



Title	新規アディポネクチン結合蛋白質の同定と動脈硬化との関連
Author(s)	二位永, 竜
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61622
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (二位永竜)	
論文題名	新規アディポネクチン結合蛋白質の同定と動脈硬化との関連

論文内容の要旨

【目的】

脂肪細胞から特異的に分泌されるアディポネクチン (APN) は、抗糖尿病作用や抗動脈硬化作用などの多彩な生理活性を有し、肥満、冠動脈疾患、2型糖尿病症例で血中濃度が低下することが知られている。その抗糖尿病作用は受容体AdipoR1とAdipoR2を介すると報告されるが、抗動脈硬化作用の機序の詳細は十分に解明されていない。そこで、新規APN結合蛋白質を同定し、動脈硬化におけるAPN結合蛋白質とAPNの複合体の意義を明らかにすることを目的に本研究を行った。

【方法と結果】

E-selectin ligand-1 (ESL-1)の同定と機能解析

肝細胞モデルであるHepG2細胞を20%AB型血清含有培養液で48時間培養した。この細胞溶解液を抗APN抗体あるいは対照IgGで免疫沈降し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、銀染色を行った。抗APN抗体により免疫沈降された検体に特異的に認められたバンドの質量分析から、E-selectin ligand-1 (ESL-1)が同定された。APNとESL-1各々にタグを付加した蛋白質をHEK293細胞に発現させ、一方のタグに対する抗体で免疫沈降し、他方のタグに対する抗体を用いたウエスタンプロットを行い、APNとESL-1の結合を確認した。次に、ヒト単球細胞株THP-1とヒト培養血管内皮細胞を用いて、単球上のESL-1に対するAPNの影響を検討した。Tumor necrosis factor (TNF)- α 刺激により増加した血管内皮細胞への単球接着はAPNにより減少したが、ESL-1をノックダウンした単球ではこのAPNの効果は消失した。従って、APNはESL-1との結合を介して、単球の血管内皮細胞への接着を阻害することが示唆された。続いて、APNとESL-1の結合部位を検討した。ESL-1のシグナル配列に続く5アミノ酸を欠損させてもAPNとの結合は認められたが、10アミノ酸以上欠損させるとAPNの結合は消失したため、APNとの結合にはESL-1のN端から6-10番目のアミノ酸配列が重要であることが考えられた。

Mac-2 binding protein (M2BP)の同定と機能解析

ヒト血清を抗APN抗体あるいは対照IgGを用いて免疫沈降し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後に銀染色を行った。抗APN抗体での免疫沈降検体に特異的に認められたバンドの質量分析よりMac-2 binding protein (M2BP)が同定された。APNとM2BP各々にタグをつけた融合蛋白を共発現させ、一方のタグに対する抗体で免疫沈降し他方のタグに対する抗体で検出する系を用いて両者の結合を確認した。さらに、電気泳動後のM2BPを転写した膜とラベルしたAPNと反応させるファーウエスタン法を用いて、APNとM2BPの直接の結合を確認した。次に、冠動脈疾患 (CAD) 患者21名と年齢を調整した健常対照者21名における血中APN濃度、血中M2BP濃度およびM2BP-APN複合体量を検討した。CAD患者では健常対照者に比べ、血中APN濃度は約0.7倍に低下、血中M2BP濃度は約1.3倍に増加する傾向を認め

た。一方、CAD患者での血中M2BP-APN複合体量は約7.4倍と著明な増加を示した。さらに、APNの抗動脈硬化作用に対するM2BPの影響を、培養血管内皮細胞を用いて検討した。TNF- α 刺激により増加した血管内皮細胞の単球接着分子mRNA量は、APNの前処理により抑制されたが、このAPNによる抑制は、M2BPとの共培養により消失した。従って、M2BPはAPNの抗動脈硬化作用を阻害するものと考えられた。

【考察】

APNと結合する新規の細胞膜蛋白質としてESL-1を同定し、APNの新たな抗動脈硬化作用機序を明らかにした。また、新規の血中APN結合蛋白質として同定されたM2BPについては、血中M2BP-APN複合体量がCADにおいて著明に増加していること、M2BPがAPNの抗動脈硬化作用を阻害することを明らかにした。これらの成果は、動脈硬化に対する新たな診断法や治療法に繋がるものと考えられた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名(二位永竜)		
	(職)	氏名
	主査 教授	木原 進士
論文審査担当者	副査 教授	岩谷 良則
	副査 教授	三善 英知

論文審査の結果の要旨

脂肪細胞から特異的に分泌されるアディポネクチン (APN) は抗糖尿病作用や抗動脈硬化作用など多彩な生理活性を有している。抗糖尿病作用に対する受容体は既に報告されているが、抗動脈硬化作用の機序に関しては未だ十分に解明されていない。本研究は、新規 APN 結合蛋白質を同定し動脈硬化における APN と APN 結合蛋白質複合体の意義を明らかにすること目的に行った。

APN 結合蛋白質として、抗 APN 抗体で免疫沈降した検体を質量分析することにより、ヒト培養細胞から E-selectin ligand-1 (ESL-1)、ヒト血清から Mac-2 binding protein (M2BP)を同定した。

APN と ESL-1 各々に別のタグを融合させた蛋白質を培養細胞に発現させ、一方のタグに対する抗体で免疫沈降し、他方のタグに対する抗体でウエスタンプロットを行い APN と ESL-1 の結合を確認した。次に、ヒト単球細胞株とヒト培養血管内皮細胞を用いて、単球上に存在する ESL-1 に対する APN の影響を検討した。Tumor necrosis factor (TNF)- α 刺激で増加した血管内皮細胞への単球接着は APN により減少し、単球の ESL-1 をノックダウンすることで APN の作用は消失した。従って、APN が ESL-1 と結合することで単球の血管内皮細胞への接着が阻害されることが明らかとなった。また、ESL-1 の N 端 5 アミノ酸を欠損させても APN と結合したが、10 アミノ酸以上欠損させると結合は消失し、APN との結合には ESL-1 の N 端から 6-10 アミノ酸が重要であることが示唆された。従って、APN が単球上の ESL-1 に結合することで単球の血管内皮への接着を抑制するという新たな APN の抗動脈硬化機序が明らかになった。

M2BP に対しても同様に APN と別のタグをつけた融合蛋白を発現させ、一方のタグに対する抗体で免疫沈降し、他方のタグに対する抗体で検出する系を用いて APN と M2BP の結合を確認した。さらに膜に転写した M2BP とラベルした APN を反応させるファーウエスタン法を用いて、APN と M2BP の直接的な結合を確認した。

次に、臨床研究として冠動脈疾患における血中 M2BP-APN 複合体量の意義を、免疫沈降とウエスタンプロットを行って検討し、M2BP-APN 複合体量が冠動脈疾患患者で健常対照者に比し著明に増加していることを明らかにした。

さらに、培養血管内皮細胞において APN の TNF- α 刺激で誘導される単球接着分子発現を低下させる作用を M2BP が減弱させた。

従って、M2BP-APN 複合体の増加は、M2BP による APN の抗動脈硬化作用の阻害を介して、動脈硬化発症と進展に関わる可能性が考えられた。

本研究の成果は、APN 結合蛋白質による動脈硬化の新たなメカニズムを明らかにしたものであり、今後の診断法や治療法の開発に繋がる可能性があると考えられる。

以上により、本論文は博士（保健学）の学位授与に値するものと考える。