

審査の結果の要旨

氏名 高橋千春

本研究は血栓症の危険因子として重要な役割を有するプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1) の発現制御において、スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) が及ぼす影響、特に S1P の運搬体による作用の相違について検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 健常人採血により得た多血小板血漿 (PRP) にコラーゲンを投与して血小板を刺激すると、刺激した群では、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. マウス 3T3L1 細胞を分化させた脂肪細胞に、ヒト PRP から分離、濃度調整を行った HDL₂、HDL₃、総 HDL、LDP を vehicle として S1P を投与し、PAI-1 発現量を比較した結果、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。
3. 脂肪細胞に、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 として 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 として 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。さらに、構築したリコンビナント ApoM (rApoM) とアルブミンを vehicle として脂肪細胞に S1P を投与すると、rApoM を vehicle とした S1P は PAI-1 mRNA 発現量を増加させなかった。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。
4. 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 発現量を比較した結果、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。

5. S1PR2 の拮抗剤 (JTE013)、S1PR1、3 の拮抗剤 (VPC23019)、S1PR1、3 の下流にある PI3K の阻害剤 (wortmannin)、S1PR2 の下流にある Rho の阻害剤 (Y27632) のそれぞれの阻害剤存在下において、S1P を脂肪細胞に投与した結果、JTE013、Y27632 の存在下では S1P の PAI-1 発現誘導作用は抑制され、VPC23019 の存在下では、この作用は増強された。しかし、wortmannin の存在下では、同様の結果が得られなかった。よって、S1P は S1PR2 を介して PAI-1 発現を誘導するが、S1PR1、3 経路はこの系には関与していないと考えられた。
6. ApoM、Null をそれぞれ vehicle として S1P を脂肪細胞に投与し、S1PR2 の下流に存在するモエシンのリン酸化を比較した結果、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は増加したが、ApoM を vehicle として 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。よって、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。
7. HIF1 α 阻害剤 (YC1)、Smad3 阻害剤 (SIS3)、NF κ B 阻害剤 (BAY11-7082) のそれぞれの阻害剤存在下において、S1P を脂肪細胞に投与した結果、YC1、SIS3 の存在下では S1P の PAI-1 発現誘導作用は阻害されなかったが、BAY11-7082 の存在下では、S1P は PAI-1 を発現誘導しなかった。以上より、アルブミン結合 S1P は S1PR2、Rho/ROCK、NF κ 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。
8. ApoM、Null をそれぞれ vehicle として S1P を脂肪細胞に投与し、核蛋白の p65 発現量を調べた結果、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 NF κ B 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。

以上、本論文は成熟脂肪細胞において、アルブミンを運搬体とした S1P は、S1PR2 \rightarrow Rho/ROCK \rightarrow NF κ B の活性化により PAI-1 を発現誘導するが、ApoM/HDL を運搬体とした S1P は、その作用がわずかである、あるいはない可能性を明らかにした。本研究は、これまでに検討されていない、PAI-1 発現誘導における、S1P の運搬体による相違と、関連するシグナル経路の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。