

## 論文の内容の要旨

論文題目 **Niemann-Pick disease type C2** タンパク質による細胞増殖抑制  
ならびに脂肪蓄積促進機構の解明

氏名 安達 健朗

### 【序】

細胞の増殖は動物個体の発生段階および細胞のおかれた環境によって正または負に調節されている。この制御機構が破綻すると、がん为代表されるような細胞の無秩序な増殖をきたす。細胞におけるエネルギー代謝も増殖と同様に、その貯蔵および消費が厳密に制御されている。細胞間で協調した増殖と代謝の制御を達成する為に、増殖因子やホルモン等の体液因子が重要な役割を果たしている。これらの体液因子を明らかにすることは、がんや代謝疾患の成因を理解し、治療法の確立を目指す上で重要な課題である。

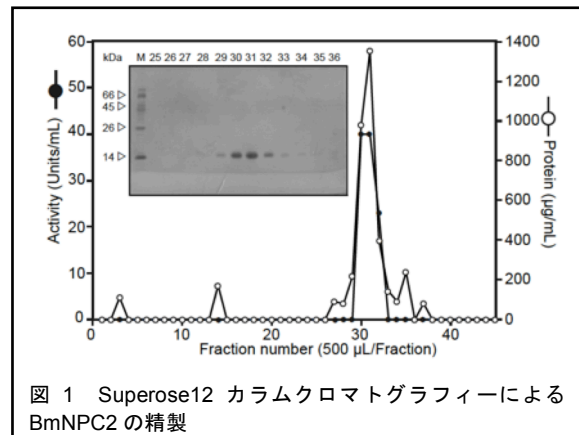
細胞の増殖と代謝を制御する重要な体液因子は、昆虫から哺乳動物に至るまで広く保存されていると考えられる。カイコ由来培養細胞である **BmN4** は、昆虫脂肪細胞のモデルとなることが提唱されている。しかしながら、**BmN4** 細胞の増殖や脂肪蓄積を制御する内因性の体液因子の実体は不明である。本研究において私は、昆虫であるカイコの体液が **BmN4** の増殖を抑制すること、および脂肪蓄積を促進することを見出した。私は生理活性を指標とした探索により、これまで明らかにならなかった体液因子を同定することが可能であると考えた。そしてこの因子および分子機構を明らかにすることは動物が持つ細胞増殖ならびに脂肪蓄積の制御機構の理解に資するとともに、がんや生活習慣病を標的とした創薬の繋がると私は考え本研究に着手した。

さらに本研究では、カイコにおいて同定した因子 **Niemann-Pick disease type C2(NPC2)** タンパク質の哺乳動物における重要性を明らかとするため、マウス脂肪細胞 **3T3-L1** およびマウス腹水がん細胞 **FM3A** を用いて、脂肪蓄積促進ならびに細胞増殖抑制機構のさらなる解明を試みた。

## 【結果・考察】

### 1. カイコ体液中の細胞増殖抑制因子の同定

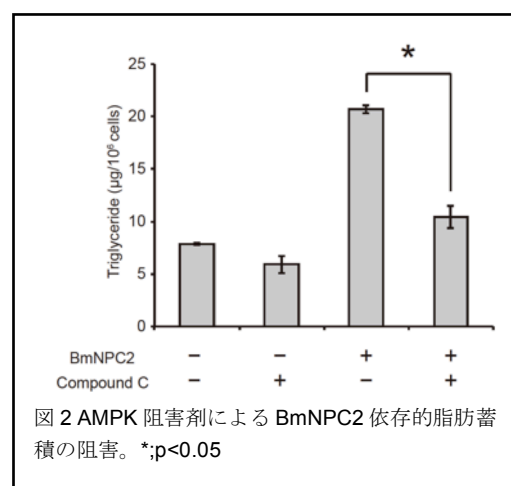
カイコ体液を細胞培養培地に添加する事により BmN4 細胞の増殖が抑制され、同時にトリグリセリドの蓄積量が増大することを見出した。これらの活性を担う体液因子を明らかにするため、私は $[^3\text{H}]$ チミジン取込みアッセイによって細胞増殖抑制を評価し、その抑制活性を指標とした精製を試みた。最終精製段階である Superose12 カラムクロマトグラフィーにおいて、SDS-



ポリアクリルアミドゲル電気泳動において分子量 15kDa の単一バンドを示し、かつタンパク質量と BmN4 細胞の細胞増殖抑制活性の挙動の一致が見られる画分を得た(図 1)。このタンパク質の内部アミノ酸配列は NPC2 タンパク質のカイコにおけるホモログ BmNPC2 の部分配列と一致していた。C 末端に His-tag を融合させた BmNPC2 リコンビナントタンパク質を作出したところ、BmN4 細胞の細胞増殖抑制活性を有し、その比活性はカイコ体液から得た最終精製画分と同程度であった。さらに、リコンビナント BmNPC2 の添加によって BmN4 細胞のトリグリセリド蓄積が促進された。これらの結果から、細胞増殖を抑制し、トリグリセリド蓄積を増大させるカイコ体液因子の実体は BmNPC2 であることが示唆された。

### 2. NPC2 の下流で働く細胞内シグナルの解明

NPC2 は真核生物において高度に保存されたコレステロール結合タンパク質であり、細胞内外のコレステロール輸送に働くことが知られている。私は本研究においてコレステロール結合能を欠失させる変異 F90A を導入したリコンビナント BmNPC2 を作出し、脂肪蓄積へのコレステロール結合の必要性を検討した。その結果、F90A 変異の導入によっては BmNPC2 による BmN4 細胞に対するトリグリセリド蓄積の促進活性は失われなかった。したがって、BmNPC2 のコレステロール結合能は体液因子としての機能に不要であると考えられた。

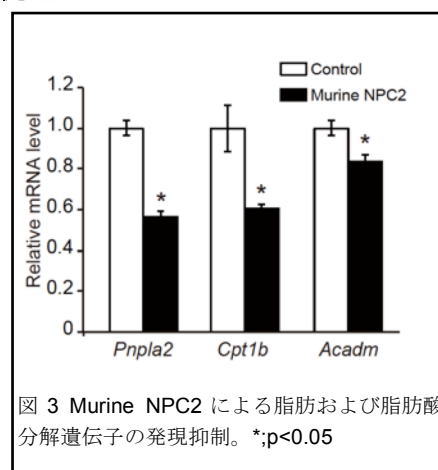


そこで次に、細胞増殖の抑制とトリグリセリド蓄積の増大にともに関与する細胞内因子

として AMPK に着目した。その結果、BmNPC2 を添加した時に BmN4 細胞における AMPK の活性化型リン酸化が亢進することを見出した。さらに、AMPK の阻害剤である Compound C の添加によって BmNPC2 によるトリグリセリドの蓄積が抑制される事を明らかにした(図 2)。以上の結果は、BmNPC2 は AMPK の活性化を介して BmN4 細胞のトリグリセリド蓄積を促進することを示唆するものである。

### 3. NPC2 によるマウス脂肪細胞に対する脂肪蓄積の促進

次に細胞外 NPC2 が哺乳動物の細胞においてもトリグリセリド蓄積を促進するか否かを検討した。真核生物において高度に保存された NPC2 は、細胞内のコレステロール輸送活性に関して酵母 NPC2 とヒト NPC2 が交換可能であることが知られている。マウス 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化誘導において、BmNPC2 または murine NPC2 を添加することにより、分化マーカー遺伝子 *aP2* の発現量の増大を引き起こした。したがって、体液因子としての NPC2 の生物種を超えた機能の



互換性が示唆された。また、murine NPC2 の添加により 3T3-L1 脂肪細胞のトリグリセリドの蓄積量を約 20%増大した。このとき、murine NPC2 の添加は脂肪細胞トリグリセリド分解酵素をコードする *Pnpla2* 遺伝子、脂肪酸分解の律速酵素である *Cpt1b*、*Acadm* 遺伝子の発現量を減少させた(図 3)。以上の結果は、NPC2 がマウスの細胞分化と脂肪細胞におけるトリグリセリド蓄積を促進することを示唆している。さらに、3T3-L1 細胞を用いて NPC2 の受容体を探索した。3T3-L1 細胞、murine NPC2、およびクロスリンカーである DTSSP を用いて murine NPC2 の受容体候補タンパク質として Cytoskeleton-associated protein 4 (CKAP4) を同定した。CKAP4 の細胞外ドメインと GST の融合タンパク質を用いた GST プルダウンアッセイにより、murine NPC2 と CKAP4 細胞外ドメインの直接の結合が確かめられた。CKAP4 は Akt の活性を抑制することが報告されている。そこで 3T3-L1 細胞における Akt のリン酸化を評価したところ、murine NPC2 の添加によって Akt のリン酸化が減弱した。以上の結果は、CKAP4 は NPC2 の新規受容体であることを示唆している。以上の結果は、CKAP4 は NPC2 の新規受容体であることを示唆している。

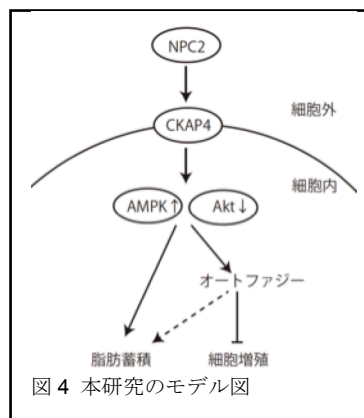
### 4. NPC2 によるマウスがん細胞に対する増殖抑制

次に私はマウス腹水がん細胞 FM3A を用いて NPC2 がマウス細胞においても増殖を抑制するか否かを検討した。その結果、BmNPC2 はマウス FM3A 細胞における AMPK のリン酸

化の亢進と増殖の抑制能を示した。次に、AMPK はオートファジーを惹起することに鑑み、オートファゴソームの構成因子である LC3 を蛍光免疫染色によって検出した。その結果、BmNPC2 の添加による LC3 の集積促進が認められた。加えて、オートファジーを阻害するクロロキンの添加によって BmNPC2 による細胞増殖抑制が部分的にキャンセルされた。したがって、BmNPC2 は少なくとも部分的にオートファジーの誘導を介して FM3A 細胞の増殖を抑制することが示唆された。さらに私は murine NPC2 も FM3A 細胞の増殖を抑制し、オートファゴソームの形成を促進することを明らかにした。

### 【総括】

本研究において私は、昆虫であるカイコとその培養細胞を用いて、細胞増殖を抑制し、かつ脂肪蓄積を促進する体液因子として新たに BmNPC2 を同定し、BmNPC2 が標的細胞の AMPK の活性化を誘導することを見出した。さらにマウス細胞を用いた解析によって、murine NPC2 が細胞の増殖の抑制および脂肪蓄積を促進することを明らかにした。図 4 に示すように、体液因子 NPC2 は CKAP4 を受容体とし、AMPK の活性化や Akt の不活性化を介して、オートファジーの惹起



による増殖抑制、あるいは中性脂肪の蓄積を促進していることが本研究により提案される。オートファジーは脂肪細胞分化ならびに脂肪蓄積に必要であることが他の研究によって示唆されている。NPC2 は肥満モデルマウスの脂肪肝や肝細胞がんにおいては発現が低下していることが報告されている。本研究によって明らかになった細胞外 NPC2 の機能を中心としてこれらの病態の理解、および NPC2 経路を標的とした治療法の開発につながると期待される。

### 【発表論文】

Adachi T, Ishii K, Matsumoto Y, Hayashi Y, Hamamoto H, Sekimizu K. Niemann-Pick disease type C2 protein induces triglyceride accumulation in silkworm and mammalian cell lines. *Biochem J.* (2014) 459(1):137-47.