

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590106

研究課題名(和文)セラミド・アラキドン酸代謝制御物質の創出と肺疾患への応用

研究課題名(英文)Development of reagents regulating metabolism of ceramide and arachidonic acid and its application to lung disorder

研究代表者

村山 俊彦 (MURAYAMA, Toshihiko)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90174317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、セラミド・アラキドン酸代謝に関して1)TNF α によるラクトシルセラミド生成を介したcytosolic PLA2 α (cPLA2)活性化の解析、2)cPLA2阻害活性を有する新規合成セラミド誘導体の創出、3)チロシンキナーゼc-Srcによるセラミド分解酵素セラミダーゼ活性化の解析、4)細胞内コレステロールとスフィンゴ脂質の相互作用の解析、5)新規ゴルジ複合体マーカーとしてのセラミド誘導体の創出を行った。肺線維症に関して6)TGF β 刺激ヒト肺線維芽細胞でのS1Pによる二重支配、7)免疫抑制薬シクロスポリンによる線維化抑制を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, the following data were obtained: 1) activation of cPLA2 α mediated by lactosylceramide in TNF α -stimulated cells, 2) development of new ceramide analogs inhibiting cPLA2 α activity, 3) activation of alkaline ceramidase by c-Src, 4) an interaction between cellular cholesterol and ceramide metabolites.

In addition, we showed 5) dual regulation of TGF β -induced fibrosis by S1P: stimulation by S1P3 receptor or activation and inhibition by S1P1 receptor activation, and 6) an inhibitory effect of cyclosporin on TGF β -induced fibrosis in human lung fibroblasts.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学，生物系薬学

キーワード：セラミド アラキドン酸 肺線維症

1. 研究開始当初の背景

アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (COX) を介してプロスタノイドが生成される。この代謝系の異常は炎症性疾患をはじめとして癌など各種の疾患、病態に関与している。私たちはアラキドン酸放出の主要な酵素である細胞質 α 型ホスホリパーゼ A 2 (cPLA2 α) の活性調節機構の研究を進め、内在性の脂質であるスフィンゴシン、スフィンゴミエリン、セラミド - 1 - リン酸など一群のスフィンゴ脂質が cPLA2 α 活性制御分子として機能していることを見出した。一方、私たちは cPLA2 α 活性やアラキドン酸代謝に作用する低分子化合物が各種の炎症性疾患の治療候補薬になると考え、有機合成化学者を連携研究者として新規の化合物の開発を進めてきたところ、セラミド・セラミド - 1 - リン酸誘導体の中に選択的に cPLA2 α 阻害活性を示す化合物を見出した。そこで本研究ではこれまでに得られた成果をさらに展開し、新しいより有効なタイプのセラミド類似性のアラキドン酸代謝制御物質の創出を計画した。肺線維症、気道過敏症、肺がんなどの肺疾患ではアラキドン酸・プロスタノイド系の関与が指摘されている。そこで肺細胞や肺がん細胞などを用いて、スフィンゴ脂質によるアラキドン酸・プロスタノイド系の制御の詳細や合成スフィンゴ脂質誘導体の薬理作用の解析を行うこととした。

2. 研究の目的

(1) 多数のセラミド・セラミド - 1 - リン酸誘導体を化学合成しその中から cPLA2 α に作用する化合物をスクリーニングし、得られた情報をさらに解析しより有効な誘導体の作出を行う。

(2) セラミド・セラミド - 1 - リン酸誘導体は、セラミド代謝にかかわる多くの酵素に対しても作用することが想定される。そこでセラミド分解酵素セラミダーゼ、スフィンゴミエリン合成酵素、セラミドキナーゼなどの酵素活性に対する新規化合物の作用を解析する。

(3) 肺線維化、肺がんなど肺疾患時におけるセラミド・アラキドン酸代謝の変動を解析し、さらに合成誘導体の薬理作用を検討し治療候補薬の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) cPLA2 α 活性に対する新規合成セラミド・セラミド - 1 - リン酸誘導体の網羅的解析

(2) セラミド代謝酵素活性に対する新規合成セラミド・セラミド - 1 - リン酸誘導体の網羅的解析

(3) 肺線維化モデル細胞でのアラキドン酸代謝・セラミド代謝異常の解析とセラミド・セラミド - 1 - リン酸誘導体の薬理作用の

解析

(4) 肺がんモデル細胞でのアラキドン酸代謝・セラミド代謝異常の解析とセラミド・セラミド - 1 - リン酸誘導体の薬理作用の解析

(5) 肺気道過敏症、肺がんモデルマウスにおけるセラミド誘導体の薬理作用の解析

4. 研究成果

(1) アラキドン酸代謝・セラミド代謝と合成セラミド関連誘導体の薬理作用の解析

1 培養細胞 CHO に緑色蛍光蛋白 (Green Fluorescence Protein, GFP) を付加したヒトセラミドキナーゼを遺伝子導入法により強制発現させた。発現細胞では 2 4 時間後に細胞が球状化し、C8 セラミドを培地中に共存させた場合には 6 時間後に球状化の亢進が観察された。また乳酸脱水素酵素の細胞外漏洩で評価した細胞死もセラミドキナーゼ強制発現細胞で亢進していた。セラミドキナーゼ強制発現細胞では、セラミド - 1 - リン酸生成が亢進し cPLA2 α 活性を介したアラキドン酸放出が亢進していた。正常細胞にセラミド - 1 - リン酸を処置した場合にも細胞形態の球状化と細胞死が観察され、これらは cPLA2 α 阻害薬で減少した。また、cPLA2 α をノックダウンした L 9 2 9 線維芽細胞ではセラミドキナーゼ強制発現による細胞球状化、細胞死亢進が、対照細胞に比較し、有意に抑制されていた。これらの結果から、セラミドキナーゼはセラミド - 1 - リン酸生成を介して cPLA2 α 活性化によるアラキドン酸放出を起こし、細胞形態の球状化を伴う細胞死を亢進していることが明らかとなった。

2 ニーマンピック病 C 型では細胞内コレステロール輸送蛋白質 NPC1 の欠損により細胞内小器官エンドソームにコレステロールが蓄積し細胞障害を生じる。本研究で、NPC1 欠損細胞では、コレステロールの蓄積が cPLA2 α 活性を介したアラキドン酸放出、プロスタノイド生成を亢進させ、細胞周期の延長・停止さらには細胞死の亢進を誘導することをはじめて明らかにした。cPLA2 α ノックダウンや阻害剤の検討から cPLA2 α が本疾患に深く関与していることを明らかにした。本成果はニーマンピック病に対する新たな治療ターゲットを示している。

3 細胞内シャペロン蛋白の 1 つである熱ショック蛋白質 HSP90 は、いくつかのがん細胞では発現量増大が観察され、HSP90 阻害薬の抗がん剤としての有用性が検討されている。神経細胞 PC12 において HSP90 阻害薬処理がセラミド、スフィンゴ脂質の代謝を変動させることを見出した。

4 連携研究者である西田篤司教授のグループが作成した 30 種以上のセラミド誘

導体を用いて cPLA2 α 活性阻害作用をスクリーニングした。複数個の活性化合物を同定し、さらに化合物の構造を修飾し、新規の cPLA2 α 阻害剤として C2-diethyl-ceramide-1-phosphate を見出した。本化合物は側鎖のアシル基が C 2 と短く、セラミド - 1 - リン酸のリン酸部分が 2 分子のエチル基で修飾された化合物である。一連の研究から、側鎖が短い化合物が有効であること、リン酸部分のメチル基修飾体も有効であることなどが示された。リン酸基がフリーである C2-ceramide-1-phosphate は cPLA2 α 活性亢進作用を示すことから、リン酸基の修飾が阻害作用に必須であると考察された。メチル誘導体は cPLA2 α 阻害活性に加えて細胞障害誘発性を示したが、エチル誘導体は 24 時間では細胞障害作用を示さない cPLA2 α 阻害薬であった。新規 cPLA2 α 阻害剤 C2-diethyl-ceramide-1-phosphate の詳細な作用メカニズムを解析したところ、cPLA2 α が基質であるホスファチジルコリンと相互作用する cPLA2 α の C 末側触媒部位において阻害作用を示すことが示された。セラミド - 1 - リン酸は cPLA2 α の N 末側領域と結合して活性化作用を示すが、新規阻害剤はセラミド - 1 - リン酸の cPLA2 α の N 末側への結合を阻害することはなかった。これらの結果は本研究で得られた新規阻害剤が細胞毒性の低い選択的 cPLA2 α 阻害剤であることを示しており、今後の阻害剤開発の大きな手掛かりとなると考えている。

5 セラミドからグルコシルセラミド合成酵素で生成されるグルコシルセラミド、さらにはこれにガラクトース付加酵素により生成されるラクトシルセラミド (LacCer) が cPLA2 α を直接的に活性化することをはじめで見出した。細胞をグルコシルセラミド合成酵素阻害剤で 18 時間処置するとグルコスフィンゴ脂質の含量が減少し、受容体刺激によるアラキドン酸放出量が減少した。LacCer の外部添加はアラキドン放出を起し、この放出は cPLA2 α ノックダウン、阻害剤で抑制された。さらに LacCer は Ca²⁺ イオンとは無関係に cPLA2 α と結合することが酵素レベルで示され、細胞中では細胞質に存在していた GFP-labeled cPLA2 α を核膜近傍のゴルジ体へ集積させた。サイトカインの一種である腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor- α , TNF α) で細胞を刺激すると、細胞内で LacCer などのグルコスフィンゴ脂質が増加し、この増加が TNF α によるアラキドン酸放出と連動していることが示された。これらの結果からサイトカイン刺激がスフィンゴ糖脂質の変動を介してプロスタノイド生成へと連動しているという新しいシステムが証明された。

6 A549 肺がんモデル細胞でがん化への関与が示されている c-Src チロシンキナーゼがセラミド分解酵素セラミダーゼの活性を

正に調節していることを、c-Src の強制発現、ノックダウン、薬理的手法で明らかにした。各種のセラミダーゼの中のアルカリ性で高い活性を示す ACER2 が調節を受けていること、Lyn という別のチロシンキナーゼの活性化では変化が見られなかったこと、ACER2 は血清中の因子により酵素の発現量が制御されることなども明らかにできた。

7 合成セラミド関連誘導体の細胞レベルでの薬理作用を検討中に、連携研究者作成の誘導体の中に細胞内小器官であるゴルジ体へ集積する化合物 acetyl-C16-ceramide-NBD を見出した。NBD などの蛍光発色団を付加させたセラミドやスフィンゴ糖脂質のいくつかは低分子ゴルジ体マーカーとして多くの研究で既に用いられている。しかしこれらの従来の低分子マーカーは、時間経過とともに代謝物へ変換されまた細胞毒性を有することから、長時間標識型のマーカーとしては短所があることが示されていた。見出した新規ゴルジ体マーカー化合物 acetyl-C16-ceramide-NBD は各種のセラミド代謝酵素による代謝を受けにくくまた細胞毒性も低い化合物であった。この新規マーカーを用いて細胞分裂時に観察されるゴルジ体の断片化と分裂後の 2 つの細胞でのゴルジ体の再編成を追跡することが可能であった。現在、国内特許権と米国での特許権を申請中である。本マーカーは再生医療などに用いる iPS 細胞などの細胞機能評価に有用であると考えられる。

上記の成果を含むセラミドやスフィンゴ脂質代謝系によるアラキドン酸代謝系の制御の詳細は日本薬理学会英文学会誌である Journal of Pharmacological Sciences (2014, 124, 307-312) に Invited Review として公表した。

(2) 各種肺疾患モデルにおけるアラキドン酸代謝・セラミド代謝異常の解析と関連薬物の薬理作用の解析

1 ヒト肺由来の線維芽細胞をサイトカイン transforming growth factor-beta1 (TGF β 1) で刺激すると線維化マーカー蛋白質 α -smooth muscle actin (α SMA) 発現が亢進する。これを指標に抗酸化作用を示すことが知られている臨床使用中の薬剤の作用を検討したところ、高脂血症治療薬であるプロブコール、ロバスタチンが TGF β 1 による活性酸素の上昇を抑え線維化を抑制することを見出した。また、レシチン化し安定性を増大させた抗酸化作用を有する酵素スーパーオキシドデスムターゼも線維化抑制作用を示した。

2 スフィンゴ脂質由来の生理活性物質スフィンゴシン - 1 - リン酸 (Sphingosine-1-Phosphate, S1P) が肺細胞の線維化に関して、促進・抑制の二面性の応答を示すことを見出した。TGF β 1 刺激はスフィンゴミエリンの分解を亢進しセラミドを生成

し、セラミドはさらにセラミダーゼにより分解されスフィンゴシンを生成させた。スフィンゴシンはスフィンゴシンキナーゼによりリン酸化され S1P が生成されオートクライン的に近傍の同種細胞へシグナルを伝え線維化反応を制御していた。薬理学的手法から、S1P3 受容体は Gq/11 を介したシグナルで α SMA 発現を亢進させ（線維化促進）、S1P1 受容体は Gi/o を介したシグナルでシクロオキシゲナーゼ 2 の発現誘導を起こし PGE2 生成を亢進させた。PGE2 は細胞内サイクリック AMP を亢進させるプロスタノイドであり、このシグナルは α SMA 発現を負に調節していた。S1P による二面性の線維化制御機構の存在を同一の細胞ではじめて明らかにできた。

3 肺気道過敏症、肺がんモデルマウスなどの作製を既知の方法に準じて行い、化合物の動物レベルでの薬理作用の解析を試みた。その結果、気道過敏症や肺がんの出現率、症状の程度に個体差あるいは実験群での違いが大きく、動物モデル作成の今後の改良が必要であると判明した。

4 肺炎症性疾患ではステロイドなど抗炎症作用を有する治療薬も使用される。ヒト肺線維芽細胞の TGF β 1 による α SMA 発現上昇に対する各種抗炎症薬の直接的な薬理作用を検討したところシクロスポリンが線維化反応を抑制することを見出した。類似の作用メカニズムを有するタクロリムスは無効であった。現在、シクロスポリンの作用機構の詳細を解析中である。

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 11 件)

1 Sasaki H, Toyomura K, Matsuzaki W, Okamoto A, Yamaguchi N, Nakamura H, Murayama T: Regulation of alkaline ceramidase activity by the c-Src-mediated pathway. (2014). Arch. Biochem. Biophys. 査読有 In press. doi: 10.1016/j.abb.2014.03.012

2 Nakamura H, Murayama T: The role of sphingolipids in arachidonic acid metabolism. (2014) J. Pharmacol. Sci. 査読有 124, 307-312. doi: 10.1254/jphs.13R18CP

3 Nakamura H, Moriyama Y, Makiyama T, Emori S, Yamashita H, Yamazaki R, Murayama T: Lactosylceramide interacts with and activates cytosolic phospholipase A2 α . (2013) J. Biol. Chem. 査読有 288, 23264-23272. doi: 10.1074/jbc.M113.491431

4 Makiyama T, Nakamura H, Nishida A, Murayama T: C2-Di-ethyl-ceramide-1-phosphate as an inhibitor of group IVA cytosolic phospholipase A₂. (2012) Eur. J. Pharmacol. 査読有 697, 144-151. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.09.041

5 Kawashima T, Yamazaki R, Matsuzawa Y, Yamaura E, Takabatake M, Otake S, Ikawa Y, Nakamura H, Fujino H, Murayama T: Contrary effects of sphingosine-1-phosphate on expression of α -smooth muscle actin in transforming growth factor β 1-stimulated lung fibroblasts. (2012) Eur. J. Pharmacol. 査読有 696, 120-129. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.09.038

6 Nakamura H, Yasufuku K, Makiyama T, Matsumoto I, Fujino H, Murayama T: Arachidonic acid metabolism via cytosolic phospholipase A2 α induces cytotoxicity in Niemann-Pick disease type C cells. (2012) J. Cell. Physiol. 査読有 227, 2847-2855. doi: 10.1002/jcp.23025

7 Matsuzawa Y, Kawashima T, Yamazaki R, Yamaura E, Makiyama T, Fujino H, Murayama T: Inhibitory effects of clinical reagents having anti-oxidative activity on transforming growth factor- β 1-induced expression of α -smooth muscle actin in human fetal lung fibroblasts. (2011) J. Toxicol. Sci. 査読有 36, 733-740. URL: <http://www.jsot.jp>

〔学会発表〕(計 19 件)

1 中村浩之, 森山友太, 牧山智彦, 江森俊介, 山下尚大, 山崎璃沙, 村山俊彦. ラクトシルセラミドによる細胞質型ホスホリパーゼ A2 活性化機構の解明. 日本薬学会第 134 年会(熊本, 2014 年 3 月 27 ~ 30 日)

2 山崎璃沙, 松澤康雄, 川島辰夫, 柳原まどか, 中村浩之, 藤野裕道, 村山俊彦. 肺線維化への免疫抑制剤の影響. 第 87 回日本薬理学会年会(仙台, 2014 年 3 月 19 ~ 21 日)

3 山崎璃沙, 川島辰夫, 松澤康雄, 大竹翔, 高島護, 中村浩之, 藤野裕道, 村山俊彦. ヒト肺線維芽細胞における S1P₁ を介した線維化抑制メカニズム. 日本薬学会第 133 年会(横浜, 2013 年 3 月 27 ~ 30 日)

4 藁谷未沙, 中村浩之, 山下尚弘, 村山俊彦. セラミド-1-リン酸産生機構におけるコレステロールの関与. 第 85 回日本生化学会大会(福岡, 2012 年 12 月 14 ~ 16 日)

5 佐々木弘恒, 中村浩之, 多田詠子, 豊村

香織, 村山俊彦. セラミダーゼ活性化制御機構の解明. 日本薬学会第132年会(札幌, 2012年3月28~31日)

6 山崎璃沙, 松澤康雄, 川島辰夫, 大竹翔, 高島護, 中村浩之, 藤野裕道, 村山俊彦. TGF- β 1 刺激時のヒト肺線維芽細胞におけるS1Pの相互的役割. 第85回日本薬理学会年会(京都, 2012年3月14~16日)

7 牧山智彦, 中村浩之, 西田篤司, 村山俊彦. 細胞質型ホスホリパーゼA2 α 阻害作用を持つC1P誘導体の探索研究. 生体機能と創薬シンポジウム2011(東京, 2011年9月1~2日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

1 名称: セラミド誘導体およびこれを用いたゴルジ体標識化蛍光プローブ
発明者: 西田篤司, 中村浩之, 牧山智彦, 村山俊彦
権利者: 千葉大学
種類: 特許権
番号: U.S. patent 14/238,932
出願年月日: February 14, 2014
国内外の別: 国外

2 名称: セラミド誘導体およびこれを用いたゴルジ体標識化蛍光プローブ
発明者: 西田篤司, 中村浩之, 牧山智彦, 村山俊彦
権利者: 千葉大学
種類: 特許権
番号: 特願 2011-177720
出願年月日: 平成23年8月15日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村山 俊彦 (MURAYAMA, Toshihiko)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号: 90174317

(2) 研究分担者 なし()
研究者番号:

(3) 連携研究者

西田 篤司 (NISHIDA, Atsushi)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号: 80130029