

学 位 論 文 題 名

A novel regulatory role of retinoid in lipid metabolism in mammalian cells

(哺乳動物細胞の脂質代謝におよぼすレチノイドの新たな作用)

学位論文内容の要旨

ビタミン A (VA) は視覚、免疫機能、繁殖、胚発生、さらには細胞の増殖や分化など多岐に渡る生理現象やその過程に重要な役割を果たす。

本研究ではまず反芻類における主要な血中 VA であるレチノールおよびその輸送体であるレチノール結合タンパク質 RBP4 の動態を明らかにするため、様々な生理的、病態生理学的条件にある牛の血漿、初乳および乳中レチノール濃度と RBP4 濃度を測定した。非妊娠、非泌乳期の牛血漿 RBP4 濃度は大凡 45 $\mu\text{g/ml}$ であり、牛に 60 時間、餌を与えなかった場合でもそのレベルは維持されたが、LPS 投与実験では投与後 4 時間では有意な減少が見られた。非妊娠、非泌乳期の牛血漿レチノール濃度は約 30 $\mu\text{g/dl}$ であり、非給餌 60 時間後には対照群の 3 分の 1 に、LPS 投与後 8 時間では対照群の 2 分の 1 に減少した。出産 3-6 日前の血漿 RBP4 濃度およびレチノール濃度は非妊娠、非泌乳期のそれらとほぼ同程度であった。しかし、出産直後に両者は有意な減少を示し、その 2 週間後に元の水準に復帰した。興味深いことに、RBP4 は初乳中に検出され、その濃度は $16.4 \pm 5.6 \mu\text{g/ml}$ であった。しかし、出産後 7 日あるいは 15 日目の乳中からはほとんど検出されなかった。初乳中のレチノール濃度は血漿の約 10 倍であり、乳中の濃度は血漿とほぼ同程度にまで減少した。これらの結果は牛において血中 VA と RBP4 の濃度が、生理的あるいは病態生理学的条件下で独立して調節されていることを示しており、また RBP4 がレチノール同様に母体から子牛に初乳を介して輸送、移動することを示した。

レチノールは細胞に取り込まれるとレチノイン酸 (RA) に代謝され、強い生物活性を持つようになる。その生物活性の一つとして脂肪細胞分化の抑制が知られるが、逆に RA が脂肪分化を促進するとの報告もある。そこで本研究では RA の脂肪蓄積に及ぼす作用を *in vitro* の培養系で再評価した。牛筋間脂肪細胞とマウス 3T3-L1 細胞に正常なグルコース濃度 (NG, 5.5mM) で培養し、RA を添加すると脂肪蓄積が抑制された。一方、高グルコース濃度 (HG, $\geq 17.5 \text{ mM}$) では RA は何れの細胞においても脂肪蓄積を促進した。グルコースに代え酢酸 (10mM) を脂肪合成基質として添加しても RA の作用の反転は見られなかった。RA の脂肪蓄積への作用は脂肪酸合成酵素 (FAS) 遺伝子発現と並行して起こり、アセチル CoA カルボキシラーゼ遺伝子発現とは解離した。また FAS mRNA の転写を促進することが知られる転写因子 SREBP-1 遺伝子発現も FAS の発現とパラレルに変化した。SREBP-2 遺伝子発現は異なる変化を示した。活性化型 SREBP-1a cDNA の 3T3-L1 細胞への強制発現は FAS 遺伝子の発現増強を伴い NG における RA の脂肪蓄積抑制作用を解除した。一方、SREBP-1 siRNA の添加は FAS 遺伝子の発現を阻害し、HG における

RA の脂肪蓄積促進作用を阻害した。つまり、RA の脂肪蓄積に及ぼす作用はグルコース濃度によって促進あるいは抑制と反転し、それは転写因子 SREBP-1a の発現を変化させて FAS 遺伝子の転写量を調節することに因ると考えられた。

RA によるグルコース濃度依存性の SREBP-1a の発現調節機構を明らかにするため、先ず最初に酸化ストレス剤 H_2O_2 の作用を検討した。NG において H_2O_2 ($2\mu M$) で 3T3-L1 細胞を刺激すると高分子量膜結合型 SREBP-1a の分解促進 (核内活性化型 SREBP-1a の増加) とともに FAS 遺伝子の発現亢進と脂肪蓄積の増加が見られた。しかし、酸化ストレス剤 H_2O_2 による SREBP-1a 活性化と RA によるその転写抑制は独立して起こったので、HG で生じる酸化ストレスは RA による転写亢進には寄与しないと考えられた。

次に、核内受容体の SREBP-1a の発現調節への関与を調べた。NG において 3T3-L1 細胞を RA で刺激すると retinoic acid receptor (RAR) α と RAR γ 遺伝子の発現増加と SREBP-1a, retinoid X receptor (RXR) α , peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ , PPAR β/δ , および liver X receptor (LXR) α 遺伝子の発現抑制が観察された。一方、HG において RA は SREBP-1a, RXR β , PPAR β/δ , および LXR β 遺伝子の発現を亢進させたが、RAR α 遺伝子の発現を減少させた。興味深いことに、同様の変化は脂肪分化誘導後 6 日目のみならず 1 日目でも観察された。

通常、3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化させるためには、コンフルエントになった後、分化剤 [insulin, isobutylmethylxanthin および dexamethasone (Dex: 合成グルココルチコイド)] で 2 日間処理する。各成分について検証したところ、NG においては分化剤で刺激しなかった細胞においても RA による SREBP-1a 発現抑制が観察された。HG において RA 単独では SREBP-1a 発現亢進は見られず、Dex を作用させた細胞においてのみ、その亢進作用が見られた。つまり、グルココルチコイド (GC) が HG における RA の応答性を与えることが示された。

次に HG における GC および RA 依存性 SREBP-1a 発現誘導に対する核内受容体の関与について調べた。細胞を RA、9-cis-RA (RXR 刺激剤)、troglitazone (PPAR γ 刺激剤) あるいは T0901317 (LXR 刺激剤) で処理すると GC 依存性に SREBP-1a 発現が亢進したが、TTNPB (RAR 刺激剤) と GW0742 (PPAR β/δ 刺激剤) では見られなかった。HX531 (RXR 阻害剤) や T0070907 (PPAR γ 阻害剤) 処置、および LXR β あるいは PPAR γ に対する siRNA の細胞内への導入は GC および RA 依存性 SREBP-1a 発現誘導を阻害したが、LXR α あるいは PPAR β/δ に対する siRNA の細胞内への導入はそれらに影響を与えなかった。さらに、LXR β siRNA の導入は PPAR γ および RXR β 遺伝子の RA と Dex による発現亢進を抑制したのに対し、PPAR γ siRNA の導入は RXR β 遺伝子の発現亢進を阻害したが、LXR β 遺伝子の発現には影響しなかった。これらの結果は LXR β , PPAR γ および RXR が HG における GC および RA 依存性 SREBP-1a 発現誘導に中心的な役割を果たすことを意味し、LXR β が PPAR γ 遺伝子の発現を調節しうることを示唆した。

以上のように RA は細胞外液のグルコース濃度に依存して細胞の脂質代謝を抑制あるいは亢進させることが新たに見いだされた。この RA の相反する作用の鍵となる分子は SREBP-1a であり、その遺伝子の RA による発現変動は脂肪分化の初期段階から見られ、HG、GC および RA 依存性に核内受容体 LXR β , PPAR γ および RXR が誘導されることで SREBP-1a 遺伝子発現が亢進することが明らかとなった。LXR β は細胞内グルコースセンサーとして知られるので、この核内受容体が RA 作用の細胞外グルコース濃度依存性に関わると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	木 村 和 弘
副 査	教 授	石 塚 真由美
副 査	准教授	佐 藤 耕 太
副 査	准教授	寺 尾 晶

学 位 論 文 題 名

A novel regulatory role of retinoid in lipid metabolism in mammalian cells

(哺乳動物細胞の脂質代謝におよぼすレチノイドの新たな作用)

ビタミンAは視覚、免疫機能、繁殖、胚発生、さらには細胞の増殖や分化など多岐に渡る生理現象やその過程に重要な役割を果たす。本研究ではまず反芻類における主要な血中ビタミンAであるレチノールおよびその輸送体であるレチノール結合タンパク質 RBP4の動態について調べ、牛においてレチノールと RBP4の濃度が、生理的あるいは病態生理学的条件下で独立して調節されていることを示し、さらに RBP4 がレチノール同様に母体から子牛に初乳を介して輸送、移動することを初めて明らかにした。

レチノールは細胞に取り込まれるとレチノイン酸 (RA)に代謝され、強い生物活性を持つようになる。その生物活性の一つとして脂肪細胞分化の抑制が知られる。しかしながら、牛筋間脂肪細胞とマウス 3T3-L1 細胞を用いた本研究において RA の脂肪蓄積に及ぼす作用は正常グルコース存在下では抑制であるのに対し、高グルコース存在下では促進と反転することを初めて明らかにした。また、グルコース濃度に依存した RA の脂肪蓄積に及ぼす作用は転写因子 sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a の発現を抑制あるいは亢進させて脂肪酸合成酵素遺伝子の転写量を調節することに因ることが強く示唆された。

RA によるグルコース濃度依存性の SREBP-1a の発現調節機構を明らかにするため、最初に高グルコース濃度で生じる酸化ストレスの作用について検討したが、酸化ストレスは高グルコース濃度条件下での RA による転写亢進には寄与しないと考えられた。次に、核内受容体の SREBP-1a の発現調節への関与を調べた。各種アゴニスト、アンタゴニストを用いた解析結果により、RA による SREBP-1a 遺伝子の発現変動にはグルコース濃度のみならず、グルコシルコイドが必要であり、それら 3つの因子に依存して核内受容体 liver X receptor (LXR) β , peroxisome proliferator-activated receptor γ および retinoid X receptor が誘導されることで SREBP-1a 遺伝子発現が亢進することが明らかとなった。LXR

は細胞内グルコースセンサーとして知られるので、この核内受容体が RA 作用の細胞外グルコース濃度依存性に関わると考えられた。

以上のように、本研究は、ビタミン A の作用やその輸送に関わる RBP4 の動態について新たな一面を明らかにしたものであり、哺乳動物の生理学に貢献が大である。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者、Mabrouk Attia Abd Eldaim Abd Elkader 氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。