

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 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790056

研究課題名（和文）ニーマンピック病 C 型の神経変性におけるアラキドン酸カスケードの関与の解明

研究課題名（英文）Role of arachidonic acid cascade on neurodegeneration in Niemann-Pick disease type C.

研究代表者

中村 浩之（HIROYUKI NAKAMURA）

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：20447311

研究成果の概要（和文）：本研究ではニーマンピック病 C 型（NPC）のアラキドン酸代謝を解析した。また NPC で蓄積が認められるスフィンゴ脂質によるアラキドン酸代謝への影響を調べ、以下の結果を得た。1) NPC 細胞では細胞質型ホスホリパーゼ A2 α （cPLA2 α ）によるアラキドン酸代謝が細胞障害性や活性酸素種（ROS）の産生に重要な役割を担っていること、2) スフィンゴミエリン（SM）やラクトシルセラミド（LacCer）が cPLA2 α の活性を直接的に調節していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the metabolism of arachidonic acid in NPC. In addition, we examined the effect of sphingolipids accumulated in NPC on the metabolisms of arachidonic acid. We showed that 1) cPLA2 α -dependent arachidonic acid metabolism plays important roles in the cytotoxicity and the ROS formation in NPC cells, 2) SM and LacCer are direct regulators of cPLA2 α .

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：アラキドン酸代謝、ニーマンピック病 C 型

1. 研究開始当初の背景

NPC は小脳失調が前景に立つ中枢神経障害を主徴とする常染色体劣性遺伝病であり、生化学的には LDL 由来コレステロールやスフィンゴ糖脂質等の後期エンドソーム/リソソームでの蓄積を特徴とする。この疾患の原因タンパク質 NPC1 の欠損マウスにおいて、活性型グリア細胞の増殖およびグリオーシスが観察されること、非ステロイド性抗炎症薬がマウスの寿命を遅延させることなどか

ら、NPC の発症・増悪に炎症反応の寄与が示唆されているが、詳細は不明である。

私たちは、本研究開始前まで、炎症性疾患に深く関与する cPLA2 α の活性制御機構の解析を行ってきた。その研究過程で、NPC で蓄積が認められるスフィンゴ脂質が cPLA2 α の活性制御に重要な役割を担うことを明らかにした。さらに、本研究に関連する予備実験を行ったところ、NPC1 欠損細胞では cPLA2 α に依存したアラキドン酸代謝の異常

亢進が観察された。従って、NPC 細胞におけるアラキドン酸代謝異常が NPC の発症・増悪の原因となり得る可能性を考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

(1) NPC 細胞におけるアラキドン酸代謝物の産生およびアラキドン酸代謝関連酵素の機能解析を行い、NPC 発症との関連性を検証する。

(2) NPC 細胞で蓄積しているスフィンゴ脂質が cPLA2 α 活性に与える影響を検討し、その詳細なメカニズムを明らかにする。本研究では特に SM 及び LacCer に焦点を当てて解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 本研究では NPC1 欠損細胞として CHO (チャイニーズハムスター卵巣由来の線維芽細胞) の変異細胞、及びヒト NPC 患者皮膚由来線維芽細胞を用いた。NPC 細胞とそのコントロール細胞における各種アラキドン酸代謝酵素の発現量をウエスタンブロットで検出し、また細胞ホモジネートでの酵素活性を測定した。放射標識したアラキドン酸で細胞をラベルした後、細胞外に遊離したアラキドン酸を測定することでアラキドン酸遊離率の測定を行った。アラキドン酸代謝物の産生は EIA 法にて検出した。コレステロール輸送阻害薬 U18666A を処理した際の細胞障害性および細胞周期への影響を、LDH 漏洩、フローサイトメトリーによりそれぞれ解析した。

(2) SM あるいは LacCer の細胞内レベルを変化させた細胞における cPLA2 α の活性を解析した。cPLA2 α 活性を直接的に制御するか否かを *in vitro* PLA2 assay により検証した。また、cPLA2 α との結合性を lipid-protein overlay assay により検証した。

4. 研究成果

(1) NPC 細胞におけるアラキドン酸代謝の変化

NPC1 欠損 CHO 細胞 (A101 細胞) およびそのコントロール細胞 (JP17 細胞) におけるアラキドン酸遊離変化を検討した。両細胞にカルシウムイオノフォア (A23187) 及びプロテインキナーゼ C 活性化剤 (PMA) の同時刺激を行ったところ、A101 細胞におけるアラキドン酸遊離がコントロール細胞に

比べて 2 倍程度上昇した (図 1)。このアラキドン酸遊離は cPLA2 α 阻害剤 (ピロフェノン) の処理により抑制された。また、アラキドン酸代謝物のプロスタグランジン E2 (PGE2) の産生も A101 細胞で上昇していた。シクロオキシゲナーゼ-1 及び 2 の発現量は両細胞で同程度だった。A101 細胞におけるアラキドン酸遊離および PGE2 の産生上昇は、リポタンパク欠損血清を含む培地で培養することで抑制された。これらの結果から、NPC 細胞ではコレステロールが蓄積することで cPLA2 α によるアラキドン酸代謝が促進されることがわかった。

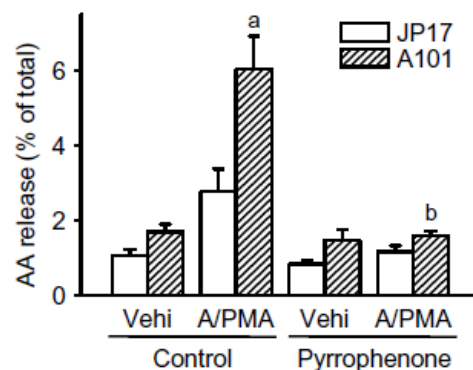
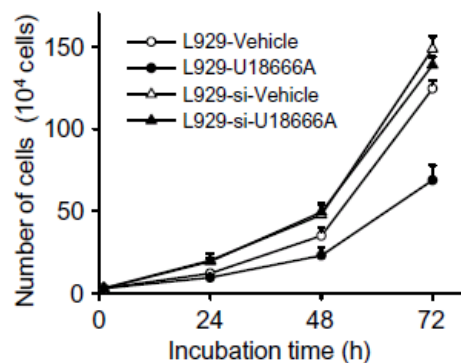


図 1. NPC 細胞におけるアラキドン酸遊離

(2) U18666A による細胞障害性における cPLA2 α の関与

マウス線維芽細胞 (L929 細胞) に U18666A を 48 時間処理すると、細胞増殖の抑制および LDH 漏洩の亢進が認められた。これらの現象は、cPLA2 α をノックダウンすることで見られなくなった (図 2)。細胞周期への影響をフローサイトメトリーにより解析したところ、U18666A 処理により G1 期から S 期への移行が遅延していることが判明した。



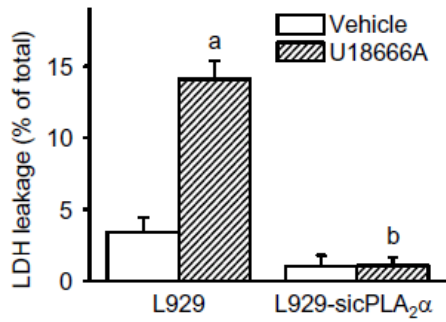


図 2. U18666A による細胞障害性

次に、U18666A による細胞障害性における ROS の関与を検討した。U18666A を処理した L929 細胞は ROS の産生が上昇しており、cPLA₂α のノックダウンにより抑制された (図 3)。また、U18666A による LDH 漏洩が NADPH オキシダーゼ阻害薬の DPI、apocynin の処理によりそれぞれ抑制された (図 4)。よって U18666A は NADPH オキシダーゼ依存的な ROS 産生を促し、細胞障害性を引き起こすこと、また、NADPH オキシダーゼの活性化は cPLA₂α を介することがわかった。以上の結果から、NPC 細胞では cPLA₂α によるアラキドン酸代謝が亢進しており、その結果として ROS の産生や細胞障害性を引き起こすことが明らかとなった。

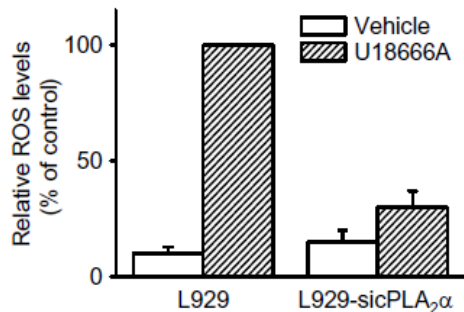


図 3. U18666A による ROS 産生

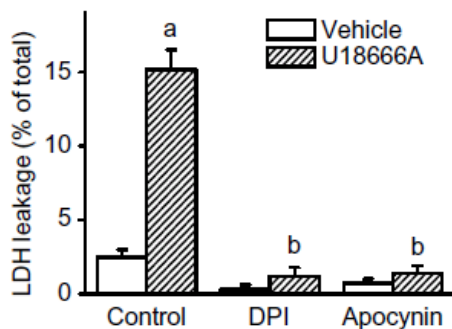


図 4. U18666A による細胞障害性における ROS の関与

(3) SM による cPLA₂α 活性制御機構

セラミド輸送タンパク CERT に変異があり、SM 合成能が欠失している CHO 細胞 (LY-A 細胞) は細胞内 SM レベルが低下している。LY-A 細胞と、そのコントロール細胞 (LY-A/hCERT 細胞) を用いてアラキドン酸遊離量の測定を行った。A23187 刺激によるアラキドン酸遊離量は LY-A 細胞ではコントロール細胞に比べて 1.7 倍程度上昇していた (図 5)。また、酸性スフィンゴミエリナーゼ阻害薬を処理し、細胞内 SM レベルを上昇させた時のアラキドン酸遊離は抑制された。従って、SM がアラキドン酸遊離を抑制することが示唆された。

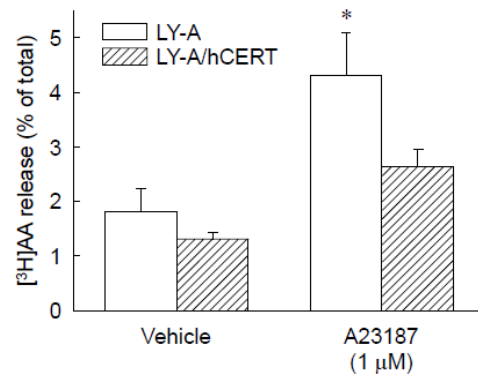


図 5. LY-A 細胞におけるアラキドン酸遊離

次に、SM の cPLA₂α 活性への影響を検討した。cPLA₂α の基質であるホスファチジルコリンのリン脂質ベジクルを用いて酵素活性を測定したところ、SM を含むリン脂質ベジクルでは酵素活性が低下した (図 6)。さらに、lipid-protein overlay assay を行ったところ、SM は cPLA₂α のグリセロリン脂質への結合を阻害した。以上の結果から、SM は cPLA₂α のグリセロリン脂質への結合を阻害することで、アラキドン酸遊離を抑制することが明らかとなった。

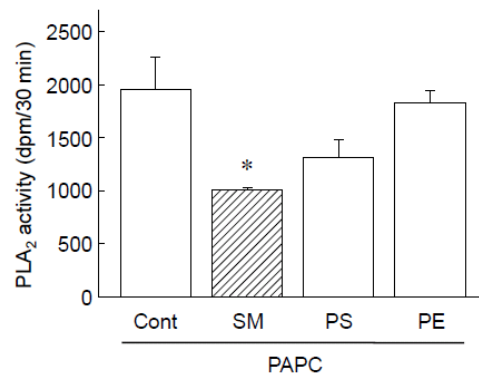


図 6. SM の cPLA₂α 活性への影響

(4) LacCerによるcPLA2 α 活性制御機構

LacCerを外因的に添加した細胞においてアラキドン酸遊離の上昇が認められ、それはピロフェノンの処理およびcPLA2 α のノックダウンによりそれぞれ抑制された。共焦点レーザー顕微鏡の観察によりLacCerはcPLA2 α の核近傍へのトランスロケーションを誘導することがわかった。また、cPLA2 α のC2ドメインのトランスロケーションも誘導した。

次に、LacCerのcPLA2 α 活性への影響を検討したところ、LacCerを含む脂質ベジクルでは酵素活性の上昇が認められた。また、lipid-protein overlay assayを行ったところ、LacCerはcPLA2 α のC2ドメインと結合することが判明した。よってLacCerはC2ドメインに結合することでcPLA2 α のトランスロケーションを誘導し、アラキドン酸遊離を引き起こすことがわかった。

腫瘍壊死因子TNF- α はcPLA2 α によるアラキドン酸遊離を誘導することが知られている。また、TNF- α はLacCerの生成を促進することも知られているため、cPLA2 α 活性化との関連性を解析した。TNF- α 刺激をしたL929細胞ではLacCerの生成およびアラキドン酸遊離の亢進が認められた。このアラキドン酸遊離の亢進はグルコシルセラミド合成酵素の阻害薬(PPMP)の処理により抑制された。また、TNF- α によるcPLA2 α のトランスロケーションもPPMPが抑制した。以上の結果から、TNF- α はLacCerの生成を促進して、cPLA2 α を活性化することがわかった。

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6件)

- 1) 中村浩之、安福加菜、牧山智彦、松本生、藤野裕道、村山俊彦、Arachidonic acid metabolism via cytosolic phospholipase A2 α induces cytotoxicity in Niemann-Pick disease type C cells, *J Cell Physiol*, 査読有、277、2012、2847-2855
- 2) 濱田由梨、加藤恵利奈、中村浩之、藤野裕道、松本健次郎、田嶋公人、堀江俊治、村山俊彦、Decrease of guanylyl cyclase b1 subunit and nitric oxide (NO)-induced relaxation in mouse rectum with colitis and its reproduction on long-term NO treatment, *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 査読有、385、2012、81-94
- 3) 中村浩之、多田詠子、牧山智彦、安福加菜、村山俊彦、Role of cytosolic phospholipase A2 α in cell rounding and

cytotoxicity induced by ceramide-1-phosphate via ceramide kinase, *Arch Biochem Biophys*, 査読有、512、2011、45-51
4) 中村浩之、脇田樹男、菅波晃子、田村裕、花田賢太郎、村山俊彦、Modulation of the activity of cytosolic phospholipase A2 α (cPLA2 α) by cellular sphingolipids and inhibition of cPLA2 α by sphingomyelin, *J Lipid Res*, 査読有、51、2010、720-728

5) 牧山智彦、長坂伸夫、北條裕也、山浦えりか、中村浩之、小出友紀、西田篤司、村山俊彦、Newly synthetic ceramide-1-phosphate analogs; their uptake, intracellular localization, and roles as an inhibitor of cytosolic phospholipase A2 α and inducer of cell toxicity, *Biochem Pharmacol*, 査読有、80、2010、1396-1406
6) 多田詠子、豊村香織、中村浩之、佐々木弘恒、斎藤健、金子雅幸、大熊康修、村山俊彦、Activation of ceramidase and ceramide kinase by vanadate via a tyrosine kinase-mediated pathway, *J Pharmacol Sci*, 査読有、114、2010、420-432

[学会発表] (計20件)

- 1) 豊村香織、斎藤健、江森俊介、松本生、加藤恵利奈、金子雅幸、大熊康修、中村浩之、村山俊彦、HSP90阻害剤 Geldanamycinのセラミド代謝に対する影響、日本薬学会第132年会、2012年3月30日、札幌
- 2) 佐々木弘恒、中村浩之、多田詠子、豊村香織、村山俊彦、セラミダーゼ活性化制御機構の解明、日本薬学会第132年会、2012年3月29日、札幌
- 3) 山崎璃沙、松澤康雄、川島辰男、大竹翔、高島護、中村浩之、藤野裕道、村山俊彦、TGF- β 1刺激時のヒト肺線維芽細胞におけるS1Pの相互的役割、第85回日本薬理学会年会、2012年3月16日、京都
- 4) 牧山智彦、中村浩之、村山俊彦、コレステロール除去によるマスト細胞スフィンゴ脂質代謝及び脱顆粒反応への影響、第85回日本薬理学会年会、2012年3月14日、京都
- 5) 中村浩之、森山友太、牧山智彦、村山俊彦、ラクトシルセラミドによる細胞質型ホスホリパーゼA2 α 活性化機構、第84回日本生化学大会、2011年9月22日、京都
- 6) 牧山智彦、中村浩之、西田篤司、村山俊彦、細胞質型ホスホリパーゼA2 α 阻害作用を持つC1P誘導体の探索研究、生体機能と創薬シンポジウム2011、2011年9月1日、東京
- 7) 藁谷未沙、安福加菜、牧山智彦、中村浩之、藤野裕道、村山俊彦、ニーマンピック病C型におけるアラキドン酸代謝の検討、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2011、

2011年8月31日、東京

8) 村山俊彦、藤野裕道、中村浩之、潰瘍性大腸炎誘発マウスでの消化管運動制御シグナル変化、第10回生命科学研究会、2011年6月24日、高崎

9) 野村涼也、中村浩之、藤野裕道、堀江俊治、村山俊彦、分泌型ホスホリパーゼA2の腸管自発性運動機能への影響と潰瘍性大腸炎モデル動物での変動解析、第124回日本薬理学会関東部会、2011年6月4日、東京

10) 江森俊介、中村浩之、藤野裕道、村山俊彦、ニーマンピック病C型モデル細胞における細胞内遊離コレステロール蓄積に対するスフィンゴ脂質の関与、第124回日本薬理学会関東部会、2011年6月4日、東京

11) 山崎璃沙、松澤康雄、川島辰男、大竹翔、山浦えりか、中村浩之、藤野裕道、村山俊彦、TGF- β 1刺激による肺細胞繊維化とS1Pの関与、第124回日本薬理学会関東部会、2011年6月4日、東京

12) 牧山智彦、中村浩之、西田篤司、村山俊彦、細胞質型ホスホリパーゼA2 α 選択的阻害作用を有するセラミド-1-リン酸誘導体、第84回日本薬理学会年会、2011年3月24日、横浜

13) 安福加菜、中村浩之、藤野裕道、村山俊彦、ニーマンピック病C型における細胞質型ホスホリパーゼA2由来のアラキドン酸遊離の増加、第84回日本薬理学会年会、2011年3月23日、横浜

14) 村山俊彦、中村浩之、多田泳子、安福加菜、牧山智彦、セラミド-1-リン酸による細胞障害性における細胞質型ホスホリパーゼA2 α の役割、第84回日本薬理学会年会、2011年3月22日、横浜

15) 中村浩之、森山友太、藤野裕道、村山俊彦、ラクトシルセラミドによる細胞質型ホスホリパーゼA2活性化機構の解明、第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会合同大会、2010年12月10日、神戸

16) 松本生、中村浩之、藤野裕道、村山俊彦、ニーマンピック病C型モデル細胞におけるスフィンゴ糖脂質合成能の変化、第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会合同大会、2010年12月10日、神戸

17) 加藤恵利奈、中村浩之、藤野裕道、村山俊彦、潰瘍性大腸炎マウスにおけるVIP応答性消化管運動変化、第12回応用薬理シンポジウム、2010年9月19日、横浜

18) 豊村香織、佐々木弘恒、中村浩之、村山俊彦、バナデート刺激によるセラミダーゼ、セラミドキナーゼの活性化、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2010、2010年9月11日、京都

19) 牧山智彦、中村浩之、長坂伸夫、北條裕也、西田篤司、村山俊彦、cPLA2 α 阻害作用を有する新規セラミド-1-リン酸誘導体、次世

代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2010、2010年9月11日、京都

20) 藤野裕道、織戸貴史、中村浩之、川島辰男、村山俊彦、インドメタシンの新たな抗癌機構の解明：シクロオキシゲナーゼ阻害非依存的作用の探索、第9回生命科学研究会、2010年6月25日、つくば

〔図書〕(計1件)

中村浩之、村山俊彦、千葉大学出版、薬学の世界をのぞく「体に欠かせない存在“脂質”」千葉学ブックレット；千葉の健康-6、2010、2

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：セラミド誘導体およびこれを用いたゴルジ体標識化プローブ

発明者：西田篤司、中村浩之、牧山智彦、村山俊彦

権利者：国立大学法人 千葉大学

種類：特許

番号：特願2011-177720号

出願年月日：2011年8月15日

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/hinka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 浩之 (HIROYUKI NAKAMURA)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：20447311