

論文の内容の要旨

論文題目 合成 IgM-Fc を用いた血中 AIM の安定化による新たな肥満治療戦略

氏 名 甲斐 敏裕

【背景】

ライフスタイルや食習慣の欧米化に伴い、現代社会では肥満の割合が増加している。肥満は、癌・脳卒中・心筋梗塞といった命に関わる疾患を招くメタボリックシンドロームや肥満症の土台となるため、公衆衛生上の重要課題となっている。メタボリックシンドロームは内臓脂肪型肥満に高血糖・高血圧・脂質異常症のうち2つ以上を合併した状態として定義され、肥満症は BMI \geq 25 に加え、耐糖能障害・脂質異常症・高血圧など 11 種類の健康障害のいずれかの発症で診断される。両者は共通する部分が多いが、肥満症は主に食事療法と運動療法で治療されており、有効な薬剤開発が待たれている点異なる。

AIM (apoptosis inhibitor of macrophage) は、マクロファージにより特異的に産生される分泌タンパク質である。これまでの研究から、AIM は脂肪細胞に取り込まれ、脂肪酸合成酵素に結合して阻害することにより、脂肪分解を促進することが分かっている。血中の AIM は、IgM 5 量体に結合することによって、腎排泄から保護されている。ゆえに、IgM 欠損マウスの血中 AIM 値は非常に低く、AIM を静脈内投与しても速やかに尿中に排泄されてしまう。同様に、野生型マウスにおいても、ほとんどの血中 IgM には既に内因性の AIM が結合しているため、AIM を投与しても血中 AIM 値はすぐに元に戻ってしまう。そこで、私は AIM を肥満治療に役立てるため、血中 IgM が低値または正常値の個体に対して、血中 AIM 値を効果的に増加させる戦略について検討した。

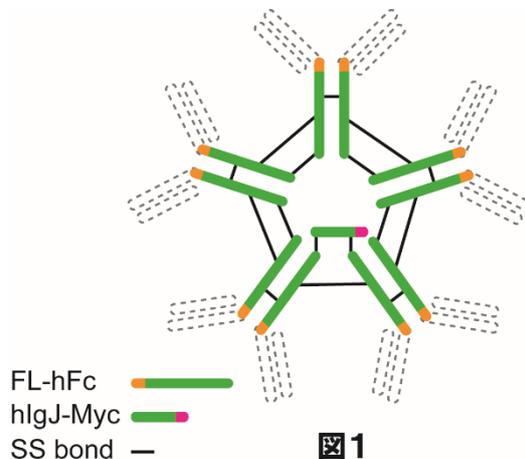
【結果と考察】

はじめに、AIM が IgM のどの領域に結合しているかを探索した。AIM は IgM の可変領域の型に関わらず、異なるモノクローナル IgM に結合できる。そこで、AIM は IgM の Fc 領域に結合している可能性が高いと考え、分子間相互作用解析システム Biacore を用いた解析を実施した。Biacore で結合速度定数や親和定数を算出するには、単量体の IgM-Fc を用いる必要がある。ヒト AIM をセンサーチップ表面に固定化し、精製ヒト IgM-Fc 単量体を流路に注入して相互作用を測定したところ、AIM と合成 IgM-Fc は特異的な結合を示し、結合速度定数 (K_a) は 2.05×10^4 ($1/Ms$)、解離速度定数 (K_d) は 3.15×10^{-3} ($1/s$)、解離定数 (K_D) は 1.53×10^{-7} (M) と算出された。なお、抗原-抗体結合の K_a は約 $10^5 \sim 10^6$ 、 K_d は $10^{-3} \sim 10^{-2}$ であり、AIM と IgM-Fc 単量体の結合は、低親和性の抗原-抗体相互作用に相当する。

IgM の Fc 領域は、3つのイムノグロブリンドメイン (CH2、CH3、CH4) から成っている。そこで、AIM の結合領域をさらに絞り込むため、短い合成 IgM-Fc を作製し、AIM に対する結合ドメインを共免疫沈降法で解析した。その結果、AIM は CH2-3 ドメインと CH4 ドメインの両方に結合し、複数の結合部位があることが示唆された。興味深いことに、CH2-3 ドメインを CH2 と CH3 の各ドメインに分割すると、AIM の結合が見られなくなった。したがって、この2つのドメインが形成する3次元構造が AIM との結合面を形成している可能性がある。

ヒト IgM-Fc には4カ所の N 型糖鎖結合部位があるが、その生理的意義は未だによく分かっていない。そこで、糖鎖修飾部位のアスパラギンをグルタミンに置換した変異 IgM-Fc を作製し、糖鎖修飾の機能について検討した。最初に、培養上清への分泌能を調べたところ、N209Q、N272Q、N272Q/N279Q、N209Q/N272Q/N279Q は培養上清中に分泌されたのに対し、N209Q/N272Q、N209Q/N279Q、N209Q/N272Q/N279Q/N439Q は細胞外への分泌能を失い、細胞内に留まっていた。次に、糖鎖修飾を3つ欠失した N209Q/N272Q/N279Q が5量体として分泌されているのか、非還元条件のウェスタンブロッティングで調べたところ、2量体に相当する約 220 kDa のシグナルしか検出されなかった。以上の検討から、糖鎖修飾の欠失により、合成ヒト IgM-Fc 5量体の分泌に問題が生じることが分かった。

AIM と IgM-Fc 単量体が十分な親和性で結合することが分かったため、続いて AIM と IgM-Fc 5量体の結合について調べた。ヒト IgM-Fc 5量体は、FLAG タグを Fc 領域の N 末端に融合した FL-hFc と、Myc タグを IgJ の C 末端に融合した hIgJ-Myc を、HEK293T 細胞に共発現させて作製した。このようにタグを付加すれば、IgM の5量体形成だけでなく、J 鎖の効率的な結合も阻害しない (図1)。FL-hFc の5量体形成と IgJ の結合は、非還元条件のウェスタンブロッティングで確認した。FL-hFc 5量体とヒトおよびマウス AIM の結合を確認するため、抗 FLAG 抗体を用いた共免疫沈降を行った結果、FL-hFc 5量体は、ヒト AIM とマウス AIM の両方に結合することが示された。



血中で AIM は IgM と結合することにより安定化されるため、分泌型 IgM 欠損 ($\Delta s\mu$) マウスの AIM 産生量は野生型マウスと同等であるにもかかわらず、血中 AIM 値は著しく低い。そこで、 $\Delta s\mu$ マウスに合成 IgM-Fc を投与することにより、AIM 値を回復させることが可能かを調べた。1 mg の精製 FL-hFc 5量体を $\Delta s\mu$ マウスに静脈内投与し、経時的に血液を採取したところ、投与した FL-hFc の半減期は 12~16 時間であり、マウス IgM の本来の半減期とほぼ同じであった (図2A)。血中 AIM 値は投与 24 時間後にピークに達し、野生型マウスの AIM 値の約 35%にまで増加した (図2B)。その後、血中 FL-hFc 値の減少に伴って、AIM 値もゆる

やかに減少した。FL-hFcの投与前と投与後4日目において、脾細胞数や血清イムノグロブリン値 (IgM、IgG) のような免疫学的パラメーターに有意な変化は認められなかった。FL-hFcには抗原結合部位がないため安全性が高いと考えられるが、投与5日目以降の免疫反応については、今後の研究が必要である。

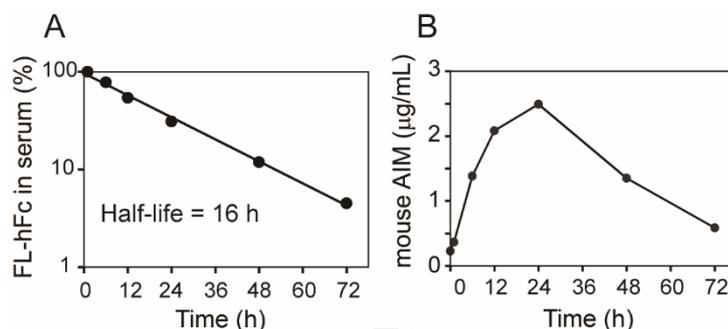


図2

Δsµマウスに FL-hFc 5 量体を投与することにより血中 AIM の半減期を延長できたため、次に、正常レベルの IgM が存在する条件下で AIM 値を増加させる方法について考えた。野生型マウスの血中 IgM は内因性 AIM で占められており、投与した AIM が結合する余地はほとんど残っていない。そこで、私は FL-hFc 5 量体とヒト AIM の複合体 (hFc-AIM) を作製した。具体的には、FL-hFc 5 量体を発現させた HEK293T 細胞と、ヒト AIM を発現させた HEK293T 細胞を共培養し、その培養上清を 2 種類のアフィニティーカラム (抗 AIM 抗体および抗 FLAG 抗体を結合したカラム) に順次通して、hFc-AIM 複合体のみを精製した。100 µg の精製 hFc-AIM を静脈内投与した野生型マウス (C57BL/6) を経時的に採血し、マウスとヒト AIM の両方に結合する抗 AIM ポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。マウスとヒトの AIM は糖鎖修飾が異なるため、分子量で区別することができる (mAIM; 45 kDa、hAIM; 37 kDa)。対照として、100 µg の hFc-AIM に含まれる AIM 量に相当する、20 µg の hAIM を別の野生型マウスに静脈内投与した。その結果、hAIM のみを投与した場合は、マウスにおける hAIM の血中半減期は 2 時間以下であった。一方、hFc-AIM を投与した場合の hAIM の血中半減期は約 12 時間であり、AIM 単独の投与に比して、6 倍以上も半減期が長くなった (図 3)。

最後に、hFc-AIM 複合体として投与した AIM が機能的であるかを確認するため、hAIM の脂肪細胞への取り込みについて調べた。500 µg の精製 hFc-AIM を AIM⁺肥満マウスに静脈内投与し、投与 3 時間後の精巣上体周囲脂肪組織を免疫組織学的に解析した。その結果、脂肪細胞は AIM 陽性に染色され、投与した hAIM を取り込んでいることが示され

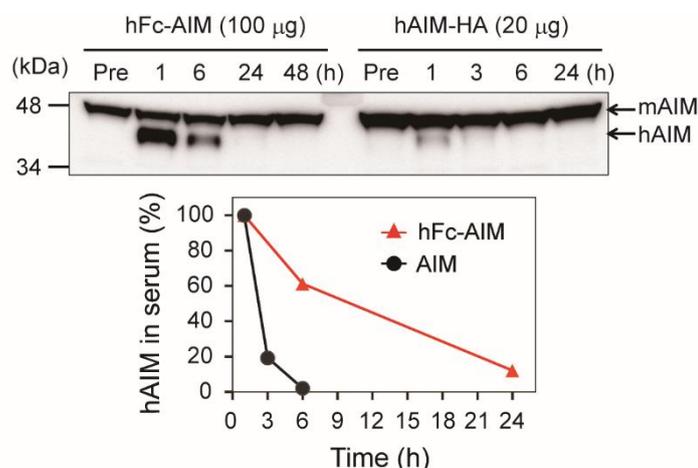


図3

た。AIMはマクロファージにも取り込まれるため、脂肪組織中のマクロファージもAIM陽性に染色された。以前の研究において、脂肪細胞に取り込まれたAIMが脂肪酸合成酵素を阻害し、脂肪滴のサイズ縮小や脂肪分解を誘導することが示されている。したがって、hFc-AIMの反復投与による肥満抑制効果が期待できる。

【まとめ】

本研究では、肥満症およびメタボリックシンドロームの新たな治療法として、血中AIM値を増加させる戦略について検討した。その結果、第一に、合成ヒトIgM-FcがJ鎖を含む5量体を形成し、ヒトおよびマウスAIMと結合することを示した。第二に、精製IgM-Fcの投与により、分泌型IgM欠損マウスの内因性AIMを安定化し、血中AIM値を増加させることができた。第三に、Fc-AIM複合体の投与により、野生型マウスのAIM値を効果的に増加させることができた。また、複合体として投与したAIMが脂肪細胞に取り込まれていることを示した。

今後は、合成IgM-Fcの半減期延長による低コスト化や、長期投与による肥満抑制効果と安全性の確認を行い、合成IgM-FcやFc-AIM複合体を用いた新たな肥満治療戦略の確立を目指したい。