

氏名	もり た しん や 森 田 真 也
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 560 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 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	薬学研究科創薬科学専攻
学位論文題目	Roles of Sphingomyelin and Ceramide in Membrane Structure, Apolipoprotein Binding, and Cell Uptake of Lipid Particles (脂質粒子の膜構造, アポリポタンパク結合, および細胞取り込みにおける スフィンゴミエリンとセラミドの役割)
論文調査委員	(主 査) 教授 半田哲郎 教授 松崎勝巳 教授 加藤博章

論 文 内 容 の 要 旨

近年、血漿スフィンゴミエリン (SM) 濃度の上昇は、動脈硬化の進行と関連し、冠動脈疾患の危険因子であることが提唱されている。リポタンパク粒子表面は主にホスファチジルコリン (PC) や SM などのリン脂質と、コレステロールおよびアポリポタンパクで構成されている。肝臓で生合成された SM は、VLDL 中に組み込まれて血中へ分泌される。PC とは異なり、SM は血中のリポタンパクリパーゼ (LPL) や肝リパーゼなどで分解されないため、リポタンパク中で濃縮され、LDL 中の SM の割合は高くなる。スフィンゴミエリナーゼ (SMase) は、リポタンパク中の SM を分解し、セラミドを生成させる。動脈内膜において、SMase により変性したリポタンパクは、マクロファージの泡沫細胞化を導き、動脈硬化発生に関与することが報告されている。しかし、リポタンパクと細胞表面受容体との相互作用における SM やセラミドの分子レベルでの働きは知られていない。本研究では、リポタンパクのモデルとして脂質エマルションを用い、粒子構造、アポリポタンパク結合、細胞取り込みにおける SM とセラミドの役割について調べた。

第一章

リポタンパク粒子中の SM の役割を明らかにするため、SM を含むエマルション粒子を調製し、肝細胞モデルの HepG2 細胞への取り込みについて評価を行った。アポ E は細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) や LDL 受容体関連タンパク (LRP) のリガンドである。SM によりアポ E のエマルション粒子への結合が減少し、アポ E によるエマルションの細胞への取り込みが低下した。アポ C-II やアポ C-III はアポ E によるエマルションの細胞取り込みを阻害するが、この阻害作用は SM 含有エマルションでより大きく現れた。また、LPL も HSPG や LRP を介したエマルションの細胞への取り込みを促進させたが、その作用は SM の存在により減少した。SM は、スフィンゴシン骨格の水素結合と飽和アシル鎖により粒子表面膜のパッキングを強め、水和度を低下させることにより、アポ E や LPL の脂質粒子への結合を抑制し、細胞取り込みを減少させると考えられる。以上のことから、SM は、アポリポタンパクや LPL の結合性を変化させることにより、リポタンパクの肝臓取り込みを低下させ、血中滞留性を増加させている。

第二章

動脈内膜において、SMase はリポタンパク中の SM を加水分解し、リポタンパクの凝集とマクロファージの泡沫細胞化を促進することが知られているが、詳細なメカニズムは分かっていない。そこで、SMase や、SM およびセラミドを含むエマルションを用い、J774マクロファージによる取り込みを評価した。SMase は、SM 含有エマルションのマクロファージへの取り込みを大きく増加させたが、その取り込みは粒子の凝集とともに低下した。また、セラミドを含むエマルションでマクロファージの取り込みが増加したことから、セラミドの存在により取り込みが促進されることが明らかになった。ヘパリンやラクトフェリンがこれらのエマルションの取り込みを阻害したことから、セラミドによるエマルションの取り込み促進には、HSPG と LRP が関係している。また、アポ E はセラミド含有エマルションの取り込みをさらに増加させた。これらのことから、SMase によるセラミドの産生はリポタンパクの HSPG や LRP を介したマクロファージの取り込みを促

進し、泡沫細胞形成に関わる。

第三章

SMaseによりできたリポタンパク粒子中のセラミドは、マイクロドメインを形成し、粒子同士の凝集と融合を導くと考えられている。また、動脈硬化病変部において、マクロファージが産生したアポEはリポタンパクに結合している。そこで、アポEとセラミドリッチドメイン間の相互作用について調べた。SM含有エマルジョン粒子のSMaseによる凝集は、アポEにより阻害された。また、セラミド含有エマルジョンはSM含有エマルジョンと比べて、アポEの結合が増加した。次に、2種類の蛍光プローブ、BODIPY-PCとDiI-C₁₈を含むエマルジョンの、共焦点顕微鏡による観察を行った。BODIPY-PCは流動相に、DiI-C₁₈はゲル相に分布しやすい。その結果、セラミド含有エマルジョンでは、DiI-C₁₈は粒子コアから表面にわたる塊状の分布を示し、BODIPY-PCは粒子表面でDiI-C₁₈と分離するように分布した。このことから、エマルジョン粒子中のセラミドは塊状のマイクロドメインを形成していることが明らかになった。また、SMase処理によるセラミドリッチドメイン形成の誘導も確認された。以上のことから、アポEは粒子表面のセラミドリッチドメインに結合しやすく、それにより粒子の凝集や融合を防いでいることが示唆された。

第四章

カイロミクロンは小腸細胞内において、アポBにより形成される原始リポタンパクと、脂質大粒子が融合することにより生成すると提唱されている。そこで、カイロミクロン分泌阻害剤プルロニックL81が脂質エマルジョンとLDLに与える影響について調べた。プルロニックL81により、エマルジョンやLDLの粒子サイズが増加した。LDL上のアポBのエマルジョン粒子への結合、すなわちLDLとエマルジョンの融合が、プルロニックL81により促進された。また、プルロニックL81によりアポBの二次構造が変化した。しかし、より親水的なプルロニックL64では、これらの変化は生じなかった。以上より、プルロニックL81は、原始リポタンパクと脂質大粒子の過剰な融合と、アポBのコンホメーション変化を導くことにより、カイロミクロンの分泌を阻害していると推察できる。

論文審査の結果の要旨

近年、血漿スフィンゴリエリン(SM)濃度の上昇は動脈硬化の進行と関連し、冠動脈疾患の危険因子であることが提唱されている。リポタンパク粒子表面は主にホスファチジルコリン(PC)やSMなどのリン脂質と、コレステロールおよびアポリポタンパクで構成されている。肝臓で生合成されたVLDLが血中に分泌されると、SMは血中のリポタンパクリパーゼ(LPL)などで分解されないため粒子中で濃縮され、VLDLの代謝により生成したLDL中のSMの割合は高くなる。スフィンゴリエリナーゼ(SMase)は、リポタンパク中のSMを分解し、セラミドを生成させる。動脈内膜において、SMaseにより変性したLDLは、マクロファージの泡沫細胞化を導き、動脈硬化発生に関わることが報告されている。しかし、リポタンパクと細胞表面受容体との相互作用におけるSMやセラミドの分子レベルでの働きは知られていない。本論文は、リポタンパクのモデルとして脂質エマルジョンを用い、粒子構造、アポリポタンパク結合、細胞取り込みにおけるSMとセラミドの役割について研究したものである。

まず、リポタンパク中のSMの役割を明らかにするため、SMを含むエマルジョン粒子を調製し、肝細胞モデルのHepG2細胞への取り込みを評価した。アポEは細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)やLDL受容体関連タンパク(LRP)のリガンドである。SMによりアポEのエマルジョン粒子への結合が減少し、エマルジョンの細胞への取り込みが低下した。また、LPLもHSPGやLRPを介したエマルジョンの細胞への取り込みを促進させたが、その作用もSMの存在により減少した。SMはスフィンゴシン骨格の水素結合と飽和アシル鎖により粒子表面のリン脂質単分子膜のパッキングを強め、アポEやLPLの脂質粒子表面への結合を抑制し、細胞取り込みを減少させると考えられる。このように、SMはリポタンパクの肝臓取り込みを低下させ血中滞留を高めることにより、その酸化を亢進することが示唆された。

次に、SMaseによる変性リポタンパクの生成について研究した。動脈内膜において、SMaseはリポタンパクの凝集とマクロファージの泡沫細胞化を促進することが知られているが、詳細なメカニズムは分かっていない。そこで、SMおよびセラミドを含むエマルジョンとSMaseを用い、J774マクロファージによる取り込みを評価した。SMaseは、SM含有エマルジョンのマクロファージへの取り込みを大きく増加させたが、その取り込みは粒子の凝集とともに低下した。また、セラミ

ドを含むエマルションでもマクロファージの取り込みが増加し、セラミドの存在が細胞取り込み促進に重要であることが明らかになった。ヘパリンやラクトフェリンがこれらのエマルションの取り込みを阻害し、セラミドによるエマルションの取り込み促進には、HSPGとLRPが関与していることが示された。また、アポEはセラミド含有エマルションの取り込みをさらに増加させた。これらのことから、SMaseによるセラミドの産生はリポタンパクの変性を導き、HSPGやLRPを介したマクロファージの取り込みを促進し、泡沫細胞形成に関わることが示唆された。

さて、SMaseにより生成した変性リポタンパク粒子のセラミドは、粒子同士の凝集と融合を導くと考えられている。そこで2種類の蛍光プローブ、BODIPY-PCとDiI-C₁₈を含むエマルションの共焦点顕微鏡による観察を行った。BODIPY-PCは流動相に、DiI-C₁₈はゲル相に分布しやすい。その結果、セラミド含有エマルションでは、DiI-C₁₈は粒子コアから表面にわたる塊状の分布を示し、BODIPY-PCは粒子表面でDiI-C₁₈と分離するように分布した。このことから、エマルション粒子中のセラミドは塊状のマイクロドメインを形成し粒子同士の凝集と融合を導くことが明らかになった。また、SM含有エマルションのSMase処理でもセラミドリッチドメインの形成が確認された。動脈硬化病変部において、マクロファージが産生したアポEはリポタンパクに結合している。そこで、アポEとセラミドリッチドメイン間の相互作用について調べた。SM含有エマルション粒子のSMaseによる凝集は、アポEにより阻害された。また、セラミド含有エマルションは、SM含有エマルションと比べてアポEの結合が増加した。以上のことから、アポEは粒子表面のセラミドリッチドメインに結合しやすく、それにより粒子の凝集や融合を防いでいることが示された。

最後に、小腸から分泌されるリポタンパク、カイロミクロンは、アポBを含有する原始リポタンパク小粒子と脂質エマルション様大粒子が小腸細胞内で融合して生成すると考えられている。そこで、カイロミクロン分泌阻害剤プルロニックL81が脂質エマルション（大粒子）とLDL（原始リポタンパク）に与える影響について調べた。プルロニックL81により、エマルションやLDLの粒子サイズが増加した。LDL上のアポBのエマルション粒子への結合、すなわちLDLとエマルションの融合が、プルロニックL81により促進された。また、プルロニックL81によりアポBの二次構造が変化した。しかし、より親水的なプルロニックL64では、これらの変化は生じなかった。以上より、プルロニックL81は、原始リポタンパクと脂質大粒子の過剰な融合と、アポBのコンホメーション変化を導くことにより、カイロミクロンの分泌を阻害していると結論した。

以上、リポタンパク粒子表面のSM、またSMaseにより生成するセラミドが粒子構造に影響し、そのアポEの結合性と細胞との相互作用を変化させて動脈硬化の進行に関係することを解明した。

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。

さらに平成17年2月28日論文内容とそれに関連した事項につき諮問を行った結果優秀と認定した。