

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月17日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591310

研究課題名（和文） 小児病態における細胞内脂質輸送の研究

研究課題名（英文） Studies for lipid transports in pathogenesis of child diseases.

研究代表者

高橋 勉（TAKAHASHI TSUTOMU）

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20270845

研究成果の概要（和文）：細胞内脂質スフィンゴミエリン/コレステロール輸送に関わる2因子、1）酸性スフィンゴミエリナーゼ（Acid sphingomyelinase; ASM）、2）NPC1/NPC2蛋白、に関して小児病態の研究を行った。小児疾患として新生児虚血性低酸素性脳障害、未熟児慢性肺障害、遺伝性脂質輸送障害を対象として、ラットモデルと培養細胞を使用して研究を行った。新生児虚血性低酸素性脳障害においてASM活性化が病態に関与していることを示した。未熟児慢性肺障害に関わる肺胞マクロファージのLPSによる活性化にASM活性化が関与していることを示した。LDLコレステロール由来コレステロール輸送に関して、NPC1機能低下状態でASM活性量がコレステロール輸送量調節に関与することを示した。すなわち、ASM活性の活性化効果のある酪酸を用いた実験で、ASM活性を酪酸で上昇させNPC1機能低下状態でライソゾーム/後期エンドゾームに蓄積したコレステロールを減少させることに成功した。今後、細胞内脂質輸送調節機序として研究を進めていきたい。

研究成果の概要（英文）：Niemann-Pick disease is a group of disorders characterized by the intracellular accumulation of sphingomyelin and cholesterol, composed of types A/B and type C. Acid sphingomyelinase (ASM) is a lysosomal enzyme to hydrolyze sphingomyelin into ceramide and phosphocholine, deficiency of which causes Niemann-Pick disease type A/B. Recently, ASM has been known as an enzyme to play a critical role in many cellular functions. NPC1, a membrane protein residing in late endosome and lysosome, and NPC2, a lysosomal secretory protein, coordinate in the transport of cholesterol, which enters into lysosome by the LDL receptor pathway, into the cytosol. Mutations in the gene of NPC1 or NPC2 cause Niemann-Pick type C. In our studies, we suggested that ASM play roles in the pathogenesises of ischemic-hypoxic brain damage and chronic lung disease in premature neonate, using 3-year-old rat conditioned with ischemic-hypoxic state and cultured cells of alveolar macrophage from rat. The results suggest the possible therapy through suppression of ASM activation in the diseases of children. In addition, our studies showed that ASM enzyme activity has some effect on the transport of cholesterol via NPC1/NPC2 system in lysosome, suggesting the relation of ASM with intracellular cholesterol metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：酸性スフィンゴミエリナーゼ・NPC1・新生児虚血性低酸素性脳障害・未熟児慢性肺障害

1. 研究開始当初の背景

ニーマンピック病はスフィンゴミエリン/コレステロール蓄積疾患として知られ、我々も含めた多くの研究者らにより原因蛋白が同定された。酸性スフィンゴミエリナーゼ (Acid sphingomyelinase; ASM) はライソゾーム水解酵素で、その欠損ではニーマンピック病 A/B 型を発症させるが、生体においてセラミドを介したシグナル伝達を通じて多くの細胞機能に関与していることが明らかになってきた。NPC1/NPC2 は後期エンドゾーム/ライソゾームに存在する蛋白で、その欠損ではニーマンピック病 C 型を発症させ、LDL 由来コレステロールの細胞内輸送の重要な蛋白であることが解明された。NPC1/NPC2 に関して、コレステロールの細胞内輸送の重要な因子であることから生体内の種々の役割を持つことから考えられている。ASM に関しては酸化ストレス、炎症などの key factor である沢山の報告がなされ、細胞機能上の重要な酵素としての役割が確立してきたが、いくつかの小児病態にも関与している可能性が高いと考えられる。また、ASM、NPC1/NPC2 に関してはコレステロールを中心とする脂質代謝との関わりの解明が今度の課題であり、多くの研究者が注目している。

2. 研究の目的

新生児虚血性低酸素性脳障害および未熟児慢性肺障害の病態に関して、1) 組織障害と ASM 活性化の関与を明らかにする、2) ASM 活性化を抑制する薬剤の組織障害に対する効果を明らかにする、の 2 点に関して動物モデルを用いて明らかにすること。また、ASM と NPC1/NPC2 の細胞内コレステロール輸送に関する相互関係を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

新生児虚血性低酸素性脳障害に関しては、片側頸動脈結紮及び低酸素暴露により仔ラットモデルを作成し、障害脳組織に関して ASM 酵素活性及び蛋白量の検討を行った。障害脳組織に関しては、免疫組織学的な方法でネクローシス、アポトーシス等を確認しモデルの妥当性を確認した。その組織と正常組織に関して、ASM 活性および蛋白量を比較検討した。虚血性低酸素性脳障害の脳障害を軽減する薬剤としてアセトアミノフェン等を加え、組織障害の程度を検討し、ASM 活性、ASM 蛋白量の検討を付け加えた。以上から、虚血性低酸素性脳障害の発症機構における ASM の役割を検討した。

未熟児慢性肺障害モデルは妊娠ラットに LPS 腹腔内投与を行い得られた仔ラットの肺に関して ASM 酵素活性及び蛋白量の検討を行った。さらに、ラット肺胞マクロファージの培養細胞を用いて LPS 刺激下での ASM 酵素活性及び蛋白量の検討を行った。以上で得られた結果と、ASM 活性抑制剤を加えて同様の検討を行い、各疾患の病態と ASM 活性の関係を調べた。

NPC1/NPC2 異常で観察される細胞内コレステロール蓄積に関して ASM 活性刺激により ASM 活性することでのコレステロール蓄積量の変化を調べた。以上から脂質輸送に関する ASM と NPC1/NPC2 の関係を検討した。

4. 研究成果

新生児虚血性低酸素性脳障害モデル障害部位においては ASM の活性化が酵素学的に証明され ASM は虚血性低酸素性脳障害の発症機序に関わっていることを示した。さらに、虚血性低酸素性脳障害の組織障害軽減薬であるアセトアミノフェンを使用した場合に、ASM 活性化の程度に変化が見られ、障害の程度との関係が観察された。ASM 活性抑制剤として幾つかの薬剤が知られているが、虚血性低酸素性脳障害に対する治療効果が期待され今後の検討課題となった。

未熟児慢性肺障害モデルとして妊娠ラットに LPS 腹腔内投与を行い得られた仔ラットの肺障害を使用する予定であった。しかし、文献等でみられる肺障害が得られなかった。そこで未熟児慢性肺障害に関わる肺胞マクロファージの培養細胞を用いて、LPS による活性化に ASM 活性化が関与していることを示した。ASM 抑制剤の効果の検討は今後お課題となった。

LDL コレステロール由来コレステロール輸送に関して、NPC1 機能低下状態で ASM 活性量がコレステロール輸送量調節に関与することを示した。すなわち、ASM 活性の活性化効果のある酪酸を用いた実験で、ASM 活性を酪酸で上昇させ NPC1 機能低下状態でライソゾーム/後期エンドゾームに蓄積したコレステロールを減少させることに成功した。今後、細胞内脂質輸送調節機序として研究を進めて行きたい。

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 4 件)

- ①Sato, Y., Ishida-Nakajima, W., Kawamura, M., Miura, S., Oguma, R., Arai, H., Takahashi, T. Hypoxia-ischemia induces hypo-phosphorylation of collapsing response mediator protein 2 in a neonatal rat model of periventricular leukomalacia (2011) *Brain Res*, 1386, 165-174. 査読有
- ②Sato, S., Ishida-Najima, W., Ishida, A., Kawamura, M., Miura S., Ono, K., Inagaki, N., Takada, G., Takahashi, T. Assessment of a new piezoelectric transducer sencer for noninvasive cardiorespiratory monitoring of newborn infants in the NICU (2010) *Neonatology*, 98, 179-190. 査読有
- ③Takahashi, I., Yamada, Y., Kadowaki, H., Horikoshi, M., Kadowaki, T., Narita, T., Tsuchida, S., Noguchi, A., Koizumi, A., Takahashi, T. Phenotypical variety of insulin resistance in a family with a novel mutation of the insulin receptor gene (2010) *Endocr J.*, 57, 509-516. 査読有
- ④Miura, S., Ishida, N.W., Ishida, A., Kawamura, M., Ohmura, A., Oguma, R., Sato, Y., Takahashi, T. Ascorbic acid protects the newborn rat brain from hypoxic-ischemia (2009) *Brain Dev*, 31, 307-317. 査読有

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 勉 (TAKAHASHI TSUTOMU)
秋田大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20270845

(2) 研究分担者

野口 篤子 (NOGUCHI ATSUKO)
秋田大学・医学部・助教
研究者番号：70400497