

令和元年5月15日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15409

研究課題名(和文) 生体膜スフィンゴ脂質レベルを制御する鍵酵素による動脈硬化抑制の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism in atheroprotective effects by the enzymes that control membrane sphingolipid levels

研究代表者

石丸 和宏 (ISHIMARU, KAZUHIRO)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：70595446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴ脂質代謝を制御する鍵酵素を全身性に欠損したマウスにおいて、コレステロール食を負荷による動脈硬化病変が有意に増大し、骨髄由来細胞、特にマクロファージに存在する代謝酵素が関与していると考えられた。当該代謝酵素は、動脈硬化を抑制する作用があると考えられる。マクロファージは不要あるいは修飾された脂質を取り込む一方、泡沫細胞に変化し動脈血管を狭窄し、血流障害を来しうる。同細胞における脂質取り込み・分解機能などを中心に解析した所、代謝酵素欠損マウスマクロファージは脂質分解に関与するオートファジー経路が障害されている可能性が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでも全世界で動脈硬化治療薬の開発が行われて来たが、未だ画期的な治療薬は作出されて来なかった。新しい治療薬の開発の為に、新しい観点からの動脈硬化形成機序を明らかにする事が重要である。本研究により、スフィンゴ脂質代謝を制御する鍵酵素が持つ抗動脈硬化作用がオートファジー制御という新しい観点から発揮される事が判明した。これらは今後、新規動脈硬化治療法の開発基盤への有益な情報提供となる。

研究成果の概要(英文)：In mice in which the metabolic enzyme was systematically deleted, atherosclerotic lesions were significantly increased by loading with a cholesterol diet. And, it was thought that the enzyme present in bone marrow-derived cells, particularly macrophages, were strongly involved. This enzyme might have atheroprotective role. After macrophages take up unnecessary or modified lipids, they change to foam cells and deposit in arterial blood vessels followed by blood flow problems. By the analysis of lipid uptake and degradation functions, lipolysis-related autophagic pathways may be mainly impaired in enzyme deleted macrophages.

研究分野：内科系臨床医学

キーワード：動脈硬化 老年医学 スフィンゴ脂質代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)動脈硬化は脂質代謝異常を基盤とし、血管壁の傷害による慢性炎症を伴う内腔狭窄性病変である。主に動脈内膜下組織で活性化したマクロファージ(M ϕ)が酸化した脂質を取り込み泡沫細胞となり、動脈硬化病変は形成される。動脈硬化は種々の合併症により健康長寿を脅かす最大の疾患であり、これからの長寿社会を支える鍵となる疾患である。従来全世界で動脈硬化治療薬の開発が行われたが、未だ画期的な治療薬の作出には至っておらず、基礎疾患である糖尿病・高血圧コレステロール症に対する代償的な治療に留まっている。これら既存治療薬は、臨床研究からも一定の動脈硬化抑制作用を認めているが、そのインパクトは弱く早急な新規治療薬開発が望まれている。

(2)スフィンゴシンキナーゼ(SK)は2つのアイソフォーム SK1,SK2 を持ち、細胞膜に存在するスフィンゴ脂質の一つ、スフィンゴシンより生理活性脂質スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)を合成する鍵酵素である。S1P は生体膜を構成するスフィンゴ脂質の代謝産物であり、細胞膜上に発現している S1P1 から S1P5 までの5種のGタンパク質共役型受容体を介して細胞遊走・分化だけでなく、細胞増殖や血管新生を含む多くの重要なプロセスに関与している。その多機能性から以前より動脈硬化病変形成への関与が強く示唆され、これまで S1P 受容体欠損マウスを用いた病変形成メカニズムの解析が進められていた。

(3)一方 SK は胎生期の発育発達に必須であり、SK1,SK2 両アイソフォームは相補的機能を持ちどちらかの遺伝子がヘテロ接合型であれば正常に発育する事が報告されており、動脈硬化病変形成における SK の両アイソフォームの関与については十分に検討されていなかった。

2. 研究の目的

今回 S1P 合成酵素 SK2 遺伝子を欠損(SK2KO)した動脈硬化モデル(ApoE 欠損)マウスで動脈硬化病変が増悪する、すなわち SK2 が抗動脈硬化作用を有する事を見出した。本研究ではこの SK2 の持つ抗動脈硬化作用を、(1)モデルマウス表現系解析と、この作用を仲介する細胞群の同定、ならびに(2)既報の S1P 受容体を介する機構、S1P 合成機能とは異なる作用機構を明らかにする事を目的とする。

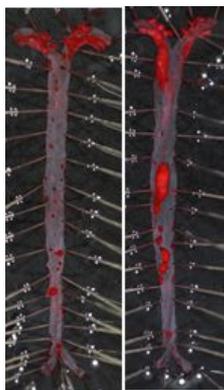
3. 研究の方法

(1)高コレステロール血症を来し自然動脈硬化病変を惹起する ApoE 遺伝子欠損マウスと、SK2 遺伝子を始めとした動脈硬化病変に関与する可能性がある遺伝子改変マウスとの二重・三重交配マウスを作成し、高コレステロール食負荷により動脈硬化病変を作成した。

(2)回収検体(血漿・細胞含む)・組織標本を用いて、蛋白質発現(ウェスタンブロット法)・定量PCR法による mRNA 発現や免疫組織染色法等を用いて、抗動脈硬化作用を仲介する細胞群の同定ならびに表現系を検討した。

4. 研究成果

(1)高コレステロール食により誘導された動脈硬化病変を解析すると、SK2KO マウスで動脈硬化病変の増悪が認められた(図1;未発表)。SK1KO マウスの動脈硬化病変は野生型(WT)と同等であった。SK2KO 群の血漿コレステロール・中性脂肪値、脂質分画解析は、WT 群と差を認めなかった。



WT SK2KO

図1. 高コレステロール食負荷後の大動脈展開標本(オイルレッド O 染色)

SK2KO マウスは WT マウスと比較し動脈硬化病変が増大(未発表)

(2) 既報では SK 阻害剤を用いて血中 S1P 濃度を低下させると、内皮細胞の S1P1 受容体を介した血管バリア機能維持が破綻し、動脈硬化病変は増悪する(Poti F, Atherosclerosis 2015)。本実験系では脂質分画に差を認めなかったため、血漿 S1P 濃度の関与を疑い両群の解析を行った。予想に反して SK2KO マウス群では、血漿 S1P 濃度が2倍近く上昇していた。以上より、既報の S1P1 受容体を介する経路では説明できない、S1P 産生以外の役割を介した、動脈硬化病態形成機構が関与している可能性が示唆された。

(3) SK2 の生体機能について既報を詳細に確認していくと、本来の S1P 合成機能と異なる機能として M ϕ におけるオートファジー経路への関連が報告されている事が分かった(Xiong Y, JBC

2013)。オートファジーはリソソームを中心に細胞構成成分を適切に分解処理し、代謝回転や細胞品質管理を担う細胞内システムである。健全な細胞構成成分だけでなく、酸化ストレスにより傷害されたミトコンドリアやユビキチン化蛋白も処理され、抗炎症性、細胞保護的な働きを持つ。そもそも、骨髄由来の単球から分化した M は、酸化脂質を取り込み泡沫細胞化し動脈硬化病変の形成に関与するが、この泡沫細胞が脂肪滴を分解しコレステロールを細胞外にくみ出す際に、オートファジー経路が関与する事が報告されている(Ouimet M, Cell Metabolism 2011)。これらの既報を元に同動脈硬化モデルマウスの解析を進め、

SK2K0 動脈硬化モデルマウスの大動脈組織では、オートファジー基質である p62 が増加しておりオートファジー経路、特に分解経路が障害されている可能性が高い

SK2K0 骨髄細胞を移植した WT マウスは、WT 骨髄細胞を移植した WT マウスに比べ動脈硬化病変が増悪する事を明らかにした。

(4) 骨髄移植実験の結果より SK2K0 マウス動脈硬化病変形成を担う細胞集団が骨髄由来細胞であると考え、M における SK2 機能の解析を進めた。その結果、

マウスより単離し細胞培養下で行った、酸化 LDL の取り込み、細胞内コレステロールの細胞外へのくみ出し機能は、群間で差を認めない

あらかじめ西洋食負荷を行ったマウスから単離した M を解析すると、SK2K0 群の脂肪含有量は WT 群と比べ有意に増加していた事が明らかになった。

(5)脂質負荷された両群 M の蛋白質発現とそのリン酸化・mRNA 発現を解析した所、SK2K0 群は WT 群と比較しオートファジー誘導(オートファゴソーム形成)経路の減衰が認められず、脂質分解を担うリソソーム内酸性化障害、非特異的蛋白分解能の低下が認められた。すなわち、M の SK2 機能はオートファジー・リソソーム系の分解経路、特にリソソーム機能そのものに関与している事が示唆された。

(6) M に発現している SK の両アイソフォームを解析すると、SK1 に比べて SK2 が優位に発現していることが判明した。もともと、両アイソフォームは相補的な機能を持つため、SK2 欠損による動脈硬化病変が、SK1 の発現増加によって改善する可能性があると考え、SK1 過剰発現マウス(SK1-Tg;以前当研究室で作出。Cardiovasc Res.2010,85;484-93.)との二重交配飼育を行い、その表現系の解析を行った。その結果、SK1 を過剰発現させたマウスとの二重交配マウスでは動脈硬化病変が抑制し、泡沫化マクロファージが改善、そしてリソソーム機能障害が改善した。現在は研究データの統合を完了し、論文投稿し校閲中の段階である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

The class II phosphoinositide 3-kinases PI3K-C2 and PI3K-C2 differentially regulate clathrin-dependent pinocytosis in human vascular endothelial cells.

Aung KT, Yoshioka K, Aki S, Ishimaru K, Takuwa N, Takuwa Y

The journal of physiological sciences : JPS 69(2) 263-280 2019年3月 [査読有り]
doi: 10.1007/s12576-018-0644-2.

Class II PI3Ks and Are Required for Rho-Dependent Uterine Smooth Muscle Contraction and Parturition in Mice.

Sarker MAK, Aki S, Yoshioka K, Kuno K, Okamoto Y, Ishimaru K, Takuwa N, Takuwa Y

Endocrinology 160(1) 235-248 2019年1月 [査読有り]

doi: 10.1210/en.2018-00756.

MTMR4, a phosphoinositide-specific 3'-phosphatase, regulates TFEB activity and the endocytic and autophagic pathways.

Pham HQ, Yoshioka K, Mohri H, Nakata H, Aki S, Ishimaru K, Takuwa N, Takuwa Y

Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms 2018年7月 [査読有り]

doi: 10.1111/gtc.12609.

Sphingosine-1-phosphate receptor-2 facilitates pulmonary fibrosis through potentiating IL-13 pathway in macrophages.

Zhao J, Okamoto Y, Asano Y, Ishimaru K, Aki S, Yoshioka K, Takuwa N, Wada T, Inagaki Y, Takahashi C, Nishiuchi T, Takuwa Y

PLoS one 13(5) e0197604 2018年 [査読有り]

doi: 10.1371/journal.pone.0197604.

iNOS as a Driver of Inflammation and Apoptosis in Mouse Skeletal Muscle after Burn Injury: Possible Involvement of Sirt1 S-Nitrosylation-Mediated Acetylation of p65 NF- κ B

and p53.

Nakazawa H, Chang K, Shinozaki S, Yasukawa T, Ishimaru K, Yasuhara S, Yu YM, Martyn JA, Tompkins RG, Shimokado K, Kaneki M
PloS one 12(1) e0170391 2017年 [査読有り]
doi: 10.1371/journal.pone.0170391.

〔学会発表〕(計6件)

Sphingosine Kinase 2 Inhibits Macrophage Cholesterol Accumulation and Atherosclerosis via Autophagy Stimulation

Kazuhiro Ishimaru, Yoh Takuwa

American Heart Association 2018 Scientific Sessions 2018年11月18日

S1P2によるプレオマイシン誘発肺線維症の増悪機構の検討:肺泡マクロファージの細胞老化制御の関与

多久和典子, 岡本安雄, 石丸和宏, 多久和陽

第28回日本病態生理学会大会 2018年8月5日

Novel indispensable role of and isoforms of class II PI3K for uterine smooth muscle contraction and labor

Azadul Kabir Sarker, Sho Aki, Kazuaki Yoshioka, Koji Kuno, Kazuhiro Ishimaru, Noriko Takuwa, Yoh Takuwa

第54回北陸生殖医学会学術講演会 2018年6月3日

Class II phosphoinositide 3-kinase isoforms PI3K-C2 and PI3K-C2 play essential roles in pinocytosis in vascular endothelial cells

Aung Thuzar Khin, Yoshioka Kazuaki, Aki Sho, Pham Quynh Hoa, Sarker Kabir Azadul, Islam Shahidul, Ishimaru Kazuhiro, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh

第95回日本生理学会大会 2018年3月28日

Myotubularin-related protein 4 (MTMR4), a phosphoinositide 3'-phosphatase, regulates endolysosome integrity and autophagy flux in human lung alveolar epithelial A549 cells

Pham Quynh Hoa, Yoshioka Kazuaki, Azadul Sarker Kabir, Aung Thuzar Khin, Islam Shahidul, Aki Sho, Ishimaru Kazuhiro, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh

第95回日本生理学会大会 2018年3月28日

抗がん剤による臓器障害におけるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)情報伝達系の関与

多久和典子, 石丸和宏, 岡本安雄, 多久和陽

第27回日本病態生理学会大会 2017年8月19日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。