

博士論文

脂肪細胞においてスフィンゴシン 1 リン酸がプラスミノー
ゲンアクチベーターインヒビター1 の産生に与える影響に
ついての検討

高橋 千春

脂肪細胞においてスフィンゴシン 1 リン酸がプラスミノー ゲンアクチベーターインヒビター1 の産生に与える影響に ついての検討

所属

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻臨床病態検査医学分野

指導教員

矢富 裕 教授

申請者

高橋 千春

目次

要旨	1
略号リスト	2
序文	3
方法	14
結果	25
考察	43
謝辞	64
文献	65

【要旨】

スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) は、血管拡張作用や血管内皮結合性維持などの抗動脈硬化作用を有する一方で、脂肪細胞ではプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1) の産生を増加させる催動脈硬化作用も報告されている。

S1P は循環血漿中では高比重リポ蛋白上のアポ蛋白 M (ApoM) あるいはアルブミンを運搬体として存在している。本研究では、成熟脂肪細胞において、ApoM 結合 S1P が、アルブミン結合 S1P と比較して、S1P 受容体 2→NF-κB 経路の活性化作用が弱く、結果として PAI-1 発現誘導効果が小さい可能性を示した。S1P は、PAI-1 の産生を促進するが、その作用は S1P の運搬体により異なると考えられた。

【略号リスト】

ACS: acute coronary syndrome

ApoM: apolipoprotein M

GPCR: G protein-coupled receptor

HPLC: high-performance liquid chromatography

NCA: normal coronary artery

PA: plasminogen activator

PAI-1: plasminogen activator inhibitor 1

PKC: protein kinase C

PLC: phospholipase C

rApoM: recombinant apoM

ROCK: Rho-associated protein kinase

SAP: stable angina pectoris

SphK: sphingosine kinase

S1P: sphingosine 1-phosphate

S1PR: sphingosine 1-phosphate receptor

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

TGF β : Tumor Growth Factor β

【序文】

血栓症は、わが国を含めた全世界において未だに致死率の高い病態であり、その発症起序、危険因子の解明が重要な課題となっている^{1,2}。心筋梗塞、脳梗塞に代表されるアテローム血栓症は、動脈の粥状硬化により血管壁が障害され、結果的に内腔が狭小化した血管に血小板血栓が形成される病態である。一方で、深部静脈血栓症に代表される静脈血栓症は、手術、外傷、長期臥床などが原因となり、血液の停滞、血管内膜の損傷、血液凝固能亢進が引き起こされ、フィブリン血栓が形成される病態である。いずれも致死率の高い病態である。

さて、このような血栓症を引き起こす凝固反応を制御する重要な因子の一つとして、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1; PAI-1) がある。健常状態では、血液中で形成された血栓は、線溶因子が十分に働くことで溶解され、過剰な血栓形成が起こらない制御機構が存在する。このような制御機構に重要な線溶因子であるプラスミノゲンアクチベーター (Plasminogen Activator; PA) は、プラスミノゲンをプラスミンに変換することにより活性化させ、線溶系を開始させる役割がある。PAI-1 は、PA と結合することにより線溶系を抑制し、血栓の溶解を遅らせる³。すなわち、血液中の PAI-1 濃度の増加は、血栓症の誘因と考えられる (図 1)。

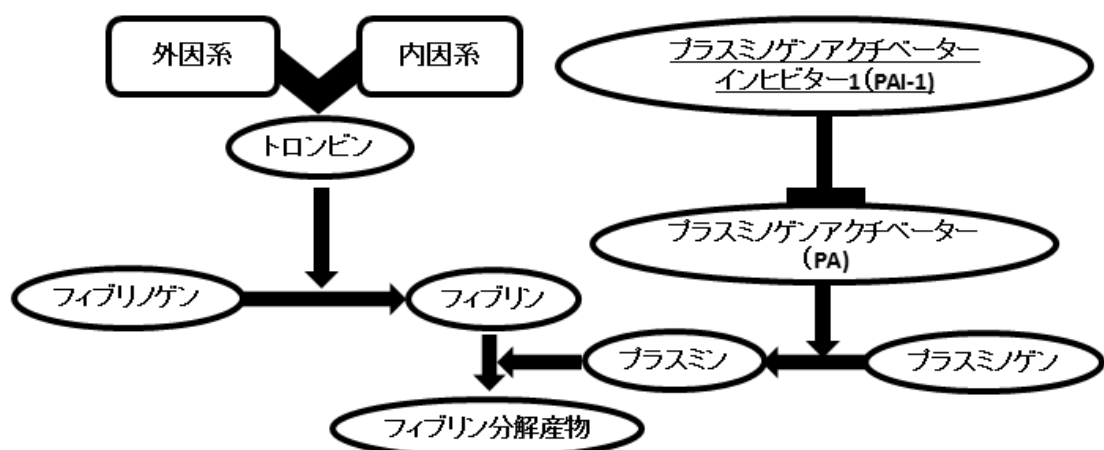


図1 止血線溶カスケード

プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1) の濃度が上昇すると、プラスミノゲンアクチベーター (PA) の作用が抑制され、プラスミンの産生が低下する。

このように血栓促進因子として重要な PAI-1 は、主に脂肪組織で産生されると報告されており⁴、内臓脂肪の蓄積に伴って脂肪組織における PAI-1 遺伝子発現量が増加し、血液中の PAI-1 濃度も上昇することが確認されている⁵。また、心血管疾患患者において血漿 PAI-1 濃度が上昇しているという報告も複数ある⁶⁻⁸。以上より PAI-1 は、肥満と血栓症を関連付ける重要な悪玉アディポサイトカインであると考えられる。

近年、脂肪細胞における PAI-1 発現の制御因子として様々な候補が挙げられている。その中には、腫瘍壊死因子 α (TNF α)⁹、腫瘍成長因子 β (TGF β)¹⁰、グルコース¹¹、インスリン¹²、低酸素⁸などが含まれるが、スフィンゴシン1リン酸 (S1P) という生理活性脂質も PAI-1 の発現を誘導すると報告されている¹³。

S1P は、構造上、リゾリン脂質という脂質グループに分類される。リゾリン脂質とは、細胞膜を構成するリン脂質から派生した脂質であり、1 本の長い疎水基と 1 つの親水基からなる脂質の総称である。その両親媒性という性質により、高濃度では特に強い界面活性作用を有する。S1P は、スフィンゴ脂質性のリゾリン脂質である（図 2）。

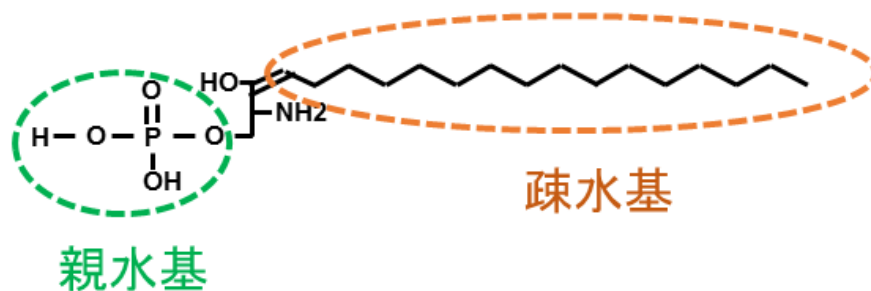


図 2 S1P の構造

S1P は、生体内の広範囲の細胞で産生されるが、赤血球や血小板などの一部の細胞を除いてその多くが分解されてしまうため、細胞内における S1P 濃度は低い¹⁴。S1P の産生は、細胞内の小胞体において、セリンとパルミトイル CoA が縮合することにより始まり、生成されたジヒドロスフィンゴシンに脂肪酸がアミド結合し、ジヒドロセラミドを経て、セラミドが生成される (*De novo* 合成)。あるいは細胞膜を構成するスフィンゴミエリンがスフィンゴミエリナーゼにより分解されることによりセラミドが生成される。これらのセラミドが、セラミダーゼにより脱アシル化されてスフィンゴシンとなり、さらにスフィンゴシンキナーゼ (SphK) により、スフィンゴシンの 1 位の水酸基がリン酸化され、S1P

が産生される（図 3）。

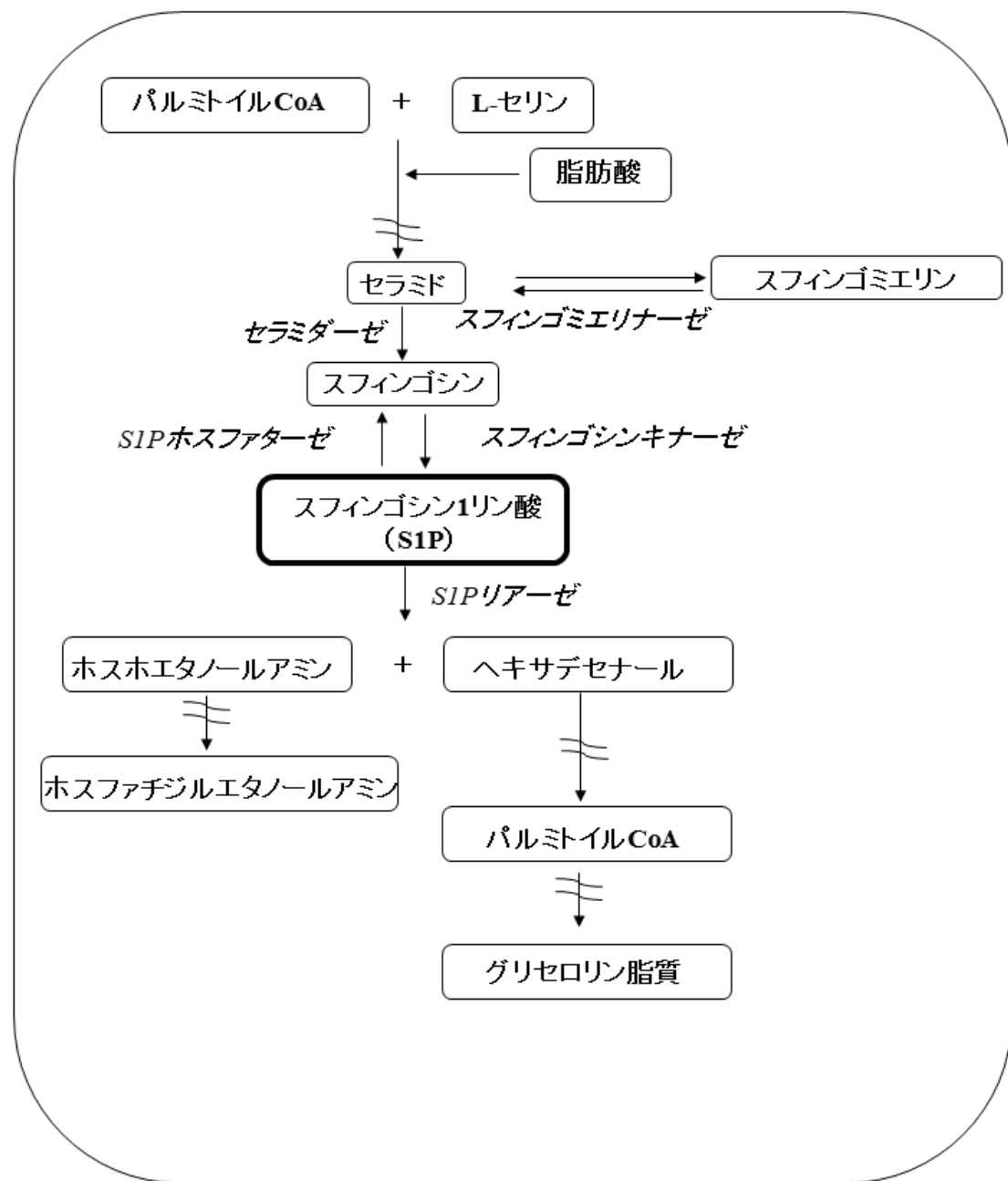


図 3 細胞内におけるスフィンゴシン 1 リン酸の産生、分解経路

この S1P の産生過程において律速酵素となる SphK は、現在までに SphK1 と SphK2 の 2 種類のサブタイプが同定されている¹⁵。産生された S1P は、主にリ

ソームにおいて S1P リアーゼの働きによりホスホエタノールアミンと、ヘキサデセナールに分解され、やがてグリセロリン脂質へと代謝される。このように S1P は、発見当初は、スフィンゴ脂質とグリセロリン脂質の中間代謝産物と考えられていたが、近年では、細胞内におけるセカンドメッセンジャーとしての役割に加えて、ABCA1、ABCB1、ABCG2、ABCC1 などの ABC トランスポーターや Spinster 2 (Spns2) により細胞内から循環血液中へ放出され、細胞の外から細胞膜に存在する G 蛋白質共役受容体 (GPCR) に結合するリガンドとしての役割が注目され、強力な生理活性を発揮する脂質メディエーターと考えられている¹⁴。

現在、S1P の特異的 GPCR として、5 種類の S1P 受容体 (S1PR) が同定されている (表 1)。S1PR1、2、3 は広範囲にわたる組織において発現していることが確認されている一方で、S1PR4 は胸腺や脾臓、肺など、S1PR5 は神経組織、皮膚などに発現が限局していると報告されている¹⁶。さらに、各 S1PR によって共役する G 蛋白質、伝達される下流のシグナルが異なることが報告されている¹⁴。すなわち、S1PR1 は主に G_i と共役し、下流の Ras/ERK や PI3K/Akt カスケードを活性化して、細胞増殖や細胞遊走を亢進させるのに対して、S1PR2 は $G_{12/13}$ との共役が最も優勢であり、Rho/ROCK 経路を活性化して、細胞遊走の抑制や収縮反応の促進といった生物学的作用を有する¹⁶。また、S1PR3 は、S1PR2 と

同様に様々な G 蛋白質と共役しているが、S1PR1 と同じ共役 G 蛋白質である G_i に加えて、PLC/ Ca^{2+} を活性化させることにより細胞増殖や細胞遊走を亢進させる G_q とも強く共役していると報告されている^{14,17}。

A

S1P受容体	共役G蛋白	受容体発現部位
S1PR1 (Edg1)	G_i	広範囲の組織
S1PR2 (Edg5/H218)	$G_{12/13}$, G_i, G_q	
S1PR3 (Edg3)	G_q, G_i, $G_{12/13}$,	
S1PR4 (Edg6)	G_i , $G_{12/13}$	胸腺、脾臓、肺
S1PR5 (Edg8)	G_i , $G_{12/13}$	脳、皮膚

B

共役G蛋白	下流シグナル	主な生体機能
G_i	Ras-ERK、PI3K-Akt/Rac	細胞増殖↑、細胞遊走↑ 血管拡張
$G_{12/13}$	Rho/ROCK	細胞増殖↓、細胞遊走↓ 血管収縮
G_q	PLC/ Ca^{2+}	細胞増殖↑、細胞遊走↑ 血管拡張

表 1 現在までに同定されている S1P 受容体

A : S1P 受容体の種類とその共役 G 蛋白、受容体発現部位（太字は優位に働く共役 G 蛋白）

B : 共役 G 蛋白とその下流シグナル、関連する生体機能

このように、活性化する **S1PR** の種類により、**S1P** は少なくとも部分的に相反する作用を発揮し、特に細胞遊走、細胞増殖といった点においては実際に様々な検討が報告されている。例えば、2003 年には、ラット肝細胞において、**S1P** が **S1PR2-Rho** 経路を活性化させることにより細胞増殖を抑制するという結果から、肝臓の再生に対して **S1P** は負の制御因子である可能性が示された¹⁸。また、**S1PR2** のみが発現しているマウスメラノーマ細胞において、**S1P** は **RhoA** の活性化を亢進させ、**Rac** の活性化を抑制することにより細胞遊走を抑制する作用を発揮し、この作用によりマウス体内におけるメラノーマの血行性転移を抑制すると報告された。同報告では、**S1PR2** の過剰発現により、さらに **S1P** の転移抑制効果が強くなり、一方で **S1PR1** の過剰発現においては、転移抑制効果が減弱したとも報告されており¹⁹、悪性腫瘍の転移という点においても、活性化される **S1PR** のサブタイプの違いが深く関連していると考えられる。同様に、**S1PR2** の活性化は、**S1PR1**、3 の活性化とは反対に、**Rac** の活性化を抑制することにより、血管内皮細胞の形態形成、血管新生に対して抑制的に働くとも報告されている²⁰。

動脈硬化症・血栓症の分野における **S1P** の報告は、抗炎症作用²¹や血管拡張作用²²、さらに血管内皮細胞のバリア機能亢進作用などの抗動脈硬化作用が多く報告されているが、この作用は **S1PR1**、3 を介した作用と考えられている²³⁻²⁵。

一方で、線溶抑制因子である PAI-1 の産生に関しては、S1P は S1PR2 を介して PAI-1 の産生を促進すると報告され^{8,13}、抗動脈硬化作用に加えて催動脈硬化作用を有するとも考えられている。すなわち、S1P の動脈硬化に対する両極性の作用は、S1PR の種類により異なると考えられてきた。

ところで、主にアルブミンと結合していると考えられている他のリゾリン脂質と異なり、S1P は、約 65%が高比重リポ蛋白 (HDL) に結合して運搬され、約 30%がアルブミン、残りは低比重リポ蛋白 (LDL) や超低比重リポ蛋白 (VLDL) などに結合して運搬されている^{26,27}。さらに、S1P が HDL 上に存在するマイナーアポ蛋白であるアポ蛋白 M (ApoM) により運搬されていることが解明された^{28,29}。S1P の生物学的作用についての基礎研究のほとんどにおいて、アルブミンを運搬体とした S1P が細胞に投与されてきた。しかし近年では、S1P の運搬体による生物学的作用の相違についての報告がされ始めている。例えば、HDL/ApoM 結合 S1P が、アルブミン結合 S1P と比較して、膵臓β細胞におけるインスリンの分泌を増加させる³⁰、血管内皮細胞のバリア機能を強める³¹といった報告などがある。さらにアルブミン結合 S1P ではなく、HDL/ApoM 結合 S1P が、リンパ球産生や中枢神経系の炎症を抑制するといった報告がされ始めている³²。以上のように、多様な細胞において、S1P の運搬体による作用の相違が報告されている背景から、動脈硬化性疾患における S1P の両極性の作用において

も、S1P の運搬体の違いが関与しているのではないかと考えた。実際に、冠動脈疾患を有する患者において、HDL 結合 S1P 濃度がアルブミン結合 S1P 濃度に比べて低いという報告もされていることから^{33,34}、アテローム血栓症との関連が報告されている PAI-1 の産生制御においても、S1P の運搬体による作用の違いがあるのではないかと仮説を立てた。

我々のチームで、急性冠症候群 (ACS, n=38)、安定型狭心症群 (SAP, n=71)、正常冠動脈群 (NCA, n=32) の 3 群の血漿活性型 PAI-1 濃度を測定したところ、ACS 群における血漿 PAI-1 濃度は、他の 2 群と比較して有意に上昇し ($P < 0.01$)

(図 4A)、これまでに報告されている冠動脈疾患患者血漿における PAI-1 濃度の上昇と一致した結果であった。さらに、血漿における総 S1P 濃度と ApoM 濃度を測定し、PAI-1 濃度の関連を調べると、ACS 群における血漿活性型 PAI-1 濃度は、ApoM 濃度との間には有意な相関がなかったが、総 S1P 濃度とは相関係数 $r = 0.425$ と有意な正の相関が存在した ($P < 0.01$) (図 4 B、C)。この研究においては、厳密に HDL 結合 S1P とアルブミン結合 S1P を分離して検討しているわけではないが、HDL 上の S1P の運搬体である ApoM 濃度と PAI-1 濃度の間には相関がなく、総 S1P 濃度と PAI-1 濃度の間には有意な正の相関があるという結果から、アルブミン結合 S1P が PAI-1 を制御し、HDL/ApoM 結合 S1P は PAI-1 に影響を与えない、もしくは、影響が少ない可能性が示唆された。

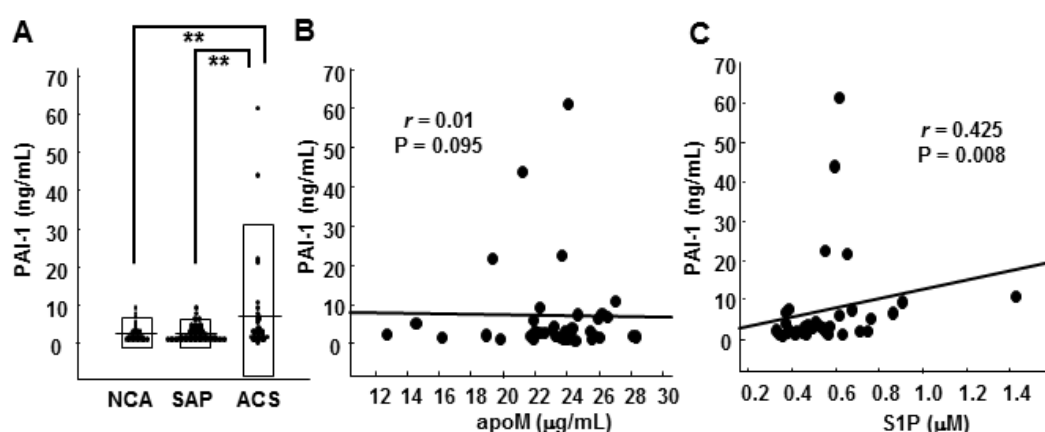


図4 ACS患者血漿において、PAI-1濃度は上昇し、PAI-1濃度はS1P濃度と正の相関を認めた

正常冠動脈群 (NCA, n=32)、安定型狭心症群 (SAP, n=71)、急性冠症候群 (ACS, n=38) の3群より得た血漿 PAI-1 濃度の比較 (A)。** $P < 0.01$ 。ACS 群における血漿 PAI-1 濃度と ApoM 濃度の相関 (B)、血漿 PAI-1 濃度と S1P 濃度の相関 (C)。

生体内の PAI-1 は、脂肪細胞において主に産生されていることが報告されている⁴。脂肪細胞の他には、肝細胞³⁵、血管内皮細胞³⁶での産生も報告されているが、血漿 PAI-1 濃度は内臓脂肪における PAI-1 発現量と相関する⁴、と報告されている脂肪細胞に対して、他の2つの細胞における PAI-1 発現量と血漿 PAI-1 濃度との相関についての報告はない。そこで、脂肪細胞において、S1P が PAI-1 産生制御に与える影響について検討している報告を調べると、現在までに3報の報告がされていた。そのうち2報は、アルブミンを vehicle として S1P を投与した報告であり^{8,37}、もう1報は HDL₃ を vehicle として S1P を投与した報告である³⁸。どちらの報告でも、S1P が脂肪細胞における PAI-1 発現量を増加させることを示しているが、アルブミン結合 S1P と ApoM/HDL 結合 S1P を直接比較した検

討は行われていない。そこで、本研究ではマウス 3T3L1 細胞を分化させた脂肪細胞を用いて、S1P が PAI-1 の発現誘導に与える影響が S1P の運搬体（アルブミンあるいは ApoM/HDL）により異なるかについて主に検討を行った。

【方法】

材料

D-erythro-S1P (SL-140; Enzo Life Science, Plymouth Meeting, PA) は、メタノールに溶解して-30℃で保管し、使用する直前にメタノールを窒素ガスで飛ばし、各種 vehicle に再溶解して使用した。VPC23109 (857360P; Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)、JTE013 (10009458; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)、Y27632 (257-00511; WAKO Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)、wortmannin、YC-1 (W1628, Y102; Sigma-Aldrich Co)、SIS3 (sc-222318; Santa Cruz Biotechnology, Inc. TX)、BAY11-7082 (sc-200615; Santa Cruz Biotechnology, Inc. TX) は、ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide; DMSO) に溶解し、終濃度が 10 μ M となるように調整して添加した。

多血小板血漿の調整と血小板刺激

健常者血液を 10% クエン酸採血で正中肘静脈より採取し、150 g、20 分、4℃で遠心分離を行って、多血小板血漿 (PRP) を得た。PRP は、その後 2 つの群に分けた。1 つは終濃度が 10 μ g/ml となるようにコラーゲン (collagen reagent Horm; Nycomed, Munich, Germany) を加えて 1000 rpm、15 分間攪拌し、それを 10000 rpm、1 分、4℃で遠心して上清を回収した。もう一方は、コラーゲンを加えずに、1000

rpm、15 分間攪拌して、10000 rpm、1 分、4℃で遠心して上清を回収した。すべての実験参加者には書面による説明と同意の取得を行った。本研究は、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会にて承認済みである（審査番号 1584-3）。

HDL とリポプロテイン欠損血漿（LDP）の分離

上記と同様の手順で、健常者から得た血液を超遠心分離により各リポ蛋白分画に分離した。HDL₂ (1.063 < 比重 ≤ 1.125 g/mL)、HDL₃ (1.125 < 比重 < 1.21 g/mL)、総 HDL (1.063 < 比重 < 1.21 g/mL) を、Ti 70 ローターを用いた標準超遠心により分離した (Beckman-Coulter Instruments, Palo Alto, CA)。HDL 除去後の残りの検体は、リポ蛋白除去血漿 (lipoprotein-depleted-plasma; LDP) とした。各検体は、4℃の PBS (pH 7.4) を用いて 48 時間透析をし、使用するまでの間 4℃で保存した。3T3L1 細胞における PAI-1 発現に対して、HDL と LDP が及ぼす影響を比較検討するため、既報を参考に、それぞれの蛋白量の終濃度は 800 µg/ml に調整し、統一した³⁸。

S1P 濃度の測定

ヒト HDL と LDP、マウス血漿における S1P 濃度は、以下のように S1P 抽出後、

HPLC にて測定した³⁹。

・ S1P の抽出

各検体 200 μ l、生食 250 μ l、内部標準として 2 μ M C₁₇S1P (860641P, Avanti Polar Lipids) 50 μ l (0.8 mg/l) をねじ式試験管に入れ、そこに氷冷された 3 ml のクロロホルム/メタノール (1:2) を加えて 30 分間超音波処理を行い、完全に溶解させた。その後、クロロホルム 2 ml、1M KCl 2.1 ml、3N NaOH 100 μ l を加えて、ボルテックスミキサーでよく混和した後 15 分間静置し、2300 rpm、15 分で遠心した。上層 3.8 ml を別のねじ式試験管にとり、4 ml クロロホルム、200 μ l HCl を加えて、ボルテックスミキサーでよく混和した後、2300 rpm、15 分で遠心し、上層を取り除き、下層をすべて別の試験管に移して 3000 rpm、5 分で遠心した。

・ HPLC 法

分離カラムとして WakoPack Ultra C18-5 (232-02661, WAKO Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)、移動層として流速 0.8 mL/min の 84% methanol + 16% 0.05 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 7.5) を用いて、S1P を分離した。

3T3L1 脂肪細胞

3T3L1 線維芽細胞 (JCRB cell bank) を、10 % 牛胎児血清 (FBS, 10099-141; Gibco BRL, Eggenstein, Germany) と 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (15070-063; Gibco,

Grand Island, NY) を含む DMEM (D5796; Sigma-Aldrich Co.) を培養液とし、CO₂ インキュベーター内にて 37°C、5%CO₂ の条件下で培養を行った。6 well の培養プレート (3516, Corning, Inc., NY) に細胞をまき、細胞密度がコンフルエンスに達してから 2 日後に、3 イソブチル 1 メチルキサンチン (099-03411, WAKO Pure Chemical Industries) を 0.5 mM、デキサメサゾン (047-18863; WAKO Pure Chemical Industries) を 1 μM、インスリン (I1882; Sigma-Aldrich Co.) を 10 μg/ml 含む分化誘導剤を投与した (Day 0)。Day 3 に、培養液を 10% 牛胎児血清 (FBS, 10099-141; Gibco BRL, Eggstein, Germany) と 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む DMEM にインスリン 10 μg/ml を添加した培養液に換えた。その後は Day 5、Day 7 に新しい培養液 (10% 牛胎児血清と 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む DMEM) に換えて 3T3L1 脂肪細胞に分化させた⁴⁰。

オイルレッド O 染色

分化誘導剤を添加した日を Day 0 とし、Day 0、Day 4、Day 7、Day 10 において脂肪細胞への分化の程度を、以下のようにオイルレッド O 染色液によって確認した。

3T3L1 細胞の培養液を吸引後に PBS で 2 回洗浄し、10% ホルマリンを 1 ml/ well ずつ投与して室温で 10 分間静置し、さらに PBS で 2 回洗浄した。続いて 60%

イソプロパノールを 1 ml/ well ずつ加えて 1 分間置き、イソプロパノールを除いた。さらにオイルレッド O 染色液（オイルレッド O (SIGMA O-0625) 30 mg に、100%イソプロパノール 10 ml を加えて、攪拌器で 20 分間混和した後、滅菌蒸留水を加えてイソプロパノールの濃度が 60%になるように調整し、フィルター濾過して作成）を 1 ml/ well ずつ加えて 20 分間静置後に除去し、60%イソプロパノールをさらに 1 ml/ well ずつ加えて 1 分後除去し、PBS で 2 回洗浄した。最後に、100%イソプロパノールを 500 μ l ずつ加えて回収した。96 well マイクロプレートに回収した溶液の原液、2 倍希釈液、4 倍希釈液をそれぞれ 200 μ l ずつ加えて、540 nm の吸光度計で吸光度を測定した。

3T3L1 分化脂肪細胞への S1P の投与

Day 10 に、細胞蛋白と細胞 RNA を抽出して分析を行った。まず、Day 9 に牛胎児血清を含まない DMEM の培養液に換えて 18 時間細胞を培養し、その後 vehicle と共に S1P を投与した。投与後、30 分間、1 時間、あるいは 4 時間培養して、蛋白と RNA の解析を行った。ヒト健常者より得た HDL、アルブミンを S1P の vehicle として用いた検討においては、最終投与濃度は 800 μ g protein/ ml となるようにして用いた。S1P の投与濃度である 10 μ M に比較して、HDL 内の S1P 濃度は非常に低濃度であったため（総 HDL 75.9 nM、HDL₂ 40.8 nM、HDL₃

73.5 nM、LDP 16.4 nM)、リポ蛋白に含まれる内因性の S1P 量については考慮せずに検討を行った。薬理的阻害剤を用いた検討では、3T3L1 細胞に、あらかじめ各阻害剤を終濃度 10 μ M となるように調整した牛胎児血清を含まない DMEM を投与し 30 分間培養後、無脂肪酸牛血清アルブミン (A8806, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) を 0.4% 添加した PBS に再溶解させた S1P を、終濃度 10 μ M になるように投与した。

各種 vehicle の作成

HepG2 細胞 (ATCC, Manassas, VA) は、10 % 牛胎児血清 (FBS, 10099-141; Gibco BRL, Eggenstein, Germany) と 1 % ペニシリン/ストレプトマイシンを含む DMEM を培養液とし、CO₂ インキュベーター内にて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養を行った。細胞が 10-cm collagen-coated dish 上 70% コンフルエンスに達した後、ApoM を発現するアデノウイルス⁴¹、ブランクのコントロールアデノウイルスを 1.0 \times 10¹⁰ pfu/10 mL にて投与し、あるいは、ヒトアルブミンに対する siRNA (si-Alb, sc-45606)、ヒト ApoM に対する siRNA (si-ApoM, sc-61978)、control siRNA (si-Ctl, sc-37007) を lipofectamin RNAi MAX を用いて投与した。アデノウイルス、あるいは siRNA を投与して 48 時間後に、培養液を無牛胎児血清の DMEM 12 mL に換えて、さらに細胞を 24 時間培養した。培養液を回収して、Amicon Ultra-15

(UFC901008; Millipore Co., Bedford, MA) を用いて 500 μ L に濃縮させた⁴²。

各 vehicle と一緒に投与した S1P の vehicle 内での分布を調べるために、C₁₇S1P を終濃度が 1 μ M となるように vehicle に混入し、超遠心分離によって HDL 分画（比重 < 1.21）、LDP 分画（比重 > 1.21）に分けて、各分画における C₁₇S1P の濃度を測定した。

動物実験

オス C57BL6/J マウスを、CLEA Japan (Tokyo, Japan) から購入し、動物実験室にて 12-12 hour light-dark cycle 下、水と通常のマウス飼育食 (Oriental Yeast Co, Tokyo, Japan) を自由に摂取できる環境で飼育した。生後 9 週齢に、ApoM をコードするアデノウイルス、あるいはブランクのコントロールアデノウイルスを尾静脈注射によりそれぞれ感染させた（以下 ApoM マウス、Null マウス）。アデノウイルス感染後、5 日目に血漿、脂肪組織を以下のように採取した。

血漿検体は、ペントバルビツール麻酔下にて retro-orbital plexus より採取した。頸椎脱臼を行い安楽死させた上で開腹し、精巣周辺の脂肪組織を両側から採取して液体窒素にて凍結保存した。血漿 PAI-1 濃度は、ELISA アッセイ (1MPA1KT-TOT; Innovative Research, Novi, MI) を用いて測定し、脂肪組織中の PAI-1 mRNA 発現量の解析は、リアルタイム PCR 法を用いた。すべての動物実

験は、東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会の承認を受け、東京大学動物実験実施マニュアルを遵守して行った。

リアルタイム PCR 法による mRNA 発現量の解析

3T3L1 細胞の PAI-1 mRNA の発現量を比較検討するために、vehicle と S1P を同時に投与し、1 時間、あるいは 4 時間培養した。マウスの脂肪組織は、動物実験の項に示した通りに採取した。3T3L1 細胞由来の脂肪細胞と、マウス脂肪組織から GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit (RTN70-IKT, Sigma-Aldrich Co.) を用いて mRNA を抽出した後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (FSQ-201, TOYOBO Co., LTD, Osaka, Japan) を用いて逆転写 PCR を行い、cDNA を作成した。リアルタイム PCR 法は、7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて施行した。リアルタイム法に用いたハイブリダイゼーションプローブとプライマーは、Taqman (Applied Biosystems) で購入した、PAI-1 (Mm00435860_m1)⁴³ と、内在性コントロールとして 18S (Mm03928990_g1)⁴⁴ を使用した。

ウェスタンブロット法による moesin, NFκB の活性化の解析

培養脂肪細胞の全成分における蛋白量の解析には、細胞を PBS で 2 回洗い、

RIPA バッファー (1 M Tris-HCL (pH 7.6)、1% NP40、10% SDS、4 M NaCl、0.5% Sodium Deoxycholate、1 mM NaV3、2 mM PMSF、protease inhibitor cocktail) にて蛋白質を抽出して用いた。核成分のサンプルは、10 mM HEPES (pH 7.9)、1.5 mM MgCl₂、10 mM KCl、0.5 mM DTT、0.05% NP40、protease inhibitor cocktail を含む溶液にてホモジナイズした後、700 g で 10 分間遠心して、沈殿をさらに 5 mM HEPES (pH 7.9)、1.5 mM MgCl₂、0.2 M EDTA、0.5 mM DTT、300 mM NaCl、26% glycerol、protease inhibitor cocktail の溶液を用いてホモジナイズ後、24000 g で 20 分間遠心することにて得た上清を用いた。

サンプルは 2×サンプルバッファー (0.125 M Tris-HCl (pH 6.8)、10% 2-Mercaptoethanol、4% SDS、10% Sucrose, Bromophenol blue) と等量ずつ混ぜた後、95℃で 5 分間加熱することに変性させ、アクリルアミドゲルを用いて分離した後、セミドライ式ブロッティング (15 V、20 分間の条件) にてニトロセルロース膜に蛋白を転写した。その後は、1 晩 Block-Ace (UK-B80, DS Pharma Biomedical Co., Ltd, Osaka, Japan) でブロッキングし、以下の一次抗体を Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution1 (NKB-201, TOYOBO Co., Ltd, Osaka, Japan) にそれぞれ 1 / 1000 に希釈して、24 時間反応させた。

一次抗体: anti-human apoM antiserum ⁴¹、anti-apoA-I antibody (AB740; Chemicon International Inc., Temecula, CA)、anti-human albumin antibody (E80-129A; Bethyl

Laboratories, Inc. Montgomery, TX)、anti-phosphomoesin、anti-total moesin、anti-total p65 (SAB4504260, 4501926, 4502620; Sigma-Aldrich Co.)、anti-lamin A/C (sc-20081; Santa Cruz Biotechnology)、anti- β -actin (PM053; MBL, Nagoya, Japan)。

その後、二次抗体: anti-Rabbit IgG antibody (70745, Cell Signaling Technology) を Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2 (NKB-301, TOYOBO Co.) に 1 / 1000 に希釈し 3 時間反応させ、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (WBKLS0500, Millipore Co., Bedford, MA)、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science) を用いた化学発光法にて検出した。検出されたバンドは、ImageJ (from NIH) を用いて定量した。

リコンビナント ApoM の構築

リコンビナントヒト ApoM は、Brevibacillus Expression System (HB300, TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて、既報通りに作成した⁴¹。プライマーは、forward primer : 5'gatgacgatgacaaaatgttccaccaaatttg3' 、 reverse primer : 5'catcctgttaagctttcagttattggacagctcac3' を用いた。構築したリコンビナントヒト ApoM は、HisTrap FF equipped with AKTA system (17-5255-01, GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden) を用いて精製し、蛋白濃度は DC Protein Assay (5000112JA, Biorad laboratories, Inc. Hercules, CA) を用いて測定した。

統計学的解析

結果は、平均±標準誤差で示した。2 群間の比較は、Student's t 検定を用いて行い、3 群間以上の比較については、one-way ANOVA テストを用いて比較し、相違があった場合、多重比較にて各群間を比較した。 $P < 0.05$ であるデータを、統計学的有意差を有するものとみなした (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

【結果】

1 活性化血小板より放出された S1P は、HDL 分画よりも LDP 分画に分布する

血小板の活性化により放出された S1P のリポ蛋白分画への分布を調べるために、PRP を用いて検討した。PRP にコラーゲンを添加して血小板を刺激した群は、刺激しない群と比較して、LDP 分画中の S1P 含有量は上昇したが ($P < 0.05$)、HDL 分画中の S1P 含有量は変わらなかった (図 5)。この結果から、活性化血小板から血漿中へと放出される S1P は HDL よりも LDP 分画に存在するアルブミンを運搬体として選択しやすい可能性が示唆された。

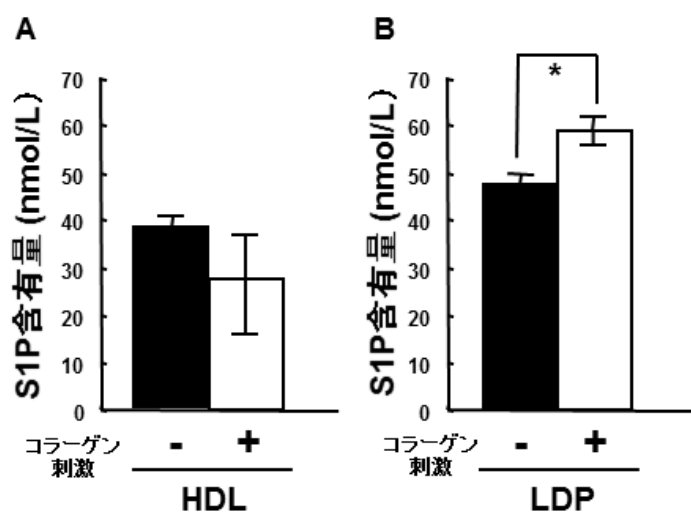


図 5 血小板活性化により増加する S1P の血漿内分画における分布

健常人よりクエン酸採血で得た血液を遠心して多血小板血漿 (PRP) を作成した。PRP にコラーゲンを添加して血小板を活性化させた群 (n=3)、コラーゲンを添加しなかった群 (n=3) の 2 群を、それぞれ超遠心分離によって HDL 分画 ($d > 1.21$)、LDP 分画 ($d < 1.21$) に分けて各分画における S1P 濃度を測定した。各分画における S1P 濃度 (nmol/L) に各分画の検体量をかけ、血漿検体量で割り、S1P 含有量を求めた。A：コラーゲン刺激の有無による HDL 分画中の S1P の分布。B：コラーゲン刺激の有無による LDP 分画中の S1P の分布。* $P < 0.05$ (Student's t 検定)。

2 3T3L1 脂肪細胞を用いた実験系の検証

3T3L1 脂肪細胞を用いた実験を行うにあたり、まず既報のように脂肪細胞へと分化できるかを検証した。オイルレッド O 染色を用いて、脂肪細胞の分化の程度を Day 0、Day 4、Day 7、Day 10 でそれぞれ確認した (図 6A、B)。Day 4 では、分化誘導を行った群はコントロール群と比較して有意に吸光度は上昇したが ($P < 0.05$)、肉眼的な染色の相違はわずかであった。Day 7、Day 10 では、肉眼所見、吸光度はいずれも 2 群間で有意な相違を認め、分化誘導により脂肪細胞へと成熟していることが確認された。

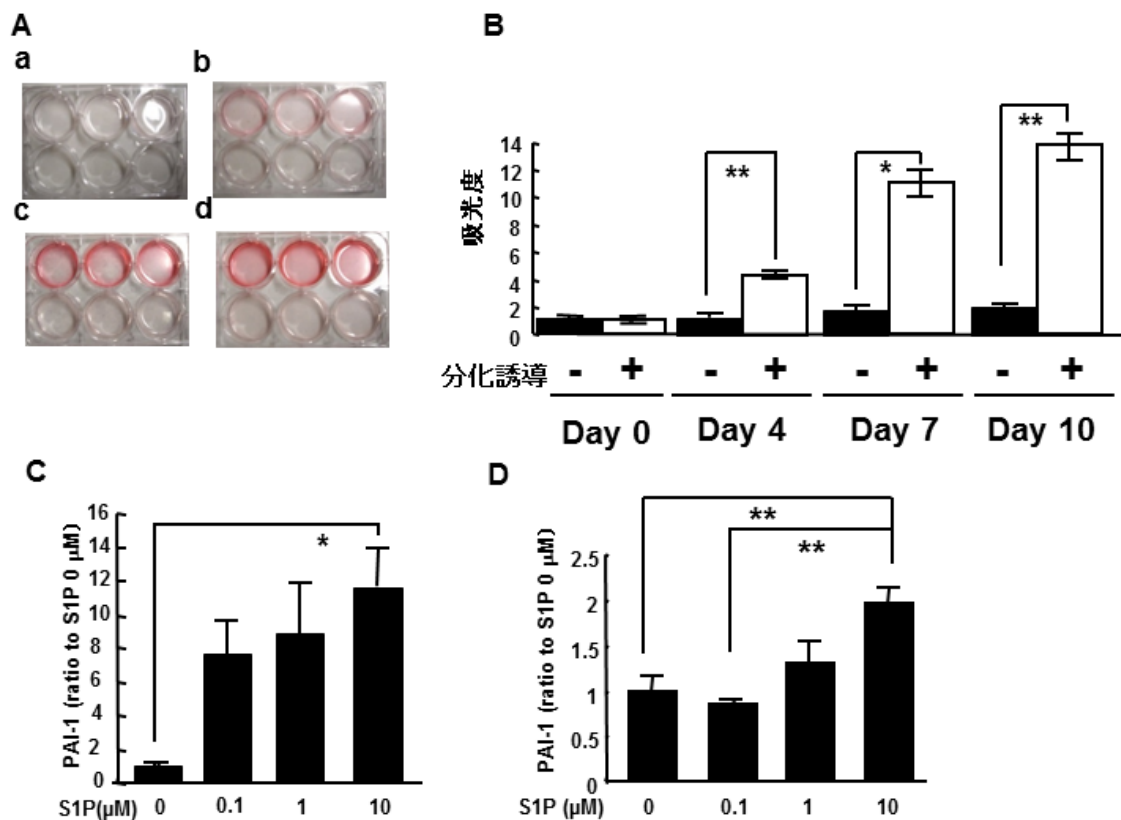


図 6 実験系の検証

A : マウス 3T3L1 細胞を培養し、分化誘導を行った。誘導剤を添加した日を Day 0 として Day 4、Day 7、Day 10 にそれぞれオイルレッド O 染色を行って肉眼的に分化の程度を確認した。Day 0 (a)、Day 4 (b)、Day 7 (c)、Day 10 (d)、上段は分化誘導剤を加えた群、下段は分化誘導剤を加えなかった群 (a-d)。

B : Day 0、Day 4、Day 7、Day 10 において、分化誘導剤を加えた群と加えなかった群におけるオイルレッド O 染色による吸光度の比較 (n=3/各群)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Student's t 検定)。

(C、D) Day 10 の成熟脂肪細胞を、あらかじめ牛胎児血清を含まない培養液で 18 時間培養してから、無脂肪酸牛血清アルブミンを添加した PBS に再溶解した、様々な濃度の S1P (0、0.1、1、10 μM) をそれぞれ添加して培養し (n=5-6)、1 時間後 (C)、4 時間後 (D) に mRNA を回収して、PAI-1 発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (多重比較)。

次に、Day 10 の脂肪細胞に、無脂肪酸牛血清アルブミン (A8806, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) を 0.4% 添加した PBS に再溶解した S1P を、0 μM 、0.1 μM 、1 μM 、10 μM の 4 段階の濃度で投与して 1 時間あるいは 4 時間培養し、mRNA を回収して、PAI-1 mRNA 発現量を比較検討した。図 6C のように、投与 1 時間後の PAI-1 mRNA 発現量は、S1P の投与濃度が 10 μM で有意に増加した。また、図 6D のように投与 4 時間後では、S1P の投与濃度が 10 μM で PAI-1 mRNA 発現量が有意に増加したが、1 μM では PAI-1 の発現量は変化しなかった。

以上の検討から、3T3L1 細胞は分化誘導を開始して 10 日後 (Day 10) に成熟脂肪細胞へと分化しており、検討を行うのに問題ないと判断した。また、生体内の HDL、ApoM を豊富に含む vehicle 中の S1P 濃度は 50-100 nM であるため³⁰、これらの内因性の S1P の影響を無視するために、以下の大部分の検討では、S1P

濃度は 10 μ M、投与後の検討時間は 4 時間後と実験の条件を設定した。

3 HDL と共に投与した S1P よりも LDP と共に投与した S1P の方が 3T3L1 細胞の PAI-1 発現量を増加させる

脂肪細胞に、HDL を運搬体として投与した場合と、LDP を運搬体として投与した場合で、S1P による PAI-1 発現促進作用が異なるかについて検討した。ヒト PRP を超遠心分離によって分け、濃度調整した HDL₂、HDL₃、総 HDL、LDP と、これらを vehicle として 10 μ M S1P を脂肪細胞に投与して 4 時間培養後、mRNA を回収して PAI-1 発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。

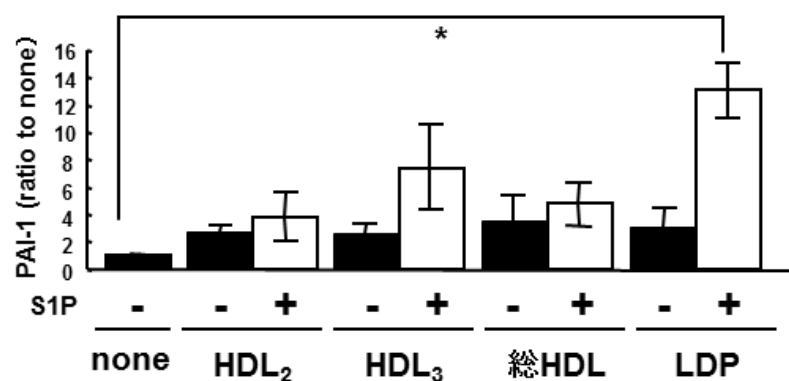


図 7 HDL を vehicle とした S1P と LDP を vehicle とした S1P の脂肪細胞での PAI-1 発現誘導の相違

健常人よりクエン酸採血で得た血液を遠心して多血小板血漿 (PRP) を作成した。作成した PRP を超遠心分離によって、HDL₂ (1.063 < d < 1.125 g/mL)、HDL₃ (1.125 < d < 1.21 g/mL)、総 HDL (1.063 < d < 1.21 g/mL) に分け、各分画を回収し、残った上清をリポ蛋白欠損血漿 (LDP) とした。得られた各リポ蛋白、LDP を PBS で透析後、無牛胎児血清培養液中の蛋白濃度が 800 μ g/mL となるように調整し、vehicle とした。あらかじめ牛胎児血清を含まない培養液で 18 時間培養した成熟脂肪細胞に (Day 10)、作成した各 vehicle と 10 μ M S1P を添加して 4 時間培養し、mRNA を回収して PAI-1 発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。

(n=3-4/各群)。* $P < 0.05$ (多重比較)。

いずれの HDL を vehicle として S1P を投与した群も、何も投与しない群 (none) と比較して PAI-1 発現量に統計学的有意差は認めなかった。一方で、LDP を vehicle として S1P を投与すると、何も投与しない群 (none) と比較して、PAI-1 発現量は有意に増加した ($P < 0.05$) (図 7)。この結果から、HDL と結合した S1P ではなく、LDP に存在するアルブミンと結合した S1P が、脂肪細胞における PAI-1 発現量を増加させることが示唆された。

4 作成した vehicle における ApoM、アルブミンの発現、S1P のリポ蛋白への分布の検証

アデノウイルスを HepG2 細胞に感染させて作成した ApoM に富む vehicle (ApoM 群)、コントロール vehicle (Null 群) のそれぞれにおける ApoM、アルブミンの分布をウエスタンブロット法により調べた。

ApoM 群においては、ApoM を過剰発現させることにより vehicle 中の ApoM 蛋白レベルは増加していた (図 8A)。また、ApoM 群、Null 群、ヒト PRP より分離された HDL (HDL 群) の、それぞれリポ蛋白分画 ($d < 1.21$)、LDP 分画 ($d > 1.21$) に超遠心分離し、各分画における ApoM、アルブミンの蛋白発現量をウエスタンブロット法により調べたところ、HDL 群では、リポ蛋白分画で ApoM

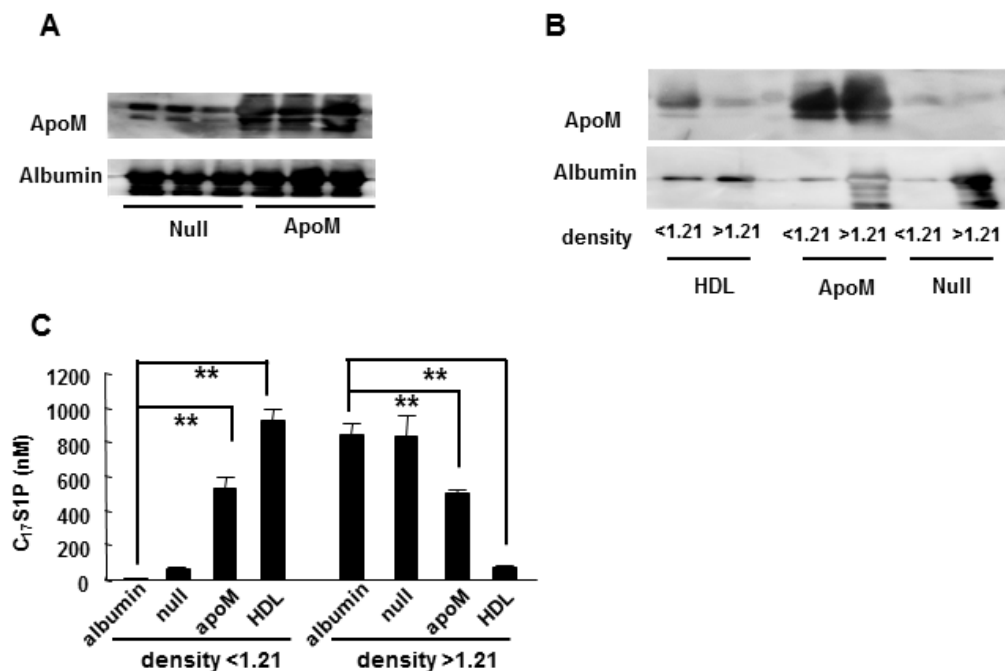


図 8 作成した vehicle における ApoM、アルブミンの発現、S1P のリポ蛋白への分布の検証

A：作成した ApoM に富む vehicle (ApoM 群)、コントロール vehicle (Null 群) のそれぞれにおける ApoM、アルブミンの蛋白量の比較。

B：ApoM 群、Null 群、ヒト PRP より分離された HDL (HDL 群) をそれぞれリポ蛋白分画 ($d < 1.21$)、LDP 分画 ($d > 1.21$) に超遠心分離した。それぞれの分画における ApoM、アルブミン分布の比較。

C：アルブミン群、Null 群、ApoM 群、ヒト PRP より分離した HDL 群の 4 つを vehicle として $1 \mu\text{M}$ C₁₇ S1P を加え、超遠心分離によってリポ蛋白分画 ($d < 1.21$)、LDP 分画 ($d > 1.21$) に分け、それぞれの分画における C₁₇ S1P 含有量を調べた ($n=3$ /各群)。** $P < 0.01$ (多重比較)。

濃度が高く、ApoM 群では、リポ蛋白分画、LDP 分画の ApoM 濃度が高く、一方で、Null 群では LDP 分画においてアルブミン濃度は高いが、ApoM はわずかに検出されるのみであった (図 8B)。この結果から、HDL 群に含まれる ApoM はリポ蛋白分画に多く存在することが確かめられ、また、作成した ApoM に富む vehicle 中の ApoM は、実際のヒト HDL と同様にリポ蛋白分画にも存在して

いることが分かった。

次に、アルブミン群、Null 群、ApoM 群、HDL 群の 4 つの vehicle 中のどの分画に S1P が分布するかを調べた。生体内に存在している S1P と区別するために、生体内には存在しない C₁₇ S1P 1 μ M を各 vehicle に溶解し、超遠心分離によってリポ蛋白分画 ($d < 1.21$)、LDP 分画 ($d > 1.21$) に分け、各分画の C₁₇ S1P 濃度を測定した。その結果、C₁₇ S1P は、Null 群、アルブミン群では、主に LDP 分画に分布していたが、ApoM 群、HDL 群では主にリポ蛋白分画に存在しており、実際のヒト HDL 同様に、作成した ApoM に富む vehicle 中でも、S1P はリポ蛋白分画にも存在することが分かった (図 8C)。

5 ApoM に富む vehicle を用いて投与した S1P は、コントロール vehicle を用いて投与した S1P よりも脂肪細胞における PAI-1 の発現量増加が小さい

次に、ApoM に富む vehicle (ApoM) あるいはコントロール vehicle (Null) を用いて 10 μ M S1P を脂肪細胞に投与し、PAI-1 発現に与える影響が異なるかを検討したところ、ApoM よりも Null を vehicle として S1P を投与した方が PAI-1 の発現量の増加は著しかった (図 9A)。続いて、ApoM 発現抑制 vehicle (si-ApoM)、アルブミン発現抑制 vehicle (si-Alb)、コントロール vehicle (si-Ctl) を用いて 10 μ M S1P を脂肪細胞に投与し、PAI-1 発現に及ぼす影響を比較した。作成した

si-ApoM、si-Alb、si-Ctl のそれぞれの vehicle における ApoM、アルブミン量は、si-Ctl と比較して si-ApoM では ApoM の発現が低下し、si-Alb ではアルブミンの発現が低下していた（図 9B）。PAI-1 の発現誘導は、si-ApoM を vehicle として S1P を細胞に投与すると、si-Ctl を vehicle として S1P を投与するよりも PAI-1 発現量の増加の程度が大きく（図 9C）、si-Alb を vehicle として S1P を投与すると、si-Ctl を vehicle として S1P を投与した場合と比較して PAI-1 発現量の増加の程度は小さかった（図 9D）。

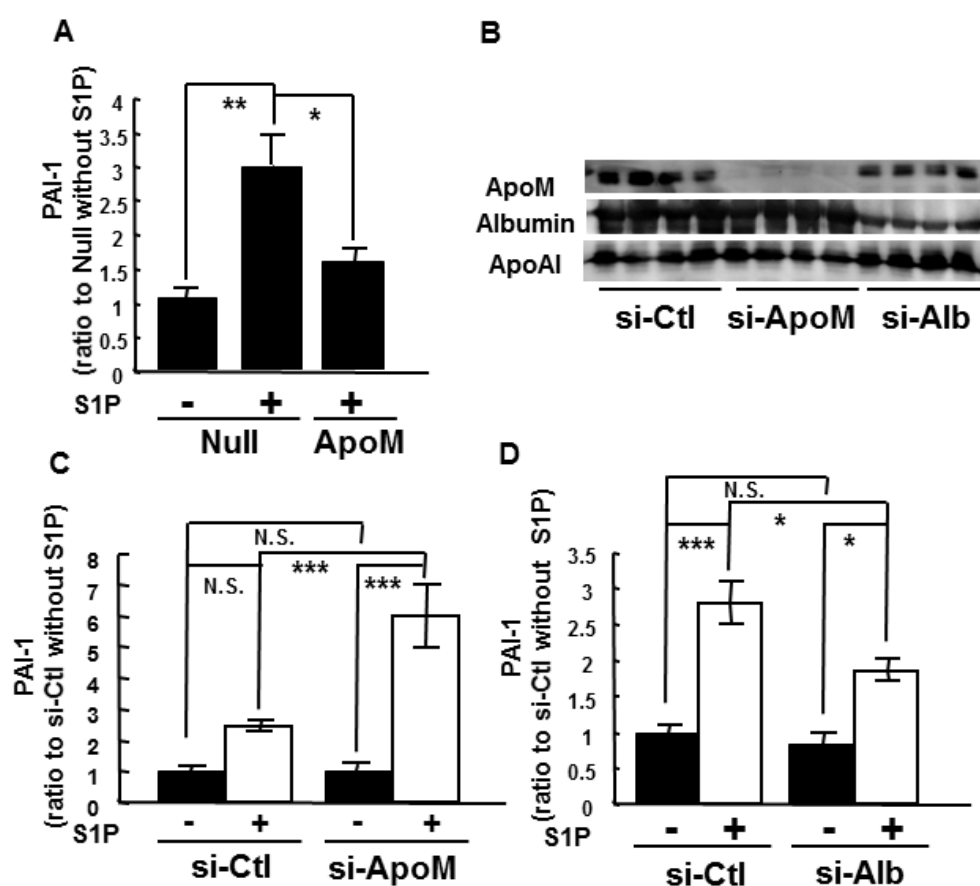


図 9 ApoM に富む vehicle を用いて投与した S1P は、コントロール vehicle を用いて投与した S1P よりも脂肪細胞における PAI-1 の発現量増加が小さい

(A、C、D) あらかじめ牛胎児血清を含まない培養液で 18 時間培養した成熟脂肪細胞に (Day 10)、作成した各 vehicle と 10 μ M S1P を添加して 4 時間培養し、

mRNA を回収して PAI-1 発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。ApoM、Null を vehicle とした検討 (n=4) (A)、si-ApoM、si-Ctl を vehicle とした検討 (n=4-6) (C)、si-Alb、si-Ctl を vehicle とした検討 (n=4-6) (D)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (多重比較)。

B : 作成した si-ApoM、si-Alb、si-Ctl のそれぞれにおける ApoM、アルブミンの蛋白量の比較。

以上の結果から、ApoM と結合した S1P は、アルブミンと結合した S1P と比較して、PAI-1 の発現誘導作用が低いことが示唆された。

6 ApoM 過剰発現による血漿 S1P の増加は、マウス血漿 PAI-1 濃度、脂肪組織 PAI-1 発現量を変化させない

これまでの *in vitro* の実験から、ApoM に結合した S1P は PAI-1 発現誘導作用が小さいことが示唆された (結果 3、5)。次に、*in vitro* の実験結果が、*in vivo* に外挿できるかどうか、動物実験にて検討した。

アデノウイルスを用いてマウス肝臓に ApoM を過剰発現させたところ、既報通り、ApoM マウスでは、Null マウスと比較して血漿 ApoM 濃度、S1P 濃度がともに有意に増加した (図 10A、B)。しかし、血漿 PAI-1 濃度と脂肪組織における PAI-1 発現量は、ApoM マウスと Null マウスの 2 群間において統計学的有意差は認めなかった (図 10C、D)。以上より、*in vivo* においても ApoM と結合した S1P は、脂肪組織中の PAI-1 発現を誘導する作用がない可能性が示唆された。

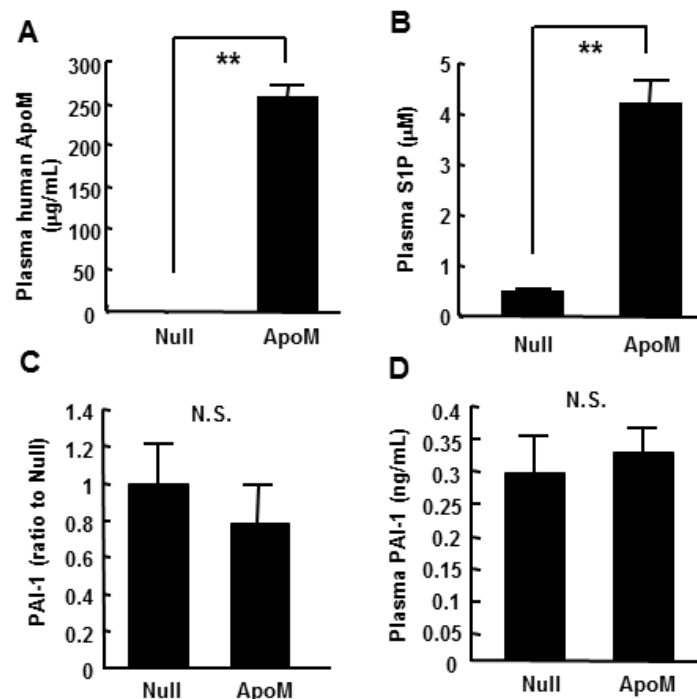


図 10 ApoM 過剰発現によるマウス血漿 PAI-1 濃度、脂肪組織 PAI-1mRNA 発現量の変化

9 週令オス C57BL6J マウスに、ヒト ApoM をコードしたアデノウイルス、そのコントロールアデノウイルスを感染させて、ApoM マウス、Null マウスを作成し、5 日目に解析を行った (n = 4-6/各群)。各群における血漿ヒト ApoM 濃度 (A)、血漿 S1P 濃度 (B)、脂肪組織中の PAI-1 mRNA 発現量 (C)、血漿 PAI-1 濃度 (D) の結果。* * $P < 0.01$ (Student's t 検定)。

7 S1P は、脂肪細胞において S1PR2 を活性化して PAI-1 発現量を増加させる

序文に記載したように、S1P は複数の S1P 受容体を活性化し、様々な生物学的作用を発揮するため、PAI-1 発現に関与する S1P 受容体を検討し、それらの受容体の活性化作用が ApoM に結合した S1P とアルブミンに結合した S1P で異なるかどうかを検討した。S1P 受容体は、5 種類同定されているが (S1PR1-5)、脂肪細胞においては S1PR1-3 の発現が確認されており³⁸、アルブミン結合 S1P は、

S1PR2 を活性化して PAI-1 発現量を増加させると報告されている⁸。

そこで、まず S1PR2 の拮抗剤である JTE013、あるいは S1PR1、3 の拮抗剤である VPC23109 を用いて、アルブミン結合 S1P の PAI-1 産生増加作用における S1PR の関与について検討した。

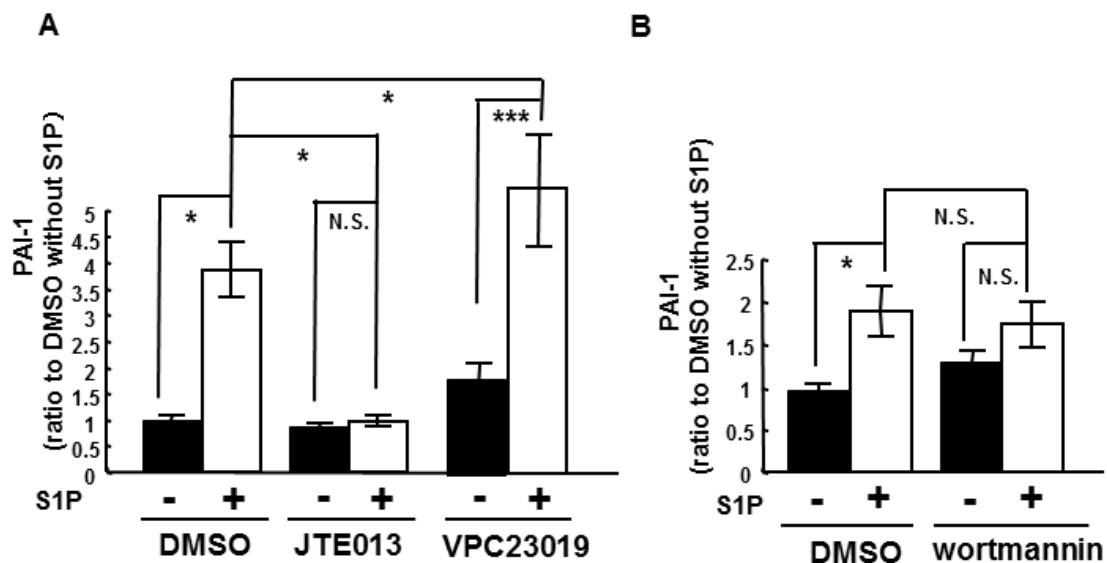


図 11 S1P は、S1PR2 を活性化して PAI-1 発現量を増加させる

(A、B) あらかじめ牛胎児血清を含まない培養液で 18 時間培養した成熟脂肪細胞に (Day10)、30 分間各阻害剤 (JTE013、VPC23109、wortmannin) あるいは、コントロールとして DMSO を添加して培養した後、無脂肪酸牛血清アルブミンを 0.4% 添加した PBS に再溶解した 10 μ M S1P と受容体阻害剤を共に添加して 4 時間培養し、mRNA を回収して PAI-1 発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。

A: S1PR2 阻害剤 (JTE013)、S1PR1/3 阻害剤 (VPC23109) を用いた検討 (n=4-6)。

* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (多重比較)。

B: PI3K 阻害剤 (wortmannin) を用いた検討 (n=6)。* $P < 0.05$ (多重比較)。

その結果 JTE013 は、アルブミン結合 S1P による PAI-1 mRNA 発現増加作用を阻害したが、VPC23109 は、アルブミン結合 S1P の PAI-1 発現増加作用をむしろ亢進させた。また、VPC23109 単独投与にても PAI-1 発現量は増加する傾向にあ

った (図 11A)。

以上より、アルブミン結合 S1P は、S1PR2 を介して PAI-1 発現増加を誘導することが示唆された。また、VPC23019 単独投与にても PAI-1 発現が増加傾向にあった結果より、VPC23019 投与によるアルブミン結合 S1P の PAI-1 の更なる発現誘導は、S1P 受容体を介するものではなく、多面的効果である可能性も考えられた。そこで、さらに S1PR1、3 の下流にある PI3K 阻害剤である wortmannin を用いて検討したところ、wortmannin は、アルブミン結合 S1P による PAI-1 発現誘導作用を増強しなかった (図 11B)。よって、S1PR1、3 経路は PAI-1 発現誘導には関与していないと考えられた。

8 ApoM を vehicle とした S1P は、モエシンを活性化させない

S1P は S1PR2 を介してモエシンを活性化すると報告されている⁴⁵。そこで、ApoM に富む vehicle (ApoM) およびコントロール vehicle (Null) を用いて S1P を脂肪細胞に投与し、モエシンのリン酸化を調べることにより、ApoM に結合した S1P とアルブミンに結合した S1P の S1PR2 の活性化作用の相違について検討した。

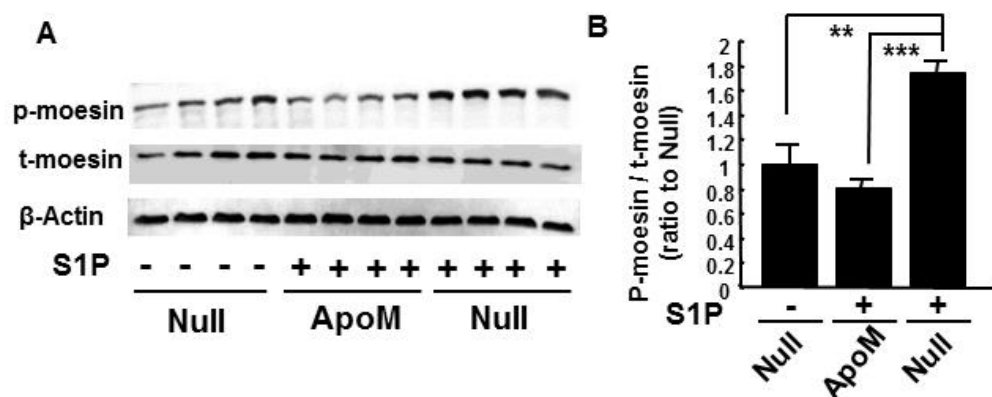


図 12 ApoM を vehicle とした S1P は、モエシンを活性化させない

牛胎児血清を含まない培養液で 18 時間培養した成熟脂肪細胞に(Day 10)、各 vehicle と共に 10 μ M S1P を加えて 30 分後に蛋白を回収し、ウエスタンブロット法にてモエシンのリン酸化を比較した。

A : ApoM、Null を vehicle として S1P を投与した場合のウエスタンブロット法によるモエシンのリン酸化の比較。B : Image J を用いて、A の結果を定量し、比較した (n=4)。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (多重比較)。

Null のみを投与した群と比較して、Null を vehicle として S1P を投与した群ではモエシンのリン酸化が増加したが、ApoM を vehicle として S1P を投与した群では Null のみを投与した群と比較して、モエシンのリン酸化の程度は変わらなかった (図 12A、B)。

以上より、アルブミン結合 S1P は S1PR2 シグナルを活性化するが、一方で、ApoM 結合 S1P は S1PR2 シグナルを活性化しないことが示唆された。

9 アルブミン結合 S1P は、S1PR2 \rightarrow Rho/ROCK \rightarrow NF κ B 経路を活性化させる
 ことにより PAI-1 の発現を誘導させる可能性がある

次に、薬理的拮抗剤を用いて S1PR2 の下流のシグナルについて検討を行った。S1PR2 の下流には Rho/ROCK が存在することが報告されているため、Rho 阻害剤によりアルブミン結合 S1P による PAI-1 の発現誘導が阻害されるかどうか検討した。予想通り、Rho/ROCK 阻害剤である Y27632 は、アルブミン結合 S1P の PAI-1 の発現増加作用を阻害した (図 13A)。

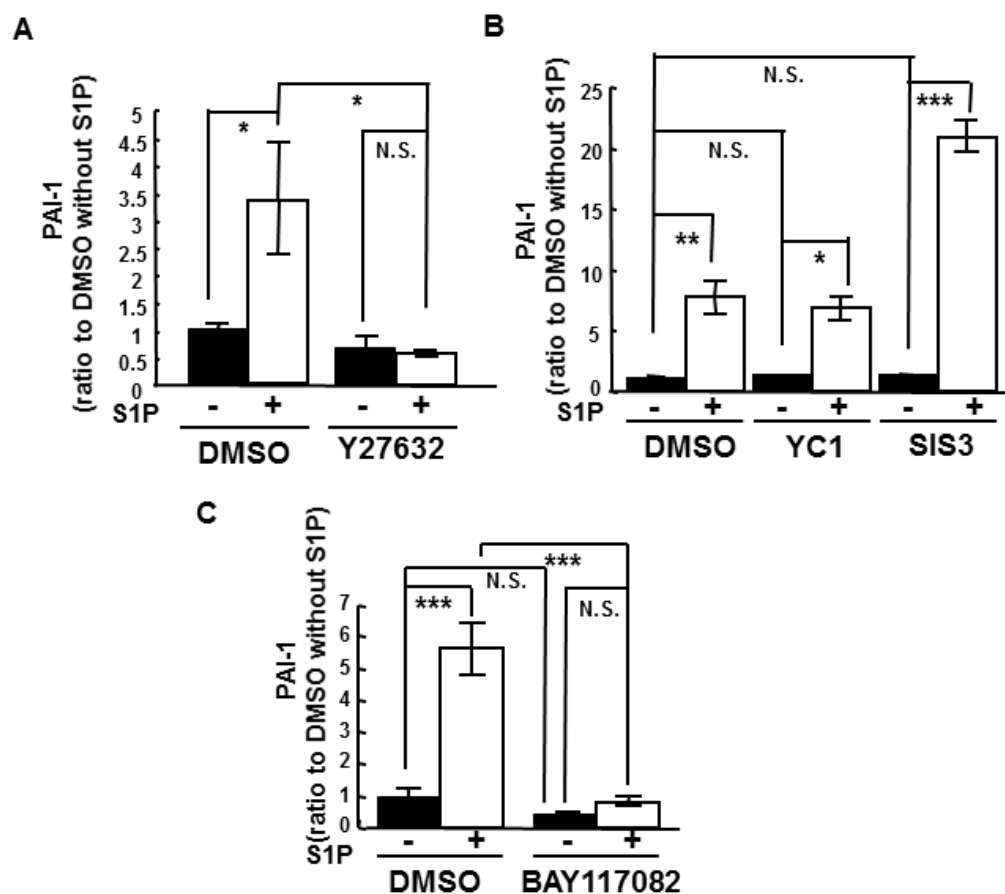


図 13 S1P による PAI-1 発現増加作用は、Rho 阻害剤、NFκB 阻害剤により阻害される

(A-C) あらかじめ牛胎児血清を含まない培養液で 18 時間培養した成熟脂肪細胞に (Day10)、阻害剤あるいは、コントロールとして DMSO を添加して 30 分間培養した後、無脂肪酸アルブミンを含む PBS に再溶解させた S1P (終濃度 10 μM) と受容体阻害剤を共に添加して 4 時間培養し、mRNA を回収して PAI-1 発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。

A : Y27632 (Rho 阻害剤) を用いた検討 (n=4-5)。B : YC1 (HIF1α阻害剤)、SIS3

(Smad3 阻害剤) を用いた検討 (n=5-6)。C : BAY117082 (NFκB 阻害剤) を用いた検討 (n=6)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (多重比較)。

S1PR2→Rho/ROCK のさらに下流に位置する経路についての関与は報告がない。そこで、次に PAI-1 のプロモーター領域に結合部位を有するさまざまな転写因子 (HIF1α、Smad3、NF-κB) の阻害剤を用いて、S1PR2→Rho/ROCK と PAI-1 発現誘導の間に存在するシグナル経路について検討した。HIF1α阻害剤である YC1、Smad3 阻害剤である SIS3、NFκB 阻害剤である BAY11-7082 の、アルブミン結合 S1P による PAI-1 発現誘導に対する影響を検討したところ、YC1、SIS3 は、S1P による PAI-1 発現誘導を阻害しなかったが、BAY11-7082 は、S1P による PAI-1 発現誘導を阻害した (図 13B、C)。以上より、アルブミン結合 S1P は、脂肪細胞において S1PR2-Rho/ROCK を活性化し、さらに NFκB を活性化させることにより、PAI-1 の発現を誘導する可能性が示唆された。

ApoM を vehicle とした S1P は、Null を vehicle とした S1P と比較して S1PR2 の下流に存在するモエシンをリン酸化する程度は弱かったため、NFκB の活性化の程度も vehicle により異なるのではないかと考えられた。NFκB は、p65 (RelA) と p50 のヘテロ二量体で構成され、リポポリサッカライドなどにより細胞が刺激されることにより、IκBαのリン酸化、分解を経て活性化され、核に移行する転写因子である。そこで、vehicle による S1P の NFκB の活性化の違いを比較するために、Null、ApoM の 2 種類の vehicle を用いて S1P を脂肪細胞に投与し、

ウエスタンブロット法を用いて核蛋白の p65 発現レベルを調べた。

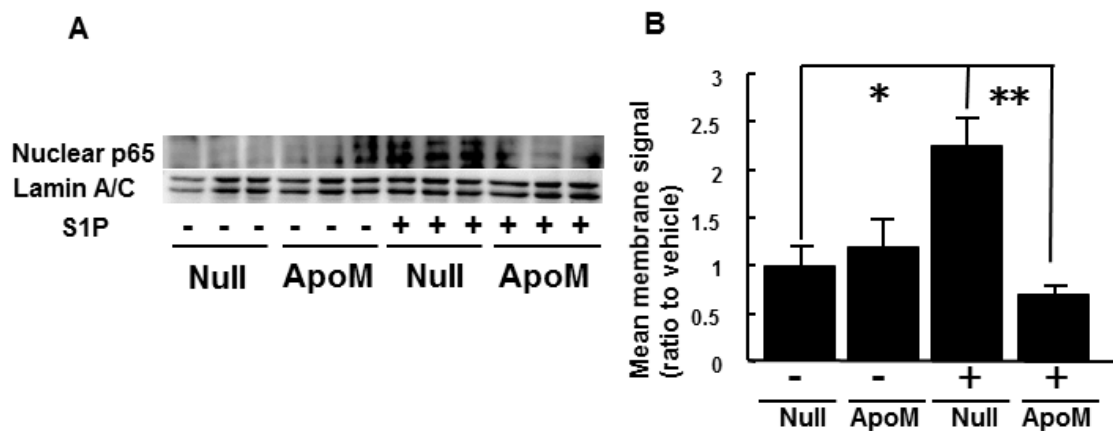


図 14 vehicle による S1P の NFκB 活性化の相違

(A、B) 牛胎児血清を含まない培養液で脂肪細胞を 18 時間培養し、各 vehicle と共に 10 μM S1P を細胞に加えて 30 分後に核蛋白を回収し、ウエスタンブロット法にて核内 p65 発現量を確認した。

A : ApoM 群、Null 群を用いて S1P を投与した場合のウエスタンブロット法による核内 p65 発現量の比較 (n=3)。

B : ImageJ を用いて A の結果を定量し、比較した (n=3)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (多重比較)。

Null、ApoM の 2 群間で核内 p65 発現量に相違は認めなかったが、Null を vehicle として S1P を投与した群では、Null 単独群と比較して核内 p65 の蛋白濃度は高かったが ($P < 0.05$)、ApoM を vehicle として S1P を投与した群では、p65 の核内移行は見られなかった (図 14)。

以上より、アルブミン結合 S1P は NFκB の活性化作用があるが、ApoM 結合 S1P はその作用がないことが示唆された。

10 リコンビナント ApoM を vehicle として S1P を投与しても PAI-1 発現量は増加しない

最後に、アルブミン結合 S1P と ApoM 結合 S1P の PAI-1 発現誘導をより純粋に比較するため、リコンビナント ApoM (rApoM 群) を構築し (図 15A)、アルブミン結合 S1P と rApoM 結合 S1P による PAI-1 発現誘導の相違について検討した。rApoM は 1 mg/ml、アルブミンは 3.5 mg/ml に濃度調整してモル数を合わせて用いた。アルブミンを vehicle として S1P を投与した群では、投与濃度 1 μ M で PAI-1 発現量は有意に増加した ($P < 0.05$) が、rApoM を vehicle として S1P を投与しても PAI-1 発現量は増加しなかった (図 15B)。以上より、ApoM 結合 S1P はアルブミン結合 S1P と比較して PAI-1 発現誘導作用が弱いと考えられた。

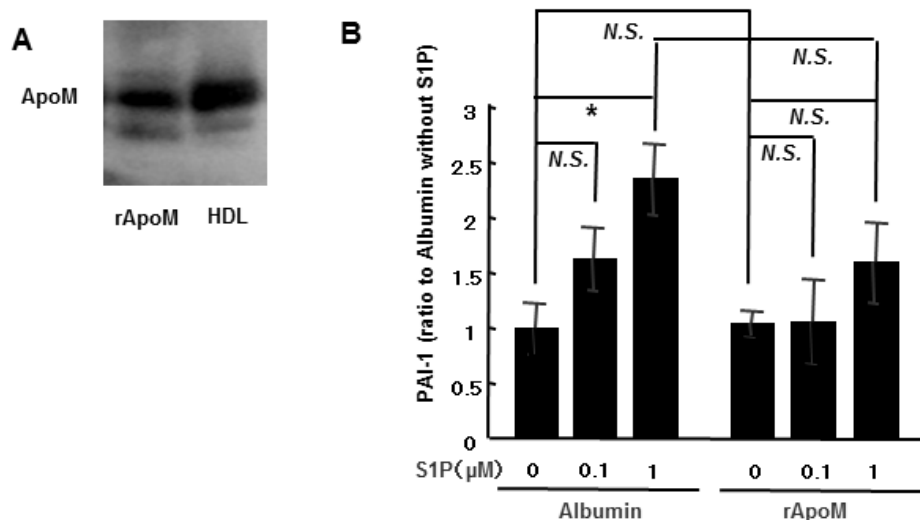


図 15 リコンビナント ApoM を vehicle として投与した S1P とアルブミンを vehicle として投与した S1P の PAI-1 発現誘導の相違

A : 作成したリコンビナント ApoM (rApoM) 中の ApoM 発現量。B : 牛胎児血清を含まない培養液で 18 時間培養した成熟脂肪細胞に (Day10)、1 μ M アルブミン、あるいは作成した 1 μ M rApoM (A) と共に 1 μ M S1P を細胞に加えて 1 時間培養後に、mRNA を回収してリアルタイム PCR 法で PAI-1 mRNA 発現量を

解析した (n=3)。* $P < 0.05$ (多重比較)。

【考察】

本研究では、主にアルブミン結合 S1P と ApoM/HDL 結合 S1P の PAI-1 発現誘導における相違について検討した。その結果、①活性化血小板より放出される S1P は、HDL 分画よりもアルブミン分画（LDP 分画）に分布しやすい、② ApoM/HDL 結合 S1P はアルブミン結合 S1P と比較して PAI-1 発現誘導作用が弱い、③脂肪細胞においてアルブミン結合 S1P の PAI-1 発現誘導作用において、S1PR2→Rho/ROCK→NFκB の活性化が関与している可能性があり、このシグナルの活性化は、ApoM 結合 S1P では見られないことを明らかにした。以下、本研究の結果を順に考察する。

①活性化血小板より放出される S1P は、HDL 分画よりもアルブミン分画（LDP 分画）に分布しやすい

血小板を活性化させると、血小板が活性化されない群と比較して LDP 分画における S1P 含有量が有意に増加した（図 5）。この結果から、血小板内に貯蔵されていた S1P が、血小板の活性化に伴って循環血液中に放出され、特にアルブミンの存在する LDP 分画に分布しやすい可能性が示された。S1P は、細胞外において主に運搬体と結合して存在すると報告されており⁴⁶、血小板から循環血液中へ放出された S1P は原則として、これらの運搬体と結合することにより、代謝分解を受けにくくなることが報告されている⁴⁷。一方で、運搬体と結合できな

かった遊離型 S1P は、S1P ホスファターゼや S1P リアーゼによる代謝を受けやすくなり、血液中には長く存在できないと考えられる。実際、遊離型 S1P は、血漿 S1P のわずか 2-4%（およそ 4-8 nM）に過ぎないと報告されており^{26,27,48}、低濃度でかつ半減期が非常に短いと推測される遊離型 S1P が、生体内において S1PR アゴニスト作用を有するとは考えにくい。

血小板から S1P が放出される機序についての報告は多くないが、Jonnalagadda らは、2つの機序を提唱している。すなわち、血小板膜に存在する貯蔵部位からの S1P の放出で、血小板の刺激に因らない放出と、 α 顆粒に貯蔵されている S1P が血小板の活性化に伴ってエキソサイトーシスによって細胞外へと放出される機序である⁴⁹。一方で、Igarashi らは、血小板内の S1P は、 α 顆粒からのエキソサイトーシスによらず、血小板膜に局在している S1P が、トロンビンあるいはカルシウムによる刺激により放出される、と提唱しており⁵⁰、結論は出ていない。血小板から短時間に放出された高濃度の S1P は、本研究の結果からは HDL 分画中の ApoM よりも LDP 分画中のアルブミンを運搬体として選択していると考えられる。血小板から放出される S1P の運搬体選択性についての既報はないが、アルブミン濃度を増加させることにより、活性化血小板からの S1P 放出が増加するという報告や⁴⁹、アルブミンと比較して HDL は活性化血小板から S1P を放出させる効果が弱い⁵¹、という報告もあり、活性化されていない血小板において

も、先に述べたように刺激によらずに S1P が放出されていることが報告されているが、この放出についてもアルブミンが必要と報告されている^{50,52,53}。これらの報告は、血小板由来の S1P の放出のされやすさについての検討ではあるが、S1P が循環血漿中においては原則として、運搬体と結合して存在し、遊離 S1P は代謝分解されやすいといった性質を考慮すると、血小板由来の S1P の放出のされやすさは、放出された S1P の運搬体への結合のしやすさをある程度反映しているとも考えられる。

健康人の生体内の血漿 S1P 濃度は数 100 nM 程度であり、赤血球濃度に依存すると報告されている⁵²。その理由として、血小板 1 つに含まれる S1P 濃度は、赤血球 1 つあたりに含まれる S1P 濃度のおよそ 9 倍とも報告されているが、直径 2-3 ミクロンの血小板は、直径 7.5 ミクロンの赤血球よりも 1 血球あたりの体積が小さく、赤血球は血液細胞のおよそ 95% を占めるため、総体積は血小板よりも赤血球の方が極めて大きいことが挙げられる⁵⁴。一方で、血小板に多く貯蔵されている S1P は、血小板の活性化に伴って血液中に放出されると報告されており⁵⁵、実際に急性冠症候群のように血小板の活性化が著しい病態においては、血漿 S1P 濃度は血小板に由来する部分が大きくなる^{48,56}。現在までに、急性冠症候群の血漿 S1P が上昇した、という報告はない。一方で、冠動脈疾患の患者血漿では、アルブミン結合 S1P に比較して HDL 結合 S1P が高い、とも報告されて

おり、同報告では、HDL コレステロール濃度が冠動脈疾患群において有意に減少していたものの、両群における HDL 1mg あたりの S1P 含有量を測定した結果においてもなお、冠動脈疾患群の S1P 含有量は健常者と比較して低い、と報告している³⁴。よって、冠動脈疾患群において HDL-S1P が低い原因は、HDL 濃度の減少の他にもある可能性が示唆される。

なぜ、活性化血小板由来の S1P が、ApoM/HDL よりもアルブミンを運搬体として選択しているのか、について本研究では解明できていない。しかし、アルブミン結合 S1P と比較して ApoM 結合 S1P は、代謝分解を受けにくく血液中においておよそ 5 倍長く存在するとも報告されており³⁰、S1P と ApoM との結合は、S1P とアルブミンとの結合よりも強い、あるいは長く維持されていると考えられる。よって、血小板血栓が形成される局所において、短時間に高濃度の S1P が血小板から放出される病態では、S1P との結合を解きやすいアルブミンの方が、ApoM よりも血小板由来の高濃度の S1P と新たに結合しやすい、と予想される。

また、ヒトにおける血漿 ApoM 濃度はおよそ 1 μ M 程度⁵⁷、血漿 S1P は数 100 nM 程度⁵²、血清アルブミン濃度は 3.5 - 5 g/dl⁵⁸ (モル濃度に換算すればおよそ 600 - 800 μ M)であり、アルブミンは ApoM に比較して非常に多く血液中に存在している一方で、1 μ M 程度と報告されている ApoM は、飽和されている可能性も考えられ、血液中の運搬体の濃度の違いが、局所における S1P との結合のされやす

さに影響している可能性もある。ただし、数 100 nM と報告されている血漿 S1P の約 2/3 が ApoM と結合している既報からは、ApoM 結合 S1P 濃度は、総 ApoM 濃度の半分以下と考えられ、血液中の ApoM が飽和されていない可能性も考えられる。

また、健常者における血漿 S1P 濃度は主に赤血球由来の S1P であり、これらは主に ApoM/HDL と結合している。一方で、活性化血小板より放出される S1P は、運搬体の選択性の意義は上記のように解明できていないが、少なくとも本研究の結果からはアルブミンと結合しやすいと考えられる。このように、同じ S1P ではあるが、産生細胞が赤血球であれば ApoM/HDL と結合しやすく、活性化血小板であればアルブミンと結合しやすい、といった産生細胞による S1P の違いにより、選択される運搬体が異なる可能性もある。赤血球と血小板における S1P の産生において大きく異なる点として、律速酵素である SphK1、2 のどちらの活性が高いか、が挙げられる。すなわち、赤血球では SphK1、血小板では SphK2 の活性がそれぞれ高いと報告されている。SphK の種類による S1P の作用の違いについて直接比較検討している報告はないが、SphK1 と SphK2 が生体に及ぼす影響は同じでないことが報告されている。例えば、SphK1 の過剰発現により乳癌細胞の増殖や浸潤が強くなるという報告や⁵⁹、SphK2 を活性化させたマウスで、肝硬変やインスリン抵抗性が改善するという報告⁶⁰ などがある。血

血小板の活性化がない通常の血管内において、赤血球の他に、血小板や血管内皮細胞を由来とする S1P が血漿 S1P に寄与しており⁴⁷、これらの由来の違いによる S1P の運搬体の選択性の相違は報告がない。しかし、以上のような S1P の産生細胞における SphK の活性の違い、SphK の種類により異なる細胞応答を考慮すると、やはり同じ S1P ではあるが、その性質は異なる可能性は否定できない。

以下、脂肪細胞における検討で用いた S1P は、すべて赤血球由来のものである。現在販売されている研究用 S1P は、赤血球由来のものに限られ、血小板由来の S1P はないため、由来による S1P の作用の違いについて検討できていない点は、本研究の限界として挙げられる。

②ApoM/HDL 結合 S1P はアルブミン結合 S1P と比較して PAI-1 発現誘導作用が弱い

本研究では、PAI-1 発現誘導に対する、S1P の運搬体の相違について以下のような vehicle の組み合わせにおいて検討した。

1) HDL と LDP の比較

健常人採血により得た血漿から超遠心分離し、蛋白濃度調整を行った各 HDL、リポ蛋白欠損血漿 (LDP) を vehicle として 10 μ M S1P を脂肪細胞に投与したところ、LDP を vehicle として S1P を投与した場合のみ PAI-1 発現量が有意に増加した (図 7)。S1P を加えていない状態の各 vehicle 中の S1P 濃度は、total HDL 75.9

nM、HDL₂ 40.8 nM、HDL₃ 73.5 nM、LDP 16.4 nM と、10 μ M と比較して非常に低濃度であり、これらの内因性の S1P の影響は無視できると考えた。また、図 8 に示す vehicle 中の S1P の分布も考慮すると、脂肪細胞において PAI-1 発現量を増加させるのは、HDL と結合している S1P ではなく、LDP 分画に分布している、おそらくアルブミンと結合している S1P であると考えられる。

HDL を vehicle として S1P を投与して PAI-1 産生を調べている論文は 1 報しかない³⁸。既報において Lee らは HDL₃ を成熟脂肪細胞に投与すると、HDL₃ の濃度依存性に脂肪細胞での PAI-1 産生量が増加するという結果から、HDL₃ に含まれる S1P が PAI-1 産生を亢進させる可能性を示していたが、本研究においては、得られた各リポ蛋白を脂肪細胞に投与して、4 時間後の PAI-1 mRNA 発現量を検討し、いずれのリポ蛋白の投与によっても PAI-1 mRNA 発現量は有意には増加しなかった（図 7）。この結果の相違の理由としては、実験方法の違いが挙げられる。すなわち、本研究ではあらかじめ 18 時間にわたり牛胎児血清を含まない培養液で細胞を培養することで、余計なアルブミンや牛胎児血清中の S1P を可能な限り除去してから S1P を投与して検討を行っているが、既報では、特に培養液中の牛胎児血清を除く手段はとられていない。よって、HDL を投与した場合に含まれる S1P が、残存する培養液中のアルブミンと結合した可能性がある。本研究においては、S1P を直接各 vehicle に溶解して細胞に投与しているため、

vehicle 作成時にリポ蛋白、アルブミンが混ざり合う可能性は極めて低いと考えられる。

また、HDL のうち ApoM を有する HDL は全体の 5 - 10%程度、さらに血漿 ApoM 濃度は 1 μ M 程度と報告されており⁶¹、投与された S1P がすべて HDL と結合しているとは考えにくい。よって、本研究の限界として、遊離 S1P の存在について検討していない点、また HDL について、ApoM を有する HDL、ApoM を持たない HDL に分けて検討していない点が挙げられる。

2)ApoM と Null の比較、si-ApoM、si-Alb と si-Ctl の比較

ApoM に富む vehicle (ApoM) を用いて S1P を投与した場合、コントロールの vehicle (Null) を用いて S1P を投与した場合よりも PAI-1 の発現増加の程度は小さかった (図 9A)。逆に、ApoM の発現を抑制した vehicle (si-ApoM) を用いて S1P を投与した場合、コントロールの vehicle (si-Ctl) を用いて S1P を投与した場合よりも、脂肪細胞における S1P の PAI-1 発現増加効果は大きかった (図 9C)。

図 8 にて検討した vehicle の性質 (ApoM に富む vehicle は HDL 分画に S1P が多く分布し、コントロール vehicle ではアルブミンの分布する LDP 分画に多く分布する) を考慮すると、この結果は、ApoM に結合した S1P はアルブミンに結合した S1P と比較して、少なくとも PAI-1 誘導作用は弱いことが示唆される。

もっとも、si-Alb を vehicle として S1P を投与しても、si-Alb の単独投与群と

比較して PAI-1 発現量は有意に増加していたが (図 9D)、その理由として、si-Alb 中には、少量のアルブミンも存在しているため (図 8D)、溶解した S1P が ApoM だけでなく、ある程度はアルブミンと結合し、アルブミン結合 S1P の影響が反映されたためと考えられ、ApoM 結合 S1P が、全く PAI-1 を発現誘導しない可能性もある。しかし、この検討においても、前述のように、遊離 S1P の存在について検討できていない。遊離 S1P は、生体内では、運搬体と結合している S1P と比較して、血液中における濃度は非常に低く、代謝分解されやすいため、S1PR アゴニスト作用を有するとは考えにくい。一方で、細胞培養液中においては、S1P の分解酵素である S1P リアーゼ (SPL)、あるいは S1P の他のリゾリン脂質も基質とする Lipid phosphate phosphohydrolase (LPP) が生体と同様に存在しているとは考えにくい。よって、本研究のような培養細胞を用いた *in vitro* の検討において、遊離 S1P の存在は無視できず、今後検討が必要な点である。ただし、マウスに ApoM を、アデノウイルスを用いて過剰発現させた *in vivo* の検討結果からは、ApoM マウスでは血漿 S1P 濃度が上昇するが、血漿 PAI-1 濃度と脂肪組織 PAI-1 発現量には変化がみられなかった (図 10)。肝臓における ApoM の過剰発現に伴って上昇した S1P が、ApoM とアルブミンのどちらの運搬体と結合した S1P であるのかは検討していないが、血漿 ApoM 濃度に伴い、ApoM 結合 S1P は増加している可能性は高い。それに加えて、血漿アルブミン結合 S1P が、ApoM

の過剰発現に伴って増加した、あるいは減少した可能性も否定はできない。

ApoM 結合 S1P のみが増加した、あるいは ApoM 結合 S1P が増加してアルブミン結合 S1P が減少した、と仮定すると、やはり ApoM 結合 S1P には PAI-1 発現誘導作用はない、あるいはわずかである、また ApoM 結合 S1P の方が、アルブミン結合 S1P よりも結合が強靱であると考えられる。一方で、ApoM 結合 S1P とともにアルブミン結合 S1P が増加した、と仮定すると、ApoM の過剰発現は、S1P の産生あるいは血漿への輸送を増加させ、血漿中に増加した ApoM に加えて、もともと多く存在するアルブミンも S1P の運搬体として動員された、という機序が考えられる。この場合には、アルブミン結合 S1P による PAI-1 発現誘導作用を、共に増加した ApoM 結合 S1P が打ち消した、あるいは、アルブミン結合 S1P の増加の程度が小さかった、と考えられるが、いずれの場合においても、ApoM 結合 S1P の、PAI-1 発現誘導作用はわずかであると考えられる。

3)リコンビナント ApoM、アルブミンの比較

最後に、ApoM 自体とアルブミンを直接比較するため、リコンビナント ApoM (rApoM) あるいはアルブミンを vehicle として S1P を脂肪細胞に投与し PAI-1 mRNA 発現量について比較した。その結果、アルブミンを vehicle として S1P を投与すると PAI-1 発現量は有意に増加したが、rApoM を vehicle として S1P を投与しても PAI-1 発現量は変わらなかった(図 15B)。この結果から、直接的に ApoM

結合 S1P は、アルブミン結合 S1P と異なり、PAI-1 発現誘導作用はない、ということが示された。

さて、ApoM は、約 26 kDa の糖蛋白で、リポカリン蛋白ファミリーのひとつであり、疎水性の結合ポケットを有し、そこに脂溶性のリガンドを結合させることができる^{29,62}。主に、肝臓、腎臓から分泌され、血漿中では約 1 μ M 程度存在し、HDL のうち ApoM を含む HDL の割合は 5-10%程度である⁵⁷。HDL とは、N末端アミノ酸配列によってつながっており、この配列が壊れると ApoM と HDL の結合は解消され、ApoM は腎臓で代謝されやすいと考えられ、さらにヒトやマウスの体内における検討から、血漿 ApoM 濃度と総 HDL 濃度に正の相関があることが示されている⁵⁷。*in vitro* の検討においては、ApoM を含まない HDL に比較して、ApoM を含む HDL は、LDL の酸化を防ぐ作用が強く、泡沫細胞からコレステロールを運び出す効果が高いことが示され⁶³、糖尿病モデルマウス、糖尿病患者、メタボリックシンドロームの基準を満たす患者において、ApoM 発現量が減少しているという報告もされている^{64,65}。これらの既報から ApoM は抗動脈硬化作用を有するアポ蛋白であると考えられているが、本研究ではさらに、ApoM には S1P による PAI-1 の誘導を減弱させるという新しい抗動脈硬化作用を有することが示唆され、動脈硬化の分野における rApoM の治療医学的な応用が期待される。

③ 脂肪細胞においてアルブミン結合 S1P は、**S1PR2→Rho/ROCK→NFκB** を活性化させて **PAI-1** 発現量を増加させるが、このシグナルの活性化は、**ApoM 結合 S1P** では見られない

1) アルブミン結合 S1P と ApoM 結合 S1P の S1PR2 活性化作用の相違

S1P の運搬体による生物学的活性の相違 (ApoM/HDL 結合 S1P とアルブミン結合 S1P の相違) については、近年様々な細胞で検討されている。例えば、HDL/ApoM 結合性 S1P は、血管内皮細胞のバリア機能維持や⁶⁶、膵臓β細胞からのインスリン分泌を亢進させ³⁰、リンパ球の増殖には抑制的に働くという報告がある³²。いずれの報告においても、ApoM/HDL と結合した S1P は、S1PR1 あるいは S1PR3 の活性化作用が強い、と考えられている。しかし、脂肪細胞における運搬体による S1P の作用の相違を調べた既報はなく、本研究が初めてである。さらに、本研究では、脂肪細胞において、ApoM 結合 S1P はアルブミン結合 S1P と比較して、S1PR2 に対するアゴニスト活性が低い可能性を示唆した初めての研究である。

S1PR2 以外の S1PR は、主に Gi-PI3K-Akt 経路に関与して、血管内皮細胞の機能維持や⁶⁷や膵臓β細胞のインスリンの分泌亢進作用³⁰などといった作用が示されてきたが、S1PR2 は G_{12/13} と主に結合しており、G_i とは優位に結合していないことが報告され、網膜における血管新生作用⁶⁸、血管内皮細胞の機能不全⁶⁹と

いった作用も報告されている。

PAI-1 の誘導に関しても、本研究からは S1PR2 が責任受容体と考えられ（図 11）、次のように既報と合致する結果である。2010 年に Lee らは、薬理的あるいは siRNA を用いて S1PR2 を阻害することにより、S1P は S1PR2 を介して PAI-1 産生を増加させることを報告しており³⁸、2013 年に Ito らも同様に S1PR2 により PAI-1 発現が誘導されることを示している⁸。このことは、本研究において S1PR2 の下流に存在する Rho/ROCK を阻害することによりアルブミン結合 S1P の PAI-1 発現誘導を阻害できたという結果も支持している。

S1PR アンタゴニストを用いた実験において、興味深いことに、本研究では、S1PR1、3 のアンタゴニストである VPC23019 の存在下では、S1P の PAI-1 発現増加作用がより強い、という結果を得た（図 11A）。また、S1P 非存在下でも VPC23019 は、PAI-1 発現を増加させる傾向があった。この結果は、2010 年の Lee らの論文と合致する。これらの結果の機序としては、まず、S1PR1 あるいは S1PR3 経路は PAI-1 発現を抑制する作用があることが考えられる。S1P 非存在下でも VPC23019 は PAI-1 産生が亢進した理由として、細胞膜に存在する S1P が S1PR1 に結合し、S1PR1 アゴニストとして関与した可能性が考えられる。実際、2012 年に Hanson らによって報告された S1PR1 の結晶構造によれば、S1PR1 の結合部位は膜貫通部位に存在し⁷⁰、リガンドは S1PR1 の側方にアプローチして結合す

ると考えられる。このような S1PR1 の構造上の特徴から、内因性、特に膜性の S1P が S1PR1 に結合する可能性もある。もう一つの可能性としては、VPC23019 の S1PR1、3 に対するアンタゴニスト作用以外の作用による可能性が考えられる。実際、S1PR1、3 の下流に存在する主なシグナル伝達経路である PI3K→Akt 経路を阻害する wortmannin を投与しても、PAI-1 発現は増加していなかった(図 11B)。また、S1PR1 アゴニストである SEW2871 を脂肪細胞に投与しても、PAI-1 発現量は減少しなかった(結果の掲載なし)。よって、S1PR1、3 の活性化が PAI-1 の発現抑制作用を有する可能性は低いと考えられ、やはり VPC23019 の S1PR1、3 アンタゴニスト作用以外の作用によるのかもしれない。本研究の結果からは、VPC23019 が S1PR2 アゴニスト作用を有する可能性も考えられるが、VPC23019 の各 S1PR に対するアゴニスト作用を検証している既報によれば、VPC23019 は S1PR4、5 に対するアゴニスト作用を有するが、S1PR2 アゴニスト作用はない⁷¹。S1PR4、5 は、共に G_i、G_{12/13} と共役しているが、脂肪細胞における発現量は S1PR1-3 と比較してわずかであり³⁸、その関与は考えにくい。

このように、S1P と S1PR1-5 の関係は複雑であり、薬理的拮抗剤による検討のみでは十分でなく、si-RNA を用いて各受容体の発現を抑制し、さらに詳細な検討を行う必要がある。

さて、アルブミン結合 S1P は、S1PR2 経路を介して PAI-1 発現を誘導してい

ることから、ApoM 結合 S1P には S1PR2 経路の活性化作用がない、もしくはわずかであると考えられる。そこで、S1PR2 の下流にある Rho 経路の活性化によってモエシンがリン酸化されることは既に報告されているため⁷²、モエシンのリン酸化の程度を比較することによって、アルブミン結合 S1P と ApoM 結合 S1P による S1PR2 経路活性化の相違を検討した。その結果、コントロール vehicle を用いて S1P を投与するとモエシンのリン酸化が亢進するが、ApoM に富む vehicle を用いて S1P を投与してもモエシンのリン酸化が亢進しないことが分かった(図 12)。よって、ApoM 結合 S1P は S1PR2 経路を活性化しない可能性が示唆された。

本研究において、ApoM 結合 S1P の、S1PR2 に対するアゴニスト活性が低い機序については解明できていない。一方で、S1P が ApoM の中に組み込まれ、それによって S1P が S1PR1 に対して結合しやすくなると提唱する報告もある²⁸。また、HDL 上に存在する ApoM 結合 S1P は、スカベンジャー受容体 BI などの HDL 結合受容体を選択することにより、アルブミン結合 S1P とは異なるアプローチで細胞と相互作用する可能性もある²¹。

前述のとおり、動脈硬化症の分野においては、S1PR1、3 経路は抗動脈硬化作用、S1PR2 経路は催動脈硬化作用を発揮することを考えると、ApoM 結合 S1P とアルブミン結合 S1P の各 S1PR に対するアゴニスト活性の相違の可能性は、S1P を治療医学的、検査医学的に応用する際に重要な課題であり、今後さらなる

検討が必要である。

2) アルブミン結合 S1P と ApoM 結合 S1P の NFκB の活性化作用の相違

S1P と PAI-1 をつなぐシグナル経路のうち、Rho 経路以下のシグナルについての既報はないため、本研究では、PAI-1 遺伝子のプロモーター領域に結合すると報告されている様々な転写因子 (Smad3, HIF1α, NFκB) の薬理的阻害剤を用いて、S1PR2 と PAI-1 の間に存在するシグナル経路についてさらに検討を行った。まず、Smad3, HIF1αは、PAI-1 発現制御において関連が報告された転写因子であるが^{73 74}、我々の検討においては、Smad3, HIF1αの阻害剤を用いてもアルブミン結合 S1P による PAI-1 発現増加は抑制されなかったため、いずれの転写因子も、S1P による PAI-1 誘導には関与しないと考えられた。ただし、Smad3 の阻害剤の存在下においては、S1P の PAI-1 発現誘導作用はより亢進した点は、無視できない。Smad3 は、TGFβにより活性化される転写因子であり、TGFβは PAI-1 のプロモーター領域に存在する Smad binding element (SRE)を介して発現誘導する、PAI-1 の正の制御因子である⁷⁵。よって、Smad3 のリン酸化を抑制する SIS3 の投与により、S1P の PAI-1 発現誘導作用がかえって亢進した結果は、TGFβ / Smad3 シグナル経路が、S1P→PAI-1 経路に対して負の制御作用を有する可能性を示唆する。2013年には、Smad3 発現抑制マウスにおいて S1PR3 の発現が減少すると報告されており⁷⁶、Smad3 と S1P のクロストークが存在する可能性も考えられ、

TGFβと S1P の関連については今後さらなる検討が必要である。

一方で、NFκB の阻害剤である BAY11-7082 は、アルブミン結合 S1P による PAI-1 発現増加作用を阻害した。

さて、NFκB とは、p50 / p105、p52 / p100、p65、c-Rel、RelB 蛋白が形成したホモ二量体あるいはヘテロ二量体のことである。転写抑制因子である IκB 蛋白と結合している状態では不活性化されているが、IκB がリン酸化されることにより、NFκB が活性化され細胞質から核内へと移動し転写因子としての役割を獲得する⁷⁷。BAY11-7082 は、不可逆的に IκBαのリン酸化を阻害することにより、細胞質内の p65 / p50 ヘテロ二量体が活性化されて核内に移動することを阻み、結果的に NFκB の転写因子としての働きを抑制する。S1P と NFκB の関連については、これまでに多数の報告があるが、いずれの報告においても、S1P の運搬体によるシグナルの違いについては検討されていない。本研究の限界として、S1PR1 と NFκB の関連について直接検討を行っていない点が挙げられるが、S1PR1 のアンタゴニストである VPC23019 を用いてもアルブミン結合 S1P の PAI-1 発現誘導作用が抑制できなかったことから、少なくとも PAI-1 発現誘導機序において S1PR1 の活性化による NFκB 活性化が関与している可能性は低いと考えられた。さらに、多くの細胞において Rho の活性化により NFκB が活性化されると報告されているため⁷⁸、脂肪脂肪においてアルブミン結合 S1P は、S1PR1 ではなく、

S1PR2 の活性化を通じて NFκB を活性化し、PAI-1 発現を誘導している可能性が考えられた。

この想定される NFκB の活性化に関して、アルブミン結合 S1P と ApoM 結合 S1P で相違があるかどうか検討するために、本研究では、p65 の核内移行を調べた。核内の p65 検出量はコントロール vehicle を用いて S1P を投与した場合は増加し、一方で、ApoM に富む vehicle を用いて S1P を投与した場合は変化がなかった（図 14）。NFκB の活性化は、乳癌⁷⁹、急性骨髄性白血病の進行⁸⁰といった悪性腫瘍、アルツハイマー病などの神経疾患⁸¹、アトピー性皮膚炎⁸²、気管支喘息⁸³といったアレルギー疾患などの多くの疾患に関連しており、S1P の運搬体による NFκB の活性化の相違が、他の細胞、組織で見られるかは不明であるが、本研究成果を他の疾患に応用するために今後さらなる検討が必要と考えられる。また、薬理的阻害剤を用いた検討、核の p65 発現量の比較により、NFκB の活性化が S1P の PAI-1 発現誘導作用に関与している可能性が示されたが、レポーターアッセイを用いた転写活性については検討できておらず、より確実な検討が今後必要である。

以上より、血小板が活性化され、血栓形成が生じる局所においては、活性化血小板より放出された高濃度の S1P が、主にアルブミンと結合した形で作用し、S1PR2 への結合を介して線溶抑制因子である PAI-1 の発現を促進することが想

定された。

炎症刺激を受けた血管内皮細胞が **S1PR2** を発現することを考えると⁸⁴、脂肪細胞で観察されたことは血管内皮細胞にもあてはまることが予想され、より催動脈硬化作用を発揮することが想定される。健常の血管内を循環している **S1P** は、主に赤血球由来とされており⁵²、この **S1P** はアルブミンよりも **HDL/ApoM** に多く結合し、血管内皮細胞上の **S1PR1** への結合を介して血管拡張作用、血管内皮結合維持作用といった抗動脈硬化作用を有すると考えると^{22,23}、生体における **S1P** の運搬体依存の作用の重要性が想定される。

【結語】

本研究では、アルブミン結合 S1P は PAI-1 を誘導するが、ApoM 結合 S1P にはそのような作用がない可能性を示した。その機序としては、前者は S1PR2-Rho-NFκB 経路を活性化するが、後者はこの経路の活性化作用がない、あるいはわずかであると考えられた。ApoM 結合 S1P が S1PR2 に対するアゴニスト活性が弱い機序については解明されていないが、本研究の結果から動脈硬化性疾患における ApoM の治療医学的あるいは検査医学的有用性が示唆された。すなわち、ApoM は、S1PR1、3 を介して、血管拡張作用、血管内皮細胞のバリア機能を増加させる作用といった、既知の作用に加え、血栓促進因子である PAI-1 の発現を誘導する S1P の有害性を弱める性質も持ち合わせている可能性が考えられた。リコンビナント ApoM や ApoM ペプチドの開発によって、動脈硬化性疾患に対する新規治療法および、動脈硬化性疾患の危険性を予測する検査方法として、今後の ApoM の臨床応用が期待される。

最後に、本研究をまとめた図を記す（図 16）。

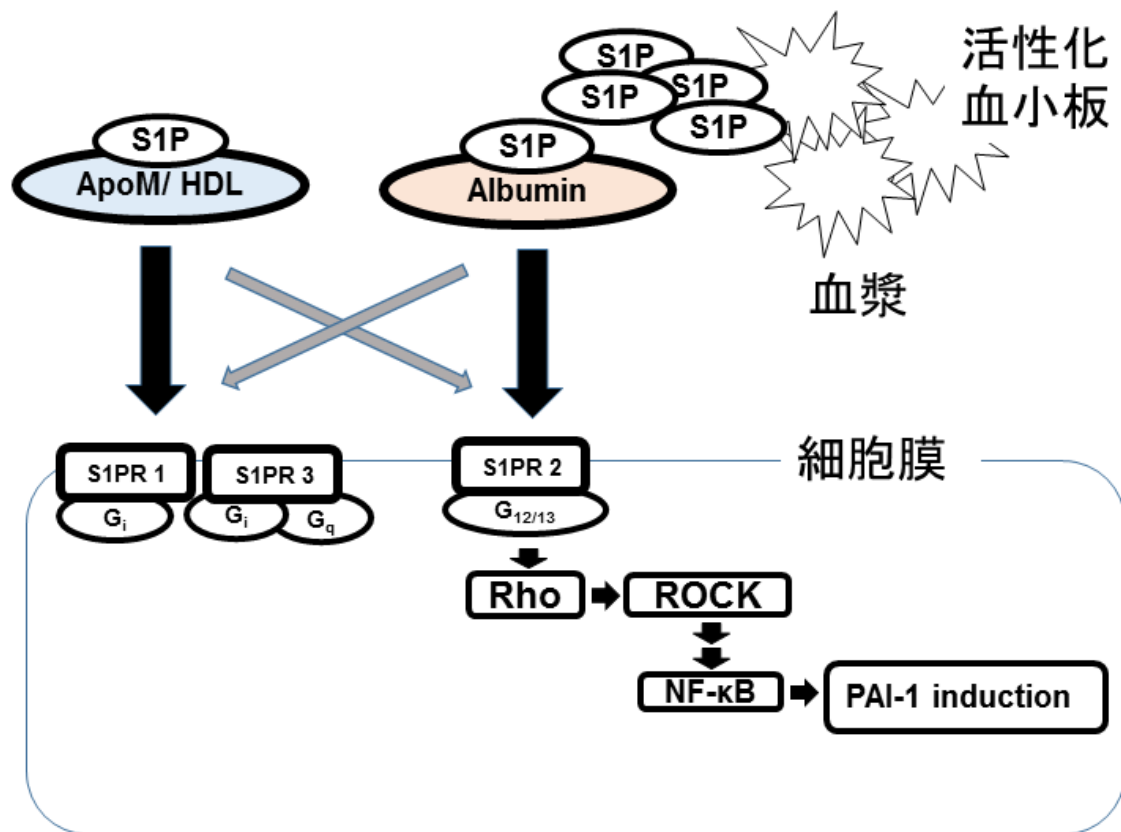


図 16 本研究のまとめ

活性化血小板より放出された S1P は、ApoM/HDL よりもアルブミンと結合し、脂肪細胞の細胞膜上の S1PR2 への結合、Rho/ROCK→NFκB の活性化を介して PAI-1 の発現誘導作用を発揮する。

謝辞

本研究に関しまして終始一貫ご指導を賜り、また本論文の御高閲を賜りました東京大学大学院医学系研究科内科学専攻臨床病態検査医学分野 矢富裕 教授に深く御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、直接の御指導を頂き、また本論文をまとめるにあたり終始御指導下さいました東京大学医学部附属病院検査部 蔵野信先生に深く感謝申し上げます。

そして、本研究の遂行にあたり、有益な御指導、貴重な御助言を頂きました東京大学医学部附属病院検査部 西川真子 先生に深く感謝申し上げます。

1. Day, I.S.C.f.W.T. Thrombosis: a major contributor to the global disease burden. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **12**, 1580-1590 (2014).
2. Mackman, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* **451**, 914-918 (2008).
3. van Meijer, M. & Pannekoek, H. Structure of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and its function in fibrinolysis: an update. *Fibrinolysis* **9**, 263-276 (1995).
4. Morange, P.E., *et al.* PAI-1 produced ex vivo by human adipose tissue is relevant to PAI-1 blood level. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **19**, 1361-1365 (1999).
5. Barnard, S.A., Pieters, M. & De Lange, Z. The contribution of different adipose tissue depots to plasma plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels. *Blood reviews* (2016).
6. Yamamoto, K., Takeshita, K., Kojima, T., Takamatsu, J. & Saito, H. Aging and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulation: implication in the pathogenesis of thrombotic disorders in the elderly. *Cardiovascular research* **66**, 276-285 (2005).
7. Kohler, H.P. & Grant, P.J. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *The New England journal of medicine* **342**, 1792-1801 (2000).
8. Ito, S., *et al.* Increased plasma sphingosine-1-phosphate in obese individuals and its capacity to increase the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in adipocytes. *Coronary artery disease* **24**, 642-650 (2013).
9. Samad, F., *et al.* Tumor necrosis factor alpha is a key component in the obesity-linked elevation of plasminogen activator inhibitor 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6902-6907 (1999).
10. Samarakoon, R., Higgins, S.P., Higgins, C.E. & Higgins, P.J. TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells requires pp60(c-src)/EGFR(Y845) and Rho/ROCK signaling. *Journal of molecular and cellular cardiology* **44**, 527-538 (2008).
11. Perkins, J.M., Joy, N.G., Tate, D.B. & Davis, S.N. Acute effects of hyperinsulinemia and hyperglycemia on vascular inflammatory biomarkers and endothelial function in overweight and obese humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **309**, E168-176 (2015).
12. Alessi, M.C., Juhan-Vague, I., Kooistra, T., Declerck, P.J. & Collen, D. Insulin stimulates the synthesis of plasminogen activator inhibitor 1 by the human hepatocellular cell line Hep G2. *Thrombosis and haemostasis* **60**, 491-494 (1988).
13. Bryan, L., *et al.* Sphingosine-1-phosphate and interleukin-1 independently regulate plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase-type plasminogen activator

- receptor expression in glioblastoma cells: implications for invasiveness. *Molecular cancer research : MCR* **6**, 1469-1477 (2008).
14. Takuwa, Y., Okamoto, Y., Yoshioka, K. & Takuwa, N. Sphingosine-1-phosphate signaling in physiology and diseases. *BioFactors (Oxford, England)* **38**, 329-337 (2012).
 15. Chan, H. & Pitson, S.M. Post-translational regulation of sphingosine kinases. *Biochimica et biophysica acta* **1831**, 147-156 (2013).
 16. Takuwa, Y. Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochimica et biophysica acta* **1582**, 112-120 (2002).
 17. Le Stunff, H., Milstien, S. & Spiegel, S. Generation and metabolism of bioactive sphingosine-1-phosphate. *Journal of cellular biochemistry* **92**, 882-899 (2004).
 18. Ikeda, H., *et al.* Antiproliferative property of sphingosine 1-phosphate in rat hepatocytes involves activation of Rho via Edg-5. *Gastroenterology* **124**, 459-469 (2003).
 19. Yamaguchi, H., *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptor subtype-specific positive and negative regulation of Rac and haematogenous metastasis of melanoma cells. *The Biochemical journal* **374**, 715-722 (2003).
 20. Inoki, I., *et al.* Negative regulation of endothelial morphogenesis and angiogenesis by S1P2 receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **346**, 293-300 (2006).
 21. Kimura, T., *et al.* Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **281**, 37457-37467 (2006).
 22. Igarashi, J., Bernier, S.G. & Michel, T. Sphingosine 1-phosphate and activation of endothelial nitric-oxide synthase. differential regulation of Akt and MAP kinase pathways by EDG and bradykinin receptors in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **276**, 12420-12426 (2001).
 23. Garcia, J.G., *et al.* Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *The Journal of clinical investigation* **108**, 689-701 (2001).
 24. Sanchez, T., *et al.* Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *J Biol Chem* **278**, 47281-47290 (2003).
 25. Sanchez, T. & Hla, T. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem* **92**, 913-922 (2004).

26. Okajima, F. Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? *Biochim Biophys Acta* **1582**, 132-137 (2002).
27. Murata, N., *et al.* Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *The Biochemical journal* **352 Pt 3**, 809-815 (2000).
28. Christoffersen, C., *et al.* Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9613-9618 (2011).
29. Xu, N. & Dahlback, B. A novel human apolipoprotein (apoM). *The Journal of biological chemistry* **274**, 31286-31290 (1999).
30. Kurano, M., *et al.* Induction of insulin secretion by apolipoprotein M, a carrier for sphingosine 1-phosphate. *Biochimica et biophysica acta* **1841**, 1217-1226 (2014).
31. Wilkerson, B.A., Grass, G.D., Wing, S.B., Argraves, W.S. & Argraves, K.M. Sphingosine 1-phosphate (S1P) carrier-dependent regulation of endothelial barrier: high density lipoprotein (HDL)-S1P prolongs endothelial barrier enhancement as compared with albumin-S1P via effects on levels, trafficking, and signaling of S1P1. *J Biol Chem* **287**, 44645-44653 (2012).
32. Blaho, V.A., *et al.* HDL-bound sphingosine-1-phosphate restrains lymphopoiesis and neuroinflammation. *Nature* **523**, 342-346 (2015).
33. Argraves, K.M., *et al.* S1P, dihydro-S1P and C24:1-ceramide levels in the HDL-containing fraction of serum inversely correlate with occurrence of ischemic heart disease. *Lipids Health Dis* **10**, 70 (2011).
34. Sattler, K.J., *et al.* Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease. *Basic research in cardiology* **105**, 821-832 (2010).
35. Kooistra, T., *et al.* Plasminogen activator inhibitor 1: biosynthesis and mRNA level are increased by insulin in cultured human hepatocytes. *Thrombosis and haemostasis* **62**, 723-728 (1989).
36. Stiko-Rahm, A., Wiman, B., Hamsten, A. & Nilsson, J. Secretion of plasminogen activator inhibitor-1 from cultured human umbilical vein endothelial cells is induced by very low density lipoprotein. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* **10**, 1067-1073 (1990).
37. Samad, F., Hester, K.D., Yang, G., Hannun, Y.A. & Bielawski, J. Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity: a potential mechanism for cardiovascular and metabolic risk. *Diabetes* **55**, 2579-2587 (2006).
38. Lee, M.H., *et al.* HDL3, but not HDL2, stimulates plasminogen activator inhibitor-1 release from adipocytes: the role of sphingosine-1-phosphate. *Journal of lipid research* **51**, 2619-2628 (2010).

39. Yatomi, Y. Plasma sphingosine 1-phosphate metabolism and analysis. *Biochim Biophys Acta* **1780**, 606-611 (2008).
40. Choi, O.M., *et al.* The small molecule indirubin-3'-oxime activates Wnt/beta-catenin signaling and inhibits adipocyte differentiation and obesity. *International journal of obesity (2005)* **38**, 1044-1052 (2014).
41. Kurano, M., *et al.* Liver involvement in sphingosine 1-phosphate dynamism revealed by adenoviral hepatic overexpression of apolipoprotein M. *Atherosclerosis* **229**, 102-109 (2013).
42. Kurano, M., *et al.* LXR agonist increases apoE secretion from HepG2 spheroid, together with an increased production of VLDL and apoE-rich large HDL. *Lipids Health Dis* **10**, 134 (2011).
43. Yokoyama, A., *et al.* MLL becomes functional through intra-molecular interaction not by proteolytic processing. *PloS one* **8**, e73649 (2013).
44. Goguet-Surmenian, E., *et al.* CXCR7-mediated progression of osteosarcoma in the lungs. *British journal of cancer* **109**, 1579-1585 (2013).
45. Adada, M.M., *et al.* Intracellular sphingosine kinase 2-derived sphingosine-1-phosphate mediates epidermal growth factor-induced ezrin-radixin-moesin phosphorylation and cancer cell invasion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **29**, 4654-4669 (2015).
46. Ksiazek, M., Chacinska, M., Chabowski, A. & Baranowski, M. Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. *Journal of lipid research* **56**, 1271-1281 (2015).
47. Proia, R.L. & Hla, T. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *The Journal of clinical investigation* **125**, 1379-1387 (2015).
48. Vito, C.D., *et al.* Platelet-derived sphingosine-1-phosphate and inflammation: from basic mechanisms to clinical implications. *Platelets* **27**, 393-401 (2016).
49. Jonnalagadda, D., Sunkara, M., Morris, A.J. & Whiteheart, S.W. Granule-mediated release of sphingosine-1-phosphate by activated platelets. *Biochimica et biophysica acta* **1841**, 1581-1589 (2014).
50. Kobayashi, N., *et al.* Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner. *Journal of lipid research* **47**, 614-621 (2006).
51. Frej, C., *et al.* Quantification of sphingosine 1-phosphate by validated LC-MS/MS method revealing strong correlation with apolipoprotein M in plasma but not in serum due to platelet activation during blood coagulation. *Analytical and bioanalytical chemistry* **407**, 8533-8542 (2015).

52. Ono, Y., *et al.* Sphingosine 1-phosphate release from platelets during clot formation: close correlation between platelet count and serum sphingosine 1-phosphate concentration. *Lipids in health and disease* **12**, 20 (2013).
53. Ulrych, T., *et al.* Release of sphingosine-1-phosphate from human platelets is dependent on thromboxane formation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **9**, 790-798 (2011).
54. Ito, K., *et al.* Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **357**, 212-217 (2007).
55. Yatomi, Y., *et al.* Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells. *Blood* **96**, 3431-3438 (2000).
56. Rauch, B.H. Sphingosine 1-phosphate as a link between blood coagulation and inflammation. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **34**, 185-196 (2014).
57. Axler, O., Ahnstrom, J. & Dahlback, B. An ELISA for apolipoprotein M reveals a strong correlation to total cholesterol in human plasma. *Journal of lipid research* **48**, 1772-1780 (2007).
58. Caraceni, P., *et al.* Clinical indications for the albumin use: still a controversial issue. *European journal of internal medicine* **24**, 721-728 (2013).
59. Li, J., *et al.* Overexpression of SphK1 enhances cell proliferation and invasion in triple-negative breast cancer via the PI3K/AKT signaling pathway. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **37**, 10587-10593 (2016).
60. Lee, S.Y., *et al.* Activation of sphingosine kinase 2 by endoplasmic reticulum stress ameliorates hepatic steatosis and insulin resistance in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **62**, 135-146 (2015).
61. Ren, K., Tang, Z.L., Jiang, Y., Tan, Y.M. & Yi, G.H. Apolipoprotein M. *Clinica chimica acta: international journal of clinical chemistry* **446**, 21-29 (2015).
62. Mosialou, I., Zannis, V.I. & Kardassis, D. Regulation of human apolipoprotein m gene expression by orphan and ligand-dependent nuclear receptors. *The Journal of biological chemistry* **285**, 30719-30730 (2010).
63. Nielsen, L.B., Christoffersen, C., Ahnstrom, J. & Dahlback, B. ApoM: gene regulation and effects on HDL metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **20**, 66-71 (2009).
64. Richter, S., *et al.* Regulation of apolipoprotein M gene expression by MODY3 gene hepatocyte nuclear factor-1alpha: haploinsufficiency is associated with reduced

- serum apolipoprotein M levels. *Diabetes* **52**, 2989-2995 (2003).
65. Zhang, X., Jiang, B., Luo, G., Nilsson-Ehle, P. & Xu, N. Hyperglycemia down-regulates apolipoprotein M expression in vivo and in vitro. *Biochimica et biophysica acta* **1771**, 879-882 (2007).
 66. Galvani, S., *et al.* HDL-bound sphingosine 1-phosphate acts as a biased agonist for the endothelial cell receptor S1P1 to limit vascular inflammation. *Science signaling* **8**, ra79 (2015).
 67. Tobia, C., *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptor-1 controls venous endothelial barrier integrity in zebrafish. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**, e104-116 (2012).
 68. Skoura, A., *et al.* Essential role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in pathological angiogenesis of the mouse retina. *The Journal of clinical investigation* **117**, 2506-2516 (2007).
 69. Liu, W., Liu, B., Liu, S., Zhang, J. & Lin, S. Sphingosine-1-phosphate receptor 2 mediates endothelial cells dysfunction by PI3K-Akt pathway under high glucose condition. *European journal of pharmacology* **776**, 19-25 (2016).
 70. Hanson, M.A., *et al.* Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)* **335**, 851-855 (2012).
 71. Davis, M.D., Clemens, J.J., Macdonald, T.L. & Lynch, K.R. Sphingosine 1-phosphate analogs as receptor antagonists. *The Journal of biological chemistry* **280**, 9833-9841 (2005).
 72. Fukata, Y., Oshiro, N. & Kaibuchi, K. Activation of moesin and adducin by Rho-kinase downstream of Rho. *Biophysical chemistry* **82**, 139-147 (1999).
 73. Hua, X., Liu, X., Ansari, D.O. & Lodish, H.F. Synergistic cooperation of TFE3 and smad proteins in TGF-beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Genes & development* **12**, 3084-3095 (1998).
 74. Chen, B., *et al.* Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **341**, 549-556 (2006).
 75. Vayalil, P.K., *et al.* Glutathione suppresses TGF-beta-induced PAI-1 expression by inhibiting p38 and JNK MAPK and the binding of AP-1, SP-1, and Smad to the PAI-1 promoter. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **293**, L1281-1292 (2007).
 76. Mori, H., Izawa, T. & Tanaka, E. Smad3 deficiency leads to mandibular condyle degradation via the sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P3 signaling axis. *The American journal of pathology* **185**, 2742-2756 (2015).
 77. Barkett, M. & Gilmore, T.D. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription

- factors. *Oncogene* **18**, 6910-6924 (1999).
78. Perona, R., *et al.* Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes & development* **11**, 463-475 (1997).
 79. Ling, J. & Kumar, R. Crosstalk between NFkB and glucocorticoid signaling: a potential target of breast cancer therapy. *Cancer letters* **322**, 119-126 (2012).
 80. Kagoya, Y., *et al.* Positive feedback between NF-kappaB and TNF-alpha promotes leukemia-initiating cell capacity. *The Journal of clinical investigation* **124**, 528-542 (2014).
 81. Li, X., Long, J., He, T., Belshaw, R. & Scott, J. Integrated genomic approaches identify major pathways and upstream regulators in late onset Alzheimer's disease. *Scientific reports* **5**, 12393 (2015).
 82. Chervet, L., *et al.* Missing C-terminal filaggrin expression, NFkappaB activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. *Experimental dermatology* **19**, e343-346 (2010).
 83. Sharma, A., *et al.* A disease module in the interactome explains disease heterogeneity, drug response and captures novel pathways and genes in asthma. *Human molecular genetics* **24**, 3005-3020 (2015).
 84. Estrada, R., *et al.* Up-regulating sphingosine 1-phosphate receptor-2 signaling impairs chemotactic, wound-healing, and morphogenetic responses in senescent endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **283**, 30363-30375 (2008).