

氏 名	安田 真子
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第716号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成26年 9月10日
学位論文題目	Fatty acids are novel nutrient factors to regulate mTORC1 lysosomal localization and apoptosis in podocytes (脂肪酸は mTORC1 のリソソームへの移行を介した活性化およびポドサイトのアポトーシスを制御する)
審査委員	主査 教授 扇田 久和 副査 教授 後藤 敏 副査 教授 平田 多佳子

論文内容要旨

※整理番号	722	(ふりがな) 氏名	やすだ まこ 安田 真子
学位論文題目	Fatty acids are novel nutrient factors to regulate mTORC1 lysosomal localization and apoptosis in podocytes 脂肪酸は mTORC1 のリソソームへの移行を介した活性化およびポドサイトのアポトーシスを制御する。		
<p>【目的】糖尿病性腎症（腎症）の主体は蛋白尿を伴う糸球体病変で、糸球体上皮細胞（ポドサイト）障害が腎症発症の成因の一つと考えられている。ポドサイトは分裂能を有さない終末分化細胞であり、アポトーシスによる細胞数の減少が蛋白尿の増悪をもたらすが、糖尿病におけるポドサイト障害の機序は十分に解明されていない。糖尿病状態では血清脂肪酸濃度の上昇がおり、これは高血糖と同様に臓器障害の原因となりうる事が報告されている。血清の脂肪酸は、飽和脂肪酸、一価不飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸の3種類に大別されるが、2型糖尿病患者の血清では飽和脂肪酸分画の増加が認められている。このような血清脂肪酸分画の変化や脂肪酸濃度上昇が、臓器障害を引き起こす病態に関わっている可能性が報告されているが、糖尿病におけるポドサイト障害に対する影響と病態との関連は未だ不明である。また、細胞内栄養シグナルの一つである mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)の過剰な活性化が腎症におけるポドサイト障害に関連し、活性亢進の抑制が腎症の発症進展抑制につながる事が報告されている。しかし、糖尿病における mTORC1 活性化機構も不明である。そこで本研究では、脂肪酸種の違いがポドサイト障害に及ぼす影響およびその分子機構への mTORC1 活性化の関与を培養ポドサイトを用いて検討した。</p> <p>【方法】終末分化細胞であるポドサイトは分裂能を有さないため、培養実験では温度感受性遺伝子を導入した不死化培養ポドサイトが用いられることが多い。本研究においてもこの細胞を用いて、培養温度 33℃で増殖させ、37℃で7日以上分化させた細胞を用いて実験を行った。</p> <p>①各種脂肪酸が培養ポドサイトのアポトーシスに及ぼす影響の検討：培養ポドサイトに飽和脂肪酸：パルミチン酸、一価不飽和脂肪酸：オレイン酸、多価不飽和脂肪酸：エイコサペンタエン酸（EPA）を孵置し、アポトーシスを Western Blot 法による切断化 Caspase-3 および切断化 PARP の蛋白量定量および TUNEL 染色により評価した。</p> <p>②各種脂肪酸が培養ポドサイトの mTORC1 活性に及ぼす影響およびアポトーシスとの関連の検討：培養ポドサイトにパルミチン酸、オレイン酸、EPA を孵置し、mTORC1 の活性を Western Blot 法による P70S6K および S6 蛋白のリン酸化蛋白量定量により評価した。さらに mTORC1 選択的阻害薬である Rapamycin の共孵置および mTORC1 構成蛋白である Raptor の RNA 干渉法を用いた発現抑制を行い、mTORC1 活性の抑制がパルミチン酸によるアポトーシスに及ぼす影響を検討した。</p> <p>③各種脂肪酸が培養ポドサイトの ER ストレスに及ぼす影響および mTORC1 活性化を介したアポトーシス誘導との関連の検討：培養ポドサイトにパルミチン酸、オレイン酸、EPA を孵</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

置し、ER ストレスを Western Blot 法による CHOP の発現および PERK のリン酸化蛋白量の定量、および CHOP の免疫蛍光染色により評価した。また、RNA 干渉法を用いた CHOP の発現抑制により ER ストレスとアポトーシスの関連を検討した。さらに Rapamycin の共孵置および Raptor の発現抑制を行い、mTORC1 の活性抑制がパルミチン酸による ER ストレスに及ぼす影響を検討した。

④脂肪酸による mTORC1 活性化の機序の検討：培養ポドサイトにパルミチン酸孵置を行い、mTORC1 を活性化する Akt および AMPK 経路の活性化を Western Blot 法を用いて Akt および AMPK のリン酸化により検討した。さらに mTORC1 はリソソーム膜上に存在する低分子量 G タンパク質 (Rheb) により活性化されているため、その活性は mTORC1 の細胞質からリソソーム膜への移行により調節される。そこで、mTORC1 ならびにリソソーム膜に存在する Lamp2 蛋白に対する 2 重蛍光染色にて mTORC1 の移行を検討した。

⑤ヒト胎児由来腎臓細胞 (HEK293 細胞) を用いた同様の検討：培養ポドサイトの実験から得られた結果がポドサイト特異的か非特異的かを検討するため HEK293 細胞を用いて同様の検討を行った。

【結果】培養ポドサイトにおいて、①パルミチン酸孵置はアポトーシスを誘導し、オレイン酸および EPA の共孵置はこれを抑制した。

②パルミチン酸孵置は mTORC1 を活性化し、オレイン酸および EPA の共孵置はこれを抑制した。さらに、rapamycin の共孵置および Raptor 発現抑制はパルミチン酸によるアポトーシスの亢進を抑制した。

③パルミチン酸孵置は ER ストレスを誘導し、オレイン酸および EPA の共孵置はこれを抑制した。CHOP 発現抑制はパルミチン酸によるアポトーシスの亢進を抑制した。さらに rapamycin の共孵置および Raptor 発現抑制はパルミチン酸による ER ストレスの亢進を抑制した。

④パルミチン酸孵置は Akt および AMPK シグナルに影響することなく mTORC1 のリソソーム膜への移動を亢進させ、オレイン酸および EPA の共孵置はこれを抑制した。

⑤HEK293 細胞を用いた検討でも培養ポドサイトでの結果と同様に、パルミチン酸は mTORC1 のリソソームへの移行を亢進させることで mTORC1 を活性化し ER ストレスを介してアポトーシスを亢進させた。オレイン酸および EPA の共孵置はこれらを抑制した。

【考察】アミノ酸やインスリンといった既知の mTORC1 活性化因子に加え、飽和脂肪酸が mTORC1 のリソソームへの移行を亢進させることで mTORC1 を活性化することを明らかにした。飽和脂肪酸による mTORC1 の活性化は ER ストレスを惹起しアポトーシスを誘導したことから、既知の栄養因子による mTORC1 活性化とは異なり、飽和脂肪酸による活性化は糖尿病状態における細胞障害に関与しうることが示唆された。さらにこれらの障害は不飽和脂肪酸により抑制されることから、血清脂肪酸分画の是正を目的とした薬物療法や食事療法が、ポドサイト障害の抑制、さらには脂肪毒性による臓器障害抑制につながる新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

【結語】培養ポドサイトおよび HEK293 細胞において飽和脂肪酸は mTORC1 のリソソームへの移行を亢進させることで mTORC1 を活性化し ER ストレスを介してアポトーシスを亢進させ、不飽和脂肪酸はこれらを抑制した。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	722	氏名	安田 真子
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>糖尿病によって増加する血清脂肪酸が、糖尿病性腎症の原因の一つである腎糸球体上皮細胞(ポドサイト)障害とどのように関連するか、その全容は明らかになっていない。一方、細胞内シグナル伝達分子 mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) の過剰な活性化はポドサイト障害を促進することが報告されている。そこで、本研究では脂肪酸とポドサイト障害との関連を、培養ポドサイトでのアポトーシスおよびmTORC1 活性化の関与を含めて検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 飽和脂肪酸のパルミチン酸はアポトーシスを誘導し、一価不飽和脂肪酸のオレイン酸および多価不飽和脂肪酸のエイコサペンタエン酸 (EPA) はこのアポトーシス誘導を抑制した。 2) パルミチン酸は mTORC1 を活性化し、オレイン酸および EPA はこの mTORC1 活性化を抑制した。 3) パルミチン酸は小胞体 (ER) ストレスを誘導し、オレイン酸および EPA はこの ER ストレス誘導を抑制した。 4) mTORC1 阻害薬ラパマイシンの存在下、または、mTORC1 構成分子 Raptor の発現抑制により、パルミチン酸によるアポトーシスおよび ER ストレスの誘導は抑制された。 5) パルミチン酸は mTORC1 のリソソーム膜への移動を促進し、オレイン酸および EPA はこの移動を抑制した。 <p>本論文は、脂肪酸が mTORC1 を介してポドサイト障害を制御する機構について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p>			
(総字数 589 字)			
(平成 26 年 9 月 1 日)			