様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月　 ２ 日現在

機関番号：３３３０３
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2013～2014
課題番号：２５８９３２６９

研究課題名（和文）マウス骨髄脂肪の加齢におけるスフィンゴ脂質変化の解析とその造血幹細胞に与える影響

研究課題名（英文）Analysis of sphingolipid changes in the aging of bone marrow stromal cells in a mouse hematopoietic system

研究代表者
小木曽　英夫（OGISO, Hideo）

金沢医科大学・医学部・特定講師

研究者番号：３０４６６７３４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,500,000円

研究成果の概要（和文）：はじめに細胞膜構成脂質を効率的に測定するための細胞膜分離法とLC-MS法を開発した。これにより刺激に対する細胞応答における細胞膜の変化を解析する手段を得た。マウス骨髄の間質細胞は造血幹細胞を維持する能力を有するが、加齢に伴い脂肪細胞へ分化する過程でこの能力は低下する。本研究では、マウス由来骨髄間質細胞PA6が脂肪細胞に分化する過程で、細胞膜脂質にどのような変化が生じるかを解析した。PA6細胞は脂肪細胞へ分化する過程でラフト内セラミド量が増加することを明らかにした。今後、細胞膜の変化と生理活性との関連付けを行う。

研究成果の概要（英文）：We developed an approach for the comprehensive analysis of sphingolipids, glycerophospholipids and diacylglycerol molecular species in a biological sample, using LC-MS. In addition, we applied a cationic colloidal silica-bead method to analyze plasma membrane lipids from monolayer cells cultured in a 10-cm dish. The detergent-resistant fraction from the silica-bead coated membrane was analyzed to evaluate the microdomain lipids. Stromal cells from mouse bone marrow have an ability to maintain hematopoietic stem cells, but this ability decreases by aging in a process differentiating to fat cells. In this study, we analyzed some changes in lipids of membrane microdomains caused during differentiation of PA6 cells, one of the stromal cell lines, to fat cells. Result showed that ceramide level in the microdomain was elevated during the differentiation. This approach will facilitate future comprehensive analyses of membrane microdomain-associated responses in a hematopoietic system.

研究分野：生体成分の分析化学

キーワード：細胞膜　脂質ラフト　リピドミクス

１．研究開始当初の背景

(1) 脂質分析手法

スフィンゴ脂質群においてシフィンゴシン(Sph)やセラミド(Cer)はアポトーシスやオートファジーを誘導するのに対し、スフィンゴシン１リン酸(S1P)は細胞増殖や遊走を促という拮抗する作用を有する。一方でスフィンゴミエリン(SM)はスフィンゴ脂質のプールとして機能するとともにコレステロールとともに生体膜におけるマイクロドメインを形成し、細胞膜上のシグナル伝達分子の機能を制御していると考えられている。しかしながらこれらの重要な脂質分子を包括的かつ効率的に測定する手法の整備は不十分であった。

(2) 造血システムにおける脂質の役割

骨髄における造血幹細胞は自身の複製と同時に各種血球細胞への分化・供給を行っている。これには造血支持細胞（骨髄間質細胞）から成る微小環境「造血ニッチ」の役割が重要であるが、加齢により骨髄間質細胞が脂肪細胞へ分化すると造血支持能力は低下し骨髄の造血能力は結果として失われる。この造血支持能力の分子レベルでのメカニズムは不明であった。

２．研究の目的

(1) スフィンゴ脂質群とその関連脂質を包括的かつ効率的に測定する方法を新たに開発する。そのための膜分離法と質量分析測定法を検討する。

(2) 骨髄間質細胞が有する造血支持能力の低下と細胞膜脂質の変化との相関を調べることにより、造血支持能を維持するための脂質分子の役割を考察する。

３．研究の方法

(1) 脂質抽出法、LC-MS/MS 法を見直し最適化する。細胞膜分離法としてカチオニックコロイダルビーズ法を適用し、細胞膜マイクロドメイン脂質解析法を開発する。これらの新規方法が有効であることを検証するために種々の生物試料を用いて脂質測定を行う。

(2) 造血支持能力を有するマウス骨髄間質細胞である MC3T3-G2/PA6 細胞を用いる。当細胞が脂肪細胞へ分化する過程で細胞膜脂質がどのように変化するかを解析し、造血維持能の分子的基盤を考察する。

４．研究成果

(1) 包括的スフィンゴリピドミクス手法の開発

スフィンゴ脂質群を正確に定量するには、これまでの手法ではアルカリ加水分解によりグリセロ脂質を分解する前処理を導入することが一般的であった。しかしながらこのような化学処理を行うと、SM からセラミド１リン酸(C1P)が生成してしまい、生体内 C1P レベルを過大評価することが懸念されていた。また、脂質抽出に際してガラス器具を用いる必要があるなど猥雑な工程が含まれることや、スフィンゴ脂質以外のグリセリ脂質やコレステロールを測定するには、改めてそれらに適した抽出法や測定法をそれぞれ適用する必要があるなど、複数の問題点があった。本研究で開発した方法はこれらの問題点の多くを克服するものであった。第１に、アルカリ加水分解を用いず、スフィンゴ脂質群を測定できるため、脂質の化学的変化の懸念がほとんどなくなった。それと同時にスフィンゴ脂質群とグリセロリン脂質群の同時測定が可能となった（図１）。第２に、脂質抽出工程ではガラス器具を用いず汎用ポリプロピレン製マイクロチューブを用いるように法法を最適化したことから、器具の洗浄不足による脂質の夾雑の懸念がなくなり、かつ多検体処理の操作性が格段に向上した。第３に、本研究で適用された脂質抽出法では、同一脂質抽出液からジアシルグリセロールやコレステロールなど種々の脂質分子の測定にも適用可能であった。

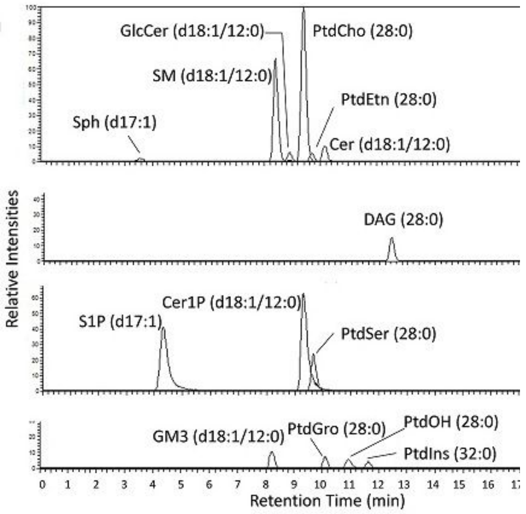

図１　LC-MS によるスフィンゴ脂質およびグリセロリン脂質測定

(2) 新規脂質測定法の適用

本研究で開発した脂質測定方法を種々の生物試料（臓器レベルおよび細胞レベル）に適用してその有用性を検証した。例えば、(a) SM 合成酵素(SMS1, SMS2)ノックアウトマウスの各臓器の脂質変化を明らかにした（図２）。その結果、SMS ノックアウトマウスでは、SM レベルの減少に伴ってモノヘキソシルセラミド(HexCer)やものシアロガングリオシド(GM3)レベルの増加が観察された。(b) 刺激に反応して細胞外に分泌される S1P の量の変化を明らかにした。(c) アポトーシスにおけるリソソーム中 Cer 量の

変化を明らかにした。(d) 刺激に応じたジアシルグリセロールおよびホスファチジン酸レベルの変化を明らかにした。(e) 皮膚及び毛の脂質レベルを明らかにした。以上のように極めて多岐にわたる生物試料に対し、スフィンゴ脂質のみならず多種多様な脂質測定に応用可能であることから、本方法はリピドミクス手法として極めて有用であることがわかった。

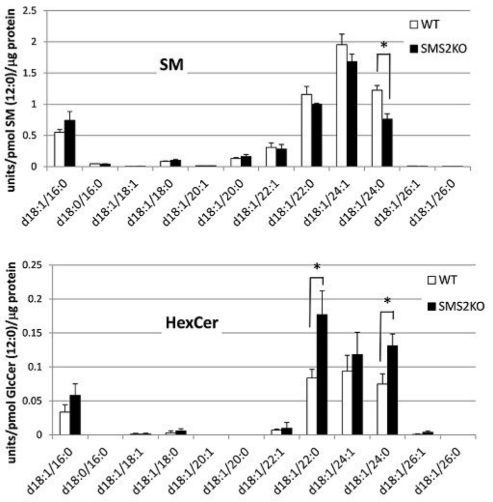

図２　SMS2 ノックアウトマウス肝臓の脂質組成変化

(3) リピドミクスを目的とした細胞膜調製法の開発

これまで細胞膜上で起こる脂質分子の変化を解析するには、特定の脂質分子に親和性をもつ蛍光プローブ等を用いたイメージング技術が利用されてきたが、脂質分子を直接測定することはできなかった。その理由として、定量的な細胞膜分離法がないことが挙げられた。本研究では細胞膜、とくに脂質マイクロドメイン上で起きる脂質変化を解析するための細胞膜分離方法を検討した。すなわち、カチオニックコロイダルビーズ法を適用して細胞膜画分を取得したのち、界面活性剤耐性脂質画分を調製した。この画分の脂質組成は従来報告されているマイクロドメイン脂質組成とその特徴が一致することからマイクロドメイン脂質が調製されたものと判断した。本方法は従来用いられているマイクロドメイン画分の超遠心分離によるマイクロドメイン脂質画分のフローテーション法に比べ、細胞内オルガネラ由来の膜の影響が少ないこと、操作が簡便で再現性が有り定量的回収が可能であるという点で優れていると判断した。本研究で開発した２つの方法、細胞膜分離法と脂質測定法を併用することにより、マイクロドメイン脂質の比率変化やマイクロドメイン内の脂質分子種の変化を解析できるようになった（図３）。例えば、(a) 細胞死を誘導する C2-Cer 刺激後に起こる細胞膜およびマイクロドメイン脂質の変化を明らかにした。(b) 各種成長因子を含む血清刺激後２分で起こる細胞膜脂質の変化を明らかにした。

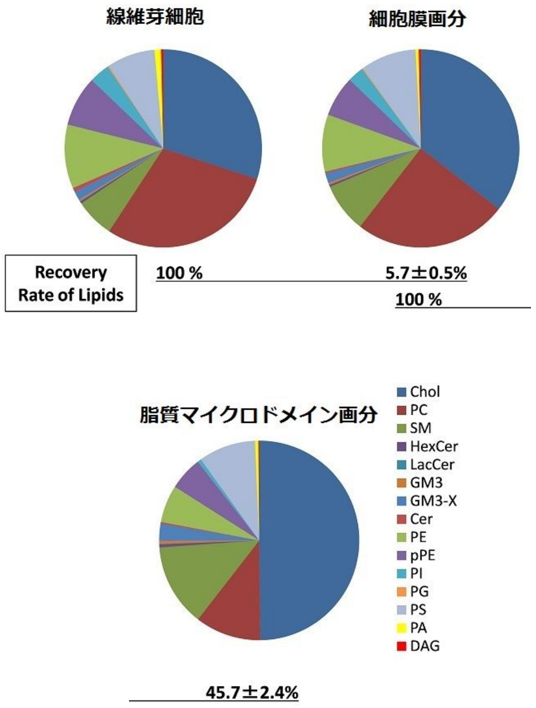

図３　各細胞膜画分の脂質組成の比較

(4)PA6 細胞の分化の過程で起こる細胞膜脂質の変化

PA6 細胞は脂肪細胞へ分化することのできる前駆細胞であるが、骨髄間質細胞として造血維持能力を有する。脂肪細胞へ分化するにつれてこの造血支持能力は低下することから、分化の過程で起こる変化を解析することにより造血能低下のメカにムズを推定することを試みた。特に本研究では細胞膜脂質分子と造血能との関わりにターゲットを絞り、脂質分子の変化を明らかにすることを目的とした。本研究で開発した細胞膜脂質分子の解析手法適用し、PA6 細胞が脂肪細胞に分化するときの細胞膜脂質分子の変化を追った。脂肪細胞への分化を誘導するデキサメサゾン/ブチルメチルキサンチン処理後９日以内に、細胞膜マイクロドメイン領域の割合がに低下すること、マイクロドメイン中の Cer レベルが上昇することが明らかとなった（図４）。

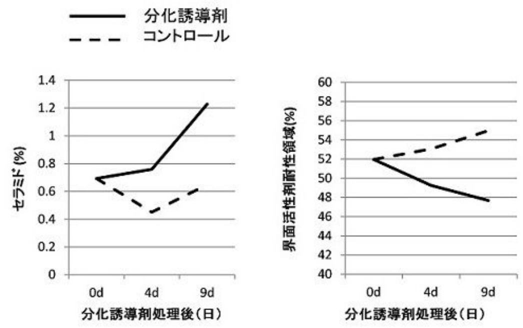

図４　PA6 細胞の脂肪細胞への分化過程における細胞膜マイクロドメイン脂質の変化

(5) 今後の展開
本研究では、上述のように PA6 細胞膜に起きる脂質変化を解析することができたものの、この脂質変化が造血能とどのように関わっているか相関解析まで成し遂げることはできなかった。したがって今後は PA6 の造血維持能の詳細な解析と脂質変化との相関研究を行い、造血ニッチにおける脂質分子の役割の解明を目指す。また一方で、本研究で開発した細胞膜脂質分析法は、脂質分子の解析には有効であるが細胞膜タンパク質の研究には適用できないという制限があった。この点について方法を改善する余地があり、細胞膜上での脂質分子とタンパク質分子の両者の同時解析を可能にする方法の開発を目指す。さらには本研究で可能となった細胞膜分離技術を応用して、細胞膜由来リポソームの作製を試み、新規素材としての可能性を探求することも目指す。

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１件）
①Ogiso H, Taniguchi M, Araya S, Aoki S, Wardhani LO, Yamashita Y, Ueda Y, Okazaki T.
Metabolites. 査読あり、2014, 27, 4, 98-114. doi: 10.3390/metabo4010098.

〔学会発表〕（計２件）
①小木曽英夫　「スフィンゴ脂質を中心とした膜脂質の LC-MS による定量的解析」第９回スフィンゴテラピー研究会、2014 年 7 月 18 日、河鹿荘ロイヤルホテル（石川県・加賀市）

②小木曽英夫　「スフィンゴミエリン合成酵素欠損 MEF における細胞膜マイクロドメイン脂質の定量的解析」第３７回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

６．研究組織
(1)研究代表者
小木曽　英夫（OGISO, Hideo）
金沢医科大学　医学部・特定講師
研究者番号：30466734