

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 6月 3日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790316

研究課題名（和文）スフィンゴシン 1-リン酸シグナル破綻による動脈硬化・血栓症の亢進の検討

研究課題名（英文）Study on the effects of dysfunctional sphingosine 1-phosphate signal on arteriosclerosis and thrombosis

研究代表者

青木慎也（AOKI SHINYA）

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10508758

研究成果の概要（和文）：スフィンゴシン 1-リン酸（Sph-1-P）は血小板の活性化に伴い大量に放出されるが、その役割は不明である。研究の結果、血管内皮細胞で TNF- α により惹起された組織因子（TF）の発現が活性化血小板上清（Plt-sup）により劇的に増幅されること、Plt-sup中の TF 発現増幅効果の本体が Sph-1-P であり、種々の炎症因子により惹起された TF 発現に対しても増幅作用を有することを明らかにした。その Sph-1-P のシグナルは、MAPK カスケードを介するものであった。以上の結果より、血小板の過剰な活性化により放出された Sph-1-P が血管局所に作用し、動脈硬化および血栓症の増悪に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Sphingosine 1-phosphate (Sph-1-P), abundantly stored in platelets, is released by the platelets' activation. However, the role of released Sph-1-P from activated platelets is remained unclear. In the present study, it was revealed that, in vascular endothelial cells, 1) the supernatant of the activated platelets (Plt-sup) enhanced TNF- α -induced expression of tissue factor (TF), an initiator of coagulation system, that was stimulated by Sph-1-P into the Plt-sup, 2) that Sph-1-P could enhance the expression of TF induced by inflammatory mediators, and 3) that Sph-1-P promoted TF expression by the induction of the transcriptional factors such as Egr-1, NF- κ B and AP-1 through MAPK cascade. These results suggest that Sph-1-P would closely be involved in the exacerbation of arteriosclerosis and thrombosis disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：スフィンゴシン 1-リン酸，組織因子，炎症因子，動脈硬化，血栓症

1. 研究開始当初の背景

血液中のスフィンゴシン 1-リン酸 (Sph-1-P) 産生は，無核細胞の赤血球と血小板が担い，恒常的な産生放出を行う赤血球に対して，血小板は殆どの Sph-1-P を細胞内に蓄積して活性化に伴い大量に放出する。赤血球により維持される血漿中 Sph-1-P は，細胞膜上の Sph-1-P 受容体 (S1P₁₋₅) の中でも S1P₁ を発現する血管内皮細胞に対して成熟血管形成，血管透過性制御，NO 産生誘導などの血管生理機能維持に不可欠である。一方で，血小板の活性化に伴い放出される局所的に極めて高濃度な Sph-1-P の生理的又は病理的な意義は十分に解明されていない。さらに，血栓症や動脈硬化の発症・進展において炎症性因子および酸化ストレスが Sph-1-P シグナルにどのような役割又は影響を及ぼすのか十分に分かっていない。

2. 研究の目的

血栓症および動脈硬化の危険因子である高脂血症，高血糖，高血圧では，その病態進行過程で生じる過剰な炎症性サイトカインや酸化ストレスなどのストレス関連因子が，過剰な血小板活性化や血管内皮障害など様々な障害を引き起こす。本研究課題では，動脈硬化や血栓症の発症・進展に関わるストレス関連因子が血管内皮の Sph-1-P シグナルおよびその生理機能に与える影響を検討した。

3. 研究の方法

幾つかの動脈硬化の危険因子と深い関連のある炎症性因子および酸化ストレスが，血中 Sph-1-P 産生・代謝および動態に及ぼす影響，そして動脈硬化および血栓形成における Sph-1-P の関与を解析した。

(1) 血栓や動脈硬化などの血管病変に関わると考えられる血中 Sph-1-P シグナルの破綻について，Sph-1-P のキャリア蛋白質であるリポ蛋白質 (LDL, HDL) およびアルブミンへの分布動態を中心とした解析を行った。

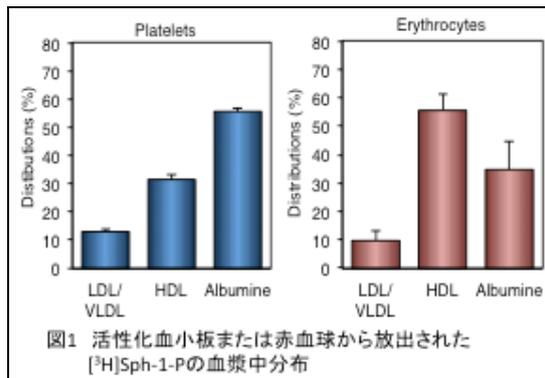
(2) ストレス関連因子により障害された血管内皮細胞について，血栓形成の初期因子である組織因子 (TF) 発現に対する Sph-1-P の影響について検討した。また，Sph-1-P を大量に含む活性化血小板の放出産物についても TF 発現を調査し，その生理活性物質の同定を行った。

(3) Sph-1-P による TF 発現増幅機構についてそれぞれの細胞内シグナル伝達経路およびシグナルのクロストークについて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 血中 Sph-1-P の恒常的な供給源である赤血球から放出される Sph-1-P および血小板活性化により大量に放出される Sph-1-P について，ヒト血漿中の輸送担体 (リポ蛋白質およびアルブミン) への結合分布を解析した。³H 標識スフィンゴシン (Sph) を取り込んだ赤血球および血小板は，細胞内で³H]Sph-1-P に変換して細胞膜トランスポーターを介して輸送担体に受け渡すた

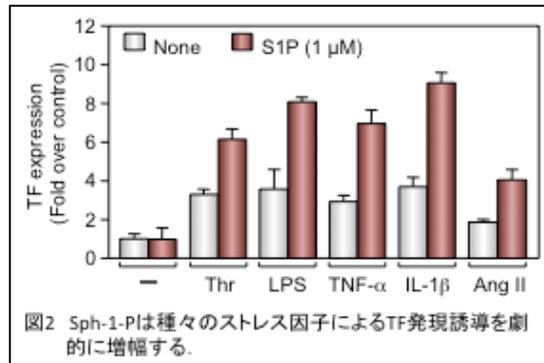
め、採血・分離精製したヒト赤血球または血小板を ^3H Sph で標識し、それぞれ血漿中にて 1 時間インキュベートした。なお、血小板はコラーゲンによる活性化後、1 時間インキュベートした。その結果、赤血球から放出された ^3H Sph-1-P は、LDL/VLDL, HDL, アルブミン分画中で主に HDL に分布する一方で、活性化血小板から放出された ^3H Sph-1-P は主としてアルブミンに分布した(図 1)。また、正常な



血漿中の Sph-1-P (濃度: 300-500 nM) の分布は LDL/VLDL : HDL : アルブミンでそれぞれ約 1 : 6 : 3 であるが、微量の ^3H Sph-1-P を分布させた血漿中に外部より Sph-1-P (0.1-1 μM) を添加していくとその結合分布は Sph-1-P 濃度依存的に HDL よりもアルブミン優位になることも明らかにした。これらの結果から、血中 Sph-1-P の輸送担体にはその結合容量に限界があり、高親和性の HDL の Sph-1-P 結合容量を超えるとその過剰な Sph-1-P がアルブミンへ結合する事が明らかになった。HDL に結合した Sph-1-P は S1P 受容体への作用が制限される一方で、アルブミンに結合した Sph-1-P は制限されないという報告がある。このことから、活性化血小板由来の Sph-1-P は S1P 受容体への強力に作用すると考えられる。

(2) ストレス関連因子により障害された

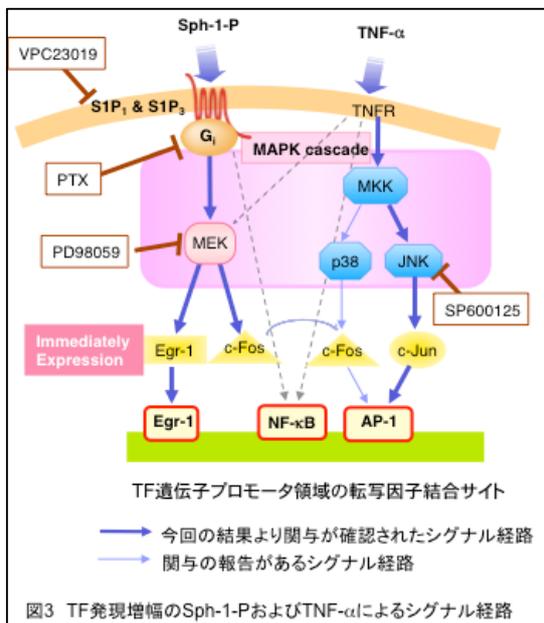
ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の TF 発現に対する Sph-1-P の影響について検討した。その結果、Sph-1-P が共存するとトロンビン, TNF- α , IL-1 β , リポポリサッカライドおよびアンジオテンシン II によって惹起された HUVEC の TF 発現が劇的に増加することをイムノアッセイによ



り見出した(図 2)。なおこの活性は、活性化血小板上清 (Plt-sup) および煮沸処理された Plt-sup でも誘導されることから、Plt-sup 中の脂質性メディエータによるものと推察された。活性物質のスクリーニングの結果、Sph-1-P および TXA₂ アナログにおいて TF 発現の促進効果を検出した。Plt-sup における TF 発現増幅は、S1P₁ および S1P₃ の阻害剤 VPC23019 により完全に抑制された。一方、TXA₂ の半減期が極めて短いことが知られており、Plt-sup 中において TXA₂ の作用を確認することは難しいと考えられる。これらの結果より Sph-1-P および TXA₂ は、炎症局所において活性化血小板から放出され、TNF- α などの他の炎症性因子と協調して内皮細胞を活性化し、血栓形成の亢進や炎症反応の増幅に関与している可能性が示唆された。

(3) Sph-1-P による TF 発現増幅における細胞内シグナル伝達機構について、特異的阻害剤を用いたイムノアッセイ、半定量的 RT-PCR 法およびゲルシフトアッセイによ

り検討を行った。その結果 Sph-1-P は、HUVEC の S1P₁ および S1P₃ から共役する G_i タンパク質、MAPK 系の MEK を介して転写因子 Egr-1 および c-Fos の発現を増幅し、それにより TF 転写に関わる Egr-1、AP-1 および NF-κB の活性が増強されることを明らかにした(図3)。これらの事から、Sph-1-P は細胞内シグナルのクロストークを介して種々のストレス関連因子による TF 発現シグナルを増幅することが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- (1) Takagi T, Taguchi O, Aoki S, Toda M, Yamaguchi A, Fujimoto H, Boveda-Ruiz D, Gil-Bernabe P, Ramirez AY, Naito M, Yano Y, D'Alessandro-Gabazza CN, Fujiwara A, Takei Y, Morser J, Gabazza EC. Direct effects of protein S in ameliorating acute lung injury. *Journal of thrombosis and*

haemostasis. 2009; 7: 2053-63.

- (2) Qin L, D'Alessandro-Gabazza CN, Aoki S, Gil-Bernabe P, Yano Y, Takagi T, Boveda-Ruiz D, Ramirez Marmol AY, San Martin Montenegro VT, Toda M, Miyake Y, Taguchi O, Takei Y, Morser J, Gabazza EC. Pulmonary hypertension is ameliorated in mice deficient in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2010; 8: 808-16.

- (3) Takagi T, Taguchi O, Toda M, Ruiz DB, Bernabe PG, D'Alessandro-Gabazza CN, Miyake Y, Kobayashi T, Aoki S, Chiba F, Yano Y, Conway EM, Munesue S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Suzuki K, Takei Y, Morser J, Gabazza EC. Inhibition of allergic bronchial asthma by thrombomodulin is mediated by dendritic cells. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011; 183: 31-42.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日：

国内外の別：

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

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

青木 慎也 (AOKI SHINYA)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10508758

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし