【別紙２】

審査の結果の要旨

氏名　　甲斐　敏裕

本研究は、新たな肥満治療戦略として、脂肪細胞に取り込まれ、脂肪分解を促進する作用を持つ分泌タンパク質 AIM（apoptosis inhibitor of macrophage）の血中濃度を増加させる方法について検討したものであり、下記の結果を得ている。

１．　AIM が IgM のどの領域に結合しているかを探索するため、分子間相互作用解析システム Biacore を用いて、AIM と IgM の Fc 領域（IgM-Fc）の親和性を解析した。その結果、ヒト AIM とヒト IgM-Fc 単量体は特異的な結合を示し、結合速度定数（Ka）は 2.05×10^{4}（/Ms）、解離速度定数（Kd）は 3.15×10^{-3}（/s）、解離定数（K_D）は 1.53×10^{-7}（M）と算出された。この K_D 値は、低親和性の抗原―抗体相互作用に相当する。

２．　IgM-Fc の AIM に対する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 が IgM-Fc のどのドメイン（CH2、CH3、CH4）に結合するかを共免疫沈降法で解析した。その結果、AIM は IgM-Fc の２ヵ所（CH2-3 ドメイン、CH4 ドメイン）と相互作用することを示した。CH2-3 ドメインを CH2 と CH3 の各ドメインに分割すると、AIM との結合が見られなくなることから、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考えられた。

３．　IgM-Fc に存在する４ヵ所の N 型糖鎖の生理的意義は未だによく分かっていないため、糖鎖結合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、培養上清への分泌と５量体形成について調べた。その結果、糖鎖を全て欠失した 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。糖鎖を３つ欠失した N209Q/N272Q/N279Q は細胞外への分泌を確認できたものの、培養上清を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、５量体ではなく、２量体に相当する分子量のシグナルしか検出されなかった。すなわち、糖鎖修飾の欠失により、IgM-Fc５量体の分泌に問題が生じることを明らかにした。

４．　１．で 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-Fc５量体との結合について調べた。FLAG タグをヒト IgM-Fc の N 末端に結合した FL-hFc と、Myc タグをヒト IgJ の C 末端に結合した hIgJ-Myc を、HEK293T 細胞に共発現させることにより、J 鎖を含む IgM-Fc５量体を作製することができた。共免疫沈降法により、この合成 IgM-Fc５量体はヒト AIM（hAIM）とマウス AIM（mAIM）の両方に結合できることを示した。

５．　AIM の産生は正常であるにもかかわらず、分泌型 IgM を欠損するため血中 AIM 値が著しく低いΔsμマウスを用いて、合成 IgM-Fc を投与することにより血中 AIM 値を回復させることが可能かを調べた。1 mg の精製 IgM-Fc 5 量体をΔsμマウスに静脈内投与したところ、投与した IgM-Fc の半減期は 12～16 時間であり、マウス IgM 本来の半減期とほぼ同じであった。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%にまで増加することを示した。

６．　野生型マウスの血中 IgM は内因性 AIM で占められており、新たに投与した AIM が結合する余地はほとんど残っていない。そこで、ヒト IgM-Fc 5 量体と hAIM の複合体（hFc-AIM）を作製し、hFc-AIM 複合体と hAIM 単独を野生型マウスに投与した場合の hAIM の血中半減期を比較した。その結果、hAIM 単独投与の場合は hAIM の血中半減期が 2 時間以下であったのに対し、hFc-AIM 複合体を投与した場合の hAIM の血中半減期は約 12 時間であった。すなわち、hFc-AIM 複合体として投与することにより、AIM 単独の投与に比して、6 倍以上も半減期を延長できることを示した。

７．　hFc-AIM 複合体として投与した AIM が機能的であるかを調べるため、hAIM の脂肪細胞内への取り込みを免疫組織化学染色で調べたところ、脂肪細胞が AIM 陽性に染色され、投与した hAIM を取り込んでいることを示した。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。

以上のとおり、本研究は合成 IgM-Fc を用いて血中 AIM を安定化することにより、血中 AIM 値を効果的に増加できることを明らかにした。特に、Fc-AIM 複合体の投与は、合成 IgM-Fc の投与に比して投与直後から高い血中 AIM 値が得られ、AIM 単独投与に比して AIM の血中半減期が大幅に延長されるため、新たな肥満治療戦略の確立に寄与することが期待され、学位の授与に値するものと考えられる。