

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 24 年度博士課程入学

氏名 金 学正

指導教員名 松木直章

論文題目 イヌの血中ハプトグロビンの誘導とカルボニル化に関する研究

【緒論】

タンパク質のカルボニル化 (protein carbonylation) は、タンパク質が酸化されてアミノ酸側鎖がカルボニル化される現象である。タンパク質のカルボニル化は、メチオニン残基のメチオニンスルフォキシドへの変化、チロシン残基間での架橋反応と並んで、タンパク質の酸化的変性の機序としてよく知られている。医学領域では、タンパク質のカルボニル化は細胞レベルおよび個体レベルの老化に密接に関連すると考えられており、広く研究されている。例えば、ヒトのパーキンソン病やアルツハイマー病の患者では、中枢神経系のカルボニル化タンパク質が増加する。また、臓器中のカルボニル化タンパク質は、全身性疾患の重症度や高齢患者の死亡リスクにも関連するとされている。イヌでも、老化に伴って大脳のカルボニル化タンパク質が増加することが知られているが、それ以外では伴侶動物におけるタンパク質カルボニル化の知見は乏しい。

本研究では、伴侶動物の老化と、それに付随した体内の酸化的障害について解析しようと計画する過程で、イヌのクッシング症候群に着目した。クッシング症候群はイヌではきわめて一般的な内分泌疾患であり、中～高年齢のイヌが罹患する。クッシング症候群のイヌは、慢性的なグルココルチコイド過剰のために、多飲・多尿、脱毛、筋力低下などの特徴的な臨床症状を呈する。クッシング症候群はヒトでは稀な疾患であるが、慢性的なグルココルチコイド過剰に関連して体内の酸化マーカーが上昇することや、老化に類似した認知機能低下が起こることが確認されている。これらの知見から、クッシング症候群のイヌでも、慢性的なグルココルチコイド過剰によって体内の脂質やタンパク質の酸化的障害が促進されており、老化に類似した変化が生じているという仮説を立てた。この仮説を検証するために、以下の一連の研究を実施した。

【第1章：クッシング症候群のイヌ血中におけるカルボニル化ハプトグロビンの検出】

本章では、クッシング症候群に罹患したイヌの血清を収集し、優先的または特徴的に増加するカルボニル化タンパク質を探索して同定することを目的とした。

2012～2014年に東京大学附属動物医療センターに来院し、各種検査でクッシング症候群と確定診断されたイヌ14頭（平均11.4歳齢）を症例群とした。また、同時期にクッシング症候群が否定され、何らかの炎症性疾患に罹患したイヌ14頭を炎症性疾患群とした。さらに、民間の実験動物管理会社で飼養管理され、疾患群と年齢のマッチした健康な雌のビーグル犬8頭を健康対照群とした。

これらのイヌの凍結血清を融解し、2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH)法に基づいた市販のキットを用い、血清中のカルボニル化タンパク質を検出した。その結果、いずれの個体からもカルボニル化タンパク質を示すいくつかのバンドが検出された。このうちカルボニル化の程度が健康対照群では低く、症例群では高いタンパク質として、みかけ上35 kDのバンドが観察された。このバンドに該当するタンパク質を泳動ゲルより切り出し、ゲル内消化ならびに質量分析を行って同定を試みたところ、イヌのハプトグロビンが候補として挙げられた。そこで抗ヒトハプトグロビン抗体を用いてイムノブロットで確認した結果、当該のバンドはハプトグロビンと確認された。

デンストメトリーを用いてイヌ血中のカルボニル化ハプトグロビンおよび総ハプトグロビンを半定量したところ、健康対照群や炎症性疾患群と比較して症例群で有意な高値であるか、高値の傾向にあった。ハプトグロビンは急性相タンパク質の一つであることから、同じ検体でイヌの代表的な急性相タンパク質であるc-反応性タンパク質（CRP）を測定したところ、症例群で高値を呈したのは14例中1例のみであった。また、血中ハプトグロビンはCRPと相関しなかった。以上より、クッシング症候群のイヌでは炎症以外の機序によってもハプトグロビンが誘導され、さらにカルボニル化されて血中を循環する可能性が示された。

【第2章：グルココルチコイド処理した培養イヌ肝細胞におけるハプトグロビンの誘導とカルボニル化】

第1章では、クッシング症候群に罹患したイヌで特徴的に増加するカルボニル化タンパク質をハプトグロビンと同定した。ハプトグロビンは、皮膚、肺、腎臓、脂肪組織などでも産生されるが、主要な産生場所は肝細胞である。ハプトグロビンの遺伝子発現および合成は、TNF- α 、IL-1、IL-6などの炎症性サイトカインによって誘導され、IFN- γ やPPAR- γ によって抑制されることが広く知られているが、イヌ肝細胞における誘導因子や抑制因子の詳細は不明である。そこで第2章では、グルココルチコイドがイヌ肝細胞のハプトグロビン合成に与える影響を観察するために試験管内実験を実施した。

本研究ではビーグル犬由来の初代培養肝細胞を含む市販の培養キットを、細胞のロットを揃

えて購入し、実験に使用した。予め I 型コラーゲンでコートした 24 穴プレートに、キット内の細胞播種液に懸濁した 7.0×10^4 /well の肝細胞を播種し、 37°C 、5% CO_2 条件下で 24 時間培養した。次に、細胞播種液および死細胞をピペティングで取り除き、付着した細胞を $0 \mu\text{M}$ 、 $5 \mu\text{M}$ あるいは $50 \mu\text{M}$ のリン酸デキサメタゾンを含むキット内の培養液中で、 37°C 、5% CO_2 条件下で 0、24、48 および 72 時間培養した。これらの細胞の培養上清と、細胞溶解液について、第 1 章と同様の方法でハプトグロビンならびにカルボニル化ハプトグロビンを検出した。

その結果、培養上清中のハプトグロビンは培養 48 時間後までほとんど検出されなかったが、72 時間後には増加していた。ただし、この増加は 0 および $5 \mu\text{M}$ のデキサメタゾン存在下で認められ、 $50 \mu\text{M}$ のデキサメタゾン存在下では有意に抑制された。培養上清中のカルボニル化ハプトグロビンは、 $5 \mu\text{M}$ のデキサメタゾン存在下で培養 72 時間後に観察されたが、他の条件ではほとんど検出されなかった。細胞溶解液中では、 $5 \mu\text{M}$ のデキサメタゾン存在下で経時的にハプトグロビンが増加したが、 $50 \mu\text{M}$ のデキサメタゾン存在下では抑制された。また、細胞溶解液中のカルボニル化ハプトグロビンは、 $5 \mu\text{M}$ のデキサメタゾン存在下で顕著に検出された。また、ハプトグロビンは細胞溶解液中では主要なカルボニル化タンパク質であった。

以上より、試験管内におけるイヌ肝細胞のハプトグロビン合成および分泌は、低濃度のグルココルチコイドによって刺激され、高濃度のグルココルチコイドによって抑制されることが示された。また、ハプトグロビンは分泌後に細胞外でカルボニル化されるのではなく、肝細胞内の段階でカルボニル化されることや、低濃度のグルココルチコイドによりカルボニル化が促進される可能性も示された。

【第 3 章：過酸化水素処理したイヌ血清におけるハプトグロビンのカルボニル化】

本研究では、クッシング症候群のイヌにおいて体内の酸化的障害を示すマーカーを探索することが当初の方針であった。その候補として第 1 章では、血中に特徴的に増加するカルボニル化タンパク質をハプトグロビンと同定した。しかし第 2 章では、グルココルチコイドに刺激された肝臓から既にカルボニル化されたハプトグロビンが分泌される可能性が示された。そこで第 3 章では、血中のハプトグロビンが酸化的条件下で優先的に酸化され、自然の抗酸化物質や酸化マーカーとして働く可能性があるか否かを確認するために、イヌの血清を過酸化水素 (H_2O_2) で直接酸化し、カルボニル化ハプトグロビンの変動を観察した。

東京大学附属動物医療センターで飼育管理されている、臨床的に健康な 6 歳、避妊雌のゴールデンレトリバーから全血を採取し、血清を分離し、直ちに酸化処理を行った。すなわち、血清を蒸留水で 5 倍希釈し、最終濃度 0 mM 、 0.5 mM または 2.0 mM の H_2O_2 を加え、 1 mL/well となるように 6 穴プレートに分注し、 37°C 、5% CO_2 条件下で 6 時間反応させた。そして第 1 および 2 章と同様の方法でカルボニル化タンパク質を検出した。

その結果、カルボニル化ハプトグロビンは H_2O_2 濃度に依存して増加したが、アルブミンや未同定の低分子タンパク質のカルボニル化がより顕著であった。本章で行った実験は H_2O_2 とフェ

ントン反応を用いた試験管内の極端な酸化モデルだが、酸化的状態にあるイヌ血清では、ハプトグロビンはとくに優先的に酸化されない可能性が高いと考えられた。

【総括】

以上を総括すると、クッシング症候群のイヌ血中のカルボニル化ハプトグロビンの増加は、全身の炎症や酸化的状況によるものではなく、肝臓のハプトグロビン産生がグルココルチコイドによって直接刺激された結果であると考えられた。また、産生されたハプトグロビンは、肝細胞内の段階で既にカルボニル化することも明らかとなった。肝細胞内のハプトグロビンのカルボニル化機構は不明であるが、肝細胞内の局所的な酸化的状況を反映する可能性がある。したがって、カルボニル化ハプトグロビンはイヌの全身的な酸化的状況を反映するマーカーとしては適さないが、クッシング症候群や外因性グルココルチコイド投与による肝臓への影響を反映するマーカーや、肝細胞内の酸化的状況を反映するマーカーとして、今後検討する価値があると考えられた。