

氏名(本籍)	こ しま たか ゆき 小 島 貴 之 (茨 城 県)
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	博 甲 第 5546 号
学位授与年月日	平成 22 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Studies on Molecular Mechanisms of Transcription Factor FoxO in Apoptosis and Proliferation of Mouse 3T3-L1 Adipocyte (マウス 3T3-L1 脂肪細胞のアポトーシスおよび細胞増殖に関わる転写因子 FoxO の作用メカニズムの研究)
主 査	筑波大学准教授 理学博士 坂 本 和 一
副 査	筑波大学教授 理学博士 林 純 一
副 査	筑波大学教授 理学博士 沼 田 治
副 査	筑波大学教授 農学博士 宮 崎 均

論 文 の 内 容 の 要 旨

糖尿病、高血圧、高脂血症などのいわゆる生活習慣病の発症には、白色脂肪細胞の過剰な増加が関与している。白色脂肪細胞はエネルギーの貯蔵器官およびアディポサイトカインの内分泌器官として機能するが、過剰なエネルギー摂取による増殖・肥大化は脂肪組織の増大とアディポサイトカインの分泌バランスの破綻を招き、肥満や代謝疾患の原因となる。従って、白色脂肪細胞の過剰な増加および肥大化の抑制は、生活習慣病の予防や治療に極めて有効である。

アポトーシスは、生体内で不要になった細胞を除去する生体機構の一つで、酸化ストレスなどの物理化学的ストレスや FasL などの生理的リガンドにより誘導される。近年、物理化学的ストレスによるアポトーシスや細胞増殖の抑制に転写因子 FoxO の関与が報告されている。FoxO は、インスリンシグナル経路の制御を受け生存シグナルにより不活化されるが、様々な刺激により活性化されて、ストレス応答、代謝、寿命など生体内の様々な生理作用に関与することが知られている。

本研究は、脂肪細胞の増殖と細胞死における FoxO の生理的役割に着目し、FoxO を介した酸化ストレス誘導性のアポトーシスと細胞増殖抑制の作用メカニズムを明らかにした。

まず、脂肪細胞への分化能を持つマウス 3T3-L1 細胞を用いて、酸化ストレスによるアポトーシスの誘導実験を行った。DMI 法により 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化を誘導し、H₂O₂ 発生源である Glucose Oxidase (GOD) で 6 時間処理したところ、DNA の酸化ストレス障害の指標である 8-OHdG の蓄積が増加し、アポトーシス細胞の増加により細胞の生存率が低下した。この際、DMI 未処理の細胞に比べ、DMI で処理した細胞ではアポトーシス誘導効率が著しく抑制された。従って、3T3-L1 細胞は脂肪細胞への分化に伴い、酸化ストレスに対する耐性を獲得することが示唆された。RT-PCR 法を用いて mRNA の発現量を解析したところ、GOD 処理により FoxO3a の発現と、アポトーシス調節遺伝子 Bad, Bax, Bim の発現が増加した。アデノウィルスを用いて RNAi を導入したところ、FoxO3a の RNAi により酸化ストレス誘導性のアポトーシスが抑制され、同時に Bim の発現増加も抑制された。従って、3T3-L1 細胞において、酸化ストレス刺激は FoxO3a を

介して Bim の発現を誘導し、アポトーシスを誘導することが明らかになった。

さらに、活性酸素の除去に関わる抗酸化ストレス遺伝子に着目し、3T3-L1 細胞の分化に伴う MnSOD, Cu/ZnSOD, Catalase および GPX1 の発現変化を解析した。その結果、全ての抗酸化ストレス遺伝子および FoxO1 の発現量が脂肪細胞の分化に伴い著しく増加した。さらに、GOD 刺激により FoxO1 の発現を誘導したところ、MnSOD と GPX1 が同様に増加し、これは FoxO1 の RNAi により顕著に抑制された。

以上の結果から、3T3-L1 細胞が脂肪細胞への分化に伴い獲得する酸化ストレス耐性は、MnSOD, Cu/ZnSOD, Catalase, GPX1 の増加が原因であり、特に MnSOD と GPX1 は FoxO1 の制御を受けるとことが明らかになった。

次に、漢方薬を用いて 3T3-L1 細胞の細胞増殖に対する生理作用解析を行った。漢方薬はポリフェノール類など種々の生理機能分子を多く含み、脂質代謝や細胞増殖に関わることが知られている。そこで、八味地黄丸と補中益気湯を用い、細胞周期への作用効果と FoxO の関わりを明らかにした。DMI 未処理の 3T3-L1 細胞を種々の漢方薬 (500 μ g/ml) 存在下で賠償したところ、八味地黄丸または補中益気湯により細胞増殖が顕著に抑制された。この際、細胞生存率への影響はなかったが、S 期の細胞の割合が約 2 倍に増加した。さらに、漢方薬により FoxO1 と p21 の発現増加が観察された。以上の結果から、八味地黄丸および補中益気湯は FoxO1 と p21 を介して細胞周期の制御 (S 期停止) に関わることが示唆された。

本研究により、脂肪細胞の酸化ストレスおよび分化誘導に伴うアポトーシスに対する FoxO の生理機能と作用機序が明らかになった。これらの結果は、動物における肥満や脂質代謝の基礎的メカニズムの解明に新たな知見をもたらしたばかりでなく、ヒトの肥満症や脂質代謝疾患の予防・改善薬や治療法の開発に向けた応用研究への道を切り開いたもので、社会的にも極めて重要な意義をもつ。

審査の結果の要旨

近年、食生活や社会環境の変化と共に、肥満症に関連した生活習慣病の増加が極めて大きな社会問題となりつつあり、肥満解消の基本的な分子メカニズムの解明が急がれている。これまで、転写因子 FoxO サブファミリーが細胞死に関わることが知られていたが、脂肪細胞のアポトーシスや細胞増殖との関連についてはほとんど知られていなかった。本研究は、酸化ストレス刺激による脂肪細胞のアポトーシスに FoxO3a が中心的な役割をもつこと、さらに、脂肪細胞が FoxO1 を介して分化に伴う酸化ストレス耐性を獲得することを明らかにしたもので、これまで未知であった脂肪細胞のアポトーシスに対する FoxO の作用と作用機序を世界で始めて明らかにした。さらに、特定の漢方薬が FoxO1 と p21 を介して脂肪細胞の細胞増殖の抑制 (S 期停止) に関わる可能性があることも明らかにした。

これらの発見は、脂肪細胞の細胞数の維持に関わる基本的分子機構の解明という学術的な意義があるばかりでなく、肥満症とそれに関連した様々な生活習慣病の治療や予防に向けた応用研究を推進するもので、社会的にも極めて重要な意義をもつ研究であると言える。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。