

徳島大学学位論文

高密度リポタンパク質関連因子
ABCA1 および AIBP の
生体内調節メカニズムに関する研究

2023

徳島大学大学院 薬学研究科

立花 洸季

要旨

【研究目的】

アテローム性動脈硬化症は、コレステロールなどの脂質を過剰に取り込んだマクロファージが血管内膜に蓄積することで引き起こされ、虚血性心疾患などのリスク因子となる。高密度リポタンパク質 (HDL)による脂質引き抜き反応は、動脈硬化病巣に蓄積した脂質を除去する主要な経路である。

第 2 章では、HDL へ脂質を輸送する膜タンパク質 ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)に着目した。ABCA1 の発現増加は、動脈硬化病巣の形成を抑制する有効な手段として知られている。免疫抑制剤 FTY720 は多発性硬化症治療薬として臨床で使用されており、動脈硬化モデルマウスに対する治療効果が報告されている。しかし、ABCA1 発現に対する FTY720 の作用はほとんど不明である。そこで、FTY720 がマクロファージへの脂質蓄積および ABCA1 発現に及ぼす影響について検討した。

第 3 章では、HDL 結合タンパク質の ApoA-I binding protein (AIBP)に着目した。AIBP は同定当初から分泌タンパク質であるとされ、細胞外での機能が主に研究されてきた。しかし、培養上清や血中で AIBP がほとんど検出されない例も報告されており、AIBP の分泌については不明な点が多い。そこで、培養上清および血中 AIBP の検出を試み、細胞外 AIBP が増加する生理的な条件を明らかにした。

【結果・考察】

FTY720 の添加により、マクロファージ細胞である J774 への脂質蓄積が有意に減少した。ABCA1 の阻害により FTY720 の効果が打ち消されたことから、FTY720 による脂質蓄積の減少は ABCA1 を介していることが示唆された。また、FTY720 の添加により ABCA1 タンパク質および mRNA が増加していた。以上より、マクロファージにおいて FTY720 が ABCA1 の発現を促進し、脂質の蓄積を抑制することを明らかにした。

ヒト血清 (n=30)において AIBP が検出され、平均 AIBP 濃度は 11.9 (±8.8) ng/mL であった。AIBP 濃度は血中トリグリセリド濃度と有意な正の相関を示した。トリグリセリドの増加が細胞外 AIBP 量の変化をもたらすかを検証するため、培養肝細胞 HepG2 にオレイン酸・パルミチン酸を添加した。パルミチン酸の添加は細胞外 AIBP 量を増加させたが、同時に細胞死が観察された。四塩化炭素の投与により肝障害を誘導したマウスでは著しく血清 AIBP 量が増加していた。以上より、肝障害が血中 AIBP を増加させる病態の 1 つであることが明らかとなった。

【結論】

ABCA1 および AIBP の新規生体内調節メカニズムを明らかにした。これらの知見は、アテローム性動脈硬化の新規治療法開発に向けた基礎資料となりうる。

目次

略語表	6
第1章 序論.....	9
第2章 FTY720による ABCA1 発現増加を介した脂質蓄積の減少.....	13
第1節 背景.....	13
第2節 結果.....	14
第1項 FTY720の添加による J774 への脂質蓄積への影響.....	14
第2項 FTY720による ABCA1の発現上昇を介した脂質蓄積の減少.....	16
第3項 FTY720による ABCA1発現上昇における LXRの関与.....	20
第4項 FTY720による ABCA1発現上昇における SphK2の関与.....	20
第5項 FTY720による SphK2を介したヒストンアセチル化の増加および ABCA1の発現の促進.....	23
第3節 小括.....	25
第4節 実験方法.....	28
第1項 Materials and Reagents	28
第2項 Cell Culture and siRNA Transfection.....	28
第3項 Evaluation of Lipid Accumulation by Oil Red O Staining	28
第4項 Evaluation of Lipid Accumulation by Nile Red Staining.....	29
第5項 Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)	29
第6項 Western Blot Analysis	30
第7項 Statistical Analysis	30
第3章 HDL 結合タンパク質 AIBP の生理的調節.....	31
第1節 背景.....	31
第2節 AIBPの分泌臓器および病態時の血中 AIBP 濃度に関する検討.....	33
第1項 マウス臓器における AIBP 発現の比較.....	33
第2項 血清での AIBP 検出.....	37
第3項 生化学検査値との相関.....	39
第4項 Triglyceride 増加による AIBP 分泌への影響.....	41
第5項 肝障害モデルマウスの血清 AIBP 量の評価.....	44
第3節 AIBPの生理機能に関する検討.....	46
第1項 AIBPによる Palmitic acid 誘導性細胞死への影響.....	46
第2項 AIBPによる抗酸化作用.....	47
第3項 AIBPによる抗炎症作用.....	49
第4節 HDLによる AIBPのN末端特異的な分解反応.....	53
第1項 大腸菌発現系を用いた rAIBPの精製.....	53

第2項	HDL との混合による AIBP の変化.....	54
第3項	AIBP の切断におけるプロテアーゼの関与.....	56
第4項	HDL による AIBP 切断の特異性の検証.....	56
第5項	AIBP 切断部位の特定.....	59
第6項	AIBP の細胞内局在に対する N 末端シグナルペプチドの影響.....	62
第5節	考察.....	65
第6節	実験方法.....	67
第1項	Resources.....	67
第2項	Animals.....	71
第3項	Detection of AIBP in tissues.....	71
第4項	Western blot analysis.....	71
第5項	Cell culture.....	71
第6項	Preparation of cell samples.....	72
第7項	Oil Red O Staining.....	72
第8項	Preparation of Mouse serum.....	72
第9項	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	72
第10項	Measurement of serum cholesterol and triglycerides.....	72
第11項	Preparation of palmitic acid and oleic acid.....	73
第12項	Cytotoxicity assay.....	73
第13項	Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR).....	73
第14項	Mouse model of carbon tetrachloride induced acute liver injury.....	73
第15項	Transfection of nucleic acids.....	73
第16項	Evaluation of the antioxidant capacity of AIBP <i>in vitro</i>	74
第17項	Evaluation of the antioxidant capacity of AIBP <i>in vivo</i>	74
第18項	Evaluation of the anti-inflammatory effect of AIBP <i>in vitro</i>	74
第19項	Evaluation of the anti-inflammatory effect of AIBP <i>in vivo</i>	74
第20項	Evaluation of inflammatory cytokine levels in human serum.....	74
第21項	Purification of recombinant AIBP.....	74
第22項	Preparation of synthetic HDL.....	75
第23項	Silver stain.....	75
第24項	Fluorescence immunostaining.....	75
第25項	Statistical Analysis.....	75
第4章	総括.....	76
第5章	参考文献.....	78

略語表

ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ABCG1	ATP-binding cassette transporter G1
acH3K9	Acetyl-Histone H3 (Lys9)
acLDL	Acetylated low-density lipoprotein
AIBP	ApoA-I binding protein
AIM-HIGH	Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome With Low HDL/High Triglycerides: Impact on Global Health Outcomes
ALT	Alanine aminotransferase
ApoA-I	Apolipoprotein A-I
ApoB	Apolipoprotein B
ApoE	Apolipoprotein E
AST	Aspartate aminotransferase
BCA	Bicinchoninic acid assay
BMI	Body mass index
BSA	Bovine serum albumin
BUN	Blood urea nitrogen
CBB	Coomassie brilliant blue
CCl ₄	Carbon tetrachloride
CCr	Creatinine clearance
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
CM	Chylomicron
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
DHR123	Dihydrorhodamine 123
DMSO	Dimethyl sulfoxide
eGFR	Estimated glomerular filtration rate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FASN	Fatty acid synthase
FDA	Food and Drug Administration
FTY720	Fingolimod
FTY720-P	FTY720 phosphate
GTP	Guanosine triphosphate

HDAC	Histone deacetylase
HDL	High-density lipoprotein
HDL-C	High-density lipoprotein cholesterol
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
IL-6	Interleukin-6
ILLUMINATE	Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events
LDL	Low-density lipoprotein
LDL-C	Low-density lipoprotein cholesterol
LPS	Lipopolysaccharide
LXR	Liver X receptor
mIgG	Mouse immunoglobulin G
MS	Multiple sclerosis
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NAXE	NAD(P)HX Epimerase
OA	Oleic acid
ORO	Oil red O
PA	Palmitic acid
PI	Protease inhibitor cocktails
rAIBP	Recombinant AIBP
RBC	Red blood cells
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
ROS	Reactive oxygen species
RXR	Retinoid X receptor
S1P	Sphingosine-1-phosphate
S1PR	Sphingosine-1-phosphate receptor
sHDL	Synthetic high-density lipoprotein
SphK	Sphingosine kinase
SREBP-1c	Sterol regulatory element binding protein-1c
TCA	Trichloroacetic acid
T-CHO	Total cholesterol
TG	Triglycerides

TLR4	Toll-like receptor 4
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TSA	Trichostatin A
UA	Uric acid
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WBC	White blood cells
WHO	World health organization

第1章 序論

World Health Organization (WHO)によると、世界における疾患別死亡者数の割合は第1位が虚血性心疾患、第2位に脳卒中となっており、共通するリスク因子としてアテローム性動脈硬化がある。動脈硬化性疾患による総死亡者数は年間1500万人以上であり、全体の約26.7%を占める¹。今もなお死亡数・死亡率ともに増加傾向が続いている重大な疾病であり、アテローム性動脈硬化に対する有効な治療法の開発が求められている。

アテローム性動脈硬化症は血管の内膜に粥状のプラークが形成され、動脈壁本来の構造が崩壊することで引き起こされる様々な病態の総称である。アテローム性動脈硬化の発症機序は現在、次のように考えられている(Figure 1)²。

- ① 血管の内膜へ、酸化した Low density lipoprotein (LDL)が蓄積し、マクロファージに貪食される。
- ② 貪食を行ったマクロファージは、泡沫化細胞へと分化および血管内膜への沈着を引き起こし、炎症性サイトカインを分泌することで、さらなるマクロファージを誘導する。
- ③ 誘導されたマクロファージは、再びコレステロールを貪食し、分化・沈着する。

以上のプロセスを通して、血管内膜へのコレステロールおよび泡沫化細胞の沈着が繰り返され、プラークが増大する。増大したプラークは血管を狭窄し、狭心症や高血圧などを発症する。さらに病態が進展すると、プラークの破綻を契機とする内膜の損傷および凝固カスケードの活性化による血栓の形成が誘発される³。やがて血栓は病巣形成部位あるいは剥離し到達した微小血管で虚血を引き起こし、虚血性心疾患、脳卒中の原因となる。

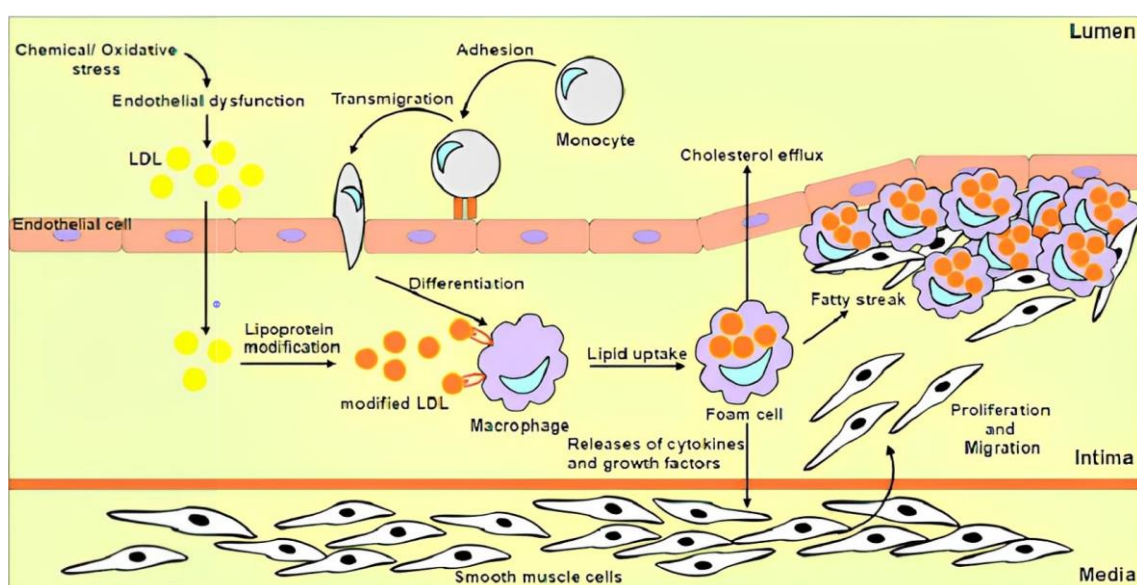


Figure 1. Macrophage foam cells formation and fatty streak development².

現在、動脈硬化性疾患に対する医療は予防・進展抑制が主な手段であり、「治療」を主眼とする薬剤はまだない。例えば、高脂血症治療の第一選択薬であるスタチンは、ヒドロキシメチルグルタリル CoA 還元酵素 (HMG-CoA reductase) を阻害することで、血中の LDL コレステロールレベルを強力に低下させ、プラークの形成を抑制する薬剤として使用される⁴。しかし、スタチンによる心血管系イベントの抑制率は約 24%程度であることが明らかとなっており、心血管イベント発生率の更なる低下には進展抑制のみならず、積極的なプラークの除去が必要であると考えられている (Figure 2)⁵。

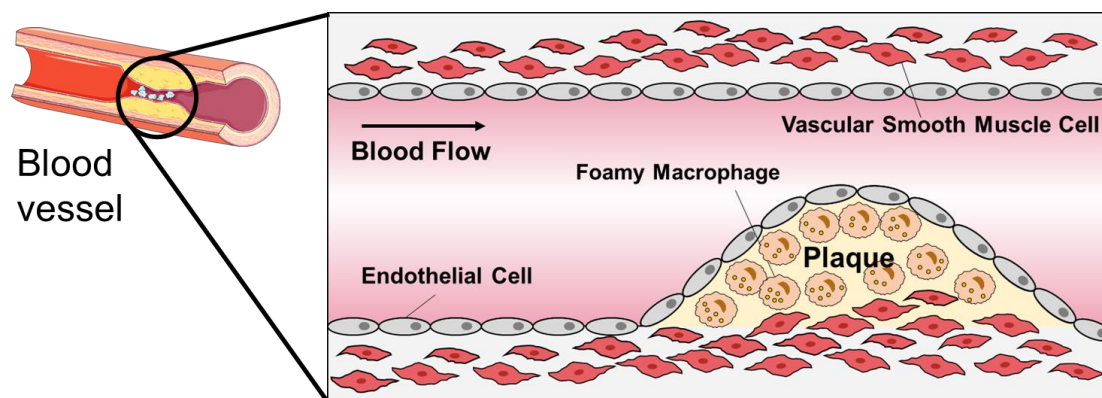


Figure 2. Plaque formation in blood vessels.

High density lipoprotein (高密度リポタンパク質, HDL)は、生体内の脂質や脂溶性物質の血中運搬を担う直径 10 nm 程度の脂質タンパク質複合体粒子である。LDL に対して「善玉」と呼ばれる HDL が、末梢細胞の過剰なコレステロールを回収し、肝臓へと輸送することで、コレステロールが胆汁酸に異化され、消化管へ排出される。一連の HDL を介したコレステロールの運搬はコレステロール逆転送と呼ばれ、末梢組織のコレステロールを除去する唯一の経路として知られている⁶。HDL の形成には、細胞膜上の ATP-Binding Cassette A1 (ABCA1)や ATP-Binding Cassette G1 (ABCG1)と呼ばれる脂質トランスポーターが大きく関わっている。ABCA1 および ABCG1 が、HDL の主要構成タンパク質である Apolipoprotein A-I (ApoA-I)へ段階的に脂質を受け渡すことで HDL の形成・成熟が行われる (Figure 3)⁷。

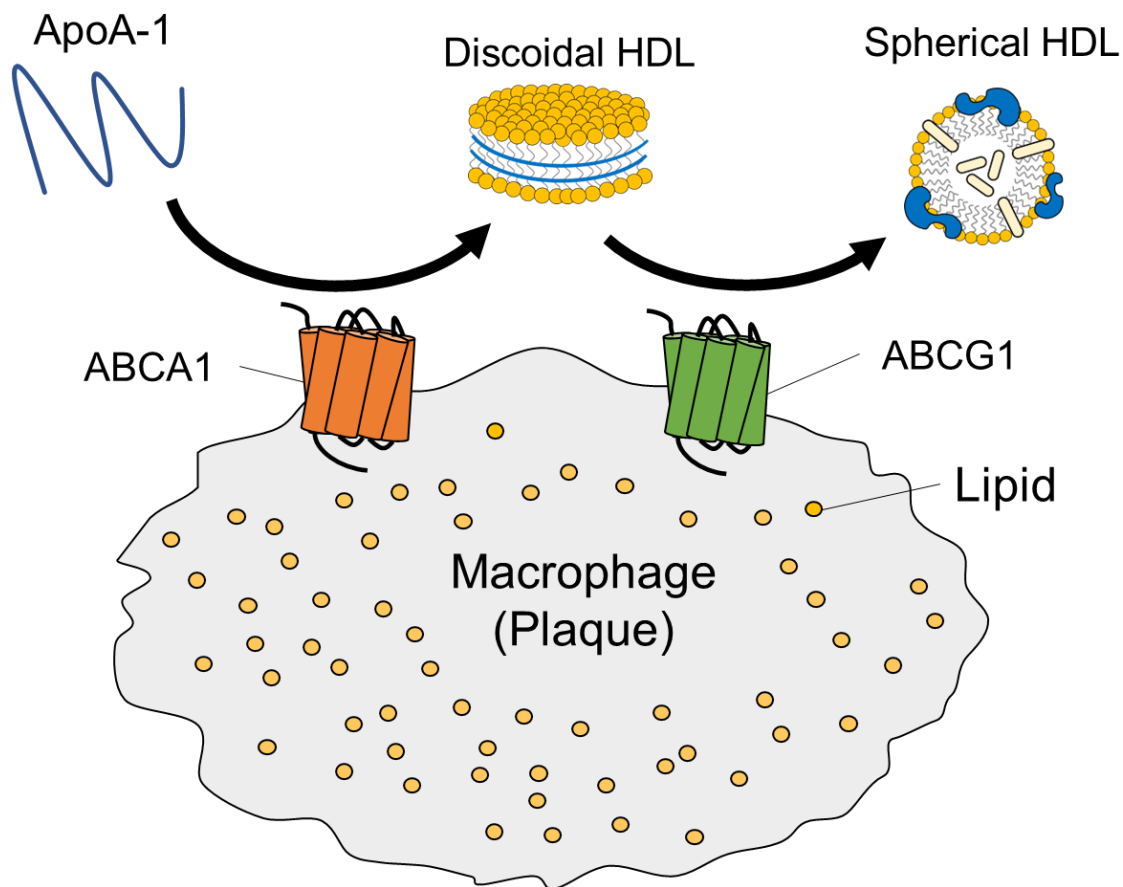


Figure 3. ABCA1 and ABCG1-mediated lipid efflux to ApoA-I and maturation to HDL.

加えて HDL は、コレステロール逆転送のみならず抗炎症作用⁸や抗酸化作用⁹、血小板凝集抑制¹⁰、血管内皮障害改善¹¹、等の多面的な抗動脈硬化活性を示すことが明らかとなっており、臨床的にも血中 HDL 濃度と冠動脈疾患のイベントの頻度が逆相関すること¹²や、HDL を静脈投与すると動脈硬化病変部が退縮すること¹³が報告されている。

HDL は、その多岐にわたる抗動脈硬化活性から血管疾患治療のターゲットとされてきた。中でも、CETP の阻害を作用機序とする HDL コレステロール (HDL-C) の上昇を指向した薬剤はこれまで多くの臨床試験が行われている。CETP 阻害剤である *torcetrapib* を用いた ILLUMINATE 試験および *dalcetrapib* を用いた dal-OUTCOMES 試験では心血管疾患患者、計 30,000 人以上に対するの検証が行われた^{14,15}。しかし、これらの薬剤投与による有意な治療効果は観察されず、現在では治療ターゲットとしての CETP の妥当性が疑問視されるに至っている¹⁶。CETP は成熟 HDL 中に蓄えられているコレステロールエステルを LDL に受け渡す脂質転送タンパク質である (Figure 4)。CETP 阻害薬は血中 HDL-C プールの増加をも

たらずことで HDL-C 値を強力に上昇させるが、作用機序を踏まえると、HDL によるコレステロール逆転送には大きく影響しないと思われる。HDL の主要な抗動脈硬化活性がプラークからの脂質引き抜きによる病巣の退縮により発揮されるという点を考慮すると、アテローム性動脈硬化の治療には、ただ HDL-C を増加させるのではなく、HDL によるコレステロール逆転送を促進するようなターゲットを設定する必要があると考えられる。

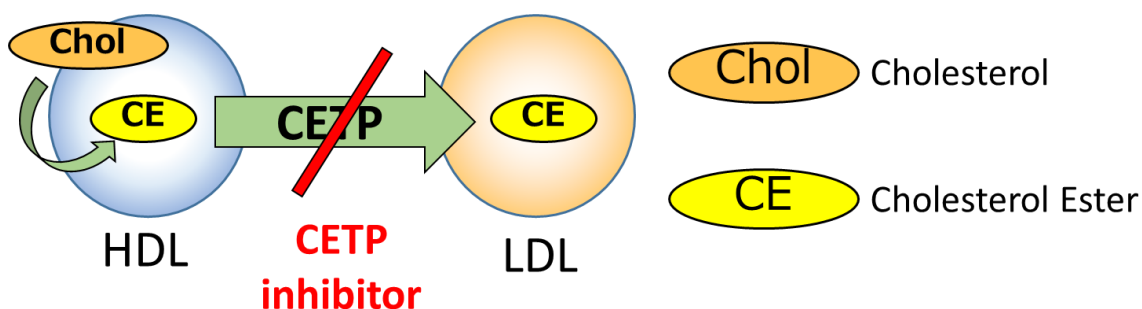


Figure 4. Transfer of cholesterol esters by CETP and its inhibition.

本研究では、コレステロール逆転送の制御に関わる HDL 関連タンパク質の生体内調節メカニズムの解明に取り組んだ。第 2 章ではマクロファージにおける ABCA1 の発現に注目し、免疫抑制剤 Fingolimod (FYT720)が脂質蓄積の減少をもたらすメカニズムを明らかにした。FTY720 は Liver X receptor (LXR)および Sphingosine kinase 2 (SphK2)を介して ABCA1 の発現を向上させており、この経路がアテローム性動脈硬化症の新規治療ターゲットとして有用である可能性が示された。第 3 章では HDL 結合タンパク質である ApoA-I binding protein (AIBP)に着目した。AIBP は HDL のコレステロール逆転送を促進するタンパク質であることが報告されており、アテローム性動脈硬化への治療応用が期待されている。しかし、生体内での発現や分泌、機能については未だ不明な点が多い。第 3 章 第 2 節では AIBP の分泌臓器を特定し、動脈硬化リスクと血中 AIBP 量が比例することを明らかにした。AIBP の血中量増加は、肝障害モデルマウスで再現された。第 3 章 第 3 節では AIBP の生理機能を検討した。Recombinant AIBP (rAIBP)の添加は Lipopolysaccharide (LPS)による炎症を顕著に抑制し、AIBP が抗炎症作用を有することが明らかとなった。第 3 章 第 4 節では HDL が AIBP の N 末端側を特異的に切断することを明らかとした。これは AIBP の細胞内局在などを調節する可能性があり、AIBP のアミノ酸配列の変化に関わる新規メカニズムを発見した。

以下に本研究で得られた知見を詳述する。

第2章 FTY720によるABCA1発現増加を介した脂質蓄積の減少

第1節 背景

ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)は、Lipid-Freeな apolipoprotein A-I (apoA-I)への細胞内コレステロールとリン脂質の流出を促進する膜タンパク質であり、高密度リポ蛋白 (HDL)の生成における主要な調節因子である^{17,18}。ABCA1によるHDLの産生は、コレステロール逆転送の開始に必須のプロセスであり、実際、ABCA1の機能喪失変異は血漿中HDLの著しい欠乏と末梢組織への脂質蓄積の増加を引き起こす¹⁹。さらにヒトおよび動物モデルの両方で、ABCA1の変異により大動脈内膜の肥厚が促進されることが知られており²⁰、マクロファージからのコレステロール排出の著しい減少およびアテローム性動脈硬化の促進が観察される²¹。

ABCA1の発現は、核内受容体のLiver X receptor (LXR)によって制御されている。LXRはレチノイドX受容体 (RXR)とヘテロ二量体を形成し、ABCA1プロモーターへ結合することで、ABCA1 mRNAの転写が促進される²²⁻²⁴。この転写促進により、ABCA1タンパク質の発現が増加し、細胞内のコレステロール排出が活性化する。したがって、LXR/RXRシグナルを介したABCA1の薬理的な発現増加戦略は、マクロファージからのコレステロール排出を促進する有効な手段であり、動脈硬化性プラークの形成を予防する上で重要な役割を果たすことが期待される。

Fingolimod (FTY720)は、冬虫夏草菌の一種である *Isaria sinclairii* が産生する天然物、Myriocin をリード化合物として見出された世界初の Sphingosine-1-Phosphate (S1P)受容体 (S1PR)調節薬である²⁵。FTY720は強力な免疫抑制作用を有し、多発性硬化症 (Multiple sclerosis : MS)に対する経口免疫調節薬として Food and Drug Administration (FDA)に承認されている²⁶。FTY720は主に

Sphingosine kinase 2 (SphK2)によってリン酸化され、活性型であるFTY720-Pが生成される。生成されたFTY720-PはS1PRの機能的アンタゴニストとして作用し、免疫細胞の遊走を強力に抑制する (Figure 5)^{27,28}。また、FTY720の投与により、アテローム性動脈硬化モデルマウスのプラーク増悪を抑制できる

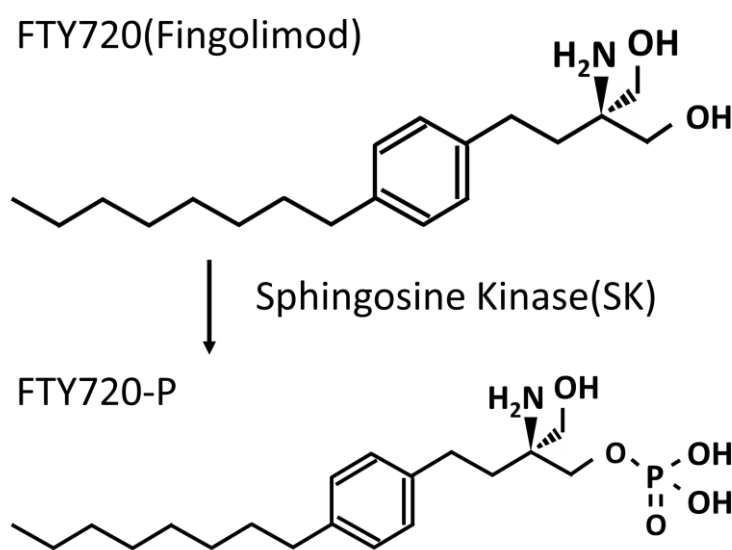


Figure 5. FTY720 to FTY720-P conversion by SphK.

ことが報告されている^{29,30}。FTY720の動脈硬化予防の効果は、S1Pシグナルの阻害による動脈硬化病巣への免疫細胞の遊走抑制という機序が主であると考えられてきた。近年、FTY720を投与したヒト血漿中でHDL濃度が上昇することが示され、FTY720の抗動脈硬化作用がHDLコレステロール逆転送の促進を介して発揮されている可能性が新たに示唆された³¹。しかしこれまで、マクロファージにおけるABCA1の発現や脂質の蓄積に対するFTY720の作用はほとんど解明されていない。

本章では、FTY720が、マクロファージへの脂質蓄積およびABCA1発現に及ぼす影響について検討した。FTY720は、S1PRシグナルではなくLXRおよびSphK2を介してABCA1の発現を増加させており、マクロファージにおける脂質蓄積の減少作用を有することを見いだした。

第2節 結果

第1項 FTY720の添加によるJ774への脂質蓄積への影響

まず、FTY720の添加が泡沫化細胞における細胞内脂質の蓄積を減少させるかどうかを検討した。J774マウスマクロファージを細胞内脂質の染色試薬であるOil Red Oを用いて、細胞内脂質滴の蓄積を評価した。アセチル化LDL(acLDL)を添加することで、細胞内脂質滴の蓄積が観察され(Figure 6A, B, acLDL)、ApoA-Iを添加することで脂質滴が減少した(Figure 6A, B, acLDL+apoA-I)。ApoA-Iは、ABCA1を介したコレステロール等の細胞内脂質の細胞外排出において、脂質のアクセプターとしてはたらくことが知られており、J774から排出された脂質をapoA-Iが受け取ることで細胞内脂質の減少が促進されていることが示唆された¹⁷。FTY720単独の添加はacLDL負荷マクロファージにおける脂質滴の蓄積にほとんど影響しなかったが、FTY720とapoA-Iの併用処理により脂質の蓄積を有意に抑制した(Figure 6A, B, acLDL+FTY720, acLDL+apoA-I+FTY720)。FTY720とapoA-Iの併用処理はapoA-I単独処理と比較しても、より有意な減少作用を示した。これらの結果は、FTY720が細胞からapoA-Iへの脂質の排出を促進することにより、脂質の蓄積を減少させることを示唆している。

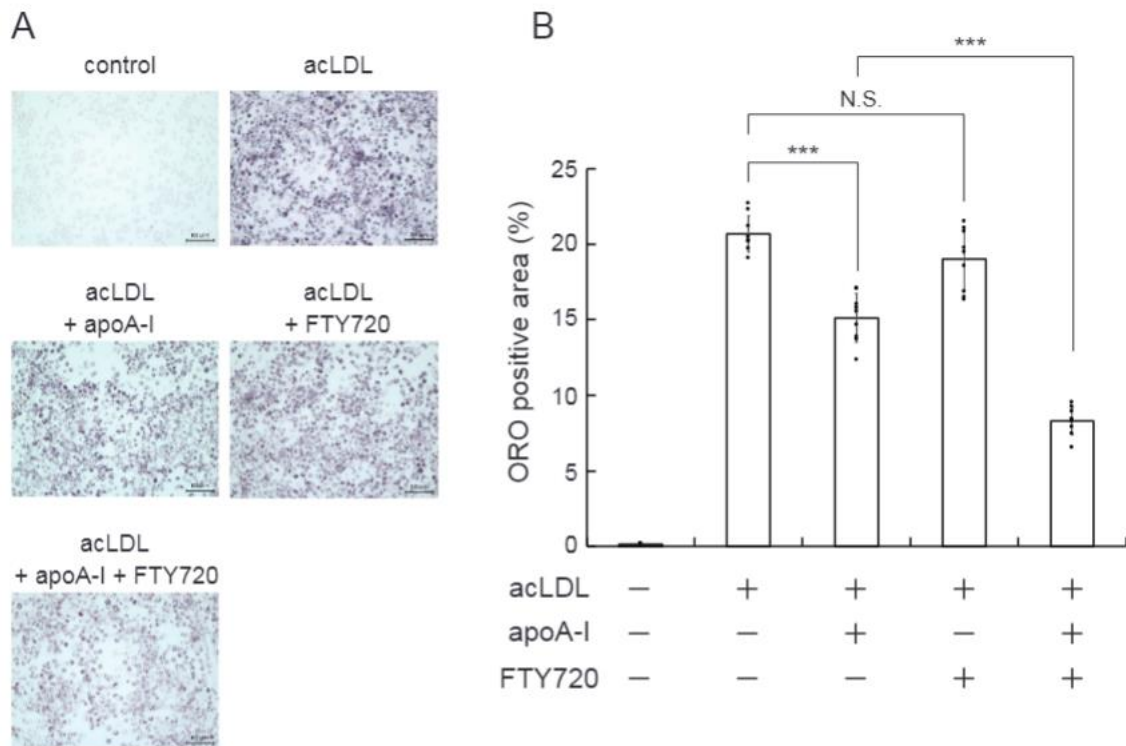


Figure 6. Effect of FTY720 on lipid droplet accumulation in J774 macrophages.

(A, B) J774 cells were incubated with acLDL for 24 h, then treated with FTY720 (1 $\mu\text{g}/\text{mL} = 3.25 \mu\text{M}$) and/or apoA-I (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. Cells were fixed and stained with Oil Red O, and Oil Red O positive areas were quantified for each of the nine random images using image J. The scale bar indicates 20 μm . The magnification of each panel was $\times 200$. Each value represents the mean \pm S. D. (n = 9). ***, $p < 0.005$. N.S.: not significant.

続いて、FTY720の細胞内脂質蓄積の減少作用について、脂質滴の蛍光染色試薬である Nile Redでも検討を行った。Oil Red O染色と同様に、acLDLとのインキュベーションにより細胞内脂質滴の蓄積が観察された (Figure 7, acLDL)。ApoA-Iの添加により、Nile Redの蛍光強度が減少し、細胞内脂質滴の減少が示唆された (Figure 7, acLDL+apoA-I)。FTY720とapoA-Iの併用添加により、Nile Redの蛍光強度がさらに減少した (Figure 7, acLDL+apoA-I+FTY720)。以上より、Figure 6で得られたOil Red O染色を用いた結果と同様に、FTY720によるapoA-Iへの脂質の排出促進および細胞内脂質蓄積の減少が観察された。

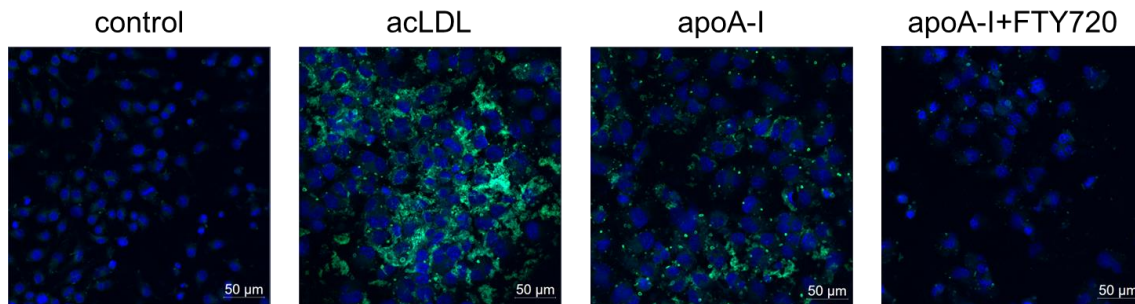


Figure 7. Observation of the effect of FTY720 on lipid droplet accumulation using Nile Red staining.

J774 cells were incubated with acLDL for 24 h, and then treated with FTY720 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and apoA-I (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. Cells were fixed and stained with Nile Red. The scale bar indicates 50 μm .

第2項 FTY720による ABCA1 の発現上昇を介した脂質蓄積の減少

ABCA1 は細胞からの脂質排出において、主要な調節因子であることが知られている¹⁷。そこで、J774 マクロファージにおいて、FTY720 の添加による ABCA1 の発現量を検討した。FTY720 の添加により、ABCA1 タンパク質レベルは濃度依存的かつ有意に上昇した (0.25, 0.5, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figure 8A, FTY720)。一方、FTY720 のリン酸化体である FTY720-P は、高濃度 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) でのみ ABCA1 タンパク質レベルを増加させ (Figure 7A, FTY720-P)、ABCA1 発現の増加作用は FTY720 よりも小さかった。また、FTY720 処理により J774 マクロファージの ABCA1 mRNA レベルが増加し、ABCA1 転写が増加することが示された (Figure 8B)。FTY720 の脂質蓄積減少作用が ABCA1 の発現に依存するかどうかを調べるために、FTY720 刺激細胞に ABCA1 阻害剤 PSC833 を添加し、細胞内の脂質滴を Oil Red O で染色した³²。Figure 8C, D に示すように、apoA-I と FTY720 の併用処理による脂質滴の減少が、PSC833 添加により著しく抑制されていることが確認された。これらの結果は、FTY720 が ABCA1 の発現を増加させることにより、細胞内脂質の蓄積を抑制することを示すものである。

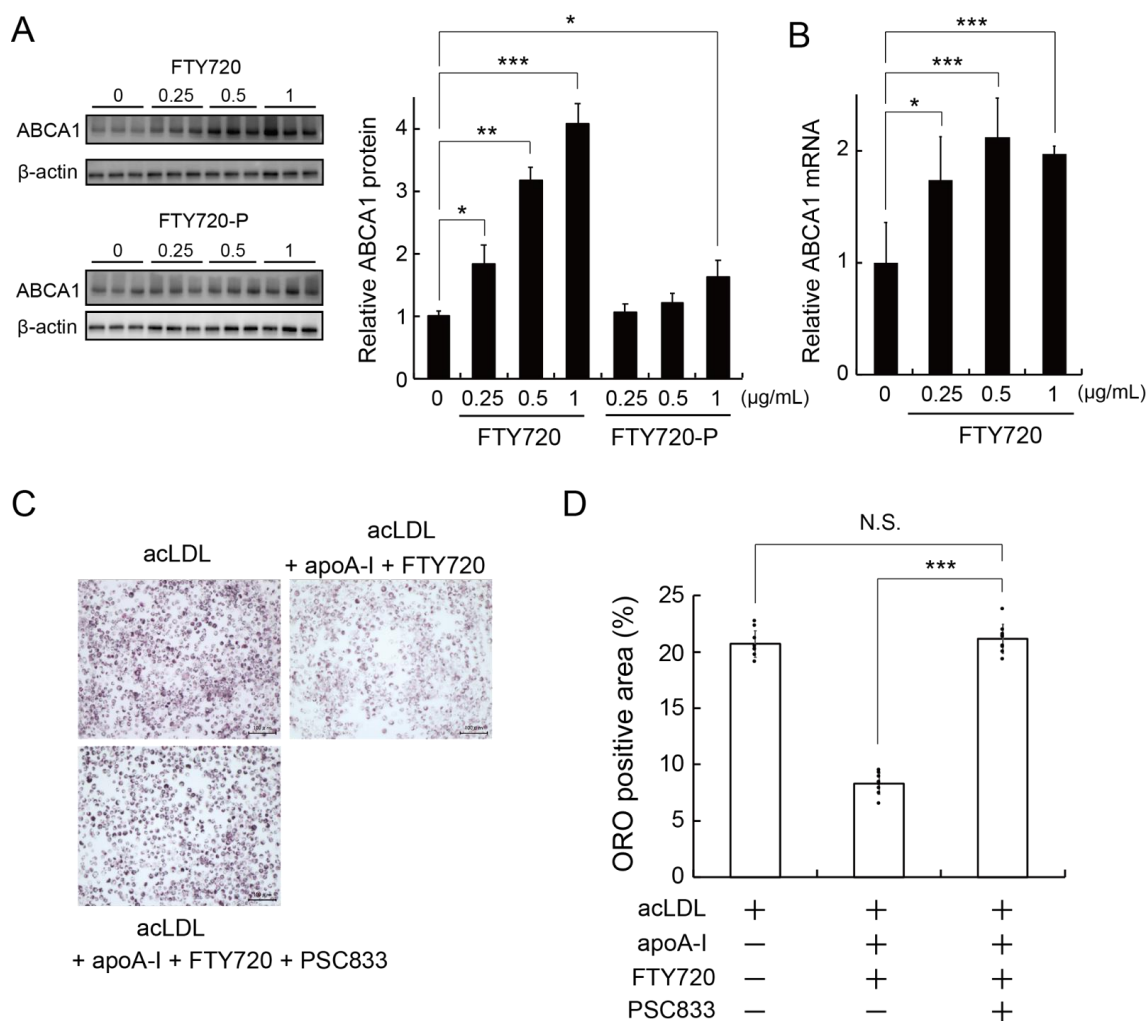


Figure 8. FTY720 upregulates the expression of ABCA1 and reduces lipid accumulation in J774 macrophages.

(A) J774 cells were treated with indicated concentration of FTY720 (0.25, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/mL}$ = 0.81, 1.63, 3.25 μM) for 24 h. The protein expression of ABCA1 and β -actin was determined by Western blot analysis. (B) Cells were incubated with FTY720 for 24 h, and ABCA1 mRNA levels were analyzed by RT-qPCR. The results are representative of 3 independent experiments. (C, D) Cells were incubated with acLDL for 24 h, and then treated with FTY720 (1 $\mu\text{g/mL}$) and apoA-I (25 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h with or without PSC833 (10 μM). Cells were fixed and stained with Oil Red O, and Oil Red O positive areas were quantified for each of the nine random images using image J. The scale bar indicates 20 μm . The magnification of each panel was $\times 200$. Each value represents the mean \pm S. D. (n = 9). *, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$ ***, $p < 0.005$. N.S.: not significant.

PSC833 は ABCA1 以外の ABC トランスポーター、中でも ABCB1 の阻害活性を持つことが報告されている³³。さらに、FTY720 は、ABCB1 および ABCC1 を含む一部の ABC トランスポーターの発現を促進する可能性が報告されている³⁴。そこで、ABCA1 を特異的に阻害するために ABCA1 siRNA を使用し、Nile Red による脂質染色を行った。その結果、ABCA1 siRNA の使用により FTY720 による細胞内脂質蓄積の減少が有意に抑制された (Figure 9A, B)。これは、FTY720 による ABCA1 の発現上昇が細胞内脂質の減少につながることを示唆しており、Figure 8 の結果と一致する。一方で、siABCA1 の処理は、FTY720 の作用を完全には打ち消さなかった。これは acLDL と ABCA1 siRNA の同時処理により、細胞死が誘導される傾向があったことが原因であると考えている (Data not shown)。ABCA1 siRNA は PSC833 よりも長時間の処理が必要であったために細胞死が誘導されたと考えられ、脂質蓄積に対する ABCA1 の寄与が実際よりも低く観測された可能性がある。

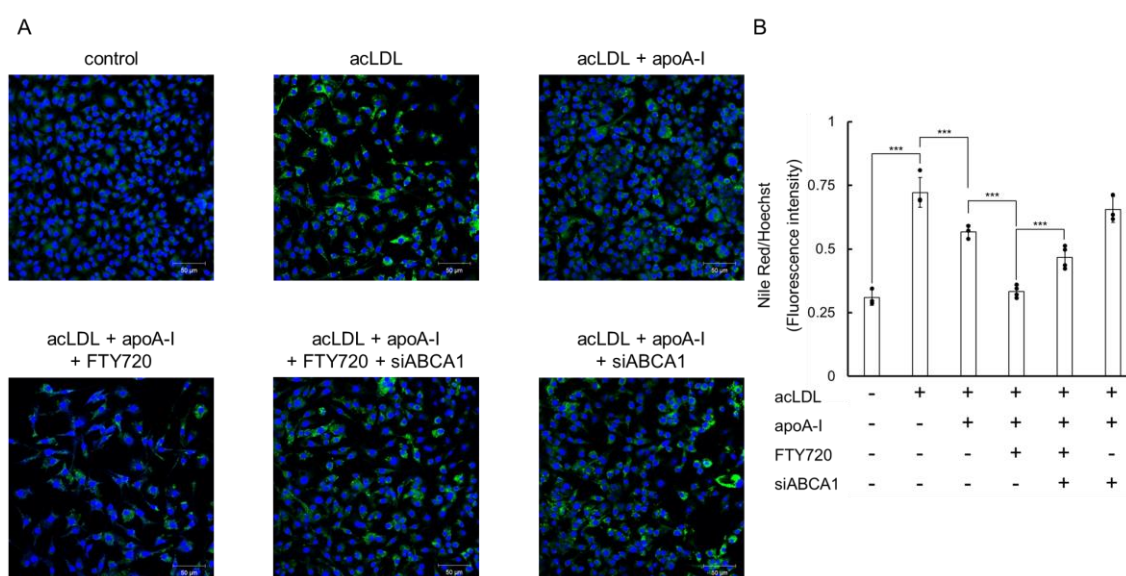


Figure 9. The lipid accumulation reducing effect of FTY720 is counteracted by siABCA1 treatment.

(A, B) J774 cells were incubated with siABCA1 and acLDL for 24 h, and then treated with FTY720 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and apoA-I (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. The cells were fixed and stained with Nile Red, and Nile Red positive areas were quantified for each of the three random images using Image J. ***, $p < 0.005$. Each value represents the mean \pm S.D. ($n = 3$). The scale bar indicates 50 μm . Each value represents the mean \pm S. D. ($n = 3$).

続いて、FTY720 および FTY720-P の添加により他の ABC トランスポーターの発現が上昇されるかどうかを調べた。ABCB1 のサブタイプである ABCB1a、ABCB1b および ABCC1 は薬剤耐性に関わる ABC トランスポーターであり、樹状細胞において FTY720 の添加により増加することが報告されている³⁵。ABCG5 は肝臓でのステロール排泄を担うトランスポーターとして知られている³⁶。本研究の実験条件では、FTY720 は ABCB1a、ABCB1b、ABCC1、ABCG5 の発現をほとんど上昇させないことが判明した (Figure 10, ABCB1a, ABCB1b, ABCC1, ABCG5)。一方で FTY720 の添加により、マクロファージ細胞からの脂質搬出を担う主要な ABC トランスポーターの ABCA1 および ABCG1 の発現が増加した (Figure 10, ABCA1, ABCG1)。これは Figure 8C, D で示した、FTY720 による細胞内脂質の蓄積を抑制が ABCA1 発現増加を介するという結果と一致している。

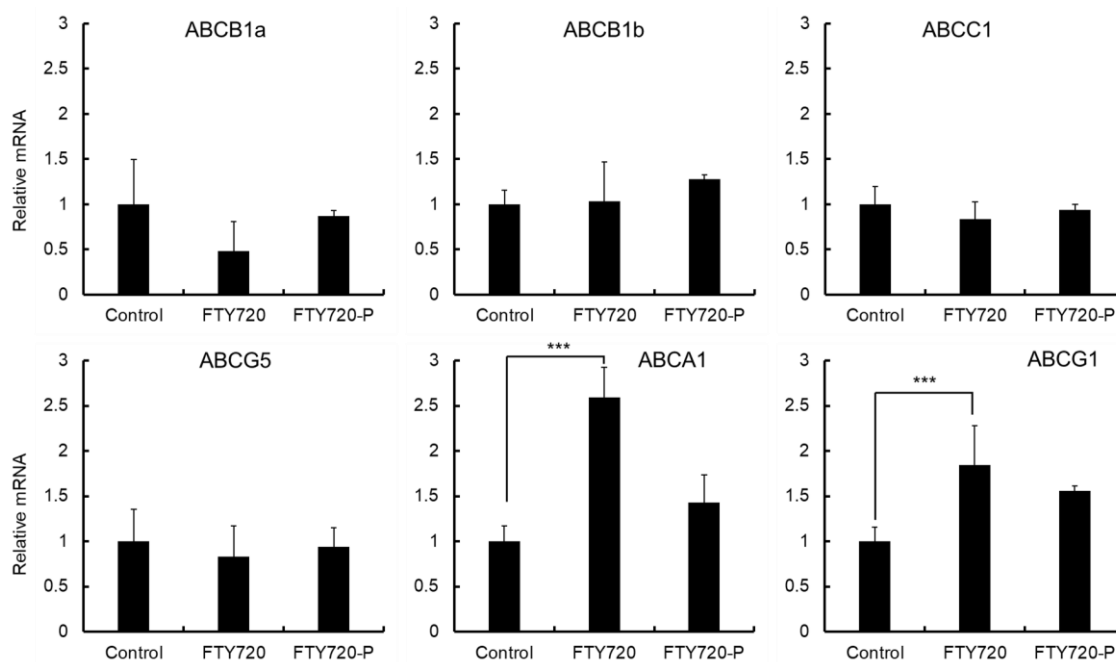


Figure 10. Alteration of ABC transporters expression by addition of FTY720 and FTY720-P. J774 cells were incubated with 1 μ g/mL FTY720 or 1 μ g/mL FTY720-P for 24 h. Relative mRNA levels were analyzed by RT-qPCR. ***, $p < 0.005$. N.S., not significant. Each value represents the mean \pm S.D. ($n = 3$).

第3項 FTY720によるABCA1発現上昇におけるLXRの関与

これまで多くの研究により、LXRの活性化がABCA1の発現を促進する因子であることが示されている²³。LXRがFTY720を介したABCA1の発現増加に関与しているかどうかを調べるために、J774細胞をFTY720とLXRアンタゴニストの5CPPSS-50で併用処理した。Figure 11Aに示すように、5CPPSS-50の処理により、FTY720のABCA1 mRNA発現の増加作用が消失した。さらに、FTY720を添加したJ774細胞において、LXRの下流遺伝子であるABCG1、FASN、APOEのmRNAレベルを測定した(Figure 11B)。FTY720処理により、ABCG1、FASN、APOEのmRNA発現が増加したことから、FTY720がLXRの活性化を誘導し、ABCA1を含む標的遺伝子の発現を増強することが示唆された。

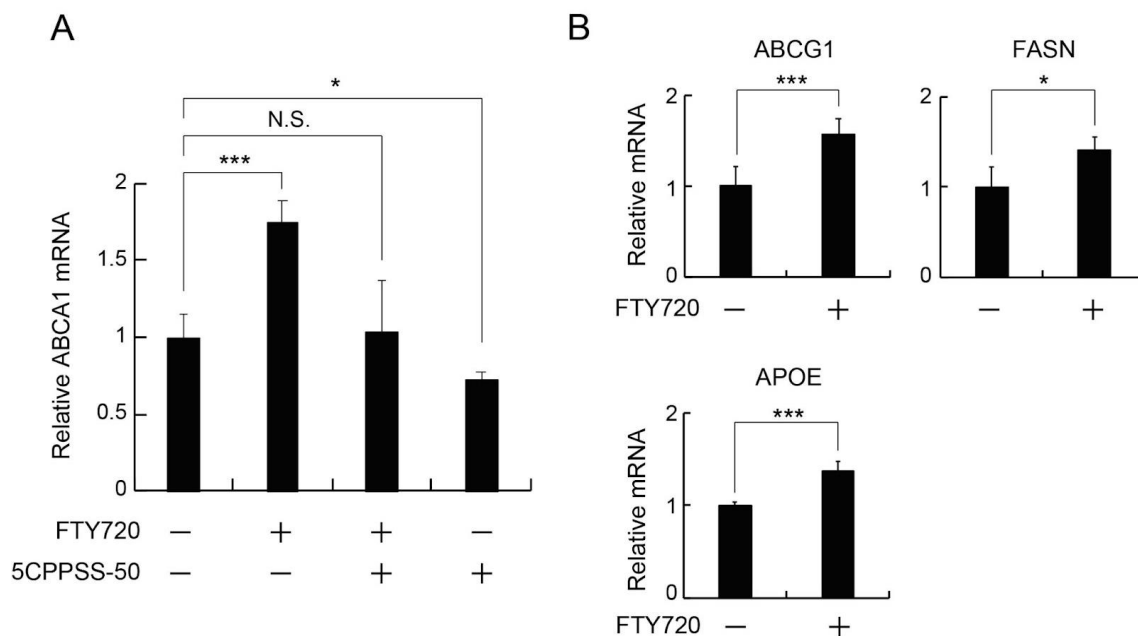


Figure 11. LXR is involved in the upregulation of ABCA1 expression induced by FTY720.

(A, B) J774 cells were incubated with or without 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FTY720 (3.25 μM) and/or 0.5 μM 5CPPSS-50 (LXR antagonist) for 24 h. Relative mRNA levels were analyzed by RT-qPCR. *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.005$. N.S., not significant. Each value represents the mean \pm S.D. ($n = 3$).

第4項 FTY720によるABCA1発現上昇におけるSphK2の関与

FTY720は生体内でリン酸化されてFTY720-Pとなり、S1PR(主にS1PR1)のリガンドとして作用し、多様な下流シグナル伝達経路を活性化する^{26,37}。S1PRがABCA1の発現調節に関与しているかどうかを調べるために、J774マクロファージをFTY720-Pのリガンドであ

る S1P で処理した。S1P は ABCA1 の発現を増加させなかった (Figure 12, Lane2)。さらに、S1PR モジュレーターである W146 (選択的 S1PR1 アンタゴニスト)、SEW2871 (選択的 S1PR1 アゴニスト)、または VPC23019 (S1PR1 および S1PR3 アンタゴニスト) も ABCA1 タンパク質レベルに影響を与えなかったことから、S1PR とその下流シグナルは FTY720 による ABCA1 の活性化には関与しない可能性が考えられた (Figure 12, Lane 3, 4, 5)。

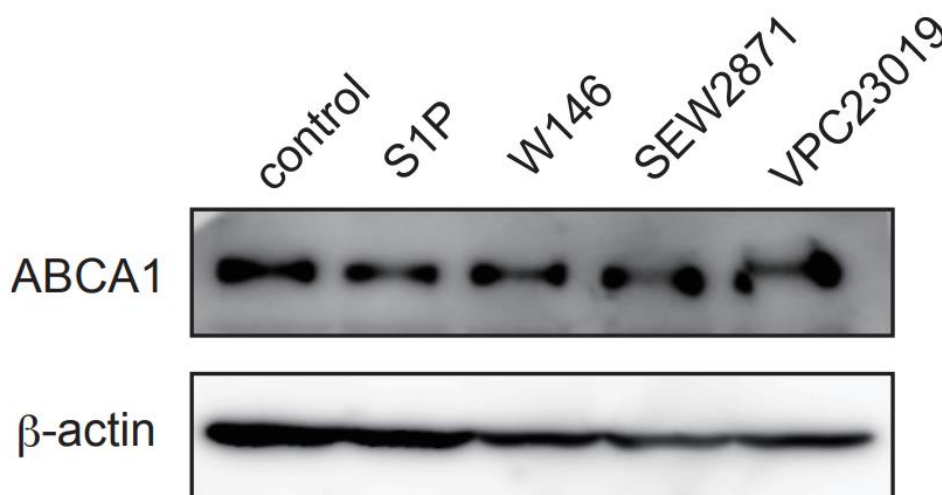


Figure 12. S1P receptors may not involve ABCA1 upregulation.

J774 cells were incubated with S1P (3 μ M), W146 (1 μ M), SEW2871 (1 μ M) or VPC23019 (1 μ M) for 24 h. ABCA1 and β -actin were analyzed by Western blotting.

過去に、FTY720 は主に Sphingosine kinase 1 (SphK1)ではなく、Sphingosine kinase 2 (SphK2)によってリン酸化されることが報告された^{27,28}。FTY720 の効果が SphK1 または SphK2 に関連しているかどうかを調べるために、細胞を選択的 SphK1 阻害剤 PF-543 (Ki = 3.6 nM)³⁸ または選択的 SphK2 阻害剤 SLM6031434 (Ki = 0.4 μ M)³⁹ で処理し、ABCA1 タンパク質および mRNA レベルを計測した。SLM6031434 は J774 および RAW264 マクロファージにおいて ABCA1 のタンパク質発現を有意に増加させたが、PF-543 は J774 において ABCA1 発現増加を中程度に誘導し、RAW264 において ABCA1 タンパク質レベルを増加させなかった (Figure 13A, B)。また、J774 細胞では、SLM6031434 によって ABCA1 の mRNA レベルが有意に上昇し、PF-543 によって中程度に誘導された (Figure 13B)。次に、FTY720 の効果が SphK2 の発現に依存するかどうかを検討した。FTY720 による ABCA1 の発現上昇は、SphK2 ノックダウン細胞では消失した (Figure 13C, D)。同様に、SphK2 のノックダウンにより LXR 標的遺伝子の発現誘導に対する FTY720 の効果が消失した (Figure 13E)。これらの知見は、Figure 13A および Figure 13B とともに、SphK2 酵素活性の阻害ではなく、SphK2 と化合物との結合が、マウスマクロファージにおける ABCA1 の発現増加に関与している可能性を示唆するものである。

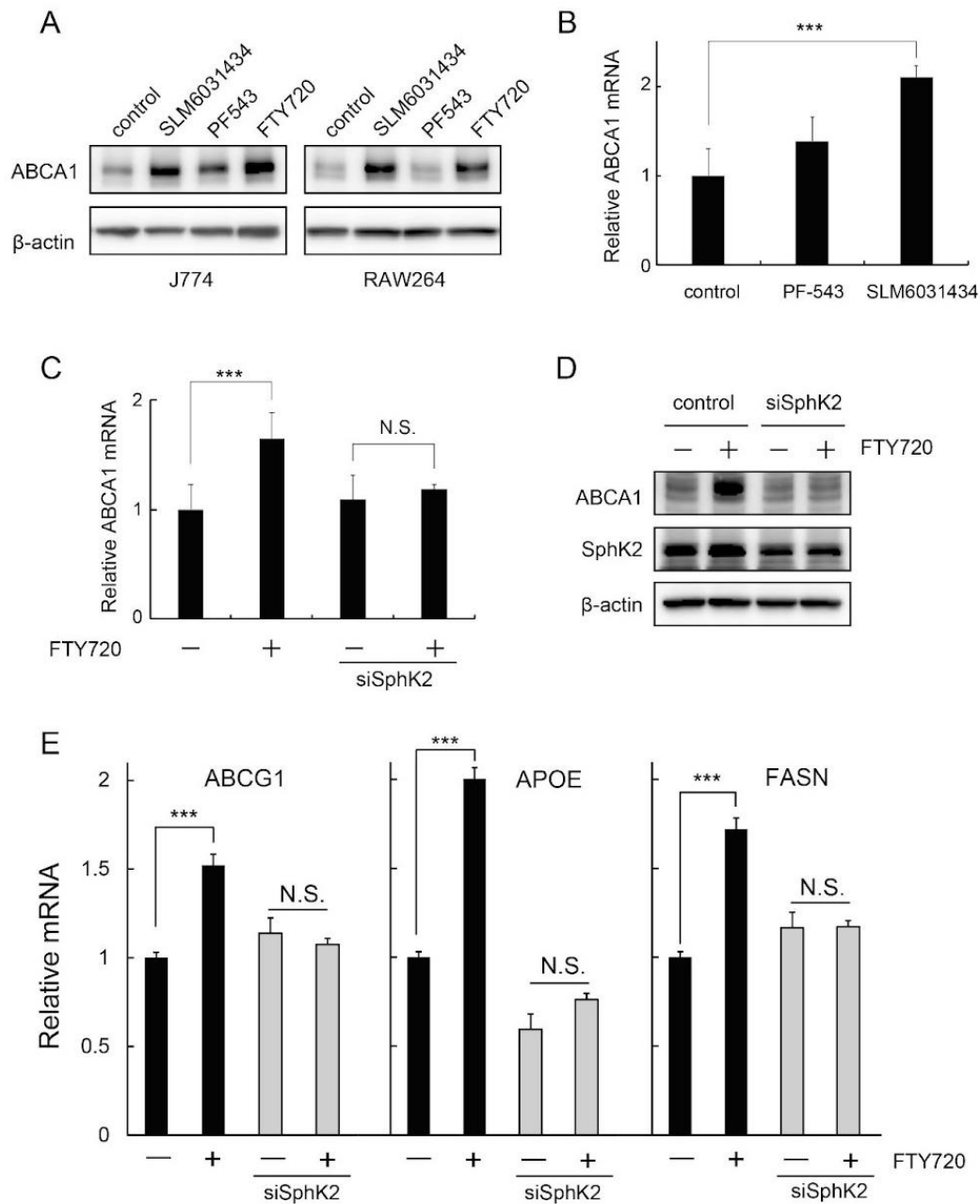


Figure 13. SphK2 is involved in the upregulation of the ABCA1 expression induced by FTY720.

(A, B) J774 and RAW264 cells were incubated with PF-543 (40 nM) or SLM6031434 (4 μ M) for 24 h. The protein expression of ABCA1 was determined by Western blot analysis. ABCA1 mRNA levels in J774 were analyzed by RT-qPCR. (C, D, E) RAW264 cells were transfected with negative control or SphK2 siRNA, and then treated with FTY720 (1 μ g/mL = 3.25 μ M) for 24 h. ABCA1, ABCG1, APOE, and FASN mRNA levels were analyzed by RT-qPCR. The protein expression of ABCA1, SphK2 and β -actin was determined by Western blot analysis. Each value represents the mean \pm S. D. (n = 3). ***, p < 0.005. N.S., not significant.

第5項 FTY720 による SphK2 を介したヒストンアセチル化の増加および ABCA1 の発現の促進

Figure 13 に示すように、SLM6031434 と FTY720 は ABCA1 の発現を増加させ、その作用は SphK2 の発現に依存していた。Hait らは、核内の SphK2 が histone deacetylases 1 (HDAC1) または HDAC2 と結合して co-repressor 複合体を形成し、標的遺伝子の転写をエピジェネティックに制御することを報告している⁴⁰。そこで、FTY720 投与がヒストンアセチル化に影響を与えるかどうかを検討した。FTY720 は Histone H3 lysine 9 のアセチル化 (H3K9ac) を増加させることがわかった (Figure 14A, B)。また、FTY720 による H3K9ac の増加は、SphK2 ノックダウンにより減弱した (Figure 14B)。さらに、HDAC1 および HDAC2 の阻害剤である Trichostatin A (TSA) を細胞に添加すると、ABCA1 タンパク質 (Figure 14C) および mRNA レベル (Figure 14D) が上昇した。これらの結果から、FTY720 は SphK2 を介してヒストンアセチル化を増加させることにより、ABCA1 の発現を増強することが示唆された。

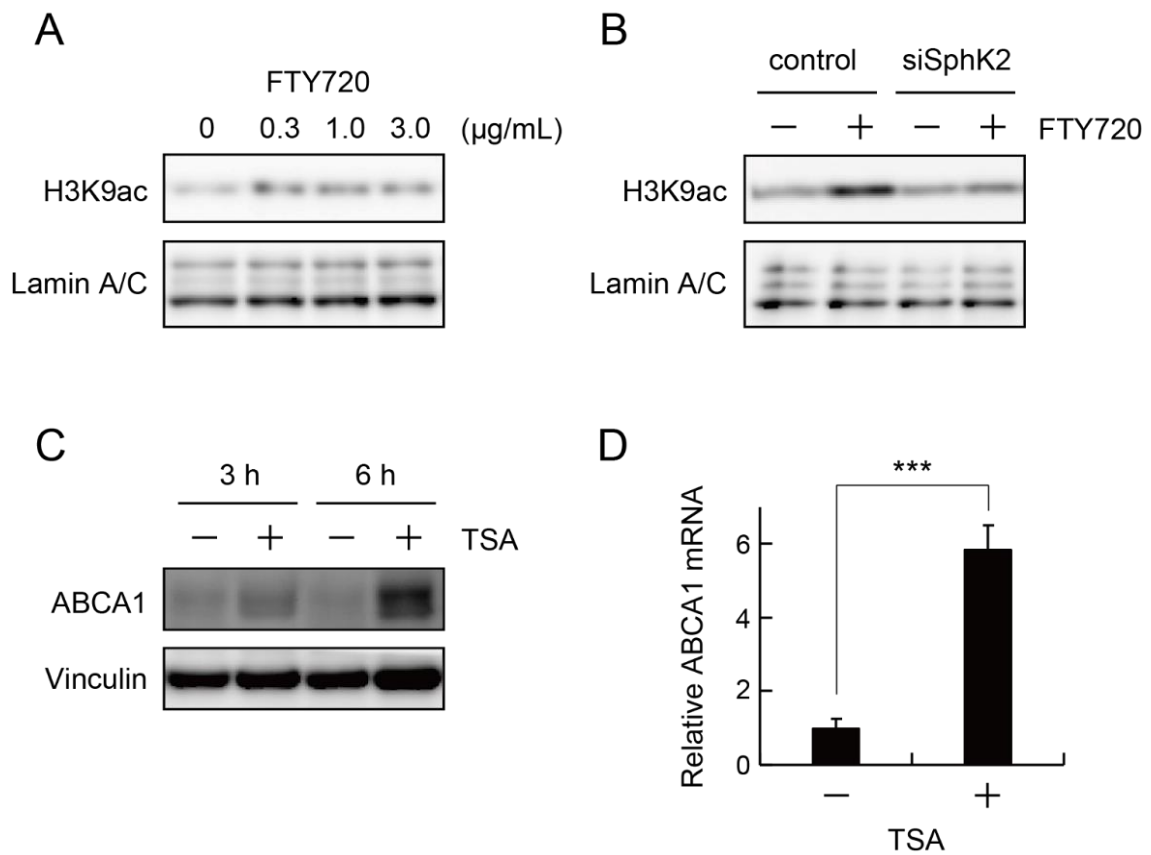


Figure 14. FTY720 enhances ABCA1 expression by increasing histone acetylation via SphK2.

(A) RAW264 cells were incubated with FTY720 for 15 min as indicated concentration. The expression of H3K9ac and Lamin A/C were determined by Western blot analysis. (B) Cells were transfected with negative control or SphK2 siRNA for 24 h, and then treated with FTY720 (1 µg/mL = 3.25 µM) for 15 min. The expression of H3K9ac and Lamin A/C were determined by Western blot analysis. (C) RAW264 cells were incubated with trichostatin A (TSA, 1 µM) for as indicated time. The expression of H3K9ac, Lamin A/C and ABCA1 was determined by Western blot analysis. Western blot analyses are representative of three independent experiments. (D) RAW264 cells were incubated with TSA (1 µM) for 6 h. ABCA1 mRNA levels were analyzed by RT-qPCR. Each value represents the mean ± S. D. (n = 3). ***, p < 0.005.

第3節 小括

FTY720 は、First-in-class の S1PR モジュレーターとして、リンパ球の枯渇や抗炎症反応など、様々な作用を発揮する免疫抑制剤である^{26,37}。FTY720 は、動脈硬化モデルマウスである LDLR^{-/-}または apoE^{-/-}マウスに対して、動脈硬化の形成を抑制することが報告されている^{29,30}。一方、通常の実験食を摂取した apoE^{-/-}マウス⁴¹や中程度の脂肪食を接種した LDLR^{-/-}マウス⁴²のプラーク病変に対しては、部分的にしか FTY720 の効果が見られなかった。これは、FTY720 の抗動脈硬化作用は餌の種類や動脈硬化の進行度によって影響を受けることを示唆しているのかもしれない。一般に、*in vivo*における FTY720 の動脈硬化予防効果は、S1P シグナルを調節することにより、単球およびマクロファージの動脈硬化病巣への遊走を抑制することに起因すると考えられてきた。最近、Kan らは、FTY720 の投与が MS 患者の HDL コレステロール値の上昇と関連していることを報告し、FTY720 の抗動脈硬化作用が ABCA1 によって媒介されている可能性が示唆された³¹。しかしながら、マクロファージにおける脂質蓄積および ABCA1 発現に対する FTY720 の効果はほとんど不明であった。本研究では、FTY720 がマクロファージにおける脂質の蓄積を抑制すること (Figure 6)、および FTY720 が ABCA1 の発現を上昇させ、細胞からの脂質の排出を促進することを明らかにした (Figure 7, 8)。ABCA1 を介した脂質排出は、細胞内の余剰脂質が細胞外の apoA-I に放出されて HDL を生成するプロセスであり、コレステロール逆転送における最初のステップである¹⁷。したがって、FTY720 の抗動脈硬化作用は、HDL を介したコレステロール逆転送を促進することで発揮されている可能性が考えられる。

さらに、FTY720 による ABCA1 の発現上昇が LXR によって媒介されていることを明らかにした (Figure 11)。核内受容体である LXR は、ABCA1 や ABCG1 を含むいくつかの脂質代謝関連遺伝子の主要な調節因子であり、コレステロールのホメオスタシスにおいて重要な役割を担っている²²。過去の研究において、LXR アゴニスト T0901317 がマクロファージにおける脂質の排出を促進し⁴³、マウスにおける動脈硬化の進行を抑制することが明らかにされている⁴⁴。本研究では、LXR アンタゴニストが、FTY720 によって誘導される ABCA1 の発現上昇を阻害することを示し (Figure 11A)、FTY720 が LXR 活性化剤として機能することが示唆された。

Figure 8A において、リン酸化されていない FTY720 は、リン酸化された FTY720-P よりも効率的に ABCA1 の発現を増加させた。FTY720-P は S1PR に対して親和性の高いリガンドとして広く知られており、特に S1PR1 への結合親和力が高いことが明らかとなっている。一方で、FTY720 は S1PR に対して低親和性である^{26,37}。さらに、S1P および 3 種類の S1PR モジュレーター (アゴニストまたはアンタゴニスト)が ABCA1 の発現に影響を与えなかったことから (Figure 12)、S1PR および下流シグナルは FTY720 による ABCA1 発現誘導のメカニズムに関与していないことが示唆された。

FTY720 のリン酸化を仲介する酵素は SphK2 であり^{27,28}、核を含むいくつかのオルガネラで発現していることが知られている⁴⁵。興味深いことに、核内の SphK2 は HDAC1 および HDAC2 と結合して co-repressor 複合体を形成し、標的遺伝子の転写を制御することが報告されている^{40,46}。例えば、FTY720 は NIH3T3 線維芽細胞において Niemann-Pick type C1 および C2 のタンパク質発現を上昇させ、siSphK2 で処理すると FTY720 の効果が消失することが報告されている⁴⁷。実際、SphK2 の発現をノックダウンすると、FTY720 による ABCA1 の発現誘導の効果が消失した (Figure 13C, D)。このことから、FTY720 による ABCA1 の発現上昇が SphK2 の発現に依存していることが示唆された。一方、Figure 13A, B に示すように SphK2 の阻害剤である SLM6031434 は、ABCA1 タンパク質及び mRNA の発現量を増加させており、一見、Figure 13C, D の結果とは矛盾しているように思われる。高濃度の FTY720 ($\geq 30 \mu\text{M}$) が SphK2 活性を阻害する可能性が報告されているが²⁷、本研究における FTY720 の濃度 ($\leq 3.25 \mu\text{M}$) が SphK2 活性を阻害する可能性は低い。FTY720 及び SLM6031434 が SphK2 に結合することを考えると、化合物が SphK2 に結合することが、ABCA1 の発現増加につながる可能性が示唆される。以上のことから、FTY720 の ABCA1 増加作用は、SphK2 の酵素活性に対する阻害作用ではなく、SphK2 がリガンドと結合することによる転写活性の増加に依存していると考えられる。

近年、FTY720 投与により MCF7 細胞で HDAC 阻害が起こることや⁴⁸、FTY720 の投与により NASH モデルマウスの肝臓でヒストンのアセチル化が増加すること⁴⁹ が報告された。本研究では、FTY720 が SphK2 の発現依存的にヒストンアセチル化を誘導することを明らかにした (Figure 14A, B)。さらに、HDAC1 および HDAC2 の阻害剤である TSA の処理により、ABCA1 の発現が顕著に増加した (Figure 14C, D)。これらの結果は、FTY720 がヒストン脱アセチル化を阻害することにより ABCA1 の発現を増強することを示唆している。一方、TSA により、ABCG1 と APOE の mRNA 発現は増強されたが、LXRA および FASN の発現は亢進しないことが分かった (Figure 15)。TSA は、クラス 1 および 2 に属する HDAC を幅広く阻害することが知られている。このことから、FTY720-SphK2 複合体は特定の HDAC 種のみを用いて LXR と ABCA1 の発現を制御していることが考えられるが、SphK2 が LXR 活性化を制御する詳しい機構は未解明であり、今後の課題である。SphK2 のノックアウトマウスは動脈硬化が悪化することが報告されており⁵⁰、SphK2 による ABCA1 および LXR 標的遺伝子のエピジェネティックな制御が FTY720 の抗動脈硬化メカニズム解明の鍵となる可能性がある。

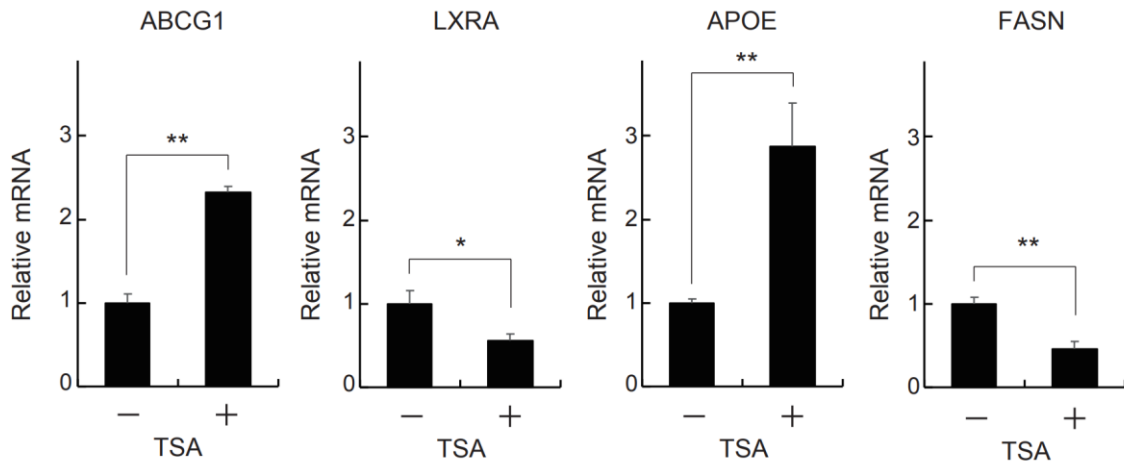


Figure 15. Changes of LXR-targeted genes by Trichostatin A (TSA) treatment.

RAW264 cells were incubated with TSA (1 μ M) for 6 h. ABCG1, LXRA, APOE, FASN mRNA levels were analyzed by RT-qPCR. Each value represents the mean \pm S. D. (n = 3). *, p < 0.05, **, p < 0.01.

以上より、本章では、FTY720 がマウスマクロファージにおいて LXR および SphK2 を介して ABCA1 の発現を促進することにより、脂質の蓄積を抑制することを明らかにした (Figure 16)。これらの結果は、アテローム性動脈硬化の治療における FTY720 の使用について新たな知見を提供するものである。

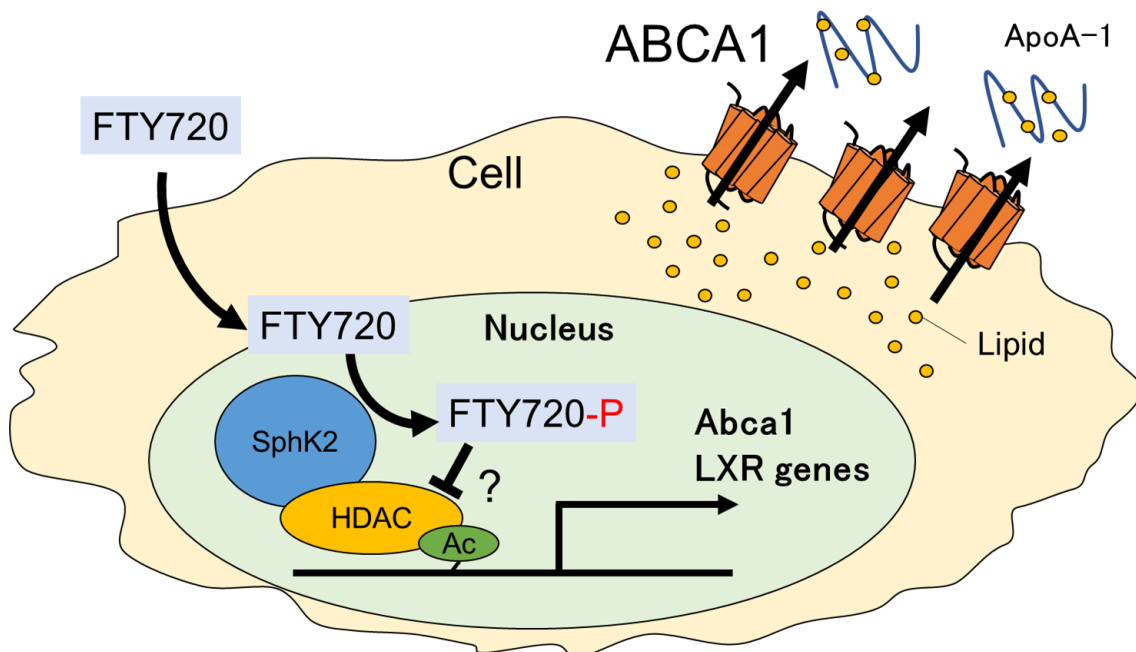


Figure 16. Graphical Abstract of ABCA1 increase by FTY720.

第4節 実験方法

第1項 Materials and Reagents

RPMI-1640 medium, penicillin and streptomycin solution, 4% paraformaldehyde, and 5CPPSS-50 were purchased from FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Gibco (Grand Island, NY). ISOGEN II reagent was purchased from Nippon Gene (Toyama, Japan). Lipofectamine™ RNAi Max transfection reagent was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). One Step TB Green Prime Script RT-PCR Kit and CellAmp™ Direct RNA Prep Kit for RT-PCR were purchased from Takara Bio (Shiga, Japan). Mouse monoclonal anti-β-actin antibody (M2), mouse monoclonal anti-vinculin antibody, protease inhibitor cocktail, and Oil Red O solution were purchased from Sigma-Aldrich, Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Rabbit monoclonal anti-acetyl histone H3 (Lys9) antibody was purchased from Cell Signaling technology (Danvers, MA, USA). Rabbit polyclonal anti-SphK2 antibody was purchased from Proteintech (Rosemont, IL, USA). Lamin A/C antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat polyclonal anti-rat IgG antibody were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc. (West Grove, PA, USA). HRP-conjugated goat polyclonal anti-mouse IgG antibody were purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). PSC833 was purchased from Novartis Pharma (Basel, Switzerland). Lipid Droplets Fluorescence Assay Kit (Nile Red), FTY720, FTY720-P, W146, SEW2871, VPC23019, FTY720, PF-543, and SLM6031434 were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Rat monoclonal anti-ABCA1 antibody was kindly provided by Dr. S. Abe-Dohmae (Chubu University). Acetylated low-density lipoprotein (acLDL) was kindly provided by Dr. M. Tsujita (Nagoya City University).

第2項 Cell Culture and siRNA Transfection

Mouse macrophage cell line J774 and RAW264 (Japan Health Sciences Foundation) were cultured in RPMI-1640 (10% FBS, 100 µg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin) at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Cells were transfected using Lipofectamine™ RNAi Max following the manufacturer's protocol. siRNA targeting SphK2 (sense 5'-UUAUUGCAUAGACCUUUUCA-3' and antisense 5'-GAAAAGGUCUAUGCAAUAAAG-3') was purchased from Sigma-Aldrich. Pre-designed siRNA targeting ABCA1 (AM16708) was purchased from Thermo Fisher Scientific. A negative control siRNA was purchased from RNAi Inc. (Tokyo, Japan).

第3項 Evaluation of Lipid Accumulation by Oil Red O Staining

J774 macrophages were seeded on 12-well plates (2.5 × 10⁵ cells/well). The cells were incubated with 50 µg/mL acLDL for 48 h. Subsequently, the cells were treated for 24 h with FTY720, apoA-

I, and/or PSC833, as indicated. The cells were washed with PBS and incubated with 4% paraformaldehyde for 10 min. After rinsing with 60% isopropanol (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), cells were incubated with Oil Red O solution for 10 min, and then washed once with 60% isopropanol. Stained cells were then observed under a fluorescence microscope (BZ-9000, Keyence, Osaka, Japan). Nine images of each treatment were used to calculate the Oil Red O positive area using Image J software.

第4項 Evaluation of Lipid Accumulation by Nile Red Staining

Cells were fixed for 20 min at room temperature with 4% paraformaldehyde. Following fixation and washing using PBS, Nile Red compound (1:1000, 500001, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) was added to the wells and incubated for 10 min in the dark. The wells were then washed using PBS and subsequently cell nuclei were counterstained with 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI, Invitrogen™, P36962, Carlsbad, CA, USA). The cells were imaged with a fluorescence microscope.

第5項 Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Total RNA was extracted using a CellAmp™ Direct RNA Prep Kit from cells grown in 96-well plates using the manufacturer's instruction. mRNA expressions were quantified using a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with a One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR kit (Takara Bio Inc., Osaka, Japan, RR066A) and the following gene-specific primers: GAPDH sense 5'-TGCCATCAACGACCCCTTCA-3' and antisense 5'-TGACCTTGCCCACAGCCTTG-3'; ABCA1 sense 5'-TCCAGGCCAGTACGGAATTC-3' and antisense 5'-ACTTTCCTCGCCAAACCAGTAG-3'; LXR α sense 5'-TCTGCGGTGGAGCTGTGGAA-3' and antisense 5'-TGACGCTGGGCGGAAGAAT-3'; apoE sense 5'-TCTGCGGTGGAGCTGTGGAA-3' and antisense, 5'-TGACGCTGGGCGGAAGAAT-3'; ABCG1 sense 5'-TCTGCGGTGGAGCTGTGGAA-3' and antisense 5'-TGACGCTGGGCGGAAGAAT-3'; ABCB1-1a sense 5'-CAGCAGTCAGTGTGCTTACAA-3' and antisense 5'-ATGGCTCTTTTATCGGCCTCA-3'; ABCB1-1b sense 5'-CTGTTGGCGTATTTGGGATGT-3' and antisense 5'-CAGCATCAAGAGGGGAAGTAATG-3'; ABCC1 sense 5'-TGATGGCTCCGATCCACTCT-3' and antisense 5'-TCCACAGAAAGAATCCTAAGGCA-3'. PCR was performed under the following conditions: denaturation at 50 °C for 2 min, followed by 38 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Gene expression was normalized to internal controls and fold changes were calculated using relative quantification ($2^{-\Delta\Delta Cq}$). The amplification specificity was checked by melting curve analysis.

第6項 Western Blot Analysis

Cells were lysed on ice with RIPA buffer (20 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl) containing protease inhibitors. Nuclear extract was prepared by NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Equal amounts of protein extracts were separated by Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to PVDF membranes. Following blocking in 4% skim milk in water at room temperature for 1 h, the membranes were incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibodies (ABCA1 or β -actin). The following day, membranes were incubated with the respective secondary antibodies for 1 h at room temperature after rinsing three times with TBS-T buffer. ImageQuant LAS 4000 system (Cytiva, Tokyo, Japan) was used to capture the protein bands. The optical density of each band was quantitated using Image J software and normalized to the intensity of β -actin.

第7項 Statistical Analysis

The experiments were performed three or more times. The data are presented as the mean \pm standard deviation (S.D.). The statistical significance of differences between groups was analyzed with Student's t-test or one-way ANOVA with Tukey's post hoc test using GraphPad Prism 5.0 software. Values of $p < 0.05$ were considered to indicate statistically significant differences.

第3章 HDL 結合タンパク質 AIBP の生理的調節

第1節 背景

アテローム性動脈硬化では血管内膜にコレステロール等の脂質が蓄積することでプラークと呼ばれる病巣を形成する²。第2章において HDL によるプラークの退縮を促進する膜タンパク質である ABCA1 の発現促進メカニズムを示した。コレステロール引き抜き作用を中心とした HDL 機能の活性化に関する研究は、前章で示した結果を含め、ABCA1 等の細胞側の因子に着目したものがほとんどである⁶。一方で、HDL 機能を規定するような細胞外因子 (HDL 側の因子)はほとんど特定されていない。

本章では HDL へ結合し、その機能を増強するタンパク質である ApoA-I binding protein (AIBP)に着目した。AIBP は全身にユビキタスな発現が見られる 28.8 kDa のタンパク質である。Ritter らは ApoA-I と結合するタンパク質を探索するため Yeast two-hybrid スクリーニングを行い、AIBP を同定した⁵¹。AIBP は動物種間で高度に保存されていることから生体にとって重要な機能を担うタンパク質であると考えられているが、その機能や生理的な調節機構については不明な点が多い⁵²⁻⁵⁴。

生体内における内因性 AIBP の機能として、HDL へのコレステロール排出の促進と、それに伴う脂質ラフトの崩壊が最も研究されている⁵⁵。脂質ラフトはコレステロールなどの脂質からなる細胞膜マイクロドメインの1種であり、様々な生理機能に関連している⁵⁶。2013年、AIBP 欠損ゼブラフィッシュにおいてコレステロール流出が低下し、血管新生が抑制されることが報告された⁵⁷。このフェノタイプの発現分子メカニズムとして、AIBP による脂質ラフトの崩壊がシグナル伝達を担う膜タンパク質 Vascular endothelial growth factor (VEGF)受容体の機能を負に調節することで、血管新生の抑制が行われることが明らかにされている⁵⁷⁻⁵⁹。また、2017年には AIBP ノックアウトマウスの解析により、アテローム性動脈硬化が増悪することが初めて明らかとなった⁶⁰。このメカニズムは完全には明らかとなっていないが、AIBP の抗炎症作用の関与が示唆されている。実際 AIBP は脂質ラフトを崩壊させることで、炎症性シグナルを伝達する Toll-like receptor 4 (TLR4)の二量体化を防ぎ、抗炎症作用を発揮すると言われている^{61,62}。これらの報告から現在、AIBP は細胞外で脂質ラフトを調節する抗動脈硬化性のタンパク質であると考えられている^{54,55}。

一方で、細胞内 AIBP が細胞代謝に関連した機能を有することも報告されている。AIBP はシロイヌナズナ、酵母、哺乳類細胞において電子伝達物質の1種である NAD (P)H 水和物 (NAD(P)HX)のエピメラーゼ (NAXE)として機能することが明らかとなっている⁶³⁻⁶⁵。実際、AIBP の変異患者はミトコンドリア機能障害性の神経代謝異常を示す⁶⁶⁻⁷⁰。幼児期に死亡するケースも多数報告されており、ヒト生体内においても電子伝達系代謝での重要な機能を有していることが示唆されている。さらに、シロイヌナズナに

において AIBP がビタミン B6 の生合成に関わることが明らかとなっており、多機能性の酵素 (moonlighting protein) であると報告されている⁷¹。細胞内 AIBP 機能の全貌は明らかとなっていないが、これらの報告を踏まえると細胞内 AIBP の発現が生体機能に影響を与えることは確定的であると言える。

内因性 AIBP の機能の解明に伴い、近年では AIBP の治療応用に関する研究がなされている。AIBP の髄腔内投与は、シスプラチンや LPS によって誘発されるアロディニア (異痛症) を回復させ、治療効果が 2 ヶ月以上持続することが報告された⁶¹。また、AIBP を過剰発現させたマウスでは HIV の複製が減少した⁷²。これらの疾患以外にも AIBP は、脈絡膜新生血管^{58,59,73}、急性呼吸促迫症候群⁷⁴、大腸癌⁷⁵、肝臓癌⁷⁶ などに対して治療効果が示されており、臨床への応用が期待されている。

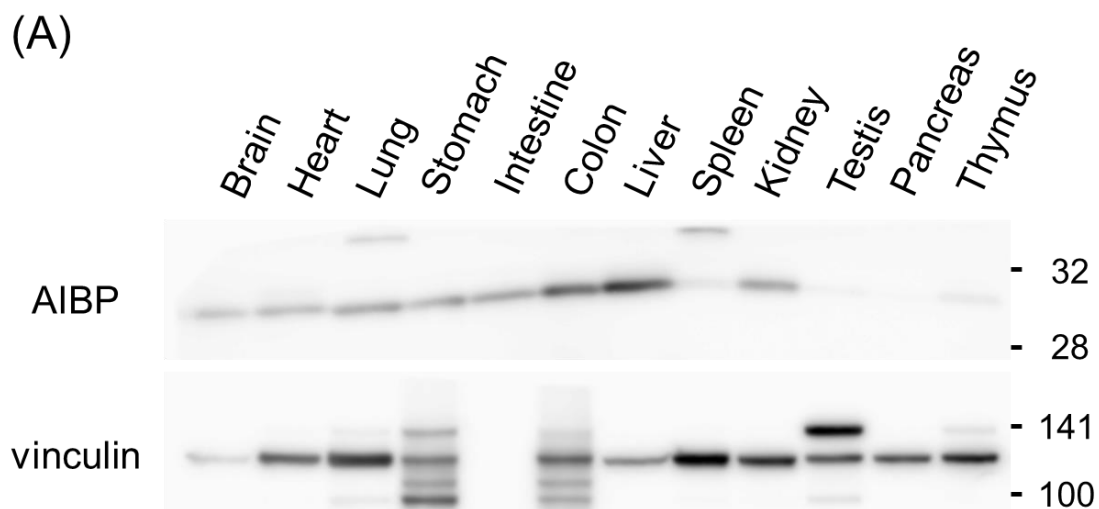
AIBP の投与あるいは過剰発現により、様々な疾患モデルに対する治療効果が観察されることが報告されているが、AIBP の細胞外への分泌については依然として議論の余地が残されている。同定された当初、AIBP は分泌タンパク質であると考えられていた⁷⁷。ヒト不死化近位尿細管上皮細胞である HK-2 へ ApoA-I または HDL を添加することで AIBP の分泌が促進されることが示された。また、AIBP は敗血症患者の血清、Cerebrospinal fluid (CSF)、尿などから検出された。実際、シグナル配列予測ツール SignalP を用いた検証では AIBP の N 末端が分泌シグナル配列となりうることを示されている^{51,77}。しかし一方で、AIBP の分泌には否定的な報告も存在する。例えば、HEK293T 細胞で過剰発現させた AIBP はミトコンドリアに局在しており、細胞外への分泌は確認されなかった⁷⁸。また、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて AIBP を過剰発現させたマウスの血清では、AIBP が検出されなかった⁶⁰。Choi らは、AIBP の作用経路はオートクライン、パラクラインを介しており、分泌された AIBP が速やかに細胞表面へ結合すると推察している⁷⁴。この仮説は、細胞外の AIBP が検出されない理由を説明しうるかもしれないが、実際にオートクライン、パラクライン経路の存在を証明するような結果は報告されていない。AIBP の細胞外への分泌に関してはそのメカニズムや分泌が増加する生理的条件、意義などは不明のままである。

本章では HDL 関連因子 AIBP の生理的な調節について検討を行った。第 2 節では AIBP の分泌臓器の特定を試み、血中 AIBP 量が増加する生理的な条件を明らかにした。第 3 節では AIBP の生理機能に関する検討を行った。第 4 節では AIBP のアミノ酸配列と機能について検討を行った。

第2節 AIBP の分泌臓器および病態時の血中 AIBP 濃度に関する検討

第1項 マウス臓器における AIBP 発現の比較

前述のように、AIBP が分泌される生理的な条件については議論の余地がある。そこで AIBP の分泌臓器を推定するため、マウスにおける AIBP の組織分布を調査した (Figure 17A)。調査した組織のうち、肝臓、大腸、腎臓で AIBP の発現量が多かった。脾臓・精巣・膵臓・胸腺ではほとんど AIBP の発現が見られなかった。採取する臓器の種類およびマウスの週齢を拡大し、さらなる検討を行った (Figure 17B)。Recombinant AIBP (rAIBP) は第4節 第1項で詳述する方法で作成し、ローディングコントロールとして使用した。ほとんどの臓器で AIBP 発現が見られたが、発現量は臓器間で異なっていた。心臓、胃、精巣、大動脈などの組織では、加齢により AIBP の発現量がやや増加しているようであった。逆に、肺、腸+大腸、精囊では、AIBP レベルはわずかに減少していた。週齢によらず、肝臓および腎臓の AIBP 発現量は高かった。



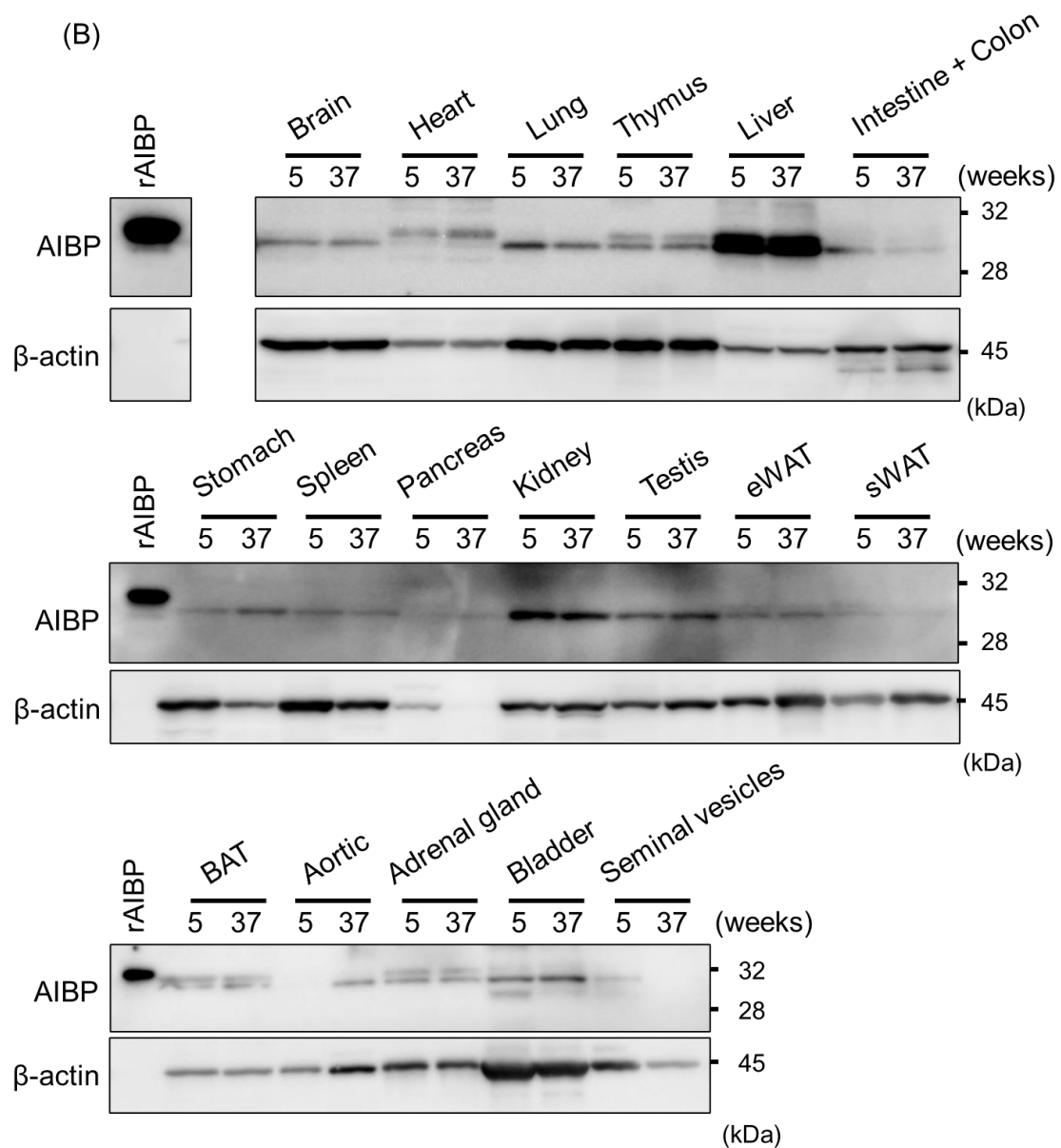


Figure 17. Tissue distribution of AIBP in mice.

(A, B) Distribution of AIBP in mouse tissues. 10 μ g extracted protein of each tissue from 5 (and 37 (B)) weeks old male Balb/c mouse was analyzed by Western blotting with anti-AIBP and β -actin antibodies. 10 ng of rAIBP was loaded as a reference. rAIBP: recombinant AIBP, eWAT: epididymal white adipose tissue, sWAT: subcutaneous white adipose tissue, BAT: brown adipose tissue.

Figure 17 で示したように、AIBP は臓器間で発現量が異なる。発現の多かった肝臓、腎臓のモデル細胞として HepG2、HEK293 を使用し、細胞内および細胞外の AIBP 産生を検討した。HepG2 および HEK293 の細胞内には、AIBP が多く発現していた (Figure 18A, Lys.)。細胞外の AIBP は HepG2 および濃縮後の HEK293 上清で確認されたが、細胞内 AIBP に比べると僅かであった (Figure 18A, Sup.)。

また、培養細胞での AIBP 発現が組織での発現とリンクしているかを確認するため、AIBP 発現の低かった白色脂肪組織のモデルとしてマウス 3T3-L1 細胞の AIBP 産生について検討を行った。未分化の 3T3-L1 では、細胞内・細胞外のいずれについても AIBP のバンドはほとんど観察されなかった (Figure 18B, Non-Diff.)。分化させた 3T3-L1 では、未分化と比較すると僅かにバンドが増加しているようであったが、HepG2 および HEK293 に比べてシグナル強度は顕著に弱かった (Figure 18B, Diff., Lys.)。脂肪細胞への分化は、ORO 染色を用いた脂質滴の蓄積により評価した (Figure 18C)。以上の結果より、AIBP の分泌モデル細胞として HepG2 を使用することとした。

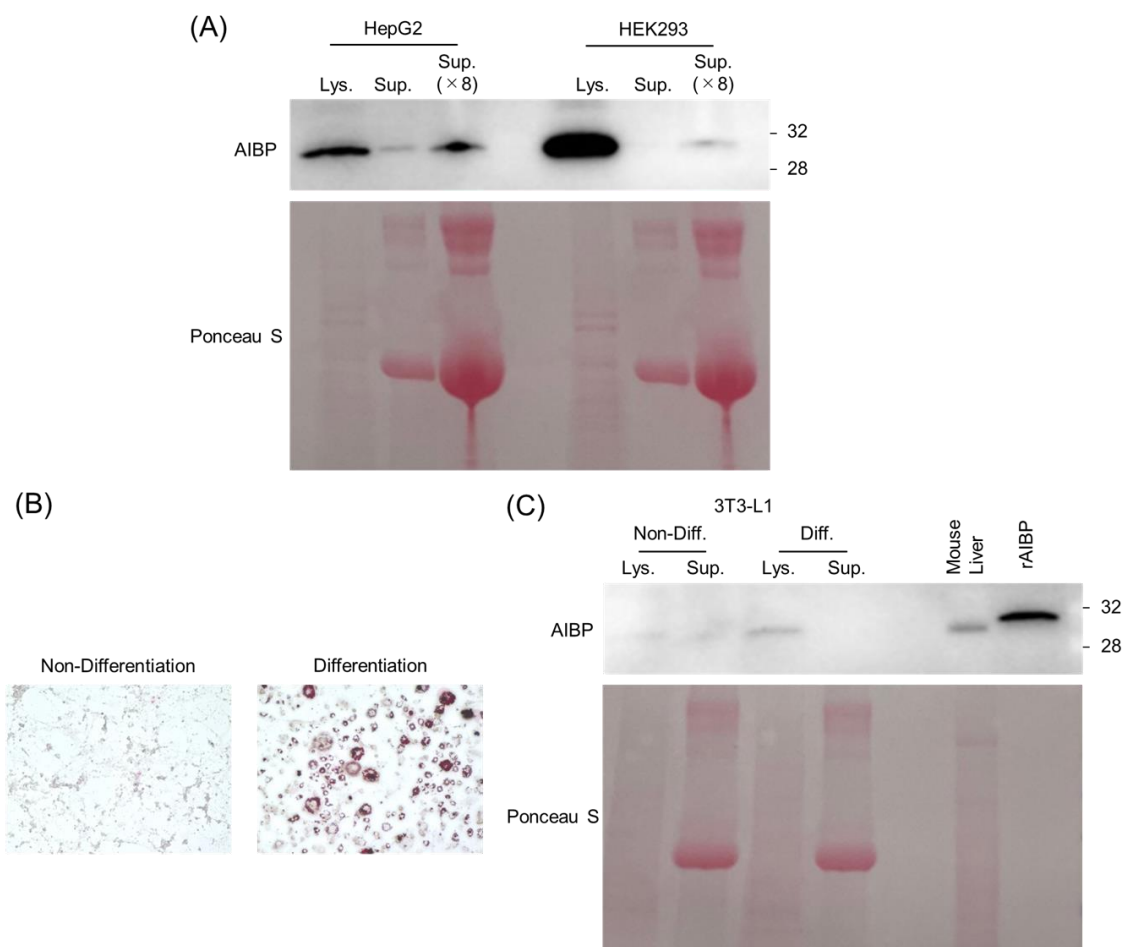


Figure 18. Production of intra- and extracellular AIBP in cultured cells.

(A) Cells were seeded, and after 24 h, lysate and supernatant, and 8-fold concentrated supernatant were subjected to Western blotting. Protein loading was confirmed by Ponceau S staining. (B) Differentiation of preadipocytes 3T3-L1 to white adipocytes was performed as shown in Materials & Methods. Completion of differentiation was confirmed using Oil Red O staining. The magnification of each panel was ×400. (C) The medium of differentiated 3T3-L1 cells was changed and incubated for 24 h, followed by collection of lysate and supernatant, and 8-fold concentrated supernatant. Western blotting was performed, and protein loading was confirmed by Ponceau S staining. Mouse liver and rAIBP were loaded as a reference. rAIBP: recombinant AIBP, Lys.: lysate, Sup.: supernatant.

第2項 血清での AIBP 検出

AIBP の分泌に関しては否定的な報告もいくつかあり、未だ統一された見解はない^{60,78}。まず、ウエスタンブロッティングを用いてマウスおよびヒト血清中の AIBP の検出を試みた (Figure 19)。rAIBP は 3.1~50 ng までアプライ量と比例したバンド強度の変化が検出された。一方でマウスおよびヒト血清を 0.25 μ L アプライした場合には AIBP のバンドはほとんど検出されず、0.25 μ L 血清中に AIBP は 3.1 ng 以下であることが示唆された。

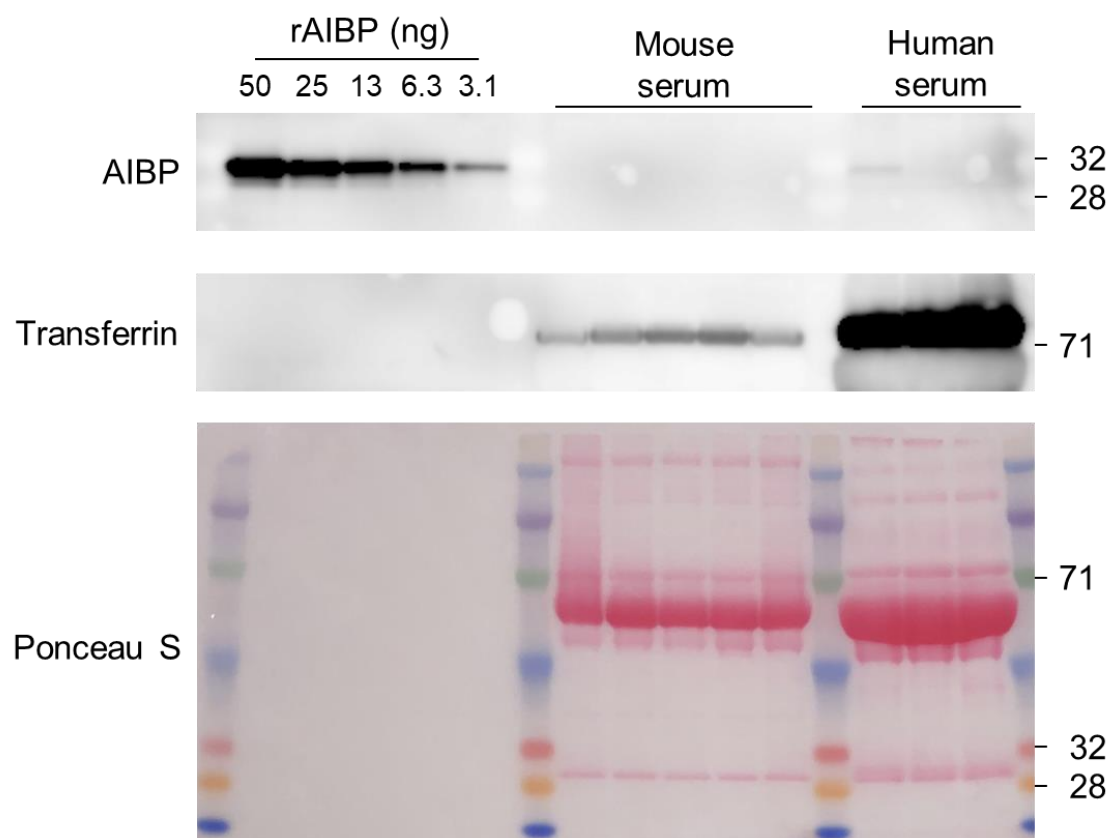


Figure 19. Western blotting of mouse and human sera with anti-AIBP antibody.

The rAIBP was diluted in PBS. Male Balb/c mice (5 weeks, n=5) serum was collected by tail vein blood collection. Human serum (n=3) was purchased from BioIVT. Both serum samples were diluted 20-fold with PBS and subjected to ponceau S staining and Western blotting. 0.25 μ L of serum was applied to each lane. rAIBP: recombinant AIBP.

続いて、ウェスタンブロッティングより検出限界値が低い Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Human APOA1BP ELISA Kit, LS-F34255, LSBio, Seattle, WA, USA)を用いてヒト血清中の AIBP の検出を試みた。BioIVT 社より購入した 30 検体の健常ヒト血清について AIBP が検出され、平均血清 AIBP 濃度は $11.9 (\pm 8.8)$ ng/mL であった。Black, Caucasian, Hispanic の人種間で血清 AIBP 濃度に有意な差は無かった (Figure 20A)。さらに、血清 AIBP 濃度と Age, Total cholesterol, Triglyceride (Figure 20B-D)の相関を確認したところ、相関係数はそれぞれ $R^2=0.0348$, 0.039 , 0.3926 となり、血清 AIBP 濃度と Triglyceride の相関は統計的に有意であった。

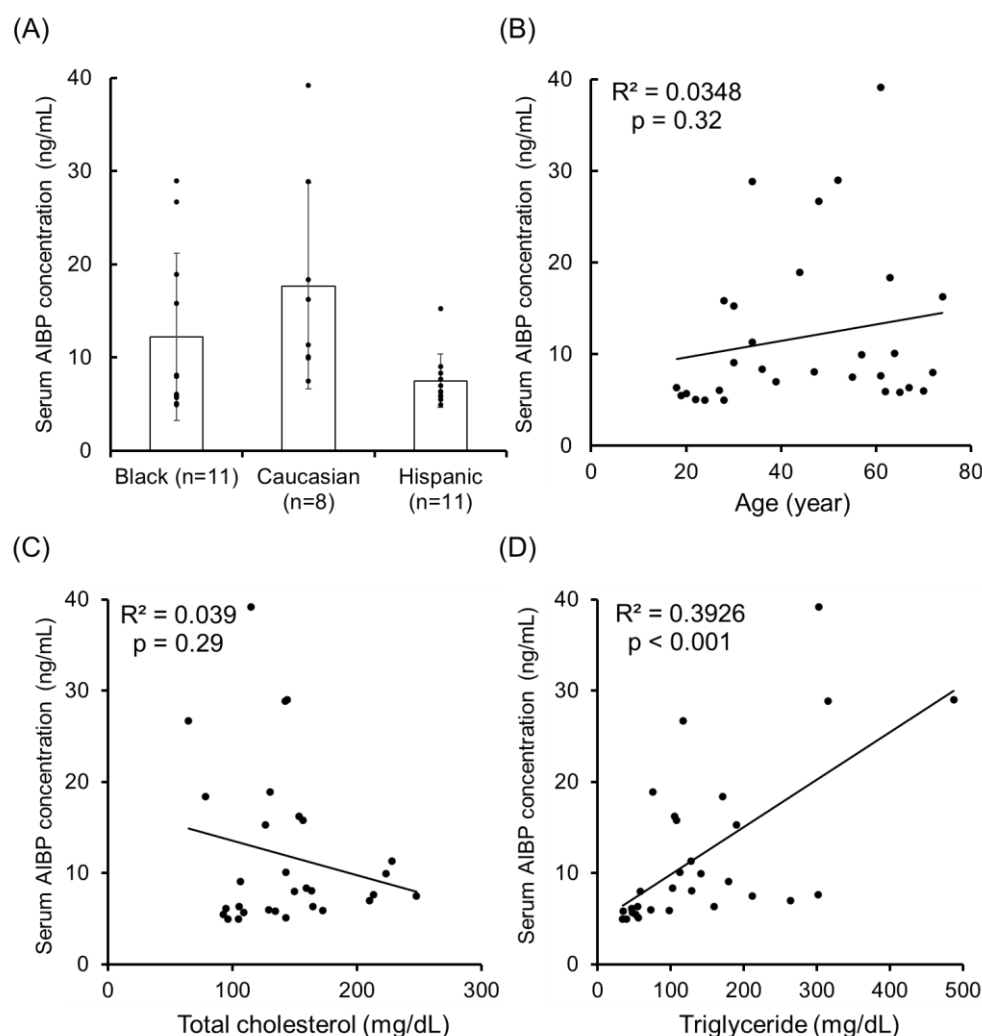
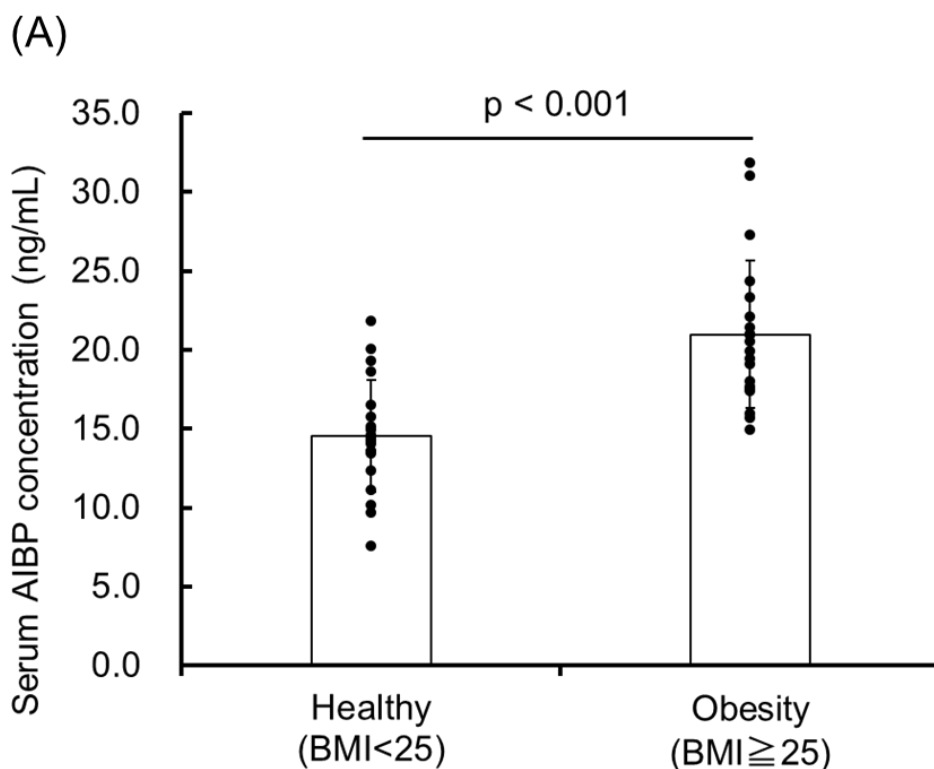


Figure 20. Detection of AIBP in human serum using ELISA and testing for correlation with several statuses.

(A-D) Human serum AIBP levels were evaluated by ELISA. Human serum (n=30) was purchased from BioIVT. Serum AIBP concentrations by race are represented in a bar graph (A). Correlations with age (B), total cholesterol (C), and triglycerides (D) are shown in scatter plots. p-values were calculated using Student's t-distribution, with $p < 0.05$ considered significant.

第3項 生化学検査値との相関

血中での高 Triglyceride レベルは肥満や Nonalcoholic steatohepatitis (NASH)などの脂質異常症で見られる⁷⁹。Figure 20D において健常ヒト血清で AIBP レベルと Triglyceride の有意な正の相関が観察されたことから、AIBP と脂質異常症との関連が示唆される。そこで、脂質異常症のヒト血清について血清 AIBP レベルを評価した。血清 AIBP レベルは健常群に比べて肥満群で有意に高かった (Figure 21A)。また、AIBP と正に相関する 14 個の検査項目および負に相関する 3 個の検査項目が、それぞれ統計的に有意な相関関係にあった (Figure 21B)。血清 AIBP 量は Triglyceride 値と最も強い正の相関 ($R=0.72$)を示した。逆に、HDL-C と最も強い負の相関 ($R=-0.48$)が観察された。血中での高 Triglyceride レベルおよび低 HDL-C レベルは、共にアテローム性動脈硬化症のリスクファクターとして知られている^{12,79}。これらの結果は血清 AIBP 量がアテローム性動脈硬化リスクを反映していることを強く示唆している。続いて肥満関連因子・腎機能・肝機能の項目を抽出し、図に示した (Figure 21C-E)。肥満関連因子のうち、6 つは正の相関を示した。HDL-C 低値は肥満およびアテローム性動脈硬化の危険因子であり、AIBP と負の相関を示したことから、肥満と血清 AIBP が正に相関することが支持される。また肝細胞のダメージマーカーである γ -GTP・ALT・AST はいずれも正の相関を示した (Figure 21D)。また、腎機能の高さと AIBP 濃度は相関した (Figure 21E)。これらの結果は、AIBP の発現が多い肝臓・腎臓の細胞応答として AIBP が分泌される可能性を示唆している。



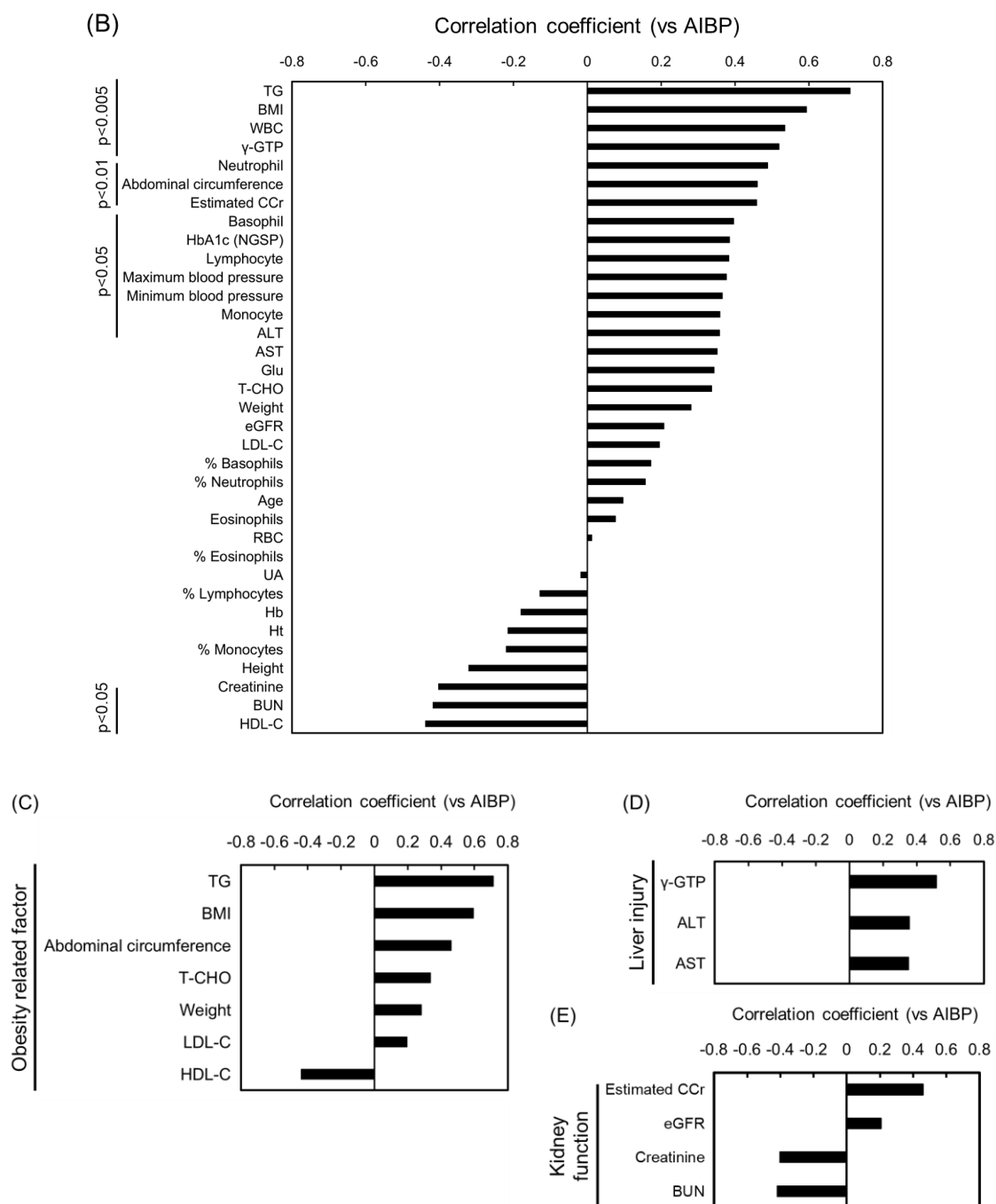


Figure 21. Correlation of blood AIBP with biochemical test values.

(A) Comparison of serum AIBP in normal and obese subjects. Serum AIBP was measured by ELISA. The bars represent the mean \pm S.D. ($n = 20$). P-values were calculated using Student's t-test. (B) Biochemical tests were performed as described in Materials & Methods. P-values were calculated using Student's t-distribution, with *, $p < 0.05$ considered significant. (C-E) Correlation values between serum AIBP levels and obesity-related factors (C), liver injury (D), and kidney function (E) are shown.

第4項 Triglyceride 増加による AIBP 分泌への影響

Figure 21B で AIBP 血清量は Triglyceride と最も強く相関することが明らかとなった。Triglyceride はグリセロール骨格へ 3 分子の脂肪酸がエステル結合した構造からなる中性脂質の 1 種である。Triglyceride を構成する脂肪酸は 20 種類以上存在し、その構成比は様々な生理的機能に影響を与える。Oleic acid (OA) および Palmitic acid (PA) は Triglyceride を構成する脂肪酸の中でも多くの割合を占めており、OA, PA の添加は Triglyceride の合成を増加させることが広く認められている (Figure 22)^{80,81}。そこで、Triglyceride により AIBP 分泌が促進される可能性を検証するため、OA および PA を用いて、*in vitro* における AIBP の発現と分泌への影響について検討した。また、Triglyceride 含有リポ蛋白質の 1 種である acLDL も併せて検討を行った。

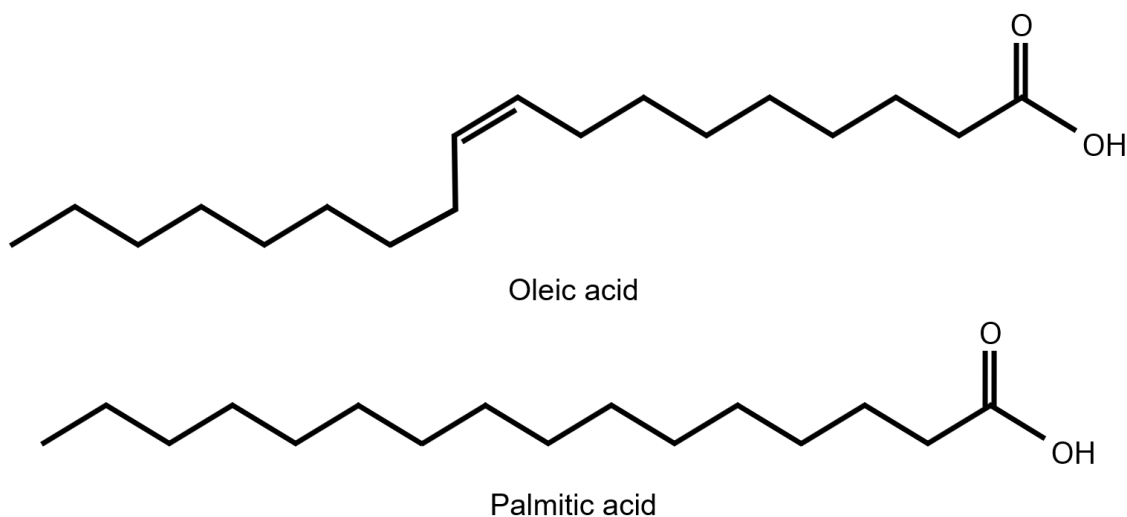


Figure 22. Structural formula of oleic acid and palmitic acid.

Figure 18 の結果より細胞は、ヒト肝臓がん細胞株の HepG2 を用いた。acLDL、OA、PA を添加し、上清および細胞の AIBP 発現レベルを確認した。acLDL および OA の添加では、上清と細胞共に AIBP の顕著な変化は見られなかった (Figure 23A, B)。一方で PA の濃度依存的に上清の AIBP が増加し、細胞の AIBP は減少した (Figure 23C)。PA 濃度依存的な上清の AIBP 増加は、ヒト肝臓がん細胞株 JHH5 でも観察された (Figure 23D)。これらの結果から、肝臓細胞への PA 添加が細胞外 AIBP 量の増加をもたらすことが明らかとなった。

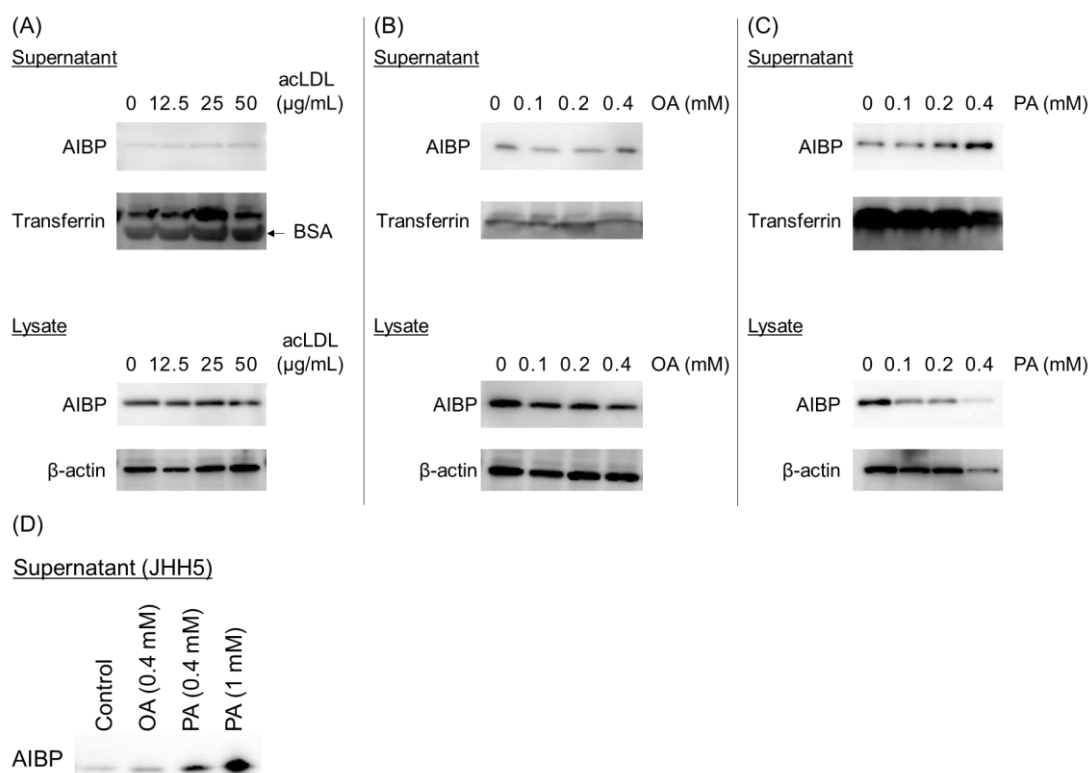


Figure 23. Effects of addition triglyceride production sources on intra- and extracellular AIBP production in human liver cancer cells.

(A-D) Following cell seeding, acLDL (A), OA (B), and PA (C) were added to the cells at the concentrations showing in the figure. After 24 h of incubation, supernatant and lysate were collected and subjected to Western blot analysis. acLDL: acetylated low-density lipoprotein. OA: Oleic acid. PA: Palmitic acid. BSA: Bovine serum albumin

PA および OA の添加は細胞外 AIBP 量に対してそれぞれ異なる影響を及ぼした。肝臓細胞への過剰な OA および PA の処理は共に脂肪肝を引き起こすが、肝細胞の反応は両者間で異なっている^{82,83}。PA 処理は酸化ストレスや小胞体ストレス、ミトコンドリア障害、Lipotoxicity など細胞障害性の反応を引き起こすが、OA の処理は上記の殆どの現象が観察されない⁸⁴。実際、本研究においても 0.4 mM の PA 処理により細胞障害が観察された (Figure 24)。細胞外 AIBP 量への影響が PA と OA で異なることを考慮すると、肝細胞の障害により AIBP が細胞外へ放出される可能性が考えられる。

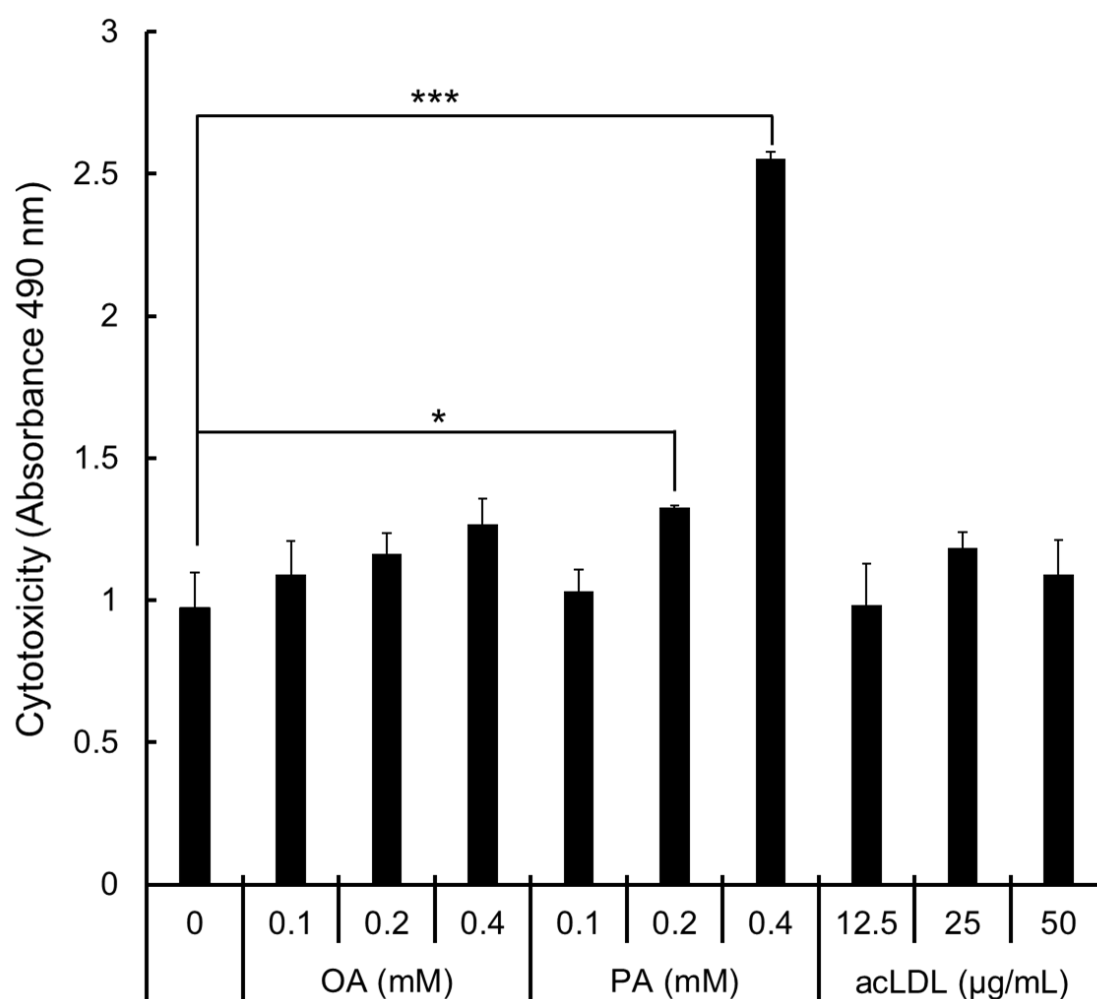


Figure 24. Effects of addition triglyceride production sources on cytotoxicity in human liver cancer cells.

Following cell seeding, acLDL, OA, and PA were added to the cells at the concentrations showing in the figure. After 24 h of incubation, supernatant was collected and subjected to lactate dehydrogenase (LDH) assay. Each value represents the mean \pm S.D. (n = 3). *, p < 0.05. ***, p < 0.005. acLDL: acetylated low-density lipoprotein. OA: Oleic acid. PA: Palmitic acid.

AIBP mRNA は 0.1, 0.2 mM の PA 添加ではほとんど変化せず、0.4 mM では約 1.5 倍に増加した (Figure 25A)。PA による細胞外 AIBP の増加は、AIBP mRNA の増加が部分的に寄与している可能性がある。また、PA の添加により増加することが知られている Sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) の mRNA 発現の増加が確認され、既報と一致した (Figure 25B) ⁸⁵。

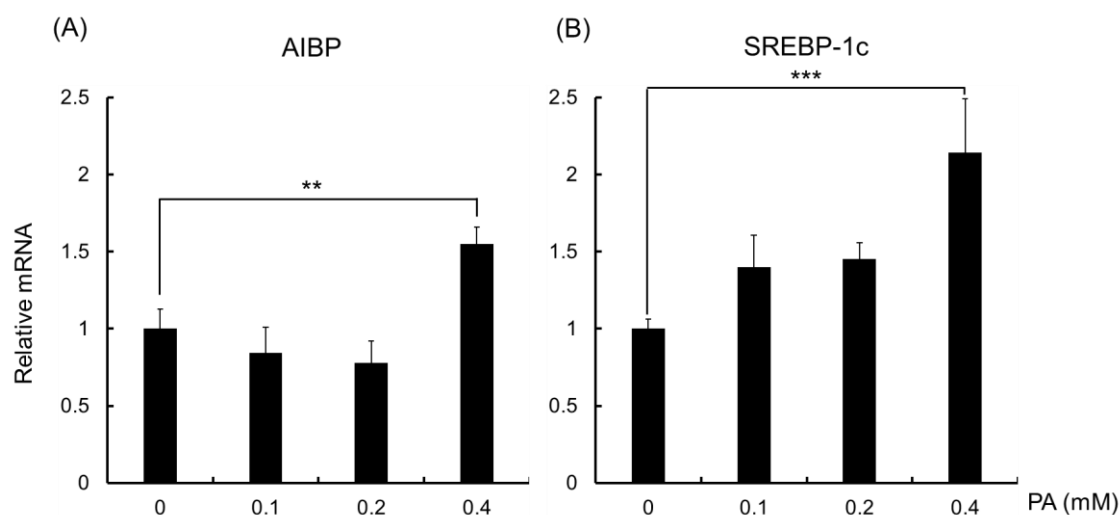


Figure 25. Changes in AIBP mRNA in HepG2 upon addition of palmitic acid.

(A, B) Following cell seeding, PA was added at concentrations of 0.1-0.4 mM. After 24 h of incubation, mRNA was collected and analyzed for AIBP and SREBP-1c levels via RT-qPCR. Each value was normalized using GAPDH mRNA levels and represents the mean \pm S.D. (n = 3). **, p < 0.01, ***, p < 0.005. SREBP-1c: Sterol regulatory element binding protein-1c.

第5項 肝障害モデルマウスの血清 AIBP 量の評価

マウスへの Tetrachloromethane (CCl₄) の投与は急性肝障害モデルとして広く使用されている。CCl₄ およびその代謝物は肝臓でリン脂質やタンパク質などの細胞成分へ共有結合し、肝臓の正常な代謝を破綻させる ⁸⁶。CCl₄ 誘導性肝障害モデルマウスの血清について、ウエスタンブロッティングにより血清 AIBP 量を評価した (Figure 26A, B)。血清 AIBP は CCl₄ の濃度依存的に増加しており、これは PA 添加による肝細胞障害が細胞外 AIBP 量を増加させるというモデルと一致する。

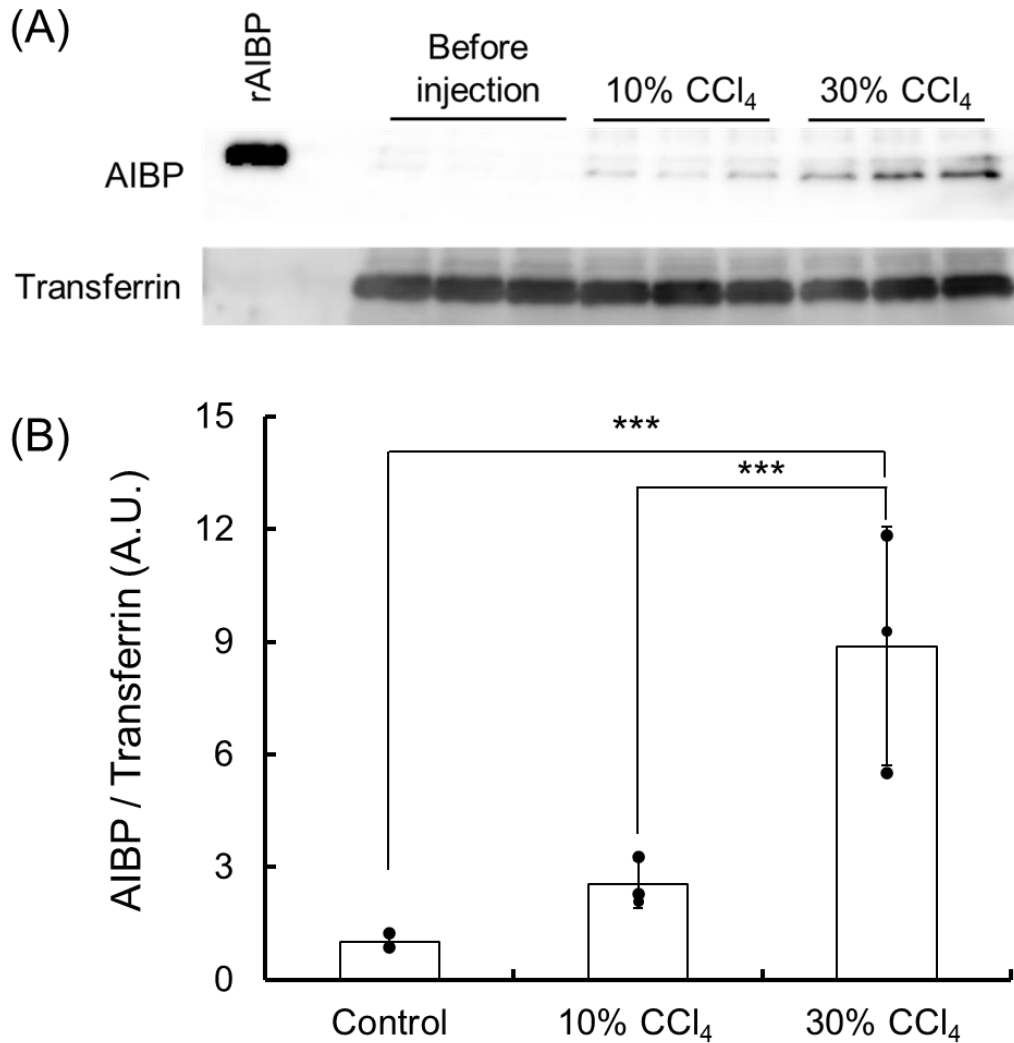


Figure 26. Evaluation of serum AIBP levels in a mouse model of CCl₄ induced liver injury.

(A, B) Balb/c mice (5 weeks old, male) blood was collected from the tail vein and CCl₄ (10 or 30% in corn oil) was administered. After 24 h, blood was again collected from the tail vein and separated by nonreducing SDS-PAGE (A). The band intensities were quantified and shown in a graph (B). Each value represents the mean \pm S. D. (n = 3). ***, p < 0.005.

第3節 AIBP の生理機能に関する検討

第1項 AIBP による Palmitic acid 誘導性細胞死への影響

第2節で、HepG2においてPA添加により、細胞外AIBPが増加することを明らかとなった。そこで、細胞外AIBP量の増加がPAによる細胞死に影響を与えるか検証するため、AIBPの過剰発現とノックダウンを行った。HepG2にAIBP-3×FLAGをコードしたプラスミドまたはAIBP siRNA (siAIBP)をそれぞれトランスフェクションした。AIBPの過剰発現により細胞内AIBPが増加すること、siAIBPによりAIBPの発現が減少することが確認された (Figure 27A-C)。続いて、過剰発現およびノックダウンした際のOAおよびPAの細胞傷害性を検証した。これまでの結果と一致して、OAの添加では細胞障害がほとんど誘導されず、PA濃度依存的に細胞障害が増加した。しかし、AIBPの過剰発現およびノックダウンによる細胞障害への有意な影響は観察されず、AIBPのPA誘導性肝細胞死への寄与は小さいと考えられた (Figure 28)。

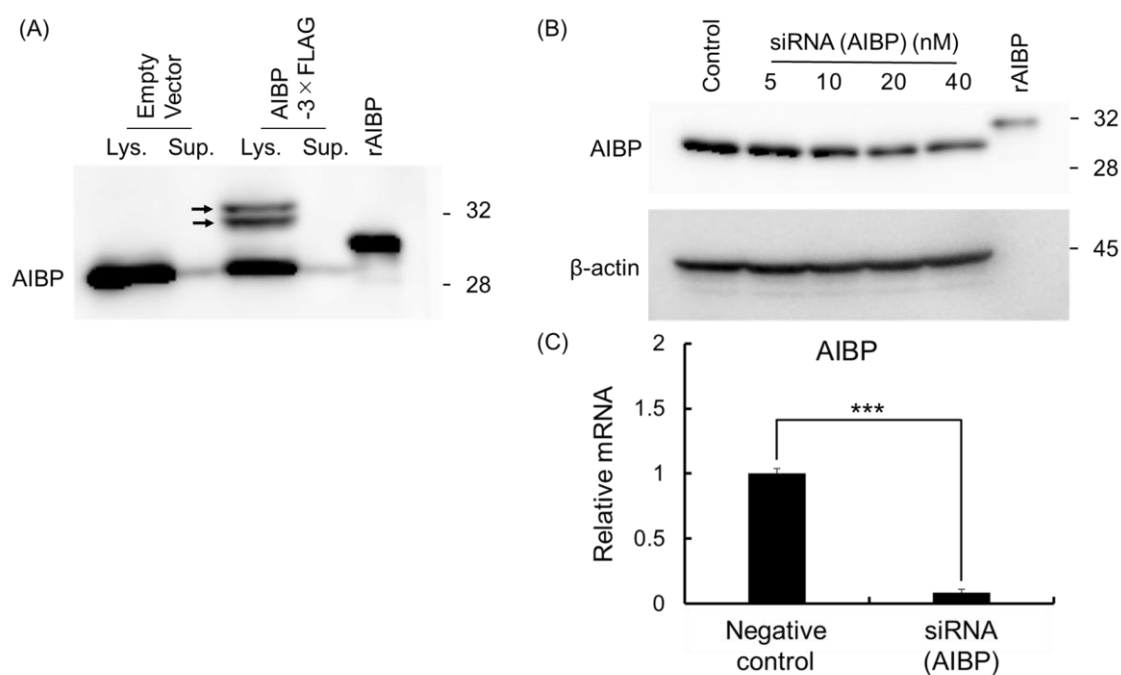


Figure 27. Overexpression and knockdown of AIBP in HepG2.

(A) pcDNA3.1(+) encoding hAIBP-3×FLAG was transfected into HepG2. Western blotting of supernatants and lysates was performed. (B) siRNA targeting AIBP was transfected into HepG2. Protein levels were assessed by Western blotting and mRNA expression were assessed by RT-qPCR. Each value represents the mean \pm S. D. (n = 3). ***, p < 0.005. rAIBP: recombinant AIBP.

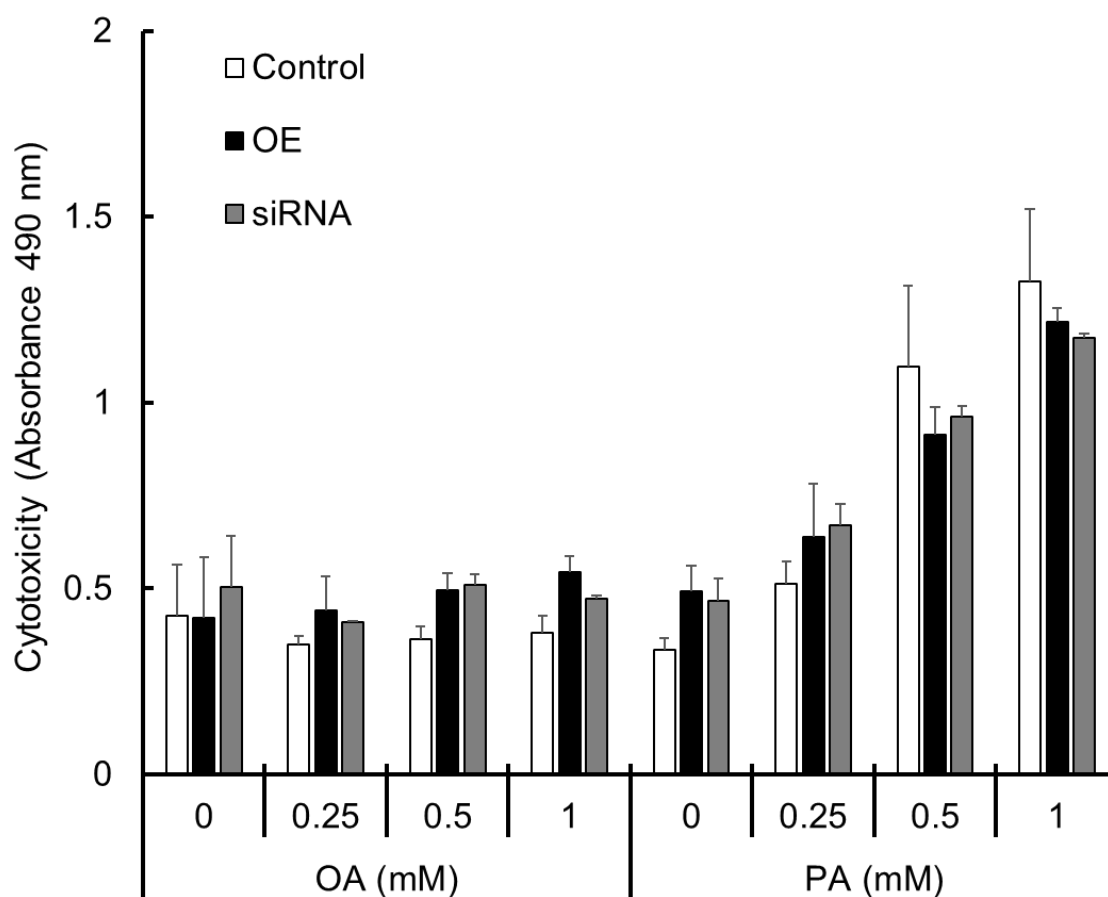


Figure 28. Effect of AIBP expression on the cytotoxicity of fatty acids.

After 24 h of transfection into HepG2, PA or OA was added and incubated for 24 h. Cytotoxicity was assessed by measuring LDH activity of the supernatant. OE: Over expression (hAIBP-3×FLAG), OA: Oleic acid. PA: Palmitic acid.

第2項 AIBPによる抗酸化作用の検討

近年、網膜細胞でのAIBPの喪失がミトコンドリアROSを増加させることなどが報告されており、AIBPが抗酸化作用を有する可能性が指摘されている⁸⁷。そこで、AIBPの抗酸化作用を評価した。HepG2にAIBPを過剰発現またはrAIBPを添加することでAIBP量を増加させた。そこへ酸化誘導物質であるH₂O₂またはMenadioneを添加し、蛍光プローブであるDihydrorhodamine 123 (DHR123)を用いて活性酸素種(ROS: Reactive oxygen species)の発生を定量した。H₂O₂およびMenadioneの添加は共に濃度依存的な蛍光強度の増加を示した(Figure 29A, white column)。しかし、AIBPの過剰発現による影響は観察されなかった(Figure 29A, black column)。一方でrAIBPの添加によりROSの発生が抑制される傾向が観察された(Figure 29A, gray column)。過剰発現とrAIBPの添加で一貫しない

結果が観察された原因として、いくつかの理由が考えられる。まず、rAIBP の添加では細胞外 AIBP が主に増加し、過剰発現では細胞内 AIBP が主に増加すると考えられる。第 3 章 第 1 節で述べたよう、AIBP は細胞内外で機能が異なるため、AIBP の抗酸化作用は細胞外で発揮される可能性がある。また、作用機序を考える上では AIBP が細胞内外を行き来できることに注意しなければならない。細胞外へ AIBP が放出されることは、Figure 18A で示した通りである。細胞外 AIBP が細胞内に取り込まれることは、Hann らが蛍光免疫染色を用いて報告しており⁸⁸、蛍光標識 rAIBP を用いた著者の検討でも確認している (Data not shown)。AIBP の細胞内外レベルの詳細な変化を明らかにすることは、抗酸化作用の分子メカニズム解明につながるかもしれない。さらに、過剰発現は HepG2 (哺乳類細胞)で行っているが、rAIBP は大腸菌細胞内で作成したものを使用しており、翻訳後修飾等が一部異なる可能性がある。AIBP の抗酸化作用の検証はこれらを踏まえたさらなる検討が必要であると考えている。

rAIBP の添加により抗酸化作用が部分的に観察されたことから、*in vivo* での検討を行った。高脂肪食摂取マウスはアテローム性動脈硬化モデルとして使用されており、酸化ストレスの増加が認められる⁸⁹。そこで、高脂肪食摂取マウスへ rAIBP を投与し、血中の酸化ストレスおよび抗酸化力を測定した。高脂肪食摂取マウスの抗酸化力は通常食のマウスと同程度であった (Figure 29B, Normal diet vs High fat diet)。高脂肪食摂取マウスへの AIBP の投与により抗酸化力の増加傾向が見られたものの、統計的に有意では無かった (Figure 29B, Before vs After)。酸化ストレスは高脂肪食摂取により、約 3 倍に増加した (Figure 29C, Normal diet vs High fat diet)。また、AIBP の投与により酸化ストレスがわずかに上昇した (Figure 29C, Before vs After)。酸化ストレスが増加した原因は不明であるが、一つの仮説として rAIBP を大腸菌から精製する際に Lipopolysaccharide (LPS)がコンタミネーションしており、炎症が誘発されている可能性がある。今後、LPS を完全に除去した rAIBP を用いることで酸化ストレスの増加が抑制できる可能性がある。相対的抗酸化ストレス度は高脂肪食により著しく減少したが、rAIBP の添加による回復は観察されなかった (Figure 29D)。

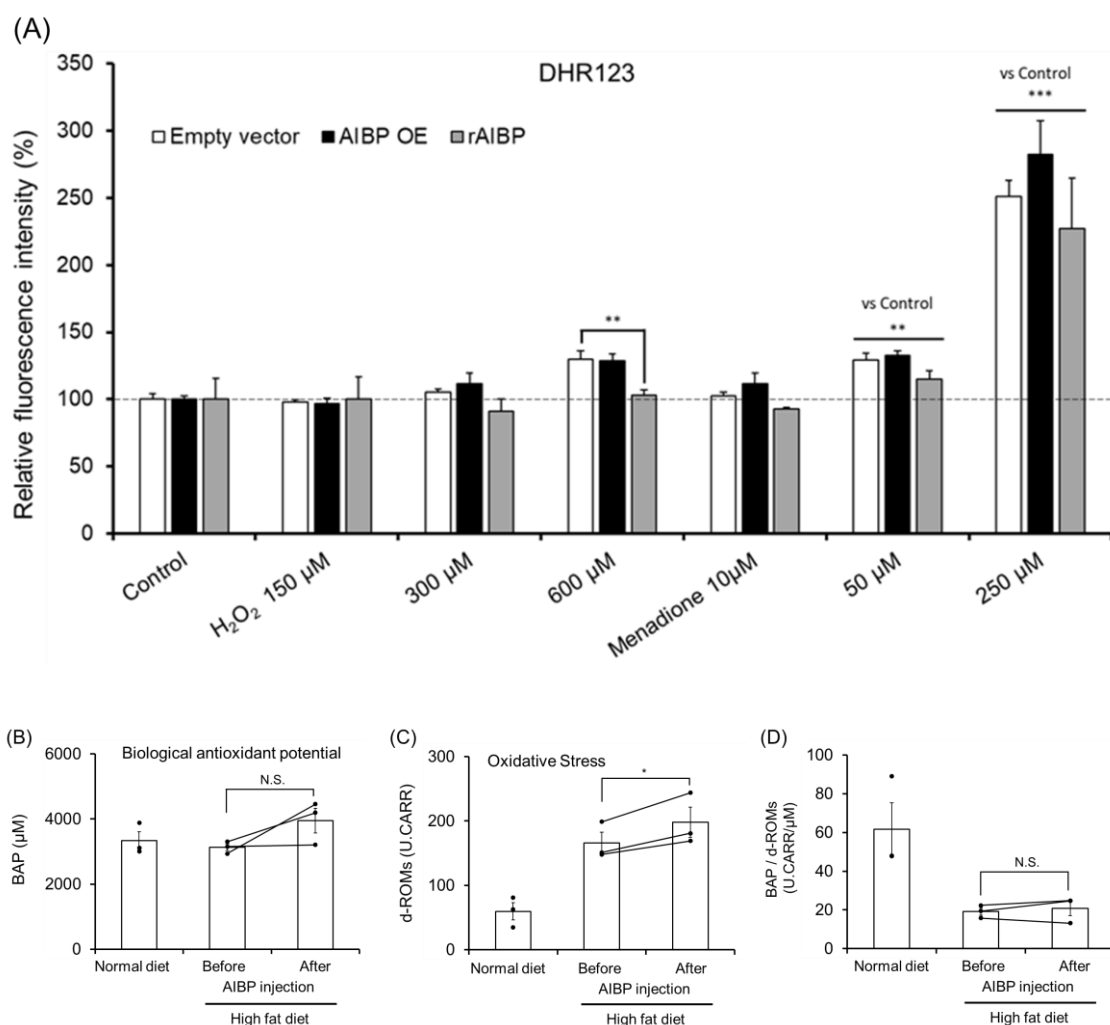


Figure 29. Antioxidant activity of AIBP.

(A) HepG2 was overexpressed with AIBP-3×FLAG or added rAIBP (0.5 μg/mL). Hydrogen peroxide (H₂O₂) or menadione was added and incubated for 6 h. DHR123 (10 μM) was reacted for 1 h to detect ROS. (B-D) Mice fed a normal diet or high fat diet for 12 weeks and *i.v.* injected with 5 μg of AIBP in PBS. Blood was collected from the tail vein before and 2 hours after administration. The profile of BAP (B), d-ROMs(C), and BAP/d-ROMs ratios (D) are shown. Each value represents the mean ± S.D. (n = 3). *, p < 0.05, N.S., not significant. BAP: Biological Antioxidant Potential d-ROMs: diacron-Reactive Oxygen Metabolites.

第3項 AIBPによる抗炎症作用の検討

ヒトマクロファージ様細胞の THP-1 を用いて、AIBP の抗炎症作用を検討した。THP-1 へ rAIBP を添加し、炎症性サイトカインである Tumor necrosis factor-α (TNF-α) および Interleukin-6 (IL-6) の分泌量を ELISA で定量した (Figure 30A, B)。LPS の添加により増加

した炎症性サイトカインの分泌は、HDL の添加により抑制された。AIBP 単独、または HDL との共添加は、HDL と同等あるいはそれ以上の抗炎症作用を示した。これらの結果から、*in vitro* における AIBP の抗炎症作用が明らかとなった。

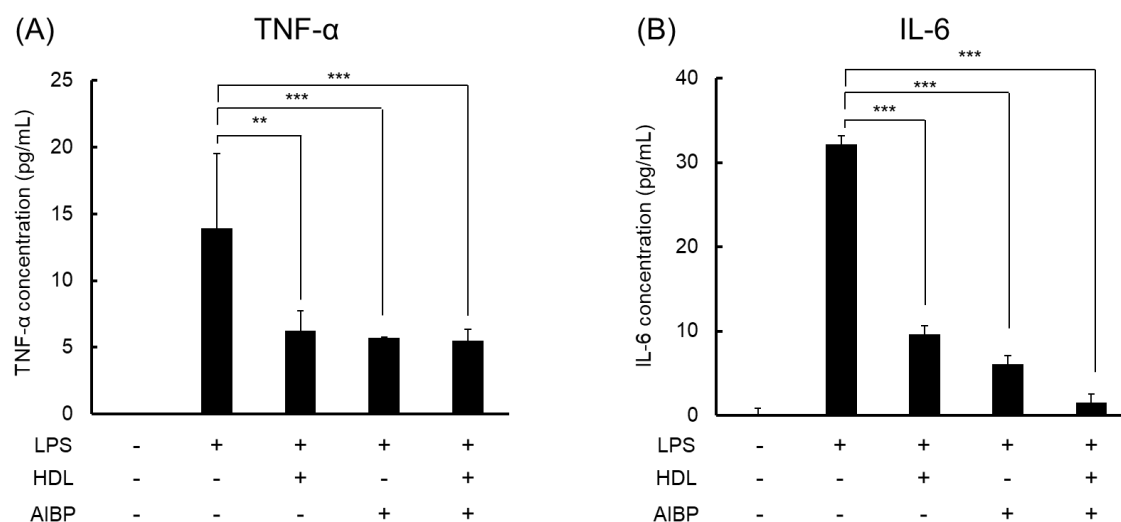


Figure 30 Evaluation of the anti-inflammatory function of AIBP.

(A, B) THP-1 macrophages were incubated with or without 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rAIBP, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDL and 1000 ng/mL LPS for 24 h. The secretion levels of TNF- α (A) and IL-6 (B) were determined by ELISA. Each values represent means \pm S.D. (n=3). **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.005$ vs. the LPS group. AIBP: apolipoprotein A-I binding protein, LPS: lipopolysaccharides, TNF- α : tumor necrosis factor- α , IL-6: interleukin-6.

続いて、*in vivo* における AIBP の抗炎症作用を検討した。マウスへ LPS および rAIBP を投与し、6 時間後まで経時的に採血を行うことで血清中のサイトカイン量を評価した (Figure 31A, B)。LPS の投与により血清中の TNF- α および IL-6 量が増加した。AIBP の投与は、血中サイトカイン量の増加を抑制する傾向にあったものの、有意な差は観察されなかった。当研究室の過去の検討で、静脈内投与した AIBP は数時間でほとんどが血中から消失することが確認されており (Data not shown)、有意な差が確認されなかった要因の一つであると思われる。

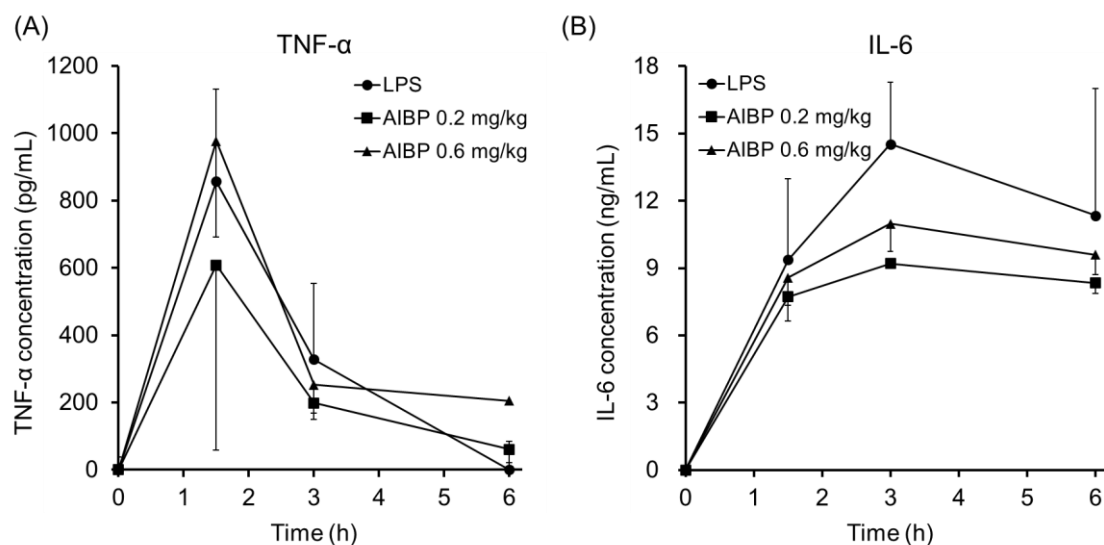


Figure 31 Evaluation of the anti-inflammatory function of AIBP.

(A, B) Male mice (Balb/c, 5 weeks) were injected intravenously with AIBP (0.2 or 0.6 mg/kg) immediately after intraperitoneal administration of LPS (2 mg/kg). Blood was collected from the tail vein for up to 6 h after administration. The secreted levels of TNF- α (A) and IL-6 (B) were determined by ELISA. Each values represent means \pm S.D. (n=3-4). AIBP: apolipoprotein A-I binding protein, LPS: lipopolysaccharides, TNF- α : tumor necrosis factor- α , IL-6: interleukin-6.

ヒト血清における炎症性サイトカインを測定し、血清 AIBP 濃度との相関関係を確認した (Figure 32A, B)。AIBP と TNF- α , IL-6 間に相関関係は観察されなかったものの、血清 AIBP が低い群では高い群と比較して、炎症性サイトカイン量が多い傾向にあった (Figure 32C, D)。これは、ヒトの血中においても AIBP が抗炎症作用を発揮していることを示唆するものである。

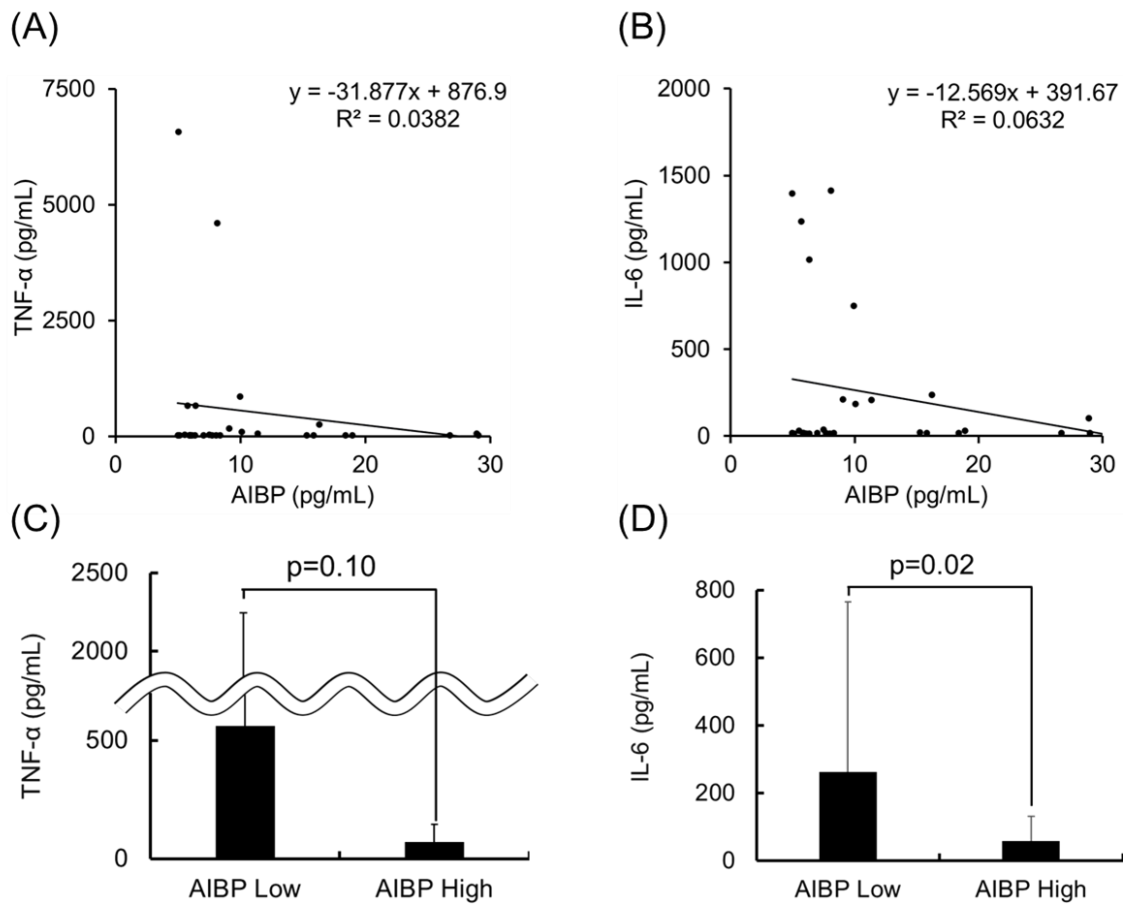


Figure 32 Evaluation of AIBP and inflammatory cytokines in human serum.

(A-D) Correlations between AIBP and TNF- α or IL-6 in human serum are shown. Samples were divided as low and high groups around the median AIBP concentration. Inflammatory cytokine levels in each group were compared. Each value represents the mean \pm S. D. (n = 20). AIBP: apolipoprotein A-I binding protein, TNF- α : tumor necrosis factor- α , IL-6: interleukin-6.

第4節 HDLによるAIBPのN末端特異的な分解反応

第1項 大腸菌発現系を用いたrAIBPの精製

まず大腸菌発現系を用いてヒトrAIBPを作成した。発現させるrAIBPはシグナルペプチドであるアミノ酸 (Amino acid: AA) 1-24を除き、C末端に6×Hisを付加した。精製はNi⁺カラムを用いた。精製前の大腸菌溶解物 (Lysate)、素通り画分 (Flow through)、洗浄画分 (Wash)、溶出画分 (Elution)をそれぞれSDS-PAGEに付した。CBB染色により、溶出画分において約30 kDa付近にシングルバンドが観察されたことから、純度の高いタンパク質が溶出されたことが確認された (Figure 33A)。また、ウェスタンブロッティングにより溶出画分にAIBPが存在することが明らかとなった (Figure 33B)。これらの結果から、純度の高いAIBPが精製されたことが示された。

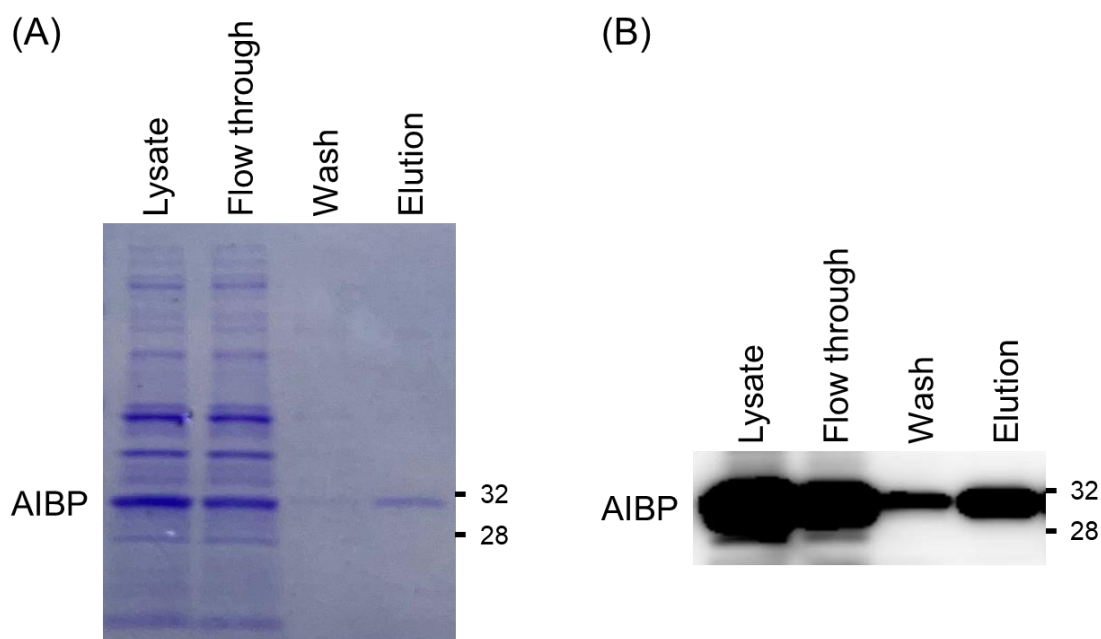


Figure 33. Expression and purification of rAIBP.

(A, B) The samples were collected at each step in the purification of rAIBP and subjected to Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining and Western blotting.

第2項 HDL との混合による AIBP の変化

AIBP は HDL の主要構成タンパク質である apoA-I と結合することが知られている⁵¹。結合能や結合による機能への影響を評価するためには AIBP と HDL を混合し、複合体を形成させる必要があるが、試験管内での混合の条件や AIBP への影響は不明である。そこで、HDL との混合・静置による AIBP への影響を評価するため、ウエスタンブロッティングを行った。rAIBP を HDL または BSA (control) と混合し、37°C、室温 (Room temperature: R.T.)、4°C でそれぞれ静置した (Figure 34)。全ての温度において、AIBP 単独で静置した場合はバンドが観察されなかった。これは、AIBP がチューブ内壁へ吸着するためであると考えている。一方で、HDL または BSA を混合すると AIBP のバンドが観察され、内壁への AIBP 吸着がブロックされたことが示唆される。37°C および室温において、HDL 濃度および温度依存的なバンド強度の減弱及びシフトダウンが観察された。これは、HDL により AIBP の一部の配列が切断されていると考えられる。

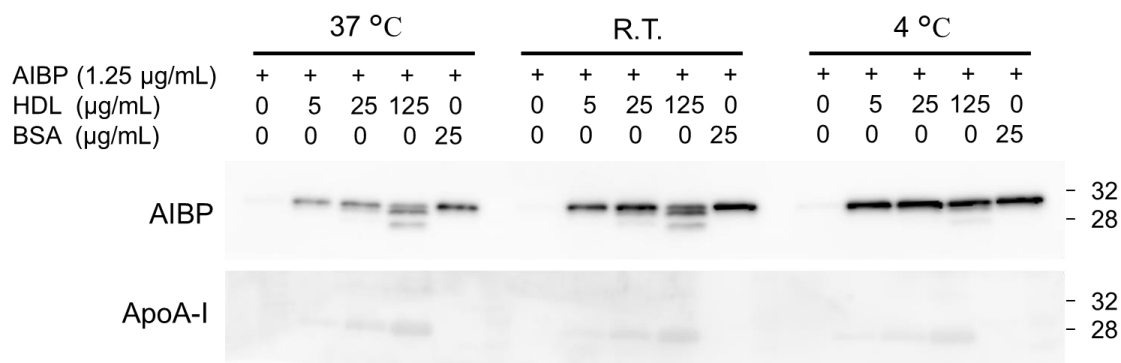


Figure 34. Alteration of rAIBP when incubated with HDL at three different temperatures.

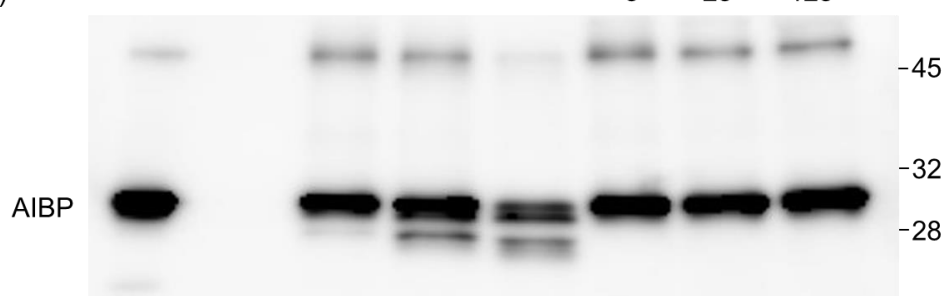
Recombinant AIBP was mixed with HDL or BSA (control) at the indicated concentration. After incubation for 24 h at the temperatures shown in the figure, Western blotting was performed on each sample. R.T.: room temperature.

ApoA-I は分子量が約 28.2 kDa であるため、SDS-PAGE により AIBP より僅かに下部でバンドが観察される。Figure 34 で AIBP の下部に観察されたバンドが、混合した HDL に含まれる ApoA-I 由来のバンドであることを否定するため、HDL 単独のレーンを追加し、実験を行った (Figure 35A)。HDL 単独ではバンドが現れなかったことから、AIBP と HDL の混合により観察されるバンドは、HDL に対する非特異的な抗体結合によるアーティファクト

ではないことが示された。また、HDL と同濃度の BSA を添加した場合はバンド強度の減弱およびシフトダウンが観察されず、HDL 特異的に引き起こされる現象であることが示唆された。また、rAIBP と HDL を混合し、72 時間後までバンドを観察した。24 時間以降でシフトダウンしたバンドが観察され、時間依存的にバンドが減弱した (Figure 35B)。

(A)

rAIBP (1.25 $\mu\text{g/mL}$)	+	—	+	+	+	+	+	+
HDL ($\mu\text{g/mL}$)	—	125	5	25	125	—	—	—
BSA ($\mu\text{g/mL}$)	—	—	—	—	—	5	25	125



(B)

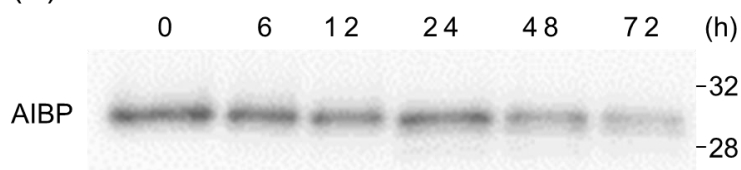


Figure 35. Cleavage of rAIBP via incubation with HDL.

(A) Recombinant AIBP was mixed with HDL or BSA (control) at the indicated concentration. After incubation for 24 h at 25 °C, Western blotting was performed on each sample. The rAIBP sample (Lane 1) was stored at -20°C until use and was used immediately after thawing. The HDL alone sample (Lane 2) was incubated for 24 h at the 25 °C and used as a control. (B) Recombinant AIBP (1.25 $\mu\text{g/mL}$) was mixed with 25 $\mu\text{g/mL}$ HDL. After incubation at the 25 °C for the time indicated in the figure, samples were collected and stored at -20 °C until subjected to Western blotting.

第3項 AIBP の切断におけるプロテアーゼの関与

AIBP の切断メカニズム解明のため、熱失活 HDL (boiled-HDL) および protease inhibitor (PI) を用いた検討を行った。これまでの結果と同様に AIBP のバンドは HDL によりシフトダウンしたが、boiled-HDL ではシフトダウンが観察されなかった (Figure 36A)。これは、HDL 中に含有されるタンパク質が加熱により失活したためであると考えられ、AIBP の開裂は HDL 中のタンパク質活性依存的に起こっていることが示唆される。一方で boiled-HDL とは対照的に、PI の添加ではバンドのシフトダウンを抑制できなかった (Figure 36B)。今後、本実験で用いた PI の阻害標的とならないプロテアーゼに対する阻害剤を用い、さらなる検討を行う必要があると考えられる (Table 1)。

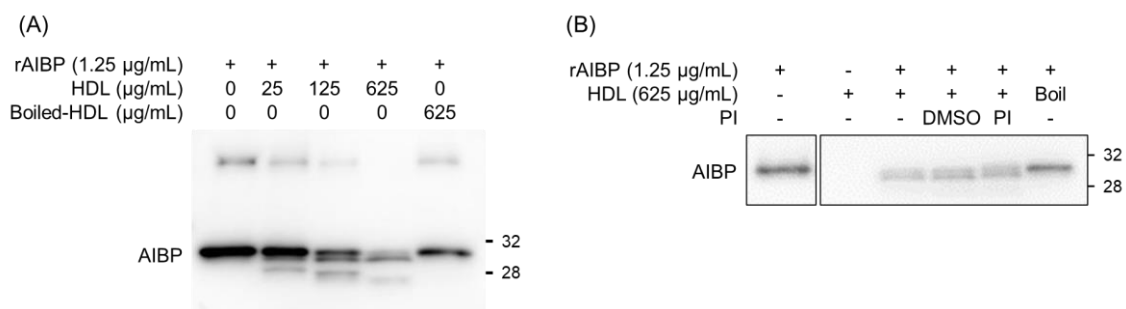


Figure 36. Inhibition of rAIBP cleavage by HDL boiling or addition of protease inhibitor cocktail.

(A) Boiled-HDL was prepared by incubating HDL at 95°C for 5 min. Recombinant AIBP was mixed with BSA (Lane 1), HDL, boiled-HDL at the indicated concentration. After incubation for 24 h at the 25 °C, Western blotting was performed on each sample. (B) When rAIBP was mixed with HDL, DMSO (control) or protease inhibitor cocktail (PI) was added at 1%.

第4項 HDL による AIBP 切断の特異性の検証

HDL による切断が AIBP 特異的に起こっているのかを明らかにするため、mouse IgG (mIgG) を用いた評価を行った。HDL との混合による mIgG のバンドの変化は、重鎖および軽鎖のいずれでも観察されず、boiled-HDL および PI を添加しても同様であった (Figure 37A, B)。このことから、HDL による開裂は、AIBP への選択性を有する反応であることが示唆される。

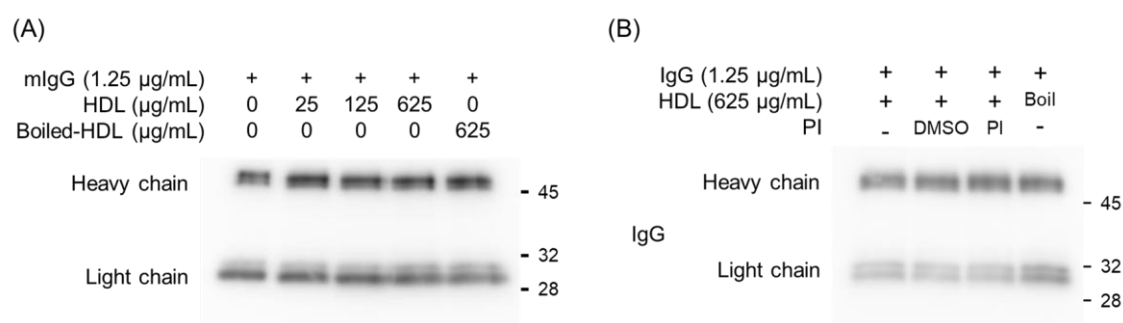


Figure 37. Specificity of HDL-mediated cleavage.

(A) Boiled-HDL was prepared by incubating HDL at 95°C for 5 min. Recombinant AIBP was mixed with BSA (Lane 1), HDL, boiled-HDL at the indicated concentration. After 24 h of incubation at 25 °C, Western blotting was performed on each sample using HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody. (B) When recombinant AIBP was mixed with HDL, DMSO (control) or protease inhibitor cocktail (PI) was added at 1%.

Protease inhibitors	Targeted protease
AEBSF	Serine protease
Aprotinin (derived from bovine lung)	Serine protease Esterase
E-64	Cysteine protease
Leupeptin hemisulfate monohydrate	Cysteine protease Trypsin-like protease
EDTA	Metalloprotease

Table 1. Components and Targets of Protease Inhibitor Cocktail (#04080, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan).

AIBP の切断が、リポタンパク質の中でも HDL 特異的に引き起こされるのかを検証するため、HDL 以外のリポタンパク質を用いて評価を行った。Acetylated low density lipoprotein (AcLDL)は酸化型の LDL として動脈硬化の病態進行に寄与している⁹⁰。Chylomicron (CM)は外因性脂質を末梢組織に輸送するリポタンパク質の 1 種である。Apolipoprotein B-48 (ApoB48)を構成因子としており、主に triglyceride の運搬に関わっている⁹¹。Synthetic HDL (sHDL)は ApoA-I 模倣ペプチドおよびリン脂質で構成される人工 HDL である⁹²。しかし、acLDL, CM, sHDL との混合による AIBP のバンドの変化はいずれも観察されず、熱不活化リポタンパク質でも同様であった (Figure 38A-C)。これらより、AIBP のバンドの変化は HDL/AIBP 間に特異的な反応であることが示唆された。

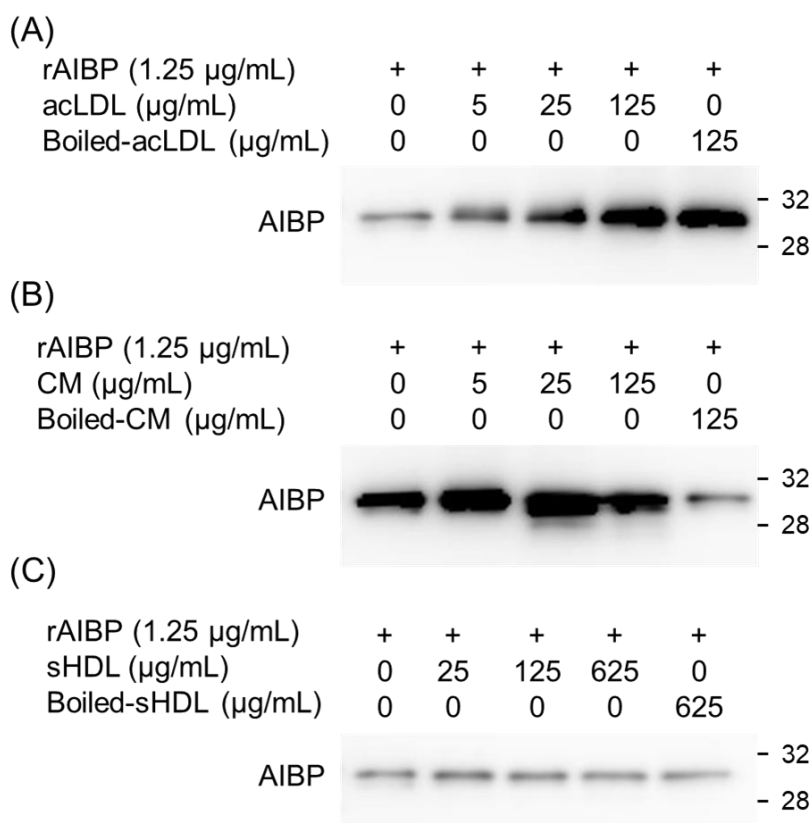


Figure 38. Activity of rAIBP cleavage via mixing with other lipoproteins.

(A-C) Boiled samples were prepared by incubation at 95°C for 5 min. Recombinant AIBP was mixed with untreated or boiled acLDL, chylomicron (CM), synthetic HDL (sHDL) or BSA (control) at the indicated concentrations. After incubation for 24 h at 25 °C, Western blotting was performed on each sample. The rAIBP alone sample (Lane 1) was stored at -20°C until use and used immediately after thawing.

第5項 AIBP 切断部位の特定

切断された AIBP の精製を試みた。本研究でここまで用いた抗 AIBP 抗体 (NBP2-30626, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) は、AIBP のアミノ酸配列 (288 アミノ酸) のうち 218-287 番の 69 残基からなるペプチドを抗原として作成したものであり、AIBP の C 末端側をエピトープとして認識する。開裂後の AIBP が抗体で検出されることから、切断部位が N 末端側であることが示唆される。rAIBP は C 末端に 6×His tag を付加していることから、Ni⁺カラムを用いて切断後の C 末端側 AIBP を精製できると考えた。HDL と rAIBP を混合した後、Ni⁺カラムで精製し、銀染色を用いて検出した。その結果、Elution 画分に切断後の rAIBP (黒矢印) が検出され、6×His tag が付加されたままであることが示唆された (Figure 39)。

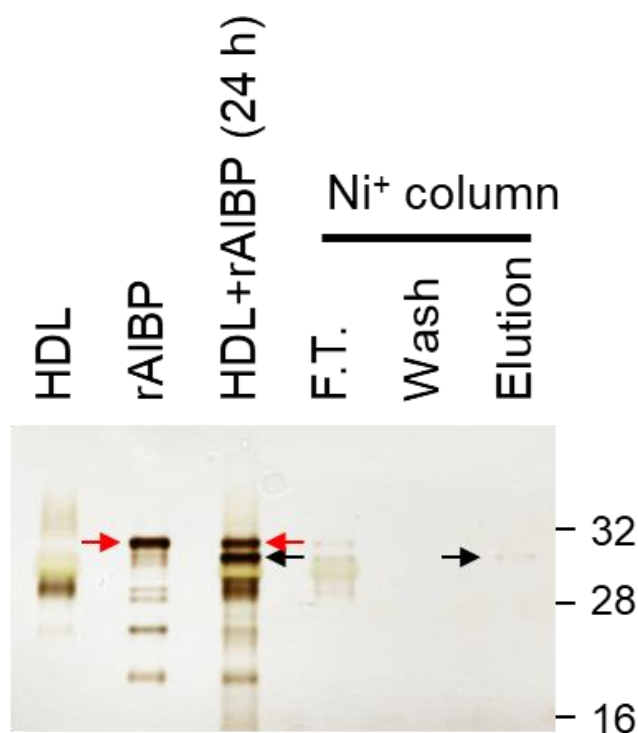


Figure 39. Silver stain of rAIBP after incubation with HDL and purification with Ni⁺ column.

Recombinant AIBP (1.25 µg/mL) was mixed with HDL (125 µg/mL). After incubation for 24 h at 25 °C, each sample was purified by Ni⁺ column and stained with silver stain. Red arrow: AIBP. Black arrow: Cleaved AIBP.

エドマン分解は N 末端アミノ酸の 1 残基を分解する手法であり、タンパク質のアミノ酸配列の決定に用いられる手法である。Figure 39 とこれまでのウエスタンブロッティングより、AIBP の切断は N 末端側で起きていることが示唆されたことから、エドマン分解を用いて AIBP 切断箇所の特特定を行った。Figure 40 に示すように、AIBP の切断を CBB 染色で確認したところ、rAIBP のバンド (A1, red arrow) が HDL との混合によりシフトダウンした (A2, black arrow)。これらのバンドについて、エドマン分解により N 末端側の 6-7 アミノ酸を特定した。A1 は MQTIACR の配列であり、予想される rAIBP の配列と完全に一致していた (Table 2, left)。A2 は LNSGGR の配列が検出され、AIBP の切断が 39 番の R (R³⁹) と 40 番の L (L⁴⁰) の間で起きていることが明らかになった (Table 2, right) (Figure 41)。

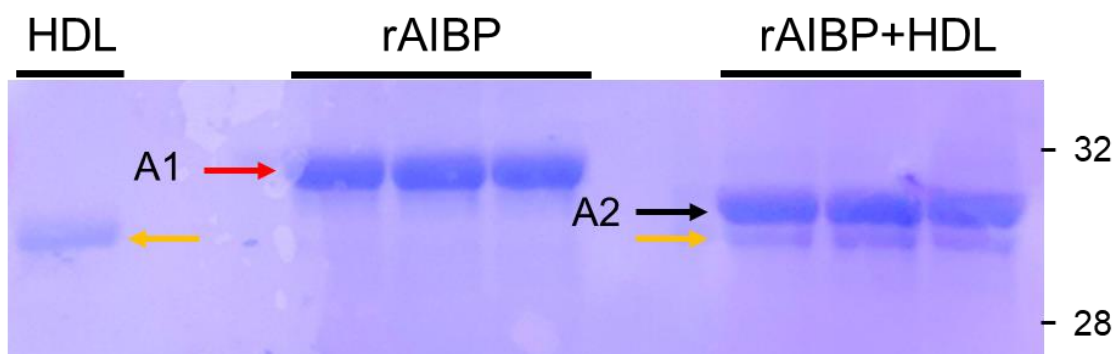


Figure 40. CBB stain of rAIBP after incubation with HDL.

Recombinant AIBP was mixed with HDL. After incubation for 36 h at 25 °C, CBB stain was performed. Yellow arrow: HDL (apoA-I). Red arrow: AIBP (A1). Black arrow: Cleaved AIBP (A2).

Untreated (A1)			Cleaved (A2)		
Cycle	AA	pmol	Cycle	AA	pmol
1	M	5.1	1	L	5.1
2	Q	10.2	2	N	3.4
3	T	5.2	3	S	4.5
4	I	6.9	4	G	3.4
5	A	5.6	5	G	2.9
6	C	—	6	R	2.7
7	R	2.4			

Table 2. Identification of N-terminal amino acid sequence of AIBP and cleavage products by Edman degradation.

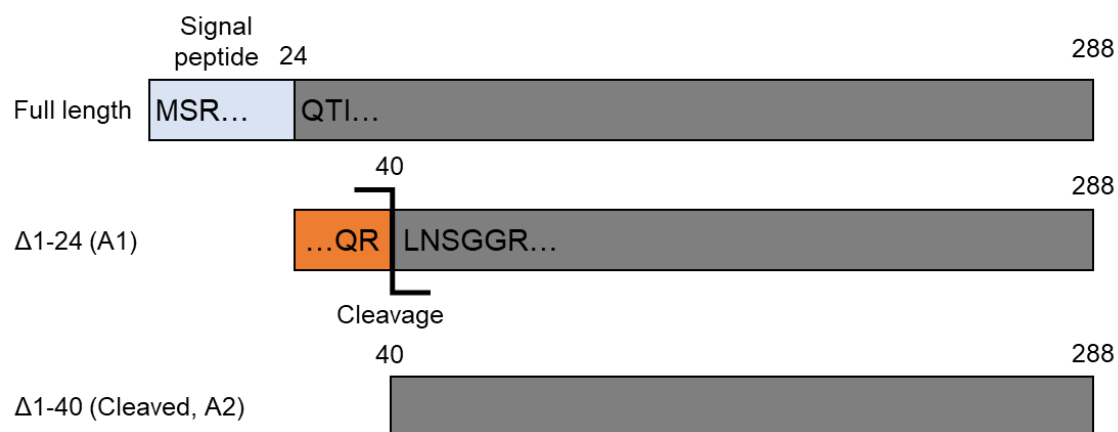


Figure 41. Model figure of AIBP sequence and cleavage.

AIBP の Cleavage site である R³⁹L⁴⁰ 付近の構造的な特徴を調べるため、タンパク質の結晶構造予測ツール AlphaFold2 を用いて、結晶構造予測を行った (Figure 42A)⁹³。AIBP の N 末端側 60 番目付近のアミノ酸まで安定な二次・三次構造をとらないことが予測された (Figure 42B)。このような、特定の立体構造をとらない領域は天然変性領域と呼ばれ、パートナー分子と結合することで立体構造が誘起される。結晶構造予測の結果を踏まえると、AIBP の N 末端側 AA1-60 は、HDL/ApoA-I と結合する天然変性領域であるかもしれない。

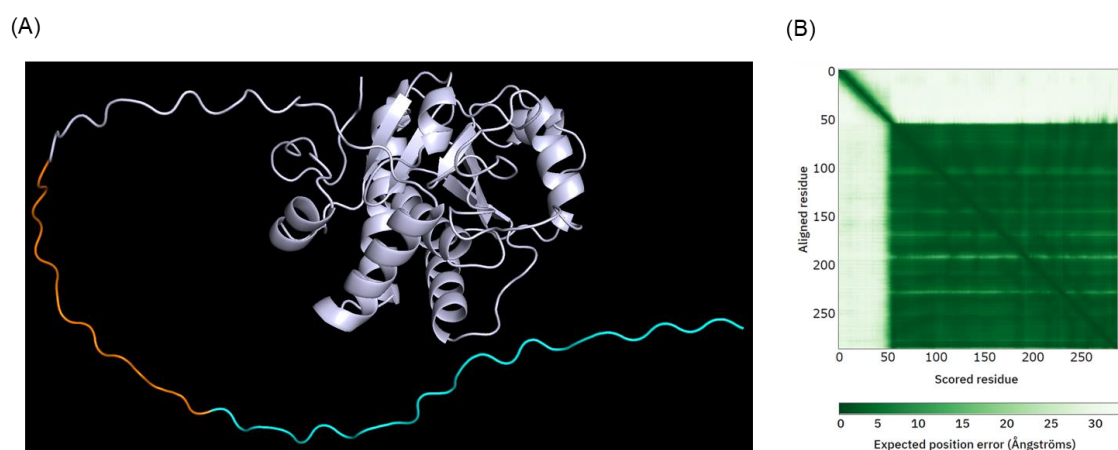


Figure 42. Predicted Structure of AIBP by AlphaFold2.

(A) Predicted structure of human AIBP by AlphaFold2 (UniProt: Q8NCW5) is shown in PyMOL. AA1-24 is shown in cyan, AA25-40 in orange, and AA41-288 in gray. (B) Predicted aligned error is shown. The color at position (x, y) indicates the expected positional error of AlphaFold at residue x when the predicted and true structures are aligned at residue y.

第6項 AIBP の細胞内局在に対する N 末端シグナルペプチドの影響

第2項から第5項で、HDLによりAIBPのN末端側R³⁹L⁴⁰が切断されることを示した。AIBPはN末端にシグナルペプチドを有しており、その配列がミトコンドリアへの配向性を有していることが知られている^{51,78}。AIBPのN末端が細胞内局在にどのような影響を及ぼすかを確かめるため、過剰発現したN末端欠損変異AIBPおよび内因性AIBPをミトコンドリアと共染色し、細胞内局在を観察した。HepG2において、全長AIBPがミトコンドリアへ局在していることが観察された (Figure 43, Upper panel)。さらに、内因性AIBPもミトコンドリアとの共局在を示し、HepG2における内因性AIBPは、全長AIBPである可能性が示唆された (Figure 44)。分泌シグナル配列と予測されているAA1-24を欠損させたAIBPは、ミトコンドリアへの局在を示さなかった (Figure

43, Middle panel)。ミトコンドリア局在シグナルとして予測されている AA1-51 を欠損させた AIBP はミトコンドリアと共局在せず、興味深いことに、一部のシグナルが核内で観察された (Figure 43, Lower panel)。これらの結果は、AIBP の N 末端が細胞内局在の決定因子であることを示しており、HDL により切断された AIBP ($\Delta 1-40$) が細胞内に存在する場合、ミトコンドリアではなく細胞質あるいは核へ局在する可能性を示唆している。

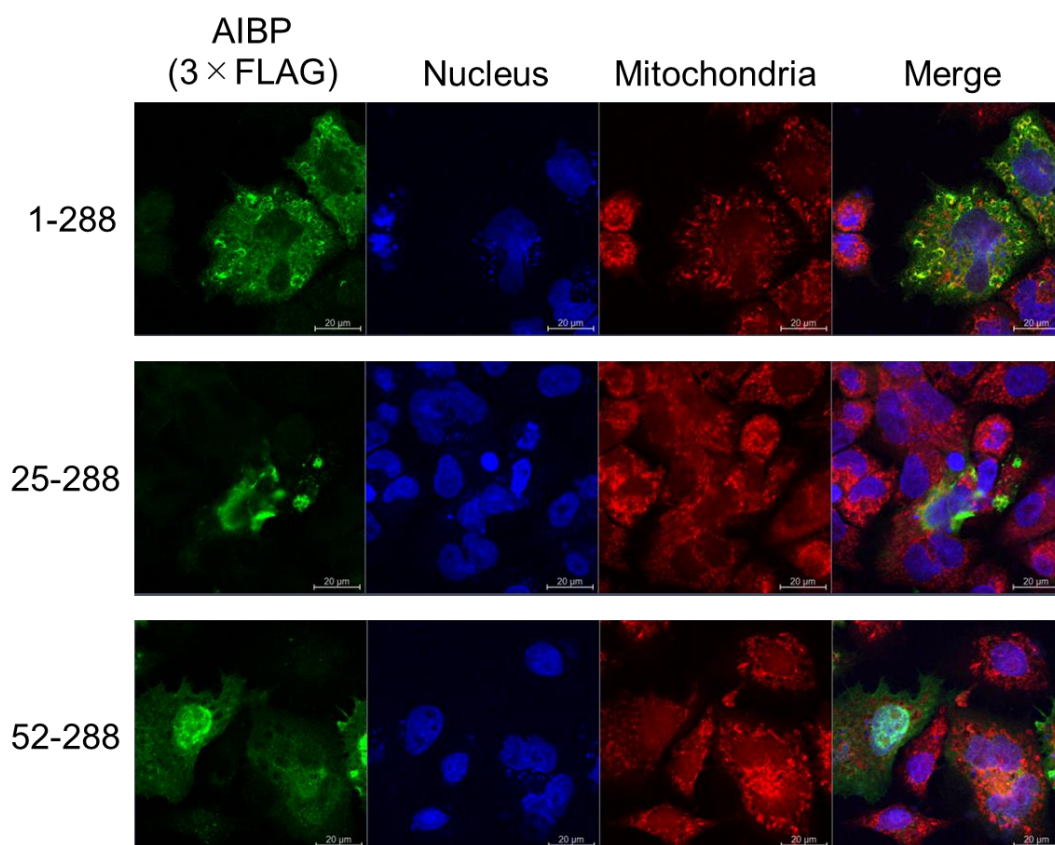


Figure 43 Localization of N-terminal deletion mutant AIBP in HepG2 cells.

pcDNA3.1(+) encoding N-terminal deletion mutant AIBP (AA1-288, 24-288, 52-288) was transfected into HepG2 cells. The mutant AIBPs were visualized by using an antibody directed against the 3×FLAG tag attached to the C-terminus. HepG2 cells were counterstained with DAPI and MitoTracker™ Red CMXRos. Scale bar indicates 20 μ m.

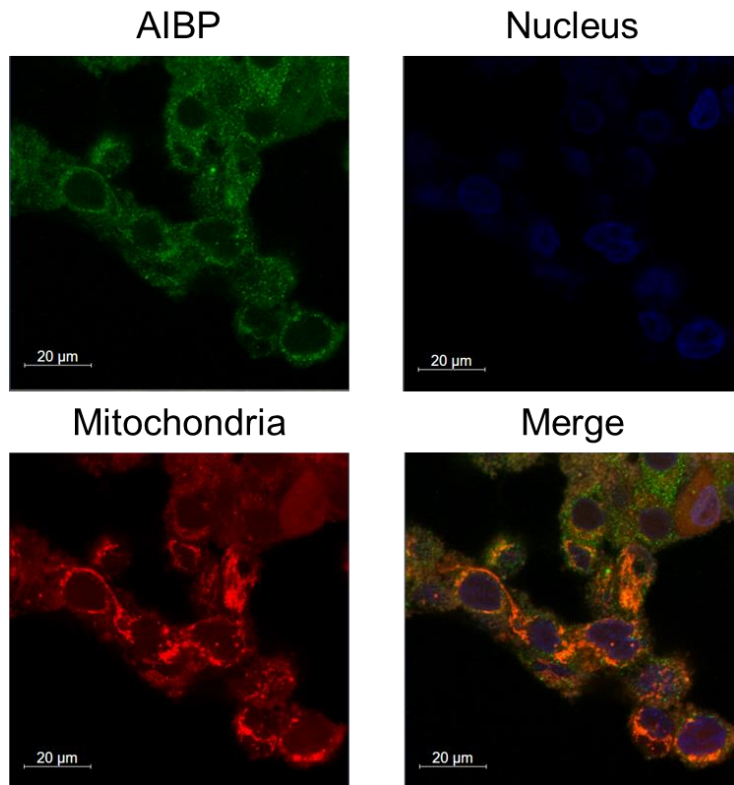


Figure 44. Endogenous AIBP localization by immunofluorescent staining.

Human hepatocellular carcinoma cells HepG2 were cultured 24 h. Anti-AIBP antibody was used to label an endogenous AIBP. MitoTracker™ CMXRos was used to label the mitochondria and the cells were counter stained with Hoechst to mark the nucleus. Scale bar is 20 μm.

第5節 考察

AIBP は染色体上の 1q21.2-1q22 に位置しており、いくつかの臓器および細胞における mRNA 発現が確認されていた⁵¹。また、Northern blot により 8 臓器の AIBP mRNA 量が比較された例もあり、本研究の結果と矛盾しない mRNA の発現パターンを示していたが⁹⁴、タンパク質発現の比較や広範な臓器ごとの発現比較は行われていない。本研究では、AIBP の分泌臓器を推定するため、18 種の臓器における AIBP の発現量を比較した (Figure 17A, B)。AIBP は腎臓・肝臓で多く、脂肪組織で少なかった。これは培養細胞における AIBP 産生でも同様の傾向を示した (Figure 18A, C)。一部の組織ではウエスタンブロッティングのバンドがダブレットになっていることが確認され、分子量の異なる AIBP が存在することが示唆された。この分子量の違いは、リン酸化 (S⁴³) やアセチル化 (K¹³⁸, K¹⁴²) などの翻訳後修飾⁹⁵、トランスクリプトバリエーションなどが要因として考えられる。しかし、ヒト AIBP の AA1-24 は分泌シグナルペプチドであると予測されており⁵¹、シグナルペプチダーゼにより切断されることを考慮すると、分子量の違いはシグナルペプチドの切断に起因している可能性が最も高い。今後、AIBP の臓器分布と分泌の関係を解明するため、それぞれのバンドのアミノ酸配列解析やシグナルペプチド欠損 AIBP を用いた検討を行う予定である。

AIBP は、細胞外で機能を発揮することとシグナルペプチド予測を根拠として、細胞外へ分泌されるとの見方が主流である⁵¹。一方で、実際に分泌が観測された例はわずかであり、むしろ細胞外 AIBP がほとんど検出されない例も散見される^{60,72,78}。過去の報告では、マウス血清および健常ヒト血清でのウエスタンブロッティングで AIBP が検出されず^{51,60}、本研究でも同様の結果が得られた (Figure 19)。一方で、ウエスタンブロッティングよりも高感度な検出系である ELISA では、ヒト血清に AIBP が存在することが確認された (Figure 20,21)。さらに、HepG2 および HEK293 の培養上清へ AIBP が分泌されていることが確認された (Figure 18, 23)。Alexandre らは AIBP を過剰発現した HEK293 で細胞外に AIBP が検出されなかったことから、AIBP の分泌を否定しているが⁷⁸、Figure 18 に示すように HEK293 での分泌は僅かなため、培養上清中のタンパク質を濃縮することで検出が可能となると思われる。

本研究で、PA の添加により培養ヒト肝がん細胞の上清で AIBP が増加することが明らかとなった (Figure 23)。これは Lactate dehydrogenase (LDH) 活性の増加を伴っており、肝細胞の損傷による細胞内容物の放出が示唆された (Figure 24)。この結果と一致して、ヒト血清 AIBP レベルは肝障害マーカーの AST・ALT と正の相関を示し (Figure 21)、*in vivo* では CCl₄ 誘導性肝障害モデルマウスの血清 AIBP が著しく増加していた (Figure 26)。AIBP の血中量が増加する病態はこれまで敗血症のみでしか報告されておらず⁵¹、肝障害誘導マウスが内因性 AIBP の分泌研究における有用な実験モデルとなりうる。一方で、肝細胞障害は非特異的なタンパク質放出をもたらさうることから、細胞外 AIBP

の増加が生理的な現象であるか、すなわち増加した細胞外 AIBP が機能を有しているかという点については未解明である。rAIBP が抗炎症作用を有していたことは (Figure 30, 31, 32)、AIBP の増加が過剰な炎症を抑制するメディエーターとして働きうる可能性を示唆している。また、細胞死により分泌される分子群の Damage-associated molecular patterns (DAMPs) は、炎症シグナルメディエーターとしての機能が確立されている⁹⁶。AIBP は DAMPs と同様に細胞死→分泌→炎症制御という作用機序により、DAMPs による過剰な炎症を抑制しているのかもしれない。

ヒト AIBP は 288 アミノ酸で構成されており、HDL の主要構成タンパク質である ApoA-I と結合することが報告されている^{51,57,62}。第 4 節では HDL による AIBP の R³⁹L⁴⁰ 間での切断が観察された (Figure 41, Table 2)。本研究の限界として、AIBP 切断の生理的意義を解明できていない点が挙げられる。AIBP の AA1-24 は分泌シグナルペプチドとして、AA1-51 はミトコンドリア局在シグナルとして働くことが示唆されている。AIBP の切断が生体内・細胞内でも起こる場合、AIBP の細胞内局在あるいは分泌を制御する生理機能を担っているのかもしれない。また、炎症抑制機能にも関与する可能性も考えられる。AIBP は TLR4 のエクトドメインへの結合を介して炎症を抑制するが、この結合には AIBP の AA24-51 ドメインを介していることが示唆されている⁶²。HDL による AIBP の切断は、TLR4 への結合特性を変化させ、抗炎症作用をコントロールしている可能性がある。

第6節 実験方法

第1項 Resources

Resources	Cat.No.	Company	Location
Antibody			
APOA1BP Antibody	NBP2-30626	Novus Biologicals, LLC	Littleton, CO, USA
Monoclonal Anti- β -Actin antibody produced in mouse	A2228	Sigma-Aldrich	Louis, MO, USA
6 \times His tag Polyclonal antibody	10001-0-AP	Proteintech	Tokyo, Japan
Anti-Apolipoprotein B Goat pAb	178467-1MLCN	Sigma-Aldrich	Louis, MO, USA
Apolipoprotein AI Polyclonal antibody	14427-1-AP	Proteintech	Tokyo, Japan
beta Actin antibody (mouse Polyclonal)	A2228	Sigma-Aldrich	Louis, MO, USA
beta Actin antibody (Rabbit Polyclonal)	GTX109639	GeneTex	Texas, USA
anti-Rabbit IgG-HRP	172-1019	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	172-1011	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
mouse anti-goat IgG-HRP	sc-2354	Santa Cruz Biotechnology	Texas, USA
Transferrin antibody	GTX21223	GeneTex	Texas, USA
Normal Mouse IgG, Whole Molecule, Purified	140-09511	FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.	Osaka, Japan
Anti-Vinculin antibody	V9264	Sigma-Aldrich	Louis, MO, USA
Monoclonal ANTI-FLAG [®] M2 antibody	F1804	Sigma-Aldrich	Louis, MO, USA
Alexa Fluor Plus 488 goat anti-rabbit IgG	A11008	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Alexa Fluor Plus 488 goat anti-mouse IgG	A11029	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins			
Protease Inhibitor Cocktail for General Use (100x)	04080-24	Nacalai Tesque, INC.	Kyoto, Japan
XV PANTERA GEL MP	NXV-378HP20	DRC Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Extra PAGE One Precast Gel, 5-20%, 17wells	13064-64	Nacalai Tesque, INC.	Kyoto, Japan
APOA1BP Protein, Human, Recombinant (His Tag)	13421-H08H	Sino Biological Inc.	Beijing, China
Immobilon-P membranes	IPVH00010	Millipore	Burlington, MA, USA
Ponceau S Staining Solution	SP-4030	APRO Science Group	Tokushima, Japan
Skim milk	N/A	YUKIJIRUSHI Nyugyyou Ltd.	Sapporo, Japan
Can Get Signal(R) Immunoreaction Enhancer Solution 1	NKB-201	Nacalai Tesque, INC.	Kyoto, Japan
Can Get Signal(R) Immunoreaction Enhancer Solution 2	NKB-301	Nacalai Tesque, INC.	Kyoto, Japan
Enhanced chemiluminescence detection kit	WBKLS0500	Merck KGaA	Darmstadt, Germany

DynaMarker® Protein MultiColor Stable II	DM660	Biodynamics Laboratory Inc.	Tokyo, Japan
IBMX	I5879	Sigma-Aldrich	Louis, MO, USA
Insulin	I-1882	Sigma-Aldrich	Louis, MO, USA
Dexamethasone	D4902	Sigma-Aldrich	Louis, MO, USA
Human serum	N/A	BioIVT	Hicksville, NY, USA
Oil Red O	O1391	Sigma-Aldrich	Louis, MO, USA
DMEM (High Glucose)	08458-16	Nacalai Tesque, INC.	Kyoto, Japan
DMEM (Low Glucose)	08456-36	Nacalai Tesque, INC.	Kyoto, Japan
RPMI	30264-56	Nacalai Tesque, INC.	Kyoto, Japan
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	31985070	Gibco	Carlsbad, CA, USA
Penicillin-Streptomycin Mixed Solution	09367-34	Nacalai Tesque, INC.	Kyoto, Japan
Fetal Bovine Serum	173012-500ML	Sigma-Aldrich	Louis, MO, USA
LPS	L4391	Sigma-Aldrich	Louis, MO, USA
Phorbol 12-myristate 13-acetate	P8139	Sigma-Aldrich	Louis, MO, USA
Bovine Serum Albumin	A7906	Sigma-Aldrich	Louis, MO, USA
Albumin, Bovine Serum, Fatty Acid Free, pH7.0	08587-84	Nacalai Tesque, INC.	Kyoto, Japan
5A peptide	N/A	Scrum Inc.	Tokyo, Japan
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	D3925	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Tokyo, Japan
Lipid removable agent	13358-U	Sigma-Aldrich	Louis, MO, USA
Palmitic acid	165-00102	FUJIFILM Wako	Osaka, Japan
Oleic acid	156-03431	FUJIFILM Wako	Osaka, Japan
4%-Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (PFA)	09154-85	Nacalai Tesque, INC.	Kyoto, Japan
William's E Medium, no glutamine	12551-032	Gibco	Carlsbad, CA, USA
Carbon Tetrachloride (CCl ₄)	030-15731	FUJIFILM Wako	Osaka, Japan
Corn oil	032-17016	FUJIFILM Wako	Osaka, Japan
FuGENE® HD Transfection Reagent	E2312	Promega	Madison, Wisconsin, USA
Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent	13778030	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
siRNA	1181-007- F#806	Sigma-Aldrich	Louis, MO, USA
H ₂ O ₂	18412	Santoku Chemical	Hiroshima, Japan
Menadione	M9429	Sigma-Aldrich	Louis, MO, USA
DHR123	85100	Cayman Chemical	Ann Arbor, MI, USA
High fat diet	F2HFD2	Oriental Yeast Co., Ltd.	Tokyo, Japan

MitoTracker [®] Red CMXRos	9082S	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
ProLong [™] Gold Antifade Mountant with DAPI	P36935	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
HDL	N/A	kindly provided from M. Tsujita	Nagoya City University
acLDL	N/A	kindly provided from M. Tsujita	Nagoya City University

Critical Commercial Assays

Protein Assay BCA Kit	06385-00	Nacalai Tesque, INC.	Kyoto, Japan
Human APOA1BP (Sandwich ELISA) ELISA Kit	LS-F34255	LifeSpan BioSciences, Inc	Seattle, WA, USA
Mouse APOA1BP (Sandwich ELISA) ELISA Kit	LS-F52905-1	LifeSpan BioSciences, Inc	Seattle, WA, USA
LabAssay [™] Cholesterol	632-50981	FUJIFILM Wako	Osaka, Japan
LabAssay [™] Triglyceride	632-50991	FUJIFILM Wako	Osaka, Japan
Capturem [™] His-Tagged Purification Miniprep Kit	635710	Takara Bio Inc.	Shiga, Japan
His Mag Sepharose [™] Ni	28967388	Cytiva	Washington, DC, USA
Human TNF-alpha DuoSet ELISA	DY210	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
Human IL-6 DuoSet ELISA	DY206	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
Mouse TNF-alpha DuoSet ELISA	DY410	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
Mouse IL-6 DuoSet ELISA	DY406	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
CellAmp [™] Direct RNA Prep Kit for RT-PCR	3732	Takara Bio Inc.	Shiga, Japan
One Step SYBR [®] PrimeScript [™] RT-PCR Kit	RR066A	Takara Bio Inc.	Shiga, Japan
LDH assay	CK17	Dojindo	Kumamoto, Japan
Silver staining kit	291-50301	FUJIFILM Wako	Osaka, Japan

Experimental Models: Cell Lines, and Mouse

HEK293	RCB1637	Riken BioResource Center	Ibaraki, Japan
HepG2	RCB1648	Riken BioResource Center	Ibaraki, Japan
3T3-L1	86052701	European Collection of Cell Cultures	Wiltshire, UK
THP-1	RCB1189	Riken BioResource Center	Ibaraki, Japan
JHH5	JCRB1029	JCRB cell bank	Ibaraki, Japan
Balb/c mouse	N/A	SLC	Shizuoka, Japan

Instruments

MULTI BEADS SHOCKER	MSH003(S)	YASUI KIKAI	Osaka, Japan
ImageQuant [™] LAS 4000	N/A	GE Healthcare	Buckinghamshire, UK
Fluorescence microscope	BZ-9000	KEYENCE	Osaka, Japan
StepOnePlus system	N/A	Applied Biosystems Japan	Tokyo, Japan

CFX maestro	N/A	Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Plate reader	SH-1200	Corona Electric Co. Ltd.	Hitachinaka, Japan
FREE CARRIO DUO Redox Analyzer system	DI-601M	Wismerll	Tokyo, Japan
Confocal microscope	Zeiss LSM 700	Carl Zeiss	Oberkochen, Germany

Software

Image J	https://imagej.nih.gov/ij/download.html
EZR	https://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmedEN.html
GraphPad Prism	https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/
AlphaFold2	https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb
PyMOL	https://pymol.org/2/

N/A : Not available

第2項 Animals

Balb/c mice (male; 5 weeks old) were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan). Animals were maintained under controlled environmental conditions (23 ± 2 °C, 50–60% relative humidity, and 12:12 h light–dark cycle). All the procedures for manipulation of the animals were approved by the Animal and Ethics Review Committee of Tokushima University.

第3項 Detection of AIBP in tissues

Balb/c mice were sacrificed by carbon dioxide asphyxiation. Organs were immediately collected and homogenized in RIPA buffer. Samples were then centrifuged at $16,000 \times g$ to remove debris, and protein concentrations were measured by the BCA assay. 10 μg of tissue extracts were analyzed by Western blotting.

第4項 Western blot analysis

Protein extracts were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Ponceau S staining was performed to establish that loading per lane was equivalent. Following blocking in 4% skim milk in TBS'T (0.02% Tween 20) at room temperature for 1 h, the membranes were incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibodies (AIBP at 1:4,000, Transferrin at 1:4,000, 6 \times His at 1:1,000, apoB at 1:4,000, apoA-I at 1:4,000 and β -actin at 1:10,000). The following day, membranes were incubated with the respective secondary antibodies (1:10,000) for 1 h at room temperature after rinsing three times with TBS'T buffer. An ImageQuant LAS 4000 system was used to capture the protein bands. The optical density of each band was quantitated using Image J software and normalized to the intensity of control protein.

第5項 Cell culture

HepG2 and HEK293 were cultured in DMEM (30% or 10% glucose) supplemented with 10% FBS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin and 100 U/mL penicillin. The cells were maintained at 37°C and 5% CO₂.

Mouse 3T3-L1 preadipocytes were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin and 100 U/mL penicillin at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air. Cell differentiation was performed as we previously reported⁹⁷. The procedure was initiated 2 days after the cells reached confluence. The cells were cultured for 3 days in differentiation medium containing 0.25 μM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin. Next, the cells were cultured for 2 days in maturation medium containing 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin. Finally, they were cultured in growth medium again for 2 days.

第 6 項 Preparation of cell samples

HepG2 and HEK293 cells were seeded in 24-well plates at 5×10^4 cells per well. The medium was then exchanged to DMEM without FBS and penicillin-streptomycin and incubated for 24 h. The culture supernatant was collected and centrifuged $2,000 \times g$ for 15 min at 4°C . The supernatant was used as the supernatant sample. Half of the supernatant was precipitated and concentrated with protein using trichloroacetic acid (TCA). Briefly, TCA was added to a final concentration of 20% and incubated in ice for 30 minutes. Centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min at 4°C , the pellet was washed with ice-cold acetone to remove TCA. The pellet was dissolved in an appropriate volume of RIPA to make an 8-fold concentrated sample. Cells were lysed in RIPA buffer with protease inhibitor cocktail and used as lysate samples. 3T3-L1 was differentiated, and samples were prepared by the same procedure as above.

第 7 項 Oil Red O Staining

3T3-L1 were fixed in 4% formaldehyde in PBS (pH 7.4) for 15 min, rinsed with PBS, and stained with 0.3% Oil Red O dye for 15 min. After washing with 60% isopropanol, the cells were observed under a fluorescence microscope (BZ-9000).

第 8 項 Preparation of Mouse serum

Blood was collected from the tail vein and left at room temperature for 30 min. Centrifugation was performed $2,000 \times g$ for 15 min at 4°C and the supernatant was collected and used as serum. Serum was stored at -80°C until use.

第 9 項 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

The levels of AIBP and inflammatory factors were quantified using ELISA kits according to the manufacturer's instructions. Specifically, in AIBP detection, human or mouse serum diluted 30-fold with sample diluent was added to the wells coated with capture antibody. The plate was then incubated at 37°C for 90 min. Subsequently, a detection antibody and HRP-Streptavidin conjugate were added in sequence, and the wells were reacted with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution. The reaction was terminated by addition of a stop solution, and absorbance was measured at 450 nm.

第 10 項 Measurement of serum cholesterol and triglycerides

Serum cholesterol and triglycerides were measured using a Triglyceride or Cholesterol Colorimetric Assay Kit. Briefly, serum samples were incubated with Enzyme Buffer solution for 15 min at room temperature, and absorbance was read at 530-550 nm using a plate reader.

第 1 1 項 Preparation of palmitic acid and oleic acid

Sodium palmitate or oleic acid was mixed with 150 mM NaCl solution at 55°C until complete dissolution and conjugated with fatty acid-free BSA for 60 min. The pH of the PA or OA solution was adjusted to 7.4 using 1 M NaOH and stored at -20°C until use. Before use, PA and OA were thawed in a water bath at 37°C and incubated at 55°C for 15 min.

第 1 2 項 Cytotoxicity assay

Cytotoxicity assay was performed by measuring the activity of lactate dehydrogenase (LDH) released from cells. LDH activity measurements were performed according to the manufacturer's manual. Briefly, the reagent was added to the cells and incubated for a certain time, and then the supernatant was collected. The supernatant was mixed with Working solution and subjected to a color reaction for 30 min at room temperature under shielded light. Stop solution was added and absorbance was measured at 490 nm using a plate reader.

第 1 3 項 Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Total RNA was extracted using a CellAmp™ Direct RNA Prep Kit from cells grown in 96-well plates using the manufacturer's instruction. mRNA expressions were quantified using a StepOnePlus™ Real-Time PCR System with a One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR kit and gene-specific primers. PCR was performed under the following conditions: denaturation at 50 °C for 2 min, followed by 38 cycles of 95 °C for 15 sec and 60 °C for 1 min. Gene expression was normalized to internal controls and fold changes were calculated using relative quantification ($2^{-\Delta\Delta Cq}$). The amplification specificity was checked by melting curve analysis.

第 1 4 項 Mouse model of carbon tetrachloride induced acute liver injury

Male Balb/c mice (5 weeks old) were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan). Acute liver injury in mice was induced by intraperitoneal injection of CCl₄ at a dose of 4 mL/kg body weight (10 or 30% CCl₄ in corn oil). After 24 h, blood was collected from the tail vein and left at room temperature for 30 min. Centrifugation was performed at 2000 × g, 15 min, 4°C, and the supernatant was collected and used as serum. The serum was diluted 20-fold in PBS and dithiothreitol (DTT)-free SDS sample buffer was added. After incubation at 37°C for 1 h, proteins were separated by SDS-PAGE.

第 1 5 項 Transfection of nucleic acids

pcDNA3.1(+) coding human AIBP (Δ 1-24) were transfected using FuGENE® HD Transfection Reagent following the manufacturer's protocol. siRNA targeting human AIBP were transfected

using Lipofectamine™ RNAi Max following the manufacturer's protocol. Each experiment was performed 24 to 48 hours after transfection.

第 1 6 項 Evaluation of the antioxidant capacity of AIBP *in vitro*

HepG2 was cultured in 96-well plates, with overexpression of AIBP-3×FLAG or addition of rAIBP (0.5 µg/mL). After 24 h, various concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂) or menadione were added and the cells were incubated for 6 h. The cells were then reacted with 10 µM DHR123 for 1 h, and the levels of ROS were detected using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 525 nm.

第 1 7 項 Evaluation of the antioxidant capacity of AIBP *in vivo*

Male Balb/c mice fed a normal diet or high fat diet for 12 weeks and *i.v.* injected with AIBP (5 µg/mouse) in PBS. Blood was collected from the tail vein before and 2 h after administration. The serum levels of d-ROMs and BAP were measured using the free radical analyzer FREE CARRIO DUO.

第 1 8 項 Evaluation of the anti-inflammatory effect of AIBP *in vitro*

Human monocyte THP-1 cells were differentiated into macrophages by the addition of PMA for 48 h. The cells were incubated with LPS, HDL, and rAIBP for 24 h. The supernatant was collected and centrifuged at 2,000 × g, 5 min. The levels of secreted cytokines were evaluated using ELISA kit for TNF-α and IL-6. The ELISA was performed according to the manufacturer's protocol.

第 1 9 項 Evaluation of the anti-inflammatory effect of AIBP *in vivo*

Male mice (Balb/c, 5 weeks) were injected intravenously with rAIBP (0.2 or 0.6 mg/kg) immediately after intraperitoneal administration of LPS (2 mg/kg). Blood was collected from the tail vein over time up to 6 h after administration. The levels of TNF-α and IL-6 in the serum were determined using ELISA kit.

第 2 0 項 Evaluation of inflammatory cytokine levels in human serum

Cytokine levels in human serum purchased from BioIVT were detected using ELISA kit for TNF-α and IL-6. The ELISA was performed according to the manufacturer's protocol.

第 2 1 項 Purification of recombinant AIBP

pET-32a(+) encoding human AIBP-6×His without signal sequence (AA1-24) was transformed into DH5α and cultured in LB medium until the optical density (OD) reached 0.4-0.6. IPTG was added and the culture was incubated at 25°C for 20 h. The cell pellets were stored at -20°C until use.

Recombinant AIBP was purified with Capture™ His-Tagged Purification Miniprep Kit according to the manufacturer's protocol. Briefly, xTractor buffer was added to the pellet. Lysate was added to an equilibrated column and centrifuged (11,000 × g, 1 min, RT). Wash buffer was added and centrifuged (11,000 × g, 1 min, RT). Elution buffer was added and centrifuged (11,000 × g, 1 min, RT).

第 2 2 項 Preparation of synthetic HDL

sHDL was prepared using a previously reported thermal cycling method⁹⁸. Briefly, 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (DMPC) and ApoA-I-mimetic 5A peptide were dissolved in acetic acid. The solutions were mixed in a 2:1 weight ratio and lyophilized overnight. The lyophilized powder was hydrated with PBS and cycled between 55 and 4°C (3 min each cycle, 3 thermal cycles). sHDL was dialyzed using 8,000 Da cutoff membrane and filtered through a sterile filter (0.22 μm). It was stored frozen at -20°C until use.

第 2 3 項 Silver stain

Proteins were separated by SDS-PAGE and visualized by silver staining using the protocol provided by the manufacturer. The silver staining kit was obtained from FUJIFILM Wako (291-50301, Osaka, Japan).

第 2 4 項 Fluorescence immunostaining

HepG2 cells were genetically engineered to overexpress the mutant AIBP-3×FLAG and incubated in 8-well chamber slides. MitoTracker[®] Red CMXRos was added according to the manufacturer's protocol. Following rinsing with PBS, the cells were fixed in 4% PFA for 15 min. Subsequently, the cells were treated with PBS containing 2% BSA and 0.1% Triton-X100 for 1 h for permeabilization and blocking. The cells were then incubated with an anti-FLAG antibody (at 1:400) for 1 h, followed by the appropriate secondary antibody (at 1:1,000). After being washed with 0.1% Tween-20, the samples were mounted with ProLong[™] Gold Antifade Mountant containing DAPI. Fluorescence images were captured using a confocal microscope.

第 2 5 項 Statistical Analysis

The experiments were performed three or more times. The data are presented as the mean ± standard deviation (S.D.). The statistical significance of differences between groups was analyzed with Student's t-test or one-way ANOVA with Tukey's post hoc test using GraphPad Prism 5.0 software. Values of $p < 0.05$ were considered to indicate statistically significant differences.

第4章 総括

1990年代にHDL-Cと心血管疾患が逆相関することが報告されて以来、HDLは治療ターゲットとして研究者の関心を集め続けてきた。ここ数年においても、体内動態を制御する新規因子の発見や核酸の運搬機構などが発見され、今もなお発展を続ける分野であると言える^{99,100}。しかし、HDLへ直接的に介入、あるいは利用した創薬は未だ達成しておらず、HDL関連因子の生理的調節について更なる理解が必要である。

筆者は、FTY720による泡沫化マクロファージの脂質蓄積減少作用について検討した(第2章)。脂質蓄積減少はABCA1の増加を介しており、発現向上メカニズムの解明を試みた。第3章では、HDL結合タンパク質であるAIBPに着目し、生理的な調節と機能の解明を目的として実験を行った。第2節では、分泌臓器および分泌が増加する病態の特定に取り組んだ。第3節では、AIBPの生理的機能として抗炎症作用を中心とした検証を行った。第4節では、HDLとの混合によるAIBPの切断を評価し、AIBPの新規制御機構について検討した。

以下に、本研究にて得られた知見を総括する。

第2章 FTY720によるABCA1発現増加を介した脂質蓄積の減少

FTY720が、泡沫化マクロファージ細胞の脂質蓄積を減少させることが明らかとなった。この減少作用はABCA1の増加により引き起こされるものであり、LXR経路を介していた。SphK2およびHDACが、FTY720によるABCA1 mRNAの発現増加の上流にあることを明らかとし、SphK2阻害剤やHDAC阻害剤でもABCA1発現が増加することを発見した。以上、ABCA1の発現増加に着目した、FTY720による脂質蓄積の減少メカニズムを解明した。

第3章 AIBPの生理的調節についての研究

第2節 AIBPの分泌臓器および血中量が増加する病態に関する検討

マウス全18臓器のうち、肝臓で最も多くAIBPが発現しており、培養肝細胞においてもAIBPが多く分泌していた。ヒト血清におけるAIBP濃度はTriglycerideやAST・ALTと強く正に相関した。培養肝細胞におけるPAの添加およびCCl₄による肝障害モデルマウスにおいて分泌AIBPが顕著に増加したことから、AIBPは肝細胞へのダメージに応答して分泌されることが示唆された。以上より、肝障害の誘導が分泌AIBPの機能解析における有用なモデルとして使用できる可能性を示した。

第3節 AIBPの生理機能に関する検討

細胞生存率・酸化ストレス・炎症に対するAIBPの作用を評価した。AIBPはPAで誘導される肝細胞障害に対して影響を与えなかった。高脂肪食により酸化ストレスを誘導し

たマウスにおいて、AIBP の投与は血中酸化ストレスの減少傾向を示した。THP-1 細胞において LPS で誘導した炎症は、AIBP の添加により抑制された。さらに、ヒト血清において、AIBP 高値の群は低値の群と比較して、炎症性サイトカインレベルが低かった。以上より、AIBP は抗炎症作用を有することが明らかとなった。

第4節 HDL による AIBP の N 末端特異的な分解反応

AIBP は HDL との混合により N 末端が切断されることが明らかとなった。その他リポタンパク質により AIBP は切断されず、HDL は IgG などのタンパク質を切断しなかったことから、HDL/AIBP 間に特異的な反応であることが示唆された。エドマン分解法により、AIBP の R³⁹L⁴⁰ が切断されることが明らかとなった。全長 AIBP はミトコンドリアに、 Δ 1-24 は細胞質に、 Δ 1-51 は核および細胞質に局在することが明らかとなった。これは HDL による AIBP の N 末端切断が細胞内局在に影響を及ぼす可能性を示唆している。

以上述べてきたように、本研究では HDL 関連因子として、ABCA1 および AIBP の生体内調節メカニズムに関する検討を行った。ABCA1 は LXR/SphK2/HDAC 経路を介して発現が制御されることが明らかとなった。また、AIBP は肝障害において分泌が増加し、抗炎症作用を有していることが明らかとなった。AIBP は HDL により切断され、細胞内局在に影響を与える可能性が示唆された。これらの知見は、HDL 関連因子である ABCA1 および AIBP の新たな生理的調節機構を明らかにしたものであり、アテローム性動脈硬化の治療に向けた HDL 研究の一助となれば幸いである。

第5章 参考文献

1. The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
2. Ooi, B., Goh, B. & Yap, W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Involvement of Nrf2 Antioxidant Redox Signaling in Macrophage Foam Cells Formation. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2336 (2017).
3. Asada, Y., Yamashita, A., Sato, Y. & Hatakeyama, K. Pathophysiology of atherothrombosis: Mechanisms of thrombus formation on disrupted atherosclerotic plaques. *Pathol. Int.* **70**, 309–322 (2020).
4. Almeida, S. O. & Budoff, M. Effect of statins on atherosclerotic plaque. *Trends Cardiovasc. Med.* **29**, 451–455 (2019).
5. Collins, R., Armitage, J., Parish, S., Sleight, P. & Peto, R. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebocontrolled trial. *Lancet* **360**, 7–22 (2002).
6. Ouimet, M., Barrett, T. J. & Fisher, E. A. HDL and Reverse Cholesterol Transport. *Circ. Res.* **124**, 1505–1518 (2019).
7. Ogura, M. HDL, cholesterol efflux, and ABCA1: Free from good and evil dualism. *J. Pharmacol. Sci.* **150**, 81–89 (2022).
8. Bonacina, F., Pirillo, A., Catapano, A. L. & Norata, G. D. HDL in Immune-Inflammatory Responses: Implications beyond Cardiovascular Diseases. *Cells* **10**, 1061 (2021).
9. Negre-Salvayre, A. *et al.* Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic. Biol. Med.* **41**, 1031–1040 (2006).
10. Mineo, C., Deguchi, H., Griffin, J. H. & Shaul, P. W. Endothelial and Antithrombotic Actions of HDL. *Circ. Res.* **98**, 1352–1364 (2006).
11. Tran-Dinh, A. *et al.* HDL and endothelial protection. *Br. J. Pharmacol.* **169**, 493–511 (2013).
12. Cooney, M. T. *et al.* HDL cholesterol protects against cardiovascular disease in both genders, at all ages and at all levels of risk. **206**, 611–616 (2009).
13. Parolini, C. *et al.* Infusions of Large Synthetic HDL Containing Trimeric apoA-I Stabilize Atherosclerotic Plaques in Hypercholesterolemic Rabbits. *Can. J. Cardiol.* **35**, 1400–1408 (2019).
14. Barter, P. J. *et al.* Effects of Torcetrapib in Patients at High Risk for Coronary Events. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2109–2122 (2007).
15. Schwartz, G. G. *et al.* Effects of Dalcetrapib in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **367**, 2089–2099 (2012).

16. Mohammadpour, A. H. & Akhlaghi, F. Future of Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) Inhibitors: A Pharmacological Perspective. *Clin. Pharmacokinet.* **52**, 615–626 (2013).
17. Yokoyama, S. Assembly of high-density lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 20–27 (2006).
18. Heinecke, J. W. Small HDL promotes cholesterol efflux by the ABCA1 pathway in macrophages: Implications for therapies targeted to HDL. *Circ. Res.* **116**, 1101–1103 (2015).
19. Muratsu, J. *et al.* Accelerated atherogenicity in tangier disease: A case accompanied by extensive atherosclerotic lesions, leriche syndrome and bleeding tendency, and review of the literature. *J. Atheroscler. Thromb.* **25**, 1076–1085 (2018).
20. Bochem, A. E. *et al.* ABCA1 mutation carriers with low high-density lipoprotein cholesterol are characterized by a larger atherosclerotic burden. *Eur. Heart J.* **34**, 286–291 (2013).
21. Van Eck, M. *et al.* Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 6298–6303 (2002).
22. Venkateswaran, A. *et al.* Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12097–12102 (2000).
23. Westerterp, M. *et al.* ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation. *Circ. Res.* **114**, 157–170 (2014).
24. Wang, B. & Tontonoz, P. Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **14**, 452–463 (2018).
25. Stepanovska, B. & Huwiler, A. Targeting the S1P receptor signaling pathways as a promising approach for treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Pharmacol. Res.* **154**, 104170 (2020).
26. Brinkmann, V. *et al.* Fingolimod (FTY720): Discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 883–897 (2010).
27. Paugh, S. W., Payne, S. G., Barbour, S. E., Milstien, S. & Spiegel, S. The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2. *FEBS Lett.* **554**, 189–193 (2003).
28. Billich, A. *et al.* Phosphorylation of the Immunomodulatory Drug FTY720 by Sphingosine Kinases. *J. Biol. Chem.* **278**, 47408–47415 (2003).
29. Nofer, J. R. *et al.* FTY720, a synthetic sphingosine 1 phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* **115**, 501–508 (2007).

30. Keul, P. *et al.* The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 607–613 (2007).
31. Blumenfeld Kan, S., Staun-Ram, E., Golan, D. & Miller, A. HDL-cholesterol elevation associated with fingolimod and dimethyl fumarate therapies in multiple sclerosis. *Mult. Scler. J. - Exp. Transl. Clin.* **5**, 205521731988272 (2019).
32. Nagao, K., Maeda, M., Mañucat, N. B. & Ueda, K. Cyclosporine A and PSC833 inhibit ABCA1 function via direct binding. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1831**, 398–406 (2013).
33. Engle, K. & Kumar, G. Cancer multidrug-resistance reversal by ABCB1 inhibition: A recent update. *Eur. J. Med. Chem.* **239**, 114542 (2022).
34. Honig, S. M. *et al.* FTY720 stimulates multidrug transporter– and cysteinyl leukotriene–dependent T cell chemotaxis to lymph nodes. *J. Clin. Invest.* **111**, 627–637 (2003).
35. Ritter, M. *et al.* Cloning and Characterization of a Novel Apolipoprotein A-I Binding Protein, AI-BP, Secreted by Cells of the Kidney Proximal Tubules in Response to HDL or ApoA-I. *Genomics* **79**, 693–702 (2002).
36. Yu, X.-H. *et al.* ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta* **428**, 82–88 (2014).
37. Chun, J. & Hartung, H. P. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.* **33**, 91–101 (2010).
38. Schnute, M. E. *et al.* Modulation of cellular S1P levels with a novel, potent and specific inhibitor of sphingosine kinase-1. *Biochem. J.* **444**, 79–88 (2012).
39. Kharel, Y. *et al.* Sphingosine Kinase 2 Inhibition and Blood Sphingosine 1-Phosphate Levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **355**, 23–31 (2015).
40. Hait, N. C. *et al.* Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* **325**, 1254–7 (2009).
41. Klingenberg, R. *et al.* Sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 causes lymphocyte redistribution and hypercholesterolemia in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2392–2399 (2007).
42. Poti, F. *et al.* Effect of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor agonists FTY720 and CYM5442 on atherosclerosis development in LDL receptor deficient (LDL-R^{-/-}) mice. *Vascul. Pharmacol.* **57**, 56–64 (2012).
43. Verschuren, L., de Vries-van der Weij, J., Zadelaar, S., Kleemann, R. & Kooistra, T. LXR agonist suppresses atherosclerotic lesion growth and promotes lesion regression in apoE*3Leiden mice: Time course and mechanisms. *J. Lipid Res.* **50**, 301–311 (2009).
44. Ma, A. Z. S., Song, Z. Y. & Zhang, Q. Cholesterol efflux is LXR α isoform-dependent in human macrophages. *BMC Cardiovasc. Disord.* **14**, 80 (2014).

45. Diaz Escarcega, R., McCullough, L. D. & Tsvetkov, A. S. The Functional Role of Sphingosine Kinase 2. *Front. Mol. Biosci.* **8**, 971–980 (2021).
46. Hait, N. C. *et al.* Active, phosphorylated fingolimod inhibits histone deacetylases and facilitates fear extinction memory. *Nat. Neurosci.* **17**, 971–980 (2014).
47. Newton, J. *et al.* FTY720/fingolimod increases NPC1 and NPC2 expression and reduces cholesterol and sphingolipid accumulation in Niemann-Pick type C mutant fibroblasts. *FASEB J.* **31**, 1719–1730 (2017).
48. Hait, N. C. *et al.* The phosphorylated prodrug FTY720 is a histone deacetylase inhibitor that reactivates ER α expression and enhances hormonal therapy for breast cancer. *Oncogenesis* **4**, e156-11 (2015).
49. Rohrbach, T. D. *et al.* FTY720/fingolimod decreases hepatic steatosis and expression of fatty acid synthase in diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. *J. Lipid Res.* **60**, 1311–1322 (2019).
50. Ishimaru, K. *et al.* Sphingosine kinase-2 prevents macrophage cholesterol accumulation and atherosclerosis by stimulating autophagic lipid degradation. *Sci. Rep.* **9**, 18329 (2019).
51. Ritter, M. *et al.* Cloning and Characterization of a Novel Apolipoprotein A-I Binding Protein, AI-BP, Secreted by Cells of the Kidney Proximal Tubules in Response to HDL or ApoA-I. *Genomics* **79**, 693–702 (2002).
52. Jackson, A. O., Rahman, G. A. & Long, S. Apolipoprotein-AI and AIBP synergetic anti-inflammation as vascular diseases therapy: the new perspective. *Mol. Cell. Biochem.* **476**, 3065–3078 (2021).
53. Qiu, X., Luo, J. & Fang, L. AIBP, Angiogenesis, Hematopoiesis, and Atherogenesis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **23**, 1 (2021).
54. Zhu, L. & Fang, L. AIBP: A Novel Molecule at the Interface of Cholesterol Transport, Angiogenesis, and Atherosclerosis. *Methodist Debaquey Cardiovasc. J.* **11**, 160 (2015).
55. Fang, L. & Miller, Y. I. Regulation of lipid rafts, angiogenesis and inflammation by AIBP. *Curr. Opin. Lipidol.* **30**, 218–223 (2019).
56. Levental, I., Levental, K. R. & Heberle, F. A. Lipid Rafts: Controversies Resolved, Mysteries Remain. *Trends Cell Biol.* **30**, 341–353 (2020).
57. Fang, L. *et al.* Control of angiogenesis by AIBP-mediated cholesterol efflux. *Nature* **498**, 118–122 (2013).
58. Zhang, Z., Shen, M. M. & Fu, Y. Combination of AIBP, apoA-I, and Aflibercept Overcomes Anti-VEGF Resistance in Neovascular AMD by Inhibiting Arteriolar Choroidal Neovascularization. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **63**, 2 (2022).

59. Zhu, L. *et al.* Combination of apolipoprotein-A-I/apolipoprotein-A-I binding protein and anti-VEGF treatment overcomes anti-VEGF resistance in choroidal neovascularization in mice. *Commun. Biol.* **3**, 386 (2020).
60. Schneider, D. A. *et al.* AIBP protects against metabolic abnormalities and atherosclerosis. *J. Lipid Res.* **59**, 854–863 (2018).
61. Woller, S. A. *et al.* Inhibition of Neuroinflammation by AIBP: Spinal Effects upon Facilitated Pain States. *Cell Rep.* **23**, 2667–2677 (2018).
62. Navia-Pelaez, J. M. *et al.* Normalization of cholesterol metabolism in spinal microglia alleviates neuropathic pain. *J. Exp. Med.* **218**, (2021).
63. Marbaix, A. Y. *et al.* Extremely Conserved ATP- or ADP-dependent Enzymatic System for Nicotinamide Nucleotide Repair. *J. Biol. Chem.* **286**, 41246–41252 (2011).
64. Niehaus, T. D. *et al.* Plants Utilize a Highly Conserved System for Repair of NADH and NADPH Hydrates. *Plant Physiol.* **165**, 52 (2014).
65. Becker-Ketterer, J. *et al.* NAD (P) HX repair deficiency causes central metabolic perturbations in yeast and human cells. *FEBS J.* **285**, 3376–3401 (2018).
66. Maalej, M. *et al.* Identification of a novel homozygous mutation in NAXE gene associated with early-onset progressive encephalopathy by whole-exome sequencing: in silico protein structure characterization, molecular docking, and dynamic simulation. *Neurogenetics* **23**, 257–270 (2022).
67. Kremer, L. S. *et al.* NAXE Mutations Disrupt the Cellular NAD(P)HX Repair System and Cause a Lethal Neurometabolic Disorder of Early Childhood. *Am. J. Hum. Genet.* **99**, 894–902 (2016).
68. Manor, J. *et al.* NAXE deficiency: A neurometabolic disorder of NAD(P)HX repair amenable for metabolic correction. *Mol. Genet. Metab.* **136**, 101–110 (2022).
69. Chiu, L.-W. *et al.* NAXE gene mutation-related progressive encephalopathy. *Medicine (Baltimore)*. **100**, e27548 (2021).
70. Mohammadi, P., Heidari, M., Ashrafi, M. R., Mahdieh, N. & Garshasbi, M. A novel homozygous missense variant in the NAXE gene in an Iranian family with progressive encephalopathy with brain edema and leukoencephalopathy. *Acta Neurol. Belg.* **122**, 1201–1210 (2022).
71. Niehaus, T. D. *et al.* Plants Utilize a Highly Conserved System for Repair of NADH and NADPH Hydrates. *Plant Physiol.* **165**, 52–61 (2014).
72. Dubrovsky, L. *et al.* Inhibition of HIV Replication by Apolipoprotein A-I Binding Protein Targeting the Lipid Rafts. *MBio* **11**, (2020).
73. Mao, R. *et al.* AIBP Limits Angiogenesis Through γ -Secretase-Mediated Upregulation of Notch Signaling. *Circ. Res.* **120**, 1727–1739 (2017).

74. Choi, S.-H. *et al.* AIBP augments cholesterol efflux from alveolar macrophages to surfactant and reduces acute lung inflammation. *JCI Insight* **3**, (2018).
75. Zhang, T. *et al.* AIBP and APOA-I synergistically inhibit intestinal tumor growth and metastasis by promoting cholesterol efflux. *J. Transl. Med.* **17**, 161 (2019).
76. Sun, B. *et al.* NAD(P)HX epimerase downregulation promotes tumor progression through ROS/HIF-1 α signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* **112**, 2753–2769 (2021).
77. Teufel, F. *et al.* SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nat. Biotechnol.* **40**, 1023–1025 (2022).
78. Marbaix, A. Y. *et al.* Occurrence and subcellular distribution of the NAD(P)HX repair system in mammals. *Biochem. J.* **460**, 49–60 (2014).
79. Gutiérrez-Cuevas, J., Santos, A. & Armendariz-Borunda, J. Pathophysiological Molecular Mechanisms of Obesity: A Link between MAFLD and NASH with Cardiovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 11629 (2021).
80. Andersen, L. F. *et al.* Evaluation of a Food Frequency Questionnaire with Weighed Records, Fatty Acids, and Alpha-Tocopherol in Adipose Tissue and Serum. *Am. J. Epidemiol.* **150**, 75–87 (1999).
81. Ricchi, M. *et al.* Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **24**, 830–840 (2009).
82. de Sousa, I. F. *et al.* Dose- and Time-Dependent Effects of Oleate on Mitochondrial Fusion/Fission Proteins and Cell Viability in HepG2 Cells: Comparison with Palmitate Effects. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 9812 (2021).
83. Zeng, X. *et al.* Oleic acid ameliorates palmitic acid induced hepatocellular lipotoxicity by inhibition of ER stress and pyroptosis. *Nutr. Metab. (Lond)*. **17**, 11 (2020).
84. Palomer, X., Pizarro-Delgado, J., Barroso, E. & Vázquez-Carrera, M. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol. Metab.* **29**, 178–190 (2018).
85. Wu, L., Guo, T., Deng, R., Liu, L. & Yu, Y. Apigenin Ameliorates Insulin Resistance and Lipid Accumulation by Endoplasmic Reticulum Stress and SREBP-1c/SREBP-2 Pathway in Palmitate-Induced HepG2 Cells and High-Fat Diet–Fed Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **377**, 146–156 (2021).
86. Boll, M., Lutz, W. D., Becker, E. & Stampfl, A. Mechanism of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity. Hepatocellular Damage by Reactive Carbon Tetrachloride Metabolites. *Zeitschrift für Naturforsch. C* **56**, 649–659 (2001).

87. Choi, S.-H. *et al.* AIBP protects retinal ganglion cells against neuroinflammation and mitochondrial dysfunction in glaucomatous neurodegeneration. *Redox Biol.* **37**, 101703 (2020).
88. Low, H. *et al.* Cholesterol Efflux-Independent Modification of Lipid Rafts by AIBP (Apolipoprotein A-I Binding Protein). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **40**, 2346–2359 (2020).
89. Li, H., Horke, S. & Förstermann, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **237**, 208–219 (2014).
90. Li, J. *et al.* Novel insights: Dynamic foam cells derived from the macrophage in atherosclerosis. *J. Cell. Physiol.* **236**, 6154–6167 (2021).
91. Krauss, R. M. & King, S. M. Remnant lipoprotein particles and cardiovascular disease risk. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 101682 (2022)
doi:10.1016/j.beem.2022.101682.
92. Zhao, Y. *et al.* Mimicry of High-Density Lipoprotein: Functional Peptide–Lipid Nanoparticles Based on Multivalent Peptide Constructs. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 13414–13424 (2013).
93. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589 (2021).
94. Jha, K. N. *et al.* Biochemical and Structural Characterization of Apolipoprotein A-I Binding Protein, a Novel Phosphoprotein with a Potential Role in Sperm Capacitation. *Endocrinology* **149**, 2108–2120 (2008).
95. APOA1BP (human).
<https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=12842&showAllSites=true>.
96. Gong, T., Liu, L., Jiang, W. & Zhou, R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 95–112 (2020).
97. Sakuma, S. *et al.* Comparative Effects of Sulforaphane and Allyl Isothiocyanate on 3T3-L1 Adipogenesis. *J. Nutr. Metab.* **2022**, 1–8 (2022).
98. He, H. *et al.* Synthetic high-density lipoproteins loaded with an antiplatelet drug for efficient inhibition of thrombosis in mice. *Sci. Adv.* **6**, (2020).
99. Han, Y.-H. *et al.* Enterically derived high-density lipoprotein restrains liver injury through the portal vein. *Science (80-.).* **373**, (2021).
100. Michell, D. L. *et al.* Elucidation of physico-chemical principles of high-density lipoprotein–small RNA binding interactions. *J. Biol. Chem.* **298**, 101952 (2022).

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪医科薬科大学衛生化学分野の奥平桂一郎教授に深く感謝致します。私が研究の基礎を身につけ、ここまで進めてこられたのは奥平先生のご指導あつてのことです。

徳島大学 薬学部 薬物動態制御学分野の石田竜弘教授、異島優准教授、清水太郎特任助教、安藤英紀特任助教、椿理恵様に深く感謝致します。徳島大学でのイレギュラーな研究活動に際しましても、丁寧なご指導および多大なご支援をいただき、ここまで来ることが出来ました。

リポタンパク質の寄贈および実験面でのアドバイスをいただきました名古屋市立大学の辻田麻紀博士に深く感謝致します。

本論文の審査に際し、有益なる御助言と御校閲を賜りました徳島大学 薬学部 生物有機化学分野の南川典昭教授に深く感謝致します。

2022年4月からの急な異動にも快く迎え入れていただき、円滑な研究遂行にご協力いただきました大阪医科薬科大学衛生化学分野の佐久間覚准教授に深く感謝致します。

実験機器の使用等に関し、御丁寧なご助言を賜りました徳島大学薬学部中央機器室の北池秀次技術員に深く感謝致します。

本研究は徳島大学大学院薬科学教育部 旧製剤分子設計学教室、薬物動態制御学教室、大阪医科薬科大学薬学部 衛生化学分野で行われたものであり、終始有益なるご指導、ご助言、及び実験において多大なるご協力を頂きました先輩・同期・後輩に感謝申し上げます。

研究室の学生の中で最も多くの時間を共有し、常に切磋琢磨できる存在であった大阪医科薬科大学薬学部の楠本嵩志修士に心より感謝申し上げます。自身とは違う視点で物事を考える同期が常に近くに居たことで、大きく成長することが出来ました。

本研究の遂行にご協力いただき、また、研究室の良い雰囲気を作っていたいただいた旧製剤分子設計学教室の土井(橘) 茉里奈学士、金山忠史学士、末永翔平修士、有井紗由季学士、小川真依修士、倉本伶音さん、向井愛菜さんに感謝を申し上げます。

薬物動態制御学の現博士課程在籍の高田春風学士、松尾菜々学士、川口桂乃学士、上田大修士、福田 翔一郎学士に感謝を申し上げます。

本研究の遂行にご協力いただきました大阪医科薬科大学薬学部の前橋梨花さん、樹山友絵さん、井阪瞭介さんに感謝を申し上げます。

なお本研究の一部は、笹川研究助成、徳島大学学際的次世代研究者育成プログラム(うずしおプロジェクト)、日本学術振興会特別研究奨励費の助成を受けたものであり、感謝申し上げます。

最後に、これまで支援していただいた家族、共に励まし合った友人達、そして深い理解を持って支えてくれた婚約者の内海彩花学士に心から感謝いたします。

2023年 立花洸季