



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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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シ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

ペルオキソソーム増殖剤応答性受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR) は、ペルオキソソーム増殖誘導剤であるクロフィブレートをリガンドとする核内受容体の一一種として見出され、今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。