



# 論文内容要旨

## 【研究目的】

Eセレクトインは selectin family に属する接着分子の一種で interleukin-1 beta (IL-1) や tumor necrosis factor-alpha など刺激された血管内皮細胞に発現する。Eセレクトインを介した白血球と血管内皮細胞の接着は炎症初期の重要段階であり、また、癌細胞と血管内皮の接着により癌転移にも関与していることが示唆されている。Eセレクトインは刺激後4時間後をピークとする一過性の発現をするが、その発現調節機構については protein kinase C, nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), NF-ELAM1 などの関与が知られているものの完全には解明されていない。その発現調節機構の解明は炎症、癌転移プロセスの解明、更なる理解につながると共に、抗炎症、抗癌転移剤の開発に寄与しうると考えられる。

近年スフィンゴ脂質がシグナル伝達物質として細胞分化、増殖、アポトーシスなど数多くの細胞機能を調節していることが明らかにされてきた。更に、セラミドは線維芽細胞における prostaglandin E2 分泌やリンパ球での IL-2 分泌など免疫、炎症反応にも関与していることが報告されている。一方、スフィンゴシンの合成誘導体である trimethylsphingosine (TMS) は in vivo での炎症、癌転移などを抑制するが、その作用機序については不明なところが多い。そこで、各種のスフィンゴ脂質が Eセレクトイン発現に与える影響ならびにその生理的意義について検討した。

## 【方法】

ヒト臍静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて以下の項目について検討した。1) IL-1 存在、非存在下に各種のスフィンゴ脂質またはフォスホリパーゼ、スフィンゴミエリナーゼ (SMase) で処理し、4時間後に enzyme-linked immunosorbent assay および flow cytometry により Eセレクトイン発現を調べた。2) 処理4時間後、全 RNA を抽出し Eセレクトイン cDNA をプローブとし常法により Northern analysis を行った。3) 処理1時間後、核タンパク質を抽出し、NF- $\kappa$ B および NF-ELAM1 oligonucleotide を用いた gel shift assay を行ない、特異的結合活性の誘導を調べた。なお super shift assay に際しては NF- $\kappa$ B の各 subunit に対する抗体と反応させた後、NF- $\kappa$ B のプローブを加えた。4)  $^3\text{H}$  ラベルした choline chloride 存在下で 72 時間培養後、細胞を洗浄し IL-1 で所定の時間処理した。その後、脂質を抽出し薄層クロマトグラフィー (TLC) にて展開、スフィンゴミエリンのスポットをかき取り放射能をシンチレーションカウンターで測定した。5) IL-1 処理後、抽出した脂質を diacylglycerol kinase で処理

し、TLCで展開、セラミドリン酸に相当するスポットをかき取り放射能を測定した。

## 【結 果】

1) 検討した sphingosine, C2-ceramide, sphingosine-1-phosphate, dimethylsphingosine, TMS のいずれも単独では Eセレクトインの発現を誘導しなかった。2) C2-ceramide, SMase は IL-1 による Eセレクトイン発現を用量依存性に増強した。その最大増強効果は各々, 2.7, 2.2 倍であった。3) TMS は IL-1 による Eセレクトイン発現を用量依存性に抑制した。4) C2-ceramide, SMase は IL-1 による Eセレクトイン遺伝子転写を増加させた。5) C2-ceramide, SMase は単独で NF- $\kappa$ B 結合活性を誘導するとともに IL-1 により誘導される結合活性を増強させた。6) IL-1 により誘導される NF- $\kappa$ B は p50/p65 heterodimer および p50 homodimer ないし p50/non-p65, non-cRel heterodimer であった。一方, セラミドにより誘導される NF- $\kappa$ B は p50/p65 heterodimer のみであった。これらの結果は IL-1 による NF- $\kappa$ B 活性化とセラミドによるそれとは質的相違があることを示唆する。7) TMS は IL-1 による NF- $\kappa$ B 結合活性誘導を抑制した。8) NF-ELAM1 結合活性は IL-1 の有無にかかわらず C2-ceramide, SMase 処理により影響を受けなかった。9) IL-1 処理により, 刺激後 30 分後をピークにスフィンゴリエリンからセラミドへの変換が促進された。

## 【結 論】

1) スフィンゴリエリン分解によるセラミド生成という, いわゆるスフィンゴリエリン経路がサイトカインによる Eセレクトイン発現調節機構として働いている可能性が示唆された。2) この調節は, NF-ELAM1 結合活性の変化ではなく, NF- $\kappa$ B を介して行われていると考えられた。3) セラミドと IL-1 による NF- $\kappa$ B 活性化との間に subunit composition という質的相違があり, セラミドが IL-1 による NF- $\kappa$ B の活性化のシグナルの全てを担っているわけではないと考えられた。4) HUVEC において IL-1 のシグナル伝達および接着分子の発現にセラミドが関与していることが示唆された。5) TMS が Eセレクトインの発現を抑制し, その作用機序は一部 NF- $\kappa$ B を介していると考えられた。これは TMS による抗炎症, 抗癌転移作用の一部を説明しうると考えられた。

以上, HUVEC における Eセレクトイン発現調節機構の一つとして, セラミドの関与を新たに解明し, また TMS がその発現抑制に働くことを示した。

## 審査結果の要旨

本論文は各種のスフィンゴ脂質がヒト臍静脈血管内皮細胞 (HUVEC) における E セレクチン発現に与える影響について系統的に検討をおこなったものである。近年、セラミドなどのスフィンゴ脂質が新たな細胞内シグナル伝達物質として細胞の分化、増殖、アポトーシスなどにおいて中心的役割を果たすことが報告されている。さらに、セラミドは線維芽細胞における prostaglandin E2 産生やリンパ球における interleukin-2 産生など炎症反応にも深く関与していることが示唆されている。しかし、血管内皮細胞における検討は見当たらない。一方、E セレクチンは白血球や癌細胞と血管内皮間の相互作用により炎症や癌転移に関与する。E セレクチンの発現調節機構は未だ不明な点が多く、その解明は炎症や癌転移の病態を理解する上でも重要な知見を与えると期待される。

本論文の主たる結論は、1) セラミドが interleukin-1 による E セレクチン発現調節機構として働いていること、2) スフィンゴシンの誘導体である trimethylsphingosine (TMS) がこの接着分子の発現を抑制すること、の 2 点である。著者はスフィンゴ脂質が E セレクチン発現に与える影響について (i) Enzyme-linked immunosorbent assay や flow cytometry による蛋白レベルの検討のみならず、(ii) Northern 解析による RNA レベル、(iii) NF- $\kappa$ B や NF-ELAM1 など転写レベルを含めて検討をおこなっておりその結論は説得力のあるものである。更に細胞内スフィンゴミエリンおよびセラミドの定量により、interleukin-1 刺激時に HUVEC においてスフィンゴミエリン経路の活性化が起こっていることを示し、その生理的意義についても考察を加えている。これはスフィンゴミエリン経路がサイトカインによる E セレクチン発現調節機構として生理的に働いている可能性を示唆するもので、重要な知見である。一方、TMS が NF- $\kappa$ B 活性化および E セレクチン発現を抑制することを示しているが、これは、TMS の抗炎症、抗癌転移作用の一部を説明しうると考えられる。このことは、スフィンゴ脂質が NF- $\kappa$ B を抑制することを初めて示したのみならず、NF- $\kappa$ B 抑制剤が炎症や癌転移の治療に応用しうることを示唆する。

以上のように、本論文ではスフィンゴ脂質の E セレクチン発現調節への関与について様々な新見が得られており、学位論文に値する。