

氏 名	洪 真 紀
(ふりがな)	(こう まき)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 号
学位審査年月日	平成26年1月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Liver X receptor up-regulates α -tocopherol transfer protein expression and α -tocopherol status (Liver X receptor は、ビタミン E 輸送タンパク質遺伝子発現と血中 α -トコフェロール濃度を調節する)
論文審査委員	(主) 教授 林 秀 行 教授 矢 野 貴 人 教授 花 房 俊 昭

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《はじめに》

ビタミン E は過酸化脂質連鎖反応を抑制することで、抗酸化作用を有する脂溶性ビタミンの 1 種である。血液中のビタミン E 濃度調節には α -TTP (α -tocopherol transfer protein: ビタミン E 輸送タンパク質) が関与している。 α -TTP は主に肝臓の細胞質に発現しており、ビタミン E 同族体の一種である α -トコフェロールと選択的に結合し、その細胞内輸送に関与する。 α -TTP 遺伝子発現は、加齢、ビタミン E 摂取量あるいは酸化ストレスにより変化することが知られているが、その分子メカニズムについては不明な点が多い。LXR (liver X receptor) は脂質代謝に関連する核内受容体である。本研究では、LXR が α -TTP 遺伝子発現を転写レベルで調節し、生体のビタミン E 濃度に影響を与えていることを明らかにした。

《材料と方法》

(1) ヒト肝癌培養細胞 FLC-5 における α -TTP 遺伝子発現の検討

リガンドとしてサイトカイン (TNF- α)、成長因子 (HGF、IGF-1、PDGF、TGF- β 、EGF)、ホルモン (レプチン、エストロゲン、デキサメサゾン、チロキシン)、脂溶性ビタミン (ビタミン D₃、 α -トコフェロール)、核内受容体リガンド (all-*trans*-retinoic acid、9-*cis*-retinoic acid、GW0742、ピオグリタゾン、22(*R*)-hydroxycholesterol) などを用い、これらの添加実験を行った。

(2) ビタミン E 欠乏ラットにおける α -TTP 遺伝子発現の検討

Wistar ラット (4 週齢、雄) をビタミン E 欠乏食で 4 週間飼育した。ラットに LXR リガンド (T0901317) を経口投与し、24 時間後に屠殺、各臓器および血液を採取した。なお、対照群には溶媒のプロピレングリコール/Tween80 (4:1) を投与した。

(3) ヒト α -TTP 遺伝子のプロモーター解析および EMSA (electrophoresis mobility shift assay)

ヒト α -TTP 遺伝子 5' 領域の約 1.3kbp を PCR 法にて取得し、この領域をルシフェラーゼベクター (tk-pGL basic vector) に組み込み、LXR に応答するか否かについてルシフェラーゼ活性を検討した。さらに、ヒト α -TTP/LXRE (LXRE 応答配列 : LXR response element) を ³²P で標識し、in vitro translation で作成した RXR (retinoid X receptor) α /LXR α が、ヒト α -TTP/LXRE に結合するか否かを検討した。また競合実験を行い、その結合が阻止されるか否かについても検討を行った。

《結果》

(1) ヒト肝癌培養細胞における LXR リガンドによる α -TTP 遺伝子発現の上昇

RXR リガンドである 9-*cis*-retinoic acid あるいは LXR リガンドである 22(*R*)-hydroxycholesterol の添加により、 α -TTP 遺伝子発現は有意に上昇した。LXR の合成リガンドである T0901317 投与では、 α -TTP 遺伝子発現は濃度依存性に上昇した。

(2) ビタミン E 欠ラットにおける、LXR リガンドによる血漿と肝臓中の α -トコフェロール濃度の上昇

肝臓と血漿中（コレステロール比）の α -トコフェロール濃度は、対照群と比較して、T0901317 投与群で有意に上昇した。また real-time PCR 法で α -TTP 遺伝子発現を調べた結果、T0901317 投与群の肝臓と大脳において、 α -TTP 遺伝子発現が有意に上昇した。また、T0901317 投与群の肝臓組織において、脂質過酸化障害の指標である TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) と 4-HNE (4-hydroxy-2-nonenal) 濃度、および抗酸化酵素である Mn-SOD (superoxide dismutase) および CuZn-SOD 発現を検討したが、これらの変動は認められなかった。

(3) ヒト α -TTP 遺伝子プロモーター領域における LXR 応答領域の同定

ヒト α -TTP 遺伝子上流-483/-468 領域に、LXR 応答配列 (GGGTCAtcagTCTGGA) を見出した。この領域に変異を挿入すると、そのルシフェラーゼ活性は消失した。

(4) ヒト α -TTP 遺伝子の LXR 応答配列における RXR α /LXR α の結合

EMSA にて、ヒト RXR α /LXR α ヘテロダイマーがヒト α -TTP/LXRE に結合することを確認した。競合実験を行うと、この結合は非ラジオアイソトープ標識のヒト α -TTP/LXRE により阻止された。

《考 察》

本研究において、核内受容体である LXR のアゴニストが α -TTP 遺伝子発現を転写レベルで促進し、 α -トコフェロール濃度上昇を誘導することが示された。また、ヒト α -TTP 遺伝子上流に LXR 応答配列が存在すること、およびそれが RXR α /LXR α を結合することが判明し、LXR のアゴニストや 9-*cis*-retinoic acid がこの応答配列を介して α -TTP 遺伝子発現を促進することが示唆された。LXR の主な作用は、コレステロール代謝、コレステロールの吸収・排泄および脂質合成などであり、肝臓においては、ApoE、ApoC などのリポタンパク質や脂肪合成系の酵素を誘導することにより、VLDL 合成を促進する。肝臓中のビタミン E は VLDL に組み込まれて肝臓外に排出される。そこで、LXR の作用によ

り、VLDL 合成の促進と同時に α -TTP の誘導を通じて VLDL 中のビタミン E の量を増やすことは、VLDL に含まれる脂質群の過酸化を阻止するという合目的性を有していると考えられる。LXR を介した α -TTP 遺伝子発現の調節機構を検討することは、ビタミン E の動態さらには抗酸化メカニズムの解明に寄与するものと思われる。

(様式 乙9)

論文審査結果の要旨

ビタミン E は抗酸化作用を有する脂溶性ビタミンである。 α -トコフェロールは、ビタミン E 同族体の中で、最も高い抗酸化活性を有する。血液中のビタミン E 濃度調節には α -TTP (α -tocopherol transfer protein : ビタミン E 輸送タンパク質) が関与している。 α -TTP は主に肝臓の細胞質に発現しており、 α -トコフェロールと選択的に結合し、その細胞内輸送に関与する。 α -TTP 遺伝子発現は、加齢、ビタミン E 摂取量あるいは酸化ストレスにより変化することが知られているが、その分子メカニズムについては不明な点が多い。本研究は、ビタミン E 動態に関与する α -TTP 遺伝子発現の調節を詳細に検討したものである。

申請者は、培養細胞の添加実験において、核内受容体 LXR (liver X receptor) のリガンドの添加により、 α -TTP 遺伝子発現が有意に上昇すること、ビタミン E 欠乏ラットに対する LXR リガンド投与実験において、肝臓中 α -TTP 遺伝子発現が有意に上昇し、血液および肝臓中 α -トコフェロール濃度も有意に上昇すること、次いでヒト α -TTP 遺伝子のプロモーター解析により、ヒト α -TTP 遺伝子の上流-483/-468 領域に LXR 応答配列 (GGGTCAtcagTCTGGA) が存在し、そこに RXR α /LXR α が結合することを見出した。以上より申請者は、核内受容体である LXR が、ヒト α -TTP 遺伝子発現を転写レベルで促進し、血中 α -トコフェロール濃度上昇を誘導するという機構を提唱している。

LXR は VLDL の合成を促進すると同時に α -TTP の発現を通じて VLDL 内のビタミン E の量を増加させる作用を持つことになり、VLDL に含まれる脂質群が過酸化を受けやすいことを考えると、これは VLDL 中の脂質の過酸化を阻止するための合目的的な機構と考えられる。申請者が明らかにした LXR を介した α -TTP 遺伝子発現の調節機構は、ビタミン E の動態および抗酸化メカニズムの解明に寄与するものと思われる。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Nutritional Biochemistry 24(12): 2158-2167, 2013