

博士(医学) 本城 裕美子

### 論文題目

1,25-dihydroxyvitamin D3 and its receptor inhibit the chenodeoxycholic acid-dependent transactivation by farnesoid X receptor, FXR

(ビタミン D3 とそのレセプターはファルネソイド X レセプター、FXR、によるケノデオキシコール酸依存性のトランス活性化を阻害する)

### 論文の内容の要旨

[はじめに]

胆汁酸の腸-肝循環は食品中のレチノイン酸(RA)、ビタミン D3(D3)などの脂溶性ビタミンの吸収に必須であり、内服された甲状腺ホルモン(T3)、チアゾリジン(TZD)の吸収にも関与する。胆汁酸の腸肝循環の鍵分子である bile salt export pump (BSEP)、肝での胆汁酸生成過程に関わる転写因子 small heterodimer partner (SHP)ならびに回腸胆汁酸トランスポーター(I-BABP)遺伝子のプロモーター上にはファルネソイド応答配列(FXRE)が存在する。ファルネソイド X 受容体(FXR)は FXRE 上でレチノイド X 受容体(RXR)とヘテロダイマーを形成しており、ケノデオキシコール酸(CDCA)をはじめとする胆汁酸が結合するとこれら標的遺伝子の転写を活性化する。RA、D3、T3、TZD などの受容体もまた FXR と同じ核受容体ファミリーに属することから、私達はこれらリガンドと受容体が、CDCA 結合した FXR(CDCA/FXR)による転写活性化に与える影響につき検討した。

[材料ならびに方法]

BSEP、I-BABP、SHP のプロモーターをもつルシフェラーゼ遺伝子(BSEP-Luc、I-BABP-Luc、SHP-Luc)、またエクダイソン応答配列由来の典型的 FXRE をチミンキナーゼプロモーターに結合した人工的レポーター遺伝子(EcRE-Luc)を FXR ならびに各種核受容体の発現プラスミドとともに CV1 細胞へコトランスフェクションし、CDCA 刺激下での各リガンドの影響を調べた。また VDR の欠失変異体を作成し同様の検討を行った。肝由来 HepG2 細胞を用いて内因性 BSEP 及び SHP の発現を、また腸管由来 Caco-2 細胞を用いて内因性 I-BABP の発現を real time RT-PCR により検討した。in vitro において FXR と各種核受容体の相互作用をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)によるプルダウン法を用い解析した。

[結果]

BSEP-Luc、I-BABP-Luc、SHP-Luc を FXR 及び各種核受容体の発現プラスミドとともに CV1 細胞へコトランスフェクションした上で、CDCA 刺激下での種々のリガンドの影響を調べた。その結果、D3 存在下でその受容体(VDR)は各 BSEP、I-BABP、SHP のプロモーター活性を約 20-30%にまで抑制した。エンハンサーとして人工的な FXRE のみを有する EcRE-Luc でも同様の結果が得られた。類似の抑制は BSEP-Luc において T3 結合した甲状腺ホルモン受容体(T3 receptor, TR) T3/TR でも認められたが、RA および TZD では観察されなかった。VDR の欠失変異体による解析では、抑制にはそのリガンド結合領域(LBD)のみで十分であった。HepG2 細胞に FXR 及び BSEP-Luc のみをトランスフェクションしたところ、CDCA/FXR による BSEP-Luc の活性化は D3 の添加により抑制された。real time RT-PCR により HepG2 細胞を用いて BSEP 及び SHP の発現を、また Caco-2 細胞を用いて I-BABP の発現を検討すると、CDCA による発現増強は D3 によって抑制された。GST pull-down では FXR との選択的な相互作用が VDR と軽度ながら TR との間に認めら

れた。

[考察]

今回、D3/VDR 及び部分的に T3/TR により CDCA/FXR の転写活性化が抑制されることを示した。D3/VDR による抑制は典型的な FXRE(EcRE-Luc)においても観察され、CDCA/FXR の転写機構に直接影響しているものと推察された。この抑制のメカニズムとして以下の可能性が考えられる。

(1) 複数の核受容体が類似の DNA 配列を相互に認識しあうこと(redundancy)が知られており、FXR の DNA 結合を VDR が競合的に阻害する可能性がある。しかし、私達の系では抑制には VDR-LBD のみで十分であり、DNA 結合を介する機序は否定的であった。(2) D3/VDR が FXR による転写活性化に関わる共通のコアクチベーターを抑制している可能性がある。しかしその場合、D3/VDR や T3/TR で選択的に抑制を生じる機序が説明できない。事実、私達の検討では種々のコアクチベーターを過剰発現しても D3/VDR の転写抑制作用は解除されなかった。(3) 抑制には VDR の LBD で十分であり、また GST プルダウン法において FXR は VDR-LBD と相互作用することからこの相互作用が重要であると推定された。ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体  $\alpha$  による転写活性化においても VDR-LBD による抑制が報告されており、関連性が示唆された。

胆汁と D3 の前駆物質はどちらも肝においてコレステロールから生成される。コレステロールからの胆汁酸合成における律速酵素は cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase(CYP7A1)であり、その発現は転写因子 SHP によって強く抑制されている。D3 が SHP の発現を減弱することは CYP7A1 の抑制を解除し、その結果コレステロールを胆汁酸として消費することで D3 合成を低下させると考えられた。また D3/VDR は BSEP と IBABP の発現を抑制することで D3 を含む脂溶性物質の腸管からの吸収を阻害すると考えられる。従って D3 がそれ自身の生体内レベルを低下させるような制御機構の存在が示唆された。今回は腸-肝循環を介するフィードバックを除外する目的で培養細胞を使用した。今後は VDR 欠失マウスなどで生理的意義を追求する必要がある。

VDR の遺伝的多型性が自己免疫疾患である原発性胆汁性肝硬変(PBC)において報告されている。これは VDR 遺伝子の mRNA の安定性に関与する。従来はこのような VDR 発現量の変化が免疫応答に影響することで PBC の病因に関わると想定されてきたが、今回の結果は VDR の発現レベルの差が直接胆汁酸の代謝に影響し、PBC の病態を修飾している可能性を示唆した。

[結論]

CDCA/FXR を介する BSEP、I-BABP、SHP の転写活性化を D3/VDR は阻害し、胆汁酸の腸肝循環を制御していると考えられた。またこのような D3/VDR の作用が生体内 D3 レベルの恒常性維持や PBC の病態に関与している可能性が推定された。

### 論文審査の結果の要旨

胆汁酸の腸肝循環に関わる分子には、肝細胞から毛細胆管への分泌に関わる bile salt export pump (BSEP)、回腸で胆汁酸の吸収に関わる胆汁酸トランスポーター(I-BABP)、そして、コレステロールから胆汁酸を生合成する律速酵素 Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A)の転写を阻害する small heterodimer partner (SHP)などがある。胆汁酸はコール酸、ケノデオキシコール酸(CDCA)、デオキシコール酸からなるが、最も親和性の強い CDCA がその受容体である Farnesoid X receptor (FXR)と複合体を形成すると、SHP, BAEP, I-BABP 遺伝子のプロモーター上にある FXR 反応性エ

レメント(FXRE)に結合して、これら遺伝子の転写を活性化する。つまり、CDCA/FXRはSHPを介して胆汁酸合成を阻害し、BSEP, I-BABPを介して胆汁酸の腸肝循環を促進する。

申請者は、FXRと同じくretinoid X receptor (RXR)とヘテロダイマーを形成する5つの核内受容体、RAR $\alpha$ , TR $\alpha$ 1, VDR, PPAR $\alpha$ 2, LXR $\alpha$ とそのリガンド、RA, T3, VD3, TZD, 22(R)HCがCDCA/FXRに対してどういう作用をするかについてルシフェラーゼリポーター遺伝子を用いた培養細胞への共遺伝子導入で検討した。最も大きく安定した作用が検出できたのはVD3/VDRで、それはCDCA/FXRによるBSEP, SHP, I-BABPプロモーターの活性化を著しく阻害した。次に、申請者は内因性のFXRを介したCDCAによるBSEP, AHP, I-BABP mRNAの増加に対して、VD3を添加すると内因性VDRの作用によりmRNAの増加が抑制されることも示した。また、VD3/VDRによるCDCA/FXRの阻害様式は、VDRのリガンド結合部位だけでおこり、DNA結合部位は必要ないことも明らかにした。

本論文は、VD3/VDRとCDCA/FXRが生体内で相互作用をしている可能性を初めて示した論文であり、腸管におけるCa<sup>2+</sup>吸収と脂質吸収についての洞察を与える内容を高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 三浦 直行  
副査 今野 弘之 副査 中川 祐一