

【11】

氏 名	しの はら やす たけ 篠 原 安 武
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第842号
学位授与の日付	令和5年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (内科学（内分泌代謝）)
学位論文題目	Transcription of cytochrome P450 46A1 in NIH3T3 cells is negatively regulated by FBS (NIH3T3細胞におけるシトクロムP450 46A1の転写はFBSにより負の制御をされる)
論文審査委員	(主査) 教授 藤 田 朋 恵 (副査) 教授 徳 田 信 子 教授 小 飼 貴 彦

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

これまで我々は、Phosphoethanolamine (PE) 合成の律速酵素 ET (CTP: ホスホエタノールアミン・シチジリルトランスフェラーゼ (Pcyt2)) やコレステロール合成の律速酵素HMG-CoAレダクターゼ (Hmgcr) の転写、酵素タンパク量や酵素活性が細胞培養液中のFetal Bovine Serum (FBS) や、FBSに含まれる25-ヒドロキシコレステロール (25-HC) などのオキシステロールの添加により抑制される事を見出し報告してきた。細胞内オキシステロールは細胞の種々の酵素によりコレステロールから合成されるため、我々は内因性の25-HCなどのオキシステロールの産生調節機構に興味を持ち研究を進めた。

生体に認められるオキシステロール産生酵素は、コレステロールを基質としてヒドロキシ基を付加することによる1回の酵素反応によりオキシステロールを産生する。これまでの研究から、数種類のオキシステロール産生酵素が知られており、①コレステロール 25-ヒドロキシラーゼ (Ch25h) は主に25-HCの産生に関与し、②Cytochrome P450 46A1 (Cyp46A1) は主に24-HCの産生に関与し、③Cytochrome P450 27A1 (Cyp27A1) は主に27-HCの産生に関与することが知られている。

【目 的】

本研究は主にNIH3T3細胞を用いて、細胞内オキシステロール産生調節機構を明らかにすることを目的とした。どのオキシステロール産生酵素が細胞に発現し、内因性オキシステロールの細胞内量に関与するのかを解析した。当研究は獨協医科大学生命倫理委員会の承認を得た。

【対象と方法】

NIH3T3細胞の培養液中のFBS濃度を変化させて培養し、Cyp46A1、Ch25h、Cyp27A1などのmRNA量の変化を調べた。また、細胞内や培養液中の種々のオキシステロール量（25-HC, 24-HC, 27-HC）などのFBS添加による影響をLC-MS/MSにより解析した。

さらに、Cyp46A1のmRNA量がFBS添加により低下したため、本研究ではCyp46A1の転写を抑制するFBS中の因子の同定も研究目的とした。FBSをBligh&Dyer法で脂質層と水層に分画し、水層をC18逆相カラムを用いたhigh performance liquid chromatography（HPLC）により分画した。その分画をNIH3T3の細胞培養液に加え培養し、Cyp46A1 mRNA発現量の変化を調べどの分画に転写抑制因子が存在するか解析をした。Cyp46A1の転写抑制作用を認めるFBS由来の分画をLC-MS/MSで解析し、転写抑制因子の同定を試みた。

【結 果】

細胞培養液中のFBS濃度を0.5%とし48時間NIH3T3細胞をスターブ状態で培養し、その後FBS濃度を0.5%もしくは10%FBSとし、さらに細胞を24時間培養すると、10%FBS培養では0.5%FBS培養に比較し細胞内のオキシステロール量は低下した。

この時コレステロール-d7を添加し、オキシステロール産生量を解析したが、この場合も10%FBS培養では0.5%FBS培養に比較し細胞内オキシステロール産生量は低下した。

24時間もしくは48時間0.5%FBSでNIH3T3細胞をスターブし、その後FBS濃度を0.5%もしくは10%に変化させて24時間培養すると、10%FBS培養では0.5%FBS培養に比べ有意にCyp46A1 mRNA量が低下した。NIH3T3細胞にはCh25hやCyp27A1の発現は認めなかった。

FBS中に存在するCyp46A1の転写抑制因子の同定を試みた。FBSをBligh&Dyer法で脂質層と水層に分画したところ、FBSの水層分画にCyp46A1の転写抑制作用が認められた。この転写抑制因子を同定するため、FBS水層をC18逆相カラムを用いたHPLCにより分画した結果、Fraction 23にCyp46A1の転写抑制作用が認められた。この抑制作用が認められた分画をLC-MS/MSで解析したところ、分画中にinsulin like growth factor II（IGF-II）が同定された。市販のインスリンや、IGF-II、IGF-IによりCyp46A1の転写が変化するか解析した結果、これらホルモンによりCyp46A1の転写が抑制され、細胞内オキシステロール量も低下した。また、コレステロール合成の律速酵素Hmgcrは、インスリンや、IGF-II、IGF-IによりmRNA量が増加した。

以上より、24-HC合成に関与するCyp46A1の転写がFBS、またFBS中のIGF-IIにより抑制され、細胞内オキシステロール量も調節を受けることが明らかになった。

【考 察】

NIH3T3細胞において、IGFsやインスリンによりCyp46A1は転写抑制を受けることが明らかになり、これらホルモン刺激により細胞内24-HC等のオキシステロール量が増加する可能性が示唆された。

IGF-IIとIGF-Iは共にインスリン受容体に結合することが報告されており、また、インスリンとIGF-Iは同じホルモンファミリーに属している。そのためIGF-IIと同様にIGF-Iとインスリンも

Cyp46A1の転写を抑制すると予想したが、予想通りIGF-Iおよびインスリンは、Cyp46A1 mRNA量を抑制した。

Cyp46A1は脳内のコレステロール代謝に関与することも知られており、今後は神経芽細胞腫由来であるNeuro2A細胞を用いた同様な実験を行いたいと考えている。

【結 論】

本研究では、NIH3T3細胞において、IGFsとインスリン添加はCyp46A1のmRNA量を低下させ、細胞内のオキシステロールレベルを制御している可能性が示唆された。

今後は、IGF-IIがこの細胞内オキシステロール濃度制御のための細胞内シグナル伝達プロセスにどのような変化をもたらすかをさらに研究していく予定である。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

24S-ヒドロキシコレステロール (24S-HC)、27-ヒドロキシコレステロール (27-HC)、25-ヒドロキシコレステロール (25-HC) などの側鎖型オキシステロール標品を細胞に添加すると、HMG-CoA還元酵素 (Hmgcr) およびCTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2) のmRNAレベルが抑制されることを見出している。オキシステロール種は、細胞内でコレステロールからcytochrome P450 46A1 (Cyp46A1) (24S-HCを産生)、Cyp27A1 (27-HCを産生)、Cyp3A11およびコレステロール25-ヒドロキシラーゼ (Ch25h) (25-HCを産生) によって酵素的に産生される。これらのオキシステロール産生酵素のうちどの酵素がNIH3T3細胞で発現しているかを解析した結果、Cyp46A1が発現していることを見出した。Cyp46A1をNIH3T3細胞で過剰発現させると、内在性オキシステロールは24S-HC > 25-HC > 27-HCの順で増加することを明らかにした。Cyp46A1によるNIH3T3細胞の内因性オキシステロール産生を制御する機構を検討したところ、mRNA量、相対タンパク量およびCyp46A1の酵素活性、酵素産物である24S-HC、25-HC、27-HCの量は、血清欠乏条件下で有意に増加し、これらの増加はFBS補充により抑制されることを見出している。Bligh & Dyer法で得られたFBSの水層はCyp46A1 mRNA量を有意に抑制した。HPLCにより水層を分画し、nanoLC-TripleTOF MS/MSにより阻害因子を有するHPLC画分を解析し、インスリン様因子-II (IGF-II) を見出した。血清飢餓状態のNIH3T3細胞に市販のIGFsおよびインスリンを添加するとCyp46A1 mRNA量は有意に抑制され、内因性オキシステロール量は減少した。また、神経細胞由来のヒトグリオブラストーマ細胞株T98GのCyp46A1 mRNA量は、血清飢餓により増加し、その増加はFBSやFBSのBligh & Dyer法で得られた水層画分の添加により抑制された。しかし、NIH3T3細胞と異なりIGFsおよびインスリンの添加により抑制を受けなかった。この結果は、T98G細胞のCyp46A1 mRNA量もFBS中の何らかの因子により制御されることを示唆するがNIH3T3細胞とは異なるため現在探索している。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、NIH3T3細胞の培養液中のFBS濃度を変化させて培養し、Cyp46A1を初めCh25h、Cyp27A1などの酵素のmRNA量の変化を調べた。また、Cyp46A1の転写を抑制するFBS中の因子の

同定方法に関しては、FBSをBligh&Dyer法で脂質層と水層に分画し、水層をC18逆相カラムを用いた high performance liquid chromatography (HPLC) により分画した。その分画をNIH3T3の細胞培養液に加え培養し、*Cyp46A1* mRNA発現量の変化を調べ、どの分画に転写抑制因子が存在するか解析した。*Cyp46A1*の転写抑制作用を認めるFBS由来のHPLC分画をnanoLC-MS/MSで解析し、転写抑制因子の同定を試みた。

サンプルサイズは過去の研究から適切に設定されており、結果として示された値は、3つの独立した培養皿から得られ、各実験を少なくとも3回繰り返しているため、結果の信頼性は高いと考える。

【研究結果の新奇性・独創性】

本研究では、FBS中のIGF-IIが*Cyp46A1*の転写を抑制することを見出し、IGF-IIばかりでなくIGF-IやインスリンもNIH3T3細胞における*Cyp46A1* mRNA量を抑制することを見出し、新奇性、独創性に優れていると評価する。

【結論の妥当性】

申請論文では、上述の通り、各実験を3回以上繰り返しており、得られた結果に対しては適切な統計解析を用いて評価をしている。導き出した結論はこれまでの先行研究結果と矛盾するものではなく、関連領域の知見も踏まえても妥当なものと判断できる。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、FBS中に存在するIGF-IIが*Cyp46A1*の転写抑制因子であることを見出し、IGF-IIばかりでなくIGF-IやインスリンもNIH3T3細胞の*Cyp46A1* mRNA量を抑制することを見出している。本研究で見出したFBS由来のIGF-I、IGF-II、インスリンは細胞の*Cyp46A1*のmRNA量を低下させることで細胞内のオキシステロール量を低下させ細胞内シグナル伝達を行う可能性を初めて示した。オキシステロールは糖代謝やアルツハイマー病への関与が示唆されることから、今後は病態解明や治療への応用として繋がる可能性もあり、非常に意義深い研究であると評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、FBS中に存在する細胞の*Cyp46A1*の転写を抑制する因子を同定し、酵素が産生するオキシステロールの生理活性や病態惹起に興味を持ち、その臨床応用にまで着目した。研究計画を立案し、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は、当該領域の国際誌へ掲載されており、申請者は十分な研究能力を有していると判断できる。

【学位授与の可否】

申請論文は、極めて質の高い研究内容を有しており、今後の当該分野における貢献度も高い。よって、博士（医学）学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids

(1867 : 159136, 2022)