



Interference of peroxisome proliferator-activated receptor γ transactivation by retinoic acid receptor (RAR) and vitamin D receptor (VDR)

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 伊東, 武志 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1138

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	医博第 285号	学位授与年月日	平成11年 3月26日
氏名	伊東武志		
論文題目	Interference of peroxisome proliferator-activated receptor γ transactivation by retinoic acid receptor (RAR) and vitamin D receptor (VDR) (PPAR γ の転写活性に及ぼす RAR と VDR の干渉作用)		

博士(医学) 伊東武志

論文題目

Interference of peroxisome proliferator-activated receptor γ transactivation by retinoic acid receptor (RAR) and vitamin D receptor (VDR)
(PPAR γ の転写活性に及ぼす RAR と VDR の干渉作用)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

糖尿病を始めとする生活習慣病に共通する因子としてインスリン抵抗性があるが、その分子生物学的機序は未だ研究途上である。最近、このインスリン抵抗性を改善する薬剤として、チアゾリジン群のトログリタゾン (Tro) が発売された。興味深いことに Tro を始めとするチアゾリジン群は、それまでリガンドが不明でオーファンレセプターとして分類されてきたペロキシゾーム増殖剤応答受容体 (PPAR) γ に特異的に結合することが見出された。更に、チアゾリジン群の PPAR γ 転写活性促進能と生体での血糖降下能が相関することが明らかになり、インスリン抵抗性に於ける PPAR γ の役割が注目を浴びるようになった。PPAR γ はレチノイン酸レセプター (RAR)、レチノイド X レセプター (RXR)、ビタミン D レセプター (VDR) と構造上、機能上高い相同性を持つ核内レセプターであり、脂肪組織に多く発現している。これらの核内レセプターは標的遺伝子のプロモーター領域において RXR と異種二量体 (ヘテロダイマー) の形で結合し、転写活性を制御するが、構造が類似しているレセプターは互いに転写レベルで相互作用を示す可能性がある。本研究では PPAR γ の転写活性に RAR、VDR がどの様に干渉するかを検討した。

〔方法〕

CV-1細胞に各レセプターの cDNA を、PPAR 応答配列 (PPRE) を含むレポーター遺伝子とともに、リン酸カルシウム法で導入した。トランスフェクション後20時間目に各種のリガンドを加え、更に48時間培養した後、細胞成分を溶解、転写活性を β -ガラクトシダーゼ活性で補正して求めた。

ゲルシフトアッセイは PPRE のオリゴヌクレオチドを α -³²P で標識し、無細胞転写翻訳系で作成した各種レセプターをそれぞれのリガンドとともに添加し、電気泳動にてバンドの検出を行った。

〔結果〕

- (1) PPAR γ の転写活性を Tro は濃度依存性に促進した。
- (2) PPAR γ と RXR を等モル発現させた時、RXR のリガンドである 9-シスレチノイン酸 (9-cis RA) は転写活性を促進した。また、低濃度 Tro との共存下では相乗効果を認めた。Tro と 9-cis RA は同経路を介して転写活性の制御を行っていると考えられた。
- (3) RAR α は特異的リガンド (TTNPB) の非存在下では、PPAR γ / Tro による転写活性を 50% に抑制した。しかし、TTNPB の添加によりこの抑制は解除された。

この RAR α による転写活性の抑制効果は RXR を過剰発現させても消失せず、RAR α が PPAR γ と RXR を競合するものではないことが示唆された。

- (4) PPAR γ と RAR α が直接ヘテロダイマーを形成し、転写抑制因子 (コレプレッサー) を呼び込む可能性をゲルシフトアッセイ法で調べたが、PPAR γ と RAR α の PPRE への結合は証明し得なかった。

(5) VDRは特異的リガンドであるビタミンD₃の非存在下ではPPAR γ /Troによる転写活性に影響を与えなかったが、ビタミンD₃を添加するとこの転写活性は34%に抑制された。

(6) A/B、C領域を欠失させ、リガンド結合領域のみとしたVDR (VDR-LBD)でも正常VDRとほぼ同程度(37%)にPPAR γ /Troによる転写活性を抑制した。従って、VDRの転写抑制にはDNA結合を必要としないことが明らかとなった。

[考察]

RAR α はリガンドであるTTNPBの非存在下ではPPAR γ /Troによる転写活性を抑制したが、TTNPBの投与によりこの抑制は解除された。この転写活性の抑制効果はRXRの過剰発現にても消失しなかった。このことは、RAR α が単に二量体形成のパートナーであるRXRを奪い取るためではないことを示している。RAR α がPPAR γ と直接ヘテロダイマーを形成してコレプレッサーを呼び込むために、PPAR γ の転写活性が抑えられる可能性が考えられるが、ゲルシフトアッセイ法ではPPAR γ とRAR α のヘテロダイマー形成を証明し得なかった。しかし、RARによる転写抑制はTTNPBにより解除されることから、何らかの形でRAR α がPPAR γ と関連し、コレプレッサーを呼び込むことによって転写抑制を行う可能性が考えられた。

一方、VDRはRAR α とは対照的に、リガンドであるビタミンD₃の非存在下ではPPAR γ /Troによる転写活性に影響を与えなかったが、ビタミンD₃の添加時のみこの転写活性を抑制した。この転写活性の抑制はDNA結合領域のないVDR-LBDでも同様に認められたため、DNA結合を必要とするものではない。VDRはコレプレッサーと結合しないこと、PPAR γ とVDRはリガンド依存性に同じコアクチベーターと結合することから、転写に介在するコアクチベーターをVDRとPPAR γ が競合しあう可能性が推測された。

[結論]

本研究ではPPAR γ の転写活性に、RAR α とVDRがそれぞれ異なった機序で干渉することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

糖尿病の危険因子の一つである肥満では、脂肪細胞、特に内臓脂肪がtumore necrosis factoa α (TNF α)や脂肪酸のような液性因子を介して骨格筋等におけるインスリンの作用を障害し、インスリン抵抗性を増悪するとされている。近年、トログリタゾン (Tro) やその他のチアゾリジン誘導体 (thiazolidinedione) がインスリン抵抗性を改善すること、およびこれら thiazolidinedione はペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (PPAR γ) の特異的なリガンドであることがそれぞれ独自に見いだされた。しかも、そのPPAR γ のリガンドとしての転写活性促進能と血糖低下能の相関が明かになり、脂肪細胞で特に多く発現しているPPAR γ がthiazolidinedioneによるインスリン抵抗性の改善に関与すると推定されるに至った。

PPARはレチノイン酸受容体 (RAR)、ビタミンD受容体 (VDR) 等と同様の基本構造を持つリガンド依存性転写因子であり、RARやVDRと同じく標的遺伝子の応答領域にレチノイドX受容体 (RXR) とのヘテロ二量体の形で結合し、転写を制御している。構造的にも作用機構の面でも高い相同性を持つこれら核内受容体が転写レベルで互いに干渉する可能性が考えられ、事実レチノイン酸やビタミンDがイ

ンスリン分泌、インスリンに対する感受性、脂肪細胞の分化等に影響を及ぼすことが報告されている。申請者はPPAR γ による転写促進に対するRARやVDRの干渉の分子レベルでの解析を目的として本研究を行った。

サル腎癌細胞由来のCV-1細胞(RXRを内在性に発現しているが、PPAR、RAR、VDR等は発現していない)にPPAR γ およびその他の核内受容体のcDNAとルシフェラーゼ遺伝子上流にPPAR応答配列(PPRE-DR1)を設置したレポータ遺伝子を共発現させ、レポータ遺伝子の発現に対するそれぞれの核内受容体のリガンドの影響を調べた。その結果、①レポータ遺伝子の転写はTroにより促進され、更にRXRのリガンドである9-cisレチノイン酸によっても促進される、②RAR α は自らのリガンドの非存在下でのみPPAR γ の転写を抑制する、③逆にVDRはそのリガンドであるビタミンD3の存在下でのみPPAR γ の転写を抑制する、という新しいしかし複雑な所見が得られた。RAR α がPPAR γ とRXRを競合する可能性は大量のRXRを発現させた実験により否定された。RAR α -PPAR γ あるいはRAR α -RXRヘテロ二量体がPPAR γ -RXRヘテロ二量体とPPRE-DR1を競合する可能性は標識PPRE-DR1をプローブとしたゲルシフトアッセイで検討し、方法の感度の限度内では証明できなかった。また、DNA結合領域を削除しリガンド結合領域のみとしたVDR-LBDも、野性型VDRと同様の阻害効果を発揮した。このことはVDRがその転写干渉作用にDNA結合を必要としないことを示している。転写制御にはDNAには直接結合せず、これら転写制御因子と転写開始複合体を両者への結合により結び付けるコアクチベーターやコレプレッサーが関与することが知られている。今後、各種核内受容体からなるヘテロ二量体へのこれら転写メディエーターの呼び込みという観点から核内受容体の転写レベルでの相互干渉を解析したいとのことであった。

本研究に関して次のような質疑、試問を行った。

- 1) 脂肪細胞由来の液性因子によるインスリン作用の阻害の機構
- 2) Thiazolidinedioneが脂肪細胞の形態、発育、分化等に及ぼす影響
- 3) 実験で用いているTroの濃度とこれを薬剤として投与した時の血中濃度との関係
- 4) PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ の違い、およびこれらPPARサブタイプの内因性リガンド
- 5) CV-1と脂肪細胞の類似点、実験にCV-1を用いた理由
- 6) RARのリガンドとして用いているTTNPBの作用とall-trans retinoic acidの作用の違い
- 7) RARおよびVDRとRXRとのヘテロ二量体の転写調節活性に対する9-cis retinoic acidの影響
- 8) RARはリガンドの非存在下でのみPPAR γ による転写促進を抑制することとレチノイン酸が脂肪の分化を抑制することは矛盾しないか
- 9) Acetyl-CoA oxidaseのDR1ではなくconsensus DR1配列を用いても同じ結果が得られるか
- 10) Referenceに引用されているMiyamotoらの実験結果に対する申請者の見解

これらの質問に対する申請者の答えは適切であり、問題点をよく把握していることを示した。研究面ではPPAR γ による転写促進に対するRARやVDRの干渉を丹念に解析し、興味ある現象を見い出していることと併せて、本論文は博士(医学)の学位授与に値すると論文審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 市山 新
副査 教授 寺田 護 副査 助教授 永田 年