

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790650
 研究課題名（和文）
 脂質メディエーター スフィンゴシン 1 リン酸による脂肪細胞分化機構の研究
 研究課題名（英文） Elucidation of physiological roles of sphingosine 1-phosphate and its receptors in adipose tissue
 研究代表者
 橋本 剛（HASHIMOTO TAKESHI）
 香川大学・医学部・助教
 研究者番号：80380153

研究成果の概要：

前駆脂肪細胞が脂肪細胞へ分化する過程で、S1P 産生酵素 (SphK) の mRNA および蛋白質が著名に増加し、発現上昇した SphK が細胞内 S1P の生成を増加させる。SphK-1 遺伝子をノックダウンした細胞は脂肪細胞への分化が抑制し、 $\alpha P2 \cdot PPAR\gamma \cdot C/EBP\alpha$ などの転写因子の mRNA の発現は減少する。ob/ob マウスの皮下脂肪組織において SphK-1 mRNA の著名な発現上昇が認められ、マウス胎児から単離した初代培養細胞においても脂肪細胞への分化過程で SphK-1 mRNA は上昇することから、脂肪細胞の分化に対して SphK-1 が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	0	2,500,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	270,000	3,670,000

研究分野：生理学・薬理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：

- (1) スフィンゴシン 1 リン酸
- (2) Sphingosine 1-phosphate (S1P)
- (3) スフィンゴシンキナーゼ
- (4) Sphingosine Kinase (SphK)
- (5) 脂肪細胞
- (6) 脂肪組織
- (7) 3T3-L1 細胞
- (8) ob/ob マウス

1. 研究開始当初の背景

- (1) 肥満症は生活習慣病（糖尿病・高血圧症・虚血性心疾患など）の主要なリスクファクターであり、わが国においては高齢化や食生活の欧米化に伴い今後ますます罹患者が増加すると考えられている。さらに、肥満症とは全身における脂肪組織の過剰な蓄積として捉えることができるため、これまでに前駆細胞から脂肪細胞への分化過程や遺伝子発現調節に関与する転写因子が数多く同定されてきた（PPARs、C/EBPs、ADD1/SREBP1 など）。一方、脂肪組織自体も単なる脂質の貯留機能のみならず、アディポネクチンやレプチンなどの「アディポサイトカイン」を放出する内分泌作用を有し、心血管系やその他の遠隔臓器に影響を与えることが明らかにされた。以上のように肥満症に対する医学研究は近年大きく進展し、また食農教育などの社会的な取り組みも積極的に行われてきた。
- (2) しかしながら、2000年に策定された「健康日本21」の中間実績によれば20～60代の肥満男性の割合は、スタート時より4.7ポイント悪化の29.0%と、目標値（15%以下）のほぼ2倍に達している。40歳以上でみると、男性の2人に1人、女性の5人に1人が、メタボリックシンドロームが強く疑われる者または予備軍と考えられる者の割合である（2006年10月17日厚生労働省・厚生科学審議会部会報道発表）。従って、肥満をもたらす分子メカニズムをさらに詳細に解明し、新たな治療的アプローチの発見に繋げていくことは大変重要であると考えている。

2. 研究の目的

- (1) 脂肪細胞の分化機構および内分泌作用におけるスフィンゴ脂質シグナリング系の役割を統合的に理解することを最終目標とする。取り扱う分子種は、代表的な機能スフィンゴ脂質であるスフィンゴシン1リン酸（S1P）、その特異的受容体（S1P受容体）、およびS1P産生酵素（スフィンゴシンキナーゼ：SphK）に特に焦点を当て、脂肪細胞の単培養系でのS1P及び関連分子の動態と役割を検討する。

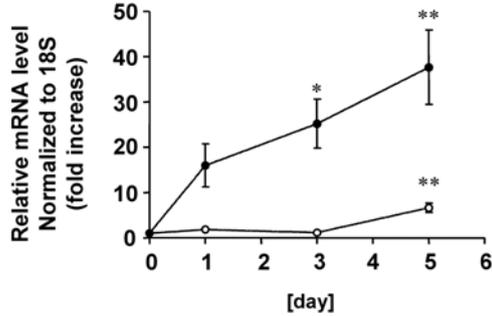
- (2) 脂肪細胞への分化誘導剤（MIX刺激：インスリン、デキサメサゾン、IBMX）として使われるインスリンやデキサメサゾンはPI3-K/Aktなど、IBMXはプロテインキナーゼA/Gなどのシグナル伝達物質を活性化することが知られている。さらに脂肪細胞における糖・脂質代謝はインスリンシグナルとcAMP/CREBシグナルのバランスによって制御されており、cAMP/CREBシグナル亢進で脂質分解に傾き、インスリンシグナル亢進で脂肪蓄積が起こる。そして脂肪の蓄積過多状態が長期間続くと、肥満と共にインスリン耐性を引き起こし2型糖尿病の発症につながると思われる。そこで、L1細胞において分化誘導剤単独またはMIX刺激での刺激によりSphK遺伝子を誘導する際、これらのシグナル伝達物質に特異的な薬理的阻害剤、ドミナントネガティブ遺伝子、RNAiの効果をそれぞれ検討することで、脂肪細胞分化誘導剤刺激からSphK遺伝子誘導に至るL1細胞内シグナル伝達機構を定める。

3. 研究の方法

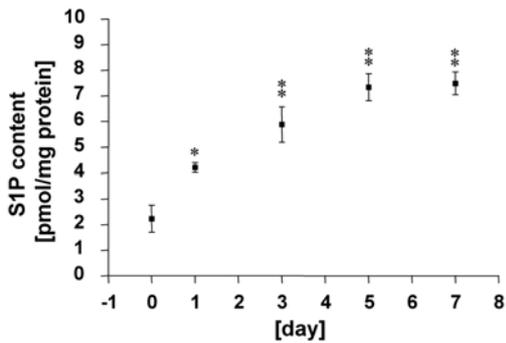
- (1) 各種mRNAの発現変化についての検討はRT-PCR法、Realtime-PCR法を用いる
- (2) 細胞内S1Pの定量は、HPLC蛍光法をもちいる。
- (3) SphK蛋白質の発現量の変化は、Western Blot法により明らかとする。
- (4) SphK阻害剤であるDMSまたはDHS、及びSphKに対するRNAiを用い、誘導されたSphKによるS1P産生を阻害することがL1細胞の脂肪細胞への分化を抑制するか否かを検討する。
- (5) SphKの過剰発現株、及び外因性にS1Pを投与した細胞でMIXによる分化が過剰に亢進するか否かも検討する。

4. 研究成果

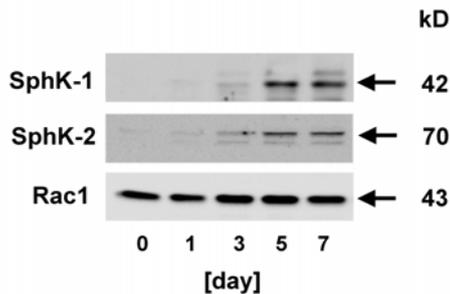
- (1) 脂肪細胞の分化過程において S1P 産生酵素である SphK-1 および SphK-2 の mRNA の著明な誘導 (37.6 倍、6.6 倍) がもたらされる。



- (2) MIX 刺激により SphK-1 および SphK-2 の mRNA が著名に増加すると同時に細胞内 S1P が産生される



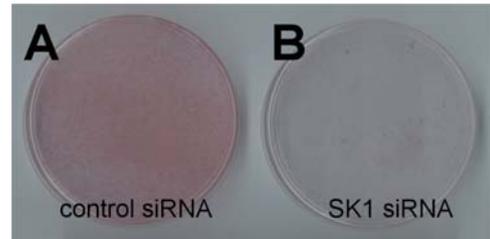
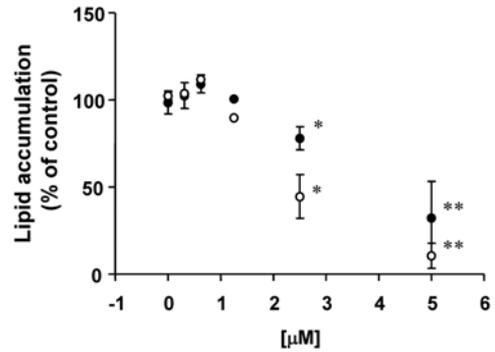
- (3) 脂肪細胞の分化過程において S1P 産生酵素である SphK-1 および SphK-2 の蛋白質の著明な誘導 (19.7 倍、16.2 倍) がもたらされる。



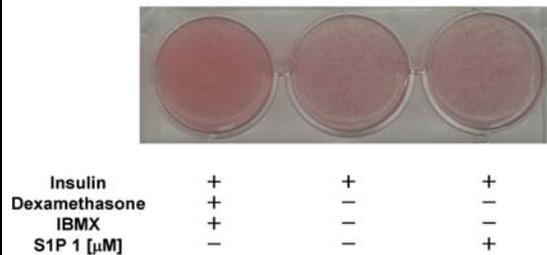
- (4) SphK 阻害剤である DMS (黒丸) または DHS (白丸) 共存下で MIX 刺激を行うと、脂肪細胞への分化は抑制し、細胞内 S1P の

産生も減少する。SphK に対する特異的 siRNA を用いると脂肪細胞の分化が抑制する。

図Aは分化開始8日目の脂肪細胞に oil red O 染色法を用いて脂肪滴を染めたもので、図Bは SphK1 の siRNA を予め細胞に導入することで脂肪細胞への分化が完全に抑制していることを示している。



- (5) SphK の過剰発現株のデータは現在、取得中である。インスリンによる脂肪細胞への分化過程に外因性の S1P を添加しても分化能への影響はほとんど認められなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

①Hashimoto T, Igarashi J, Kosaka H.

Sphingosine kinase is induced in mouse 3T3-L1 cells and promotes adipogenesis.

Journal of lipid research
50(4)、602-610、2009

査読：有

〔学会発表〕(計 2 件)

①橋本剛；五十嵐淳介；小坂 博昭
第81回日本薬理学会
2008.03.17、横浜

Sphingosine Kinase-1, an S1P-producing enzyme, promotes adipogenesis

②橋本剛；五十嵐淳介；小坂 博昭
第84回日本生理学会
2007.03.20、大阪

3T3-L1 前駆脂肪細胞における Sphingosine Kinase-1 の脂肪細胞分化への関与

5. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 剛(HASHIMOTO TAKESHI)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80380153