

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	諏訪 旭
論文題目	Discovery of the novel target and medication for the treatment of metabolic syndrome (メタボリックシンドローム改善のための新規標的及び治療薬の発見)		
(論文内容の要旨)			
<p>メタボリックシンドローム(MetS)とは、内臓脂肪型肥満を共通基盤とし、高血糖、高血圧、脂質異常等の生活習慣病を複数併せ持った状態であり、これらリスク因子の重積は相乗的に動脈硬化性疾患の発生頻度を高める。近年、日本において生活習慣の欧米化によりMetS罹患者は急増しており、生活習慣の改善に加えて早期の治療的介入が必要と考えられているが、現在までに有効な治療法は確立されていない。</p> <p>そこで本研究では、MetSの共通基盤である内臓脂肪型肥満及び重要な合併症の一つである高血糖を改善するために、新しい治療標的の探索及び治療薬の開発を行った。その結果、内臓脂肪型肥満の新規治療標的分子としてRMI1(recQ-mediated genome instability 1)を見出し、また2型糖尿病(高血糖)改善薬として世界で初めてSHIP2(SH 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase 2)阻害剤を見出すことに成功した。</p> <p>本論文の主な内容は以下のとおりである。</p>			
<p>第1章では、肥満発症の新規原因分子を見出すため、可変型遺伝子トラップ法を用いた<i>in vivo</i>スクリーニングを実施した。その結果、RMI1ヘテロ欠損マウスにおいて血糖値低下及び体重減少が認められ、RMI1分子が肥満の原因分子である可能性が考えられた。そこで、RMI1の肥満症改善ポテンシャルを調べるために、高脂肪食誘導性の肥満モデル及び遺伝子肥満モデルを用いて検討した。いずれのモデルにおいてもRMI1ヘテロ欠損マウスは野生型マウスに比べて顕著な体重増加抑制作用を示した。またこの時、RMI1ヘテロ欠損マウスでは糖代謝能の亢進及び内臓脂肪量の減少が認められた。これらの結果から、RMI1の欠損により肥満症が改善する可能性を示した。</p>			
<p>続いて肥満発症とRMI1の関係を調べるため、モデルマウスを用いRMI1の発現量を肥満発症の前後で比較した。その結果、脂肪蓄積臓器である内臓脂肪組織及び肝臓において、RMI1の発現量が病態発症により顕著に増加することを明らかにした。</p>			
<p>次に、RMI1と肥満発症をつなぐ分子メカニズムの解明を試みた。RMI1は細胞増殖に関与するとの報告があり、肥満発症の原因の一つである脂肪細胞の量的変化にRMI1が関与する可能性が考えられた。そこで高脂肪食誘導性肥満モデルにおける細胞周期関連遺伝子の発現量を検討したところ、RMI1ヘテロ欠損マウスでは高脂</p>			

肪食誘導性のE2F8の発現量が顕著に減少していた。続いて、肥満発症に伴いRMI1発現を増加させる誘導因子の探索を行った。MetS発症時に増加することが知られるグルコース、インスリン、脂肪酸をヒト脂肪細胞由来培養細胞株SW872細胞に添加したところ、グルコース刺激によってのみ濃度依存的にRMI1の発現が誘導されることがわかった。また興味深いことに、このグルコース誘導性のRMI1発現増加は、細胞周期関連分子であるE2F5やE2F8のノックダウンにより抑制された。

以上の結果から、RMI1はグルコース刺激により誘導され、E2Fとの相互作用を介し細胞周期に影響を及ぼすことで、肥満発症に関与すると考えられた。RMI1と代謝制御との関連は今までに全く知られておらず、本研究の発見が内臓脂肪量を直接的に減少させる全く新しい肥満症治療薬の開発に繋がることが期待される。

第2章では、高血糖の原因となるインスリン抵抗性を改善させる新規の薬剤を見出すため、インスリンシグナル経路への関与が報告されているSHIPに注目した。SHIP2は細胞内に存在する脂質ホスファターゼであり、通常は細胞質に存在するが、インスリン刺激により細胞膜上に移行し、インスリンシグナル経路の重要なセカンドメッセンジャーであるホスファチジルイノシトール3,4,5リン酸(PIP3)を脱リン酸化することで、インスリンシグナル経路を負に調節する。遺伝子欠損マウス等の分子生物学的手法により、SHIP2の阻害が抗糖尿病作用を示す可能性が示唆されているが、現在までSHIP2の薬理的阻害による糖尿病への作用を検討した報告は知られていない。そこで、本研究では、SHIP2の阻害剤を探索し、薬理的なSHIP2阻害によるインスリンシグナル経路及び糖尿病への作用を検討した。SHIP2の基質が脂質であることや、高活性の全長タンパク質の取得が困難であることから、SHIP2阻害剤の探索は難しいと考えられていた。本論文では、水溶性基質の使用やSHIP2の一部ドメインを用いることで、これら問題を解決し、ハイスループットスクリーニングによって複数のSHIP2選択的阻害剤を取得することに成功した。取得したAS1949490及びAS1938909は強力なSHIP2阻害作用を持ち、かつ同じSHIPファミリー分子であるSHIP1に対しては弱い活性しか示さなかった。また、その他複数の脂質ホスファターゼに対しては全く阻害作用を示さなかった。

次に、これら新規に発見したSHIP2阻害剤が、細胞内のインスリンシグナル経路に影響を与えるかを検討した。まず、筋肉でのSHIP2阻害剤の影響を検討するために、筋芽細胞株L6細胞を用いてSHIP2下流のインスリンシグナル経路分子であるAktのリン酸化レベルを測定した。L6細胞にSHIP2阻害剤を処理すると、インスリン応答性のAktリン酸化が亢進した。さらにAkt下流で起こるグルコース取り込みも亢進していた。この時、グルコーストランスポーターであるGLUT1の遺伝子発現量が顕著に増加していた。続いて肝臓での作用を検討するため、肝細胞株Fao細胞を用いて、インスリンシグナル経路下流で起こる糖新生への影響を検討した。Fao細胞に

SHIP2阻害剤を処理すると、インスリン応答性の糖新生抑制活性が亢進した。さらに、マウスにSHIP2阻害剤を経口投与し、肝臓中の糖新生関連遺伝子の発現量を測定したところ有意に抑制されており、SHIP2阻害剤が*in vivo*においても有効性を示すことがわかった。

SHIP2の薬理的阻害による抗糖尿病作用を検討するために、SHIP2阻害剤を糖尿病モデルdb/dbマウスに1週間反復投与したところ、飽食時血糖値が有意に低下し、耐糖能不全が顕著に改善された。この時、インスリンシグナル経路下流分子であるGSK3 β のリン酸化が亢進していた。これらの結果から、SHIP2の薬理的阻害によりインスリンシグナル経路が活性化され、インスリン抵抗性及び糖尿病が改善されることが示唆された。SHIP2阻害剤は末梢組織のインスリン抵抗性を改善させる新しいタイプの糖尿病治療薬として非常に有望であることを示した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

メタボリックシンドローム(MetS)は複数の生活習慣病の重積によって発症し、動脈硬化性疾患の発症を飛躍的に増加させる。近年、日本においても、MetS罹患者が急増しているが有効な治療法は確立されていない。本研究では、まずMetSの共通基盤である内臓脂肪型肥満に対する新規の治療標的分子としてRMI1を見出し、その機能メカニズムを明らかにした。続いて、高血糖に対する新規治療薬開発のためSHIP2に注目し、世界で初めてSHIP2阻害剤を発見することに成功した。本研究において、評価すべき点は以下の通りである。

1. RMI1 欠損で高脂肪食誘導性及び遺伝性の肥満が改善することを見出した。
2. RMI1 発現は肥満発症及びグルコースにより誘導されることを見出した。
3. *in vivo* では、RMI1 欠損で高脂肪食誘導性の E2F 発現が抑制され、*in vitro* では E2F 欠損でグルコース誘導性 RMI1 発現が抑制されることを見出した。
4. 世界で初めて SHIP2 の選択的阻害剤を発見することに成功した。
5. SHIP2 阻害剤処理により、細胞内のインスリンシグナル経路が活性化されることを明らかにした。
6. SHIP2 の薬理的阻害により糖尿病が改善することを見出し、SHIP2 阻害剤が有望な新規抗糖尿病薬となり得ることを示した。

以上のとおり、本論文は、メタボリックシンドローム治療薬開発にとって重要な新規標的分子の同定及び、新規治療薬の発見に関するものであり、生化学、分子生物学、細胞生物学、生理学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成23年12月15日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降