Sphingosine-1-Phosphate,a Platelet-Derived Lysophospholipid Mediator, Negatively Regulates Cellular Rac Activity and Cell Migration in Vascular Smooth Muscle Cells

メタデータ	言語: eng
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 龍, 泰治
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4645

金沢大学十全医学会雑誌　第113巻　第2号　48－51（2004）

【総　説】

第二回　高安賞最優秀賞受賞論文

論　文　「Sphingosine-1-Phosphate, a Platelet-Derived Lysophospholipid Mediator, Negatively Regulates Cellular Rac Activity and Cell Migration in Vascular Smooth Muscle Cells.」

Circulation Research

Vol.90, No.3, Page 325-332　　2002年2月掲載

血小板由来リゾリン脂質メディエータースフィンゴシン-1-リン酸は血管平滑筋細胞において，Rac活性および細胞遊走を負に制御する

龍　泰治（りゅう　やすじ）

研究の背景

スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）は，細胞増殖作用，細胞運動調節作用，細胞分化作用，血管収縮，血管新生作用などの多彩な活性を示す脂質メディエーターとして注目されている[1]（図1）．S1Pは血漿中に約200nM，血清中に500nMの濃度で存在する．1990年初めヒト臍帯静脈内皮細胞をホルボールエステルで刺激することにより発現が誘導される遺伝子として血管内皮分化因子-1（endothelial differentiation gene-1: Edg1）が報告されていた．この遺伝子はそのアミノ酸配列からG蛋白共役型受容体（GPCR）をコードすると考えられた．しかし，そのリガンドは不明であった．一方，筆者の属した研究室では1993年に，やはりGPCRをコードすると考えられた新規遺伝子AGR-16を血管平滑筋よりクローニングしたが，遺伝子データベース上AGR-16（その後Edg5と命名）と唯一高いホモロジーを示したのが上述のEdg1であった．1998年に到り，筆者の研究室を含むいくつかの研究室からEdg1（最近は$S1P_1$と呼称）がS1Pに対する特異的受容体であることが見出されたのを皮切りに相互にホモロジーの高い一群のGPCR（Edgファミリー）がS1P特異的受容体であることが見出された．現在では，S1P特異的GPCRとして，5つのサブタイプ$S1P_1$/Edg1，$S1P_2$/Edg5/AGR16，$S1P_3$/Edg3，$S1P_4$/Edg6，$S1P_5$/Edg8が同定されている．これらのS1P受容体と近縁関係にある受容体群（LPA_1/Edg2，LPA_2/Edg4およびLPA_3/Edg7）はリゾホスファチジン酸（lysophosphatidic acid: LPA）に対する特異的受容体であることが解明されている．

各S1P受容体はサブタイプ特異的に発現分布が異なるが，多くの臓器では複数のS1P受容体が発現している（表1）．ラット，マウスでは$S1P_1$，$S1P_2$，$S1P_3$は全身のほとんどすべての臓器・組織に広範に発現しているが，これとは対照的に$S1P_4$はリンパ系組織および肺に，$S1P_5$は神経系のみに発現が限局している．

外来導入遺伝子の機能解析によく使われるCHO細胞は内因性のS1P受容体の発現が弱いため，親細胞ではS1Pに対する反応はほとんど見られない．外因性のS1P各受容体を遺伝子導入したCHO細胞を用いてS1P受容体遺伝子のシグナル伝達経路を筆者らの研究室では検討した[2]（図2）．$S1P_1$はGiを介して，Ras-ERK（extracellular signal-regulated kinase）の活性化，ホスホリパーゼC（PLC）の活性化，アデニル酸シクラーゼの抑制に共役している．$S1P_3$は，$S1P_1$と同様にGiを介してRas-ERKお

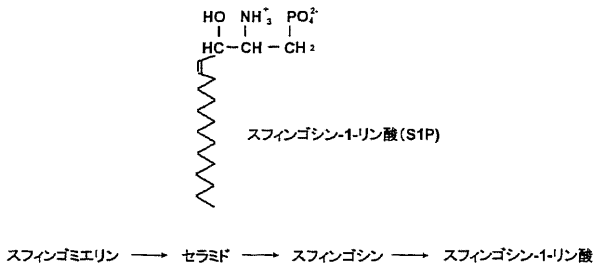

図1．S1Pの構造と生成

表1．Edg受容体ファミリーとその特徴

受容体名	新命名法	発現組織	文　献
S1P受容体			
Edg1	$S1P_1$	広範囲に発現	Hla and Maciag (1990)
Edg3	$S1P_3$	広範囲に発現	Yamaguchi et al. (1995)
Edg5	$S1P_2$	広範囲に発現	Okazaki et al. (1993)
Edg6	$S1P_4$	リンパ組織・肺	Graler at al. (1998)
Edg8	$S1P_5$	神経系	Niedernberg et al. (2002)
LPA受容体			
Edg2	LPA_1	広範囲に発現	Masana et al. (1995)
Edg4	LPA_2	神経系，腎 睾丸，肺	An et al. (1998)
Edg7	LPA_3	睾丸，前立腺， 心，脳，肺，腎	Bandoh et al. (1999)

よびアデニル酸シクラーゼの抑制に共役するほかに，Gqを介してPLCの活性化に，$G_{12/13}$を介してRhoの活性化に共役している．$S1P_2$は，$S1P_3$と同様にGi，Gq，$G_{12/13}$を介してそれぞれRas-ERK，PLCおよびRhoを活性化するが，ERK活性化能を指標として評価するとGiへの共役はほかの2つの受容体に比較して弱い．

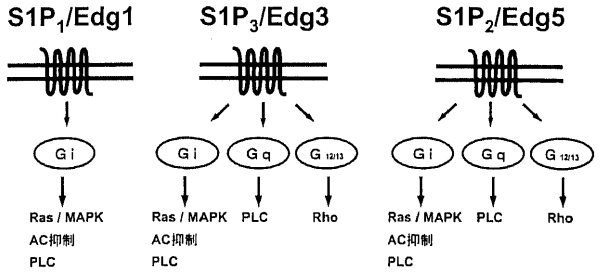

図2．$S1P_1$/Edg1，$S1P_3$/Edg3，$S1P_2$/Edg5の情報伝達経路
PLC：ホスホリパーゼC，AC：アデニル酸シクラーゼ

S1Pの興味深い作用の1つに細胞のタイプ特異的な細胞運動の促進と抑制の二面作用がある．血管内皮細胞では細胞運動の促進[3]を，好中球や悪性黒色腫細胞，血管平滑筋細胞[4]などでは細胞運動抑制効果が報告されていた．我々は，前述の外来遺伝子を導入したCHO細胞を用いて各S1P受容体の細胞遊走におよぼす影響を検討した．細胞遊走の評価はボイデンチャンバー法を用いて行った．ボイデンチャンバーの下槽にのみS1Pを加えS1P単独の細胞遊走効果を観察したところ，上槽の$S1P_1$および$S1P_3$発現細胞はS1Pの濃度依存的に下槽へ遊走した．一方，$S1P_2$発現細胞では，遊走を誘導しなかった．CHO細胞に対する強力な化学走化因子であるインスリン様成長因子-I (IGF-I) を下槽に加えると，遺伝子導入を受けていない親細胞を含めいずれのS1P受容体サブタイプ発現細胞も活発に下槽に遊走した．下槽にS1PとIGF-Iを同時に加えると，$S1P_1$あるいは$S1P_3$発現細胞ではIGF-I単独刺激の場合に比較して，ごく軽度の遊走亢進がみられたが，$S1P_2$発現細胞ではS1Pは濃度依存的にIGF-Iによる遊走を強く抑制した．

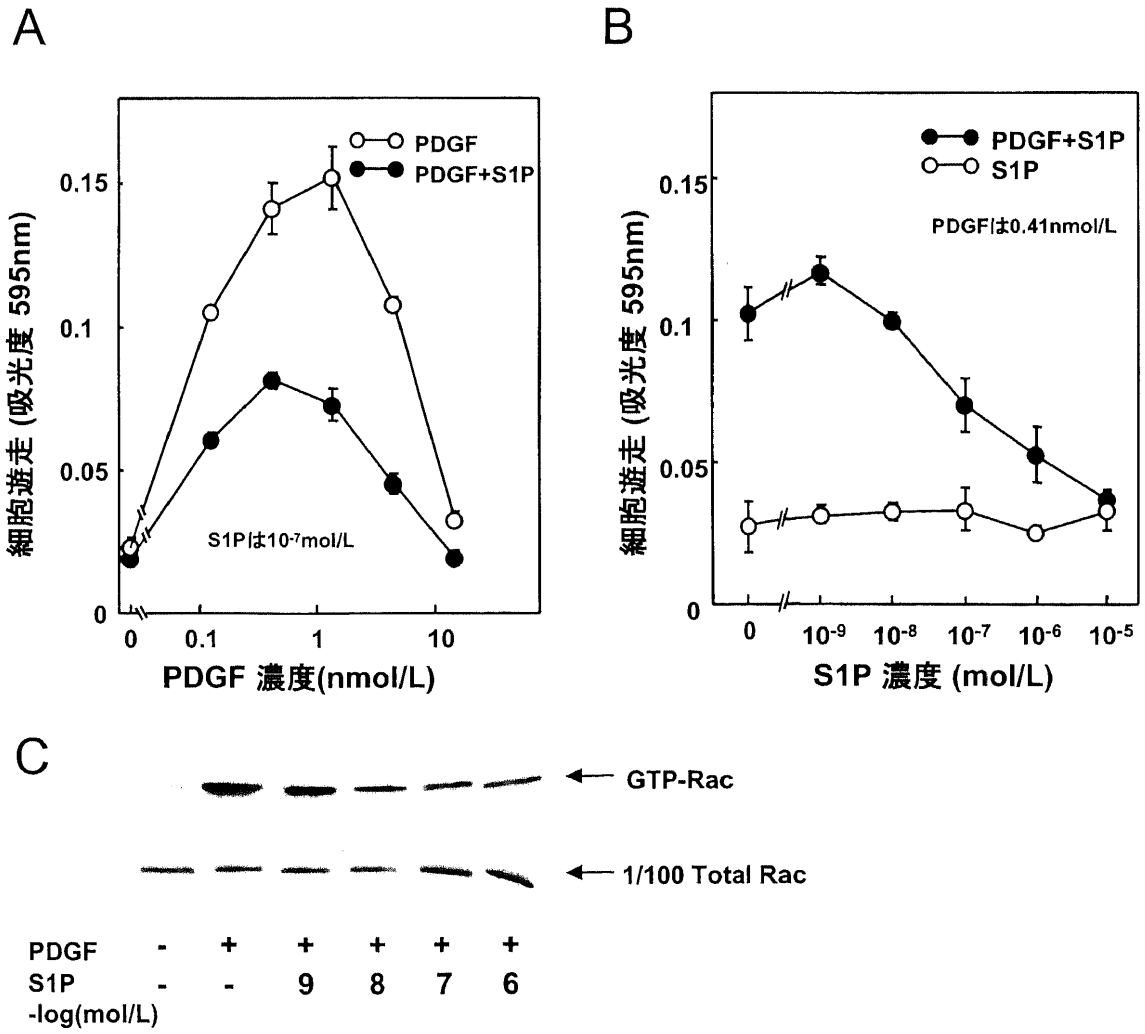

図3．A．PDGF濃度による化学遊走の変化　B．S1P濃度による化学遊走の変化 (PDGF濃度一定)
C．S1P濃度によるRac活性化の変化 (PDGF濃度一定)

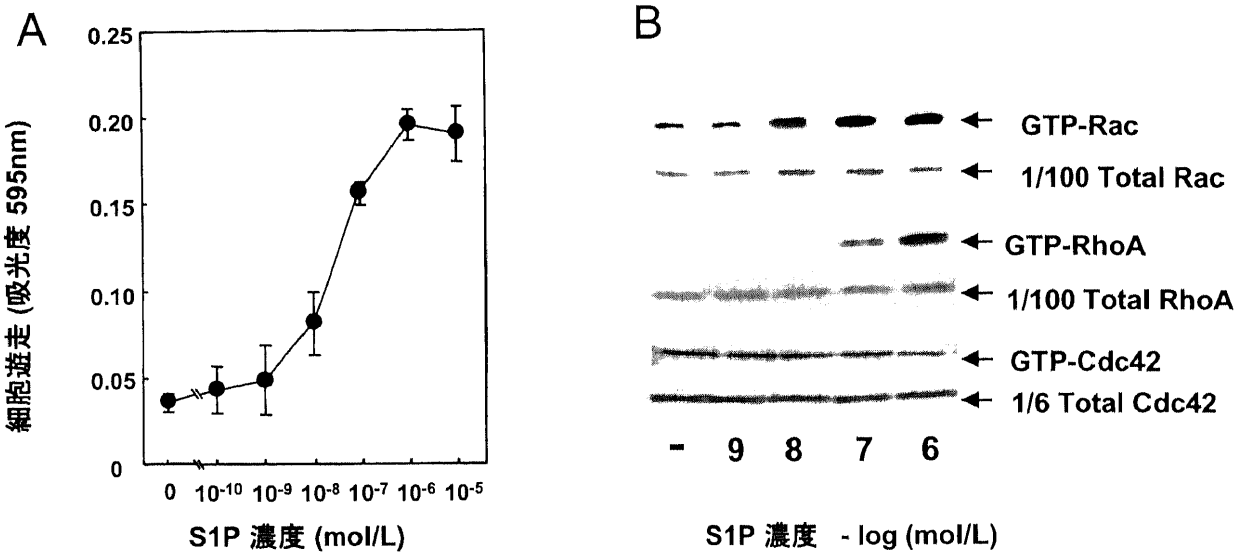

図4．A. S1P濃度による化学遊走の変化　B. S1P濃度によるRac活性化の変化

これまでの研究で，Rhoファミリーに属する低分子量G蛋白質Rho，Rac，Cdc42が細胞運動の調節因子であることが明らかにされており[5]，その中でとくにRacの重要性が指摘されている．IGF-I刺激にて，遺伝子導入を受けていない親細胞を含めいずれのS1P受容体サブタイプ発現細胞でもGTP結合型Rac(活性型）のレベルは増強した．$S1P_1$及び$S1P_3$発現細胞では，S1P刺激で細胞内のGTP結合型Racのレベルは濃度依存的に増強し，その容量反応曲線はS1Pによる細胞遊走の促進のそれと類似していた．一方$S1P_2$発現細胞は，S1P刺激単独でGTP結合型Racレベルをわずかに抑制した．さらに，$S1P_2$発現細胞はIGF-IによるGTP結合型Racレベルの増加をS1Pの濃度依存的に抑制した．このS1PによるRac活性抑制の容量反応曲線もIGF-Iによる細胞遊走のS1Pによる抑制の容量反応曲線とほぼ一致していた．また，Racの優性抑制型変異体N^{17}Racを発現させるとIGF-Iによる細胞遊走や，$S1P_1$及び$S1P_3$受容体を介したS1Pによる遊走は強く抑制された．以上の結果から，$S1P_2$はRac活性を抑制する結果，細胞遊走の抑制をもたらすと考えられた．

S1Pによる血管平滑筋細胞の遊走抑制とそのメカニズム

動脈硬化の発生，進展には持続する高脂血症，糖尿病，高血圧や機械的および酸化ストレスなどの慢性刺激に対する血管壁の内皮細胞，平滑筋細胞の応答ならびに血中由来の白血球細胞による炎症・修復過程が重要である．バルーン拡張術やステント留置術などの経皮的血管形成術は，冠動脈疾患や閉塞性動脈硬化症などに現在広く行われている治療法である．しかし，血管の再狭窄が高率に発生する事は大きな問題となっている．血管形成術により内弾性板と内膜は断裂され，中膜血管平滑筋細胞の内膜への遊走と増殖を引き起こしその結果，新生内膜肥厚が生じる．私は高安賞受賞論文において，血管平滑筋細胞および血管内皮細胞の遊走に及ぼすS1P受容体の働きについて検討した．

S1Pに対する受容体が同定される以前にS1Pが血管平滑筋細胞において細胞運動抑制効果があることが，血管内皮細胞においてS1Pは細胞運動促進効果があることが報告されていたことはすでに述べた．

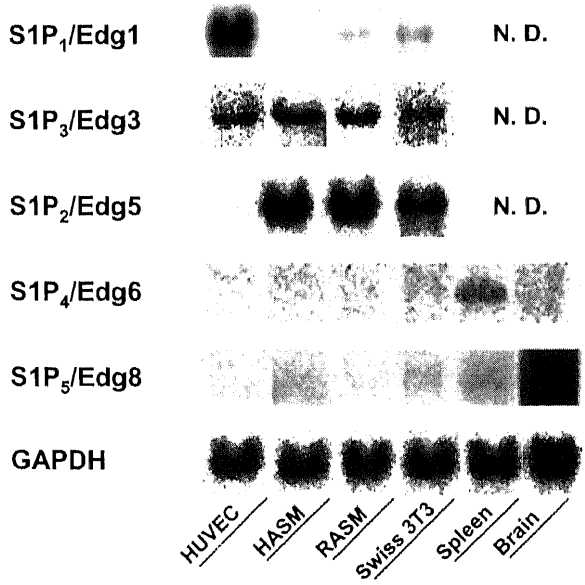

図5．ラット血管平滑筋細胞（RASM），ヒト血管平滑筋細胞（HASM），ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）における各S1P受容体mRNAの発現

図3，4，5はCirculation Research Vol.90, No.3, Page 325-332　2002年2月より許可を得て転載．

血管平滑筋細胞において，S1Pを単独で下層に加えても細胞運動は誘導されなかった．血小板由来成長因子（PDGF）は血管平滑筋細胞において強力な化学走化因子として知られている

が，下槽にPDGFを加えると，平滑筋細胞は活発に下槽に遊走した．下槽にS1PとPDGFを同時に加えるとS1Pは濃度依存的にPDGFによる遊走を強く抑制した（ボイデンチャンバー法，図3A＆B）．

低分子量G蛋白質（分子量は20～30kDa）はシグナル伝達の基本因子の一つで，大きく分けてRas，Rho，Rab，その他のファミリーに分類される．Rhoファミリーはアクチン細胞骨格の再構成を介して細胞の形態や運動を制御していることが知られている．Rhoファミリーのうち，Rhoはストレスファイバーの形成に，Racは細胞膜のラッフリングにCdc42はフィロポデアに関係する．Racについて検討するとPDGFは強力にGTP結合型Racレベルを増加させたが，S1Pは遊走抑制効果と同様の濃度勾配を持ってGTP結合型Racレベルを抑制した(図3C)．つづいて，血管内皮細胞についても同様に検討した．S1Pは単独で濃度依存的に細胞を遊走させ，またGTP結合型Racレベルを増加させた（図4）．Racの優性抑制型変異体N^{17}Racを血管平滑筋細胞，血管内皮細胞に発現させると，血管平滑筋細胞ではPDGFによる化学遊走が，血管内皮細胞ではS1Pによる化学遊走がそれぞれ強く抑制された．Racの抑制性制御が遊走抑制のメカニズムであることが示唆された．

ノーザンブロット解析をしたところ，血管内皮細胞には，$S1P_1$が強く発現し，$S1P_2$の発現はほとんど検出されなかった．一方，血管平滑筋細胞では$S1P_2$が強く発現しているが$S1P_1$の発現は弱い．$S1P_3$はいずれの細胞でも中等度に発現していた(図5)．S1P受容体サブタイプのうち，内因性には発現のほとんど見られない受容体をそれぞれの細胞に遺伝子導入した．血管平滑筋細胞に$S1P_1$を強発現させると，S1Pによる化学遊走抑制効果およびRac抑制効果はかなり減弱した．一方で，血管内皮細胞に$S1P_2$を強発現させるとS1Pによる化学遊走およびRac活性化が抑制された．

以上の結果からは血管平滑筋細胞における細胞運動抑制効果は$S1P_2$の豊富な発現を，血管内皮細胞における細胞運動促進効果は$S1P_1$の豊富な発現をそれぞれ介して，Racを正負いずれかの方向に調節することにより細胞運動を二方向性に制御していることが示された．

おわりに

S1Pによる血管平滑筋細胞の遊走抑制および血管内皮細胞における遊走促進は，Rac活性の抑制もしくは促進と相関しており，異なるS1P受容体を介していることが示唆された．$S1P_2$特異的アゴニストや$S1P_1$特異的アンタゴニストが新生内膜形成や血管新生の抑制に働き，これらの作用を介して，動脈硬化や腫瘍血管新生に対する新たな治療手段となる可能性があり，今後さらなる検討を進めていく必要があると考えられる．

謝　　辞

本研究は血管分子生理（生理学第一）研究室において，それまでの教室での研究成果を土台に行なわれた研究です．指導していただいた血管分子生理教室　多久和 陽教授およびスタッフの先生方に深甚なる感謝を申し上げます．

また，このような研究の場を与えていただいた金沢大学放射線科　松井修教授をはじめ多数のかたがたの励まし，ご指導に深く御礼申し上げます．

文　　献

1）Takuwa Y. Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors. Biochim Biophys Acta 1582: 112-120, 2002

2）Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, Takuwa Y. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. Mol Cell Biol 20: 9247-9261, 2000

3）Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. Cell 99: 301-312, 1999

4）Bornfeldt KE, Graves LM, Rainse EW, Igarashi Y, Wayman G, Yamamura S, Yatomi Y, Sidhu JS, Krebs G, Hakomori S, Ross R. Sphingosine-1-phosphate inhibits PDGF-induced chemotaxis of human arterial smooth muscle cells. J Cell Biol 130: 193-206, 1995

5）Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science 279: 509-514, 1998

Profile

所　属：金沢大学医学部放射線医学教室（現　福井県済生会病院放射線科勤務）
1997年　金沢大学医学部卒業
2004年　金沢大学大学院医学系研究科修了（生理学第一教室にて）
趣　味：ダイビング