

令和 4 年 9 月 3 日現在

機関番号：32525

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20157

研究課題名(和文) 動脈硬化症の関連分子であるLTBP-1の細胞遊走に関わる部位決定とその応用

研究課題名(英文) Site determination and application of LTBP-1, a molecule related to arteriosclerosis, involved in cell migration

研究代表者

三森 盛亮 (Mimori, Seisuke)

千葉科学大学・薬学部・講師

研究者番号：70433688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アテローム性動脈硬化(atherosclerosis)は、動脈硬化症の一般的な形態であり、動脈硬化症とは動脈壁の肥厚および弾性喪失を引き起こす幾つかの疾患の総称である。本研究では、アテローム性動脈硬化において現在最も広く受け入れられている動脈内膜肥厚過程の中で、TGF- β 複合体の成分であるLatent TGF- β binding protein-1 (LTBP-1)の平滑筋細胞の遊走作用を有する部位を明らかにしようと試みた。さらに、LTBP-1の機能とTGF- β との関係性を明らかにし、粥腫の発症、進展および退縮にどのように働いているかについて発展させたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アテローム性動脈硬化は、冠動脈疾患や脳血管疾患を引き起こすことから、動脈硬化症の中で最も重篤で臨床的に重要な病態でもある。アテローム性動脈硬化は、あらゆる大型および中型動脈に発生し、米国や多くの先進国において疾患発生および死亡の主な原因となっている。本研究のようにアテローム性動脈硬化において、LTBP-1に着目し、その病態との関係についての報告は少なく、まだ明らかになっていないことが多い。そのため新たな知見により創薬開発などにつながることで期待できる。

研究成果の概要(英文)：Atherosclerosis is the most common form of atherosclerosis, a collective term for several diseases that cause thickening and loss of elasticity of the arterial wall. In this study, we attempted to identify the site where Latent TGF- β binding protein-1 (LTBP-1), a component of the TGF- β complex, has a migratory effect on smooth muscle cells during the process of arterial intima-media thickening, which is currently the most widely accepted process in atherosclerosis. Furthermore, we would like to clarify the relationship between the function of LTBP-1 and TGF- β , and develop how it works in the onset, progression, and regression of atherosclerosis.

研究分野：分子生物学

キーワード：LTBP-1 動脈硬化症 TGF- β 細胞遊走

1. 研究開始当初の背景

アテローム性動脈硬化 (atherosclerosis) は、動脈硬化症 (arteriosclerosis) の最も一般的な形態であり、動脈硬化症とは動脈壁の肥厚および弾性喪失を引き起こすいくつかの疾患の総称である。アテローム性動脈硬化は、冠動脈疾患や脳血管疾患を引き起こすことから、動脈硬化症の中で最も重篤で臨床的に重要な病態でもある。アテローム性動脈硬化は、あらゆる大型および中型動脈に発生し、米国や多くの先進国において疾患発生および死亡の主な原因となっている。

2. 研究の目的

Transforming growth factor- β (TGF- β) は平滑筋細胞やマクロファージに対して多様な作用を示すため、動脈硬化症において、重要な役割を担っていることは明らかである。そこで本研究では、この TGF- β を制御する分子として、TGF- β 複合体の一分成分である Latent TGF- β binding protein-1 (LTBP-1) に着目し、遺伝子組み換え技術によりタンパク質の部分発現を行い、その機能を明らかにすることを目的とした。すなわち、現在最も広く受け入れられている動脈内膜肥厚過程において、LTBP-1 の平滑筋細胞の遊走作用を有する部位を明らかにする。さらに、LTBP-1 の機能と TGF- β との関係性を明らかにし、粥腫の発症、進展および退縮にどのように働いているかを調べたい。以上から、動脈硬化症の予防および検査、また創薬のため有効な情報を提供する。

3. 研究の方法

本研究は、LTBP-1 の機能解析を行いたい。そのために 組換え体発現用ベクターの作製、HEK293 細胞への導入、LTBP-1 組換えタンパク質の精製、細胞遊走実験の順で研究を行う予定である。以上から、細胞遊走に関わる部位を明らかにした後、それ以外の部位の細胞への動態を確認することで機能解析を進める。

4. 研究成果

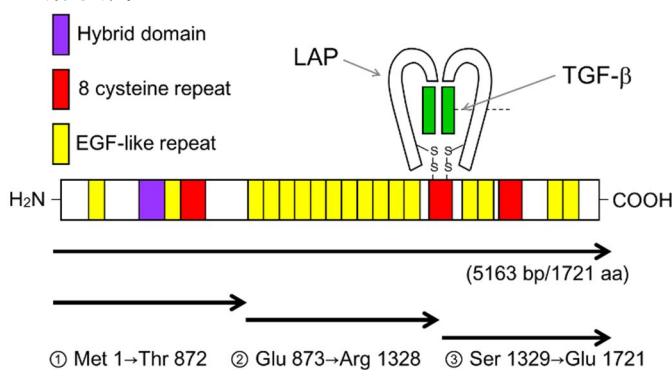


図3. TGF- β 複合体の構造と組換え体作出マップ

LTBP-1 を構成するアミノ酸それぞれ 1-872、873-1328、1329-1721 までを組換え体として発現用ベクターに挿入するためにプライマーを設計し、PCR により LTBP-1cDNA から遺伝子を増幅後、タンパク質発現用ベクターに挿入した。シーケンスで配列を確認し、プラスミドを精製した。(図3. 参照)

さらにこれらのプラスミドを用いて、組換えタンパク質を安定的に得るためにセルラインを確立した。リポフェクション法を用い、

発現ベクターのマーカーに耐性を持つ細胞を継代培養し、形質転換細胞を作製した。それぞれの変異体で培地や細胞から LTBP-1 組換えタンパク質の精製を行い、抗体を用いたウェスタンブロットティング法により発現の確認を行った。

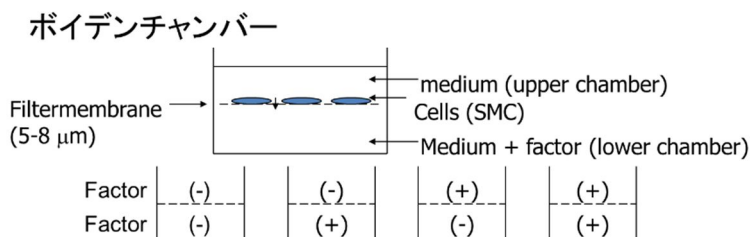


図4. ボイデンチャンバーを用いた細胞遊走実験

現在は精製したタンパク質溶液を用いて細胞遊走実験を行っている。(図4. 参照)

この細胞遊走実験は、コントロールとして PDGF-BB を用い、対照群と比べの細胞の遊走能を数値化することを予定し、予備実験も成功していた(図5 . 参照)が、回数を経るとコントロールの安定性が問題となり、現在は実験が滞っている。試薬の保存条件による活性低下が考えられるが、現在有効な解決手段が見つかっていない。

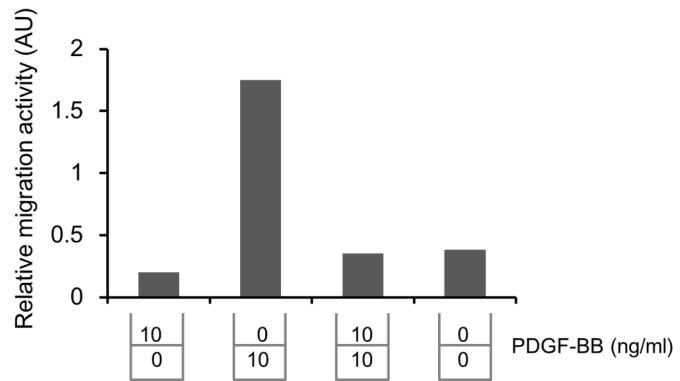


図5. PDGF-BBを用いた細胞遊走能の予備実験

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoriyasu Uju, Tetsuto Kanzaki, Yuki Yamasaki, Tadayuki Kondo, Hideki Nanasawa, Yu Takeuchi, Yuta Yanagisawa, Shun Kusanishi, Chieko Nakano, Tetsuro Enomoto, Akahito Sako, Hidekazu Yanai, Shunichi Mishima, Seisuke Mimori, Kazuei Igarashi, Tsuyoshi Takizawa, Tatsuro Hayakawa	4. 巻 -
2. 論文標題 A cross-sectional study on metabolic similarities and differences between inpatients with schizophrenia and those with mood disorders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of General Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12991-020-00303-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Seisuke Mimori, Koichi Kawada, Ryo Saito, Masato Takahashi, Kenta Mizoi, Yasunobu Okuma, Masakiyo Hosokawa, Tetsuto Kanzaki	4. 巻 517
2. 論文標題 Indole-3-propionic acid has chemical chaperone activity and suppresses endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 623-628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.07.074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koichi Kawada, Nobuyuki Kuramoto, Seisuke Mimori	4. 巻 13
2. 論文標題 Possibility that the Onset of Autism Spectrum Disorder is Induced by Failure of the Glutamine-Glutamate Cycle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1874467213666200319125109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoriyasu Uju, Tetsuto Kanzaki, Yuki Yamasaki, Tadayuki Kondo, Hideki Nanasawa, Yu Takeuchi, Yuta Yanagisawa, Shun Kusanishi, Chieko Nakano, Tetsuro Enomoto, Akahito Sako, Hidekazu Yanai, Seisuke Mimori, Kazuei Igarashi, Tsuyoshi Takizawa, Tatsuro Hayakawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Metabolic changes of Japanese schizophrenic patients transferred from hospitalization to outpatients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Global Health & Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35772/ghm.2020.01008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seisuke Mimori	4. 巻 June
2. 論文標題 Site determination and application of LTBP-1, a molecule related to arteriosclerosis, involved in cell migration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 www.impact.pub	6. 最初と最後の頁 24-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Seisuke Mimori, Koichi Kawada, Ryo Saito, Masato Takahashi, Kenta Mizoi, Yasunobu Okuma, Masakiyo Hosokawa, Tetsuto Kanzaki
2. 発表標題 Indole-3-propionic acid has chemical chaperone activity and suppresses endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death
3. 学会等名 第37回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 三森 盛亮、川田 浩一、齋藤 僚、高橋 正人、溝井 健太、大熊 康修、細川 正清、神崎 哲人
2. 発表標題 インドール-3-プロピオン酸 (IPA) の神経変性疾患モデル培養細胞に対する細胞死抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 三森 盛亮、高橋 正人、望月 啓貴、木村 友一、川田 浩一、神崎 哲人
2. 発表標題 IPA誘導体の合成と小胞体ストレス誘導性の神経細胞死に対する影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------