

氏 名	かな ざわ たか ゆき 金 沢 崇 之
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 517 号
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	リゾスフィンゴ脂質の生理的機能に関する研究

論文調査委員 (主 査)
教授 小 堤 保 則 教授 川 寄 敏 祐 教授 市 川 厚

論 文 内 容 の 要 旨

細胞の膜脂質成分として主にグリセロリン脂質、コレステロール、そしてスフィンゴ脂質が知られている。近年までスフィンゴ脂質の生理的役割はほとんど知られていない中、先天性スフィンゴ脂質分解酵素欠損症の多くが神経症状を呈することから、神経系の機能を司るものとして考えられてきた。近年になり、スフィンゴ脂質に関する研究結果が蓄積され、スフィンゴ脂質は神経系だけでなく、細胞の活動そのものにとって必須成分であり、セカンドメッセンジャーとして、細胞の生死の調節や分化、運動等と幅広い生理的機能を有することが次第に明らかになってきた。しかし、まだ未知な部分も多く残されており、特に脂肪酸を持たないリゾスフィンゴ脂質の機能はほとんど知られていないのが現状である。著者はリゾスフィンゴ脂質の細胞質分裂への関与及びマクロファージ分化への関与を明らかにしたので、本論文で詳述する。

第一章 スフィンゴ脂質代謝異常症の一種であるグロポイド細胞ロイコジストロフィー症は β -ガラクトシルセラミダーゼの欠損のため、基質であるサイコシンが蓄積することが知られている。本症の特徴として、脳白質内にグロポイド細胞と呼ばれる多核細胞が観察されることがあげられるが、この細胞の由来や出現原因は不明であった。著者はグロポイド細胞の出現がサイコシンの蓄積によるものであると仮定し、培養細胞系を用いたモデル構築を行った。サイコシンを処理したヒト単球系細胞株 U937 は時間依存的に巨大化すると共に多核細胞となることが顕微鏡下で観察された。さらにこの細胞の DNA 量を測定するためフローサイトメトリーで解析したところ、多倍数体となっていることがわかった。これら二つの結果から、サイコシンは細胞質分裂を阻害していることが考えられた。そこで、より詳細な機構を検討するため、タイムラプス顕微鏡を用いて、細胞分裂時の様子をサイコシン処理の有無で観察した。その結果、サイコシン処理した細胞は分裂溝の形成は見られるが、その後分裂することなく多核細胞へと進んでいくことが明らかとなった。ついで、細胞質分裂に必要であるアクチンの局在を観察したところ、アクチンは巨大な凝集塊を形成し、その凝集塊は細胞膜に内接して局在していた。また、このアクチン凝集塊は細胞分裂開始以前より認められた。アクチン凝集塊は電子顕微鏡による観察結果によると、無数の空胞の凝集体であることが分かった。このことから、サイコシンはアクチン制御及び細胞内小胞輸送を阻害することで、細胞質分裂を阻害していることが示唆された。

第二章 サイコシンはサル腎臓細胞由来 COS-7 細胞に対してもアクチン線維を伴った空胞を誘導し、多核細胞を産生する。そこで、サイコシンが影響を与える細胞内小胞輸送系を特定するため、COS-7 細胞をいくつかのオルガネラマーカーを用いて染色し、観察した。その結果、サイコシンは初期エンドソーム、リソソーム、脂肪滴そして小麦胚凝集素 (WGA) 陽性顆粒の局在を核周辺から細胞質全体へと拡散させていたのに対し、ゴルジ体と後期エンドソームの局在には影響を与えていなかった。興味深いことに、サイコシン未処理細胞では WGA 陽性顆粒は細胞質分裂時に分裂溝に集積するのに対し、サイコシン処理ではその集積が見られなかった。これは細胞質分裂には細胞内からの WGA 陽性顆粒の分裂溝への集積が必要であることを示唆するとともに、サイコシンはその輸送を阻害することで細胞質分裂を抑制していることが考えられた。さらに細胞内小胞輸送のルールとして機能する微小管の細胞分裂時の挙動を蛍光蛋白質融合チューブリンを発現させて、タ

タイムラプス顕微鏡で観察した。サイコシン処理細胞でも、細胞質分裂時に中央体が形成されたため、サイコシンはチューブリンの制御ではなく、チューブリンが司る小胞輸送に作用していると考えられた。

第三章 近年、ヒト血漿中に含まれる高密度リポタンパク質 (HDL) 中にスフィンゴシルフォスホリルコリン (SPC) やリゾスルファチド (LSF) といったリゾスフィンゴ脂質が含まれていることが報告された。HDL は動脈硬化症における粥腫発生に対して抑制的に働いていることは知られているが、その詳細な機構は知られていない。そこで、HDL の抗粥腫作用に、SPC 又は LSF が関与していると仮定し、培養細胞系を用いて検討した。粥腫形成には単球のマクロファージへの分化促進及びその活性化が必要であるため、まず、U937 細胞にそれぞれのリゾスフィンゴ脂質を処理した後、TPA で 3 日間処理し、マクロファージへの分化率を測定した。その結果、分化指標として用いた CD11b の発現、及び、シャーレへの接着性のいずれの結果からも、SPC では分化を促進し、LSF では抑制していることが明らかになった。HDL 中では LSF 量が SPC 量を上回るため、生理的にも HDL のマクロファージ分化抑制能に反映していると考えられる。

マクロファージの分化制御には古典的 MAP キナーゼ経路が重要な役割を担っていることが知られている。そこで、古典的 MAP キナーゼである ERK1/2 のリン酸化に対する SPC 及び LSF の影響を検討した。予想された通り、SPC は ERK1/2 のリン酸化を促進していたのに対し、LSF では抑制していた。ここで、SPC による ERK1/2 のリン酸化促進は既に報告されていたので、スフィンゴ脂質によるリン酸化抑制に着目し、LSF と類似の構造を持ついくつかのスフィンゴ脂質の分子種特異性を検討した。その結果、ERK1/2 のリン酸化抑制はリゾスフィンゴ脂質で極性頭部が単糖であるもの (Lyso-monglycosphingolipid: LMGS) のみに認められ、二糖であるリゾラクトシルセラミドや脂肪酸を持つスフィンゴ脂質では全く認められなかった。さらに、LMGS による ERK1/2 リン酸化抑制機構を調べるため、ERK1/2 の上流に位置する分子の活性化状態を解析した。その結果、LMGS は PKC を抑制することなく、その下流にある Raf-1, MEK1/2 のリン酸化を抑制していることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

細胞の膜脂質成分として主にグリセリン脂質、コレステロール、そしてスフィンゴ脂質が知られている。近年までスフィンゴ脂質の生理的役割はほとんど知られていない中、先天性スフィンゴ脂質分解酵素欠損症の多くが神経症状を呈することから、神経系の機能を司るものとして考えられてきた。近年になり、スフィンゴ脂質に関する研究結果が蓄積され、スフィンゴ脂質は神経系だけでなく、細胞の活動そのものにとって必須成分であり、セカンドメッセンジャーとして、細胞の生死の調節や分化、運動等と幅広い生理的機能を有することが次第に明らかになってきた。しかし、まだ未知な部分も多く残されており、特に脂肪酸を持たないリゾスフィンゴ脂質の機能はほとんど知られていないのが現状である。このような背景のもとで本論文はリゾスフィンゴ脂質の細胞質分裂への関与及びマクロファージ分化への関与を明らかにしたものである。

著者はまず、スフィンゴ脂質代謝異常症の一種であるグロボイド細胞ロイコジストロフィー症における脳白質内に出現する巨大多核細胞であるグロボイド細胞が本疾患で蓄積するサイコシンによるものであることを示した。すなわちサイコシンを処理したヒト単球系細胞株 U937 は時間依存的に巨大化すると共に多核細胞となることが顕微鏡下で観察された。さらにこの細胞の DNA 量を測定するためフローサイトメトリーで解析したところ、多倍数体となっていることがわかった。これら二つの結果から、サイコシンは細胞質分裂を阻害していることが考えられた。そこで、より詳細な機構を検討するため、タイムラプス顕微鏡を用いて、細胞分裂時の様子をサイコシン処理の有無で観察した。その結果、サイコシン処理した細胞は分裂溝の形成は見られるが、その後分裂することなく多核細胞へと進んでいくことが明らかとなった。ついで、細胞質分裂に必要なアクチンの局在を観察したところ、アクチンは巨大な凝集塊を形成し、その凝集塊は細胞膜に内接していた。

次にサイコシンは初期エンドソーム、リソソーム、脂肪滴そして小麦胚芽凝集素 (WGA) 陽性顆粒の局在を核周辺から細胞質全体へと拡散させることを明らかにした。また、サイコシンは WGA 陽性顆粒の分裂溝への集積を阻害することから、これがサイコシンの細胞質分裂阻害機構の一因と考えられる。

次に著者は、HDL の抗粥腫形成作用に、リゾスフィンゴ脂質の一種であるスフィンゴシルフォスホリルコリン (SPC) やリゾスルファチド (LSF) が関与していることを培養細胞系を用いて検討した。その結果、分化指標として用いた CD11b の発現、及び、シャーレへの接着性のいずれの結果からも、SPC では分化を促進し、LSF では抑制しているこ

とが明らかになった。HDL 中では LSF 量が SPC 量を上回るため、生理的にも HDL のマクロファージ分化抑制能に反映していると考えられる。

以上、本研究は、リゾスフィンゴ脂質の機能を種々の方法を用いて明らかにしたもので、グロボイド細胞ロイコシトローフィー症や動脈硬化症の治療のための基礎的な指針を与えるものである。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成15年2月24日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。