

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590521
 研究課題名（和文） 冠動脈疾患の新しいバイオマーカーとしてのリポ蛋白中リゾリン脂質バランス変化
 研究課題名（英文） The change of lysophospholipid balance in the lipoprotein is a new biomarker for the coronary artery disease.
 研究代表者
 桑原 敦志（KUWABARA ATSUSHI）
 群馬大学・医学部・助教
 研究者番号：90323344

研究成果の概要：冠動脈疾患患者の LDL 中に含まれるスフィンゴシン 1-リン酸(S1P)とリゾホスファチジン酸(LPA)の量を測定し、また、LDL による血管平滑筋細胞の遊走反応を調べ、脂質分子バランスと平滑筋細胞の遊走反応との関係を検討した。基礎的検討において、LPA は LPA1 受容体を介して血管平滑筋細胞の遊走活性を促進し、S1P は S1P2 受容体を介して血管平滑筋細胞の遊走活性を抑制することを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	660,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：スフィンゴシン 1 リン酸、リゾホスファチジン酸、リポ蛋白、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質の代謝産物であるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は血中では高密度リポ蛋白 (HDL) に高濃度存在し HDL コレステロール量と S1P 量に正の相関があること、内皮細胞の障害保護、遊走、アポトーシスの抑制、接着分子発現抑制、血管平滑筋細胞の遊走抑制などの抗動脈硬化作用は HDL 中の S1P を介していることを明らかにしてきた。即ち、従来知られていた HDL の抗動脈硬化作用の少なくとも一部は S1P を介していることが示された。しかし、低密度リポ蛋白 (LDL) 中にも HDL 中ほどではないが S1P は存在している。LDL が酸化されると S1P 含量は減少するが、

この事実だけで、LDL、酸化 LDL が何故、動脈硬化促進的に作用するのかを説明することは難しい。ところで、S1P に構造の類似したリゾホスファチジン酸 (LPA) は EDG-受容体ファミリーのリガンドであるが S1P とは異なった受容体に結合する。血管系では平滑筋細胞に発現し、細胞増殖、細胞遊走の亢進と動脈硬化に対しては促進的に作用する。LPA の血中分布を測定したところ LDL に比較的多く存在し、LDL の酸化に伴い著明に増加することが判明した。従って、LDL 中には LPA の方が S1P より多く存在し、LDL が酸化されるとこの傾向は顕著になり LPA が S1P より圧倒的に多くなる。これらの知見は LPA と S1P の

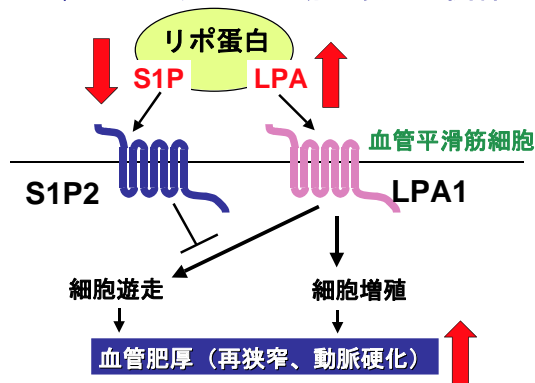
バランスがリポ蛋白の抗動脈硬化性、動脈硬化促進性を決定しており、LPA の S1P に対する割合が増加すると動脈硬化に対して促進的になることを示唆している。

ヒト冠動脈平滑筋細胞の遊走反応は動脈硬化症、血管形成術後再狭窄時の内膜肥厚に伴う特徴的な細胞応答である。LDL は細胞遊走促進、HDL は遊走抑制を起し、従来、指摘されているリポ蛋白の病態における作用と一致する。我々は既に、LPA は LDL と同様に遊走促進、S1P は HDL と同様に遊走抑制を起すことを見出している。

2. 研究の目的

リポ蛋白中の S1P と LPA バランスが動脈硬化症をともなう冠動脈疾患の新しいバイオマーカーとなる可能性について解析する。本研究では LPA, S1P の相反する作用の結果が反映されるこの遊走反応を調べることでリポ蛋白の血管病リスクに対するバロメーターとする。従って、各個体から LDL を調製し、LDL による平滑筋細胞の遊走反応と LPA, S1P 濃度比の関係を測定することをできるだけ多数の個体で調べ、脂質分子バランスが平滑筋細胞の遊走反応（強力な細胞遊走活性を有する PDGF 有無）と相関することを証明することが目的である。

S1P/LPA バランスと動脈硬化の関係



3. 研究の方法

研究データ解析までの流れ

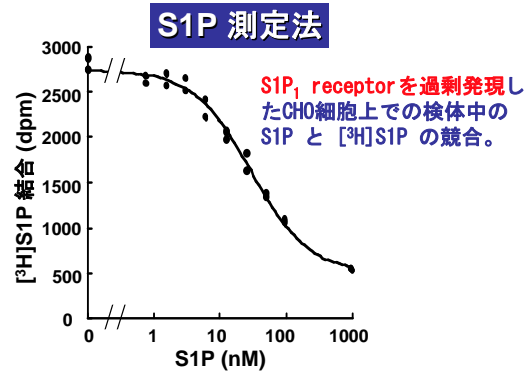
- (1) 血液検体を集め血漿として冷凍保存。
- (2) 検体からリポ蛋白の分離、透析。
- (3) 脂質抽出。S1P、LPA の測定。
- (4) 血管平滑筋細胞での遊走活性。

(1)について：動脈硬化が疑われる急性心筋梗塞患者、労作性狭心症患者や高脂血症、糖尿病患者からの検体である。EDTA またはクエン酸入り採血管を用い、血小板の活性化による凝固を抑制し、血漿を採取した。

(2)について：各リポ蛋白の密度勾配遠心法による分離と脱塩のための透析。比重液を

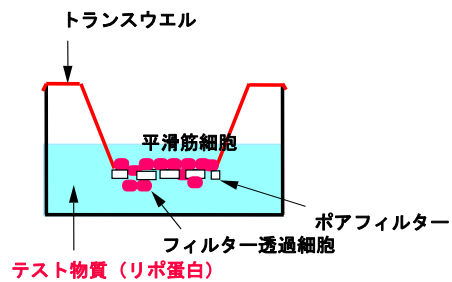
VLDL 用、LDL 用、HDL 用の 3 種類用意し、80 万 g の超遠心機で分離。その後 24 時間の透析を行った。

(3)について：S1P 受容体、LPA 受容体発現細胞を用いた各脂質濃度の測定。



(4)について：ボイデンチャンバー法による細胞遊走活性測定。

細胞遊走法



下層にテスト物質を入れておきポアフィルターを通過する細胞をカウントする。

本研究ではヒト血液中の S1P、LPA 濃度を測定するため、血液を用いたが、この検体の入手に当たっては、インフォームドコンセントをとり、以後の解析に供した。

4. 研究成果

研究方法は理論的には問題がないが、LDL を調製直後に、これら一連の応答実験を行う必要があり、各個人から採血、リポ蛋白分離、透析 (24 h)、アッセイ (24 h) を一定のスピードでおこなう必要がある。更に、細胞遊走のための細胞をたえず準備しておく必要がある。従って、実験対象者が一人しかいない場合、この一連の実験のために膨大な労力をとる必要がある。そこで本実験に先立ち、調製直後の LDL から保存可能な LPA、S1P 画分を調製した後にこれらの一連の実験を行うことでも同様な結果がでることをまず確

認した。LDL 画分の凍結融解の繰り返しはリポ蛋白の破壊が起こるため行わないことがわかった。この結果、検体の採血、リポ蛋白分離、透析 (24h) 後、LPA、S1P 画分を調製した後、細胞の実験まで保存が可能となり、一度に多量の検体の処理が可能になった。

基礎的実験を進めていく中で、LDL はヒト冠動脈平滑筋細胞の遊走を促進することが判明した。LDL 中に含まれる LPA により同様の作用が起こること、また、百日咳毒素、LPA 受容体のアンタゴニスト Ki16425、LPA(1) 受容体に対する siRNA により LDL による細胞遊走が抑制されることがわかった。HDL では細胞遊走は見られず、LDL は HDL に含まれるより高濃度の LPA を含んでいた。

HDL は LDL に比べ 4 倍量の S1P を含んでおり、LPA や PDGF による細胞遊走を阻害した。HDL 中の S1P によると考えられるこの遊走抑制作用は S1P(2) 受容体に対する siRNA で解除された。一方、モノグリセリドリパーゼによる LDL 中の LPA の減少や Ki16425 による LPA 受容体の拮抗は LDL が PDGF による細胞遊走を阻害することをもたらした。

LPA/LPA(1) 受容体と S1P/S1P(2) 受容体を介する細胞遊走促進または抑制効果はそれぞれ LDL と HDL の作用に相当する。したがって、リポ蛋白中の LPA と S1P の濃度バランスだけでなく、LPA(1) 受容体と S1P(2) 受容体間のシグナル強度も冠動脈平滑筋細胞の遊走の制御には重要であると考えられた。

臨床的には十数例の冠動脈疾患患者で動脈硬化のある患者の血液から LDL、HDL を採取し、細胞遊走実験を行い、LDL 中の S1P、LPA 濃度のバランスで細胞遊走に変化の見られることを確認したが、各受容体へのシグナル強度も考慮する必要があると思われた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

①LPA1 receptors mediate stimulation, whereas LPA2 receptors mediate inhibition, of migration of pancreatic cancer cells in response to lysophosphatidic acid and malignant ascites.

Komachi M, Tomura H, Malchinkhuu E, Tobo M, Mogi C, Yamada T, Kimura T, Kuwabara A, Ohta H, Im DS, Kurose H, Takeyoshi I, Sato K, Okajima F.

Carcinogenesis. 2009 Mar;30(3):457-65. (査読有)

②Induction of scavenger receptor class B type I is critical for simvastatin enhancement of high-density lipoprotein-induced anti-inflammatory actions in endothelial cells.

Kimura T, Mogi C, Tomura H, Kuwabara A, Im DS, Sato K, Kurose H, Murakami M, Okajima F.

J Immunol. 2008 Nov 15;181(10):7332-40. (査読有)

③Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes.

Sato K, Malchinkhuu E, Horiuchi Y, Mogi C, Tomura H, Tosaka M, Yoshimoto Y, Kuwabara A, Okajima F.

J Neurochem. 2007 Oct 11;103(6):2610-19. (査読有)

④HDL-like lipoproteins in cerebrospinal fluid affect neural cell activity through lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate.

Sato K, Malchinkhuu E, Horiuchi Y, Mogi C, Tomura H, Tosaka M, Yoshimoto Y, Kuwabara A, Okajima F.

Biochem Biophys Res Commun. 2007 Aug 3;359(3):649-54. (査読有)

⑤Role of lipoprotein-associated lysophospholipids in migratory activity of coronary artery smooth muscle cells.

Damirin A, Tomura H, Komachi M, Liu JP, Mogi C, Tobo M, Wang JQ, Kimura T, Kuwabara A, Yamazaki Y, Ohta H, Im DS, Sato K, Okajima F.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 May;292(5):H2513-22. (査読有)

⑥Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells.

Kimura T, Tomura H, Mogi C, Kuwabara A, Damirin A, Ishizuka T, Sekiguchi A, Ishiwara M, Im DS, Sato K, Murakami M, Okajima F.

J Biol Chem. 2006 Dec 8;281(49):37457-67. (査読有)

⑦Sphingosine 1-phosphate receptors mediate stimulatory and inhibitory signalings for expression of adhesion molecules in endothelial cells.

Kimura T, Tomura H, Mogi C, Kuwabara A, Ishiwara M, Shibasawa K, Sato K, Ohwada S, Im DS, Kurose H, Ishizuka T, Murakami M, Okajima F.

Cell Signal. 2006
Jun;18(6):841-50. (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 敦志 (KUWABARA ATSUSHI)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号：90323344

(2) 研究分担者

村上 正巳 (MURAKAMI MASAMI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30241871

岡島 史和 (OKAJIMA FUMIKAZU)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号：30142748

(3) 連携研究者