

学位論文審査の結果の要旨

平成 29年 1月 16 日

審査委員	主 査	中 村 隆 範		
	副 主 査	芳 地 一		
	副 主 査	桑 原 知 巳		
願 出 者	専攻	分子情報制御医学	部門	病態制御医学
	学籍 番号	13D737	氏名	佐倉 雄馬
論 文 題 目	A quantitative study on splice variants of <i>N</i> -acylethanolamine acid amidase in human prostate cancer cells and other cells.			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格 (該当するものを○で囲むこと。)			

〔 要 旨 〕

【背景および目的】

N-アシルエタノールアミンは抗炎症・鎮痛・食欲抑制作用を示す脂質メディエーターであり、近年、癌細胞の増殖抑制作用が報告されている。「*N*-アシルエタノールアミン水解酸性アミダーゼ (NAAA)」は *N*-アシルエタノールアミンを加水分解するリソソーム酵素であり、前立腺癌細胞株で豊富に発現しているその発現強度が前立腺癌の悪性度と負に相関するという報告もある。ヒト NAAA mRNA には 3' 側が異なる複数のスプライスバリエントが存在するが、その発現解析はほとんど行なわれていない。本研究では NAAA mRNA の各バリエントを個々に測定する定量的 PCR (qPCR) 法を開発し、種々の前立腺癌細胞株を含む多種類の細胞に適用した。また、バリエントから翻訳された蛋白質の翻訳後修飾・酵素活性についても検討した。

【方法】

- 1) NAAA mRNA 総量の測定
ヒト前立腺癌細胞株 (PC-3, LNCaP, AI-LNCaP, DU145, VCaP)、正常前立腺上皮細胞 (PrEC)、他のヒト由来細胞株 (THP-1, MCF-7, HeLa, HEK293, CMK) における NAAA mRNA の全スプライスバリエントの総量を qPCR 法で定量した。
- 2) 主要なスプライスバリエントの定量
NAAA mRNA 総量が最も多かった LNCaP 細胞を用いて、conventional PCR で発現量の多かった 4 種類のスプライスバリエントを同定して a1, a2, b2, c2 と名付け、各々に特異的なプライマーを用いた qPCR 法を開発した。本法を用いて前述の細胞株で各バリエントの発現量を定量・比較した。
- 3) バリエントから翻訳された蛋白質の解析
NAAA は前駆体蛋白質 (不活性型) が自己触媒により限定分解を受けて成熟体となる。a1 と a2 から翻訳される同一蛋白質 (アイソフォーム A) と、b2 と c2 から翻訳される蛋白質 (それぞれ B および C) を HEK293 細胞に強制発現させ、Western blotting 法で前駆体と成熟体の発現を解析し、酵素活性も評価した。
- 4) C 末端変異体の解析
アイソフォーム B と C は構造類似蛋白質間で高度に保存されている Leu-325 と Thr-335 を欠いているので、アイソフォーム A の点変異体 L325A, L325T, T335A, T335V を HEK293 細胞に強制発現させ、前項と同様に発現量と酵素活性を解析した。

【結果】

- 1) NAAA mRNA の総量は LNCaP で最も多く、HeLa が最も少なかった。アンドロゲン感受性前立腺癌細胞である LNCaP, VCaP で発現量が多く、非感受性細胞である AILNCaP, DU145, PC3 では少なかった。
- 2) 4 種のバリエント a1, a2, b2, c2 の発現量を解析すると、いずれの細胞株でも a1 が最も多量に存在していたが、各バリエントの発現割合は細胞株毎に異なっていた。
- 3) アイソフォーム A, B, C の前駆体は全て検出されたが、成熟体は A にしか認められなかった。酵素活性も A のみで検出された。
- 4) 前駆体はすべての点変異体で検出されたが、成熟体は L325A と L325T でわずかしこ検出されず、T335A と T335V ではまったく検出されなかった。酵素活性も L325A と L325T でのみわずかに検出された。

【考察】

NAAA mRNA の総量がアンドロゲン感受性細胞株で非感受性細胞より多かったことから、アンドロゲンに対する細胞応答と NAAA の関連が示唆された。4 種類のスプライスバリエントの発現割合には細胞間で多少の差が認められた。NAAA 蛋白質の L325 と T335 が酵素機能に重要であることが判明し、阻害薬の開発に役立つ可能性が考えられた。

本論文に関する学位論文審査委員会は平成 29 年 1 月 6 日に行われた。本研究は NAAA の複数のスプライスバリエントとそれらが翻訳されたタンパク質について解析した初めての研究であり、結果に対する十分な考察もなされている。本研究で得られた成果は NAAA の機能解析と臨床応用の可能性に有用な情報をもたらしており、学術的意義も大きい。審査会において、申請者はいずれも的確に回答し、博士（医学）の学位授与に値する見識と能力を有することが認められた。よって、審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位論文に十分値するものと判定した。

審査においては以下の質疑応答が行われた。

1. 臨床における前立腺癌細胞と今回使用した前立腺癌細胞株の相関について。
(回答) 臨床的には前立腺癌が進行すると局所進展やリンパ節、実質臓器への転移が起こる。また去勢による治療を行ってもアンドロゲン感受性が無くなり、病状進展様式は様々である。今回使用した細胞株は全てヒト前立腺癌症例の転移巣（リンパ節: LNCaP, AILNCaP, 骨: VCaP, DU145, 脳: PC3）から採取され、アンドロゲン感受性を有するもの（LNCaP, VCaP）と感受性がない細胞株（AILNCaP, DU145, PC3）に分けられ、様々な病態における NAAA の変化を推察できると考えている。
2. Western blotting で、点変異体の前駆体から成熟体への変換が観察されないにもかかわらず前駆体が蓄積していないのはなぜか。
(回答) 使用している抗体が、アミノ酸配列や立体構造の変化した点変異体の前駆体を十分に認識できていない可能性や、点変異体の前駆体が不安定で一部分解した可能性が考えられる。
3. 細胞培養時にアンドロゲン（あるいはアンドロゲンレセプター拮抗薬）を加えるとどうなるか。
(回答) 今後の研究課題であり、マイクロアレイによる網羅的な解析も検討したいと考えている。
4. 前立腺癌細胞以外では、THP-1 で NAAA mRNA が多いのはなぜか。
(回答) NAAA は白血球系細胞（特にマクロファージ）に強く発現しており、基質のパルミトイルエタノールアミドの抗炎症作用を制御している可能性が考えられる。
5. 内因性の NAAA アイソフォームを Western Blotting で検出ないしは識別出来ないか。
(回答) 今回使用した抗 NAAA 抗体は特異性があまり高くないため、強制発現系でなければ検出は困難と考えられる。また NAAA の mRNA 総量に占めるスプライスバリエント b2, c2 の割合は少なく、アイソフォーム B, C の量は A より少ないことが予想され、これらの同定はさらに難しいと考えられる。さらに特異性の高い抗体の開発が望まれる。
6. スプライスバリエントの生理的意味は何か。
(回答) 研究対象である 4 つのスプライスバリエントのうち a1, a2 から翻訳されるアイソフォーム A は、酵素活性を認め N-アシルエタノールアミンの代謝に関与すると考えられる。しかし、b2, c2 からそれぞれ発現するアイソフォーム B と C には酵素活性が認められず、かつ検討した前立腺癌細胞株ではアンドロゲン感受性とも関連を認めなかった。現時点では b2, c2 の生体内での役割は不明である。

掲載誌名	Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids 第 1861 巻, 第 12 号		
(公表予定) 掲載年月	2016年 12月	出版社(等)名	ELSEVIER

(備考) 要旨は、1, 500 字以内にまとめてください。