

- maier, B., Stuart-Tilley, A., Alper, S.L., & Seidler, U. (2001) *J. Physiol.*, 534, 837-848.
- 6) Gawenis, L.R., Ledoussal, C., Judd, L.M., Prasad, V., Alper, S. L., Stuart-Tilley, A., Woo, A.L., Grisham, C., Sanford, L.P., Doetschman, T., Miller, M.L., & Shull, G.E. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 30531-30539.
- 7) McDaniel, N. & Lytle, C. (1999) *Am. J. Physiol.*, 276, G1273-G1278.
- 8) Flagella, M., Clarke, L.L., Miller, M.L., Erway, L.C., Giannella, R.A., Andringa, A., Gawenis, L.R., Kramer, J., Duffy, J. J., Doetschman, T., Lorenz, J.N., Yamoah, E.N., Cardell, E.L., & Shull, G.E. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 26946-26955.
- 9) Wang, K.S., Komar, A.R., Ma, T., Filiz, F., McLeroy, J., Hoda, K., Verkman, A.S., & Bastidas, A. (2000) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 279, G448-G453.
- 10) Fujii, T., Takahashi, Y., Ikari, A., Morii, M., Tabuchi, Y., Tsukada, K., Takeguchi, N., & Sakai, H. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 619-629.
- 11) Yao, X. & Forte, J.G. (2003) *Annu. Rev. Physiol.*, 65, 103-131.

酒井 秀紀, 藤井 拓人, 竹口 紀晃
(富山大学大学院医学薬学研究部薬物生理学研究室)

Functional relationship between K^+ - Cl^- cotransporters and P-type ATPases in gastric parietal cells
Hideki Sakai, Takuto Fujii, and Noriaki Takeguchi (Department of Pharmaceutical Physiology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama city, Toyama 930-0194, Japan)

リポタンパク質作用における S1P の役割と そのシグナル伝達機構

1. はじめに

スフィンゴ脂質はセリンとパルミチン酸の縮合反応にはじまり、スフィンゴシン、脂肪酸が付加したセラミドを経て合成される細胞膜の主要な構成成分である。おもな細胞膜のスフィンゴ脂質は、セラミドにさらにコリン残基が結合したスフィンゴミエリンである。スフィンゴミエリンは必要に応じてスフィンゴミエリナーゼによってセラミドに分解される。スフィンゴシンがスフィンゴシンキナーゼによってリン酸化されるとスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) が産生される (図 1)。これらスフィンゴシン、セラミド、S1P などのスフィンゴ脂質代謝産物は単なる細胞膜の構成成分としてのみならず、強力な生理活性を有していること

が明らかにされてきた。中でも S1P は受容体が複数同定されており、細胞増殖、運動、形態、アポトーシスなど生命の基本的な活動に関わっていることが明らかにされている。私達のグループは S1P が血漿中ではリポタンパク質などの高分子成分に結合して運搬されていることを見いだした。リポタンパク質は動脈硬化症など心血管疾患と密接に関連しており、その役割に関しては、これまで主にコレステロール代謝との関連で理解されてきた。しかし、最近、コレステロール代謝と直接関連しないリポタンパク質作用も指摘されている。本稿では、リポタンパク質のもつ心血管調節作用のメディエーターとしての S1P の役割について解説する。

2. S1P の産生とその受容体

S1P はスフィンゴシンキナーゼによって通常、細胞内で産生される。本酵素はタイプ 1 とタイプ 2 の 2 種類が存在する。本酵素は全身の細胞に存在するが血小板、赤血球では S1P 分解酵素活性が少ないために S1P は高濃度で存在している。血漿中の S1P は赤血球由来と考えられているが、凝集塊の形成による血小板からの S1P 放出は心血管疾患との関連では特に重要であろう。血中の S1P 濃度は 200~900nM 程度と考えられている。S1P 受容体は S1P₁₋₅ の 5 種が知られている (図 2A)。S1P 受容体サブタイプの中では S1P₁₋₃ が広く各組織、細胞に発現し、S1P₄ は血液系の細胞、S1P₅ は神経系と発現分布が限局している。S1P₂ はやや特徴的な受容体で、本受容体を発現した細胞では細胞遊走の抑制が観察される。これは G_{12/13}-Rho 系との共役が強いため、血管系では血管平滑筋細胞に発現し、細胞遊走を抑制し、収縮を誘導する。がん細胞でもこの受容体の発現の程度で S1P の動きが制御される。

3. S1P は細胞外ではリポタンパク質に結合している

私達が S1P に関する研究をはじめた 1990 年代、endothelial cell differentiation gene (Edg) 受容体ファミリーはオーファン受容体であったが、私達はその受容体サブタイプのリガンドが S1P であることを、受容体を過剰に発現した細胞を用いた標識 S1P の結合実験によって確認することができた。私達は、この受容体のリガンド特異性、親和性を利用して S1P の定量法 (ラジオレセプターアッセイ法) を開発した¹⁾。S1P は水に溶けにくいことから、生体では高分子に結合していることが想定された。そこで、血漿を密度勾配遠心法によって分離して S1P の分布を調べたところ、S1P はリポタンパク質、特に高密度リポタン

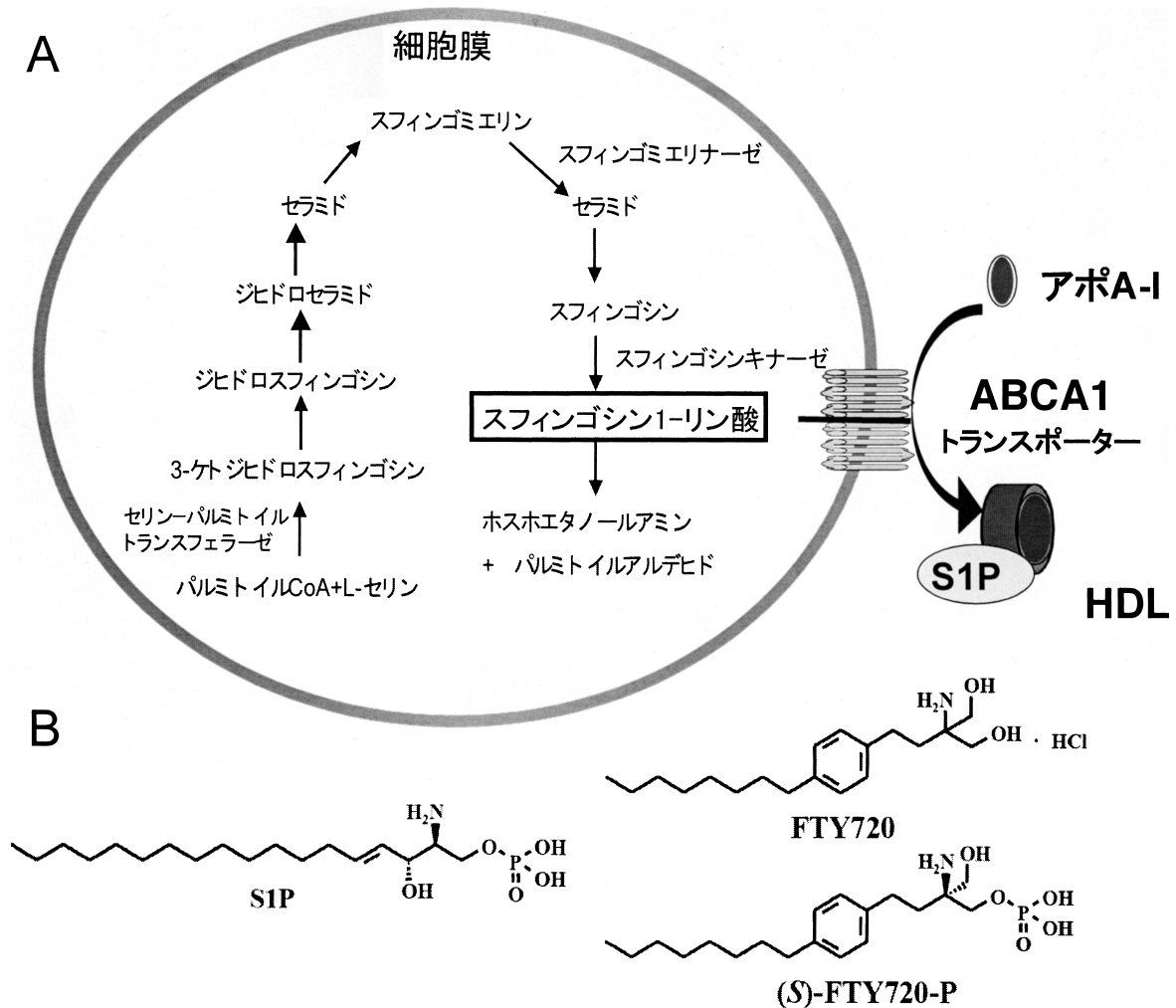


図1 S1Pの産生経路，放出機構(A)ならびにS1Pとその誘導体の構造(B)

パク質 (high-density lipoprotein ; HDL) 画分に高濃度で存在することが判明した¹⁾。血中ではS1Pは赤血球由来と考えられているがS1PがどのようなメカニズムでHDLに濃縮されるのかは不明である。最近，S1Pの細胞外への放出にABCトランスポーターが関与していることが血小板，好塩基球で報告されている。私達は中枢神経系における主要なリポタンパク質産生細胞であるアストロサイトを用い，S1Pの細胞外への放出がABCA1トランスポーターを介したリポタンパク質形成に連動していることを示唆する結果を得ている (図1A)²⁾。

リポタンパク質が心血管機能と密接に関連していることはよく知られている。リポタンパク質の最も重要な機能はコレステロールの運搬であると考えられている。低密度リポタンパク質 (low-density lipoprotein ; LDL) は末梢組織

へコレステロールを運搬する働きをもつが，血管内膜では酸化ストレスにさらされると酸化LDLに変換される。この酸化LDLはマクロファージなどに発現しているスカベンジャー受容体を介して取り込まれる。この取り込みが充進し続けると内膜肥厚の原因となる泡沫細胞になる。一方，HDLは細胞内に取り込んだコレステロールを引き抜き，最終的には肝臓などで余分なコレステロールを胆汁酸として排出する，いわゆるコレステロール逆輸送を担っている。HDLが善玉コレステロールと呼ばれる所以である。一方，最近の研究ではこのようなコレステロール代謝と直接関連しないLDLやHDLの作用も知られるようになってきた。生理活性リゾリン脂質がリポタンパク質に存在しているという発見から，これらの脂質分子がコレステロール代謝に依存しないリポタンパク質作用のメディエーターと

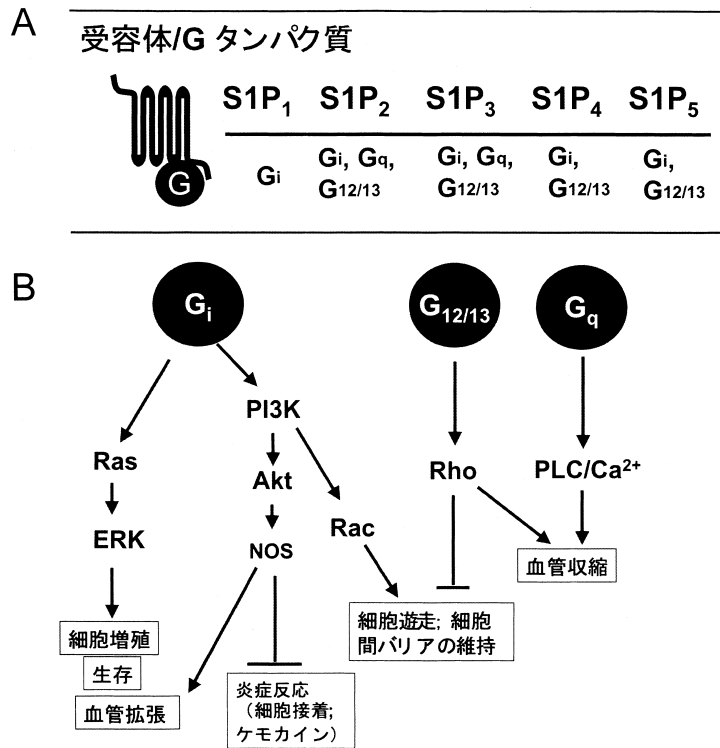


図2 S1P受容体サブタイプ(A)ならびにその細胞内シグナル伝達系と生体機能(B)

して機能している可能性が浮上した^{3,4)}。

4. S1Pはリポタンパク質の作用を仲介している

S1Pは心血管系のみならず生体の様々な細胞や組織で多彩な作用を発揮する(図2B)。我々はヒト臍帯静脈内皮細胞の傷害作用とその保護作用を指標にし、リポタンパク質作用におけるS1Pの役割を検討した。その結果、内皮細胞におけるHDLのMAPキナーゼ活性化を伴う細胞傷害保護作用はHDLに結合しているS1Pによって仲介されていることを明らかにした⁵⁾。内皮細胞にはS1P₁とS1P₃受容体が発現しているが、この細胞生存保護作用は主にS1P₁受容体を介し、血管新生や修復に関わる細胞遊走はS1P₁とS1P₃受容体を介していると推定された⁵⁾。

S1PはVCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)やICAM-1(intercellular adhesion molecule-1)等の接着分子の発現を誘導⁶⁾、単球などの内皮細胞への結合、血管壁内への侵入を促す。内皮細胞に対する単球や好中球の接着は内膜内への浸潤、単球のマクロファージへの分化、コレステロール取り込みを経て、内膜肥厚、次いでプラーク形成を誘導する。このように、内皮細胞における接着分子の

発現、血球細胞接着は動脈硬化発症の初期過程として極めて重要なステップであると考えられている。しかし、S1Pは腫瘍壊死因子(TNF)-αによって強い細胞接着をおこした状態下ではTNF-α作用を逆に抑制する。すなわち、S1Pは細胞接着に対しては促進にも抑制にも作用する⁶⁾。細胞接着の促進は主にS1P₃を介し、抑制は主にS1P₁を介している。HDLは共存するS1Pによって、この抑制作用を発揮するが、興味深いことに、HDL存在下ではS1Pによる接着分子の発現作用は発揮されない。詳細は論文⁷⁾を見たいが、HDLの別の成分であるアポA-Iがスカベンジャー受容体クラスBタイプI(SR-BI)を介してS1Pの接着分子発現応答を抑制するためらしい(図3)。このように、血小板凝集塊を介して放出された高濃度のS1Pは血管収縮、内皮細胞での接着分子の発現など血管系に対して好ましくない応答も発揮するが、HDLはこのようなS1Pの動脈硬化性の作用を抑制し、積極的に抗動脈硬化性の作用を発揮する。血管平滑筋細胞ではS1PはS1P₂受容体を介して細胞遊走を抑制する⁸⁾。血管平滑筋細胞の遊走は血管形成術後の再狭窄時にしばしば観察され、血管内膜への遊走後の増殖により血管内膜肥厚の原因となることが

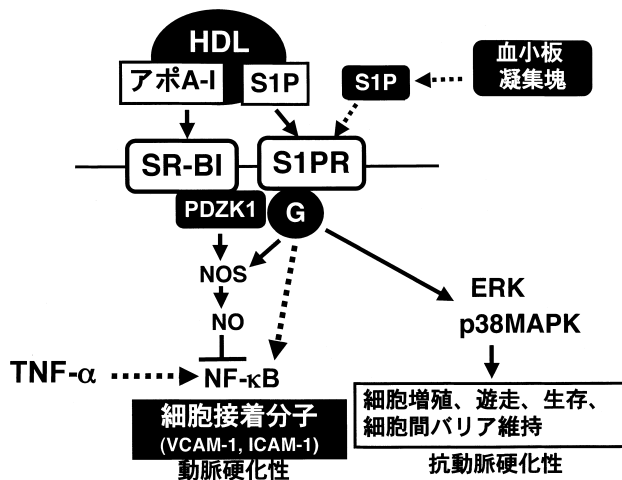


図3 血管内皮細胞における HDL 作用と S1P

S1P は通常 HDL 中に存在しているが、血小板凝集時には HDL に結合しない S1P が高濃度で細胞を刺激する可能性がある。このような場合には高濃度の S1P を必要とする NF- κ B/細胞接着分子発現系が活性化される。一方、HDL 中に存在する S1P を介する場合も S1P 受容体を介することには違いがないが、比較的低濃度でも有効な NO 産生系、MAP キナーゼ (ERK, p38MAPK) 系を活性化する。HDL 中に存在する S1P 濃度では NF- κ B/細胞接着分子発現系を促進するには不十分である。また、HDL は積極的に外部 (血小板) 由来の S1P による細胞接着分子発現作用を抑制する。この作用は HDL のもう一つの重要な成分である Apo A-I によるスカベンジャー受容体クラス B タイプ I (SR-BI)/NO 合成系の活性化によるもので、細胞接着分子発現系を抑制する。実線は抗動脈硬化性の作用あるいは代謝の流れを、破線は動脈硬化性の作用を示している。

知られている。HDL でも同様の細胞遊走抑制が観察され、この応答は S1P₂ 受容体を介している⁸⁾。

このような HDL-S1P の作用は必ずしも細胞レベルの作用にとどまらない。Nofer 等⁹⁾ は摘出血管を用い、HDL や S1P はフェニレフリンで収縮した血管を著明に抑制すること、また、この抑制作用は血管をあらかじめ一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害薬で処理した場合や S1P₃ 欠損マウス由来の血管を用いた場合には消失することを観察している。さらに、血管内皮細胞では HDL や S1P によって NO 合成酵素の活性化がおこることから、産生された NO が血管平滑筋に作用して血管弛緩をもたらしたと考えられる⁹⁾。古くから HDL の投与が虚血再灌流障害を軽減することが知られている。HDL あるいは S1P の投与により、虚血再灌流後の梗塞部位の減少、白血球の浸潤の低下、心筋細胞のアポトーシスの抑制などが観察される¹⁰⁾。この心筋保護作用には好中球の浸潤抑制、心筋細胞のアポトーシスの抑制が伴っている。また、この HDL や S1P の作用は NO 合

成酵素の阻害薬の投与、S1P₃ 受容体欠損マウスでは減弱する¹⁰⁾。このように、HDL は S1P₃ 受容体を介して心筋保護に関わっていると考えられる。好中球の浸潤抑制はおそらく上述した血管内皮細胞における接着分子発現の抑制作用を反映している。また、摘出血管や平滑筋細胞では、HDL や S1P が NAD(P)H 依存性のオキシダーゼを介した活性酸素種 (reactive oxygen species ; ROS) 産生を抑制し、血球細胞の遊走因子である monocyte chemotactic protein (MCP)-1 産生を抑制する。この HDL 作用は S1P₃ 欠損マウスの血管では著明に抑制されており、S1P₃ 受容体を介していると推定される。

5. HDL 作用に関連した薬剤

HDL のコレステロール逆輸送の効果は長い年月をかけた末に観察されるものであるが、コレステロール逆輸送と直接関連しない HDL 成分による細胞膜受容体 (S1P 受容体あるいは SR-BI) を介した作用は分、時間のオーダーの早い応答である。現在、臨床の場において HDL を増加させることの有用性が議論されているが、本稿で述べた知見を考慮すると、単に HDL を増加させるだけでなく HDL 中の S1P 量を考慮した増加を目指すべきかも知れない。

また、HDL を増加させるばかりではなく、関連する受容体系 (即ち、S1P 受容体あるいは SR-BI) を標的にした薬剤が治療に用いられることが期待される。現在、このような観点から、S1P 誘導体 FTY720 (図 1B) の免疫抑制薬としての臨床応用が注目されている。FTY720 は生体内でスフィンゴシンキナーゼ (タイプ 2) によってリン酸化される。このリン酸化 FTY720 (図 1B) はリンパ球の S1P 受容体を脱感作しリンパ節から血中へのリンパ球の放出を抑制することによって免疫抑制作用を発揮すると考えられている。現在、腎臓移植、多発性硬化症に対しては第 II 相試験での結果は有効であり、第 III 相試験も有効であるらしい。S1P 受容体研究から得られた最初の臨床薬として期待されている^{11,12)}。この S1P 誘導体は心血管系の疾患に対しても有効性が期待される。LDL 受容体欠損マウスを高脂肪食で飼うとプラークが観察されるが、この作用は FTY720 の投与で減弱する。FTY720 は血液中のリンパ球を減少させ、血漿中の TNF- α 、IL-6 などの炎症性サイトカイン濃度も減少させる¹³⁾。FTY720 の抗動脈硬化性、抗炎症性反応は Apo E 欠損マウスを高コレステロール食で飼った時のプラーク形成に対しても観察される。FTY720 は摘出動脈片での MCP-1 産生を抑制する。この作用は S1P₃ マウス由来の動脈片では観察されない。

一方、アポ A-I 製剤は本来、ABCA1 トランスポーターを介した細胞からのコレステロール引き抜きに着目した薬物であるが、この製剤は SR-BI も標的にしてコレステロール代謝非依存性の作用を活性化する可能性がある。また、HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるスタチンはコレステロール合成を抑制し血中コレステロール濃度をコントロールするために開発された薬であるが、コレステロール代謝とは直接関係しないスタチン作用も報告されている。低分子 G タンパク質を細胞膜にとどめるために必要なセラニルセラニルピロリン酸などの脂質合成が抑制されることがその一因と考えられている。私達は最近、スタチンが血管内皮細胞における SR-BI 発現を増加することによって、NO 産生や接着分子発現抑制などの HDL 作用を強めることを明らかにした¹⁴⁾。スタチンは Rho 活性を抑制することによって PPAR- α を活性化し SR-BI 発現を増加すると推定している。スタチンの抗動脈硬化性作用の新しいメカニズムと考えられる。

6. おわりに

本稿ではリポタンパク質、中でも HDL 中に存在する S1P の役割を中心に述べたが、LDL、酸化 LDL 中には S1P に構造の類似したリゾホスファチジン酸 (LPA) が存在し、コレステロール代謝と直接関連しない様々な作用を仲介していることが判ってきた。LPA の受容体も様々な細胞、組織に発現している。これらのリゾリン脂質は細胞増殖、運動、形態、アポトーシスなど生命の基本的な活動に関わっているため、リゾリン脂質分子の濃度変化、受容体の発現変化は心血管疾患以外にも様々な病態に関連することが予想される。上述したように、FTY720 の免疫抑制薬としての可能性は現在臨床レベルで評価の対象になっている。S1P に対する抗体医薬、LPA 受容体アンタゴニストなどもがん治療への応用が期待されている。今後も新しい病態と関連づけた研究が行われることが予想され、これらの情報を基に新しい薬剤の開発が行われることを期待したい。

- 1) Okajima, F. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, 1582, 132-137.
- 2) Sato, K., Malchinkhuu, E., Horiuchi, Y., Mogi, C., Tomura, H., Tosaka, M., Yoshimoto, Y., Kuwabara, A., & Okajima, F. (2007) *J. Neurochem.*, 103, 2610-2619.
- 3) Argraves, K.M. & Argraves, W.S. (2007) *J. Lipid Res.*, 48, 2325-2333.
- 4) Okajima, F., Sato, K., & Kimura, T. (2009) *Endocrine J.*, in press.
- 5) Kimura, T., Sato, K., Malchinkhuu, E., Tomura, H., Tamama,

- K., Kuwabara, A., Murakami, M., & Okajima, F. (2003) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23, 1283-1288.
- 6) Kimura, T., Tomura, H., Mogi, C., Kuwabara, A., Ishiwara, M., Shibasawa, K., Sato, K., Ohwada, S., Im, D.S., Kurose, H., Ishizuka, T., Murakami, M., & Okajima, F. (2006) *Cell. Signal.*, 18, 841-850.
- 7) Kimura, T., Tomura, H., Mogi, C., Kuwabara, A., Damirin, A., Ishizuka, T., Sekiguchi, A., Ishiwara, M., Im, D.S., Sato, K., Murakami, M., & Okajima, F. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 37457-37467.
- 8) Damirin, A., Tomura, H., Komachi, M., Liu, J. P., Mogi, C., Tobo, M., Wang, J.Q., Kimura, T., Kuwabara, A., Yamazaki, Y., Ohta, H., Im, D.S., Sato, K., & Okajima, F. (2007) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 292, H2513-2522.
- 9) Nofer, J.R., van der Giet, M., Tolle, M., Wolinska, I., von Wnuck Lipinski, K., Baba, H.A., Tietge, U.J., Godecke, A., Ishii, I., Kleuser, B., Schafers, M., Fobker, M., Zidek, W., Assmann, G., Chun, J., & Levkau, B. (2004) *J. Clin. Invest.*, 113, 569-581.
- 10) Theilmeyer, G., Schmidt, C., Herrmann, J., Keul, P., Schafers, M., Herrgott, I., Mersmann, J., Larmann, J., Hermann, S., Stypmann, J., Schober, O., Hildebrand, R., Schulz, R., Heusch, G., Haude, M., von Wnuck Lipinski, K., Herzog, C., Schmitz, M., Erbel, R., Chun, J., & Levkau, B. (2006) *Circulation*, 114, 1403-1409.
- 11) Chiba, K., Matsuyuki, H., Maeda, Y., & Sugahara, K. (2006) *Cell. Mol. Immunol.*, 3, 11-19.
- 12) Brinkmann, V. (2007) *Pharmacol. Ther.*, 115, 84-105.
- 13) Nofer, J.R., Bot, M., Brodde, M., Taylor, P.J., Salm, P., Brinkmann, V., van Berkel, T., Assmann, G., & Biessen, E.A. (2007) *Circulation*, 115, 501-508.
- 14) Kimura, T., Mogi, C., Tomura, H., Kuwabara, A., Im, D.S., Sato, K., Kurose, H., Murakami, M., & Okajima, F. (2008) *J. Immunol.*, 181, 7332-7340.

岡島 史和¹, 木村 孝穂^{1,2}, 佐藤 幸市¹
 (¹群馬大学生体調節研究所シグナル伝達分野,
²群馬大学医学部附属病院検査部)

Role of S1P in the lipoprotein-induced actions and their signaling mechanism
 Fumikazu Okajima¹, Takao Kimura^{1,2}, and Koichi Sato¹
 (¹Laboratory of Signal Transduction, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, 3-39-15 Showa-machi, Maebashi 371-8512, Japan; ²Department of Clinical Laboratory Medicine, Gunma University Graduate School of Medicine, 3-39-15 Showa-machi, Maebashi 371-8511, Japan)