において、動脈硬化の進展と関連する因子を調べたところ、早朝空腹時のコルチゾール濃度と正の相関を示し、骨代謝マーカーである TRACP-5b および P1NP とは負の相関を示すことが明らかになった。コルチゾールの自律分泌により、骨代謝回転が低下することが、動脈硬化の進展に関与して

いることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Abe I, Karasaki S, Matsuda Y, Sakamoto S, Nakashima T, Yamamoto H, Kawate H, Ohnaka K, Nakashima H, Kobayashi K, Oda Y, Nomura M, Takayanagi R. Complete remission of anaplastic thyroid carcinoma after concomitant treatment with docetaxel and radiotherapy. Case Rep Endocrinol. 査読有, 2015, 2015, p726085.

Kawate H, Kohno M, Matsuda Y, Akehi Y, Tanabe M, Horiuchi T, Ohnaka K, Nomura M, Yanase T, Takayanagi R. Long-term study of subclinical Cushing's syndrome shows high prevalence of extra-adrenal malignancy in patients with functioning bilateral adrenal tumors. Endocr J 査読有, 61(12), 2014, pp1205-12.

Matsuda Y, Kawate H, Shimada S, Matsuzaki C, Nagata H, Adachi M, Ohnaka K, Nomura M, Takayanagi R. Perioperative sequential monitoring of hemodynamic parameters in patients with pheochromocytoma using the Non-Invasive Cardiac System (NICaS). Endocr J 査読有, 61(6), 2014, pp571-575.

堀内由布子, 河手久弥, 野村政壽, 高柳涼一. 骨粗鬆症治療における新たなビタミンD製剤 eldecalcitol, リウマチ科 査読なし, Vol. 52, No. 6, 2014, pp. 561-566.

河手久弥, 高柳涼一, 副腎皮質機能低下を早期診断・治療するために, 日本内科学会雑誌 査読なし, Vol. 103, No. 4, 2014, pp. 878-885.

高柳涼一, 河手久弥, ステロイド療法を理解するための基礎知識, 臨床と研究 査読なし, Vol. 91, No. 4, 2014, pp. 453-458.

Noguchi Y, Kawate H, Nomura M, Takayanagi R. Eldecalcitol for the treatment of osteoporosis. Clin Interv Aging 査読有, 8, 2013, pp1313-21.

Tanaka M, Budhathoki S, Hirata A, Morita M, Kono S, Adachi M, Kawate H, Ohnaka K, Takayanagi R. Behavioral and clinical correlates of serum bilirubin concentrations in Japanese men and women. BMC Endocr Disord 査読有, 13(1), 2013, 39.

Akehi Y, Kawate H, Murase K, Nagaiishi R, Nomiyama T, Nomura M, Takayanagi R, Yanase T. Proposed diagnostic criteria for subclinical Cushing's syndrome associated with adrenal incidentaloma. Endocr J 査読有, 60(7), 2013, 903-912.

Matsuda Y, Kawate H, Matsuzaki C, Sakamoto R, Abe I, Shibue K, Kohno M, Adachi M, Ohnaka K, Nomura M, Takayanagi R. Reduced arterial stiffness in patients with acromegaly: non-invasive assessment by the cardio-ankle vascular index (CAVI). Endocr J 査読有, 60(1), 2013, 29-36.

河手久弥, 高柳涼一, 発熱と各種疾患 内分泌疾患, 臨床と研究 査読なし, Vol. 90, No. 8, 2013, pp. 1069-1072.

河手久弥, 高柳涼一, カルシウム製剤・活性型ビタミン D3 製剤, 日本臨床 査読なし, Vol. 71 増刊, No. 2, 2013, 最新の骨粗鬆症学, pp. 338-342.

Abe I, Nomura M, Watanabe M, Shimada S, Kohno M, Matsuda Y, Adachi M, Kawate H, Ohnaka K, Takayanagi R. Pheochromocytoma crisis caused by Campylobacter fetus. Int J Urol 査読有, 19(5), 2012, 465-467.

高柳涼一, 河手久弥, 柳瀬敏彦副腎偶発腫とサブクリニカルクッシング症候群, 日本内科学会雑誌, 査読なし, Vol. 101, No. 4, 2012, pp. 941-948.

〔学会発表〕(計 19 件)

河手久弥. 高齢骨粗鬆症・骨折の予防と管理. 第 25 回日本老年医学会九州地方会, 2015 年 3 月 7 日, 福岡.

武市幸奈, 河手久弥, 松田やよい, 河野倫子, 蘆田健二, 大中佳三, 野村政壽, 高柳涼一. 副腎性サブクリニカルクッシング症候群患者における動脈硬化と骨代謝の関連性. 第 22 回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 2014 年 11 月 3 日, 東京.

武市幸奈, 河手久弥, 蓮澤奈央, 松村祐介, 松田やよい, 蘆田健二, 大中佳三, 野村政壽, 高柳涼一. 高齢者原発性アルドステロン症患者における骨代謝と動脈硬化の関連性についての検討. 第 56 回日本老年医学会学術集会, 2014 年 6 月 12 日~14 日, 福岡.

河手久弥, 武市幸奈, 松田やよい, 松村祐介, 蘆田健二, 大中佳三, 野村政壽, 高柳涼一. サブクリニカルクッシング症候群患者における動脈硬化と骨代謝の関連性. 第 56 回日本老年医学会学術集会, 2014 年 6 月 12 日~14 日, 福岡.

河手久弥, 坂本竜一, 坂本絵里子, 萬代幸子, 岡村建, 松田やよい, 阿部一郎, 大中佳三, 野村政壽, 高柳涼一. バセドウ病眼症患者における肝炎ウイルスマーカー陽性率の検討. 第 87 回日本内分泌学会学術総会, 2014 年 4 月 24 日~26 日, 福岡.

武市幸奈, 河手久弥, 蓮澤奈央, 松村祐介, 松崎千登勢, 松田やよい, 嶋田伸吾, 河野倫子, 阿部一郎, 坂本昌平,

蘆田健二, 大中佳三, 野村政壽, 高柳涼一. 原発性アルドステロン症患者における骨代謝と動脈硬化の関連性についての検討. 第 87 回日本内分泌学会学術総会、2014 年 4 月 24 日～26 日、福岡.

堀内俊博, 河手久弥, 蘆田健二, 大中佳三, 野村政壽, 高柳涼一. ヒト脂肪前駆細胞に対するグルココルチコイドの作用とそれに対する GLP-1 の解析. 第 87 回日本内分泌学会学術総会、2014 年 4 月 24 日～26 日、福岡.

川原佑太, Enciso PL, 蘆田健二, 河手久弥, 大中佳三, 野村政壽, 高柳涼一. 天然型ビタミン D が耐糖能に及ぼす影響とその機序に関する検討. 第 87 回日本内分泌学会学術総会、2014 年 4 月 24 日～26 日、福岡.

Horiuchi T, Kawate H, Gushima M, Adachi M, Ohnaka K, Nomura M, Takayanagi R. The effects of various SERMs on the intracellular localization and the transactivation of estrogen receptor alpha. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting, 2013 年 6 月 15 日～18 日, San Francisco, USA.

嶋田伸吾, 松崎千登勢, 松田やよい, 永田宙生, 足立雅広, 河手久弥, 大中佳三, 野村政壽, 高柳涼一. 褐色細胞腫患者の循環血液量評価における NiCaS の有用性の検討. 第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013 年 4 月 25 日～27 日、仙台.

堀内俊博, 河手久弥, 具島三佳, 足立雅広, 大中佳三, 野村政壽, 高柳涼一. エストロゲン受容体の細胞内動態と転写活性化能に対する各種 SERM の影響. 第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013 年 4 月 25 日～27 日、仙台.

松田やよい, 松崎千登勢, 河手久弥, 嶋田伸吾, 永田宙生, 足立雅広, 大中佳三, 野村政壽, 高柳涼一. 原発性アルドステロン症患者の治療前後における動脈硬化指標及び代謝系の経時的評価. 第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013 年 4 月 25 日～27 日、仙台.

野口由布子, 山村いずみ, 足立雅広, 河手久弥, 大中佳三, 野村政壽, 高柳涼一. 多発脊椎圧迫骨折を有する妊娠後骨粗鬆症患者に対するテリパラチドの使用経験. 第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013 年 4 月 25 日～27 日、仙台.

河野倫子, 河手久弥, 足立雅広, 大中佳三, 野村政壽, 高柳涼一. 高齢の副腎性サブクリニカルクッシング症候群患者における合併症の経過. 第 55 回日本老年医学会学術集会、2013 年 6 月 4 日～6 日、大阪.

河手久弥, 松田やよい, 松崎千登勢, 阿部一朗, 足立雅広, 大中佳三, 野村政壽, 高柳涼一. 原発性アルドステロン症に対するエブレレノンの有用性について -

頸動脈 IMT の結果から -. Aldosterone Expert Seminar in Fukuoka、2013 年 4 月 22 日、福岡.

Kawate H, Kohno M, Abe I, Matsuda Y, Adachi M, Ohnaka K, Akehi Y, Yanase T, Nomura M, Takayanagi R. Long term follow-up of patients with adrenal subclinical Cushing syndrome. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, 2012 年 11 月 15 日～17 日, Kanazawa, Japan. 河野倫子, 河手久弥, 阿部一朗, 松田やよい, 足立雅広, 大中佳三, 明比祐子, 柳瀬敏彦, 野村政壽, 高柳涼一. 副腎サブクリニカルクッシング症候群患者の長期予後調査. 第 20 回日本ステロイドホルモン学会学術集会、2012 年 11 月 18 日、金沢.

野村政壽, 田中公貴, 足立雅広, 河手久弥, 高柳涼一. 前立腺癌におけるアクチビン受容体の活性化とリンパ節転移. 第 20 回日本ステロイドホルモン学会学術集会、2012 年 11 月 18 日、金沢.

川原佑太, Enciso PL, 河手久弥, 足立雅広, 野村政壽, 高柳涼一. 天然型ビタミン D が耐糖能に及ぼす影響とその機序に関する検討. 第 20 回日本ステロイドホルモン学会学術集会、2012 年 11 月 18 日、金沢.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.intmed3.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河手 久弥 (KAWATE, Hisaya)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 20336027

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

高柳 涼一 (TAKAYANAGI, Ryoichi)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 30154917

(4) 研究協力者

堀内 俊博 (HORIUCHI, Toshihiro)