

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 373 号	学位申請者	清水 利昭
審査委員	主査	西尾 善彦	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	金蔵 拓郎	副査 堀内 正久
	副査	岸田 昭世	副査 石塚 賢治
<p>主査および副査の5名は、平成28年6月6日、学位申請者 清水 利昭 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) サイトカインを分泌する細胞に神経細胞があり、顆粒により神経伝達物質の違いや分泌経路の違いがある。3T3-L1 脂肪細胞からの HMGB1 やアディポネクチンの分泌に、顆粒の違いや分泌経路の違いはあるのか。 回答) 今回は検討していないが、一部の細胞ではエクソソームに内包されて分泌される。</p> <p>質問2) TNF-α は 3T3-L1 脂肪細胞からの HMGB1 の分泌を促進すると考えてよいのか。 回答) そのように考察している。</p> <p>質問3) TNF-α は 3T3-L1 脂肪細胞からのアディポネクチン分泌に対しては抑制的に作用するのか。 回答) TNF-α は 3T3-L1 脂肪細胞からのアディポネクチン分泌を抑制する。</p> <p>質問4) アディポネクチンの遺伝子発現に TNF-α はどう関係するか。 回答) TNF-α はアディポネクチンの発現を転写・翻訳の双方において低下させることがわかっている。</p> <p>質問5) 3T3-L1 脂肪細胞を TNF-α で刺激した時、HMGB1 の転写の抑制がみられるが、どう考えているのか。 (回答) TNF-α による HMGB1 の分泌増加は、少なくとも転写調節を介したものではないと考えているが、転写の抑制の機序については現在のところ不明である。</p> <p>質問6) 3T3-L1 前駆脂肪細胞に比べ、3T3-L1 脂肪細胞の β-アクチンが低下しているが、これに意味があるのか。 回答) 単純にタンパク質の loading 量が少なかったための β-アクチンの低下と考えている。3T3-L1 前駆脂肪細胞と分化した 3T3-L1 脂肪細胞は細胞が違うため一概に比較できないが、β-アクチンが同程度の時、3T3-L1 脂肪細胞のトータルの HMGB1 の発現量は 3T3-L1 前駆脂肪細胞に比べ高値になることから、3T3-L1 前駆脂肪細胞が脂肪細胞に分化していくに従い、細胞内の HMGB1 の発現量が増大していくものと推測する。</p> <p>質問7) ヒト脂肪組織の免疫蛍光染色において CD68 染色によるマクロファージが観察されないのはどう考えるのか。 回答) 通常、肥満症患者の内臓脂肪組織では、炎症性のマクロファージの浸潤が観察されるはずだが、今回の染色では観察されなかった。従って肥満症患者の内臓脂肪組織ではマクロファージが浸潤してくる肥満症の進行期以前から大型脂肪細胞から HMGB1 が分泌されると推測する。</p> <p>質問8) アディポネクチンレセプター抗体でアディポネクチンによる HMGB1 の分泌抑制をブロックした実験で、コントロール抗体とアディポネクチンレセプター2 抗体+アディポネクチンの比較では、HMGB1 の分泌がむしろ増加しているように見えるがどのように考えるか。 回答) コントロール抗体のときはアディポネクチンを加えていないので有意差は評価していない。</p> <p>質問9) 3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化の仕組み、分化メediumの組成について述べてください。 回答) 分化メediumには3種類の分化誘導試薬として IBMX (isobutylmethylxanthine)、インスリン、デキサメタゾンと PPARγ アゴニストが入っている。</p> <p>質問10) PPARγアゴニスト製剤 (チアゾリジンジオン系) は糖尿病治療薬として使われるが、PPARγアゴニスト製剤を使うと、脂肪細胞に分化して HMGB1 の分泌が増大し糖尿病治療に対し悪い方向に働かないか。 回答) PPARγアゴニスト製剤により小型脂肪細胞が増加するのでアディポネクチンの分泌は増加し、一方 HMGB1 の分泌は低下すると推測するので糖尿病治療に対し悪い方向には働かないと考える。</p> <p>質問11) HMGB1 の 3T3-L1 脂肪細胞に対するシグナル経路で JNK と AKT は異なる経路か。 回答) 異なる経路と考える。HMGB1 は MAPK 経路で ERK1/2 と JNK を活性化させ炎症を誘導し、これとは独立した PI3K 経路で AKT のリン酸化を低下させインスリンシグナルの減弱を生じさせると考える。</p> <p>質問12) HMGB1 は分泌後安定な状態で存在するか。 回答) 細胞培養上清中で分解されるという報告はない。生体内ではトロポモジュリンに結合したトロンピンにより分解されるという報告がある。</p> <p>質問13) 細胞培養上清中では、他のタンパク質と結合しないのか。 回答) HMGB1 と結合して存在するタンパク質は報告されていない。</p>			

- 質問 1 4) ELISA で用いている HMGB1 の抗体はどの部位を認識しているのか。
 回答) ELISA kit の添付文書に記載がなく不明である。
- 質問 1 5) HMGB1 の分泌は 3T3-L1 脂肪細胞の分化に伴ってアディポネクチン分泌と逆の挙動を示すと説明したが、平均値を求めた結果によるのか。
 回答) $n=4$ の平均値から、HMGB1 とアディポネクチンの分泌は逆相関の関係にあると推測した。
- 質問 1 6) 分化 4 日から 7 日ならその説明は理解できる。それぞれの分化日ごとの HMGB1 とアディポネクチンの散布図から関係性を求めれば数字として表現できたと考える。
 回答) 今後検討したい。
- 質問 1 7) 3T3-L1 脂肪細胞の免疫蛍光染色で観察される空砲は脂肪滴か。
 回答) 空砲は脂肪滴であり、その周囲の細胞質に HMGB1 が強く発現しているのが観察できる。
- 質問 1 8) 内臓脂肪組織標本における健常者と肥満症患者の血液中の HMGB1 の濃度はいくらか。
 回答) 購入した標本のため HMGB1 濃度のデータは不明である。しかしながら肥満症患者では健常者に比べ血液中の HMGB1 濃度が優位に高値であることについてはこれまでに報告されている。
- 質問 1 9) 大型脂肪細胞から HMGB1 が分泌されることについて、従来言われているマクロファージからの HMGB1 分泌量に比べてどうか。細胞当たりの HMGB1 分泌量は比較しているか。
 回答) これまでの *in vitro* の実験では、3T3-L1 脂肪細胞からの HMGB1 の分泌量はマクロファージ (Raw 264.7 cell) からの HMGB1 量よりはるかに多いという結果を得ている。
- 質問 2 0) HMGB1 は脂肪細胞に対してバラクライン的に働くので、これを自律的という言葉で表現したのか。
 回答) これまで報告されている HMGB1 の分泌には、活性化マクロファージからの active release と壊死細胞からの passive release の 2 通りがある。3T3-L1 脂肪細胞は無刺激の状態で細胞質に HMGB1 を発現しかつ上清中に分泌するため、これを自律的な HMGB1 の分泌と表現した。
- 質問 2 1) 脂肪細胞に発現している HMGB1 のレセプターは何か。
 回答) TLR4 もしくは RAGE と考える。
- 質問 2 2) JNK 阻害剤 (SP600125) による HMGB1 の抑制効果を 30%としているがどのように計算したのか。
 ((SP600125+TNF- α)/SP600125)/(TNF- α /DMSO) の計算式から求めるべきで、もっと強力に抑制しているようにみえるがどうか。
 回答) 御指摘の通りである。この計算式からは 52%の抑制効果になる。30%という数字は単純に、 $1 - (\text{SP600125} + \text{TNF-}\alpha) / \text{TNF-}\alpha$ から計算したが、この計算法は誤っている。訂正したい。
- 質問 2 3) AKT のリン酸化のウェスタンブロッティングとアディポネクチン前処理時の MAPK のウェスタンブロッティングはどのような処理をしたタンパク質か。
 回答) DTT, PMSF, NA3VO4 とプロテアーゼインヒビターを含んだサンプルバッファーを用いて細胞を可溶化して用いた。
- 質問 2 4) ヒト内臓組織標本の入手先は BioChain か。
 回答) BioChain である。
- 質問 2 5) アディポネクチンによる HMGB1 の分泌抑制効果を partial と説明しているが言い過ぎではないか。ほぼ同じ条件の抗体を使った実験では有意差はとれているようだが効果は弱いようにみえる。
 回答) 貴重な御指摘と考える。今後検討したい。
- 質問 2 6) 3T3-L1 脂肪細胞をアディポネクチンレセプター抗体で処理したのち TNF- α で刺激すると HMGB1 の分泌が増加したとする実験は意義があるのか。
 回答) アディポネクチンレセプターをブロックすることで 3T3-L1 脂肪細胞からバラクラインに分泌されたアディポネクチンによる刺激がブロックされ、TNF- α 刺激時の HMGB1 の分泌が増大することを示すもので意義があると考えられる。
- 質問 2 7) 3T3-L1 脂肪細胞を分化させていったとき HMGB1 の分泌が徐々に減っていくことを、アディポネクチンの分泌が増えて HMGB1 の分泌を抑制しているためと説明しているが、単に蓄積が少なくなって減少してきているのではないか。分化日毎の細胞内のトータルの HMGB1 量を評価したのか。
 (回答) 評価していない。貴重なご指摘であり今後の課題としたい。
- 質問 2 8) JNK 阻害剤を使用しているが、この阻害剤は JNK の自己リン酸化を抑制しているのか、それとも上流のキナーゼを阻害しているのか。
 (回答) JNK は下流の c-JUN の N 末端に対するキナーゼ (c-jun N-terminal kinase: JNK) である。JNK 阻害剤 (SP600125) は ATP 競合的阻害物質で JNK を阻害し c-JUN のリン酸化を低下させる。
- 質問 2 9) インスリン抵抗性を AKT のリン酸化で評価しているが、脂肪細胞では MAPK 経路もインスリンシグナルに重要であるが確認しているか。
 (回答) 確認していない。今後検討したい。
- 質問 3 0) HMGB1 が TNF- α 刺激により誘導されてインスリン抵抗性に関与すると説明しているが、TNF- α を使用したときのインスリン刺激実験時の AKT のリン酸化はどうか。
 (回答) 今回の実験では行っていない。今後検討したい。
- 質問 3 1) TNF- α でインスリン刺激による AKT のリン酸化が大きく低下すると考えられるが、TNF- α と比較したとき、HMGB1 による AKT のリン酸化の抑制の役割はどの程度か。HMGB1 はインスリン抵抗性にどの程度重要と考えるか。
 回答) 今回の実験では TNF- α との比較は行っていない。HMGB1 とインスリン抵抗性については今後の検討課題としたい。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。