

論文内容の要旨

申請者氏名 AHMED REZWANA

概日時計は約 24 時間ごとに繰り返される内因性の生物学的周期維持機構であり、環境に適応して健康状態を保つことに寄与している。すべての細胞は、遺伝子転写制御のフィードバック機構を利用して、遺伝子の発現パターンを周期的に変化させることによって、約 24 時間周期を作り出す概日時計のしくみを内在している。個体レベルでは視床下部の視交叉上核がすべての細胞の概日時計を統括し、同調させることにより、個体としての 1 日のリズムを作り出している。これまでの研究で、個体レベルでは概日時計システムは加齢の影響を受けることが明らかにされている。全身を統括する視交叉上核 (SCN) の概日時計は、組織レベルおよび個体レベルで、加齢に伴って位相の後退と周期の延長が起こる。しかし、末梢組織は生体内では SCN の概日時計の影響を常に受けているために、末梢組織のそれぞれの細胞が内在する概日時計が、細胞老化によってどのような影響を受けるかはよく理解されていなかった。申請者は SCN からの同調シグナルの影響を排除でき、末梢時計そのものが加齢により変化するかを検証する実験系としてヒト胎児肺由来初代培養線維芽細胞 (TIG-3) を用いた細胞老化による末梢時計への影響を検証した。

まず申請者は、継代を繰り返すことにより TIG-3 細胞の細胞老化を誘導した。その後、細胞増殖曲線、細胞老化関連 β -ガラクトシダーゼアッセイ、老化マーカー遺伝子発現定量を行い、増殖期細胞群と老化期細胞群を規定した。これら細胞群に概日時計遺伝子 *bmal1* プロモーターで発現制御された luciferase 遺伝子を導入し、リアルタイム生物発光測定装置で luciferase 発光の観察を行った。増殖期細胞と比して老化期細胞では、概日時計遺伝子発現周期の位相後退および周期延長が観察された。また、細胞内情報伝達経路が異なる 2 種類の概日時計同調因子 dexamethasone と forskolin により細胞の概日時計をそれぞれ同調させた結果、どちらの因子によっても老化期細胞での位相後退および周期延長が観察された。また、増殖期および老化期細胞での luciferase タンパク質の安定性の違い、レポーター遺伝子の導入量の違いが位相後退および周期延長を生み出しているのではないことを確認した。さらに、内在性概日時計遺伝子発現変動を定量的 PCR にて検証した結果、老化期細胞で位相後退していることを確認した。これらの結果は、細胞老化にともない概日時計機構自身が老化することを示している。さらに、ストレス誘導性の老化細胞においても細胞老化依存的に位相後退および周期延長が誘導されることを見いだした。

これらの結果は、細胞老化した細胞では概日時計の特性が変化し、位相の後退と周期延長が起こることを示している。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 AHMED REZWANA

全身ほぼ全ての臓器・細胞に備わっている約 24 時間周期のリズムを作り出す概日時計機構は生物の環境適応戦略の代表的なものであり、生体の恒常性を維持する重要な機能である。概日時計機能も他の生理機能同様に加齢による機能低下が、個体や臓器レベルで報告されている。全身の細胞の概日時計は、間脳の脳視床下部に存在する視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus; SCN) によって個体レベルで同調させられているので、SCN は中枢時計とよばれている。過去の知見から、SCN は組織および細胞レベルで概日時計特性が加齢により変化することが報告されている。また、肺や肝臓などの末梢臓器の概日時計 (末梢時計) も加齢により変化することが報告されている。しかし、末梢臓器を用いた研究では、末梢時計機構そのものが加齢により変化したのか、中枢時計である SCN からの同調シグナル異常に起因するのかが不明のままであった。末梢組織の細胞がもつ固有の概日時計の特性が、細胞老化によってどのように変化するかという、これまでの個体を用いた研究では不可能であった問いを解くことを申請者は企図して、ヒト組織の初代培養細胞を用いて研究をおこなった。

申請者は予備実験をおこなって、いくつかのヒト初代培養細胞の中からヒト胎児肺由来初代培養線維芽細胞 (TIG-3) を実験系として選び出した。細胞老化には細胞分裂を重ねて増殖しなくなる複製老化、ストレスを受けて生じる早期細胞老化があるが、肺は外界と接する臓器でありストレスを受けやすいと考えられるので、両方の老化のモデルとして適した系である。

申請者は TIG-3 細胞を用い、継代を重ねて複製老化を誘導する系、および過酸化水素に曝露することにより早期細胞老化を誘導する系を確立した。また、TIG-3 細胞に概日時計遺伝子 *bmal1* プロモーターで発現制御された luciferase 遺伝子を導入することに成功し、リアルタイム生物発光測定装置を用いて TIG-3 細胞がもつ概日時計を検出し、解析するシステムを構築した。これらの系を活用し、申請者は複製老化した TIG-3 細胞および早期細胞老化した TIG-3 細胞では、分裂可能な増殖期細胞に比べて概日時計の位相が後退し、周期が延長することを発見した。

以上のように、本論文は細胞老化にともないヒト肺由来線維芽細胞の概日時計特性が変化、位相後退および周期延長することを初めて明らかにし、また、細胞老化が概日時計老化の原因である可能性を示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由 [図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()] により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】