



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Adiponectin is partially associated with exosomes in mouse serum [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	PHOONSAWAT, WORRAWALAN
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11541号
Issue Date	2014-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57175
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Worrawalan_Phoonsawat_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（農学） 氏 名 Worrawalan Phoonsawat

審査担当者 主査 教授 川端 潤
 副査 教授 原 博
 副査 准教授 園山 慶（生命科学院）

学位論文題名

Adiponectin is partially associated with exosomes in mouse serum

（マウスの血清においてアディポネクチンの一部はエキソソームに存在する）

本論文は総頁数 63 の英語論文で、図 15 および表 3 を含み、4 章で構成されている。別に参考論文 1 編が添えられている。

エキソソームは、さまざまな細胞が放出する直径 30-120 nm の膜小胞であり、血液、尿、胆汁、乳などの体液中に存在する。さまざまなタンパク、脂質、mRNA、および miRNA を含んでおり、これらを細胞間で輸送することから、エキソソームは細胞間コミュニケーションに関与すると考えられている。培養細胞を用いた先行研究により、脂肪細胞由来のエキソソームが代謝性疾患の発症・進展に関わる細胞間コミュニケーションに一定の役割を果たしていることが示唆されているが、生体内において脂肪細胞が放出するエキソソームの特性や機能については不明の部分が多かった。本論文は、脂肪細胞特異的に発現するタンパク、とりわけアディポネクチン、レプチン、レジスチンのようなアディポサイトカインが血清中に存在する脂肪細胞由来エキソソームのマーカーとなり得るという仮説を立て、それを検証した結果をまとめたものである。

1) マウスの血清エキソソームに存在するアディポネクチンの証明

マウスの血清から超遠心分離法により得たエキソソーム画分をウェスタンブロッティングにより分析した結果、エキソソームのマーカータンパクである CD63 が濃縮されていたので、本法により血清エキソソームが回収できることが示唆された。ウェスタンブロット分析および ELISA の結果、エキソソーム画分にはアディポネクチンが含まれ、レプチンとレジスチンはほとんど含まれないことが示された。また、血清を密度勾配遠心分離に供し、ウェスタンブロット分析を行ったところ、従来知られているエキソソームの密度に相当する密度画分に CD63 およびアディポネクチンが検出された。さらに、超遠心分離後のエキソソーム画分をプロテイナーゼ K 処理することにより、ウェスタンブロッティングによって検出されるアディポネクチンのシグナルが減少し、プロテイナーゼ K および Triton X-100 の同時処理により完全に消失した。以上の結果より、マウスの血清において、アディポネクチンがエキソソームの膜結合タンパクとして存在することが示唆された。

2) 血清エキソソームに存在するアディポネクチンの存在様式と生理機能の関連

血中のアディポネクチンは低分子量（3 量体）、中分子量（6 量体）、および高分子量（12~18 量体）の複合体として存在する。アディポネクチンは代謝性疾患に対する防御作用を発揮することが知られているが、そのような生理機能を担うのは高分子量アディポネクチンであることが先行研究により示されている。本論文において、マウスの血清およびエキソソーム画分を非還元条件下で SDS-PAGE に供し、ウェスタンブロット分析を行った結果、血清においては中分子量アディポネクチンが大部分であったのに対し、エキソソーム画分では高分子量アディポネクチンが大部分であることが示された。また、エキソソーム画分におけるアディポネクチン濃度/総タンパク濃度比が、正常マウスに比較して肥満マウスで低いことが ELISA により示された。以上の結果より、血中でエキソソームに結合したアディポネクチンと遊離のアディポネクチンとは生理機能に違いがある可能性が示唆された。

結論として、マウスの血清においてアディポネクチンの一部がエキソソームに存在することから、アディポネクチンが生体内において脂肪細胞から放出されたエキソソームのマーカーのひとつとなり得ること、およびエキソソームにおいては高分子量アディポネクチンが主体であることから、生理機能を発揮するアディポネクチンは血中においてエキソソームに存在することを提案した。

以上、本論文は、脂肪細胞が特異的に産生するサイトカインであるアディポネクチンの一部が血清エキソソームの膜結合タンパクとして存在することを初めて示し、それによって脂肪細胞由来エキソソームのマーカータンパクとしてアディポネクチンを提案した点、および血清エキソソームに存在することがアディポネクチンの生理機能と関係する可能性を提案した点で、学術上高く評価されるものである。

よって審査員一同は、Worrawalan Phoonsawat が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。