

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08264

研究課題名(和文) 硫酸化糖脂質の生成・排泄促進による新たな酸化ストレス抑制作用の解明

研究課題名(英文) Studies on a novel oxidative stress-reducing effect resulting from generation/excretion of sulfated glycolipids

研究代表者

中島 岳郎 (Nakajima, Takero)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：30581011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒトおよびマウスの検討において、硫酸化糖脂質スルファチドの発現量と酸化ストレスレベルの間に負の相関があることを観察してきた。本研究では、スルファチドの発現・代謝に与える酸化ストレスの影響を調べた。培養細胞を過酸化水素で処理したところ、高濃度の処理ではスルファチド発現量が顕著に減少した。このことから、酸化ストレスはスルファチドの発現に直接影響を与えること、また、強いストレス負荷はスルファチド発現を抑制することがわかった。一方、低濃度処理では、スルファチド発現量は増加傾向にあった。この変化は、酸化ストレスに対する防御反応の一環である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In previous studies in human patients and mice, we have found that expression of the sulfated glycolipids sulfatides is negatively correlated with the level of oxidative stress. In the present study, we examined the influence of oxidative stress on the expression and metabolism of sulfatides. We treated cultured cell lines with several concentrations of hydrogen peroxides for 24h. The treatment with high concentration of hydrogen peroxides resulted in significant reduction of sulfatide contents. This indicates that oxidative stress directly affects the expression of sulfatides, and that the powerful stress down-regulates it. On the other hand, treatment with the low concentration tended to increase the content of sulfatides. Since several studies have suggested the importance of sulfatide expression in the growth and survival of cells, this change may be involved in the defensive response against oxidative stress.

研究分野：代謝生化学、脂質生化学

キーワード：スルファチド 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

スルファチドは分子内に硫酸基をもつスフィンゴ糖脂質である。各臓器や血清中に存在し、臓器特異的な作用を示す多機能性分子として知られる。我々は、スルファチドが抗凝固・抗血栓作用を示すことを報告して以来、血清中に存在するスルファチドに関する研究を進めてきた。その過程で、末期腎不全患者や腎障害マウスモデルにおける検討から、血清中のスルファチド含量が腎障害病態において顕著に減少することを観察し、血清スルファチドの低下が腎障害に起因する酸化ストレスの増加と関連することを報告した。また、エタノールを大量投与したマウスにおいて、酸化ストレスレベルの上昇に伴い、血清スルファチド含量が減少することを報告した。血清中のスルファチドは肝臓において産生され、リポタンパク質の構成成分として分泌されたものに由来するため、酸化ストレスは肝臓のスルファチド産生・代謝に影響を与えられた。

一方、我々はマウス体内のスルファチド分布の解析から、胆汁および糞便中に大量のスルファチドが存在することを観察した。また、エタノール大量投与マウスにおいて、胆汁中のスルファチド含量が増加していることを観察した。これらから、肝臓で産生されるスルファチドは胆汁中へも分泌されており、酸化ストレスが亢進した状態においては、胆汁中へのスルファチド排出量が増加する可能性が考えられた。

以上から、肝臓におけるスルファチドの産生および排出は、酸化ストレスレベルに応じて変化することが示唆された。スルファチド代謝と酸化ストレス応答の間には関連性があり、肝臓によるスルファチド産生・排出の亢進は、酸化ストレスに対する生体防御反応の一環である可能性がある。しかし、スルファチド代謝と酸化ストレスの関連性は十分に研究されていない。

## 2. 研究の目的

肝臓由来スルファチドの発現・代謝に与える酸化ストレスの影響を調べることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### マウスを用いた検討

我々は酸化ストレスの他にスルファチド代謝に影響を与える因子として、核内受容体である型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR) を報告した。これらの2つの因子による肝臓スルファチド発現制御がどのような平衡状態にあるのかを調べるため、PPAR の機能的活性化と酸化ストレスレベルの増加を共に生じるマウスモデル (C 型

肝炎ウイルスコア蛋白トランスジェニックマウス) を解析した。また、酸化ストレス増加を呈する別のマウスモデルとして、不飽和脂肪酸欠乏飼料で飼育したマウスを解析した。

### 培養細胞を用いた検討

酸化ストレスがスルファチドの発現および代謝に与える直接的な作用を調べるため、培養細胞を用いた実験を行った。ヒト肝細胞癌由来細胞株である HepG2 細胞、および、マウス肝臓由来細胞株である Hepa1-6 細胞に対して過酸化水素処理を行い、スルファチド発現変化が起こるか否かを検証した。

## 4. 研究成果

### マウスを用いた検討

C 型肝炎ウイルスの構成成分であるコア蛋白を肝細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスは、加齢に伴い肝臓の PPAR 活性化と酸化ストレス増加を生じ、肝発癌に至る。このマウスの肝臓を調べたところ、PPAR の加齢依存的活性化に伴い、スルファチド合成関連酵素の発現誘導が生じ、スルファチド含量が増加することが分かった。また、当該マウスの肝臓から癌部・非癌部を採取し解析した結果、癌部では非癌部よりも PPAR 活性化・スルファチド合成酵素 Cst の発現増加・スルファチド蓄積がより顕著に生じていた。スルファチドは発癌に関与することが報告されていることから、当該マウスにおいて PPAR 活性化は肝臓中スルファチドの合成・蓄積を促進することにより、肝発癌を促す可能性が示唆された。一方、当該マウスにおいて酸化ストレス増加とスルファチド代謝変化の関連性はみられなかった。このことから、スルファチド代謝は酸化ストレス増加よりも PPAR 活性化による影響を強く受けることが示唆された (発表論文)。

不飽和脂肪酸欠乏飼料で飼育したマウスは、PPAR 機能抑制に伴う脂肪酸酸化の低下により、脂肪肝を生じる (発表論文)。このマウスの肝臓では、多くの PPAR 標的遺伝子の発現が抑制されるが、スルファチド合成酵素の発現量に有意な変化はみられなかった。また、肝臓におけるスルファチド発現変化をはっきり捉えることはできなかった。一方、本マウスにおいて、脳および腎臓中のスルファチド発現量が顕著に減少していることが新たに分かった。このマウスの腎臓を調べたところ、スルファチド分解系酵素 (Arsa, Galc) の発現量が増加しており、スルファチド分解が亢進している可能性が示唆された。脳と腎臓は生体内で最も豊富にスルファチドを発現する臓器であり、スルファチドの役割に関する研究が数多く報告され

ている。しかし、スルファチド発現に影響を与える物質はほとんど知られていない。上記の観察結果は、必須栄養素である多価不飽和脂肪酸にスルファチド発現を維持する作用があることを示唆している。スルファチド発現を制御する新たな食事由来成分とその作用機序を明らかにできる可能性があり、調査を続けている。

#### 培養細胞を用いた検討

はじめに、実験に使用する細胞株のスルファチド含量と組成を調べた(図1)。ヒト肝臓由来 HepG2 細胞には約 8 nmol/mg protein のスルファチドが発現しており、このうち約 7 割は SM3 (lactosylceramide sulfate)、残りのほとんどは SM2(gangliosylceramide sulfate)であった。我々がこれまでの実験で対象としてきた SM4s(galactosylceramide sulfate)由来のピークはほとんど検出されなかった。また、各スルファチドのスフィンゴイド塩基組成は d18:1 型が 9 割以上を占めた。HepG2 細胞に多量の SM3 が発現することは過去に報告されており、それと一致する結果が得られた。また、過去の報告では示されなかったスフィンゴイド塩基組成に関する情報が新たに得られた。一方、マウス肝臓由来 Hepa1-6 細胞のスルファチド含量は約 2 nmol/mg protein であり、HepG2 細胞の 1/4 程度の発現量であった。スルファチド分子種は SM2 型が 80%以上を占め、SM3 は約 6%、SM4s は約 5%であった。スフィンゴイド塩基組成は、HepG2 細胞と同様、d18:1 型が 9 割以上を占めた。以上から、HepG2 細胞と Hepa1-6 細胞にスルファチドが十分量発現することを確認できたので、これらの細胞を用いて酸化ストレス負荷試験を行った。

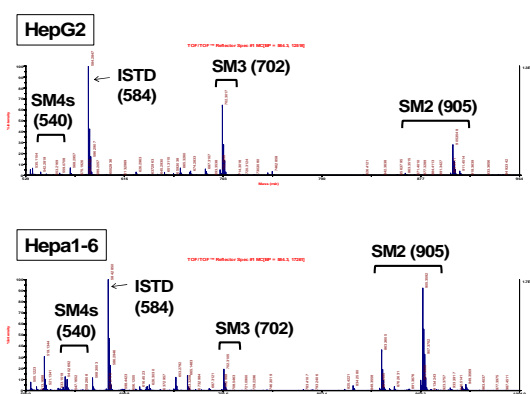


図1. スルファチドの MALDI-MS データ: SM4s, SM3, SM2 は構成糖が異なるスルファチド分子種である。各分子種には、スフィンゴイド塩基組成が異なる分子種が更に存在する。カッコ内は主要な分子種の m/z を示す。ISTD は内部標準を表す。

結果を図2に示した。まず、スルファチド発現量がより多い HepG2 細胞について試験を行った。過酸化水素を最終濃度 0, 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{M}$  で各々含む無血清 DMEM 培地を用いて、約 80% confluency にある細胞を 37  $\pm$  5% CO<sub>2</sub> 存在下で 24 時間培養した後、細胞を回収し、スルファチドを定量した。その結果、スルファチド発現量は過酸化水素 低濃度域 (1-10  $\mu\text{M}$ ) で微増し、高濃度域 (100  $\mu\text{M}$ ) において顕著に低下することが分かった。最高濃度 1000  $\mu\text{M}$  では 100  $\mu\text{M}$  に比べて増加傾向にあった。続いて、同様の実験を Hepa1-6 細胞に対して行った。Hepa1-6 細胞では、過酸化水素 低濃度域 (1-10  $\mu\text{M}$ ) に変化はみられなかったが、高濃度域 (100  $\mu\text{M}$ ) では HepG2 細胞と同様に顕著な低下がみられた。過酸化水素 1000  $\mu\text{M}$  の処理ではほぼ全ての細胞が死滅し、細胞を回収することができなかった。以上から、スルファチド発現量は酸化ストレスの影響を直接的に受けること、また、強い酸化ストレス負荷を受けた場合、スルファチド発現量は顕著に減少することが分かった。

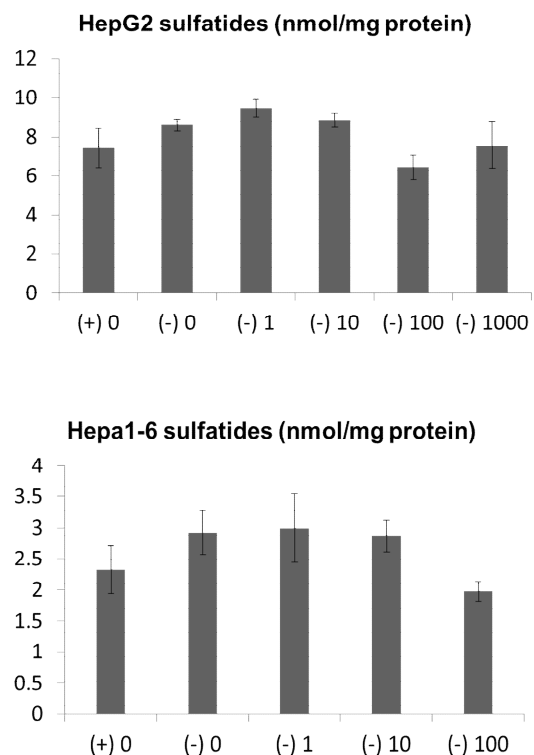


図2. 過酸化水素処理によるスルファチド発現量の変化: (+)は FBS(+)DMEM 培地、(-)は FBS(-)DMEM 培地で処理したサンプルを示す。数字は過酸化水素の処理濃度を表す。各実験条件において、24 時間培養した細胞を分析した。過酸化水素 100  $\mu\text{M}$  で処理したサンプル ((-) 100) では、コントロール ((-) 0) に比べて有意に減少していた ( $P < 0.05$  by ANOVA-Dunnett)。

上記の検討から、酸化ストレスがスルファチドの発現・代謝の制御に直接的に関与する可能性が示された。この点をさらに追及するため、過酸化水素負荷に伴うスルファチド発現変化の経時的解析、今回の実験系と異なるストレス強度におけるスルファチド発現変化の有無の検討、抗酸化剤併用処理下での検討、および、スルファチド代謝関連因子の発現・機能変化の調査などを進めている。これらの結果に基づき、酸化ストレス刺激に反応してスルファチド発現量が変動する分子メカニズムを明らかにしたいと考えている。また、酸化ストレスに対するスルファチド発現変化の生理的意義を明らかにするための試みとして、スルファチドを欠失させた細胞と過剰発現させた細胞などを作製し、ストレス刺激に対する細胞応答の違いを検証したいと考えている。さらに、本研究では、HepG2細胞とHepa1-6細胞の間にスルファチド分子種の著しい違いを認めた。Hepa1-6細胞については、マウス肝臓のスルファチド分子種組成と大きく異なっていた(マウス肝臓の主な分子種はSM4sである)。これらの組成の違いが、細胞の状態・成長・機能にどのように影響を与えるのかということについても、今後検討を行いたい。

#### <総括>

本研究では、肝臓由来スルファチドの発現・代謝に与える酸化ストレスの影響を調べた。肝細胞由来培養細胞株を用いた検討において、高濃度の過酸化水素処理はスルファチド発現量を顕著に減少させた。このことから、酸化ストレスはスルファチドの発現に直接影響を与えること、また、強いストレス負荷によりスルファチド発現が抑制されることがわかった。一方、低濃度の過酸化水素処理では、スルファチド発現量は増加傾向にあった。この点に関して、がん細胞を用いた過去の研究では、スルファチドが細胞の成長・生存に重要な役割を担うことが示されている。このことから、生理的環境で生じるような比較的低いレベルの酸化ストレス刺激に対しては、細胞はスルファチドの発現を増強し、細胞機能を強化する方向に応答している可能性が考えられる。酸化ストレスに対するスルファチド発現変化が実際にどのような生理的意義をもつのかについては、今後詳細な検討が必要である。このほか、マウスを用いた解析において、肝臓スルファチドの発現制御に関してPPARの優位性を観察した。また、スルファチド発現を調節する新たな食事由来成分を特定した。

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計5件)

Nakajima T, Yang Y, Lu Y, Kamijo Y, Yamada Y, Nakamura K, Koyama M, Yamaguchi S, Sugiyama E, Tanaka N,

Aoyama T. Decreased fatty acid -oxidation is the main cause of fatty liver induced by polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *Tohoku J Exp Med* 242(3): 229-239, 2017. (査読有)  
Tian Y, Yang Y, Zhang X, Nakajima T, Tanaka N, Sugiyama E, Kamijo Y, Lu Y, Moriya K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. Age-dependent PPAR activation induces hepatic sulfatide accumulation in transgenic mice carrying the hepatitis C virus core gene. *Glycoconj J* 33(6): 927-936, 2016. (査読有)  
DOI: 10.1007/s10719-016-9703-1

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

中嶋 岳郎 (NAKAJIMA, Takero)  
信州大学・学術研究院医学系・助教  
研究者番号: 30581011

##### (2)研究分担者

田中 直樹 (TANAKA, Naoki)  
信州大学・学術研究院医学系・准教授  
研究者番号: 80419374

##### (3)連携研究者

青山 俊文 (AOYAMA, Toshifumi)  
信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号: 50231105

上條 祐司 (KAMIJO, Yuji)  
信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・准教授  
研究者番号: 50377636

中村 浩蔵 (NAKAMURA, Kozo)  
信州大学・学術研究院農学系・准教授  
研究者番号: 20345763