OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Protein Carbamylation Exacerbates Vascular Calcification
Author(s)	森, 大輔
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69410
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、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

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　森　大輔

論文審査担当者	（職）	氏　名
主　査	大阪大学教授	猪阪善隆
副　査	大阪大学教授	大薗恵一
副　査	大阪大学教授	坂田泰史

論文審査の結果の要旨

本研究は、蛋白質カルバミル化が血管石灰化病変に与える影響を、培養血管平滑筋細胞、大動脈リング培養系、ビタミンD/ワルファリン誘導血管石灰化モデルラットを用いて評価し、以下の結果を得ている。蛋白カルバミル化刺激にて血管石灰化が悪化し、免疫沈降/質量分析にてカルバミル化蛋白としてATP synthaseが*in vitro, in vivo*に共通して同定された。カルバミル化刺激によりミトコンドリア機能障害を認め、ミトコンドリア由来の酸化ストレスが石灰化増悪に関与していた。石灰化抑制因子ピロリン酸の合成酵素 ENPP1の発現がカルバミル化刺激により抑制され、細胞外ピロリン酸濃度の減少を認めた一方、ENPP1はカルバミル化蛋白としては同定されず、ミトコンドリア障害により生じる酸化ストレスによりENPP1の発現が抑制された。以上、本論文は、カルバミル化刺激によりミトコンドリア蛋白質の特性が変化し、ミトコンドリア障害および酸化ストレスを生じることでENPP1の発現が抑制され、血管石灰化が悪化することを示しており、学位の授与に値するものと考えられる。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	森　大輔
論文題名 Title	Protein Carbamylation Exacerbates Vascular Calcification （蛋白カルバミル化は血管石灰化の増悪因子である）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

腎不全患者では全身のさまざまな蛋白質リジン残基に尿素によるカルバミル化修飾が引き起こされることが知られている。しかしながら、蛋白カルバミル化が腎不全の病態に寄与しているか否かは不明である。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

蛋白質カルバミル化が血管石灰化病変に与える影響を、培養血管平滑筋細胞、大動脈リング培養系、ビタミンD/ワルファリン誘導血管石灰化モデルラットを用いて評価した。また、免疫沈降/質量分析にてカルバミル化された蛋白質を同定し、蛋白カルバミル化が血管石灰化に影響を与えるメカニズムを検討した。さらにヒト腎臓組織に含まれる血管も解析した。

蛋白カルバミル化刺激にて、培養細胞系、大動脈リング培養系、ビタミンD/ワルファリン誘導血管石灰化モデルラットのいずれにおいても血管石灰化が悪化した。免疫沈降/質量分析にてカルバミル化蛋白を検索したところ、ATP synthaseをはじめとするミトコンドリア関連蛋白と細胞骨格関連タンパクがin vitroおよびin vivo実験系に共通して同定された。ミトコンドリアDNAを欠失させた血管平滑筋ρ0細胞ではカルバミル化による石灰化増悪作用が認められなくなったため、ミトコンドリア関連蛋白のカルバミル化が石灰化増悪に関与していると考えられた。なお、ATP synthaseがカルバミル化されていることを免疫沈降および質量分析による翻訳後修飾解析にても確認した。そこで、In vitroモデルにおいて、カルバミル化刺激によりミトコンドリア膜電位が低下しミトコンドリア由来酸化ストレスが上昇することを、TMRE染色、Oxygen consumption rateおよびMitoSOX Red染色にて確認した。さらにMitoTEMPO存在下では、カルバミル化による石灰化増悪作用は認められなかったことから、ミトコンドリア由来の酸化ストレスが石灰化増悪に重要と考えられた。さらにIn vivoモデルにおいても、COX染色・SDH染色などを用いて、カルバミル化刺激によりミトコンドリア障害が生じることを確認した。石灰化に関わる遺伝子群を網羅的に解析したところ、石灰化抑制因子ピロリン酸の合成酵素 ENPP1の発現がカルバミル化刺激により抑制されており、細胞外ピロリン酸濃度の減少を認めた。shRNAによりENPP1をノックダウンした血管平滑筋細胞ではカルバミル化により石灰化は増悪しなかった。なお、ENPP1はカルバミル化蛋白としては同定されず、ミトコンドリア障害により生じる酸化ストレスによりENPP1の発現が抑制された。さらにヒト組織を用いた検討においても、腎不全患者では、ヒト腎組織に含まれる血管のミトコンドリア蛋白がカルバミル化されていることも確認した。

〔総　括(Conclusion)〕

カルバミル化刺激によりミトコンドリアATP synthaseの蛋白質特性が変化し、ミトコンドリア障害および酸化ストレスを生じることでENPP1の発現が抑制され、血管石灰化が悪化する。