

論文の内容の要旨

The Effects of Sphingolipids on Cultured Mesangial Cells スフィンゴ脂質の 培養メサンギウム細胞に対する影響

指導教官 後藤 淳郎助教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 10 年4月入学
医学博士課程
内科学専攻
花房 規男

〔背景〕 Sphingolipid は細胞膜の構成成分である sphingomyelin に由来する一連の脂質である。Sphingolipid の一つである ceramide (Cer) とアポトーシスの関連が示され、細胞膜の構成成分のみならず情報伝達物質としての役割に注目が集まってきている。Sphingosine 1-phosphate (S1P) は sphingosine (Sph) から sphingosine kinase によって産生されるが、当初、線維芽細胞を中心として platelet-derived growth factor (PDGF) のセカンドメッセンジャーと考えられていた。近年、細胞膜上の受容体が発見されこれを介した細胞外からの作用が明らかになっている。Sphingosine kinase の活性は血小板で高く、S1P は血小板内に蓄えられており、その活性化に伴って放出されるため、血小板が生体内での重要な source と考えられている。

一方、腎不全は糸球体硬化がその組織像として特徴的であるが、メサンギウム細胞の増殖から最終的に糸球体硬化にいたる過程が腎不全の進展に重要であると、広く考えられている。一方、血小板はメサンギウム細胞の増殖に深く関係しており、慢性腎炎の組織あるいは尿中に血小板が見出される。さらにメサンギウム増殖腎炎モデルで血小板を除去すると、組織像が軽減することが知られている。こうした血小板の作用は PDGF によるものが考えられていた

が, S1P が血小板内に多く含まれることから, S1P のメサンギウム細胞増殖因子としての可能性を探った.

[方法] ラット培養メサンギウム細胞(passage 5~15)を用いた. 96well plate に細胞を培養し, 70% confluent となったところで 48 時間の血清飢餓により細胞増殖を停止させ, S1P を 24 時間作用させた. 最後の 6 時間で bromodeoxy uridine (BrdU)を加え, その DNA への取り込みを ELISA 法で測定し DNA 合成を評価した. また, 細胞数の変化を細胞数に比例して呈色する MTS で測定した. 同様に S1P を加え 24 時間後に MTS を培地に加え, その色調の変化を吸光度で測定し細胞数を計数した. また他の sphingolipid である Cer, Sph, dimethylsphingosine(DMS)を加えた細胞でも同様に細胞数を MTS assay で計数した.

sphingolipid の中にはアポトーシスを誘導するものがあるが, メサンギウム細胞のアポトーシスに対する影響を Hoechst 33258 による核の形態変化の検出および fluorescein (FITC)-labeled annexin V による flow cytometry からアポトーシスを検出した. 同様に 48 時間の血清飢餓の後, 各 $10 \mu\text{M}$ の sphingolipid を加え 24 時間培養した. その後, 1mM の Hoechst 33258 および FITC annexin V, propidium iodide で 2 重染色を行った.

一方, S1P は以前 PDGF のセカンドメッセンジャーとして考えられていたが, 血小板と関連して S1P の作用が細胞外から作用している可能性を探った. まず PDGF によって S1P が細胞内で増加するかということについて調べた. Tritium label した Sph を含む $1 \mu\text{M}$ の Sph を培地中に加え, 5, 20, 60 分後に培地・細胞から脂質を抽出. 薄層クロマトグラフィで展開し, オートラジオグラフィで sphingolipid を検出した. またメサンギウム細胞の増殖を誘導するのに十分な量である 5ng/ml の PDGF を培地中に加え同じ実験を行った. さらに今回使用したメサンギウム細胞における S1P に対する受容体の発現を rat *edg-1, 2, 5* (*h218/agr16*) に対する primer を使った RT-PCR で検出した.

[結果] S1P は $0.1\sim 3 \mu\text{M}$ の濃度でメサンギウム細胞への BrdU の取り込みを増加させた. さらに $3 \mu\text{M}$ の濃度で S1P は有意に細胞数を増加させた. 一方, 他の sphingolipid については, 高濃度で細胞数を減少させる傾向があったが, $10 \mu\text{M}$ で Sph, DMS は有意に細胞数を減少させた. 特に $10 \mu\text{M}$ の DMS を加えた群において MTS assay 上ほとんど生細胞は見られなかった.

Sphingolipid のアポトーシスへの影響では $10 \mu\text{M}$ の DMS を加えたもので, Hoechst 33258 ではアポトーシスに特徴的な核の形態変化が見られた. Flow cytometry によっても有意に

annexin V 陽性, propidium iodide 陰性で示されるアポトーシスに陥った細胞の比率が増加した。一方, S1P を初めとする他の sphingolipid ではアポトーシスに与える影響は見られなかった。

次に, メサンギウム細胞での Sph 代謝を見たが, 細胞外に加えられた Sph はそのほとんどが Sph のままあるいは Cer へと変化していて, S1P へ変化したものはごくわずかであった。これは PDGF を加えたものでも同様の結果であった。さらに RT-PCR では S1P に対する受容体のメサンギウム細胞での発現が確認された。

[考察] 今回, S1P がメサンギウム細胞の増殖を促進することが明らかにされた。以前, 主として線維芽細胞において S1P が PDGF のセカンドメッセンジャーであると報告されていたが, メサンギウム細胞においては PDGF の有無にかかわらず, S1P はほとんど合成されなかった。このことからメサンギウム細胞においては, sphingosine kinase の活性は低く, PDGF のセカンドメッセンジャーとしての役割は持たないものと思われた。一方, S1P の受容体の mRNA は今回使用したメサンギウム細胞でも発現が確認された。これらの受容体を介して S1P が細胞外からメサンギウム細胞の増殖に関与していることが推測される。今回の研究は, 新たな血小板由来のメサンギウム細胞増殖因子としての S1P の役割を示唆するものであり, S1P の作用を調節することにより, 今後腎炎治療に新たな手段が得られる可能性を示唆している。