

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 濱田 淳平

論 文 名 THP-1 ヒト単球細胞においてツニカマイシン誘発小胞体ストレスは PERK-ATF4-CHOP 経路を介してレジスチン mRNA を増加させる

---

### 学位論文要旨

#### 【背景・目的】

レジスチンは、マウスでは主に脂肪細胞より分泌され、インスリン抵抗性を惹起するサイトカインである。一方、ヒトにおいては、レジスチン遺伝子は主に単球やマクロファージで発現し、マウスとヒトでは病態生理学的な意義が異なる可能性がある。

近年、3T3-L1 マウス脂肪細胞において、ツニカマイシンは小胞体ストレスを誘発し、レジスチン遺伝子発現を減少させることが報告された。

本研究では、ヒト単球細胞における、小胞体ストレスのレジスチン遺伝子発現に対する影響を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法】

はじめに、健康若年成人 30 人の末梢血より単離した単球を用いて、レジスチン mRNA と小胞体ストレスマーカー mRNA との関連を RT-PCR により解析した。

次に、THP-1 ヒト単球細胞を lipopolysaccharides (LPS、100ng/ml、24 時間) で刺激し、レジスチンおよび小胞体ストレスマーカーの mRNA を解析した。さらに、THP-1 細胞を用いて、小胞体ストレスとレジスチン mRNA について検討した。小胞体ストレス誘発剤であるツニカマイシンの濃度(0、0.01、0.1、1.0  $\mu$ g/ml)、時間(0、4、8、12、24、48、72 時間)によるレジスチン mRNA への影響を解析した。次に、小胞体ストレスを緩和するケミカルシャペロンの 4-フェニル酪酸(4-PBA)を前処置(0.75、1.5、3.0 or 7.5 mM、14 時間)し、ツニカマイシン(0.1  $\mu$ g/ml、24 時間)によるレジスチン mRNA への影響に対する 4-PBA の効果を解析した。

さらに、siRNA を用いた小胞体ストレス応答(unfolded protein response、UPR)に関連する分子(PERK、ATF4、CHOP、ATF6、IRE1、XBP1)のノックダウン、およびプラスミド cDNA を用いた

氏名 濱田 淳平

UPR 関連分子 (ATF4、CHOP) の過剰発現による解析により、小胞体ストレスからレジスチン mRNA に至るシグナル経路を解析した。

最後に、培養液中に分泌されたレジスチン蛋白を超高感度 ELISA により定量した。

#### 【結果と考察】

健康若年成人の単球において、レジスチン mRNA と小胞体ストレスマーカーである BiP、CHOP の mRNA は正に相関した (BiP:R=0.45、CHOP:R=0.42、 $p<0.05$ )。

THP-1 細胞において、LPS 刺激により小胞体ストレスマーカーの BiP mRNA は 1.3 倍、PERK mRNA は 1.3 倍、CHOP mRNA は 1.3 倍に、レジスチン mRNA は 1.5 倍に増加した ( $p<0.0005$ )。以上より、小胞体ストレスはレジスチン遺伝子発現と正に関連することが示唆された。

THP-1 細胞をツニカマイシンで処理することにより、レジスチン mRNA は時間および濃度依存性に増加し、ツニカマイシン濃度  $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、投与後 24 時間で最大となり、対照の 2.0 倍となった ( $p<0.01$ )。その際、小胞体ストレスマーカー (BiP、PERK、ATF4、CHOP、IRE1、XBP1) mRNA も対照に比して増加した。4-PBA の前処置により、小胞体ストレスマーカー (BiP、PERK、ATF4、CHOP、ATF6、IRE1、XBP1) mRNA は低下した。ツニカマイシン処理 ( $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、24 時間) で増加したレジスチン mRNA は、最大値 (対照の 3.3 倍) から対照の 2.4 倍まで 4-PBA 濃度依存性に抑制された ( $p<0.05$ )。以上より、ツニカマイシンは、小胞体ストレスを介して、レジスチン遺伝子発現を増強している可能性が考えられた。

UPR に関連する 3 つの主要経路のうち、はじめに PERK-ATF4-CHOP 経路を解析した。siRNA による PERK の発現抑制により、ツニカマイシン処理で対照の 2.1 倍に増加したレジスチン mRNA は 18.8% が抑制された ( $p<0.05$ )。同様に、ATF4 の発現抑制により、対照の 1.7 倍に増加したレジスチン mRNA は 32.3% が抑制され、CHOP の発現抑制により、対照の 1.4 倍に増加したレジスチン mRNA は 27.1% が抑制された ( $p<0.01$ )。次に、他の 2 つの経路 (ATF6 経路、IRE1-XBP1 経路) を解析したが、各々の発現を抑制してもレジスチン mRNA は抑制されなかった。また、プラスミド cDNA を THP-1 細胞に導入し、ATF4、CHOP を過剰発現したところ、レジスチン mRNA は各々対照の 1.5 倍、1.3 倍に増加した ( $p<0.01$ )。以上より、PERK-ATF4-CHOP 経路が、ツニカマイシンによるレジスチン mRNA 増加に至る主要経路であると考えられた。

なお、培養液中に分泌されたレジスチン蛋白は、ツニカマイシン処理により逆に低下した。同様のレジスチン mRNA と分泌蛋白の乖離は、U937 ヒト単球細胞でも報告されている。

#### 【結論】

THP-1 ヒト単球細胞において、ツニカマイシン誘発小胞体ストレスは、PERK-ATF4-CHOP 経路を介してレジスチン mRNA を増加させる。

キーワード (3~5)	レジスチン 小胞体ストレス 炎症 THP-1細胞
-------------	-----------------------------------