

審査の結果の要旨

氏名 前原奈都美

本研究は、肥満抑制作用を持つ Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) による非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) および非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH) 病態への影響を検討するために、野生型 ($AIM^{+/+}$) マウスおよび AIM 欠損 ($AIM^{-/-}$) に対して高脂肪食を負荷した NAFLD および NASH 病態モデルの解析を発端とし、AIM の新規機能である肝細胞がん (Hepatocellular carcinoma: HCC) に対する抑制作用のメカニズムを解明することを目的としたものであり、下記の結果を得ている。

1. $AIM^{+/+}$ マウスおよび $AIM^{-/-}$ マウスに高脂肪食を負荷し、肝重量や肝臓の中性脂肪含有量を比較したところ、 $AIM^{+/+}$ マウスと比較し、 $AIM^{-/-}$ マウスにおける脂肪肝の亢進を確認した。初代培養肝細胞に AIM を添加した培養系から、AIM は肝細胞内に取り込まれることが明らかになった。また、抗 AIM 抗体による免疫沈降を用いた解析から、AIM は肝細胞内で脂肪酸合成酵素 (Fatty acid synthase: FASN) に結合することが明らかになった。さらに、高脂肪食を負荷した $AIM^{+/+}$ マウスおよび $AIM^{-/-}$ マウスの肝臓における FASN の活性や FASN の下流である脂肪滴のコーティングプロテイン *Fat-specific protein 27 (FSP27)* の遺伝子発現をそれぞれ測定したところ、 $AIM^{-/-}$ マウスと比較し、 $AIM^{+/+}$ マウスの肝臓において、FASN の活性および *FSP27* の遺伝子発現が低かったことから、AIM は肝細胞内において、FASN の機能を阻害することで脂肪融解を促進し、脂肪肝を抑制することが明らかになった。
2. $AIM^{+/+}$ マウスおよび $AIM^{-/-}$ マウスに高脂肪食を負荷したところ、 $AIM^{+/+}$ マウスにおいては、脂肪肝の亢進のみを認めたが、 $AIM^{-/-}$ マウスにおいて、顕著な肝細胞がん (Hepatocellular carcinoma: HCC) の腫瘍形成を認めた。さらに、高脂肪食を負荷した $AIM^{-/-}$ マウスに対し、長期間にわたって継続的に AIM を投与することにより、HCC の腫瘍形成が抑制されることを確認した。以上のことから、AIM は HCC 抑制作用を有することが明らかになった。
3. C57 系統由来の HCC 細胞株である Hepa1.6. に $AIM^{+/+}$ マウス血清や $AIM^{-/-}$ マウス血清、AIM を添加して培養した結果、HCC 細胞において、AIM は細胞内に取り込まれず、細胞表面上に集積することが明らかになった。また、高脂肪食負荷によってマウス肝臓に生じた HCC においても同様に、HCC 細胞表面上への AIM の集積を認めた。さらに、AIM の HCC 細胞表面上集積の原因としては、高脂肪食を負荷した $AIM^{-/-}$ マウス肝臓の非がん部位およびがん部位における、エンドサイトーシス関連遺

伝子の発現量を解析した結果から、一部の上皮系がんの特徴であるエンドサイトーシス不良であることが示唆された。

4. AIM を恒常的に細胞表面上に結合した形で発現する安定細胞株 (Membrane-bound AIM/ Hepa1.6: MB-AIM/ Hepa1.6) を作製し、*AIM*^{-/-} マウス肝臓に移植したところ、MB-AIM/ Hepa1.6 は *AIM*^{-/-} マウス肝臓にほとんど生着しなかった。また、ドキシサイクリン (Dox) の投与により、AIM を細胞表面上に結合した形で発現する安定細胞株 (Inducible membrane-bound AIM/ Hepa1.6: iMB-AIM/ Hepa1.6) を作製し、*AIM*^{-/-} マウス肝臓に移植した。移植した iMB-AIM/ Hepa1.6 が *AIM*^{-/-} マウス肝臓内においてコロニーを形成後 (移植 1 週間後)、Dox を投与し、移植細胞に AIM を発現させると、6-7 時間後の時点において、迅速なネクローシスが生じることを確認した。
5. iMB-AIM/ Hepa1.6 のマウス肝臓への移植実験において、Dox 投与後 2 時間の時点において、移植コロニーにおける C3 および膜侵襲複合体 (Membrane attack complex: MAC) の集積を確認した。また、MB-AIM/ Hepa1.6 を補体系が活性化されない C3 欠損 (*C3*^{-/-}) マウスに移植したところ、MB-AIM/ Hepa1.6 が *C3*^{-/-} マウス肝臓内において生着することを確認した。よって、AIM が HCC 細胞表面上に集積することによって生じる迅速なネクローシスは、補体系の活性化に起因することが明らかになった。また、免疫沈降法を用いた系において、AIM と自己細胞を補体系の攻撃から防御している補体制御因子 (CD55, Crry, Complement factor H, CD59) が結合することを確認したことから、AIM の細胞表面上集積により、補体系の活性化が誘導される機序としては、AIM が各補体制御因子と結合することで、その働きを阻害し、補体系による攻撃を可能にしていることが示唆された。

以上、本論文は疾患モデルマウスを用いた解析から、これまで肥満抑制作用を有することが知られてきた AIM の新たな機能として、HCC 抑制作用を明らかにした。本研究はこれまで生活習慣の改善以外に有効な治療法がなかった NASH による HCC だけでなく、様々な原因に起因する HCC の新規治療法の基盤となる研究成果として、重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものであると考えられる。