

# 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>

2020年度 農学研究科  
博士学位請求論文（要旨）

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

A study on receptor and functions of vasoinhibin,  
and mechanism of phosphorylated prolactin mechanism

学位請求者 生命科学専攻  
諸星和紀

## 研究背景と目的

プロラクチンとは (Prolactin: PRL) とは、主に脳下垂体前葉に存在する PRL 産生細胞で合成、分泌される分子量約 23kDa のペプチドホルモンである。主な作用として乳汁の合成、乳腺の発達、妊娠の維持等が知られているが、その他に恒常性を維持する機能を中心に 300 を超える機能が報告されている。PRL はプロテアーゼ切断、リン酸化、糖付加等、様々な翻訳後修飾を受けることが知られており、修飾を受け構造が変化した PRL を異型 PRL と呼ぶ。PRL の多岐にわたる作用はこの異型 PRL の存在が一因になっていると考えられている。本研究では特にプロテアーゼ切断、リン酸化を受けた異型 PRL に着目し研究を行った。

バソインヒビン (Vasoinhibin: Vi) とは、PRL がプロテアーゼによって切断された N 末端側 11-18kDa の異型 PRL である。Vi は血管内皮細胞に対し、細胞遊走や増殖の抑制、アポトーシス誘導作用を持ち、一酸化窒素の産生を抑制することで血管拡張を抑制する機能がある。Vi のもつ抗血管新生作用が周産期心筋症という妊娠関連疾患に関与している可能性が報告されている。

周産期心筋症 (Peripartum cardiomyopathy: PPCM) とは、心疾患の既往がない女性が妊娠、出産を機に突然心不全を発症する妊娠関連疾患である。心不全に見られる全身浮腫や呼吸困難を主な病態とし、心臓の形態は拡張型心筋症と似た左心室の肥大、拡張、重症患者では線維化が起こる。妊娠、出産による心臓への負荷が発症原因であると考えられているが、詳しい発症原因は不明である。しかし、近年、Vi が PPCM に関与することが報告されている。PPCM 患者の血中では健常妊娠女性よりも多くの Vi が検出されており、また、PPCM 患者に PRL 抑制処置を施すと心不全の症状が回復することが報告されている。また、モデルマウスを用いた実験も行われており、酸化ストレスから心臓を保護するシグナル伝達性転写因子 (STAT3) を心筋特異的にノックアウトしたマウスでは、妊娠出産を経験すると PPCM 様の心筋症を発症することが報告されている。このマウスでは STAT3 欠損により、心筋の酸化ストレスが上昇し、プロテアーゼであるカテプシン D (CathD) が増加、活性化する。この CathD により PRL が Vi へと切断され、Vi が心臓の微小循環を傷害することで心筋症を引き起こす可能性を示した。

リン酸化 PRL とは (Phosphorylated PRL: PPRL) はリン酸化酵素によりリン酸化された PRL の総称である。リン酸化部位や PPRL 量は種特異性があるとされており、現在までにマウス、ラット、ヒト等で同定されている。PPRL の生理作用として、PRL に対して、アンタゴニストとして作用することが報告されている。また、近年、癌細胞に対する作用が報告されており、前立腺癌細胞のアポトーシス誘導、乳がん細胞において細胞増殖を阻害すること等が報告されている。

以上のように、PRL はその異型性により多岐に渡る作用を有している。しかし、現在までに異型 PRL の解明されていない受容体や生成機序、機能が多くあると考えられる。そこで、本研究では Vi の受容体探索、新たな機能の解明、PPRL の生成機序の解明を目的とした。

## 第一章：バソインヒビンの受容体探索

Vi は PRL がプロテアーゼ切断されることで生成されるが、PRL 受容体への結合力が弱く、PRL と同様のシグナル伝達は起こらないと考えられている。このことから Vi 特異的な受容体の存在が示唆されている。本章では Vi の受容体としてインテグリンを候補に挙げ、その結合能や作用への関与を解析することを目的とした。

Vi とインテグリンとの結合を確認する為、Vi とインテグリン  $\beta 1$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha 1 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$  を用いて固相結合解析により結合能を確認した。その結果、全てのインテグリンで Vi との結合が確認された。固相結合解析において、最も高い結合強度が確認されたインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  と Vi の結合を再度確認する為、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$ 、Vi、インテグリン抗体を用いた共免疫沈降を行った。Vi とインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  をプリインキュベートし、インテグリン抗体で免疫沈降を行った後、PRL 抗体を用いた western blotting で検出した。その結果、Vi とインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  が結合することを示した。Vi と結合することが明らかとなったインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  が、細胞における Vi の作用発現に関与しているかを確認する為、ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた免疫中和実験を行った。Vi を添加する前の HUVEC に対し、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  抗体を添加し、培養することでインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  の中和を行った。中和された HUVEC に Vi を加え 24h 培養した後に TUNEL 法によりアポトーシス陽性細胞率を確認した。その結果、Vi により増加するアポトーシス陽性細胞率がインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  の中和により有意に低下することが確認された。

本章ではインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  が Vi の受容体である可能性を示した。また、内皮細胞において Vi 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明らかにした。また、インテグリンアイソフォームであるインテグリン  $\alpha 1 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$  との結合も確認された。Vi は血管新生に関する作用を中心に数多くの作用を持つことが報告されている。このことから、Vi は一種類のインテグリンにのみ結合するのではなく、複数のインテグリンに結合することで、多岐に渡る作用のシグナル伝達を引き起こしている可能性が考えられる。

## 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

PPCM の症状は主に全身浮腫や呼吸困難などが挙げられるが、一部の PPCM 患者では心臓の線維化が起こることが報告されている。心臓の線維化は心室中に異常なコラーゲン蓄積が見られる症状である。この心臓の線維化には線維芽細胞の活性化型である筋線維芽細胞が関与していることが知られている。また、線維芽細胞の活性化の主要因子として Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) が報告されている。しかし、周産期心筋症患者の血中では TGF- $\beta$  量が健常妊娠女性と比較して増加しないことが報告されている。つまり、PPCM における線維化は TGF- $\beta$  を介さない機序であることが考えられる。このことから本章では Vi の心臓線維芽細胞に対する影響を解析することを目的とした。

Vi が心臓線維芽細胞の活性化に関与するかを確認する為、50nM の Vi 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 で確認した。活性化マーカーとして用いられる  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) の発現量を確認した。その結果、Vi により心臓線維芽細胞における活性化マーカーの発現量は約 1.4 倍に増加した。また、TGF- $\beta$  の関与を確認する為、同様に Real Time PCR で TGF- $\beta$  の遺伝子発現量を確認した。その結果、Vi により TGF- $\beta$  の発現量に変化は起きなかった。また、コラーゲン産生遺伝子である collagen-I (Col-I)、collagen-III (Col-III)、コラーゲン編成に関与する Matrix Metalloproteinase (MMP)、その阻害剤である Tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP) 遺

伝子発現に対する Vi の影響も Real Time PCR で確認した。その結果、Vi は Col-I、MMP、TIMP の遺伝子発現量に影響を与えなかった。しかし、Vi は Col-III の発現量を有意に低下させた。また、PPCM 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 Vi 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 Vi は IL-6 発現を有意に増加させた。

本章では Vi 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た。このことから、Vi は TGF- $\beta$  非依存的に心臓線維芽細胞の活性化を引き起こす可能性を示した。また、Vi 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、Vi による心臓線維芽細胞の活性化は Vi 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：リン酸化プロラクチンの産生機序解明**

当研究室の過去の研究において、エストロゲンを投与したマウス下垂体中でリン酸化 PRL が同定された。現在までに p21 activated kinase2 (PAK2) や protein kinase A (PKA) が PRL のリン酸化酵素であるとの報告があるが、これらの結果は細胞外における結果であり、実際に細胞内でリン酸化を担っているかの確認はされていない。このことから本章では、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とリン酸化 PRL の関係性を解明することを目的とした。

下垂体内における PRL とリン酸化酵素の局在を確認する為、エストロゲン投与マウス下垂体を用いて免疫染色を行った。その結果、PRL と PAK2 の共局在は確認されたが、PRL と PKA の共局在は確認されなかった。エストロゲン投与により PAK2 の遺伝子及びタンパク発現量に変化があるかを確認する為、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。その結果、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、細胞内におけるエストロゲンと PAK2 により PRL のリン酸化の関係性を明らかにするため、下垂体初代培養細胞に PAK2 siRNA (siPAK2) を導入することで PAK2 をノックダウンし、その細胞にエストロゲンを投与した際のリン酸化 PRL 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投与による PRL のリン酸化が有意に減少していた。次に 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する為、エストロゲン投与マウス下垂体における Rac1、cdc42 の発現を western blotting で確認した。その結果、エストロゲンにより cdc42 の発現増加が確認された。

本章ではマウス下垂体においてエストロゲン誘導性 PRL のリン酸化が PAK2 を介して引き起こされることを示した。また、リン酸化酵素である PAK2 はその量ではなく、活性化 PAK2 比率が重要であることも示唆した。加えて、その PAK2 の活性化は cdc42 によるものである可能性も示した。

### **総括**

本研究では異型 PRL の受容体探索、新規作用、産生機序の解明を行った。PRL は自身の特徴である異型性や異所性により 300 を超える機能を持つと考えられている。また、数多くの異型 PRL は作用が明らかになっているが、生体内での存在意義の不明なものも多い。これら異型 PRL の受容体や産生機序、新たな機能が明らかになることは生体内での存在意義を明らかにするために重要であると考えられる。