

(様式4)

学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

清塚 啓介 印

(学位論文のタイトル)

**Apolipoprotein M supports S1P production and conservation and mediates prolonged Akt activation
via S1PR1 and S1PR3**

(アポリポタンパク質Mは、S1P産生促進および保護に寄与し、S1PR1およびS1PR3を介したAktの持続的な活性化を引き起こす)

(学位論文の要旨)

スフィンゴシン1リン酸 (S1P) は、細胞内でスフィンゴシンのリン酸化により産生されるリゾリン脂質性の生理活性脂質である。赤血球や血管内皮細胞で産生されたS1Pは、S1P特異的なトランスポーターを介して血中に放出され、キャリアタンパク質に結合して血中を循環する。S1Pのキャリアタンパク質として、これまでにアルブミン、アポリポタンパク質M (ApoM)、アポリポタンパク質A4 (ApoA4) が報告されている。運搬されたS1Pは、標的細胞表面に存在する受容体 (S1PR1-5) を刺激することで多様な生理機能に関与する。これまでに、アルブミンに結合したS1P (Alb-S1P) とApoMに結合したS1P (ApoM-S1P) とでは発揮する生理機能にいくつかの差異が報告されている。例えば、血管内皮細胞においてAlb-S1Pは、Gαiタンパク質を活性化し細胞内cAMP濃度上昇を抑制するが、ApoM-S1Pでは認められない。また、S1PR1受容体を介した血管バリア機能の亢進は、ApoM-S1Pにおいてより持続的な作用が認められる。しかしながら、それらの分子機序については十分に明らかにされていない。また、ApoA4については、我々の研究チームが最近新たに同定したキャリアタンパク質であるため、アルブミンやApoMとの機能面での差異は十分に検討されていない。そこで、本研究はS1Pの産生および分解の過程に着目し、キャリアタンパク質間の差異を比較検討することでS1Pの血中濃度調節機構の一端を解明することを目的とした。

S1P分解系の比較では、キャリアタンパク質に重水素標識S1P (S1P-d7) を結合させ、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) 培養上清中やマウス血液中におけるS1P-d7の濃度変化を質量分析計により経時的に定量した。等濃度のキャリアタンパク質に結合させたS1P-d7をHUVECの培地中に加えた場合、ApoMが最も安定にS1P-d7を保持し、アルブミンおよびApoA4のS1P-d7保持能はApoMよりも低かった。一方、生理的な濃度のキャリアタンパク質 (アルブミン : 600 μM、ApoM : 1 μM、ApoA4 : 3 μM) に結合させたS1P-d7を培地中に加えた場合、アルブミンはApoMと同等の量のS1P-d7を保持した。このことから、*in vitro*ではApoMが最も安定にS1Pを保持できること、アルブミンは1分子あたりの保持能はApoMよりも低いものの、生理

的な濃度ではS1P-d7に対して過剰に存在することで、ApoMと同等のS1P-d7保持能力を示すことがわかった。培養細胞での結果とは対照的に、キャリアタンパク質に結合させたS1P-d7 (1 μ M) をマウス血中に投与した場合、3種のキャリアタンパク質の間にS1P-d7の保持能の差は観察されず、いずれの場合もS1P保持能は*in vitro*に比べて非常に低いことがわかった。また、ApoMを投与した場合には、血液中S1P濃度がアルブミン、ApoA4を投与した場合と比べて200 nM程度高くなっていた。*in vitro*と*in vivo*においてこのような差異が出る正確な理由は不明であるが、*in vivo*ではS1P分解活性が非常に高い可能性、ApoMに結合したS1P-d7が内因性S1Pを始めとする他の脂質と置き換わる可能性などが考えられる。

次に、S1P産生系の比較では、キャリアタンパク質をS1P産生細胞 (HUVECおよび赤血球) やS1P産生酵素 (SphK1) とS1Pトランスポーター (Spns2またはMfsd2b) を発現させたCHO細胞の培地に加え、培地中に放出されるS1PやS1P-d7の量を質量分析計により経時的に定量した。HUVECおよびCHO-SphK1/Spns2細胞の培地中に生理的濃度のアルブミンやApoMを加えた場合にはS1Pが検出されたが、ApoA4を加えた場合にはS1Pは検出されなかった。また、Sphingosine-d7を前投与したマウス赤血球およびCHO-SphK1/Mfsd2b細胞にキャリアタンパク質を加えた場合、いずれのキャリアタンパク質でもS1P-d7の産生が検出されたが、アルブミン、ApoMに比べApoA4では産生量が非常に少なかった。このことから、S1P産生細胞からのS1P引き抜き能はアルブミン、ApoMが高く、ApoA4では低いことがわかった。また、CHO細胞ではApoMが最も効率よくS1Pを引き抜くが、HUVEC、マウス赤血球においては、アルブミンとApoMで大きな差異が認められなかった。細胞種によりS1Pの細胞外放出効率が大きく異なることから、S1Pの放出にはキャリアタンパク質だけでなく、細胞表面に存在する他の分子の関与が示唆された。

最後に、S1PR1またはS1PR3を過剰発現させたCHO細胞を各キャリアタンパク質に結合したS1Pで刺激することで、S1P受容体を介した細胞内シグナル伝達におけるキャリアタンパク質依存的な差異を検討した。等濃度あるいは生理的濃度のキャリアタンパク質に結合させたS1Pにより、S1PR1あるいはS1PR3を発現させたCHO細胞を刺激すると、5~10分をピークとしてAktおよびERKの活性化が観察された。アルブミンやApoA4に結合させたS1Pによる刺激では、30分後にはAktの活性化がほとんど観察されなくなるのに対して、ApoMに結合させたS1Pによる刺激では、Aktの活性化が持続化する傾向が観察された。一方、ERKの活性化については、キャリアタンパク質間で差異が観察されなかった。また、受容体を介した細胞内シグナル伝達においては、キャリアタンパク質の濃度による差異は観察されなかった。

以上をまとめると、3種のキャリアタンパク質のうち、*in vitro*での1分子あたりのS1P保持能はApoMが最も高かった。ApoMはS1P産生細胞からのS1Pの引き抜き効率も高い傾向にあり、S1P受容体を介した細胞内シグナル伝達においてはAktを持続的に活性化する傾向が観察された。アルブミンはS1Pに対して過剰量存在する場合には、ApoMと同様のS1P分解保護能力を示すが、S1P受容体を介した持続的なAktの活性化には至らなかった。以上の結果から、キャリアタンパク質依存的なS1Pの生理機能の差異は、ApoMが有するS1P産生促進および保護の能力によって一部説明できるものの、その全容を解明するにはさらなる研究が必要である。