



Title	Identification of a GPI-anchored type HDL-binding protein on human macrophages
Author(s)	松山, 晃文
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42621
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	まつやまあきふみ 松山晃文
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第16068号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Identification of a GPI-anchored type HDL-binding protein on human macrophages (ヒトマクロファージにおける GPI アンカー型 HDL 結合蛋白の同定)
論文審査委員	(主査) 教授 松澤 佑次
	(副査) 教授 木下タロウ 教授 萩原 俊男

論文内容の要旨

【背景ならびに目的】

疫学的に高比重リポ蛋白（HDL）が動脈硬化防御作用を有することが明らかとなっている。この機序として、末梢組織の余剰なコレステロールを引き抜き肝臓へ転送する、コレステロール逆輸送系が知られている。動脈硬化発症の初期段階にマクロファージ（MΦ）の泡沫化が大きく関与していることを鑑みると、MΦからのコレステロール引き抜きはコレステロール逆輸送の第一段階として動脈硬化防御に最も必要である。これまで、HDLによる末梢細胞からのコレステロール引き抜き過程には HDL 結合蛋白の関与が推察され、いくつかの候補蛋白が同定してきた。しかし、MΦにおいてコレステロール引き抜きに関与する HDL 結合蛋白は十分には明らかとなっていない。そこで本研究では、ヒト単球由来 MΦにおける HDL 結合蛋白の同定・機能解析ならびに精製を目的とした。

【方法】

ヒト単球は Ficoll-Paque 法にて末梢血から分離し、10% ヒト AB 型血清添加 RPMI1640にて 7 日間培養し、MΦへと分化させた。HDL は超遠心法にて比重 1.125–1.210 の HDL₃ 分画を分離し、FITC ないし biotin 標識した。HDL による ligand blotting は、MΦ の膜分画ないし phosphatidylinositol specific phospholipase C (PI-PLC) 処理した上清を、電気泳動後 blotting し、biotin 化 HDL にて可視化した。Detergent Resistant Membranes (DRMs) は、Hope らの方法により、Triton X-100 非可溶性膜分画として得た。コレステロール引き抜きは、放射標識 cholesterol にて 24 時間標識した MΦ を、HDL (50 μg/ml) 添加した培養液にて 4 時間培養し、培養液中に認められた放射活性を引き抜かれたコレステロールとした。

【成績】

ヒト単球由来 MΦにおいて、特異的 HDL 結合蛋白質が存在するか HDL による ligand blotting にて検討した結果、80kDa と 130kDa の HDL 結合蛋白を認めた。競合阻害実験により、これら HDL 結合蛋白は HDL を特異的に結合することが明らかとなった。

これまでに、コレステロールに富んだ細胞膜分画である DRMs がコレステロール引き抜きの主たる場所であると報告されているため、この HDL 結合蛋白が DRMs に多く分布しているか否かを、ligand blotting により検討した。130kDa の HDL 結合蛋白は膜分画と DRMs 分画でその分布に差は認められなかったが、80kDa の HDL 結合蛋白は DRMs により多く分布していた。DRMs には GPI-anchor 型蛋白が多く存在していることから、GPI-anchor 型

蛋白と HDL の関連を検討するため、GPI-anchor 型蛋白の PI-anchor を特異的に消化切断する PI-PLC にて MΦ を前処理し、HDL 結合蛋白の細胞表面における発現を flowcytometry にて検討し、CD14 と比較した。FITC 標識 HDL の結合は PI-PLC の濃度および時間依存的に低下し、それは既知の GPI-anchor 型蛋白である CD14 の発現様式と同様であった。また、PI-anchor の合成を阻害する mannosamine を培養液に加えて 18 時間培養し、同様に HDL 結合蛋白の発現を検討した。mannosamine の濃度依存的に HDL 結合蛋白の発現は低下し、それは CD14 の発現様式と同様であった。さらに、PI-PLC によって HDL 結合蛋白が培養液中に遊離されるか検討したところ、PI-PLC により培養液中に 80kDa の HDL 結合蛋白が遊離されることが ligand blotting により確認された。以上より、この HDL 結合蛋白は PI-PLC によって切断され、mannosamine によって PI-anchor の合成が阻害される GPI-anchor 型蛋白であり、その分子量が 80kDa であることが明らかになった。

PI-PLC にて単層 MΦ を処理し、GPI-anchor 型 HDL 結合蛋白が MΦ における HDL によるコレステロールの引き抜きに関与しているか否か検討したところ、PI-PLC 処理することで 31.4% 引き抜きは減少した。また、mannosamine にて単層 MΦ を培養した後、HDL によるコレステロール引き抜きを検討したところ、PI-PLC 処理と同様に mannosamine 処理においてもコレステロール引き抜きは低下しており、GPI-anchor 型 HDL 結合蛋白がコレステロール引き抜きに深く関与することが示唆された。

MΦ を PI-PLC により処理、その上清を濃縮し、HDL affinity column を用いて GPI-anchor 型 HDL 結合蛋白を精製した。純度を銀染色と HDL-ligand blotting で検定したところ、80kDa に单一バンドを認め、HDL ligand blotting によりこの蛋白は HDL と結合することが明らかとなった。

【総括】

今回、我々は新たに 80kDa の GPI-anchor 型 HDL 結合蛋白をヒト単球由来 MΦ から精製した。この HDL 結合蛋白は、ヒト単球由来 MΦ からのコレステロール引き抜きに関与していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

高比重リポタンパク (HDL) は末梢組織からコレステロールを引き抜き肝臓へと転送する、コレステロール逆輸送機構を介して動脈硬化防御作用を有することが明らかとなっている。動脈硬化の発症にマクロファージ (MΦ) の泡沫化が大きく関与していることを考慮に入れると、HDL による MΦ からのコレステロール引き抜きは動脈硬化防御に最も重要であると言える。しかし、MΦ におけるコレステロール引き抜きに関与する HDL 結合蛋白は明らかとなっていなかった。本申請者は本研究において、ヒト単球由来 MΦ に HDL を特異的に結合し、コレステロールの MΦ からの引き抜きを媒介する HDL 結合蛋白が存在することを明らかにした。この HDL 結合蛋白の分子量は、SDS-PAGE 上 80kDa と 130kDa であり、80kDa の HDL 結合蛋白は、細胞のコレステロール負荷によって誘導され、コレステロール引き抜きの主たる場であるとされる detergent resistant membranes に多く分布していた。またこの蛋白が GPI-anchor 型蛋白であることを明らかにし、世界に先駆けて 80kDa の GPI-anchor 型 HDL 結合蛋白の精製・単離に成功した。さらにこの GPI-anchor 型 HDL 結合蛋白が、HDL による MΦ からのコレステロール引き抜きに関与していることを明らかにした。動脈硬化発症に対する防御機構を解明し、血管病への治療戦略をたてる上で、今後の発展性に期待出来るものであり、医科学への貢献度が極めて高い研究といえ、従って学位授与に十分に値すると考えられる。