

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780344

研究課題名(和文)セラミドキナーゼによるマクロファージ細胞機能調節機構の解明

研究課題名(英文)Study on the role of ceramide kinase in the macrophage-function

研究代表者

光武 進 (Mitsutake, Susumu)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：10344475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：慢性的炎症は、肥満症の初期発症ステップに関与する。セラミドキナーゼはセラミドをリン酸化する酵素でセラミド1-リン酸を生成する。我々はセラミドキナーゼ遺伝子欠損マウスを用いてセラミドキナーゼの肥満への関与を調べた。そして、セラミドキナーゼ遺伝子欠損が食事誘導性肥満や耐糖能異常を強く抑制する事を見いだした。さらに、セラミドキナーゼの欠損は、マクロファージが脂肪組織に浸潤する際に重要なMCP-1/CCR2シグナルを抑制し、その結果として脂肪組織の炎症と、それに続く肥満症、糖尿病の発症を抑える事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Chronic and low-grade inflammation is associated with the initial steps of obesity. Ceramide kinase (CERK) is an enzyme which phosphorylates ceramide to produce ceramide 1-phosphate. Recently, evidence has emerged that CERK has a role in inflammatory signaling of immune cells. Since obesity is accompanied with chronic, low-grade inflammation, we examined whether CERK might be involved using CERK-null mice. We determined that CERK deficiency suppresses diet-induced increases in body weight, and improves glucose intolerance. Furthermore, we demonstrated that CERK deficiency attenuates MCP-1/CCR2 signaling in macrophages infiltrating adipose tissue, resulting in the suppression of inflammation in adipose, which might otherwise lead to obesity and diabetes.

研究分野：境界農学

科研費の分科・細目：応用分子細胞生物学

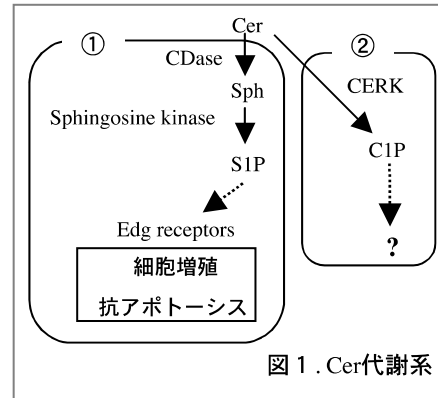
キーワード：ceramide ceramide kinase ceramide 1-phosphate MCP-1 obesity diabetes

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質は、コレステロールやグリセロリン脂質と並んで細胞膜を構成する主要な脂質成分として知られていた。しかし近年、その中のいくつかの分子は、細胞内セカンドメッセンジャーや細胞外脂質メディエーターとして、様々な生命現象に関わる事が明らかになってきた。その一つ、セラミド (Cer) は、細胞内脂質セカンドメッセンジャーとして細胞周期の停止やアポトーシスの誘導に関与することが明らかになり、抗がん剤開発等創薬のターゲットとしても注目を集めてきた。しかし、Cerの細胞内における直接のターゲット分子が同定されていないため、Cerの代謝産物や代謝酵素のCerシグナルにおける役割も重要視されつつある。つまり、Cerの代謝酵素の詳細な解析が、Cerシグナリングを理解する上で重要であると考えられる。一方、近年の網羅的な脂質メタボローム解析の結果、Cerが加齢や肥満によってマクロファージに蓄積する事が明らかになり、Cerの蓄積と動脈硬化等の循環器系疾患との関係が報告されはじめた。以前から図1のに見られるCDaseによるCerの異化経路が知られていた。近年図1の経路を担うセラミドキナーゼ (CerK) が発見されCerの新たな代謝経路として注目を集めている。しかしながら、これまでCerKと循環器系疾患に関する研究は皆無である。我々は、これまでCerKの研究を行い本酵素が、マスト細胞のCa<sup>2+</sup>依存的な脱顆粒に関与しており (Mitsutake S. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 17570-17577, 2004)、その活性化にはCa<sup>2+</sup>/calmodulinが関与している事を初めて明らかにした (Mitsutake S. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **280**, 40436-40441, 2005)。これらの発見を契機にCerKは、国内外様々な研究者によって研究された。さらに我々は世界に先駆けてCerK欠損マウスの性状解析を行い報告した (Mitsutake S. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res.*

*Commun.*, **363**, 519-524, 2007)。しかしながら、CerK欠損マウスは通常状態では目立った表現系を示さない事からCerKの生理的役割は、CerK欠損マウスの更なる解析を待たなければならなかった。



### 2. 研究の目的

我々のグループは、世界に先駆けてCerKがアレルギーや慢性的な炎症に関わる事を明らかにした。一方、近年、他のグループからも、炎症応答におけるCerKの役割が発表されるようになってきた。近年、食の欧米化に伴い肥満症や糖尿病は日本でも社会的な問題になってきた。メタボリック症候群は、肥満、脂肪肝、糖尿病、動脈硬化等が複合的に起こる病態概念で、中性脂質の蓄積を伴う事が知られている。メタボリックシンドロームに陥らない為には、肥満を未然に防ぐ事が重要と考えられる。肥満症の初期のプロセスには、低強度の慢性的な炎症を伴う事が知られる。肥満や動脈硬化といった病態は、様々な細胞が絡み合って起こる現象であって単一の細胞実験で十分に理解する事は難しい。そこで、我々は、CerK欠損マウスを保有する強みを生かし、*in vivo*の実験系と細胞レベルの実験系の両方を行い、CerKの肥満時炎症での役割を検討する事にした。これによりまだまだ謎の多いCerKの生理的な機能に迫りたいと考えた。CerKの生理機能解明は、これまで謎であったCerシグナリング解明に向けた重要な情報を提供する事も考えられ意義深いと考えた。

### 3. 研究の方法

#### 食餌誘導性肥満モデルを用いた解析

CerK 欠損マウスの食餌誘導性肥満モデルにおける解析を行った。更に脂肪組織に浸潤したマクファージの数、大きさ、サイトカイン放出能等、肥満や炎症に関わる因子を調べ、これらの基本的な解析により CerK と肥満性炎症との関与を明らかにする事を試みた。

#### CerK とマクロファージの機能の関与を細胞内シグナル伝達の解析を中心に検証

CerK ノックアウトマウス由来マクロファージや、株化マクロファージを用いて、CerK/C1P と CCR2 シグナルを検証し、細胞レベルでの CerK の機能解析を行った。

### 4. 研究成果

#### 食餌誘導性肥満モデルを用いた解析

CerK の機能解析として、肥満や糖尿病、メタボリックシンドロームへの関与を解析する為に食事誘導性肥満の実験を行った。Fig.1 は、4 週齢の CERK-KO マウス (CK<sup>-/-</sup>) と野生型 (WT) マウスに高脂肪食 (HFD, 60%fat) とコントロール食 (ND) を与え、14 週までの体重変化を計測した。その結果、興味深い事に、CERK-KO マウスは、WT マウスに比べて体重増加が緩やかである事が解った。さらにこれらのマウスの耐糖試験を行ったその結果、CERK-KO マウスは HFD によって誘導される耐糖能の異常を回避する事が明らかになった (Fig.2)。

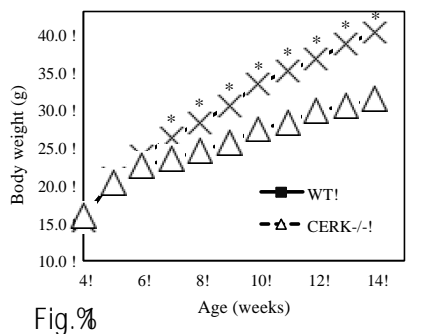


Fig.1

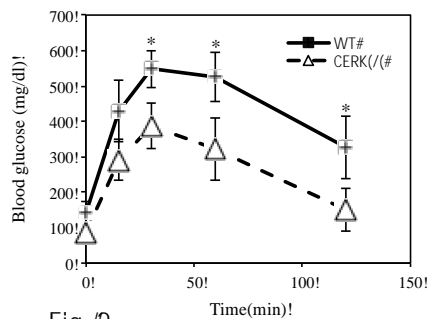


Fig.2

最近、CERK が脂肪滴の形成に関わっている事や血管新生に関わっている事が報告された。脂肪組織の増大は、脂肪細胞への脂質の蓄積と脂肪滴の増大、脂肪組織自体の増大の為に血管新生を伴う事などが知られている。そこで、我々はそれぞれの精巣上体の脂肪組織を解析した。Fig.3 に示す様に脂肪組織の切片を観察し、脂肪組織の面積を計測した。その結果、CERK-KO マウスでは、比較的小さな脂肪細胞が多く、脂肪細胞の増大が抑えられている事が明らかになった。近年、肥満を伴うメタボリックシンドロームの脂肪組織では、マクロファージの脂肪組織への浸潤と、脂肪組織内で、脂肪細胞を取り囲み crown-like structure (CLS) と呼ばれる炎症部位を形成する事が知られている。そこで切片を抗 F4/80 抗体で染色し、脂肪組織に侵入したマクロファージを調べた。その結果、興味深い事に CERK-KO マウスでは CLS (Fig.4; 白矢印) の形成が殆ど観察されなかった。

#### 脂肪組織

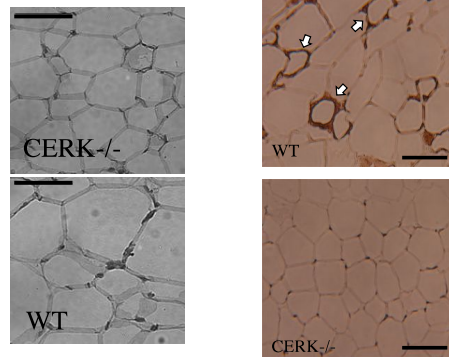


Fig. 3

Fig. 4

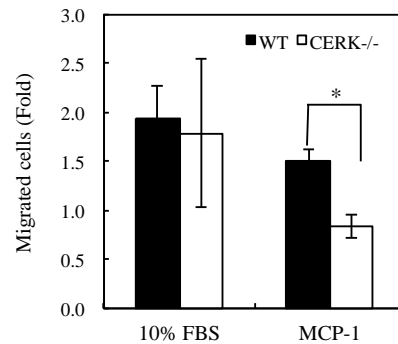


Fig. 5

マクロファージの脂肪組織への浸

潤にはケモカインの一つ MCP-1 による化学遊走が重要な役割を持つ事が知られている。次に、CERK-KO マウスから調製した骨髄由来マクロファージの諸性質を調べた。WT と CERK-KO マウスから単離したマクロファージは、前駆細胞から同じ様に分化し、貪食能、細胞接着に関しても大きな違いは見られなかった。しかし、ボイデンチャンバーを用いた化学遊走実験で、CERK-/-マウス由来マクロファージは MCP-1 に対する走化性が落ちている事が確認された (Fig.5)。つまり、CerK は、MCP-1 のシグナル伝達の調節に関わっている事が示された。最終的には CERK の欠損により、単球 / マクロファージの脂肪組織への侵入が防がれ、それによって引き続き起こる慢性的な炎症が抑えられている事が判った (Fig.6)。

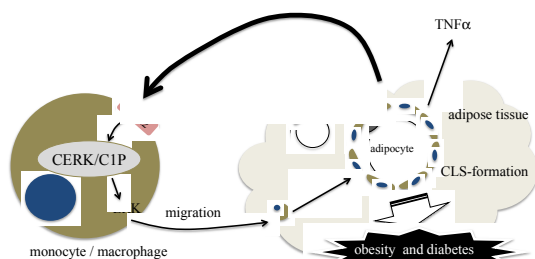


Fig. 6

## 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 8 件)

I. Murakami, S. Mitsutake\*, N. Kobayashi, J. Matsuda, A. Suzuki, T. Shigyo, Y. Igarashi, 2013年  
Oral administration of phytosphingosine improves high-fat diet-induced glucose intolerance  
*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **77**: 194-197  
(査読有り)

K. Zama, S. Mitsutake\*, K. Watanabe, T. Okazaki, and Y. Igarashi, 2012 年  
A sensitive cell-based method to screen for selective inhibitors of SMS1 or SMS2 using HPLC and a fluorescent substrate  
*Chemistry and Physics of Lipids* **165**:

760-768

S. Mitsutake\*, T. Date, H. Yokota, M. Sugiura, T. Kohama, Y. Igarashi, 2012 年  
Ceramide kinase deficiency improve diet-induced obesity and insulin resistance  
*FEBS Letters* **586**: 1300-1305  
(査読有り)

S. Mitsutake\*, K. Zama, H. Yokota, T. Yoshida, M. Tanaka, M. Mitsui, M. Ikawa, M. Okabe, Y. Tanaka, T. Yamashita, H. Takemoto, T. Okazaki, K. Watanabe, and Y. Igarashi, 2011 年  
Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes  
*Journal of Biological Chemistry* **286**: 28544-28555 (査読有り)

[学会発表](計 10 件)

“SMS2 is implicated as a novel regulator of lipid microdomain structure and function”

S. Mitsutake, K. Zama, T. Yoshida, H. Takemoto, T. Okazaki, Y. Igarashi "Glycolipid & Sphingolipid Biology" 2012 Gordon Research Conferences  
Lucca, Italy, April 22 - 27, 2012, (Selected speaker)

[図書](計 2 件)

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

光武 進 (Mitsutake Susumu)  
佐賀大学農学部・准教授  
研究者番号: 10344475

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし