

審査の結果の要旨

氏名 山上 まり

本研究は老化細胞において高発現しているインターフェロン誘導遺伝子(ISGs)の発現制御機構について検討したものであり、以下の結果を得ている。

1. cDNA マイクロアレイを用いて、複製老化させた正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) と非老化細胞の mRNA の網羅的発現比較を行った。すると老化細胞では IFN の発現増加がないにもかかわらず、ISGs の発現が増加していた。定量 PCR でも同様の結果であった。
2. ISGs は通常リン酸化 ISGF3 が核内に移行することで発現が誘導されと考えられているため、ISGF3 の構成成分である STAT1、STAT2、IRF9 の免疫細胞染色を行った。すると老化細胞ではそれらが顕著に核内に移行していた。STATs のリン酸化について Western blotting を行うと、老化細胞ではリン酸化 STATs の増加は認めない一方で、非リン酸化 STATs が老化細胞の核内で増加していた。
3. 抗 IRF9 抗体を用いた免疫沈降では、老化細胞において STAT1、STAT2、IRF9 が複合体を形成していることが示された。また抗 IRF9 抗体を用いた ChIP アッセイでは、老化細胞において ISGF3 が、ISGs のプロモーター領域に結合していることが示された。
4. 老化細胞における ISGs 発現が典型的な JAK-STAT 経路とは独立しているかどうかの検討として、STATs の主要キナーゼである *JAK1* を shRNA でノックダウンし ISGs の発現変化を検証した。すると Western blotting と定量 PCR の両方で、*STAT1*、*STAT2* をノックダウンした老化細胞では ISGs の発現が低下する一方で、*JAK1* のノックダウンでは ISGs の発現が低下しないことが示された。これらの結果から、老化細胞における ISGs が JAK-STAT 経路とは独立していることが示唆された。
5. 複製老化させた線維芽細胞に加えて、Werner 症候群から抽出した線維芽細胞で検討を行った。定量 PCR では複製老化させた NHDF 同様、Werner 症候群の細胞では IFN の発現増加を認めないにもかかわらず、ISGs の発現が増加していた。また、免疫細胞染色で STAT1、STAT2、IRF9 が核内に移行していることが示された。Western blotting では Werner 症候群由来の線維芽細胞で STATs の発現が増加していたが、リン酸化 STATs については増加していなかった。以上より Werner 症候群においても、非リン酸化 ISGF3 によって ISGs の発現が誘導されていることが示唆された。
6. 上記の *in vitro* で明らかになったことが、生体内で起きているかの一つの例として、肝

組織アレイを用いて免疫組織染色を行った。すると、高齢患者の肝星細胞では、若年患者に比べ、STAT1、STAT2 のいずれにおいても発現が増加していた。

以上本論文では、老化細胞において ISGs が高発現しており、その機序として非リン酸化 STATs を伴う非リン酸化 ISGF3 により ISGs の発現が誘導されていることを明らかにした。老化細胞において増加している非リン酸化 STATs や ISGs の生物学的意義については今後さらなる検討が必要であるが、老化の病態に関与している可能性があり、本研究は老化関連疾患の病態解明の一助となりうる、重要な知見であると考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。