

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：37401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659469

研究課題名(和文)スフィンゴ脂質代謝と止血血栓反応制御

研究課題名(英文)Sphingolipid metabolism in thrombosis and hemostasis

研究代表者

武谷 浩之(TAKEYA, Hiroyuki)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：60222105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴ脂質は細胞膜の構成要素として脂質マイクロドメインの形成に関わるだけでなく、セラミドやスフィンゴシン1-リン酸などのシグナル伝達脂質として機能する重要な生体分子である。本研究課題では、スフィンゴ脂質代謝酵素遺伝子の欠損マウスや線虫を用いて、こうした代謝酵素の生物学的機能、特に止血血栓制御におけるスフィンゴ脂質代謝系の関与について解析した。その結果、スフィンゴミエリン量減少および/あるいはセラミド量増加が、細胞機能障害に関連する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sphingolipids are important components of cellular membranes and act as signaling molecules such as ceramide and sphingosine 1-phosphate, potentially regulating cellular processes such as growth, differentiation, adhesion, migration, autophagy, and apoptosis. Here, we have investigated the biological function of sphingolipid metabolic enzymes by using mice and *C. elegans* mutants deficient for these enzymes.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：スフィンゴミエリン スフィンゴ脂質 セラミド スフィンゴミエリン合成酵素 スフィンゴシン1-リン酸 S1Pリアーゼ スフィンゴミエリナーゼ 線虫

1. 研究開始当初の背景

(1) スフィンゴミエリン (SM) は細胞膜ラフトなどの脂質マイクロドメインの構成脂質であり、その形成を介してシグナル伝達や細胞膜輸送に機能する。また、セラミド (アポトーシスに参与) やスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P; 細胞の生存維持・活性化に参与) などのシグナル伝達脂質の細胞膜リザーバーとしても重要である。したがって、その合成酵素 (SMS) は生命機能の維持に必須と思われるが、その生理的・病態生理的な機能には不明な点が多い。SMS 活性を有する遺伝子ファミリーとして SMS1 と SMS2 がクローニングされており、SMS1 はゴルジ体、SMS2 は細胞膜に主に局在している。

(2) SMS については、本邦において世界をリードする研究が進み、SMS1 がトランスフェリンの取り込み調節を介して細胞増殖を制御すること (Shakor et al., *J Biol Chem* 286:36053-62, 2011)、SMS1 と SMS2 の遺伝子欠損マウス (SMS1^{-/-}および SMS2^{-/-}) の作製と解析により、SMS1^{-/-}のミトコンドリア機能異常 (Yano et al., *J Biol Chem* 286:3992-4002, 2011)、SMS2^{-/-}の脂質マイクロドメインの形成異常による脂質取り込みの減少 (Mitsutake et al., *J Biol Chem* 286:28544-28555, 2011) などが明らかとなっていた。

(3) 我々はこれまで、抗リン脂質抗体症候群における血栓症発症の分子機序 (Takeya et al., *J Clin Invest* 99:2260-8, 1997) や S1P による組織因子の発現促進を介した凝固反応と炎症の増幅 (Takeya et al., *Blood* 102:1693-700, 2003) の解析などを通して、細胞膜脂質ダイナミズムと血栓止血反応の制御調節機構に関する研究を行ってきた。この様な我々の研究も含め、従来から止血血栓制御における細胞膜脂質ダイナミズムの関与は解析されてきたが、スフィンゴ脂質代謝系との関連性についての研究は行われていなかった。

2. 研究の目的

スフィンゴ脂質代謝系が原因不明の血小板減少症や出血性・血栓性疾患、特発性血小板減少性紫斑病や抗リン脂質抗体症候群の発症機序に参与するか否かを明らかにし、さらに、スフィンゴ脂質代謝系を標的とした新規抗血栓薬の開発研究につなげることを最終目標とする。研究期間内にはまず、巨核球の分化・成熟や胞体突起形成、血小板産生・代謝、血小板機能、細胞膜上の凝固反応活性化・制御の各機能に関わるシグナル伝達や転写因子活性化、細胞膜グリセロ脂質動態、ミトコンドリア機能、酸化ストレス応答などとスフィンゴ脂質代謝系との関連性を検討する。

3. 研究の方法

(1) SMS1 欠損マウスにおける血小板減少の分子機序について、巨核球の分化・成熟や胞

体突起形成、血小板産生などを骨髄中および *in vitro* 分化で解析し、各ステップに必要なシグナル伝達や転写因子活性化を酸化ストレス応答との関連性を含めて検討した。また、脾臓における血小板補足・破壊動態、および、その血小板膜の異常との関連性を解析するとともに、血小板機能や細胞膜上 (胎児線維芽細胞、単球、内皮細胞も含める) の凝固反応活性化・制御機能との連関を検討した。

(2) 脂質代謝は階層的な複数の経路からなっているため、単一酵素の欠失で単純に生成物が減り、基質が増えることは稀である。例えば、SMS を欠失させた際、基質であるセラミドは増加せず、別経路で加工されて、スフィンゴシンや S1P、あるいは、スフィンゴ糖脂質が増加する可能性がある。本課題の研究分担者 (研究代表者が所属する研究室の准教授) は線虫 (*C. elegans*) を用いた遺伝学的解析を専門とする。スフィンゴ脂質代謝系についてはこれまで、酵母を用いた遺伝学的解析は行われてきたが、酵母ではセラミド (酵母や植物の場合はフィトセラミド) から SM ではなくイノシトール含有スフィンゴ脂質が生成されるなど、動物界のスフィンゴ脂質組成とは異なる部分も多い。この点、線虫は哺乳類と類似しており、SM を有する。本研究では、マウスや培養細胞では解析困難な代謝産物と表現型の関連性について補完するため、スフィンゴ脂質代謝の遺伝学的解析を線虫を用いて行ったが、線虫のスフィンゴ脂質代謝系を網羅的に解析する研究は斯界に例を見ない。線虫のスフィンゴ脂質代謝酵素の各種変異体を用いた遺伝学的解析を行い、代謝産物と細胞膜を介したシグナル伝達や細胞膜グリセロ脂質動態、ミトコンドリア機能との連関を解析した。これらの結果を基に、スフィンゴ脂質代謝系を標的とした新規抗血栓薬開発の可能性、および、この系と止血血栓関連病態との関連性を探った。

4. 研究成果

SMS1^{-/-}は体が小さく (図1)、脂肪組織の委縮が明らかとなった。また、雄性不妊である可能性が示された。他方、SMS1^{+/-}や SMS2^{-/-}、SMS2^{+/-}は野生型と同等であった。SMS1^{-/-}マウスでは出生率の低下などのために、研究



図1. SMS1^{-/-}は体が小さい

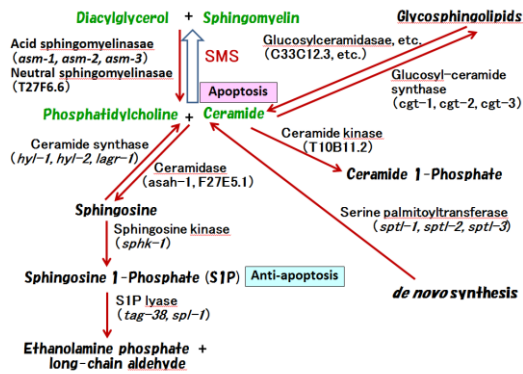


図2. 線虫のスフィンゴ脂質代謝系

の進展が遅れたが、血球組成分析の結果から、SMS1^{-/-}で血小板のみが減少していることが明らかとなった。尾切断による出血時間はSMS1^{-/-}において、顕著（血小板減少のみでは説明不可）に延長し、血小板数が正常なSMS1^{+/-}も出血症状を示した。したがって、SMS1欠損では血小板機能や凝固反応活性化能なども欠損していることが示唆された。マウスの解剖で、SMS1^{-/-}においてのみ、脾臓の肥大が観察された。スフィンゴ脂質の代謝は複雑に制御されているため、SMS欠損マウスの表現型がなぜ・どのようにして惹起されるのかを明らかにすることは困難であった。すなわち、SMSを欠損させた場合、スフィンゴミエリン (SM) の産生が阻害されるだけでなく、SMSの基質であるセラミドの蓄積、あるいは、セラミド代謝で産生されるC1PやS1Pの蓄積、さらに、S1P代謝によるグリセロリン脂質代謝の調節など、様々な代謝経路・産物の影響が複雑に相互作用することが考えられ、それぞれの代謝酵素の欠損型および多重欠損型マウスの解析が必要であった。そこで、線虫のスフィンゴ脂質代謝系酵素遺伝子の欠失変異体および多重欠失変異体の作製と解析に着手した。

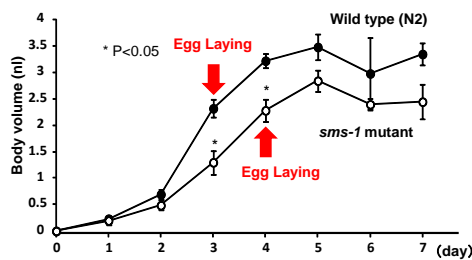


図3. sms-1欠失変異体における体積の減少

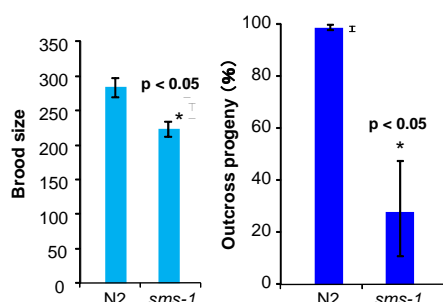


図4. sms-1欠失変異体は雄性不妊

SMS 遺伝子 (*sms-1*)、セラミド合成酵素遺伝子 (*hyl-1* と *hyl-2*)、酸性スフィンゴミエリナーゼ遺伝子 (*asm-3*)、S1P リアーゼ遺伝子 (*tag-38*) の各変異体について、3 回の戻し交配を行い解析に使用した。また、現在までに、*asm-3; sms-1* 変異体、*hyl-2; sms-1* 変異体、*tag-38; sms-1* 変異体、*asm-3; hyl-1* 変異体、*asm-3; hyl-2* 変異体などの二重変異体の作製に成功しており、これらについても解析した。その結果、*sms-1* 欠失変異体における体積の減少 (図3) と雄性不妊 (図4) が観察された。この表現型はマウスの SMS1^{-/-} と全く同じであり、線虫のスフィンゴ脂質代謝系や代謝酵素の生物学機能が哺乳類と類似している可能性が示唆された。そこで次に、他の代謝酵素遺伝子の欠失変異体の解析を行ったところ、特に興味深い変異体として、*asm-3* 欠失変異体が見いだされた。*asm-3* 変異体では、産卵数の増加 (図5) と寿命の延長 (図6) が観察された。

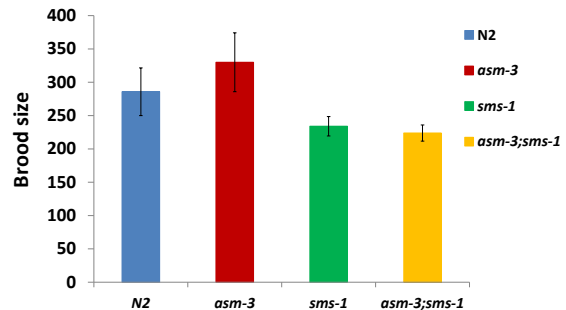


図5. sms-1 および asm-3 変異体、asm-3; sms-1 二重変異体の産卵総数

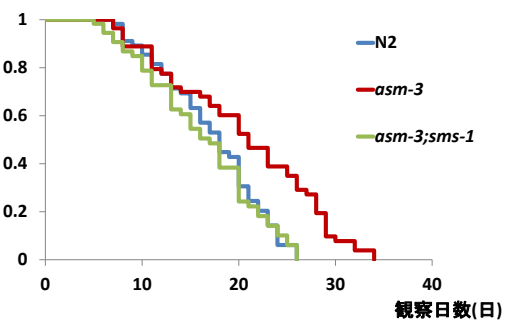


図6. asm-3 変異体および asm-3; sms-1 二重変異体の寿命

asm-3 変異体の表現型は *sms-1* 変異体により抑圧されることから、細胞膜 SM 量の増加あるいは/およびセラミド量の減少が寿命の延長や産卵数増大 (雄性不妊の改善) に促進的に働く可能性が示唆された。血小板減少の分子機序にも SM 量減少やセラミド量増加が関連している可能性が高く、現在、検討中である。

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7件)

① 大野耕作、武谷浩之、血小板ADP受容

- 体 P 2 Y 1 2 の立体構造、日本血栓止血学会誌、査読無、第 25 巻、6 号、2014、pp. 472-477.
doi: 10.2491/jjsth.25.742
- ② Yakura Y, Ishihara C, Kurosaki H, Kazuki Y, Komatsu N, Okada Y, Doi T, Takeya H, Oshimura M. An induced pluripotent stem cell-mediated and integration-free factor VIII expression system. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 Vol. 431, No. 2, 2013, pp. 336-341.
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.096
- ③ 千々岩崇仁、武谷浩之、トロンビン受容体 PAR1 の立体構造、日本血栓止血学会誌、査読無、第 24 巻、4 号、2013、pp. 454-459.
doi: 10.2491/jjsth.24.454
- ④ 武谷浩之、宮田茂樹、篠澤圭子、中村真潮、凝固分野 2012 Hot Topics、日本血栓止血学会誌、査読無、第 24 巻、1 号、2013、pp. 62-63.
doi: 10.2491/jjsth.24.60
- ⑤ Taniguchi M, Kitatani K, Kondo T, Hashimoto-Nishimura M, Asano S, Hayashi A, Mitsutake S, Igarashi Y, Umehara H, Takeya H, Kigawa J, Okazaki T. Regulation of autophagy and its associated cell death by "sphingolipid rheostat": reciprocal role of ceramide and sphingosine 1-phosphate in the mammalian target of rapamycin pathway. *J Biol Chem* 査読有 Vol. 287, No. 47, 2012, pp. 39898-39910.
doi: 10.1074/jbc.M112.416552
- ⑥ Asano S, Kitatani K, Taniguchi M, Hashimoto M, Zama K, Mitsutake S, Igarashi Y, Takeya H, Kigawa J, Hayashi A, Umehara H, Okazaki T. Regulation of cell migration by sphingomyelin synthases: sphingomyelin in lipid rafts decreases responsiveness to signaling by the CXCL12/CXCR4 pathway. *Mol Cell Biol* 査読有 Vol. 32, No. 16, 2012, pp. 3242-52.
doi: 10.1128/MCB.00121-12
- ⑦ 武谷浩之、リン脂質膜による凝固制御。Thrombosis Medicine、査読無、第 2 巻、4 号、2012、pp. 379-382.
http://www.sentan.com/cgi-bin/db_n.cgi?mode=view_backno&no=922
- [学会発表] (計 18 件)
- ① 林 知成、宮原浩二、田尻裕也、武谷浩之、スフィンゴ脂質代謝系酵素遺伝子の欠失変異体の解析、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15~18 日、国立京都国際会館 (京都府京都市)。
- ② 清水安奈、千々岩崇仁、大栗誉敏、中村仁美、上田直子、武谷浩之、触媒三残基の His が Arg に置換したハブ毒新規セリンプロテアーゼ様タンパク質、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15~18 日、国立京都国際会館 (京都府京都市)。
- ③ 手柴衣理、宮原浩二、武谷浩之、グルコース誘発性成長停止に關与する遺伝子の線虫変異体の取得と解析、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15~18 日、国立京都国際会館 (京都府京都市)。
- ④ 武谷浩之、スフィンゴ脂質の代謝と機能。岡山県医用工学研究会シンポジウム、2014 年 10 月 10 日、岡山大学鹿田キャンパス (岡山県岡山市)。
- ⑤ 栗山嵩史、武谷浩之、脂肪細胞による β 2-glycoprotein I の共有結合性多量体化、第 36 回日本血栓止血学会学術集会、2014 年 5 月 29~31 日、大阪国際交流センター (大阪府大阪市)。
- ⑥ 林 知成、宮原浩二、田尻裕也、武谷浩之、線虫スフィンゴ脂質代謝系酵素遺伝子の欠失変異体の解析、平成 26 年度日本生化学会九州支部例会、2014 年 5 月 17~18 日、九州大学病院キャンパス (福岡県福岡市)。
- ⑦ 手柴衣理、宮原浩二、武谷浩之、線虫のグルコース誘発性成長停止に關与する遺伝子の変異体取得、平成 26 年度日本生化学会九州支部例会、2014 年 5 月 17~18 日、九州大学病院キャンパス (福岡県福岡市)。
- ⑧ 清水安奈、千々岩崇仁、大栗誉敏、中村仁美、上田直子、武谷浩之、ハブ毒新規セリンプロテアーゼ様タンパク質の同定、平成 26 年度日本生化学会九州支部例会、2014 年 5 月 17~18 日、九州大学病院キャンパス (福岡県福岡市)。
- ⑨ 手柴衣理、宮原浩二、本山彩霞、武谷浩之、線虫インスリン相同遺伝子 ins-7 の欠失変異体におけるグルコース誘発性成長停止の分子機序の解析、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3~6 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)。
- ⑩ 手柴衣理、宮原浩二、本山彩霞、武谷浩之、線虫のグルコース誘発性成長停止の分子機序、第 86 回日本生化学会大会、2013 年

9月11～13日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）.

- ⑪ 宮原浩二、田尻裕也、南條健太、武谷浩之、スフィンゴミエリン合成酵素機能の線虫を用いた解析、第35回日本血栓止血学会学術集会、2013年5月30～6月1日、山形国際ホテル（山形県山形市）.
- ⑫ 手柴衣理、宮原浩二、本山彩霞、武谷浩之、線虫のインスリン相同遺伝子欠失変異体を用いた新規糖尿病治療薬スクリーニング系の開発、平成25年度日本生化学会九州支部例会、2013年5月18～19日、佐賀大学（佐賀県佐賀市）.
- ⑬ K. Miyahara, K. Nanjo, Y. Tajiri, H. Takeya. A loss-of-function mutant of the sphingomyelin synthase homologue SMS-1 in *Caenorhabditis elegans*. 8th AIM (Aso International Meeting). 2013年5月16日～18日、ホテルグリーンピア南阿蘇（熊本県阿蘇市）.
- ⑭ 宮原浩二、南條健太、武谷浩之、線虫スフィンゴミエリン合成酵素の欠失変異体の表現型の解析、第85回日本生化学会大会、2012年12月14～16日、福岡国際会議場他（福岡県福岡市）.
- ⑮ 手柴衣理、宮原浩二、武谷浩之、新規糖尿病薬スクリーニングにおける線虫 *C. elegans* の有用性の検証、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11～14日、福岡国際会議場 他（福岡県福岡市）.
- ⑯ 本山彩霞、宮原浩二、手柴衣理、武谷浩之、グルコースによる線虫インスリン相同遺伝子 ins-7 の欠失変異体の成長停止、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11～14日、福岡国際会議場 他（福岡県福岡市）.
- ⑰ 矢倉裕奈、黒崎創、石原千恵、香月康宏、土井健史、松下正、武谷浩之、押村光雄、人工染色体ベクターを用いた新規血友病A遺伝子治療法の開発、第11回日本再生医療学会総会、2012年6月12～14日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）.
- ⑱ 手柴衣理、宮原浩二、武谷浩之、線虫を用いた新規糖尿病薬スクリーニング系の開発、平成24年度日本生化学会九州支部例会、2012年5月26～27日、福岡大学（福岡県福岡市）.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：内因系血液凝固反応のみを特異的に阻

害する抗血栓剤

発明者：武谷浩之、田尻裕也、金子慎一郎

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-034482

出願年月日：平成27年2月24日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.life.sojo-u.ac.jp/biosci/takeya/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武谷 浩之 (TAKEYA, Hiroyuki)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：60222105

(2) 研究分担者

宮原 浩二 (MIYAHARA, Kohji)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：40325155