

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08997

研究課題名(和文) 脂肪分解酵素を介する内因性ジギタリス物質の産生機序の関与と高血圧発症機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of production, secretion and hypertension in the endogenous digitalis like factors mediating lipolytic enzyme

研究代表者

吉賀 正亨 (YOSHIKA, Masamichi)

関西医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70434834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチド結合とエステル結合の両方を持つマリノブフォトキシシン(MBT)の特殊構造に着目し、トリプシンや凝固線溶系酵素など血中に存在するペプチド結合、エステル結合分解活性発現が想定される数種の酵素検討は非生理的な条件での検討であるが、MBTからマリノブファゲニンへの変換を確認できた。

酵素の種類や反応条件の更なる検討を要するが、引き続き酵素や反応条件を検討することでいまだ十分解明されていない内因性ジギタリス様物質の産生メカニズムの解明につながると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧の発症はさまざまな要因が存在するが、その1つとして内因性ジギタリス様物質(EDLF)がナトリウム代謝を介して高血圧発症に関わると考えられている。EDLFには多くの候補物質が存在するがどの候補物質も産生分泌機序が十分に解明されていない。

今回の研究結果内因性ジギタリス様物質の産生メカニズムの解明につながり、ひいては新規機序の高血圧治療薬の開発につながる基礎的検討として意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This research is a part of patho-physiological study of endogenous digitalis-like factors (EDLFs). We took notice of the maronobufotoxin (MBT) in special structure having both peptide and ester bond. We confirmed MBT was converted to marinobufagin incubated with trypsin or any enzymes concerned with congealing fibrinogenolysis system. Those enzymes have cleavage activities of peptide or ester bond. Further studies on the types of enzymes and reaction conditions are required, but our studies will lead to the elucidation of the production mechanism of EDLFs, which has not yet been fully elucidated.

研究分野：医歯薬

キーワード：内因性ジギタリス様物質 マリノブファゲニン マリノブフォトキシシン エステラーゼ ELISA HPLC

1. 研究開始当初の背景

内因性ギタリス様物質 (EDLF) はナトリウム代謝を介して高血圧発症に関わると考えられている。しかし産生分泌機序が解明されていないため十分な研究が成されていない。EDLFの研究は、多くの候補物質が存在するが産生分泌機序は明確になっていない。近年 EDLF の中でマリノプファゲニン (MBG) と MBG にスベロイルアルギニンがエステル結合したマリノプフォトキシン (MBT) は高血圧発症に強く関係してとの報告がある。しかし MBT と MBG の関係は全く解明されていない。

報告者らは MBG と MBT の産生分泌機序の解明において、LC/MS だけでなく抗 MBG 抗体を作製し、MBG 様免疫活性 (MBGi) を測定する enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を構築した。報告者らの作製した抗 MBG 抗体はその特異性から試料を HPLC を用いて溶出時間ごとに分離し ELISA を用いて各分画の MBGi を ELISA で測定すれば MBG と MBT を両方同時に定量することが可能なことから MBT、MBG の産生分泌機序の解明を行う。

2. 研究の目的

報告者らの抗 MBG 抗体を用いてラット組織の免疫染色の結果による、ステロイド骨格を有する EDLF の産生組織と考えられている副腎皮質だけでなく、褐色脂肪細胞にも MBGi の陽性所見を認めた。しかし、MBG と脂肪細胞との関連はまったく解明されていない。近年、脂肪分解酵素としてコレステロールエステルを加水分解するホルモン感受性リパーゼ (HSL) が注目を集めている (Yeaman S: Hormone sensitive lipase new roles for an old enzyme. Biochem J 379: 11-22, 2004)。HSL は脂肪細胞だけでなく、ステロイド産生に関与しているため副腎にも存在している。さらにコレステロールエステルは MBT と非常に近い構造式を有していることから、MBT のエステル結合の切断に HSL が関与している可能性が高く、MBG の産生に関与している可能性がある。

HSL に限らず MBT のエステル結合を加水分解する酵素が確認できれば両者の関係の解明の手がかりになると思われる。今回、血中に存在するペプチド結合、エステル結合分解活性発現が想定される酵素、その中でも炎症時等様々な場面で活性化する凝固線溶因子のエステラーゼ的性質を取り上げ MBT から MBG への分解反応の有無の検討を行い EDLF の合成経路発見の端緒として、HSLをはじめ各種酵素が MBG と MBT 産生経路に関与するかを明らかにすることである。

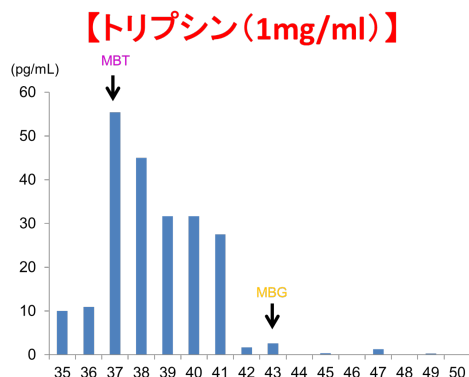
3. 研究の方法

今回、血中に存在するペプチド結合、エステル結合分解活性発現が想定される酵素、その中でも炎症時等様々な場面で活性化する凝固線溶因子のエステラーゼ的性質を取り上げ MBT から MBG への分解反応の有無の検討を行った。

1mg/ml および 10 µg/ml トリプシン、1単位の組織型プラスミノゲンアクチベータ (t-PA)、400単位のウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ (u-PA)、1単位のカリクレインを我々が精製した MBT をメタノールに溶解した MBT 溶液 (1mg/ml) にそれぞれ添加し、24時間インキュベータした。その後 HPLC を用い 1分間毎の分画に分離し、それぞれの分画の MBGi を ELISA で測定し、標品の MBT、MBG の溶出位置と比較し MBT からの MBG への変化を測定した。

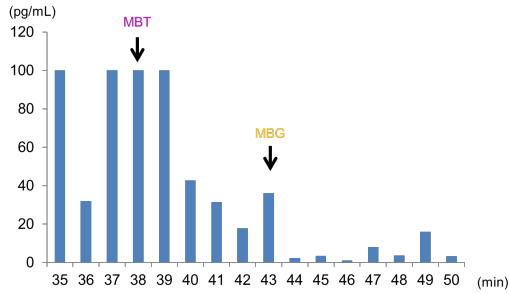
4. 研究成果

- ・トリプシン (1mg/ml) 添加では、MBT から MBG の変化はみられなかった。



- ・トリプシン (1mg/ml) 添加では、やや MBG の生成が見られた。

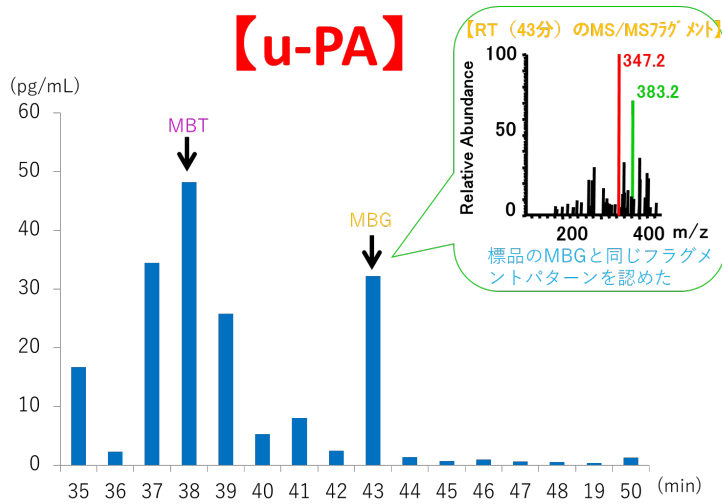
【トリプシン(10 μ g/ml)】



・ u-PA でもっとも MBG の生成を認めた。

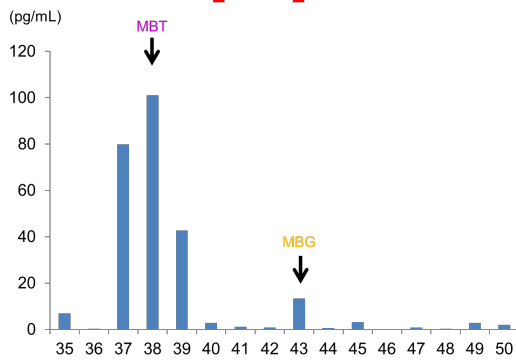
標品の溶出位置と同じ分画を LC/MS の用いたところ標品の MBG と同じフラグメントパターンを認めたことから MBG の生成を定性的にも確認した。

【u-PA】



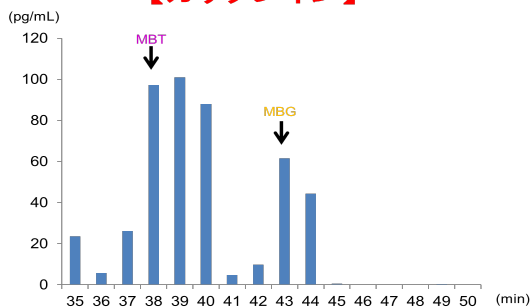
・ t - PA でもやや MBG の生成を認めた。

【t-PA】



・ カリクレイン添加でも MBG の生成を認めた。

【カリクレイン】



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 繁富 明日香, 野村 明代, 河島 実花, 榎原 雅美, 五十嵐 裕子, 高田 厚照, 下埜 敬紀, 神田 靖士, 三島 伸介, 吉賀 正亨	4. 巻 68
2. 論文標題 成虫によると思われる眼症状と末梢血液中にマイクロフィラリアを検出したロア糸状虫症の一例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床病理	6. 最初と最後の頁 17-20
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 -

1. 著者名 東京医学社	4. 巻 84
2. 論文標題 HIT 抗体 (血小板第4 因子・ヘパリン複合体抗体)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 『腎と透析』2018年増刊号「腎と透析ベッドサイド検査事典」	6. 最初と最後の頁 237-239
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 無
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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉賀正亨
2. 発表標題 当院での風しんに関する追加的対策事業における年代別抗体保有率の報告
3. 学会等名 第67回臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉賀正亨 小宮山豊 高橋伯夫
2. 発表標題 エステラーゼ活性をもつ各種酵素を用いた内因性ジギタリス様物質マリノプファゲニンの産生機構の検討
3. 学会等名 臨床検査医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masamichi YOSHIKA, Yutaka KOMIYAMA, Mika YOSHIDA, Sumiyoshi NAITO, Masahiro IEKO
2. 発表標題 A case of lupus anticoagulant-hypoprothrombinemia syndrome with phosphatidylserine-dependent anti-prothrombin antibody
3. 学会等名 XXXIst International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉賀 正亨, 尾崎 貴恵, 畑上 真緒, 山城 早織, 日高 典子, 中矢 桂子, 高田 厚照
2. 発表標題 2ステップ法による甲状腺関連ホルモンTSH、fT4、fT3測定の検討
3. 学会等名 臨床検査医学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 谷直人、吉賀正亨 他	4. 発行年 2017年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 132 (22-24、42-43、86-87)
3. 書名 検査データの「？」に答えます！	

1. 著者名 吉賀正亨	4. 発行年 2018年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 印刷中
3. 書名 『腎と透析』2018年増刊号「腎と透析ベッドサイド検査事典」	

〔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
研究 分 担 者	保坂 直樹 (HOSAKA Naoki) (30388459)	関西医科大学・医学部・研究員 (34417)	

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