

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 （ 工 学 ）	氏名	重 藤 元
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論 文 題 目			
Development of evaluating methods for the live cell response related to insulin (インスリンが関わる生細胞応答の評価法開発)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	黒 田 章 夫	
審査委員	教 授	加 藤 純 一	
審査委員	教 授	河 本 正 次	
審査委員	特任講師	舟 橋 久 景	
〔論文審査の要旨〕			
<p>本論文は、第1章から第5章で構成され、糖尿病治療薬開発への応用を念頭に置いたインスリンが関わる生細胞応答の評価法の開発について記述されている。</p> <p>第1章は序論として本研究の目的と意義を明らかにした。生体内では血中のグルコース濃度（血糖値）が上昇すると、インスリン分泌細胞がインスリンを分泌し、次にインスリンを受容した細胞がグルコースを取り込む。糖尿病はこの血糖値維持システムが破綻することで発症する。これまでに様々な糖尿病治療薬が開発されているが、その効能は、1型糖尿病ではインスリン分泌量、2型糖尿病ではグルコースの取り込み量という単純な指標を用いて評価されている。しかし本来の血糖値維持システムは長時間にわたり複雑に制御されていることから、より複雑な長期間にわたる生細胞の応答を指標として薬剤を開発する必要があると考えられる。そこで本研究では「インスリン分泌を伴う生細胞応答」と「インスリン受容後の生細胞応答」の評価法開発を目的とした。</p> <p>第2章では「インスリン分泌を伴う生細胞応答」の評価法開発を行った。1型糖尿病の薬剤開発では分泌されるインスリンを経時的に評価することが重要である。そこで本章では、分取操作の必要がないインスリン分泌応答評価法開発を行った。インスリン受容体の標的認識部位である αCT セグメントと発光タンパク質 (Nluc)、同じく標的認識部位の L1 ドメインと蛍光タンパク質 (YPet) の融合タンパク質をプローブとして作製した。このプローブは「(Nluc-αCT) - (インスリン) - (L1-YPet)」の複合体を形成し Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) シグナルを生じた。このプローブをインスリン分泌細胞株の培養液に混合し、BRET シグナル経時変化を評価した結果、血糖値応答や薬剤効果を反映した変化を示したことから、分取操作の必要ない、連続的な生細胞のインスリン分泌応答評価法開発に成功し</p>			

たと結論した。

第3章では「インスリン受容後の生細胞応答」の評価法開発を行った。生体内におけるインスリン濃度は数時間かけて変動することから、2型糖尿病治療薬開発ではインスリン受容後の生細胞応答を経時的に評価することが重要である。そこで、インスリン受容後に発現が増加する *GLUT1* mRNA と減少する *GLUT4* mRNA のモニタリングに挑戦した。まず標的を検出すると Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) シグナルを発する DNA ナノピンセット構造体 (DNA-NT) を新たにデザインした。細胞に DNA-NT を導入し、インスリン受容後の各 *GLUT* mRNA 発現応答を単一細胞レベルで評価した結果、個々の細胞によって大きく異なる挙動が観察された。一方、全体の積算値は従来法で測定した細胞群応答挙動に対応したことから、単一生細胞レベルでインスリン受容後の *GLUT* mRNA 発現応答評価に成功していることが示唆された。

第4章では、第2章で開発したインスリン検出プローブを発現させたセンサー細胞を作製し、これを利用したインスリン分泌応答評価法開発を行った。センサー細胞はインスリン濃度依存的な BRET シグナルを示したことから、インスリンの局所的な濃度観察が可能であると結論した。そこでインスリン分泌細胞とセンサー細胞の共培養系を用いたインスリン分泌応答のモニタリングに挑戦した。2種類の濃度のグルコースでインスリン分泌細胞を刺激した結果、センサー細胞はグルコース濃度に依存した BRET シグナルの変動を示した。この結果から、グルコース刺激を受けた細胞から分泌されたインスリンを単一細胞レベルでモニタリングが可能であることが示唆された。

第5章では、研究を総括した。本研究では、血糖値維持システムに準じた生細胞機能を指標に糖尿病治療薬を開発する必要があると考え、生細胞のインスリン分泌応答、およびインスリン受容後の生細胞応答の評価法開発を行った。その結果、従来困難であった「インスリン分泌応答」と「インスリン受容後の遺伝子発現応答」の連続測定を単一生細胞レベルで実現し、評価するための基盤技術創出に成功したと結論した。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士（工学）の学位を授与される十分な資格があるものと認める。