

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 5 月 31 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590610

研究課題名（和文）リポ蛋白質の相反する作用の決定因子としてのリゾリン脂質シグナル分子

研究課題名（英文）Lysophospholipid signal molecules act as determinants of conflicting actions of the lipoproteins.

研究代表者

桑原 敦志（KUWABARA ATSUSHI）

高崎健康福祉大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：90323344

研究成果の概要（和文）：リポ蛋白質に含まれるリゾリン脂質の抗動脈硬化作用を調べた。血管内皮細胞では、HDL による抗動脈硬化作用の一部はスフィンゴシン 1 - リン酸（S1P）/S1P 受容体とアポ A/スカベンジャー受容体（SR-BI）の二つの経路で媒介された。LDL はシグナル伝達系の方であるアポ A/SR-BI 系を抑制し、S1P/S1P 受容体系は抑制しなかった。HDL 中の S1P による抗動脈硬化作用は LDL で抑制されなかった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate the antiatherogenic actions of lysophospholipid contained in lipoproteins. In the endothelial cells, the antiatherogenic actions of HDL was mediated through two signaling pathways, both sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptors and Apo A/scavenger receptor class B type I receptors (SR-BI). LDL inhibited the signal transduction system of Apo A/SR-BI, but not S1P/S1P receptors. The antiatherogenic action of S1P contained in HDL was not inhibited by LDL.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：LDL、HDL、スフィンゴシン 1 - リン酸、リゾホスファチジン酸、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

血漿中リポ蛋白質は動脈硬化症など血管病に密接に関係していることが知られている。たとえば、低密度リポ蛋白質（LDL）濃度の増加、また、高密度リポ蛋白質（HDL）濃度の低下は動脈硬化症のリスクを高めることが知られている。このように、LDL と HDL は機能的には全く正反対の作用を発揮し、LDL は動脈硬化性に、一方、HDL は抗動脈硬化性に作用する。リポ蛋白質の有するコレステロール代謝調節作用の違いがこれらの相反する作用の違いと考えられている。即ち、LDL は LDL

受容体を介してコレステロールを細胞内に送り込み、一方、HDL は余分のコレステロールを細胞から取り除き、胆汁酸として肝臓から排出する。しかし、最近の研究によるとこのようなコレステロール代謝に加え、LDL、HDL 分子がコレステロール代謝と直接関連しない様々な作用を発揮することが判ってきた。しかし、LDL と HDL がどのようなメカニズムで相反する作用を発揮するのかは不明な点が多い。私達はスフィンゴシン 1-リン酸（S1P）受容体の S1P に対する高親和性、特異性を利用した S1P の新規の定量法の開

発し、血中での S1P の分布を調べたところ、S1P は HDL、LDL などのリポ蛋白質中に濃縮されていることが判明した。そこで、コレステロール代謝と直接関連しない HDL 作用が S1P でメディエートされているとの観点から実験を行い、HDL の血管内皮細胞保護作用、遊走作用、接着分子発現抑制作用が S1P とその受容体系を介していること等を明らかにすることができた。また、血管平滑筋細胞では HDL が S1P を介して細胞遊走を抑制することを見出した。

更に、16 名の軽い高脂血症を有する患者において HDL コレステロールと HDL-S1P 濃度間に極めて高い相関関係があることなどが判明した。この結果は HDL コレステロールが高い人は HDL-S1P が高いことを意味し、HDL-S1P が抗動脈硬化作用を発揮するという考えとよく一致する。しかし、LDL 中にも S1P が存在しており、必ずしも S1P 濃度の違いだけで HDL と LDL 作用との違いを説明できないことも判ってきた。我々はこのような LDL と HDL の相反する作用は S1P の量的な違いの他に他の脂質成分が関わっている可能性を検討した。その結果、S1P と構造が類似したリソホスファチジン酸 (LPA) がリポ蛋白質中に存在し、S1P とは異なり HDL よりも LDL 中に多いこと、LPA は LDL の酸化によって著明に増加すること、細胞によっては全く相反する作用を発揮することなどを明らかにした。従って、S1P のみならず、LPA 量のバランス変化がリポ蛋白質の動脈硬化性、抗動脈硬化性を決定しているとの考えに至った。

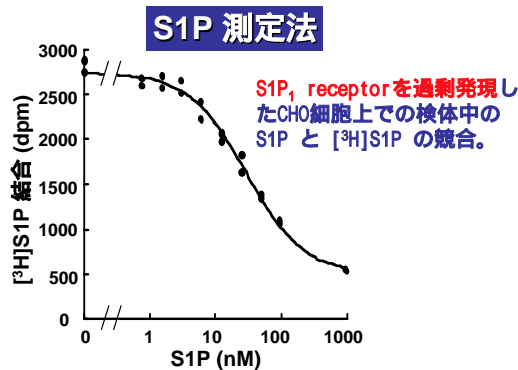
2. 研究の目的

本研究ではボランティアを募り、血中リポ蛋白質中の S1P、LPA 量と動脈硬化性、抗動脈硬化性を示す様々なリポ蛋白質作用との関係を調べ、S1P、LPA の量的なバランス変化が動脈硬化性疾患など生活習慣病の新しいバイオマーカーとなる可能性を検証する。

3. 研究の方法

リポ蛋白質の調製：

密度勾配遠心法により、比重の軽い順に、超低比重リポ蛋白質 (VLDL)、低比重リポ蛋白質 (LDL)、高比重リポ蛋白質 (HDL)、リポ蛋白質



質欠損血漿 (LPDP; アルブミン画分) に分画する。これらの検体を透析後、蛋白質量を測定し、通常、保存液中には EDTA、抗酸化剤と

して BHT を入れ酸化を防止し、氷水中で 2 週間程度保存して検体とする。

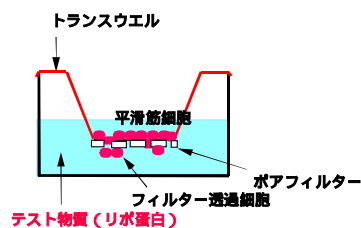
S1P ならびに LPA の測定：

S1P は S1P₁ 受容体を過剰発現した細胞上での検体 S1P と標識 S1P との競合から評価 (図参照) また、LPA は LPA₁ 受容体を過剰発現した細胞での LPA₁ 受容体活性 (cAMP 低下) から評価する。実験上の課題は全てクリアしている。

動脈硬化性ならびに抗動脈硬化性応答の解析：

動脈硬化性 (血管平滑筋細胞における細胞遊走促進活性) ならびに抗動脈硬化性 (血管平滑筋細胞における細胞遊走抑制活性、血管内皮細胞における細胞遊走促進活性、NOS 活性化、細胞接着抑制活性) の応答を解析する。

細胞遊走活性



下層にテスト物質を入れておきボアフィルターを通過する細胞をカウントする。

ヒト冠動脈平滑筋細胞を用いた遊走反応

ヒト冠動脈平滑筋細胞の遊走促進反応は動脈硬化症、血管形成術後再狭窄時の内膜肥厚に伴う特徴的な細胞応答である。LDL は細胞遊走促進、HDL は遊走抑制を起し、従来、指摘されているリポ蛋白質の病態における作用と一致する。我々は既に、LPA は LDL と同様に遊走促進、S1P は HDL と同様に遊走抑制を起すことを見出している。本研究では LPA、S1P の相反する作用の結果が反映されるこの遊走反応をリポ蛋白質の血管病リスクに対するバロメーターの一つとする。

各個体から LDL を調製し、LDL による平滑筋細胞の遊走反応 (図参照) と LPA、S1P 濃度比の関係を測定することをできるだけ多数の個体で調べ、脂質分子バランスと平滑筋細胞の遊走促進反応 (動脈硬化性) との関係を解析する。

強力な細胞遊走活性を有する PDGF 存在下における遊走抑制活性 (抗動脈硬化性) に対するリポ蛋白質作用を解析する。HDL は抑制的に機能するが、LDL では通常 (正常ヒト由来) この活性が見られない。

また、上述のように、通常、リポ蛋白質は EDTA、抗酸化剤として BHT を入れ酸化を防止した状態下、氷水中で保存して使用するが、これらの抗酸化剤を除くと、LPA が相対的に増加することを観察している。各個体から得た検体について、その操作を加えることで、時間に依存して S1P、LPA の量的なバランスを変化させることができる。このような検体

についても同様に細胞遊走を測定して、LPA、S1P 濃度比との関係を調べる。

HDL による遊走抑制活性は S1P でも観察される。しかし、LDL 中には S1P があるにもかかわらず、この抑制応答は通常観察されない。この原因は LDL 中に存在している LPA に基づくと推定している。この仮説を証明するために、LPA 分解酵素であるモノグリセリドリパーゼ処理した LDL また、血管平滑筋細胞遊走実験を LPA1 受容体アンタゴニスト存在下で行う。これらの処理によって LDL でも HDL と同様の遊走抑制効果が観察できると考えている。もし、そのような結果が得られれば、LDL 中の LPA、S1P のバランスが LDL の遊走応答の方向性（動脈硬化性、抗動脈硬化性）を決定していることの証明になる。

ヒト血管内皮細胞（HUVEC）における細胞遊走活性、NOS 活性、細胞接着抑制（抗動脈硬化性）

血管内皮細胞の細胞遊走（ポイデンチャンパー法）、NOS 活性化（アルギニンからのシトルリン産生、eNOS のリン酸抗体によるウェスタンブロッティング）、細胞接着の抑制応答（VCAM-1, ICAM-1 発現、THP-1 単球の接着）は抗動脈硬化性の応答である。これらの応答は S1P で促進し、LPA では顕著な応答はない。したがって、抗動脈硬化性の応答と考えられる。各個体から得られた各分画のリポ蛋白質と LPA、S1P 濃度比の関係を解析する。

これらの実験を通して LPA / S1P 比が高いと動脈硬化性応答が強いこと、逆の場合には抗動脈硬化性応答が強いことを確認する。

4. 研究成果

(1) 健常者ボランティアより血液を採取し、血漿を密度勾配遠心法で分離した各種リポ蛋白質中、あるいは血漿中の S1P、LPA のバランスを調べた。また、LDL と HDL の動脈硬化性（血管平滑筋細胞における細胞遊走促進活性）ならびに抗動脈硬化性（血管平滑筋細胞における細胞遊走抑制活性、血管内皮細胞における細胞遊走促進活性、NOS 活性化、細胞接着抑制活性）の活性との関係を調べた。血漿におけるサンプル取り扱いに難しさがあり、実験手順の煩雑さを解消し、スムーズに各実験を行っていく必要があることがわかった。検査として成立させるためには多数のサンプルを一度に処理できる方法の確立が必要なことわかった。

(2) 血管内皮細胞において、HDL の抗動脈硬化作用に対して、LDL がどのように働くかを調べた。HDL の抗動脈硬化作用は S1P/S1P 受容体系、ApoA/SR-B 受容体系を介して発揮されるが、LDL は S1P/S1P 受容体系は抑制せず、ApoA/SR-B 受容体系を抑制し、HDL と LDL は競合して抗動脈硬化作用を発揮していることが示唆された。

(3) 調製直後の LDL から保存可能な LPA、S1P 画分を調製した後にこれらの一連の実験を行うことも同様な結果がでることを検討しているが、LDL からの LPA、S1P 画分が不安定であることがわかった。その上で、本研究である程度確立した多数サンプル検査方法を用いて、複数の血管機能疾患患

者から得られた血漿について同時に解析し、S1P、LPA のバランス変化が動脈硬化症のバイオマーカーとなるかどうかを調べている。

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1件)

Kimura T, Tomura H, Sato K, Ito M, Matsuoka I, Im DS, Kuwabara A, Mogi C, Itoh H, Kurose H, Murakami M, Okajima F. Mechanism and role of high density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. J Biol Chem. 査読有, 285(7) 2010 4387-97

〔学会発表〕(計1件)

桑原敦志、木村孝穂他、HDL の血管内皮細胞保護作用に対する LDL の作用の解析、第 57 回日本臨床検査医学会学術集会、2010.9.12、京王プラザホテル

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 敦志 (KUWABARA ATSUSHI)

高崎健康福祉大学・保健医療学部・准教授
研究者番号：90323344

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

岡島 史和 (OKAJIMA FUMIKAZU)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：30142748