

学位論文審査結果の要旨

氏 名	濱田 淳平
審 査 委 員	主査 鳥居 本美 副査 堀内 正嗣 副査 大蔵 隆文 副査 古川 慎哉 副査 越智 博文

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

審査結果の要旨

【研究内容のまとめ】 レジスチンは、マウスでは主に脂肪細胞により分泌されインシュリン抵抗性を惹起するサイトカインであるが、ヒトではレジスチン mRNA が主に単球やマクロファージで発現することが判明している。申請者は、ヒト単球細胞において小胞体ストレスがレジスチン mRNA 発現に及ぼす影響を解明することを目的に本研究を実施した。

始めに、健康若年成人（30人）の末梢血から単離した単球を用い、レジスチン mRNA 発現と小胞体ストレスマーカー（BiP, CHOP）の mRNA 発現を RT-PCR 法により測定し、これらが正の相関を示すことを明らかにした。

そこで、THP-1 ヒト単球細胞を用いた培養系を用いて、小胞体ストレスとレジスチン発現の関連性について検討を行い、以下の点を明らかにした。1) LPS 刺激した THP-1 細胞において、小胞体ストレスマーカーである BiP、PERK、CHOP と共にレジスチンの mRNA 発現量の増加を認めた。2) THP-1 細胞に小胞体ストレス誘発剤のツニカマイシン処理を行ったところ、濃度依存性にレジスチン mRNA 発現の増加が認められた。また、これらの細胞の小胞体ストレスマーカーのうち、BiP、PERK、ATF4、CHOP、IRE1、XBP1 の mRNA 発現の有意な増加が認められたが、ATF6 の mRNA 発現には変化がなかった。ツニカマイシン処理前にケミカルシャペロンである 4-フェニル酪酸（4-PBA）添加を行うと、上記の増加

した各ストレスマーカーmRNAの増加量は4-PBA添加量依存性に低下した。3) 小胞体ストレス応答に関連する分子(PERK、ATF4、CHOP、ATF6、IRE1、XBP1)のsiRNAによるノックダウンを行ってレジスチンmRNA量を測定したところ、PERK、ATF4、CHOPの発現抑制細胞ではツニカマイシン処理によるレジスチンmRNA上昇の抑制が認められた一方で、ATF6、IRE1、XBP1の発現抑制細胞ではレジスチンmRNA発現に変化が認められなかった。また、THP-1細胞にATF4、CHOPを過剰発現させると、レジスチンmRNAの増加が認められた。4) レジスチンタンパク質量を好感度ELISA法により測定したところ、ツニカマイシン処理によってTHP-1細胞内のレジスチンのタンパク質量は増加したが、培養上清への分泌量は減少していた。

以上の結果から、申請者は、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、小胞体ストレス応答に関連する主要な3経路のうちPERK-ATF4-CHOP経路を介してレジスチンmRNAを増加させるとの結論を導きだした。

本論文に対する公開審査会は平成27年2月6日に開催された。申請者から研究内容が口頭発表された後に、審査委員から本研究に関連する以下の質問がなされた。

1) 健康若年成人対象の解析において、単球のレジスチン、BiP、CHOPのmRNA発現量を見ているが、これらの値と血糖値、BMIなどとの関連はあったのか。食事前後で単球のレジスチン、BiP、CHOP値に変動はないのか。また、単球のBiPおよびCHOPのmRNA発現にかなりの個体差がみられる理由は何か。2) THP-1細胞にLPS刺激を行った意図を説明して欲しい。3) レジスチンのタンパク質が新規に合成されたものであることを示すためにアイソトープラベル実験は行ったか。4) PERK, ATF4, CHOPのタンパク質レベルの発現を検討したのか。5) ツニカマイシン処理後にレジスチンmRNAの発現は亢進するのに分泌タンパク質の上昇が少ない理由として、ツニカマイシンによってN-グリコシル化が抑制されるため分泌が阻害されて細胞内に留まることで説明できないのか。また、グリコシル化の障害以外にアポトーシスの関与は考えられないのか。6) ツニカマイシン以外で小胞体ストレス刺激を行った場合にどのような結果が予測されるのか。7) ヒトにおけるレジスチン蛋白受容体の発現分布はどこまで明らかになっているか。8) 糖尿病患者におけるBiPやCHOPの疫学データはあるのか。9) メタボリックシンドロームや糖尿病などの病態と小胞体ストレスとの関連はどうか。10) ヒト糖尿病患者における血漿レジスチン濃度はどうなっているか。レジスチン遺伝子多型の存在を踏まえた報告はあるのか。本研究結果とレジスチン遺伝子多型はどう関連するのか。11) 小児のインスリン抵抗性は成人のものに比べてレジスチンとの関連はより密接なのか。12) 1型糖尿病と2型糖尿病それぞれの病態において本研究で示された結果の意義はどのように考えられるのか。

これらに対して申請者は、質問の意図を十分に理解した上で、詳細かつ明解に応答した。本論文は、いまだ知見の限られているヒト単球細胞におけるレジスチン発現の機序を小胞体ストレスに着目して解析したもので、糖尿病発症機序の基礎研究として有用な知見を含んでおり、今後の研究の発展が期待される。審査委員は一致して本論文を高く評価し、博士(医学)の学位論文に値するものと結論した。