

# バソインヒビンの受容体、機能探索及びリン酸化プロラクチン生成機序の解明

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-05-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 諸星, 和紀 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10291/21813">http://hdl.handle.net/10291/21813</a>

## 「博士学位請求論文」審査報告書

審査委員 (主査) 農学部 専任教授

氏名 針谷 敏夫 ㊞

(副査) 農学部 専任教授

氏名 戸村 秀明 ㊞

(副査) 農学部 専任准教授

氏名 中村 孝博 ㊞

- 1 論文提出者 諸星 和紀
- 2 論文題名 バソインヒビンの受容体,機能探索及びリン酸化プロラクチン生成機序の  
解明  
(英文題) A study on receptor and functions of vasoinhibin, and mechanism of  
phosphorylated prolactin mechanism

### 3 論文の構成

本論文は次の5章と謝辞および参考文献から構成されている。

序 章

第一章 バソインヒビンの受容体探索

第二章 心臓線維芽細胞におけるバソインヒビンの影響解析

第三章 リン酸化プロラクチンの産生機序解明

第四章 総合考察

### 4 論文の概要

プロラクチンは、脊椎動物脳下垂体前葉で合成・分泌される分子量約 23kDa のペプチドホルモンであり、主な生理作用は、哺乳類において乳腺の発達、乳汁合成と分泌の開始、維持であるが、多くの動物に存在し、その機能も多岐にわたっている。また、近年プロラクチンは脳下垂体以外に局所組織特異的タンパク質として産生されること（異所性プロラクチン）、リン酸化、糖付加、プロテアーゼ切断等のバリエーションが存在すること（異型プロラクチン）

が報告されており、このホルモンの多岐にわたる機能の要因であると考えられている。

本論文は近年のプロラクチン研究の進展に伴い注目されている、プロラクチンがカテプシンDなどのプロテアーゼにより切断されて生成する異型プロラクチンの一つであるバソインヒビンと、下垂体において産生後リン酸化されることにより生じるリン酸化プロラクチンに着目し、その機能解析を目的とした研究を記載したものである。

序章では、本研究の背景と目的について述べている。まずプロラクチンについてその生理学的特徴、受容体、分泌制御など、これまでの研究知見について詳細に述べ、次に本研究で着目した異型プロラクチンであるバソインヒビンの産生機序及び機能について述べられ、バソインヒビンが関連すると考えられている妊娠関連疾患である周産期心筋症について解説し、これらの疾患とバソインヒビンとの関連性について着目した動機、目的、意義が述べられている。また、本研究で扱ったもう一つの異型プロラクチンであるリン酸化プロラクチンについて、これまでの知見および研究背景・目的について概説している。

第一章では、バソインヒビンの作用機序の解明に重要な、これまで明確に特定されていないバソインヒビン受容体の探索を目的とし、その結合能や作用への関与を解析した。

過去の研究知見から受容体候補としてインテグリンに着目し、インテグリン $\beta 1$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ を用いて固相結合解析により結合能を確認し、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ に最も高い結合強度が確認された。さらに両者についてインテグリン抗体を用いた共免疫沈降を行ない、プロラクチン抗体を用いた western blotting で検出した。その結果、バソインヒビンとインテグリン $\alpha 5\beta 1$ が結合することを明らかにした。

さらに、細胞におけるバソインヒビンの作用発現にインテグリン $\alpha 5\beta 1$ が関与しているかを確認するため、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた免疫中和実験を行い、TUNEL法によりアポトーシス陽性細胞率を観察した結果、バソインヒビンにより増加するアポトーシス陽性細胞がインテグリン $\alpha 5\beta 1$ の中和により有意に低下することを確認している。

本章ではインテグリン $\alpha 5\beta 1$ がバソインヒビンの受容体である可能性を示し、また血管内皮細胞においてバソインヒビンはインテグリン $\alpha 5\beta 1$ を介してアポトーシス誘導作用を発現することを示唆している。

第二章では、妊婦の周産期心筋症に関連していると考えられているバソインヒビンについて、心筋細胞の繊維化に関与している可能性について解析した。

バソインヒビンが心臓線維芽細胞の活性化に関与するかを確認するため、バソインヒビンを含む培地で24,48時間培養した心臓線維芽細胞の遺伝子発現を Real Time PCR で解析した結果、活性化マーカーの $\alpha$ -Smooth Muscle Actin( $\alpha$ -SMA)の発現量が約1.4倍に増加していた。また、TGF- $\beta$ の関与を確認する為、同様に Real Time PCR で遺伝子発現量を確認した結果、バソインヒビンによる TGF- $\beta$ の発現量に変化は見られなかった。また、周産期心筋症患者血中において TGF- $\beta$ 非依存的に線維化を誘導することが報告されている Interleukin-6(IL-6)が有意に増加していることから、線維芽細胞におけるバソインヒビンの IL-6 発現に対する影響を Real Time PCR で確認した。その結果、線維芽細胞においてバソインヒビンは IL-6 発現

を有意に増加させた。

本章ではバソインヒビンが心臓線維芽細胞の分化マーカー発現量を有意に増加させ、TGF- $\beta$  発現には影響を与えないことを示し、またバソインヒビンは TGF- $\beta$  非依存的に線維化を誘導する IL-6 の発現量を有意に増加させることを示した。このことから、バソインヒビンによる心臓線維芽細胞の活性化はバソインヒビンにより増加した IL-6 を介して引き起こされる可能性が示唆された。

第三章では、異型プロラクチンの一種であるリン酸化プロラクチンの産生に関し、これまでの研究において、エストロゲンを投与したマウス下垂体中でリン酸化プロラクチンが同定されていることから、エストロゲンを投与したマウス下垂体内におけるリン酸化酵素の同定とエストロゲンのプロラクチンリン酸化への関連を解明することを目的とした。

下垂体内におけるプロラクチンとリン酸化酵素の局在を確認するため、エストロゲン投与マウス下垂体の免疫組織化学染色を行った結果、プロラクチンとリン酸化酵素の一つである p21 activated kinase2 (PAK2) の共局在が確認された。また、エストロゲン投与マウス下垂体中における PAK2 発現量を real time PCR および western blotting で確認した結果、PAK2 の遺伝子、タンパク発現量のエストロゲンによる増加は見られなかったが、活性型 PAK2 の比率の上昇が見られた。次に、下垂体細胞内におけるエストロゲンと PAK2 によるプロラクチンリン酸化の関係性を明らかにするため、PAK2 siRNA (siPAK2) を下垂体初代培養細胞に導入し PAK2 をノックダウンし、その細胞にエストロゲン刺激をした際のリン酸化プロラクチン量を二次元電気泳動により確認した。その結果、siPAK2 を導入した細胞においてエストロゲンによるプロラクチンのリン酸化が有意に減少していた。また、PAK2 の活性化因子として知られる Rac1, cdc42 の発現に対するエストロゲンの影響を確認した結果、エストロゲンにより cdc42 の発現増加が確認された。

本章では雌マウス下垂体においてエストロゲン誘導性プロラクチンのリン酸化が PAK2 を介して引き起こされることが強く示唆されたが、PAK2 はその量ではなく、活性型 PAK2 比率の上昇が重要であることが示唆された。

最後に総合考察において、エストロゲンとプロラクチンの関係について言及し、本研究の発展性について述べている。エストロゲンは性周期を決定するのに重要な因子であり、その時期により分泌量が大きく変化する。月経前に月経前症候群 (premenstrual syndrome: PMS) と呼ばれる浮腫、乳房痛、倦怠感、抑うつなど様々な身体的不調を訴える状態があり、詳細な原因は明らかではないが、性周期におけるプロラクチン量の増加はエストロゲンの増加と同時に起こり、プロラクチンと PMS の関係は現在までに明らかになっていないが、エストロゲンにより増加するリン酸化プロラクチンがその症状に関与していることは否定できないのではないかと述べている。また、エストロゲンを長期投与したマウスはプロラクチノーマのモデルマウスとして用いられている。プロラクチノーマは下垂体内におけるプロラクチン産生細胞の増加と分泌細胞の肥大化により、血中へのプロラクチン分泌が上昇する結果、高プロラクチン血症を発症する下垂体腺腫の一種である。しかし、症状を呈している高プロラクチン血症患者と同程度の血中プロラクチン濃度を示しているが、高プロラクチン血症の病状を示さない人が多く、

これは本来の血中プロラクチン量だけでなく、リン酸化プロラクチン量により差異が出ている可能性が考えられると考察している。このことから本研究で明らかになったプロラクチンのリン酸化機序より、高プロラクチン血症患者の血中リン酸化プロラクチン濃度やPAK2活性を測定することでより正確な臨床診断への応用が期待出来るのではないかと述べている。

## 5 論文の特質

本論文は、脳下垂体前葉で合成・分泌されるホルモンであるプロラクチンについて、近年300種類にもなるといわれ、複雑化しているプロラクチンの生理作用について、その機能解明を目指し新しい視点から研究を試みたものである。プロラクチンには下垂体以外の組織で産生される局所組織特異的な異所性プロラクチンや、タンパク合成後修飾によるリン酸化、糖付加、プロテアーゼ切断等により生じる異型プロラクチンが報告されている。プロラクチン作用は、従来下垂体で合成される単純タンパクプロラクチンだけでなく、このような異所性プロラクチンや異型プロラクチンが多様な生理機能を引き起こしていると考え、その中の異型プロラクチンの一種であるバソインヒビンとリン酸化プロラクチンに焦点を当て、多岐にわたるプロラクチン作用の解明を目指したものである。バソインヒビンについてはその受容体の特定と心筋細胞に対する作用機序に対する新たな知見を得た。また、リン酸化プロラクチンについてはそのリン酸化酵素の特定とエストロゲンの関与機序を明らかにし、これまでのプロラクチン作用機序の研究に新たな知見と発展性を拓いたものである。

## 6 論文の評価

現在までに、プロラクチン研究の中で異型プロラクチンに関する研究は少なく、その作用機構についても不明な点が多く残されていた。本論文では異型プロラクチンの一種であるバソインヒビンとリン酸化プロラクチンに焦点を当て、バソインヒビンの受容体を明らかにし、その作用機構の解明に新たな知見を与えた。またリン酸化プロラクチンの生成機構について、初めてリン酸化酵素を下垂体細胞において特定し、そのリン酸化におけるエストロゲンの役割を明らかにしている。これらの研究成果はすでに国際専門誌2誌に発表するとともに、さらに生体内でのリン酸化プロラクチンの役割について考察し、今後のプロラクチン研究の新たな展開を示し、高く評価できるものである。

## 7 論文の判定

本学位請求論文は、農学研究科において必要な研究指導を受けたうえ提出されたものであり、本学学位規程の手続きに従い、審査委員全員による所定の審査及び最終試験に合格したので、博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定する。

以上