

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

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

### 氏名

高橋 千春

### 背景

血栓症は致死率が高く、危険因子や発症機序の解明が重要な病態である。血栓症の発症に関連する因子の中で、我々は、プラスミノゲンアクチベーターの抑制因子である、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1) に注目した。現在までに PAI-1 が血栓促進因子であることは多くの研究で示され、実際に、心血管疾患患者の血漿 PAI-1 濃度が健常者と比較して上昇し、さらに PAI-1 が主に脂肪組織で産生され、内臓脂肪の蓄積に伴い脂肪組織での PAI-1 遺伝子発現が増加するとも報告されており、PAI-1 は肥満と血栓症を関係づける重要な悪玉アディポサイトカインの一つであると考えられる。

以上のように血栓症の危険因子である PAI-1 の制御因子の一つに、スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) というリゾリン脂質がある。リゾリン脂質は、細胞膜を構成するリン脂質から派生した脂質で、第二世代の生理活性脂質として注目されている。その中で、S1P はスフィンゴ脂質性のリゾリン脂質に分類される。細胞内で産生された S1P は、運搬体により循環血液などの体液中へ放出され、細胞膜上の G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) に結合して強力な生理活性を発揮する。現在までに S1P の特異的 GPCR として 5 種類の S1P 受容体 (S1PR) が同定されており、S1PR1、3 の活性化は細胞増殖能や遊走能を亢進させるが、S1PR2 の活性化は反対に細胞増殖能、遊走能を抑制すると報告されており、活性化される S1PR による S1P の作用の相違が示されている。

動脈硬化症・血栓症においても、S1P は、S1PR1、3 を介した血管拡張作用や血管内皮細胞のバリア機能維持などの抗動脈硬化作用の報告が多いが、S1PR2 を介した PAI-1 の産生促進作用などの催動脈硬化作用も報告されている。

S1PR の種類による S1P の作用の相違に加えて、近年の研究結果から、S1P の運搬体の種類により、S1P の作用が異なる可能性が示され始めている。循環血液中の S1P は、高比重リポ蛋白 (HDL) 中の ApoM により主に運搬され (おおよそ 65%)、アルブミンによる運搬は 30% 程度と報告されている。これまでに、冠動脈疾患を有する患者では HDL 結合 S1P 濃度がアルブミン結合 S1P 濃度よりも少ない、という報告や、血漿中の PAI-1 濃度と HDL コレステロールの濃度が逆相関する、という報告などがされており、動脈硬化症・血栓症においても、S1P の運搬体による作用の相違の重要性が考えられた。我々の先行研究では、急性

冠症候群（ACS）の血漿 PAI-1 濃度が、安定型狭心症群（SAP）、正常冠動脈群（NCA）と比較して有意に上昇し、さらにこの PAI-1 濃度が S1P 濃度と正に相関したが、アポ M 濃度と相関しなかった結果を得ており、血栓促進因子である PAI-1 の制御についても、運搬体による S1P の作用の相違が示唆された。

現在までに、主な PAI-1 の産生細胞である脂肪細胞を用いて、S1P の PAI-1 産生誘導を検討している報告は 3 報あるが、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検討するとともに、個体レベルでも検証を行った。

## 方法と結果

### 1 活性化血小板より放出される S1P のリポ蛋白分画への分布

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、健常人採血により得た多血小板血漿（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すると、刺激しない群と比較してリポ蛋白欠損血漿（LDP）分画中の S1P 含有量は有意に上昇したが、HDL 分画中の S1P 含有量は変わらなかった。よって活性化血小板から血漿中へ放出される S1P は、HDL 分画中の ApoM 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。

### 2 脂肪細胞における、運搬体による S1P の PAI-1 発現誘導作用の違い

マウス 3T3L1 細胞を分化させた脂肪細胞に、様々な vehicle を用いて S1P を投与して培養後に mRNA を回収し、リアルタイム PCR 法により PAI-1 発現量を比較した。

まず、ヒト PRP から分離、濃度調整を行った HDL<sub>2</sub>、HDL<sub>3</sub>、総 HDL、LDP を vehicle とした検討を行った。何も加えなかった群と比較して、いずれの HDL 分画を vehicle とした S1P も PAI-1 発現量を増加させなかったが、LDP を vehicle とした S1P は、PAI-1 発現量を有意に増加させた。よって HDL ではなく LDP に存在するアルブミン結合 S1P が、PAI-1 発現を誘導すると考えられた。

そこで、アデノウイルスを用いて作成した ApoM に富む vehicle（ApoM）、コントロール vehicle（Null）の 2 種類を vehicle とした S1P を投与すると、Null を vehicle とした S1P は、ApoM を vehicle とした S1P よりも有意に PAI-1 発現量を増加させた。さらに 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 vehicle とした S1P を投与すると、si-ApoM を vehicle とした S1P は、si-Ctl を vehicle とするよりも PAI-1 発現量の増加が有意に大きく、si-Alb を vehicle とした S1P は、si-Ctl を vehicle とするよりも PAI-1 発現量の増加が有意に小さかった。以上より、ApoM 結合 S1P は、アルブミン結合 S1P よりも PAI-1 の発現誘導作用が弱いことが示唆された。

次に、in vitro の実験結果が in vivo に外挿できるか検討するために、9 週齢の雄 C57BL6J マウスを用いて、ApoM を過剰発現させたマウス（ApoM マウス）と、そのコントロールマ

ウス (Null マウス) を作成し、血漿 S1P 濃度、PAI-1 濃度、脂肪組織中の PAI-1 mRNA 発現量を比較した。ApoM マウスでは、Null マウスと比較して血漿 ApoM 濃度、S1P 濃度のいずれも有意に増加したが、血漿 PAI-1 濃度と脂肪組織 PAI-1 発現量は、2 群間で有意差がなかった。よって、*in vivo* においても ApoM 結合 S1P は、脂肪組織中の PAI-1 の発現誘導作用がない可能性が示唆された。

さらに、構築したリコンビナント ApoM (rApoM) とアルブミンを vehicle とした S1P の PAI-1 発現誘導作用を比較すると、rApoM を vehicle とした S1P は PAI-1 mRNA 発現量を増加させず、ApoM 結合 S1P には PAI-1 誘導作用がないと考えられた。

### 3 S1P による PAI-1 発現誘導に関与する S1PR、シグナル経路

最後に、PAI-1 発現に関与する S1PR を検討し、S1P の運搬体による S1PR の活性化の違いを検討した。脂肪細胞には S1PR1-3 の発現が報告されているため、S1PR2 の拮抗剤 (JTE013)、S1PR1、3 の拮抗剤 (VPC23019) を用いて検討した。その結果、JTE013 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が、VPC23019 は PAI-1 発現増加作用をむしろ亢進させ、VPC23019 単独投与にても PAI-1 発現量は増加する傾向にあった。よって、S1P は S1PR2 の活性化により PAI-1 を発現誘導すると考えられた。また、VPC23019 単独投与にても PAI-1 発現が増加傾向であった結果から、VPC23019 投与による 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いと考えられた。そこで、S1PR1、3 の下流にある PI3K-Akt 経路を阻害する wortmannin を用いて検討したところ、wortmannin の投与により、S1P による PAI-1 発現誘導作用は増強されなかった。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。

次に S1P 運搬体による、S1PR2 活性化の違いを検討するために、S1PR2 の下流に存在するモエシンのリン酸化を比較した。その結果、Null のみを投与した群と比較して、Null を vehicle とした S1P を投与した群ではモエシンのリン酸化は増加したが、ApoM を vehicle とした S1P を投与した群ではモエシンのリン酸化は増加しなかった。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、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。

また、S1PR2 の下流に存在すると報告されている Rho/ROCK の関与を調べた結果、Rho/ROCK 阻害剤 (Y27632) の存在下ではアルブミン結合 S1P の PAI-1 発現誘導は抑制された。よって S1PR2→Rho/ROCK の活性化が PAI-1 誘導に関連していると考えられた。

現在までに、S1PR2→Rho/ROCK のさらに下流の経路についての関与は報告がない。そこで PAI-1 のプロモーター領域に存在する様々な転写因子の阻害剤を用いて、Rho/ROCK 経路の下流のシグナル経路を検討した。HIF1 $\alpha$ 阻害剤 (YC1)、Smad3 阻害剤 (SIS3) は、S1P による PAI-1 発現誘導を阻害しなかったが、NF $\kappa$ B 阻害剤 (BAY11-7082) は、PAI-1 発現誘導を阻害した。以上より、アルブミン結合 S1P は S1PR2-Rho/ROCK、NF $\kappa$ B の活性化を介して PAI-1 を誘導する可能性が示唆された。

さらに、S1P の運搬体の種類による、NF $\kappa$ B の活性化の違いを検討するために、ウエスタ

ンブロット法を用いて核蛋白の p65 発現量を調べた。Null 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核内 p65 発現量は有意に大きかったが、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。以上より、アルブミン結合 S1P には NFκB の活性化作用があるが、ApoM 結合 S1P にはその作用がない可能性が示唆された。

### 考察

本研究では、脂肪細胞において、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主に検討した。その結果、血小板の活性化が惹起される病態においては、血小板から放出された高濃度の S1P が、ApoM/HDL よりも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。また、このような血栓形成部位において局所的に増加したアルブミン結合 S1P は、ApoM/HDL 結合 S1P と比較して脂肪細胞における PAI-1 発現誘導作用が強く、その機序として S1PR2→Rho/ROCK→NFκB が活性化されることが判明した。本研究の限界として、血小板より放出された S1P の運搬体選択性の機序が解明できていない点、血小板由来の S1P と赤血球由来の S1P の運搬体への結合の違いが生じる機序について検討できていない点、運搬体に結合していない遊離 S1P の存在について検討していない点、また HDL を ApoM の有無により分けて検討していない点、さらに ApoM/HDL 結合 S1P の S1PR2 アゴニスト作用が弱い機序が解明できていない点が挙げられ、今後さらなる検討が必要である。

### 結論

脂肪細胞において S1P が PAI-1 産生に与える影響について検討を行った。S1P は、アルブミンと結合すると PAI-1 の発現誘導作用を発揮するが、一方で ApoM と結合するとその作用は減弱すると考えられ、PAI-1 の産生においても S1P が運搬体による作用の違いを有すると判明した。さらに ApoM は、PAI-1 の発現誘導といった、S1P の催動脈硬化作用を減弱させる作用を有すると考えられ、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な臨床応用が期待される。