



Glucocorticoid regulation of the promoter of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is indirect and requires ccaat/enhancer-binding protein- β

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 齋, 秀二 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/783

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 5 2 1 号	学位授与年月日	平成 2 1 年 3 月 1 0 日
氏 名	齋 秀 二		
論文題目	Glucocorticoid regulation of the promoter of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is indirect and requires ccaat/enhancer-binding protein-β (グルココルチコイドによる 11 β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 プロモーターの調節機構は間接的で ccaat/enhancer-binding protein-βを必要とする)		

博士(医学) 齋 秀 二

論文題目

Glucocorticoid regulation of the promoter of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is indirect and requires ccaat/enhancer-binding protein- β

(グルココルチコイドによる 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 プロモーターの調節機構は間接的で ccaat/enhancer-binding protein- β を必要とする)

論文内容の要旨

[はじめに]

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) は、脂肪、肝臓、脳、肺などの様々な臓器・組織に発現し、主にレダクターゼ活性により細胞内で不活性型のグルココルチコイドを活性型のグルココルチコイドへ変換し、細胞内のグルココルチコイド作用を増強させる。11 β -HSD1 は、近年肥満研究で注目されている。肥満ではこの 11 β -HSD1 の発現及び活性の上昇が、脂肪組織で認められ、組織内でのグルココルチコイド作用が増強していると考えられている。11 β -HSD1 の発現を上昇させる因子の解明は重要であり、グルココルチコイド自身が 11 β -HSD1 を上昇させると報告されている。しかし分子レベルのメカニズムについては不明である。今回の研究では、A549 細胞中におけるグルココルチコイドによる 11 β -HSD1 転写調節機構の重要なメカニズムを解明した。

[方法]

内因性の 11 β -HSD1 が発現している A549 細胞を、培養細胞として使用した。10⁻⁶M のデキサメサゾン を A549 細胞に投与し、リアルタイム PCR を用いて 11 β -HSD1 mRNA、CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) mRNA を測定した。

ラットの 11 β -HSD1 のプロモーターをレポータープラスミドに組み込み、A549 細胞にトランスフェクトし、ルシフェラーゼアッセイにより活性を測定した。

ゲルシフトアッセイ、ウエスタンブロッティング、クロマチン免疫沈降法を用いて、11 β -HSD1 プロモーターに結合するタンパク質分析を行った。

[結果及び考察]

A549 細胞には、コルチゾンをコルチゾールに変換する 11 β -HSD1 のレダクターゼ活性を認めた。デキサメサゾン投与により 11 β -HSD1 mRNA は、濃度依存的に上昇した。グルココルチコイド拮抗薬である RU38486 と、タンパク合成阻害薬であるシクロヘキシミド (CHX) を投与すると 11 β -HSD1 mRNA の上昇が阻害された。デキサメサゾンによる 11 β -HSD1 mRNA の上昇は、グルココルチコイドレセプター (GR) 依存적であるが、11 β -HSD1 はプライマリー遺伝子ではないと考えられた。つまりグルココルチコイドにより、何らかのタンパクが合成され、二次的に 11 β -HSD1 mRNA の発現が上昇していると考えられた。

トランスフェクションによる実験においても、デキサメサゾンの投与により 11 β -HSD1 のプロモーター活性は上昇した。プロモーター上の -196 (転写開始点: +1) から -124 の領域を欠損した場合に、デキサメサゾンによる 11 β -HSD1 活性の上昇が消失し、この領域にグルココルチコイド反応領域 (GRE) が存在することが示唆された。-196 から -124 の領域には、11 β -HSD1 の転写因子である CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) が結合する部位 (FP3, 4) が 2 箇所存在する。FP3 と FP4 を遺伝子変異させると、デキサメサゾンによる 11 β -HSD1 活性の上昇が消失した。すなわち C/EBP 結合領域は、このグルココルチコイドによる

11 β -HSD1 の調節に重要な役割を果たしていることが示された。FP3 と FP4 の間には、GRE コンセンサスと類似の塩基配列を認めた。

グルココルチコイドによる 11 β -HSD1 プロモーターの調節因子として C/EBP α , β , δ が候補として考えられた。リアルタイム PCR では、C/EBP β mRNA と C/EBP δ mRNA がデキサメサゾンにより上昇し、CHX では阻害されなかった。C/EBP β のみが、ゲルシフトアッセイで 11 β -HSD1 プロモーターの核酸断片に結合した。ウエスタンブロッティングでも、C/EBP β タンパク質レベルの上昇を認めた。A549 細胞に siRNA を用いて、C/EBP β と C/EBP δ をノックダウンしたところ、C/EBP β siRNA では、デキサメサゾンによる 11 β -HSD1 mRNA の上昇が消失した。さらにクロマチン免疫沈降法では、デキサメサゾン投与により FP3 と FP4 に結合する C/EBP β の上昇を認めた。以上の結果から、C/EBP β がグルココルチコイドによる 11 β -HSD1 の転写調節に必要な因子であると考えられた。

プロオピオメラノコルチンノックアウトマウスの脂肪細胞においても、グルココルチコイド投与により 11 β -HSD1 mRNA と C/EBP β mRNA は上昇した。したがって *in vivo* の脂肪組織でも、*in vitro* で見られたグルココルチコイドによる C/EBP β を介した 11 β -HSD1 の転写調節機構が生じていると考えられた。

[結論]

今回の研究で、グルココルチコイドが 11 β -HSD1 のプロモーター転写活性を上昇させるメカニズムを分子レベルで解明した。11 β -HSD1 プロモーター上の C/EBP 結合領域近傍にグルココルチコイド反応領域が同定され、C/EBP β が必要不可欠な因子であった。培養細胞だけではなく、マウスの脂肪細胞でも同様のメカニズムが生じていた。このグルココルチコイドによる 11 β -HSD1 の調節機構は、肥満発症のメカニズムの解明に寄与するものと思われる。さらにグルココルチコイドと 11 β -HSD1 の相互作用は、ステロイド治療という点でも意味深く、様々な疾患への組織特異的なステロイド治療の応用に繋がる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) は、脂肪、肝臓、脳、肺などの様々な臓器・組織に発現し、主にレダクターゼ活性により細胞内で不活性型のグルココルチコイドを活性型のグルココルチコイドへ変換し、細胞内のグルココルチコイド作用を増強させる。グルココルチコイド自身が 11 β -HSD1 を上昇させると報告されているが、その分子レベルのメカニズムについては不明である。そこで、申請者は、グルココルチコイドによる 11 β -HSD1 転写調節機構について検討した。

内因性の 11 β -HSD1 が発現している A549 細胞を培養細胞として使用した。10⁻⁶M のデキサメサゾンを A549 細胞に投与し、リアルタイム PCR を用いて 11 β -HSD1 mRNA、CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) mRNA を測定した。

ラットの 11 β -HSD1 のプロモーターをレポータープラスミドに組み込み、A549 細胞にトランスフェクトし、ルシフェラーゼアッセイにより活性を測定した。

ゲルシフトアッセイ、ウエスタンブロッティング、クロマチン免疫沈降法を用いて、11 β -HSD1 プロモーターに結合するタンパク質分析を行った。

A549 細胞に、11 β -HSD1 のレダクターゼ活性を認めた。デキサメサゾン投与により 11 β -HSD1 mRNA は、濃度依存的に上昇した。グルココルチコイド拮抗薬である RU38486 と、タンパク合成阻害薬であるシクロヘキシミド (CHX) を投与すると 11 β -HSD1 mRNA の上昇が阻害された。デキサメサゾンによる 11 β -HSD1 mRNA の上昇は、グルココルチコイドレセプター依存的であるが、11 β -HSD1 はプライマリー

遺伝子ではないと考えられた。

トランスフェクションによる実験においても、デキサメサゾンの投与により11 β -HSD1のプロモーター活性は上昇した。プロモーター上の-196(転写開始点:+1)から-124の領域を欠損した場合に、デキサメサゾンによる11 β -HSD1活性の上昇が消失し、この領域にグルコルチコイド反応領域が存在することが示唆された。-196から-124の領域には、11 β -HSD1の転写因子であるCCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)が結合する部位(FP3, 4)が2箇所存在する。FP3とFP4を遺伝子変異させると、デキサメサゾンによる11 β -HSD1活性の上昇が消失した。すなわちC/EBP結合領域は、このグルコルチコイドによる11 β -HSD1の調節に重要な役割を果たしていることが示された。

グルコルチコイドによる11 β -HSD1プロモーターの調節因子としてC/EBP α , β , δ が候補として考えられた。リアルタイムPCRでは、C/EBP β mRNAとC/EBP δ mRNAがデキサメサゾンにより上昇し、CHXでは阻害されなかった。C/EBP β のみが、ゲルシフトアッセイで11 β -HSD1プロモーターの核酸断片に結合した。ウエスタンブロッティングでも、C/EBP β タンパク質レベルの上昇を認めた。A549細胞にsiRNAを用いて、C/EBP β とC/EBP δ をノックダウンしたところ、C/EBP β siRNAでは、デキサメサゾンによる11 β -HSD1 mRNAの上昇が消失した。さらにクロマチン免疫沈降法(ChIPアッセイ)では、デキサメサゾン投与によりFP3とFP4に結合するC/EBP β の上昇を認めた。以上の結果から、C/EBP β がグルコルチコイドによる11 β -HSD1の転写調節に必要不可欠な因子であると考えられた。

今回の研究により11 β -HSD1プロモーター上のC/EBP結合領域近傍にグルコルチコイド反応領域が同定され、C/EBP β が必要不可欠な因子であることが示された。

審査委員会では、今回の研究が肥満発症やステロイド治療効果の違いのメカニズム解明に結びつくものであることを高く評価した。

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) 11 β -HSD1 調節における因子について
- 2) 11 β -HSD1 及び HSD2 の発現する臓器について
- 3) 11 β -HSD1 及び HSD2 の相同性と相違性について
- 4) 11 β -HSD1 の蛋白量の測定について
- 5) 11 β -HSD1 の mRNA の発現量について
- 6) デキサメサゾン 10^{-6} M を用いた根拠について
- 7) siRNA のターゲットサイトについて
- 8) グルコルチコイド受容体の発現様式について
- 9) ChIP アッセイの意義について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、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	梅村 和夫	
	副査	瀧川 雅浩	沖 隆