



Paradoxical triiodothyronine suppression of S14 transcription in permanent hepatic cell lines

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 太田, 策啓 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1665

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 388号	学位授与年月日	平成16年 3月 9日
氏 名	太 田 策 啓		
論文題目	Paradoxical triiodothyronine suppression of S14 transcription in permanent hepatic cell lines (永久的肝細胞株における S14 転写のトリヨードサイロニンによる逆説的抑制)		

論文題目

Paradoxical triiodothyronine suppression of S14 transcription in Permanent hepatic cell lines

(永久的肝細胞株におけるS14転写のトリヨードサイロニンによる逆説的抑制)

論文の内容の要旨

[はじめに]

Spot14(S14)は17KD蛋白で脂肪組織に発現しており、ブドウ糖や甲状腺ホルモン(T_3)による脂肪合成に重要な役割をはたしていることが示唆されている。ラット初代培養肝細胞において、S14遺伝子の転写は T_3 によって促進され、そのプロモーターには少なくとも3箇所のthyroid hormone response element(TRE)が同定されている。そこで、 T_3 によるS14遺伝子の転写調節を明らかにするため、永久的培養肝細胞株と初代培養肝細胞を用いて比較検討した。

[材料ならびに方法]

- (1) ラット初代培養肝細胞はコラゲナーゼ灌流法にて分離、培養し、また、ヒト肝細胞癌由来のHepG2、Hep3B、HuH-7細胞、またマウスの非悪性肝細胞由来のAML-12細胞を使用した。
- (2) S14遺伝子のプロモーター4.3kb、5.0kb部分をpXP2またはpCAT(An)に融合したプラスミド(4.3kbLUC、5kbLUCまたは5kbCAT)や5kbLUCの種々のinternal deletionプラスミド、コントロールとして1または4個のTREを組み入れたプラスミド[ルシフェラーゼ(4xTREpal mMTVLUC)またはCAT(TREpal Δ MMTVCAT)レポータープラスミド]を使用した。
- (3) 上記のプラスミドをそれぞれの培養細胞にカルシウムーリン酸法にて、甲状腺ホルモン受容体発現プラスミド[α 1甲状腺レセプター(α 1TR)、 β 1甲状腺レセプター(β 1TR)またはコントロールであるCDM8]とともに遺伝子導入した。17時間後、5.5mMまたは27.5mMのブドウ糖濃度、種々の T_3 濃度の培養液に交換し48時間培養後、細胞を回収し、ルシフェラーゼおよびCAT活性を測定した。

[結果]

- (1) HepG2細胞を用いて、4.3kbLUCをそれぞれCDM8、 α 1TR、 β 1TRとともに遺伝子導入した。ブドウ糖濃度はルシフェラーゼ活性(LUC活性)に影響を与えなかったが、甲状腺レセプターを加えると活性は低下傾向を示し、 T_3 添加にて著明に活性が低下し、それは α 1TRを同時に導入した方が顕著であった。一方、ラット初代培養肝細胞では α 1TRとともに遺伝子導入すると、27.5mMブドウ糖、 T_3 添加にてともにLUC活性は著明に増加した。
- (2) 5kbLUCでは4.3kbLUCと同様の結果であったが、4xTREpal mMTVLUCでは T_3 添加にて著明にLUC活性は増加し、HepG2細胞自体の T_3 反応性は良好であった。
- (3) 遺伝子導入する4.3kbLUCと α 1TRの比を24対1から2対1まで変化させたが、 T_3 による抑制はどの比でもみられ変化はなかった。
- (4) 添加する T_3 の濃度による影響を検討するために、 T_3 濃度を0~ 10^{-4} nMまで変化させたが、生理的濃度である0.5nMにて十分な抑制がみられた。

- (5) 次に5kbCATまたはTREpal Δ MMTVCATを用いて同様の検討を行った。5kbCATではやはりT3によるCAT活性の抑制がみられたが、TREpal Δ MMTVCATでは著明な活性の増加がみられ、RSVLUCではT3による変化はなかった。
- (6) 一方、ラット初代培養肝細胞では5kbCAT、TREpal Δ MMTVCATともにT3にて著明に活性が増加した。従って、HepG2細胞におけるT3によるS14遺伝子の転写抑制はルシフェラーゼ遺伝子自体に存在するnegativeTREによる可能性は否定的であった。
- (7) 次にS14遺伝子プロモーターのどの部位がT3による抑制に関与しているかを検討するために、種々のinternal deletionプラスミドを用いて検討した。既知のTREも含んだ種々のdeletion mutantすべてのプラスミドでT3による抑制がみられ、最終的には転写起点部位より-285塩基対までの間にT3による抑制に関与する部位があることが判明した。
- (8) 最後に、これらのT3によるS14遺伝子の転写抑制がHepG2細胞のみでなく肝細胞癌由来の細胞に共通するのか、または、悪性細胞であるか否かや種の違いによるのかを検討するために、ヒト肝細胞癌由来のHep3B細胞やHUH-7細胞、強力な肝細胞増殖因子であるTGF- α のtransgenicマウスの肝細胞由来であるAML-12細胞を用いて同様の検討を行った。すべての細胞においてHepG2細胞と同様な結果が得られ、悪性であるか否かや種の違いには関連しないことが判明した。

[考察]

HepG2細胞におけるS14遺伝子の転写抑制機序にはいくつかの可能性が考えられる。第1にルシフェラーゼ遺伝子自体にラット初代培養肝細胞では働かないnegative TREが存在する可能性であるが、これについては結果で述べたようにCATレポータープラスミドにて同様の結果であり否定的であった。第2にHepG2細胞に、S14遺伝子のbasal transcription machineryおよびTR-TRE複合体に陰性に作用する因子が存在する可能性である。しかし、それを解決するにはT3による抑制に関与する塩基配列を同定する必要がある。第3にS14遺伝子自体にHepG2細胞で働くnegative TREが存在する可能性である。

S14遺伝子の転写起点部位より-285塩基対までの間にはT3の抑制反応に関与するConsensus half site TREや今まで報告されているnegative TREは存在しないが、一塩基違いのhalf siteやinverted repeat half siteなどが存在し、これらがnegative TREとして作用する可能性もあり今後の検討が必要である。

[結論]

HepG2細胞をはじめとする永久的培養肝細胞株ではT3による反応が正常肝細胞とは異なっている可能性があり、肝臓での遺伝子発現を研究する場合には考慮する必要がある。また、これらの異なった反応の機序や生理的現象との関わりを明らかにすることが今後重要と考えられる。

論文審査の結果の要旨

Spot 14(S14)は、肝、脂肪組織に発現しているが、ブドウ糖や甲状腺ホルモン(T₃)により誘導され、脂肪合成に関与していることが示唆されている。S14遺伝子のプロモーターには少なくとも3箇所のthyroid hormone response element(TRE)が同定されている。申請者はT3によるS14遺伝子の転写調節を永久的培養肝細胞株と初代培養肝細胞を用いて比較検討した。

[材料ならびに方法]

- (1) 培養細胞として、コラゲナーゼ灌流法にて分離、培養したラット初代培養肝細胞、およびヒト肝細胞癌由来のHepG2、Hep3B、HuH-7細胞、TGF- α 発現transgenicマウス肝細胞由来のAML-12細胞を使用した。導入遺伝子として、S14遺伝子のプロモーター4.3kb、5.0kb部分をpXP2またはpCAT(An)に融合したプラスミド(4.3kbLUC、5kbLUCまたは5kbCAT)、5kbLUCの種々のinternal deletionプラスミド、コントロールとして1または4個のTREを組み入れたプラスミド[ルシフェラーゼ(4xTREpal Δ mMTVLUC) またはCAT(TREpal Δ MMTVCAT) レポータープラスミド]を使用した。
- (2) 上記プラスミドをそれぞれの培養細胞にリン酸-カルシウム法にて、甲状腺ホルモン受容体(TR)発現プラスミド α 1、 β 1(TR α 1、TR β 1)あるいはコントロールプラスミドCDM8とともに遺伝子導入した。17時間後、5.5mMまたは27.5mMのブドウ糖濃度、種々のT3濃度の培養液に交換し、48時間培養後細胞を回収、ルシフェラーゼおよびCAT活性を測定した。

[結果]

- (1) HepG2細胞を用いて、5kbLUC、4.3kbLUCをそれぞれTR α 1、TR β 1とともに遺伝子導入した。ブドウ糖濃度はルシフェラーゼ(LUC)活性に影響を与えず、T3は甲状腺レセプター発現下で著明に活性を低下させた。TR β 1よりTR α 1を発現させた方が抑制は顕著であり、T3は0~10⁻⁶nMの範囲で用量依存性であった。一方、ラット初代培養肝細胞ではTR α 1発現下で27.5mMブドウ糖、500nMT3ともにLUC活性を著明に増加した。
- (2) 4xTREpal mMTVLUCではT3添加でLUC活性は著明に増加し、HepG2細胞自体のT3反応性は良好であることが確認された。また5kbCATでもT3によるCAT活性の抑制がみられたこと、RSV LUCではT3による変化はなかったことから、HepG2細胞におけるT3によるS14遺伝子の転写抑制が、ルシフェラーゼ遺伝子自体に存在するnegative TREによる可能性は否定的であった。
- (3) S14遺伝子プロモーターのどの部位がT3/TRによる抑制に関与しているかを、種々のinternal deletionプラスミドを用いて検討した。その結果、転写起点部位より-285塩基対までの間にT3による抑制に関与する部位があると考えられた。
- (4) T3によるS14遺伝子の転写抑制が肝細胞癌由来の細胞あるいは悪性細胞に共通するものか否かを、Hep3B細胞、HUH-7細胞、AML-12細胞を用いて検討した。すべての細胞においてHepG2細胞と同様な結果が得られ、悪性細胞に特異的なものではなく、また細胞種の違いにも関連しないことが判明した。

[考察]

HepG2細胞においてS14遺伝子の転写が抑制される機序は不明であるが、HepG2細胞にS14遺伝子のbasal transcription machineryやTR-TRE複合体に抑制的に作用する因子が存在する可能性、S14遺伝子自体にHepG2細胞で作用するnegative TREが存在する可能性などが考えられる。今後、抑制に関与する塩基配列の同定が必要である。

[結論]

申請者は、HepG2細胞をはじめとする永久的培養肝細胞株ではT3による反応が正常肝細胞とは異なっている可能性があり、肝での遺伝子発現を研究する場合にはこの点に注意する必要があることを示した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) S14遺伝子以外の遺伝子におけるcarbohydrate response elementについて
- 2) HepG2細胞とラット初代培養肝細胞におけるS14遺伝子プロモーター活性の基礎値は同レベルであったか
- 3) ブドウ糖濃度はどうやって決められたか
- 4) S14の細胞内局在について
- 5) T3以外のホルモンによるS14遺伝子活性の調節はあるのか
- 6) S14遺伝子ノックアウトマウス作成状況はどうか
- 7) 癌細胞におけるPXRの量的変化について
- 8) HepG2細胞とラット初代培養肝細胞においてT3に対する反応性が異なる機序について
- 9) 本研究の生理学的意義について

これらに対し、申請者の回答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	中 村 浩 淑	
	副査	三 浦 直 行	副査 大 関 武 彦