

多環芳香族炭化水素が誘発する アテローム性動脈硬化の発症機構

学位論文内容の要旨

3-Methylcholanthrene (MC) や benzo[a]pyrene (B[a]P) などに代表される多環芳香族炭化水素 (PAH) 類はタバコ煙, 自動車の排気ガスおよび食品の焼焦げに多く含まれ, 生体内に取り込まれるとアテローム性動脈硬化, 胎児奇形および発がんなどの重篤な毒性を誘発することが知られている. 一般に PAH 類によって誘発される毒性はリガンド依存性の転写因子である aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介して引き起こされるとされている²⁾が, 毒性の発現機構の詳細は未だ不明な点が多い. Liver X receptor (LXR) は核内受容体スーパーファミリーに属し, コレステロールの代謝物であるオキシステロールによって活性化される. LXR はコレステロールの代謝, 輸送および排泄に関わる遺伝子の転写を調節し, 生体内でコレステロールセンサーの役割を担っている. 近年, PAH 類などのリガンドによって活性化された AhR は estrogen receptor および peroxisome proliferators-activated receptor α などの核内受容体に対して抑制的に働くことが報告されてきている. そこで本研究では PAH 類がコレステロールのホメオスタシスに重要な役割を担う核内受容体 LXR を介したシグナル伝達経路に与える影響に着目し, PAH 類が誘発するアテローム性動脈硬化の発症機構を分子レベルで解明することを目的とした.

(1) PAH 類が LXR を介したシグナル伝達経路に与える影響

PAH 類の一つである MC がコレステロールのホメオスタシスに重要である核内受容体 LXR を介したシグナル伝達経路に及ぼす影響を検討することを目的とし, PAH 類が引き起こすアテローム性の動脈硬化の原因となりうるか検討を行った. ヒト肝がん由来 HepG2 細胞において LXR 標的遺伝子である ATP binding cassette (ABC) A1 および sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) の mRNA の発現は LXR リガンドである T1317 によって誘導され, 典型的な PAH 類である MC との共処置によって抑制されることを見出した. また SREBP-1c 標的遺伝子である fatty acid synthase および stearoyl-CoA desaturase の mRNA の発現もまた T1317 により誘導され, MC との共処置によって抑制されることも見出した. さらに LXR および SREBP-1c を介した転写が MC によって抑制されること, この転写活性の抑制には AhR が関与することをレポータ

ージーンアッセイにより明らかにした。LXR 標的遺伝子にはコレステロールの排泄および代謝に関わる遺伝子が、SREBP-1c 標的遺伝子にはコレステロールの解毒に関わる遺伝子が存在するため PAH 類によるこれらの遺伝子の発現の抑制がアテローム性動脈硬化の原因の一つになることが考えられた。

(2) PAH 類による LXR シグナル伝達経路の抑制における CYP1A1 の役割

PAH 類によって AhR を介して誘導された cytochrome P450 (CYP) 1A1 が PAH 類による LXR を介したシグナル伝達経路の抑制作用に重要な役割を担っているのではないかと予想し、この仮説を検証することを目的とした。LXR を介した転写が CYP によって代謝を受ける AhR リガンドである PAH 類、MC および B[a]P によって抑制されるが、一方で CYP によって代謝を受けにくい AhR リガンドである halogenated aromatic hydrocarbon 類、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin および 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl によっては抑制されないことをレポータージーンアッセイによって証明した。また CYP1A1 の阻害剤を処置した HepG2 細胞、および CYP1A1 に対する short interference (si) RNA を発現させて CYP1A1 の機能を低下させた HepG2 細胞においては MC によって LXR を介した転写は抑制されないことをレポータージーンアッセイにより明らかにした。さらに CYP1A1 に対する siRNA を発現させた HepG2 細胞においては LXR 標的遺伝子である ABCA1 および SREBP-1c の mRNA の発現は MC によって抑制されないことを見出した。以上の結果から PAH 類による AhR の活性化ではなく、CYP1A1 による PAH 類の代謝的な活性化が PAH 類による LXR を介したシグナル伝達経路の抑制に重要となることが示唆された。したがって、PAH 類が誘発するアテローム性動脈硬化において AhR よりも CYP1A1 がより直接的に関与することが考えられた。

(3) がん抑制遺伝子 p53 の活性化を介した LXR シグナル伝達経路の抑制

PAH 類によって引き起こされた DNA 損傷によって活性化された p53 が他の核内受容体と同様に LXR シグナル伝達経路を抑制するのではないかという仮説を立て、本仮説を検証することを目的とした。LXR を介した転写が野生型 p53 を発現する HepG2 細胞では p53 の活性化剤である doxorubicin (Dox) によって抑制されることをレポータージーンアッセイにより見出した。野生型 p53 を欠損する Hep3B 細胞では MC によって LXR を介した転写は抑制されないが、野生型 p53 を発現させた場合、LXR を介した転写が抑制されることをレポータージーンアッセイにより明らかにした。HepG2 細胞においては LXR の標的遺伝子である ABCA1 の mRNA の発現は Dox によって抑制されることを見出した。HepG2 細胞においては MC および Dox によって LXR のヘテロ二量体パートナーである retinoid X receptor (RXR) の核内における発現が抑制されることを見出した。さらに MC による核内 RXR の発現量の抑制はプロテアソーム阻害剤 MG132 によって解除された。以上の結果から PAH 類によって活性化された p53 がプロテアソ

ームを介した RXR タンパク質の分解を促進することで LXR シグナル伝達経路が抑制され、その結果、アテローム性動脈硬化が促進されることが考えられた。

以上、本研究により PAH 類が誘発するアテローム性動脈硬化の発症機構の一部を解明した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 教 授 三 浦 敏 明
副 査 教 授 鎌 滝 哲 也 (高崎健康福祉大学薬学部)
副 査 助 教 授 松 本 健 一

学位論文題名

多環芳香族炭化水素が誘発する アテローム性動脈硬化の発症機構

はじめに

3-Methylcholanthrene (MC) や benzo[a]pyrene (B[a]P) などに代表される多環芳香族炭化水素 (PAHs) はタバコ煙, 自動車の排気ガスおよび食品の焼焦げに多く含まれ, 生体内に取り込まれるとアテローム性動脈硬化, 胎児奇形および発がんなどの重篤な毒性を誘発することが知られている. 一般に PAHs によって誘発される毒性はリガンド依存性の転写因子である aryl hydrocarbon receptor (AHR) を介して引き起こされるとされているが, 毒性の発現機構の詳細は未だ不明な点が多い. Liver X receptor (LXR) は核内受容体スーパーファミリーに属し, コレステロールの代謝物であるオキシステロールによって活性化される. LXR はコレステロールの代謝, 輸送および排泄に関わる遺伝子の転写を調節し, 生体内でコレステロールセンサーの役割を担っている. そこで本研究では PAHs がコレステロールのホメオスタシスに重要な役割を担う核内受容体 LXR を介したシグナル伝達経路に与える影響に着目し, PAHs が誘発するアテローム性動脈硬化の発症機構を分子レベルで解明することを目的とした.

1. PAHs が LXR を介したシグナル伝達経路に与える影響

PAHs が LXR を介したシグナル伝達経路に与える影響を検討するために, LXR のリガンドである TO-901317 (T1317) および代表的な PAHs の 1 つである MC で処置したヒト肝がん由来 HepG2 細胞を使い, LXR によって発現を調節されるコレステロールの排泄に関与するトランスポーターである ATP binding cassette (ABC) A1, 脂肪酸の生合成を調節する転写因子である sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c), および脂肪酸の合成, 伸長反応を触媒し, 遊離コレステロールの解毒に関与する fatty acid synthase (FAS) および stearyl-CoA desaturase (SCD) の mRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR によって定量した. T1317 処置によって誘導された LXR によって発現が制御される遺伝子である ABCA1, SREBP-1c,

FAS および SCD の発現は MC によって濃度依存的に抑制された。次に MC によるこれら LXR 標的遺伝子の発現の抑制が LXR を介した遺伝子の転写活性化を抑制することに起因するか否か検討を行うためにレポータージーンアッセイを行った。T1317 処置によって誘導されたルシフェラーゼ活性は MC によって濃度依存的に抑制された (data not shown)。そこで RNA 干渉法を用いて AHR をノックダウンさせた HepG2 細胞を用いて MC が LXR を介した遺伝子の転写活性化に及ぼす影響を検討したところ、MC によって引き起こされた p(LXRE)₂-TK-Luc で見られるルシフェラーゼ活性の抑制効果は完全に消失した。以上のことから PAHs は AHR を介して LXR 標的遺伝子の転写活性化を抑制し、その発現を抑制することが示唆された。

2. PAHs による LXR シグナル伝達経路の抑制における CYP1A1 の役割

AHR のリガンドであり CYP1A1 によって代謝を受ける PAHs および AHR のリガンドであるが CYP1A1 に代謝されにくいハロゲン化炭化水素 (HAHs) が LXR を介した遺伝子の転写活性化に及ぼす影響を検討した。PAHs である MC または B[a]P と T1317 で HepG2 細胞を共処置した場合、p(LXRE)₂-TK-Luc で見られるルシフェラーゼ活性は T1317 単独で処置した場合と比較して約 40 から 50% まで抑制された。一方、HAHs である 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin または 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl と T1317 で HepG2 細胞を共処置した場合、ルシフェラーゼ活性は抑制されなかった。次に CYP1A1 に対する siRNA を発現させた場合、MC によって引き起こされる p(LXRE)₂-TK-Luc で見られるルシフェラーゼ活性の抑制は完全に消失した。また AHR に対する siRNA を発現させた HepG2 細胞に CYP1A1 を強制発現させた場合、MC はルシフェラーゼ活性を抑制した。以上のことから PAHs による LXR シグナル伝達経路の抑制には自身によって誘導された CYP1A1 による代謝的な活性化が重要である可能性が示唆された。

3. がん抑制遺伝子 p53 の活性化を介した LXR シグナル伝達経路の抑制

p53 の活性化が LXR シグナル伝達経路を抑制するか否か検討するために、p53 の活性化剤である doxorubicin (Dox) の LXR を介した転写活性化に及ぼす影響を p(LXRE)₂-TK-Luc を用いて検討した。T1317 処置によって誘導されたルシフェラーゼ活性は Dox との共処置で濃度依存的に抑制された。したがって PAHs による LXR シグナル伝達経路の抑制において p53 の活性化が重要になる可能性が示唆された。そこで p53 が核内受容体 LXR およびヘテロ二量体のパートナーである RXR タンパク質の分解を促進するか否か検討するために、ウエスタンブロット法により核内における LXR および RXR の発現量を確認した。MC で 0, 6, 12 および 24 時間また Dox で 24 時間処置した HepG2 細胞では、リン酸化 p53 および p53 の典型的な標的遺伝子である p21 の発現量は MC 処置 6, 12 および 24 時間後で増加した。LXR の発現量は MC によって影響を受けなかったが RXR の発現量は MC 処置 12 および 24 時間後で減少した。HepG2 細胞を Dox で処置した場合においても LXR の発現量は影響を受けないものの RXR の発現量は減少した。以上のことから活性化された p53 は LXR のヘテロ二量体のパートナーである RXR の発現を抑制し、LXR を介したシグナル伝達経路を抑制することが示唆された。

このように、岩野 俊介は精力的に多環芳香族炭化水素の毒性発現機能解析を行ない、多くの成果をあげた。これらの業績は岩野 俊介に博士（薬学）の学位授与に十分値し、推薦するものである。