

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4月27日現在

機関番号：12301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591158
 研究課題名（和文）抗動脈硬化性脂質スフィンゴシン1-リン酸の産生制御と ABCA1 トランスポーター
 研究課題名（英文）Involvement of ABCA1 transporter in the regulation of anti-atherogenic sphingosine-1-phosphate content in plasma and high-density lipoprotein
 研究代表者
 佐藤 幸市（SATO KOICHI）
 群馬大学・生体調節研究所・准教授
 研究者番号：00302498

研究成果の概要（和文）：スフィンゴシン1-リン酸（S1P）は、血漿の高密度リポ蛋白質（HDL）に濃縮しており、抗動脈硬化作用を示す。しかし、S1P が HDL にどのように取込まれるのか全く不明である。HDL 産生の初期段階に関与する ABCA1 トランスポーターやレシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ欠損マウスの血漿 S1P の動態を解析した結果、ABCA1 トランスポーターが HDL-S1P の蓄積、維持に重要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Sphingosine 1-phosphate (S1P) is accumulated in plasma high-density lipoprotein (HDL), which induces anti-atherogenic actions in endothelial and smooth muscle cells. However, it remains uncharacterized how extracellular S1P is produced and accumulated in HDL particles. This study has focused on the relationship between S1P accumulation in HDL particles and lipoprotein formation by ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1 transporter). Our results using ABCA1 transporter-deficient and lecithin-cholesterol acyltransferase-deficient mice suggested that ABCA1 transporter may be involved in the accumulation of S1P in HDL particles.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：脂質生化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：ABCA1 トランスポーター、スフィンゴシン1-リン酸、リポ蛋白質、スフィンゴシン、HDL、抗動脈硬化性脂質、ApoA-I、スフィンゴシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) スフィンゴシン1-リン酸(S1P)は様々な細胞、組織において、細胞膜受容体(G蛋白質連関型受容体 S1P1~5)を介して生物応答

に関与する生理活性脂質である。私達は、S1Pが血中ではリポ蛋白(主に HDL)中に濃縮されていること、HDLに結合しているS1Pが循環器系や中枢神経系の細胞群において多彩な

作用を發揮し、リポ蛋白作用のメディエーターとして機能する場合があること、さらに、S1Pが血管内皮や平滑筋細胞の受容体を介して抗動脈硬化作用を示すことなどを報告してきた。また、私達は、血中のS1P濃度が反映されない中枢神経系におけるS1Pの供給機構について検討し、S1Pが脳脊髄液に含まれるHDL様蛋白質に濃縮されていることを明らかにした。このモデル実験から細胞外S1Pの蓄積には、スフィンゴシンキナーゼ活性化やApoE発現に加えて、HDLの産生を高めるシグナル分子(ABCA1トランスポーター)の関与が推定された。しかし、S1Pが新生HDL形成後に取り込まれる可能性も完全には否定できない。

(2) 血漿中のS1Pのソースは赤血球であると報告されているが、血漿中のS1Pに焦点を当てた研究であり、HDL中のS1Pには言及していない。S1Pはリポ蛋白産生を実質的に行わない細胞からも放出されることが知られており、マスト細胞(MK571)や血小板ではABCトランスポーターの関与が報告されている。また、血漿中のS1Pは血管内皮細胞が重要であるという発表もある。しかし、血管循環液中においてどのようなメカニズムでS1PがHDLに濃縮されるのかは依然不明である。

2. 研究の目的

(1) HDL粒子形成の初期段階には2つの酵素群が重要である。即ち、HDL産生細胞のABCA1トランスポーター(ABCA1)の働きによってアポ蛋白質(ApoA-I)とリン脂質/コレステロール複合体が形成され血中に新生HDL(pre β -HDL)が形成される。新生HDLは不安定であるが、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)の作用で安定化した成熟HDLに変換されて行く。従って、血漿の新生HDLにS1Pの存在が確認できれば、インビボでのS1P放出にABCA1の関与を強く示唆すると考えられた。そこで、マウス(ABCA1やLCAT欠損マウス)の血液に含まれる新生HDLや成熟HDLとS1Pの存在様式について解析した。

(2) 血中における主要なリポ蛋白産生細胞(肝細胞またはマクロファージ)を用いて、HDL(ApoA-I)とS1P複合体がどのように産生されるのかを細胞レベルで詳細に解析することによって、血漿HDLの産生と連携したS1Pの産生メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) マウスとヒトの血液に含まれるリポ蛋白質とS1Pの存在様式を以下のように解析し、HDLの産生と連携したS1Pの供給経路の有無

について検討した。

① ABCA1やLCAT欠損マウスの血液から血漿リポ蛋白質(VLDL、LDL、HDL)を分離し、ウェスタンブロットでリポ蛋白質を確認後、リポ蛋白質のプロファイルとS1Pの分布を調べた。一方、ABCA1欠損マウスのHDL画分にS1Pが検出されるか、また、野生型マウスの成熟HDLやLCAT欠損マウスの新生HDLにおけるS1Pの比活性(ApoA-I当り)を測定した。

② マウスのデータをヒト血漿HDLの場合と比較し、血中S1P濃度を調節するための標的分子としてのABCA1の重要性を考察した。ヒト血漿HDLから成熟HDL(HDL2とHDL3)や新生HDL(pre β -HDL)を分離し、S1Pの比活性を調べた。また、HDLと他のS1Pキャリア(血球やアルブミンなど)との比較することで、HDLのS1Pがどの程度血球由来なのか分析した。

(2) アストログリアを用いたモデル実験から、S1Pの細胞外蓄積には、HDLの産生に重要なABCA1の関与が推定されていたので、血漿HDLの産生と連携したS1Pの産生メカニズムを明らかにするため、細胞レベルの実験を試みた。ABCA1やLCAT欠損マウスのリポ蛋白質産生細胞(初代肝細胞、マクロファージ)を用いて、HDL様粒子(ApoA-I)産生調節に関わる生理活性物質のS1P放出活性への影響を調べた。また、ApoA-I、スフィンゴシンキナーゼやABCA1を細胞に過剰発現させS1P産生応答を調べた。

4. 研究成果

(1) 血漿リポ蛋白質とS1Pの動態解析:

① マウス血漿リポ蛋白質とS1Pの動態について解析したところ、ヒトの場合と同様にマウスの場合でもS1Pは血漿HDLに濃縮していた。ABCA1欠損マウスでは血漿HDLがないためにHDL-S1Pは検出されず、血漿S1P濃度は野生型より半減していた。しかし、血漿リポ蛋白質除去画分(LPDP:主にアルブミン)や血球画分のS1P含量は野生型、ABCA1欠損マウスで大きな差はなかった(図1、2)。

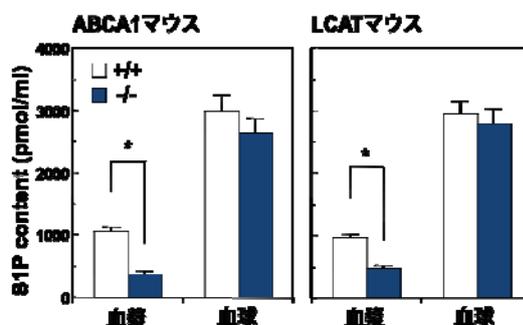


図1. マウスの血漿ApoA-IとS1P含量
ABCA1やLCAT欠損マウスの血漿S1P濃度は野生型より半減していた。しかし、血漿中S1P含量は有意な差は見られなかった。

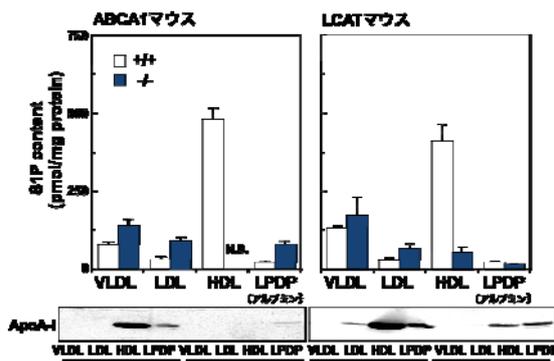


図2. ABCA1、LCAT欠損マウスの血漿HDLとS1P含量の低下

② 採取したヒトやマウスの血液をインキュベートしたところ、血球由来と考えられるS1Pの蓄積はHDL画分ではなくアルブミン画分に顕著に見られた(図3)。

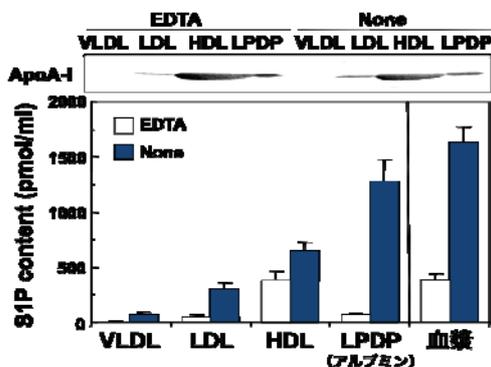


図3. 採血後に観察されるヒト血漿S1Pの濃度変化
抗凝剤無しで採血した場合、採血後に観察される血漿S1Pの蓄積はリポ蛋白質除去画分に顕著に見られた。抗凝剤有りでも、採血後37℃でインキュベーションすると同様な結果であった。

③ LCAT 欠損マウスの血漿にわずかながら含まれる新生 HDL (pre- β -HDL) 画分に S1P が検出され、その S1P 含量は ApoA-I 当りで換算すると HDL の値に近似していた(図4)。このように、新生 HDL 画分に S1P が認められたこと、ABCA1 欠損した場合の血漿 S1P 含量が半減することから ABCA1 が血漿 HDL-S1P の蓄積、維持に重要であると考えられた。

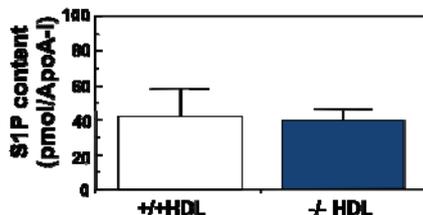


図4. LCAT欠損マウス血漿Pre β -HDL画分のS1P含量
血漿HDL画分のS1P含量はApoA-I当りで換算すると近似していた。

(2) ApoA-I の再構成と S1P の細胞外蓄積 : マウス由来のリポ蛋白質産生細胞(肝細胞やマクロファージ)を用いて ApoA-I 添加によ

る HDL 放出と連携した細胞外 S1P 蓄積を再構成実験で証明しようと試みた。しかし、スフィンゴ脂質の分解活性が高いためか、肝細胞やマクロファージにおける HDL 放出と連携した細胞外 S1P 蓄積は検出されなかった。一方、本研究課題を遂行中に S1P が血漿 HDL に含まれる ApoM に結合していることが Christoffersen 等より報告された(PNAS, 108, 9613-9618, 2011)。そこで、ApoA-I に加えて ApoM を考慮した HDL 産生と連携した細胞外 S1P 蓄積メカニズムが考えられた。

(3) 本研究で得られた成果と今後の展望 : ABCA1 欠損した場合の血漿 S1P 含量が半減すること、新生 HDL 画分に S1P が認められたこと、また、新生 HDL の安定性に ApoM が必須であることから血漿 ApoM/HDL-S1P 形成過程に連携した機構が考えられる(図5)。従って、ABCA1 が血漿 HDL-S1P の蓄積、維持に重要であると推測される。

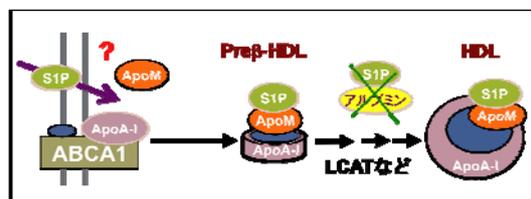


図5. まとめと考察

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 14 件)

① Mayumi Komachi, Koichi Sato, Masayuki Tobo, Chihiro Mogi, Takayuki Yamada, Hideo Ohta, Hideaki Tomura, Takao Kimura, Dong-Soon Im, Keisuke Yanagida, Satoshi Ishii, Izumi Takeyoshi, Fumikazu Okajima, An orally active lysophosphatidic acid receptor antagonist attenuates pancreatic cancer invasion and metastasis in vivo, Cancer Sci., 査読有, 2012, in press

② Xiao-Dong He, Masayuki Tobo, Chihiro Mogi, Takashi Nakakura, Mayumi Komachi, Naoya Murata, Mutsumi Takano, Hideaki Tomura, Koichi Sato, Fumikazu Okajima, Involvement of proton-sensing receptor TDAG8 in the anti-inflammatory actions of dexamethasone in peritoneal macrophages, Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有, Vol. 415, 2011, pp. 627-631

③ Shinichi Matsuzaki, Tamotsu Ishizuka, , , Hidenori Yamada, Yosuke Kamide, Takeshi Hisada, Isao Ichimonji,

Haruka Aoki, Masakiyo Yatomi, Mayumi Komachi, Hiroaki Tsurumaki, Akihiro Ono, Yasuhiko Koga, Kunio Dobashi, Chihiro Mogi, Koichi Sato, Hideaki Tomura, Masatomo Mori, Fumikazu Okajima, Involvement of proton-sensing receptor TDAG8 in the anti-inflammatory actions of dexamethasone in peritoneal macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, Vol. 413, 2011, pp. 499-503

④ Koichi Sato, Yuta Horiuchi, Ye Jin, Enkhzol Malchinkhuu, Mayumi Komachi, Toshihiko Kondo, Fumikazu Okajima, Unmasking of LPA₁ receptor-mediated migration response to lysophosphatidic acid by interleukin-1 β -induced attenuation of Rho signaling pathways in rat astrocytes, *J. Neurochem.*, 査読有, Vol. 117, 2011, pp. 164-174

⑤ Koichi Sato, Fumikazu Okajima, Role of sphingosine 1-phosphate in anti-atherogenic actions of high-density lipoprotein, *World J. Biol. Chem.*, 査読有, Vol. 1, 2010, pp. 327-337

⑥ Isao Ichimonji, Hideaki Tomura, Chihiro Mogi, Koichi Sato, Haruka Aoki, Takeshi Hisada, Kunio Dobashi, Tamotsu Ishizuka, Masatomo Mori, Fumikazu Okajima, Extracellular acidification simulates IL-6 production and Ca²⁺ mobilization through proton-sensing OGR1 receptors in human airway smooth muscle cells, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 査読有, Vol. 299, 2010, pp. L567-L577

⑦ Jin-Peng Liu, Mayumi Komachi, Hideaki Tomura, Chihiro Mogi, Alatangaole Damirin, Masayuki Tobo, Mutsumi Takano, Hiromi Nochi, Koichi Sato, Fumikazu Okajima, Each one of certain histidine residues in G-protein-coupled receptor GPR4 is critical for extracellular proton-induced stimulation of multiple G-protein-signaling pathways, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 査読有, Vol. 299, 2010, pp. H731-H742

⑧ Jin-Peng Liu, Takashi Nakakura, Hideaki Tomura, Masayuki Tobo, Chihiro Mogi, Ju-Qiang Wang, Xiao-Dong He, Mutsumi Takano, Alatangaole Damirin, Mayumi Komachi, Koichi Sato, Fumikazu Okajima, Each one of certain histidine residues in G-protein-coupled receptor GPR4 is

critical for extracellular proton-induced stimulation of multiple G-protein-signaling pathways, *Pharmacol. Res.*, 査読有, Vol. 61, 2010, pp. 499-505

⑨ 戸村秀明、茂木千尋、佐藤幸市、岡島史和、細胞外pH環境を感知するプロトン感受性GPCRの機能と作用機構、*日薬理誌*、査読有、Vol. 135、2010、pp. 240-244

⑩ Enkhzol Malchinkhuu, Koichi Sato, Tomohiko Maehama, Shogo Ishiuchi, Yuhei Yoshimoto, Chihiro Mogi, Takao Kimura, Hitoshi Kurose, Hideaki Tomura, Fumikazu Okajima, Role of Rap1B and tumor suppressor PTEN in the negative regulation of lysophosphatidic acid--induced migration by isoproterenol in glioma cells, *Mol. Biol. Cell*, 査読有, Vol. 20, 2009, pp. 5156-5165

⑪ Mayumi Komachi, Alatangaole Damirin, Enkhzol Malchinkhuu, Chihiro Mogi, Masayuki Tobo, Hideo Ohta, Koichi Sato, Hideaki Tomura, Fumikazu Okajima, Signaling pathways involved in DNA synthesis and migration in response to lysophosphatidic acid and low-density lipoprotein in coronary artery smooth muscle cells, *Vascul. Pharmacol.*, 査読有, Vol. 50, 2009, pp. 178-184

⑫ Naoya Murata, Chihiro Mogi, Masayuki Tobo, Takashi Nakakura, Koichi Sato, Hideaki Tomura, Fumikazu Okajima, Inhibition of superoxide anion production by extracellular acidification in neutrophils, *Cell. Immunol.*, 査読有, Vol. 259, 2009, pp. 21-26

⑬ Fumikazu Okajima, Koichi Sato, Takao Kimura, Anti-atherogenic actions of high-density lipoprotein through sphingosine 1-phosphate receptors and scavenger receptor class B type I, *Endocrine J.*, 査読有, Vol. 56, 2009, pp. 315-332

⑭ 岡島史和、木村孝穂、佐藤幸市、リポタンパク質作用におけるS1Pの役割とそのシグナル伝達機構、*生化学*、査読有、Vol. 81、2009、pp. 393-397

[学会発表] (計 11 件)

① 佐藤幸市、茂木千尋、岡島史和、血漿ならびにリポ蛋白質HDL中スフィンゴシン 1-リン酸量の調節におけるABCA1 トランスポーターの役割、第 84 回日本生化学会、2011. 9.

21-24、国立京都国際会館（京都府）

② 小町麻由美、佐藤幸市、戸村秀明、岡島史和、ヒト膵臓がん細胞株のインビボ浸潤・転移に対するリゾホスファチジン酸受容体アンタゴニストKi16198の経口投与による抑制作用、第53回日本脂質生化学会、2011.5.12-13、ホテル東京ガーデンパレス（東京都）

③ 小町麻由美、佐藤幸市、茂木千尋、当房雅之、山田敬之、戸村秀明、岡島史和、ヒト膵臓癌細胞株のインビボ転移・浸潤に対するリゾホスファチジン酸受容体アンタゴニストKi16198の抑制作用、BMB2010（日本分子生物学会年会、日本生化学会）、2010.12.7-10、神戸国際会議場（兵庫県）

④ Xiao-Dong He、当房雅之、茂木千尋、佐藤幸市、戸村秀明、岡島史和、糖質コルチコイドの抗炎症作用におけるTDAG8の役割、BMB2010（日本分子生物学会年会、日本生化学会）、2010.12.7-10、神戸国際会議場（兵庫県）

⑤ Hideaki Tomura, Jin-Peng Liu, Takashi Nakakura, Masayuki Tobo, Chihiro Mogi, Xiao-Dong He, Mutsumi Takano, Mayumi Komichi, Masashi Ebara, Ayaka Matsui, Koichi Sato, Fumikazu Okajima, Each one of specified histidine residues in GPR4 is important for acidic pH-induced stimulation of multiple signaling pathways、BMB2010（日本分子生物学会年会、日本生化学会）、2010.12.7-10、神戸国際会議場（兵庫県）

⑥ Koichi Sato, Enkhzol Malchinkhuu, Fumikazu Okajima, β -adrenergic agonist, isoproterenol, inhibits lysophosphatidic acid-induced glioma cell migration through the cAMP/Epac/Rap1B/PTEN-dependent signaling pathways, JSH International Symposium in Akita, 2010.7.16-17、秋田大学（秋田県）

⑦ 戸村秀明、茂木千尋、当房雅之、佐藤幸市、岡島史和、細胞外プロトンをセンスするGタンパク共役型受容体の情報変換機構と生体機能、第52回日本脂質生化学会、2010.6.14-15、森秋旅館（群馬県）

⑧ 佐藤幸市、堀内雄太、小町麻由美、岡島史和、ラットアストロサイトにおけるインターロイキン-1 β によるリゾホスファチジン

酸受容体/遊走応答系の特異的な増強作用とRhoシグナリング、第82回日本生化学会、2009.10.21-24、神戸国際会議場（兵庫県）

⑨ 小町麻由美、佐藤幸市、戸村秀明、岡島史和、ヒト膵臓癌細胞の遊走・浸潤におけるリゾホスファチジン酸受容体LPA2の役割について、第82回日本生化学会、2009.10.21-24、神戸国際会議場（兵庫県）

⑩ 戸村秀明、劉進朋、茂木千尋、小町麻由美、当房雅之、中倉敬、佐藤幸市、岡島史和、ヒト大動脈平滑筋細胞における細胞外プロトン/OGR1受容体を介したシクロゲナーゼ-2の発現のリゾホスファチジン酸による増加、第82回日本生化学会、2009.10.21-24、神戸国際会議場（兵庫県）

⑪ 劉進朋、戸村秀明、茂木千尋、小町麻由美、当房雅之、佐藤幸市、岡島史和、ヒト大動脈血管平滑筋細胞のCOX-2発現/プロスタサイクリン産生応答におけるプロトン感受性GPCRとLPA受容体のクロストーク、第51回日本脂質生化学会、2009.7.30-31、ウィルあいち（愛知県）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.gunma-u.ac.jp/index-j.html>

<http://imcr.showa.gunma-u.ac.jp/lab/signal/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 幸市 (SATO KOICHI)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：00302498

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：