




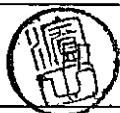


学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第542号	氏名	甲斐由布子
審査委員会委員	主査氏名	滝田文彦	
	副査氏名	横山繁史	
	副査氏名	松尾哲孝	
<p>【論文題目】 A possible role for AMP-activated protein kinase activated by metformin and AICAR in human granulosa cells 顆粒膜細胞における metformin および AICAR (5-amino-imidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside) によって活性化された adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) の役割</p> <p>【論文掲載雑誌名】 Reproductive Biology and Endocrinology</p> <p>【背景と目的】 排卵障害による不妊症を引き起こす多嚢胞性卵巣症候群の患者には、肥満に伴う炎症とインスリン抵抗性を認める症例が存在することから、これらの患者の排卵誘発には AMPK の活性化を介してインスリン抵抗性を改善する metformin が併用される。本研究では、metformin と、これと同様に AMPK を活性化することが知られている AICAR が、ヒト卵巣の顆粒膜細胞に直接的に与える影響を解析し、その作用機序を解明することによって、有効な排卵誘発法を開発することを目的とする。</p> <p>【研究方法および結果】 実験は、ヒト顆粒膜継代培養細胞株 KGN を用いた。多嚢胞性卵巣症候群では血中 TNF-α レベルが上昇していることから、KGN を TNF-α で刺激したところ、IL-8 や GROα などのケモカイン産生が著明に増加した。KGN を metformin あるいは AICAR で処理すると、AMPK が活性化（リン酸化型 AMPK の蛋白量を Western blotting によって評価）されるが、TNF-α 刺激によるケモカイン産生量の増加は、これらの薬剤の存在下においては約 50% 以下に減少した（ケモカイン産生量は ELISA によって測定）。以上より、TNF-α によって惹起されるケモカイン産生は、AMPK によって負に制御されることが示唆された。TNF-α 刺激による IκB のリン酸化も metformin 処理によって同様に減弱したことから、AMPK は IκB のリン酸化を負に制御していることが示唆された。さらに AMPK は mTORC1 シグナル伝達経路を負に制御することが知られているが、metformin および AICAR の処理によって、この経路の最下流に位置する p70 S6 kinase および eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1 (4E-BP1) の活性が阻害された（それぞれの蛋白質のリン酸化状態によって評価）。以上より metformin および AICAR が、顆粒膜細胞における mTORC1 シグナル伝達経路を阻害することを明らかとなった。</p> <p>本研究は、metformin および AICAR が卵巣の顆粒膜細胞において AMPK を活性化することにより、多嚢胞性卵巣症候群の排卵障害の原因の一つとして挙げられている卵巣内炎症を直接制御する可能性を示しており、臨床的な意義は大きいと考えられる。よって審査委員の合議により、本論文は学位論文に値するものと判断した。</p>			

最終試験

の結果の要旨

学力の確認

審査区分 課・論	第542号	氏名	甲斐由布子
審査委員会委員	主査氏名	濱田文彦	
	副査氏名	極山繁生	
	副査氏名	松尾哲孝	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> ① Fig. 2 で各薬剤の効果は24時間で評価している一方で、AMPKの活性化状態の評価については細かく時間を設定している理由は何か？ ② Fig. 2の実験で用いられているmetforminの濃度とFig. 3の実験での濃度が異なる理由は何か？ ③ Fig. 3において、薬剤未処理のデータがないのはなぜか？処理時と比較すべきではないか？ ④ Fig. 3, 4, 5において、各蛋白質の活性化状態をリン酸化型蛋白質の定量化によって示しているか、それぞれの蛋白質の非リン酸化型、リン酸化型の総量を併せて示すべきではないか？ ⑤ Fig. 5でA, Bのデータ間に矛盾があるように思われるが、評価法に問題はないか？ ⑥ 薬剤によって特定の酵素の活性を制御する実験においては、標的以外の酵素への非特異的效果が常に問題となるが、この問題を解決するためにどのような実験を行うべきか？ ⑦ 排卵時の好中球浸潤は、卵胞破裂に対する単なる炎症反応なのか？ ⑧ AICARとmetforminの投与量、反応時間等どのように決めたのか？ ⑨ Phospho-AMPK抗体等はポリクロナール抗体を用いているが、特異なエピトープのみを認識するポリクロナール抗体はどのように作製されたのか？ ⑩ 多嚢胞性卵巣症候群のガイドラインではmetforminのみが推奨されているが、より効果の高いAICARが使用されない理由は何か？ ⑪ Fig. 3で、AICARとmetforminは時間依存性にAMPKを活性化するとしてあるが、経時的に増加しているとは言えないのではないか？ ⑫ 多嚢胞性卵巣症候群患者のインスリン抵抗性を示す割合はどれくらいか？ ⑬ 多嚢胞性卵巣症候群患者とAMPK活性化の関係は、どれくらい明らかになっているのか？ ⑭ MetforminとAICARのAMPK活性化の作用機序は？また、両者間で作用機序に違いがあるのか？ ⑮ MetforminによるIκBのリン酸化の抑制は、示されているよりさらに低い濃度ではどうなるか？また、他の細胞でも同様の抑制が認められるか？ ⑯ 多嚢胞性卵巣症候群におけるTNF-αの役割は何か？排卵が炎症類似現象とすると、TNF-αやIL-8などのケモカインや炎症細胞と、多嚢胞性卵巣症候群との関係をどのように考えればよいか？ <p>これらの質問に対し、申請者は概ね適切に回答した。以上の質問に加え、審査委員から、論文および論文要旨（日本語）にいくつかの誤りが認められること、論文要旨にまとまりがなく、理解し難いことなどの指摘がなされ、申請者はこれらを修正した。以上より、審査委員は合議の結果、申請者が学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 甲斐 由布子

論 文 題 目

A possible role for AMP-activated protein kinase activated by metformin and AICAR in human granulosa cells

(顆粒膜細胞における metformin および AICAR によって活性化された AMP- activated protein kinase (AMPK) の役割)

要 旨

【緒言】排卵は LH サージにより始まり、成熟した卵子が卵胞内から排出される現象である。これまでの研究から排卵は炎症に類似した現象であると考えられており、実際に排卵期周辺では卵胞内では炎症性メディエータが増加し、さらには卵胞周囲に白血球系の細胞が認められる。TNF- α は顆粒膜細胞から分泌され、その過剰な産生は発育過程の卵胞においては卵胞閉鎖を誘導する作用を持つ。種々の細胞において TNF- α はケモカイン産生を増加させることが報告されており、実際に、閉鎖卵胞周囲には多数の白血球の集簇が認められる。

多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) は生殖年齢の 5~8%の女性に発症し、軽度から重度の排卵障害を来たし不妊症の原因として重要な疾患である。また、PCOS のなかにインスリン抵抗性を認める症例が存在することから代謝性疾患と関連することが知られている。Metformin はビグアナイド系薬剤に属するインスリン抵抗性改善薬であり、AMP-activated protein kinase (AMPK) を介して血糖の調節インスリン抵抗性を改善し、生体内の機能調節を行うことが知られている。また metformin は多嚢胞性卵巣症候群の排卵誘発時に併用して用いると効果的であるが、卵巣に対しての metformin の直接的な作用機序については明らかにされていない。作用機序を解明し更なる有効な排卵誘発法を開発するため、ヒト顆

粒膜細胞において細胞内シグナル伝達を調整し蛋白合成を調節する AMPK への metformin の効果を検討した。

【研究対象および方法】 ヒト顆粒膜細胞株 (KGN 細胞) を培養し、tumor necrosis factor- α (TNF- α) による炎症性サイトカイン産生への 5-minoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) と metformin の効果について、ELISA 法を用いて検討した。また、western immunoblot 法を用いて AMPK、転写因子の NF κ B と複合体を形成する Inhibitor κ B (I κ B)、翻訳制御関連蛋白である 4E binding protein 1 (4EBP-1)、p70S6Kinase の活性について検討を行った。

【結果】 ELISA 法による interleukin (IL) -8 と growth regulated oncogene (GRO) - α の測定では、TNF- α を 1nM 添加により、コントロールと比較して有意に 5 倍に増加した。TNF- α 1nM とともに AICAR 3mM を添加すると、TNF- α 1nM 単独添加と比較して IL-8 産生量は約 40%減少し、GRO- α 産生量は約 70%減少した。また TNF- α 1nM とともに metformin 1mM 添加すると、IL-8 産生量は約 60%減少し、GRO- α 産生量は約 70%減少した。Western immunoblot 法による解析では、KGN 細胞に AICAR を 1mM 添加すると、15 分後から 30 分後にかけて AMPK のリン酸化を認めた。KGN 細胞に metformin 1mM を添加すると、同様に AMPK のリン酸化を認めた。TNF- α 1nM を添加すると I κ B のリン酸化を認め、TNF- α 1nM と同時に metformin 1mM を添加すると、I κ B のリン酸化は抑制された。KGN 細胞に AICAR 1mM を添加するとコントロールと比較して 4 時間後以降では p70S6Kinase のリン酸化を約 70%、また 4EBP-1 のリン酸化も約 30%抑制し、48 時間後では約 60%抑制した。KGN 細胞に Metformin 1mM を添加するとコントロールと比較して 4 時間後以降では p70S6Kinase のリン酸化を約 20%抑制し、4EBP-1 のリン酸化を約 40%抑制した。

【結語】 これらの結果から、顆粒膜細胞において metformin によって活性化された AMPK は下流の翻訳制御に関する蛋白質の活性を下げることで蛋白合成を低下させ、卵胞内における炎症性変化を調整する可能性が示唆された。特に、排卵障害を呈する慢性炎症の状態を呈する多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) では卵の質の低下が懸念されている。AMPK 活性の制御が卵胞発育ひいては卵胞内環境の改善に重要な役割を担う可能性が示唆された。