

Title	核内受容体PPARの転写因子としての機能に関する分子生物学的研究
Author(s)	橘, 敬祐
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45671
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	橋 敬 祐
博士の専攻分野の名称	博士 (薬学)
学位記番号	第 19429 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学位論文名	核内受容体 PPAR の転写因子としての機能に関する分子生物学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 土井 健史 (副査) 教授 今西 武 教授 田中 慶一 教授 西原 力

論文内容の要旨

核内受容体の一種である PPAR には、 α 、 δ 、 γ の 3 種類のサブタイプが存在する。PPAR α は主に肝臓で脂肪酸代謝に関与し、PPAR γ は脂肪組織で脂肪の蓄積を促進する。一方、PPAR δ は普遍的に発現しているが、骨格筋や脂肪組織などで脂肪酸代謝に関与している。さらに、これら PPARs は肥満、糖尿病、動脈硬化、癌などの病態において重要な役割を果たしている。特に、抗高脂血症薬が PPAR α の、また、抗糖尿病薬が PPAR γ のリガンドになることから、PPARs は医薬品開発の標的として非常に注目を集めている。一方、これら PPARs は癌に対して抑制的であるという報告と促進的であるという報告があり、その機能には不明な点も多い。

そこで、著者は、PPARs の機能を明らかにする目的でトランスクリプトーム解析を行った。PPARs の標的遺伝子群の網羅的解析を行うにあたり、テトラサイクリン誘導システムを用いて PPARs の発現を制御できる安定発現細胞株を樹立した。樹立した細胞株を用いてトランスクリプトーム解析を行ったところ、PPARs が各リガンドに応答して脂肪酸代謝に関わる遺伝子をはじめ、脂肪酸輸送、糖代謝などに関わる遺伝子の発現を上昇した。特に、PPAR α は脂肪酸代謝に関与する遺伝子群の発現を強く誘導し、また、PPAR γ は脂肪酸の取り込みや輸送に関与する遺伝子群の発現を強く誘導する傾向が認められた。さらに、これまでに PPARs の標的遺伝子として報告されていない CLAMP/PDZK1 の発現量も PPARs のリガンドに応答して変化した。CLAMP/PDZK1 はスカベンジャー受容体の一種である SR-BI の発現をタンパク質レベルで安定化することから、PPARs は SR-BI を介したコレステロールの選択的取り込みに関与している可能性が考えられた。興味深いことに、リガンドの無い状態でも PPAR α 、 γ は標的遺伝子の発現を誘導していたが、PPAR δ は抑制した。すなわち、細胞内に含まれる脂肪酸や、使用した培地中の成分に PPAR α や γ のリガンドが含まれるが、PPAR δ に対するリガンドは存在しない可能性が考えられた。PPAR δ のリガンド結合ポケットは PPAR α や γ に比べて狭いため、このような違いが生じたと考えられる。すなわち、PPAR δ は生体内において普遍的に発現しており、リガンドの無い状態では他の PPAR ファミリーと競合的に作用して標的遺伝子の転写を調節している可能性が示唆された。

これら各 PPAR の転写制御機構を解明する目的で、PPRE が同定されていないヒト *adrp* 遺伝子のプロモーター解析を行った。ヒトプロモーターの塩基配列を既に PPRE が同定されているマウスプロモーターと比較した結果、ヒトプロモーター上に PPRE の候補配列を見出した。この領域を用いてレポーターアッセイ、並びに、ゲルシフトアッセイを行ったところ、PPARs は RXR α とヘテロ二量体を形成してヒト *adrp* 遺伝子の PPRE に結合することが明らか

になった。

このように、PPARsはRXR α とヘテロ二量体を形成し、DR1またはDR2配列を認識する。しかし、各PPARサブタイプ特異的な認識配列は明確にされていない。そこで、著者は改良ランダムセレクション法を用いて各PPARサブタイプ特異的な認識配列の探索を試みた。しかし、この手法ではRXR α のホモ二量体が認識する配列が多く得られた。そこで、PPAR/RXR α のヘテロ二量体の認識配列を多く回収するために、ランダムセレクション法とPPARの抗体を用いたスーパーソフトアッセイの手法を組み合わせて認識配列の探索を行った。その結果、いずれもDR1配列を持つオリゴヌクレオチドが多く回収されたが、これ以外にも、PAL配列やER配列も得られた。興味深いことに、PPAR δ に関してはER配列を持つオリゴヌクレオチドが多く回収されたことから、PPAR α や γ と異なりER配列を特異的に認識する可能性が示唆された。今後、これら配列と各PPARサブタイプとの親和性を詳細に解析することにより、サブタイプ特異的な認識配列をエンハンサーに持つレポーター遺伝子の作製が可能になると思われる。

最近、高脂肪食下でPPAR γ 活性を中等度に低下させる薬剤が抗肥満、抗糖尿病薬になり得ることが報告されたことから、PPAR γ の発現を特異的に抑制しその活性を低下させるアンチセンス分子は、糖尿病に対するアンチセンス医薬品になり得るものと考えられた。そこで、著者は、PPAR γ に対する超機能性核酸2',4'-BNAを含むアンチセンス分子を作製した。ヒト単球系細胞株THP-1にアンチセンス分子を導入したところ、2',4'-BNAを含むアンチセンス分子はPMAによるPPAR γ のmRNAの発現誘導を特異的かつ顕著に抑制した。また、ヒト大腸癌由来細胞株HCT116に常時発現しているPPAR γ のmRNAの発現も効率よく抑えた。このように、今回作製したPPAR γ に対する2',4'-BNAを含むアンチセンス分子は、様々な細胞株においてPPAR γ の発現を特異的に抑制した。

以上の結果、今回著者が樹立した細胞株を用いることにより、PPARsの標的遺伝子を網羅的に解析できることが示された。また、各サブタイプ特異的な候補配列を精査することにより、サブタイプ特異的なレポータープラスミドの構築が可能になると考えられる。すなわち、樹立した細胞株にサブタイプ特異的なレポータープラスミドを導入することにより、PPARsのリガンドをスクリーニングすることが可能になる。また、様々な細胞株に発現するPPAR γ に対する超機能性核酸BNA類を含むアンチセンス分子の抑制効果を示した。今後、本研究成果を応用することにより、さらなるPPARsの機能の解明、並びに、PPARsを標的とした創薬への寄与が期待できる。

論文審査の結果の要旨

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR) は、ペルオキシソーム増殖誘導剤であるクロフィブレート系をリガンドとする核内受容体の一種として見出され、現在までに哺乳動物においてPPAR α 、 δ 、 γ の3種類のサブタイプが存在する。PPAR α のリガンドであるフィブレート系薬剤は抗高脂血症薬として臨床で用いられており、また糖尿病治療薬であるインスリン抵抗性改善薬 (thiazolidinedione; TZD) がPPAR γ のリガンドとして機能し、その薬理効果を発揮することが明らかになっている。

このような背景の下、橘君はPPARファミリーの機能を明らかにすることを目的として、分子生物学的手法を用い研究を展開した。

まず、テトラサイクリン誘導システムを用いてPPARの発現を自在に制御できるヒト肝癌由来細胞株を樹立し、その細胞株を用いてトランスクリプトーム解析を行い、各PPARが脂肪酸代謝、脂肪酸輸送、糖代謝などに関わる遺伝子群の発現を誘導することを明らかにした。また、脂肪滴の構成成分であるヒトADRPのプロモーター領域のPPRE (peroxisome proliferator responsive element) を同定し、ヒトADRP遺伝子がPPARによって発現誘導を受けることを明らかにした。次に、改良ランダムスクリーニング法を用いてPPARの認識する塩基配列の同定を試み、種々候補配列を得ることに成功したが、いずれのサブタイプもDR1を強く認識し、またPPAR δ に関してはER配列も認識する可能性が示された。さらに、医薬品への応用を視野にいれ、PPAR γ に対するアンチセンス分子を超機能性核酸BNAを含むDNA分子として作製し、ヒト単球系細胞株THP-1のPMA誘導によるPPAR γ の発現、およびヒト大腸癌由来細胞株HCT116の内在性PPAR γ の発現をともに抑制した。

以上の研究成果は、核内受容体PPARの機能解明に大きく貢献することが考えられることより、博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。