

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580318

研究課題名（和文） 核内受容体ER $\alpha$ とCARの活性化バランスによる肝脂質代謝制御の分子機構研究課題名（英文） Activation balance of nuclear receptors ER $\alpha$  and CAR regulates hepatic lipid metabolism

研究代表者

山本 幸男 (YAMAMOTO YUKIO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任講師

研究者番号：40321707

研究成果の概要（和文）：脂質代謝の性差は、核内受容体 ER $\alpha$  (Estrogen Receptor  $\alpha$ ) が、脂質代謝のマスターレギュレーターである核内受容体 LXR (Liver X Receptor) および CAR (Constitutive Androstane/Active Receptor) に直接もしくは間接的に働き、遺伝子発現を制御することが一因であることを見いだした。

研究成果の概要（英文）： The underlying molecular mechanism of the sex difference in lipid metabolism remains largely unknown. We investigate the roles of hepatic nuclear receptors: ER $\alpha$  (Estrogen Receptor  $\alpha$ ), which is an authentic estrogen receptor, and LXR (Liver X Receptor) and CAR (Constitutive Androstane/Active Receptor), which are regulators of hepatic lipid metabolism. The transcriptional crosstalk between LXR, CAR, and ER $\alpha$  may explain the suppression mechanism of lipid synthesis by estrogens.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：獣医学・基礎獣医学

キーワード：エストロゲン、エストロゲンレセプター、脂質代謝、核内受容体

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 食生活の西洋化によるエネルギー供給過多にともない、高脂血症、糖尿病などの生活習慣病が増加しており、その克服は近代社会における重要な課題となっている。

(2) 生活習慣病の有病率は、通常男性が女性に比べて7倍以上高いが、その一方で、閉

経後に女性の有病率は顕著に上昇する。

## 2. 研究の目的

生活習慣病に対する感受性に性差が存在することは、現象として広く知られているが、その分子機構は不明な点が多い。本研究では、その一環を担うと考えられるエストロゲンによる肝臓の脂質代謝制御の分子機構を解

明する。このために、エストロゲンに応答する肝臓の核内受容体として ER $\alpha$  (エストロゲン受容体 $\alpha$ ) と CAR (Constitutive Androstane/Active Receptor) に着目し、その遺伝子発現調節機構を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ER $\alpha$ の脂質代謝における機能検討

ER $\alpha$ -KO マウスと野生型マウスを比較し、肝臓における病理的変化、脂肪酸分画の分布、血漿生化学値、ホルモンの変動を検討する。さらに、マイクロアレイ解析を用いて、ER $\alpha$  の制御下で変動する肝臓の遺伝子を検索する。特に、脂質代謝に直接関与する遺伝子については Real Time PCR により詳細に検討する。

#### (2) 脂質代謝関連酵素の ER $\alpha$ と CAR による発現調節機構の検討

そのときに、ER $\alpha$  が CAR による転写活性を抑制する可能性、逆に CAR が ER $\alpha$  による転写活性を促進する可能性を他の転写因子との蛋白-蛋白相互作用を考慮し検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 肝臓におけるエストロゲン/ER $\alpha$ による遺伝子発現の検討

ER $\alpha$  欠損マウスと野生型マウスに合成エストロゲンを投与し、Real Time PCR 法により肝臓の遺伝子発現変化を検討した。野生型マウスでは、合成エストロゲンにより脂質代謝のマスターレギュレーターである転写因子 Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c (SREBP-1c)、中性脂肪合成経路の律速酵素である Stearoyl-Coenzyme A Desaturase (SCD1) や脂肪酸合成酵素 Fatty Acid Synthase (FAS) 遺伝子発現がそれぞれ約 1/3 倍、約 1/30 倍、約 1/2 倍に低下するが、ER $\alpha$  欠損マウスではほとんど変化しな

かった。以上より、エストロゲンは ER $\alpha$  を介してこれらの肝中性脂肪合成関連酵素の遺伝子発現を抑制することが明らかになった。

#### (2) エストロゲン/ER $\alpha$ 経路の標的遺伝子の網羅的解析

合成エストロゲンを投与した ER $\alpha$  欠損マウスと野生型マウスの肝臓を用いた cDNA マイクロアレイ解析を施行し、肝臓におけるエストロゲン/ER $\alpha$  経路の標的遺伝子の網羅的解析を試みた。野生型マウスでは、エストロゲンにより肝中性脂肪合成関連酵素群の遺伝子発現が協調的に抑制されていたが、ER $\alpha$  欠損マウスではこの抑制効果は消失していた。

#### (3) SCD1 遺伝子の ER $\alpha$ による発現制御に関する検討

SCD1 遺伝子のプロモーター解析により、エストロゲン/ER $\alpha$  の標的遺伝子として SCD1 が直接制御されるか否かを検討した。マウスの SCD1 の 5' 隣接領域-10 kb をクローニングし、順次 5' 側より欠失した変異体を Luc レポーター遺伝子に連結したコンストラクトをヒト肝臓癌細胞株 HepG2 細胞に導入してプロモーター活性を測定した。本検討により、5' 隣接領域-1.6 kb にエストロゲンに応答して転写抑制が検出される領域が存在することが明らかになった。更に、本領域中に LXR および CAR の認識配列である DR4 モチーフが認められるため、ER $\alpha$  と LXR あるいは CAR が相互作用して SCD1 の転写を調節する可能性を仮定した。

#### (4) ER $\alpha$ と LXR あるいは CAR の相互作用による遺伝子発現制御に関する検討

HepG2 細胞に ER $\alpha$  と LXR を過剰発現して内在性の SCD1 mRNA の遺伝子発現を検討した。SCD1 mRNA の発現は、LXR リガンド T0901317

により亢進したが、エストロゲンにより抑制された。SCD1-LUC レポーターを用いた解析により、SCD1 のプロモーター活性も同様に制御された。ER $\alpha$  と CAR を過剰発現する HepG2 細胞において、SCD1 遺伝子発現とプロモーター活性は、CAR リガンド TCPOBOP により亢進し、エストロゲン依存性に抑制された。以上より、エストロゲン/ER $\alpha$  経路は LXR あるいは CAR により増加する SCD1 遺伝子発現に拮抗することが明らかになった。

#### (5) ER $\alpha$ と LXR あるいは CAR の蛋白質相互作用に関する検討

ER $\alpha$  と LXR を過剰発現する HEK293 細胞を用いて、ER $\alpha$  と LXR あるいは CAR の蛋白質相互作用を検討した。免疫沈降法により、ER $\alpha$  と LXR が結合することを初めて証明した。同様に、ER $\alpha$  と CAR の弱い結合を確認した。

#### (6) まとめ

エストロゲンは ER $\alpha$  を介して肝中性脂肪含量を減少させるとともに、肝臓脂質合成酵素群の遺伝子発現を協調的に抑制することが明らかになった。SCD1 遺伝子発現は、LXR リガンドあるいは CAR リガンドにより増加し、これは ER $\alpha$  リガンドにより抑制されること、ER $\alpha$  が LXR あるいは CAR と蛋白質複合体を形成することが示唆された。以上より、エストロゲンにより活性化された ER $\alpha$  が LXR あるいは CAR に結合することにより、これらの受容体により誘導される SCD1 遺伝子発現を抑制すると考えている。本研究の成果は、性差に基づく脂質代謝制御の分子基盤を明らかにするだけでなく、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) や肝硬変あるいは肝癌の前駆段階である肝脂肪蓄積 (脂肪肝) に対する全く新しい治療法を開発するための基礎的な知見となることが期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Yamamoto Y, Moore R, Flavell RA, Lu B, Negishi M. Nuclear receptor CAR represses TNF $\alpha$ -Induced cell death by interacting with the anti-apoptotic GADD45B. (2010) PLoS One 5, e10121. (査読あり)

Yamamoto Y, Negishi M. (2008) The anti-apoptotic factor GADD45B regulates the nuclear receptor CAR-mediated transcription. Drug Metab Dispos. 36, 1189-1193. (査読あり)

Yamada H, Yoshida M, Nakano Y, Suganami T, Satoh N, Mita T, Azuma K, Itoh M, Yamamoto Y, Kamei Y, Horie M, Watada H, Ogawa Y. (2008) In vivo and in vitro inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and endothelial adhesion molecules by eicosapentaenoic acid. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 28, 2173-2179. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

○Yukio Yamamoto, Masahiko Negishi  
「核内受容体 CAR の活性化は肝臓癌を誘発する」  
第 145 回日本獣医学会 2008 年 3 月 28 日-30 日 麻布大学

○Yukio Yamamoto, Rick Moore, Frank Gonzalez, Kenneth Korach, Masahiko Negishi  
「Estrogen Receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) の活性化は肝内胆汁うっ滞を引き起こす」  
第 31 回日本分子生物学会 2008 年 12 月 9 日-12 日 神戸ポートアイランド

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 幸男（東京医科歯科大学・難治疾患研  
究所・特任講師）

研究者番号：40321707

### (2) 研究分担者

亀井 康富（東京医科歯科大学・難治疾患研  
究所・准教授）

研究者番号：70300829

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：