



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42621">https://hdl.handle.net/11094/42621</a>
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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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 松 山 晃 文
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 0 6 8 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 荻原 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、コレステロール逆転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転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されてきた。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 HDL<sub>3</sub>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に単一バンドを認め、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、コレステロール逆転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結合蛋白は明らかになっていなかった。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。