〔別紙 2〕

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 安 達 健 朗

本論文では、昆虫であるカイコとその培養細胞 BmN4 を用いて、細胞増殖および脂肪蓄積を制御する新規体液因子の探索が行われている。さらに、本研究によって見出された体液因子 Niemann-Pick disease type C2 (NPC2) タンパク質の作用機構の解明を目的として、カイコ個体を用いた解析、ならびにマウス培養細胞を用いた解析を行った研究成果が記されている。

まず、第一章ではカイコ体液および BmN4 細胞を用いた体液因子の探索ならびに分子機構の解明に関する研究成果が記載されている。このうち第一節において、カイコ体液が BmN4 細胞の増殖を抑制すること、および脂肪蓄積を促進することが明らかにされている。これらの活性を担う体液因子の同定を目的として、[^{3}H]チミジン取込みアッセイによって細胞増殖抑制活性を評価する系の確立、ならびにその活性を指標とした精製が行われた。その結果、最終精製画分として 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が得られている。内部アミノ酸配列の解析から、このタンパク質は NPC2 タンパク質のカイコにおけるホモログ BmNPC2 であると同定された。そして、リコンビナント BmNPC2 が細胞増殖抑制活性を示したことから、カイコ体液中の細胞増殖抑制因子の実体は BmNPC2 であることが検証された。さらに、リコンビナント BmNPC2 が BmN4 細胞の脂肪蓄積を促進したことから、BmNPC2 は細胞増殖抑制ならびに脂肪蓄積促進を誘導する体液因子であることが示唆されている。続いて第二節では、NPC2 の最も良く知られている機能であるコレステロール結合能に着目した解析が行われ、BmNPC2 による BmN4 細胞の増殖抑制ならびに脂肪蓄積促進にはコレステロール結合能は必要ではないことが示唆されている。一方で、BmNPC2 の下流において AMP-activated protein kinase (AMPK)の活性化が誘導されることが本研究によって新しく見出された。そして AMPK 阻害剤が BmNPC2 の脂肪蓄積促進活性をキャンセルすることが明らかにされている。またカイコ個体を用いた解析により、BmNPC2 が脂肪体において高発現していること、BmNPC2 または抗 BmNPC2 血清の注射によって脂肪体における脂肪蓄積量がそれぞれ増大または減少することが見出されたことから、カイコ個体における脂肪蓄積において BmNPC2 が重要となることが示唆された。

第二章では、マウス 3T3-L1 細胞を用いて NPC2 のマウス細胞における脂肪蓄積促進

機構が解析されている。この章では 3T3-L1 細胞における脂肪蓄積を、3T3-L1 細胞が脂肪細胞へ分化する段階と、脂肪細胞へ分化した後の段階における NPC2 の作用が解析されている。3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化誘導において、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、murine NPC2 は脂肪細胞分化を促進していると考えられる。また、murine NPC2 の添加により脂肪細胞に分化した 3T3-L1 細胞の脂肪蓄積量が増大した。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。これらの結果は、murine NPC2 がマウスの細胞分化と脂肪細胞における脂肪蓄積を促進することを示唆している。続いて、3T3-L1 細胞とタンパク質クロスリンカーを用いて 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。

最後に第三章では、マウス腹水がん細胞 FM3A を用いて NPC2 のマウス細胞に対する増殖抑制活性が解析されている。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 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されている。

本論文ではカイコをモデル生物とした解析により、細胞増殖および脂肪蓄積を制御する体液因子の同定が行われ、その作用経路と哺乳動物における保存性の解明という独創的な創薬基盤研究が展開された。本研究は、肥満や脂肪肝などの脂肪代謝異常やがん等の細胞増殖制御異常の成因の理解、ならびにこれらの疾患に対する治療法の確立につながるものであると考えられる。

よって本論文は、博士(薬科学)の学位請求論文として合格と認められる。