

平成29年度 独創的研究助成費 実績報告書

平成30年2月19日

報告者	学科名	栄養学科	職名	教授	氏名	高橋 吉孝
研究課題	慢性炎症性疾患の新規治療法開発に向けた基礎研究					
研究組織	氏名	所属・職		専門分野	役割分担	
	代表	高橋 吉孝	栄養学科・教授	脂質生化学	総括	
	分担者	川上 祐生 森 香子	栄養学科・准教授 博士後期課程保健福祉科学専攻・3年生	食品生化学 栄養学	変異抗体に関する実験 NASH モデルに関する実験	
研究実績の概要	<p>これまでの国内外の研究で、各種ロイコトリエン(LT)が、慢性炎症性疾患の一つである肺線維症の進行に関わることが示されている。申請者らはこれまでの研究で、抗 LTC₄モノクローナル抗体を元に、抗 LTC₄単鎖抗体を作成し、これが各種 LT の受容体への結合の阻害を介して、LT の作用を抑制することを示してきた。本計画では、抗 LTC₄単鎖抗体のヒト化を目指すにあたっての基礎的検討として、各種変異体の作成によって抗原の特異的認識に重要なアミノ酸の同定を試みるとともに、構造モデリングにより LT の特異的認識の分子的根拠を明らかにすることにより、これまでに有効な治療法が知られていない肺線維症の抗体治療薬開発の基盤的知見を得ることを第一の目的として実施した。</p> <p>また、もう一つの慢性炎症性疾患として非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)は、単純性脂肪肝に、セカンドヒットとして酸化ストレスが加わることによって引き起こされると考えられている。本計画では、NASH 進行のセカンドヒットに関わるリポキシゲナーゼの分子種を同定し、このリポキシゲナーゼがどのように NASH の進行に関わるか、そのメカニズムを解明することにより、NASH に対する新規予防法を確立するための基盤的知見を得ることを第二の目的として実施した。</p>					

※ 次ページに続く

<p>研究実績 の概要</p>	<p>NASH の進行に関わるリポキシゲナーゼ分子種としては、これまで白血球型 12-リポキシゲナーゼが着目され研究されてきたが、申請者らは昨年度までの研究で、NASH モデルマウスで上昇する 12-リポキシゲナーゼのアラキドン酸生成物として、12-ヒドロペルオキシ酸以外に、白血球型酵素の生成物に特徴的な 15-ヒドロペルオキシ酸が含まれていないことを見出した。さらに、NASH モデルマウスの肝サイトソルで上昇する 12-リポキシゲナーゼ活性が、抗血小板型 12-リポキシゲナーゼ抗体では免疫沈降するが、抗白血球型 12-リポキシゲナーゼ抗体では免疫沈降しないことを見出し、NASH モデルマウスの肝で上昇する酵素が血小板型の 12-リポキシゲナーゼであることを突き止めた。本年度は、この酵素が肝臓にわずかに存在すると考えられる血小板に由来するのかどうかを明らかにする目的で、肝組織を構成する細胞を密度勾配遠心法で分画しての抗血小板型 12-リポキシゲナーゼ抗体を用いたウェスタンブロッティングを行ったところ、本酵素が主に肝非実質細胞に存在することが示された。さらに同じ抗体を用いた免疫染色により、本酵素が血小板ではなく肝星細胞に存在することを明らかにした。興味深いことに、血小板型 12-リポキシゲナーゼの mRNA は NASH モデルマウスのみならず、コントロールマウスにもほぼ同じレベルで発現しており、さらにウェスタンブロットにより、酵素蛋白もコントロールマウスに発現していることが示された。この酵素の NASH における活性化機構の解明と、その病態生理学的な役割の解明が今後の課題となる。</p> <p>また、慢性炎症性疾患の一つである肺線維症の抗体治療薬開発に向けて、抗体による LT の特異的認識の分子的根拠を明らかにすることを目的として、X 線結晶解析に基づき網羅的に作成した抗 LTC₄ 単鎖抗体変異体の中で、V_L上の 54 番目のチロシン(Y)をトリプトファン(W)に、V_L上の 35 番目のアスパラギン(N)をグルタミン(Q)に、V_L上の 37 番目のチロシン(Y)をフェニルアラニン(F)に変異させたトリプルミュータント N35(L)Q/Y54(L)W/Y37(L)F は、LTE₄ への結合選択性が LTC₄ への結合を上回っていた。今回行った構造モデリングによる解析の結果、Y37(L)の水酸基がなくなることにより、LTC₄ と LTD₄ のグリシンへの水素結合がなくなり、さらに置換した Q35(L)と K55(L)の相互作用が K55(L)を固定して LTE₄ との相互作用を安定化するメカニズムが明らかとなり、今後抗 LTC₄ 単鎖抗体のヒト化に向けて新たな知見が得られた。</p>
<p>成果資料目録</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Yoshimura Y, Araki A, Maruta H, Takahashi Y, Yamashita H. Molecular cloning of rat acss3 and characterization of mammalian propionyl-CoA synthetase in the liver mitochondrial matrix. <i>J Biochem. (Tokyo)</i> 161(3): 279-289. (2017) 2. Tsukayama I, Toda K, Takeda Y, Mega T, Tanaka M, Kawakami Y, Takahashi Y, Kimoto M, Yamamoto K, Miki Y, Murakami M, Suzuki-Yamamoto T. Preventive effect of <i>Dioscorea japonica</i> on squamous cell carcinoma of mouse skin involving down-regulation of prostaglandin E2 synthetic pathway. <i>J Clin Biochem Nutr</i> in press. (2018)