

令和 3 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：奨励研究

研究期間：2020～2020

課題番号：20H01108

研究課題名 HepG2を用いたSAA-HDL形成の解析

研究代表者

藤井 祐葵 (Fujii, Yuki)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・臨床検査技師

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000 円

研究成果の概要：HepG2細胞内のSAAとapoA-Iの局在を蛍光免疫染色および共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析と、近接ライゲーションアッセイにて解析したところ、SAAとapoA-Iは細胞質中に重なることなく点在していた。これより、SAAとapoA-IはHepG2細胞から放出されたときには同一粒子内に存在しているが、HepG2細胞内では別々に存在している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高比重リポタンパク（HDL）は抗粥状動脈硬化を担う重要な粒子である。また、HDLはヘテロジニアスなりポタンパクであり、様々な種類のHDL亜分画が知られている。血清アミロイドA（SAA）は急性期反応蛋白であり、炎症時に上昇することが知られている。先行研究により、血中のSAAはHDLに結合していることが分かっている。このことから、SAA含有HDL（SAA-HDL）の生成過程に焦点を当てることで、SAA-HDLが及ぼす影響を知ることができ、動脈硬化進展のバイオマーカーとしての役割を見いだせる可能性がある。

研究分野：先端分析検査学分野

キーワード：高比重リポタンパク 急性アミロイドA HepG2細胞

1. 研究の目的

血清アミロイド A (SAA) は急性期反応タンパクの一つで、炎症性サイトカインの刺激により主に肝臓で合成される。血中の SAA の多くは高比重リポタンパク (HDL) と結合し、SAA 含有 HDL (SAA-HDL) として存在する。以前我々は、HDL に添加した SAA が HDL に取り込まれ SAA-HDL を形成するとともに、HDL の主要アポリポタンパクであるアポリポタンパク A-I (apoA-I) の一部が離脱することを明らかにした。また、炎症の程度が異なる患者血清から HDL を分離し、SAA の分布を調べたところ、炎症の程度に関わらず大きな HDL から小さな HDL まで広く分布していた。このように、肝臓から分泌された SAA は HDL に結合し、通常の HDL とは異なる多彩な粒子を形成すると考えられるが、その形成メカニズムは明らかではない。本研究では、ヒト肝臓由来細胞株 HepG2 を用いて SAA-HDL がどのように形成されるか検討した。

2. 研究成果

【方法・結果】

HepG2 の培養上清中に apoA-I が存在することを確認した。さらに、HepG2 を IL-1 β 、IL-6、およびデキサメタゾンの 3 物質で刺激することによって、培養上清中に効率よく SAA が分泌された。Native-PAGE において、刺激後の培養上清を分析したところ、apoA-I は大粒子と小粒子に分布していることが確認されたが、SAA はその中間の粒子サイズ付近に 2 本のシャープなバンドとして観察され、見かけ上 apoA-I の泳動像とは一致していなかった。次に、刺激後の培養上清を超遠心法によって、上、中、下層の 3 分画に分離した。回収したそれぞれの分画を SDS-PAGE にて apoA-I と SAA を解析し、コレステロール濃度の測定を行ったところ、apoA-I は上層と下層に同程度分布していたが、SAA は上層に偏って分布していた。また、上層には他の分画と比較して多量のコレステロールが含まれていた。免疫沈降法にて、抗 apoA-I 抗体への結合物には SAA が、抗 SAA 抗体への結合物には apoA-I が存在していた。さらに、rhSAA を添加した培養液で HepG2 を培養したところ、刺激した HepG2 上清の Native-PAGE 像と同じ 2 本のシャープなバンドが確認できた。刺激した HepG2 細胞内の SAA と apoA-I の局在を蛍光免疫染色および共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析と近接ライゲーションアッセイにて解析したところ、SAA と apoA-I は細胞質中に重なることなく点在していた。

【考察】

IL-1 β 、IL-6、デキサメタゾンで HepG2 を刺激し、SAA の放出が確認できた。SAA が超遠心後にコレステロールに富んだ上層に分布し、免疫沈降法にて apoA-I と同一粒子上に存在することから、SAA は apoA-I および脂質とリポタンパク粒子を形成していることが示唆された。しかし、Native-PAGE において SAA 含有バンドに apoA-I はほとんど検出されず、SAA 主体のリポタンパクとして分泌される可能性が考えられた。また、rhSAA 添加培地で HepG2 を培養すると、刺激時と同じ Native-PAGE 像が得られたことと、刺激した HepG2 細胞内の SAA と apoA-I が細胞内で別々に点在していたことから、SAA と apoA-I は HepG2 細胞から放出された時には同一粒子内に存在しているが、HepG2 細胞内では別々に存在している可能性が考えられた。以上のことから、SAA-HDL は細胞外で形成されることが示唆された。

今後、細胞中の apoA-I と SAA の分布の確認、HepG2 から放出された SAA を含む HDL 様リポタンパク粒子の分泌後の成熟過程について検討し、炎症時 HDL の特性について明らかにしていく。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------