

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

平成23年7月 27日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局・研究科	薬学研究科
職 名・学 年	助 教
氏 名	木 村 郁 夫

助成の種類	平成23年度 ・ 若手研究者在外研究支援 ・ 在外研究長期助成		
研究課題名	新規細胞膜上ステロイドホルモン受容体mPRおよびMAPRを介した non-genomic effectによる生理機能解明と乳癌におけるその影響の検討		
受入機関	University of California, San Diego, School of Medicine		
渡航期間	平成 23年 9月27日 ～ 平成24年 7月17日		
成果の概要	タイトルは「成果の概要／報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有()		
会計報告	交付を受けた助成金額	2,500,000円	
	期間短縮により再決定された助成金額	2,100,000円	
	返納すべき助成金額	期間短縮による返納 400,000円	
	助成金の使途内訳	航空賃(KIX-SFO, SFO-SAN往復)	157,030 円
		日当・宿泊料への充当	1,942,970 円
当財団の助成について	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 財団からの助成のおかげで、生活面等、気にすることなく研究に集中することができたい非常に有意義な研究活動を遂行することができた。		

研究課題

新規細胞膜上ステロイドホルモン受容体 mPR および MAPR を介した non-genomic effect による生理機能解明と乳癌におけるその影響の検討

薬学研究科 助教 木村郁夫

研究目的

近年、新たに発見された細胞膜上性ステロイドホルモン受容体群(mPR ファミリー、MAPR ファミリー)の細胞レベルおよび個体レベルでの生体内機能解析を行う。この受容体群を介した即時性の non-genomic effect を明らかにすることにより、従来まで考えられていた性ステロイドホルモンの核内受容体を介した genomic effect では説明できない性ステロイドホルモンの生理機構を明らかにする。さらには、この即時性の non-genomic effect が重要な要因であると予想される乳癌等の性ステロイドホルモン異常が関与する病態におけるこれら受容体の役割を明らかにし、この新規細胞膜上性ステロイドホルモン受容体群を標的とする新たな治療薬創成の基礎検討を行う。

結果の概要

まず初めにこれら受容体群の機能を予測するために、その発現について詳細な検討を行った。qRT-PCR により成体マウスの様々な組織における発現を比較したところ、MAPR ファミリーのほうは、多様な組織に広く強い発現が見られたが、mPR ファミリーの方は、特定の組織においてのみの発現が確認できた。例えば、mPRb, mPRd は脳特異的に非常に強い発現が観察された、また mPRg は腎臓に非常に強い発現がみられた。これは、これら受容体が性ステロイドホルモンをリガンドとするにも関わらず、生殖器以外の組織に特異的に発現することから、非常に興味深い独自の機能を有している可能性が示唆される。さらに、脳に特異的に発現する mPRb と mPRd に関して、in situ hybridization により、脳のどの領域に発現するか検討を行った。結果、mPRb は脳のあらゆる領域に広く発現がみられたが、mPRd に関しては、脳の中でも特定の機能を有する領域特異的に発現が確認できた。この結果は、mPRd が中枢神経を介し、プロゲステロンによる特定の生理機能と結びついている可能性が非常に強く予想され、興味深い結果が得られたと考える。これら発現結果から、mPRb および mPRd のプロゲステロンによる脳における生理機能について焦点するべく、現在、これら遺伝子を欠損している mPRb ノックアウトマウスおよび mPRd ノックアウトマウスを作成中である。

MAPR ファミリーは現在、その相互作用するタンパクおよびどのタイプの受容体であるかが全く不明である。また mPR ファミリーに関しては G 蛋白共役型受容体であることはわかっているがどのタイプの G 蛋白と共役しているか等、詳細については、まだ不明である。したがって、これら in vivo の実験に加えて、MAPR ファミリーおよび mPR ファミリー

一の細胞内シグナル伝達機構についての検討を行うために MAPR あるいは mPR の安定発現細胞株の作成を行い、その作成に成功した。今後、これら細胞株を用いることによって、MAPR ファミリーのほうは、相互作用するタンパクの同定、mPR ファミリーのほうは、どの G 蛋白と共役しているかを cAMP の測定や細胞内カルシウムの測定により検討を行う。さらに、マウス乳癌細胞株 MMT-060562 における MAPR および mPR の発現を検討した結果、これらのうちのいくつかの受容体がこの細胞株に高発現することがわかった。したがって、今後、これらの受容体の乳癌細胞における RNAi により、乳癌細胞におけるこれら受容体の機能を明らかにすることにより、乳癌治療への応用の可能性を探る。

以上の研究結果により当初の目的は、ほぼ達成された。これらの結果の一部は現在、**Functions of MAPR (membrane-associated progesterone receptor) family membrane as heme/steroid-binding proteins** として *Curr Protein Pept Sci.* に投稿中である。

また、今後の脳における性ステロイドホルモンの細胞膜上受容体の機能解析をする上で、必要な実験技術および知識を得るため、受入研究室において、中枢神経系を介した生殖機能制御や中枢神経系と性ステロイドホルモンに関係する *in vivo* の実験を行った。具体的内容としては 1. 脳に発現する転写因子 *Otx2* の生殖機能への影響の検討。2. 脳における性ホルモン、特にプロゲステロン核内受容体を介したエネルギー調節機構の検討。3. 前脳形成に関わる転写因子 *Vax1* の脳を介した生殖機能への影響の検討。以上の 3 つの研究テーマに関して実験を行った。1. *Otx2* 欠損マウスにおいて、中枢神経からの生殖機能に必須である GnRH ニューロンの存在が有意に減少していることがわかった。これは *Otx2* が分化後の GnRH の脳視床下部領域への migration に密接に関わっていることを明らかにした。以上の研究結果は **Examining the role of *Otx2* and *Gata4* in the development of gonadotropin-releasing neurons and maintenance of fertility** として現在 *PLoS One.* に投稿中である。2. ニューロン特異的なプロゲステロン核内受容体の欠損は視床下部領域において有意にニューロン数を減少させ、逆にグリア細胞数の上昇とグリア細胞におけるプロゲステロン受容体の発現量を上昇させた。これは、プロゲステロン受容体と脳機能の密接な関係の可能性を示しており、現在、この結果としてどのような生理機能変化が起こるかについて検討中である。3. 脳における *Vax1* の欠損が完全に GnRH ニューロンを消失させることを明らかにした。これは *Vax1* が GnRH の発生に必須であることを示唆しており、現在この GnRH ニューロンの欠損がどのように生殖機能に影響するか、加えて *Vax1* がどのステージにおける GnRH 分化に関与しているかの検討を行っている。

以上より、当初の研究計画がほぼ達成されただけではなく、さらに新たな実験技術および新たな研究テーマをも遂行することができた。今後、これらの研究について我々日本および受入研究機関であった米国 UCSD と引き続き共同研究を行うことにより、さらに発展させ医療および創薬への応用を目指す。