

審査の結果の要旨

氏名 山口 潔

本研究は、膵β細胞における小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおける、細胞内情報伝達経路の一つである MAP キナーゼ経路、特に ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) を介した経路の関与を検討したものである。

膵β細胞の小胞体ストレス誘導性アポトーシスが糖尿病の発症機序とされる糖尿病モデルマウスの Akita マウス、ASK1 ノックアウトマウスを用いた *in vivo* の実験、マウスインスリン分泌細胞株である MIN6 細胞、また Akita マウスの糖尿病発症の原因遺伝子である変異型 Insulin2 遺伝子を挿入したアデノウイルスベクターを用いた *in vitro* の実験により、以下の結果を得た。

1. まず、Akita ($Ins2^{C96Y/WT}$) マウスと ASK1 ノックアウト ($ASK1^{-/-}$) マウスの交配実験を行い、 $Ins2^{C96Y/WT} ASK1^{-/-}$ マウスを作製した。 $Ins2^{C96Y/WT} ASK1^{-/-}$ マウスの血糖値は、対照とした同週齢の Akita マウスと比較して上昇が抑えられ、糖尿病の発症が 1 週間程度遅くなることがわかった。つまり、Akita マウスの糖尿病発症において ASK1 は必要であることが示唆された。

2. 生後 4 週齢、6 週齢において膵インスリン量を比較したところ、Akita マウスで観察される膵インスリン量の減少が、 $Ins2^{C96Y/WT} ASK1^{-/-}$ マウスにおいて抑えられた。Akita マウスの膵組織においては生後 6 週より TUNEL 陽性細胞を認めるが、 $Ins2^{C96Y/WT} ASK1^{-/-}$ マウスでは陽性細胞数の減少を認めた。以上より、ASK1 をノックアウトすることで膵β細胞のアポトーシスが抑えられることが、糖尿病発症が遅れる原因の一つであることが示唆された。

3. 次に、MIN6 にアデノウイルス法により変異型 Insulin2 を発現させたところ、ASK1、JNK、p38 の活性化ならびにアポトーシスの亢進が認められた。アポトーシスは、ヒストン - DNA 断片複合体量および Caspase-3 活性の測定において、p38 阻害剤である SB203580 の投与により部分的に抑制された。

4. 変異型 Insulin2 を MIN6 細胞に発現させると CHOP の誘導とともに、CHOP により誘導されることが知られた分子である Carbonic Anhydrase 6 , stress inducible form (CA6) の誘導が認められる。p38 阻害剤の投与により CHOP の

誘導には変化はなく、CA6 の誘導のみが抑えられた。

5. MIN6 細胞に小胞体ストレス誘導体として知られる Thapsigargin または Tunicamycin を投与したところ、p38 の活性化、CHOP の誘導が認められた。そこにさらに p38 阻害剤を投与したところ、アポトーシスの抑制を認めた。以上より膵β細胞の小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおいて p38 の活性化が必要であることが示唆された。

6. MIN6 細胞に小胞体ストレス誘導体として知られる Thapsigargin または Tunicamycin を投与したところ、CHOP の誘導とともに CA6 の誘導を認めるが、CA6 の誘導は p38 阻害薬の投与により抑えられた。また、Tunicamycin を投与したところ、CHOP により誘導されることが知られる tribbles-related protein 3 (TRB3) の誘導が認められたが、その誘導は p38 阻害剤の投与により抑えられた。さらに、ASK1^{-/-}マウス由来の線維芽細胞(MEF)に Thapsigargin を投与したところ、野生型マウス由来 MEF と比較し、CA6 の誘導は低下した。以上より、p38 の活性化によりアポトーシスが誘導されるメカニズムにおいて、p38 の活性化による CHOP の転写活性化能の亢進が関与していることが示唆された。

以上、本論文は、MAP キナーゼシグナル伝達経路の一つである ASK1-p38 経路が、膵β細胞における小胞体ストレス誘導性アポトーシスならびにその結果引き起こされる糖尿病の発症に関与することを明らかにした。さらに、小胞体ストレスによる ASK1-p38 経路の活性化は、転写因子 CHOP の転写活性化能を亢進させることを明らかにした。

本論文は、膵β細胞の小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおける、これまで知られていなかった新たなシグナル伝達経路を解明し、今後の糖尿病治療における分子標治療の研究・開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。