

学 位 (博 士) 論 文 要 旨
(Doctoral thesis abstract)

論文提出者 Ph. D. Candidate	生物システム応用科学府 共同先進健康科学専攻 (博士課程) 平成 31 年度入学(Your Entrance Fiscal Year) 氏名 向 亮 (Your Name(Family, First) and Seal)				
主指導教員 氏 名 Chief Advisor's Name	田中 あかね	副指導教員 氏 名 Vice Advisor's Name		副指導教員 氏 名 Vice Advisor's Name	
論文題目 Title	ウマ Histidine-rich glycoprotein の遺伝子解析と好中球の制御機能に関する研究				
<p>論文要旨 (和文要旨(2000字程度)または英文要旨(500words)) ※欧文・和文どちらでもよい。但し、和文の場合は英訳を付すこと。 Write a summary in Japanese (2000 characters) or in English (500words). If the abstract is written in Japanese, needed to translate into English.</p> <p>ウマは過去から現在にかけて、様々な形で人間社会に貢献しており、福祉向上と健康維持はウマに携わる者にとっての責務である。致死率の高いウマの炎症性疾患として全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) や敗血症が挙げられる。ウマにおけるこれらの疾患は、ヒトの診断基準を元に作成されており、SIRS や敗血症と診断されたウマの致死率は極めて高い。この現状にも関わらず、ヒト・ウマ共に具体的な根治療法は確立されていない。近年、ヒトの炎症性疾患に対する有望なバイオマーカーとして histidine-rich glycoprotein (HRG) が注目されている。HRG は血漿中に豊富に存在する糖タンパク質で6つのドメイン (N-terminal domain 1・2, Proline-rich region (PRR) 1・2, Histidine-rich region (HRR), C-terminal domain) から構成されており、相互作用分子から免疫応答や血液凝固、血管新生に関わると考えられている。SIRS および敗血症患者では血漿中 HRG 濃度が健常者と比較して著しく低下し、濃度の低下は患者の致死率と相関すること、さらに、敗血症モデルマウスに HRG を投与することで生存率が回復することから、HRG が有望なバイオマーカーとなる知見が集積されている。以上の背景から HRG に着目し、ウマ SIRS や敗血症などの重症炎症性疾患に対する新規診断法の確立を目指した。</p> <p>GenBank データベース上にウマ HRG の遺伝子情報が予想配列しか存在しなかったため、まず、ウマ HRG cDNA の配列解析を行なった。HRG はヒトやマウスでは肝臓の実質細胞で発現することが報告されているため、ウマでも同様に肝臓で発現しているかを確認したところ、前述の情報と同様に肝臓でのみ mRNA 発現が確認された。発現が確認できた肝臓由来の cDNA の配列解析を行なったところ、予想配列に追加で 135 bp の新規配列が同定された。以上の結果から、ウマ HRG は 1,530 bp、509 aa によって構成されることが明らかとなった。次に、ウマ HRG の精製・検出を行なった。HRG は名前の示す通りヒスチジン残基を多く含み、ヒスチジン残基は Ni²⁺ と強く結合するため、ニッケルセファロースカラムを使用した精製が可能である。この手法に従ってウマ HRG の精製を行なったところ、精製サンプルは Coomassie brilliant blue (CBB) 染色およびウェスタンブロット法で 70 kDa 付近にシングルバンドが確認され、ウマ HRG の精製・検出を行うことに成功した。</p> <p>ウマ HRG 遺伝子解析の一部サンプルにおいて histidine rich region (HRR) ドメインに欠失が確認されたため、ゲノム DNA を使用して HRR ドメインに対する PCR 解析を行なったところ、3種類のサイズのバンドが確認され、サイズの大きいものから順に野生型 (Insertion: I)、45 bp 欠損を含む Deletion 1 (D1)、90 bp 欠損を含む Deletion 2 (D2) のウマ HRG が存在することが半明した。HRG の HRR ドメインにおけるアミノ酸配列は、コンセンサス配列のリピートによって構成されることが知られており、野生型ウマ HRG は 11 回のコンセンサス配列のリピートによって構成されている。見つかった欠失はいずれも HRR</p>					

ドメインに含まれ、Deletion 1 ではコンセンサス配列のリPEAT回数が 8 回、Deletion 2 では 5 回となり、HRG タンパク質として重要な役割を果たすと考えられるヒスチジン残基の割合が欠失型 HRG では少ないことが判明した。HRR は Zn^{2+} 依存的に様々な分子と相互作用することや、グラム陽性菌・陰性菌・真菌に対して殺菌作用を示すこと、血管新生に関与することが報告されていることから、欠失型 HRG が上記活性に対して何らかの異常を有する可能性が示唆された。また、PCR のバンドパターンから、ウマ HRG の遺伝子多型は II、ID1、ID2、D1D1、D1D2 の 5 種類が存在することが明らかとなった。次に、遺伝子多型の分布を調べるために 987 頭のウマ血液を使用して多検体解析を行なったところ、II: 24.4%、ID1: 45.2%、ID2: 3.7%、D1D1: 23.0%、D1D2: 3.6% の割合で分布していることが判明した。いずれの遺伝子型も 1%以上存在することから、5 種類の遺伝子多型が存在すると規定できる。約 1,000 頭の高検体解析を行なったにも関わらず D2 ホモキャリアが見つからなかったことから、D2 ホモキャリアには発生や成長過程に何らかの異常があることや、競走馬としての育成対象にならない可能性が考えられる。

次に、炎症病態形成に対する HRG の作用を調べるために、好中球の接着、遊走、reactive oxygen species (ROS) 産生、貪食能に対してウマ HRG がどのように影響するのかを調べた。ウマ血液から回収した好中球を使用して、ウマ HRG 存在下でそれぞれの活性に対する作用を調べたところ、接着・遊走・ROS 産生はウマ HRG によって抑制され、一方で、貪食は促進されることがわかった。HRG はトロンビンによって分解されることが報告されており、炎症環境下では血中と比較して HRG 濃度が低下していると考えられる。そのため、血中では HRG は好中球の貪食を促進する反面、接着・遊走・ROS 産生は抑制がかかっており、炎症組織では HRG 濃度が低下することによって好中球動員が誘導されると考えられる。以上のことから、HRG は好中球の活性を双方向的に調節することによって、過剰な活性化を防ぎ、恒常性の維持に関与することが示唆された。

上記研究成果は、好中球性炎症における病態形成の理解の一助となるものであり、ウマの炎症性疾患に対して HRG を標的とした診断および治療の有効性を提唱するものである。

(英訳) ※和文要旨の場合(300 words)

If the abstract is written in Japanese, needed to translate into English.(300 words)

Histidine-rich glycoprotein (HRG) is a plasma glycoprotein that is involved in immune response, coagulation, and fibrinolysis. Plasma HRG levels are markedly decreased in human patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and sepsis. Although high lethality of SIRS and sepsis have been noticed in both humans and horses, therapeutic procedures for those diseases have not been established. In the present study, I investigated production of equine HRG (*eHRG*) using various organ samples of Thoroughbred horses and found that *eHRG* mRNA was expressed in the liver. Consequently, the whole sequence of *eHRG* and the amino acid sequence of *eHRG* were identified using the liver samples. Next, equine eHRG in horse serum was purified using a nickel resin and the purified eHRG was detected by Western blot analysis.

When analyzing the sequence of *eHRG*, deletion sites within histidine-rich region (HRR) of *eHRG* was discovered. To elucidate the deletion sites, HRR of *eHRG* was analyzed, and 2 types of deletion (deletion type 1 (D1) and deletion type 2 (D2) containing 45 bp or 90 bp deletion in HRR of *eHRG*) and 5 genotypes of *eHRG* (insertion/insertion (II), ID1, ID2, D1D1 and D1D2) were identified. I examined genomic DNA samples from 987 horses by the PCR method for analyzing frequency of each genotype. The II, ID1, ID2, D1D1 and D1D2 genotype distribution was 24.4%, 45.2%, 3.7%, 23.0% and 3.6%, respectively. The result shows *eHRG* polymorphism contains 5 genotypes. Since divalent cations are involved in physiological functions and immune response, the difference of *eHRG* genotype may affects inflammatory reaction or performance of each horse.

Next, we investigated various effects of eHRG on neutrophil functions, including adhesion, migration, reactive oxygen species (ROS) production and phagocytosis using neutrophils isolated from horses. As a result, the addition of eHRG to the culture diminished suppressed neutrophilic adhesion, migration and ROS production, in contrast, eHRG promoted phagocytic activity. These results indicated that eHRG acts as a dual regulator of neutrophils in horses.

Finally I propose that eHRG may become a novel molecule for diagnosis and treatment of equine SIRS.