



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1438号
学位記番号	第299号
氏名	伊藤 史織
授与年月日	平成 26年 3月 25日
学位論文の題名	スフィンゴシン 1-リン酸による NKT 細胞の免疫応答調節機構および肥満者における血中スフィンゴシン 1-リン酸濃度の解析
論文審査担当者	主査： 木村 和哲 副査： 藤井 聡, 林 秀敏, 服部 光治

名古屋市立大学学位論文

スフィンゴシン 1-リン酸による NKT 細胞の免疫応答調節機構

および肥満者における血中スフィンゴシン 1-リン酸濃度の解析

平成 25 年度（2014 年 3 月）

伊藤 史織

名古屋市立大学大学院薬学研究科

医療機能薬学専攻

病態解析学分野

1. 本論文は、2014年 月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 木村和哲 教授

副査 服部光治 教授

林 秀敏 教授

藤井 聡 教授

2. 本論文は学術誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

1. Shiori Ito, Soichiro Iwaki, Keiko Koike, Yuichiro Yuda, Ayako Nagasaki, Ryunosuke Ohkawa, Yutaka Yatomi, Tomoo Furumoto, Hiroyuki Tsutsui, Burton E Sobel, Satoshi Fujii

Increased plasma sphingosine-1-phosphate in obese individuals and its capacity to increase the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in adipocytes

*Coronary Artery Dis.* 2013; **24**:642-650.

2. Shiori Ito, Soichiro Iwaki, Rie Kondo, Masashi Satoh, Kazuya Iwabuchi, Satoshi Fujii

TNF- $\alpha$  production in NKT cell hybridoma is regulated by sphingosine-1-phosphate: implications for atherosclerosis

*Coronary Artery Dis.* (Manuscript in press)

3. 本論文の基礎となる研究は、藤井聡 教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科にて行われた。

4. 本研究内容の参考となる論文を以下に示す。

1. Tomonori Sugiura, Yasuaki Dohi, Sumiyo Yamashita, Nobuyuki Ohte, Shiori Ito, Soichiro Iwaki, Yuji Hirowatari, Ryunosuke Ohkawa, Yuko Mishima, Yutaka Yatomi, Genjiro Kimura, Satoshi Fujii

Analytical evaluation of plasma serotonin and sphingosine 1-phosphate and

their clinical assessment in early atherosclerosis

*Coron Artery Dis.* 2012; **23**:234-238.

2. Xiao Sun, Man Zhang, Akimasa Sanagawa, Chieko Mori, Shiori Ito,  
Soichiro Iwaki, Hiroki Satoh, Satoshi Fujii  
Circulating microRNA-126 in patients with coronary artery disease:  
correlation with LDL cholesterol  
*Thrombosis J.* 2012; **10**:16.
  
3. 藤井聡, 伊藤史織  
線溶系からみたアテローム血栓症  
*血液フロンティア* 2011;**21**:1129-1136

## 目次

略語一覧	5
第 1 章 序論	6
第 2 章 実験材料および実験方法	8
第 3 章 NKT 細胞ハイブリドーマとマウス NKT 細胞を用いた S1P による TNF- $\alpha$ 産生調節機構の解析	13
第 4 章 NKT 細胞ハイブリドーマの S1P に対する遊走性の検討	26
第 5 章 ヒト血漿中 S1P 濃度の解析	34
第 6 章 総括	41
参考文献	43
謝辞	56

## 略語一覽

$\alpha$ -GalCer	$\alpha$ -galactosylceramide
BMI	Body mass index
CRP	C-reactive protein
DBP	Diastolic blood pressure
FBS	Fetal bovine serum
FMD	Flow-mediated dilation
HbA1c	Hemoglobin A1c
HDL	High density lipoprotein
HOMA-R	Homeostasis model assessment ratio
HPLC	High-performance liquid chromatography
LDL	Low density lipoprotein
MAPKK	MAP kinase kinase
NKT cell	Natural killer T cell
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PBS	Phosphate-buffered saline
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussis toxin
RBC	Red blood cell
ROCK	Rho/Rho kinase
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SBP	Systolic blood pressure
TCR	T cell antigen receptor
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
SPHK	Sphingosine kinase
WBC	White blood cell

## 第1章 序論

Natural killer T (NKT) 細胞は、非古典的なクラスI major histocompatibility complex (MHC) 分子であるCD1dに提示された糖脂質を抗原として認識する可変性のないT細胞抗原受容体 (invariant T-cell antigen receptor: iTCR) を持つT細胞群である (Bendelac et al. 2007)。糖脂質を抗原として認識し、Th1サイトカインやTh2サイトカインなど多様なサイトカインを短時間で多量に産生する (図1)。

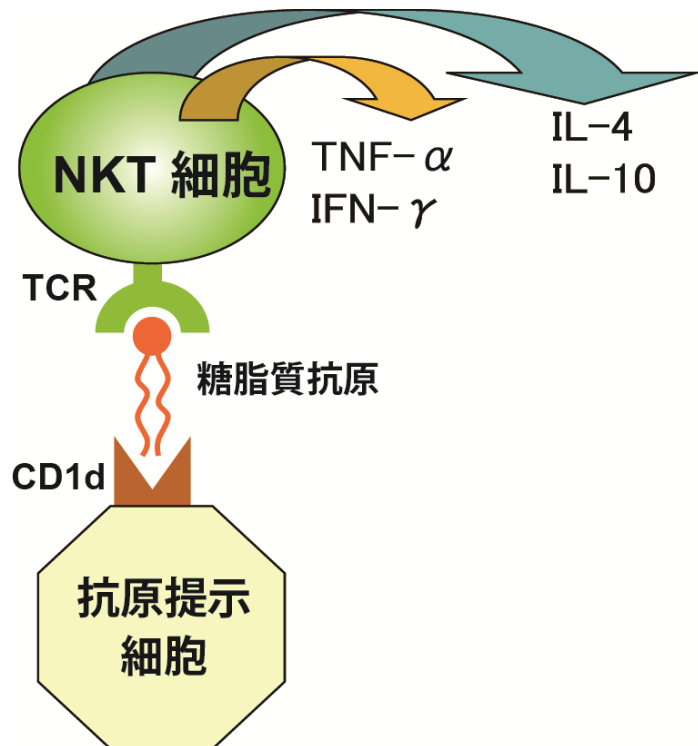


図1 NKT細胞は糖脂質を抗原として認識し、サイトカインを産生する

る (図1)。iTCRを持つNKT細胞 (iNKT細胞) の中でも、マウスV $\alpha$ 14 iNKT細胞がメジャーなサブタイプであり、現在最も解析が進んでいる。NKT細胞は自己免疫疾患やアレルギー、動脈硬化などにおいてTCRを介して様々なサイトカインを産生し、自然免疫系と獲得免疫系を賦活することで病態の制御に重要な役割を果たしている。とくに近年NKT細胞とメタボリックシンドロームとの関係が注目されており、NKT細胞を欠損させたApoE<sup>-/-</sup>マウスでアテローム性動脈硬化症の進展が減弱することや (Nakai et al. 2004)、NKT細胞は冠動脈疾患のマーカーになり得ること (Andoh et al. 2006) が報告されている。高脂肪食で誘導されたインスリン抵抗性の増悪はNKT細胞欠損マウスで抑制されること (Ohmura et al. 2010) も報告された。海綿の成分である $\alpha$ -GalCerがNKT細胞の代表的なリガンドであるが、 $\alpha$ -GalCerが哺乳類の生体内に存在することは証明されていない (Brennan et

al. 2013)。NKT細胞の内因性リガンドとしてはisoglobotriaosylceramide (iGb3) が最有力候補とされているが、NKT細胞の分化に関与するセクターリガンドは未だ探索段階である (Iwabuchi 2011)。

スフィンゴシン 1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate: S1P) は生理活性を持つスフィンゴ脂質代謝産物の一種で、S1P 受容体を介して血管新生、細胞の増殖、分化、生存、遊走、炎症等に関与している (Spiegel et al. 2002, Takuwa et al. 2008)。S1P 受容体は7回膜貫通型のGタンパク質共役型受容体で、S1P<sub>1</sub>からS1P<sub>5</sub>まで5種類のサブタイプが同定されている (Takuwa et al. 2008)。S1P 受容体の発現パターンは組織間で異なっており、S1P<sub>1</sub>、S1P<sub>2</sub>、S1P<sub>3</sub>は様々な組織で広く発現が見られる一方、S1P<sub>4</sub>は脳や皮膚、S1P<sub>5</sub>は肺や胸腺、脾臓といった限られた組織にのみ発現している (Ishii et al. 2001)。肥満モデルマウスで血漿中 S1P 濃度が高くなるという報告があり (Samad et al. 2006)、血中 S1P レベルと心血管疾患との相関を示唆する報告もある (Sattler et al. 2010)。肥満はメタボリックシンドロームの危険因子であり、動脈硬化症や2型糖尿病を進展させる要因である。肥満によって引き起こされる生体内の分子機構を解明することは、メタボリックシンドロームの予防あるいは治療の開発に有用である。

本研究では、S1P が NKT 細胞の免疫応答を制御し、病態の進行に影響を及ぼしているのではないかという仮説を立て、NKT 細胞ハイブリドーマとマウス iNKT 細胞に対して S1P 刺激実験を行い、サイトカイン産生の変化を検討した。さらに、S1P に対する NKT 細胞ハイブリドーマの遊走を調べた。また、実際にヒトにおいて S1P 濃度がどのようになっているのかを調べるため、合併症を持たない脂質異常症あるいは高血圧症患者の血漿中 S1P 濃度の解析を行った。



## 第 2 章 実験材料および実験方法

### 2-1. 試薬

S1P 刺激実験に用いた D-erythroS1P は Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA) より購入した。S1P 刺激の前処理に以下の試薬を用いた: VPC23019 (Cayman Chemicals), JTE013 (Cayman Chemicals), FTY720 (Cayman Chemicals), Y-27632 (WAKO Pure Chemical, Osaka, Japan), U0126 (Abcam, Cambridge, UK), pertussis toxin (PTX) (Tocris Bioscience, Bristol, UK), Ro-31-8220 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)。

### 2-2. 細胞培養

実験に用いた細胞は、RPMI 1640 培地 (Wako Pure Chemical) に 10% FBS (Life Technologies, CA, USA)、100 U/mL penicillin、100  $\mu$ g/mL streptomycin、50  $\mu$ M 2-mercaptethanol (Wako) を添加した培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。S1P 刺激実験を行う前に、細胞を PBS で洗浄し、FBS を含有しない培地に交換して無血清処理を行った。NKT 細胞ハイブリドーマおよびマウス iNKT 細胞を、血清飢餓処理の 16 時間後に S1P 刺激実験を行った。マウス V $\alpha$ 14 iNKT 細胞と胸腺腫細胞 BW1100 を掛け合わせて作製された NKT 細胞ハイブリドーマ 1B6 細胞および 2E10 細胞 (北里大学・岩渕和也教授より提供を受けた) を実験に用いた (Nyambayar et al. 2007)。NKT 細胞ハイブリドーマは iNKT 細胞と同様に TCR を介したサイトカイン産生を行うことが確認されている。マウス CD1d 分子をトランスフェクションした rat basophilic leukemia (RBL) 細胞株 (RBL-CD1d、北里大学・岩渕和也教授より提供を受けた) に  $\alpha$ -GalCer を負荷し、共培養を行って NKT

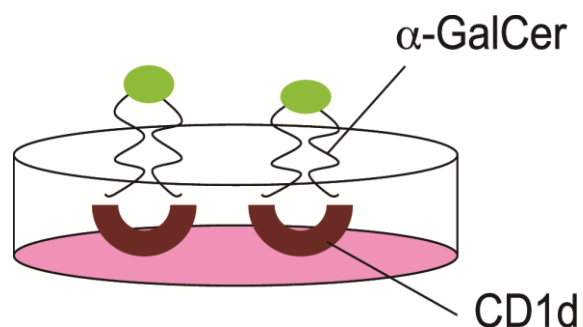


図 2  $\alpha$ -GalCer を負荷した CD1d 分子を固相化するプレートコーティング法

細胞の活性化を行った (Nyambayar et al. 2007)。図 2 のように  $\alpha$ -GalCer を負荷した CD1d (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を培養プレートに固相化したプレートコーティング法による活性化も用いた (Nyambayar et al. 2007)。200  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -GalCer と BD DimerX CD1d Reagents (BD Bioscience, NJ, USA) を容量比 1:2 で混合し、37°Cで一晩インキュベートして  $\alpha$ -GalCer-CD1d 複合体を調製した。 $\alpha$ -GalCer-CD1d 複合体を PBS で 34 倍希釈し、ディッシュにコーティングした後に細胞を播種した。

### 2-3. PCR による遺伝子発現の解析

細胞を回収し、Tripure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて total RNA を抽出した。その後、total RNA を PrimeScript RT reagent kit (for Real Time) (TAKARA Bio, Shiga, Japan) を用いて逆転写を行い、cDNA に変換した。FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Diagnostics) を用いて定量的 PCR を行った。また、PrimeScript RT-PCR Kit (TAKARA Bio) を用いて逆転写を行い、cDNA に変換した後に PrimeSTAR HS Polymerase (TAKARA Bio) を用いて RT-PCR を行った。RT-PCR 産物はアガロース電気泳動によって検出した。プライマーセット mouse TNF- $\alpha$  (MA031450) および mouse  $\beta$ -Actin (MA050368) は TAKARA Bio より購入した。その他のプライマーの塩基配列は、表 1 に示した。ケモカインリガンド mouse CXCR6 のプライマー塩基配列は以前の報告を参考にした (Diegelmann et al. 2010)。

Gene names	Direction	Sequence (5'-3')
(qRT-PCR)		
mS1P <sub>1</sub>	Forward	TCCATCGTCATCCTCTACTGC
	Reverse	AGGATGTCACAGGTCTCCGC
mS1P <sub>2</sub>	Forward	TATCGTGGCTCTGTACGTCC
	Reverse	CGCCACGTATAGATGACAGG
mS1P <sub>3</sub>	Forward	TCAGTGGTTCATCATGCTGG
	Reverse	CAGGTCTTCCTTGACCTTCG
mS1P <sub>4</sub>	Forward	AAGACCAGCCGTGTGTATGG
	Reverse	TCAGCACGGTGTGAGTAGC
mS1P <sub>5</sub>	Forward	CTTGCTATTACTGCATGTCGC
	Reverse	GTTGGAGGAGTCTTGGTTGC
mSPHK1	Forward	GATGCATGAGGTGGTGAATG
	Reverse	TACCCAGCATAGTGGTTCACAG
mSPHK2	Forward	GAATGGGCTCCTTGATCG
	Reverse	TTGAGCAACAGGTCAACACC
(RT-PCR)		
β-Actin	Forward	TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT
	Reverse	CCTAGAAGCATTGCGGTGCACGATG
CXCR6	Forward	TGTACGATGGGCACTACGA
	Reverse	GTGAGAGAGGCAGCCGATA

表 1 プライマーの塩基配列

#### 2-4. マウス iNKT 細胞の分離

雌性の8週齢C57BL/6マウス (Nippon SLC, Shizuoka, Japan) の脾臓を摘出し、iNKT細胞を分離した。iNKT細胞の分離はSatohらの方法に従って行った (Satoh et al. 2012)。フローサイトメトリーには以下の抗体を用いた : DimerX-CD1d (BD Biosciences)、PE Rat Anti-Mouse IgG1 (BD Biosciences)、Purified Mouse IgG1 (BD Biosciences) 、 FITC Anti-mouse TCR $\beta$  chain (BioLegend, San Diego, CA, USA)。

#### 2-5. ELISA 法によるタンパク質の定量

NKT細胞が放出したサイトカイン量の測定には、OptEIA enzyme-linked immunosorbent assay kit (BD Biosciences) を用いた。1B6細胞の培養上清は、Vivaspin R15 (Sartorius stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany) を用いて濃縮を行った後にサイトカインを定量した。ヒト血漿中PAI-1測定には Active Human PAI-1 ELISA kit (Innovative Research, Novi, MI, USA) を用いた。ヒト血漿中TNF- $\alpha$  測定にはQuantikine HS ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いた。

#### 2-6. 細胞の遊走実験

ボイデンチャンバーの仕組みを利用したケモタキセル (8.0- $\mu$ m-pore size membrane; KURABO, Osaka, Japan) を用いて細胞遊走を測定した。CXCL16 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) はNKT細胞に特異的なケモカインリガンドとして用いた。NKT細胞ハイブリドーマを上部チャンバーに播種し、下部チャンバーにはS1Pあるいは 150 ng/ml CXCL16を加えた培地を入れた。ケモタキセルの膜をPBSで洗浄し、4% paraformaldehyde phosphate bufferで膜上の細胞を固定した。固定した細胞を0.2% trypan blue solutionで染色し、膜部分を切り取った後に顕微鏡で観察して計数した。

#### 2-7. ヒト血漿中 S1P 濃度の測定

本研究は、北海道大学倫理委員会および名古屋市立大学倫理委員会の承認を受け、2000年に世界医師会で採択されたヘルシンキ宣言に基づいて

行われた。インフォームドコンセントを得た後に採血を行った。血漿サンプルは EDTA 採血法で北海道大学病院循環内科にて収集した。合併症を持たない高血圧症あるいは脂質異常症の患者 120 名を対象に、血漿中 S1P 濃度を測定し、病態との関連を解析した。脂質異常症は日本動脈硬化学会のガイドラインに基づいて定義された。高血圧症は日本高血圧学会のガイドラインに基づいて定義された。組織に障害がある患者、糖尿病患者、悪性新生物、心血管イベントの既往歴がある患者を除外した。S1P の定量は大川らの報告に従い HPLC 法で行った (Ohkawa et al. 2008)。血管内皮機能の指標である FMD の測定は、杉浦らの方法に従って行われた (Sugiura et al. 2013)。

## 2-8. 統計

測定値は平均値±標準偏差で表した。統計ソフトウェア SPSS (IBM, Chicago, IL, USA) を用いて統計処理を行った。多群間の有意差検定は ANOVA と Bonferroni 補正多重 t-検定によって行った。検定において  $p < 0.05$  の場合を有意差有りと判断した。

### 第3章 NKT細胞ハイブリドーマとマウスNKT細胞を用いたS1PによるTNF- $\alpha$ 産生調節機構の解析

#### 3-1. S1PはNKT細胞ハイブリドーマのTNF- $\alpha$ のmRNA発現量およびタンパク質産生量を増加させる

高脂肪食を与えたマウスではインスリン抵抗性が増加するが、NKT細胞を欠損させるとインスリン抵抗性が減弱するという報告がある (Ohmura et al. 2010)。炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ はインスリン抵抗性を増悪させる因子である (Suganami et al. 2010)。また、S1P刺激によってマクロファージのTNF- $\alpha$  mRNA発現量が増加するという報告がある (Wang et al. 2010)。そこで、S1PによってNKT細胞はTNF- $\alpha$ の産生を増加させる可能性があると考え、NKT細胞ハイブリドーマをS1Pで刺激してTNF- $\alpha$ の産生量を測定した。

リアルタイムPCR法により、NKT細胞ハイブリドーマ1B6細胞と2E10細胞にはS1P受容体のうち、S1P<sub>1</sub>、S1P<sub>2</sub>、S1P<sub>4</sub>が発現していることがわかった。(図3)。SPHK2も1B6細胞と2E10細胞に発現していた。S1PによってNKT細胞ハイブリドーマがTNF- $\alpha$ の発現量を増加させるか調べるためS1P刺激実験を行った。16時間の血清飢餓処理後、1  $\mu$ M S1Pを培地に加えて刺激を行った。S1Pは有意にTNF- $\alpha$ の発現量を増加させた。1B6細胞では10時間後において約2倍程度mRNA発現量が増加し、2E10細胞で

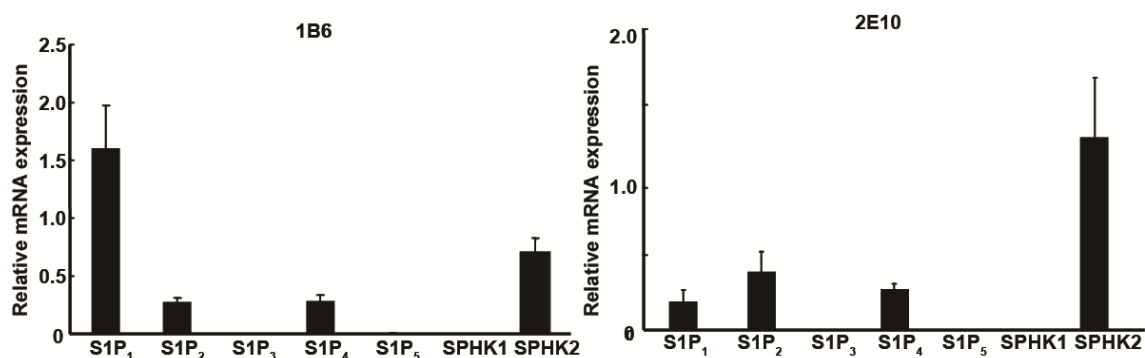
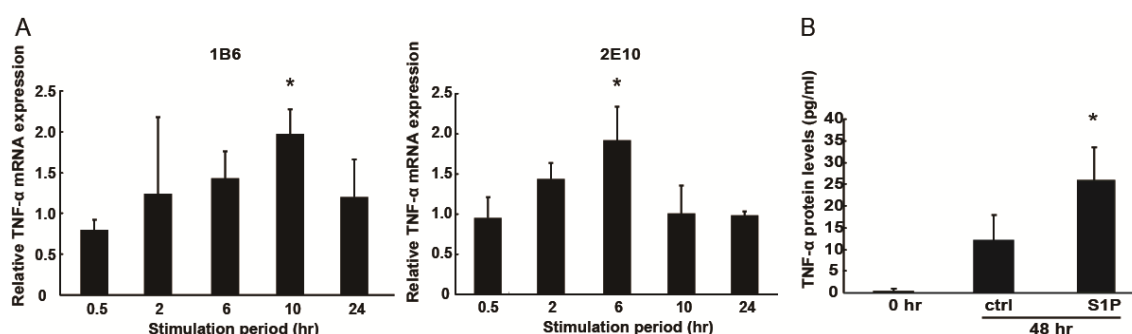
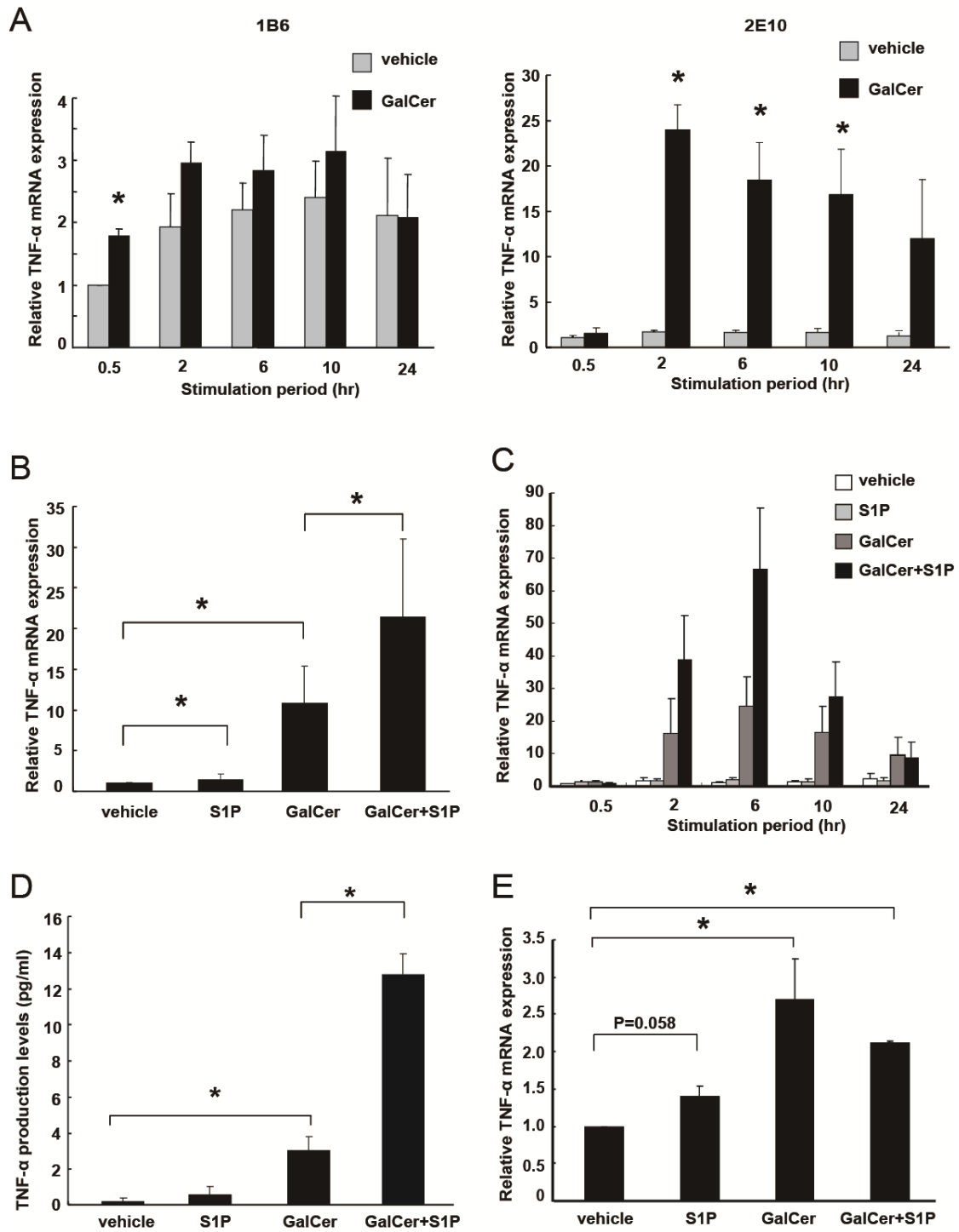


図3 リアルタイムPCR法により、NKT細胞ハイブリドーマ1B6細胞と2E10細胞のS1P受容体およびSPHK発現を調べた。(n=3)

は6時間後において発現量増加のピークが観察された (図4 A)。S1Pは1B6細胞のTNF- $\alpha$ タンパク質産生量も有意に増加させた (図4 B)。以上の結果より、S1PはNKT細胞ハイブリドーマにおいてTNF- $\alpha$ のmRNA発現量およびタンパク質産生量を増加させることが明らかとなった。



**図4** NKT細胞ハイブリドーマのTNF- $\alpha$ 産生に対するS1Pの影響を調べた。(A)1B6細胞と2E10細胞に対して1 $\mu$ M S1Pで刺激を行い、各時間におけるTNF- $\alpha$ のmRNA発現量を測定した。(n=3, \*p<0.05 vs unstimulated controls at the indicated time) (B)1B6細胞に対して1 $\mu$ M S1Pで刺激を行い、刺激48時間後に回収した上清中のTNF- $\alpha$ タンパク質量をELISA法で定量した。(n=3, \*p<0.05 vs control)



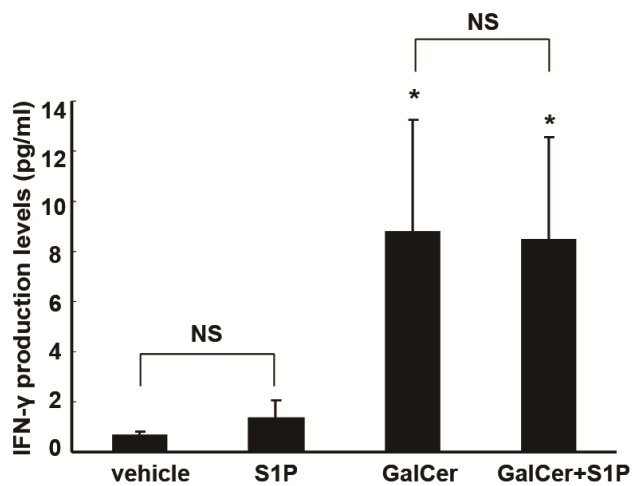


### 3-2. S1Pは $\alpha$ -GalCerによって誘導されたNKT細胞ハイブリドーマのTNF- $\alpha$ mRNA発現量およびタンパク質産生量の増加を増強する

$\alpha$ -GalCerはiNKT細胞の主要なリガンドであり、 $\alpha$ -GalCer刺激によってNKT細胞ハイブリドーマはIL-4とIFN- $\gamma$ を産生することが明らかとなっている (Nyambayar et al. 2007)。 $\alpha$ -GalCerを負荷したRBL-CD1dと共培養することで、1B6細胞および2E10細胞は活性化された。共培養開始30分後に、1B6細胞は有意にTNF- $\alpha$ のmRNA発現量を増加させた (図5 A)。これに対して2E10細胞は、約24倍程度TNF- $\alpha$ の発現量を増加させた (図5 A)。

**図5  $\alpha$ -GalCerが誘導するNKT細胞のTNF- $\alpha$ のmRNA発現量およびタンパク質産生量に対するS1Pの影響を調べた。(A) 1B6細胞 (左) および2E10細胞 (右) を $\alpha$ -GalCerを負荷したRBL-CD1d細胞と共培養し、各時間におけるTNF- $\alpha$ のmRNA発現量を測定した。(n=3, \*p<0.05 vs. unstimulated controls at the indicated time) (B) 2E10細胞を $\alpha$ -GalCerでコーティングしたプレートで、1  $\mu$ M S1Pの存在下あるいは非存在下で10時間培養を行い、TNF- $\alpha$ のmRNA発現量を測定した。(n=8, \*p<0.05 vs. control or  $\alpha$ -GalCer) (C) 2E10細胞を $\alpha$ -GalCerでコーティングしたプレートで、1  $\mu$ M S1Pの存在下あるいは非存在下で培養を行い、各時間におけるTNF- $\alpha$ のmRNA発現量を測定した。(n=4, ) (D) 2E10細胞を $\alpha$ -GalCerでコーティングしたプレートで、1  $\mu$ M S1Pの存在下あるいは非存在下で24時間培養を行い、上清中のTNF- $\alpha$ をELISA法で測定した。(n=3, \*p<0.05 vs. unstimulated control or  $\alpha$ -GalCer) (E) C57BL/6マウスの脾臓より分離したiNKT細胞をプレートコーティング法でS1Pおよび $\alpha$ -GalCer刺激を10時間行い、TNF- $\alpha$ のmRNA発現量を測定した。(n=3, \*p<0.05 vs. unstimulated control)**

$\alpha$ -GalCer/CD1dコーティングされたプレートを用いた場合も、共培養法と同じようにTNF- $\alpha$ の発現量が増加した (図5 B)。1  $\mu$ M S1Pの存在下で、 $\alpha$ -GalCer/CD1dコーティングされたプレートを用いて活性化を行うと、さらにTNF- $\alpha$ のmRNA発現量が増加した (図5 B, C)。2E10細胞では、 $\alpha$ -GalCerで誘導されたTNF- $\alpha$ のタンパク質産生量も、S1Pが存在することによりさらに増強された (図5 D)。S1Pおよび $\alpha$ -GalCerは、マウス脾臓より採取したNKT細胞のTNF- $\alpha$  mRNA発現量も増加させた (図5 E)。これに対して、S1Pは $\alpha$ -GalCerによって誘導されたIFN- $\gamma$ 産生に影響を及ぼさなかった (図6)。



**図6** 2E10細胞を $\alpha$ -GalCerでコーティングしたプレートで、1  $\mu$ M S1Pの存在下あるいは非存在下で24時間培養を行い、上清中のIFN- $\gamma$ をELISA法で測定した。(n=3, \*p<0.05 vs. unstimulated control or  $\alpha$ -GalCer)

### 3-3. S1Pによって誘導されたNKT細胞ハイブリドーマにおけるTNF- $\alpha$ 発現量増加はS1P受容体とPKC経路を介した作用である

前述の実験結果より、S1PはNKT細胞においてTNF- $\alpha$ の増加を誘導することが判明した。そこで、S1P受容体を介した作用であるかについて調べるため、S1P受容体阻害剤を用い実験を行った。1B6細胞および2E10細胞を10  $\mu$ MのVPC23019 (S1P<sub>1/3</sub>アンタゴニスト) もしくは10  $\mu$ MのJTE013 (S1P<sub>2</sub> アンタゴニスト) で30分間処理を行い、1  $\mu$ MのS1Pで刺激を行ってTNF- $\alpha$ のmRNA発現量を測定した。VPC23019とJTE013のどちらもS1PによるTNF- $\alpha$ の発現量増加を抑制した (図7 A)。これらの結果より、S1PはS1P受容体に結合することでNKT細胞ハイブリドーマのTNF- $\alpha$ 発現量を増加させていると考えられる。FTY720は細胞表面上のS1P受容体をダウンレギュレーションさせる免疫抑制剤である。FTY720はSPHK2によってリン酸化されることでS1Pアナログとなり、S1P受容体のアゴニストとして働く。1B6細胞および2E10細胞を100 nMのFTY720で12時間処理し、1  $\mu$ MのS1Pで刺激を行ってTNF- $\alpha$ の発現量を測定した。FTY720はS1PによるTNF- $\alpha$ 発現量増加を抑制した (図7 B)。この結果は、FTY720がNKT細胞ハイブリドーマのS1P受容体発現を減少させ、S1P刺激によって増加したTNF- $\alpha$ 発現量を抑制した可能性を示す。S1P受容体はGタンパク質と共役している7回膜貫通型受容体である。S1P<sub>1</sub>はGi、S1P<sub>2/3</sub>はG、GqおよびG12/13、S1P<sub>4/5</sub>はGiおよびG12/13と共役している (Rosen et al. 2013)。Gタンパク質は図8に示したような経路を辿り、細胞の増殖、生存、代謝、細胞運動に関与しているといわれている。これらの経路あるメディエーターの中で、何がS1PによるTNF- $\alpha$ の発現量増加に関与しているのか調べるため、Gタンパク質下流シグナル分子の阻害剤を用いた実験を行った。1B6細胞および2E10細胞を1  $\mu$ MのRo-31-8220 (protein kinase C; PKC阻害剤) で30分間処理し、1  $\mu$ MのS1Pで刺激を行ってTNF- $\alpha$ のmRNA発現量を測定した。Ro-31-8220はS1PによるTNF- $\alpha$ の発現量増加を抑制した (図9 A)。1B6細胞および2E10細胞を10  $\mu$ MのY-27632 (Rho kinase; ROCK阻害剤) で30分間処理し、1  $\mu$ MのS1Pで刺激を行ってTNF- $\alpha$ のmRNA発現量を測定した。Y-27632はS1PによるTNF- $\alpha$ のmRNA発現量増加を抑制しなかった (図9 B)。G12/13の下流には

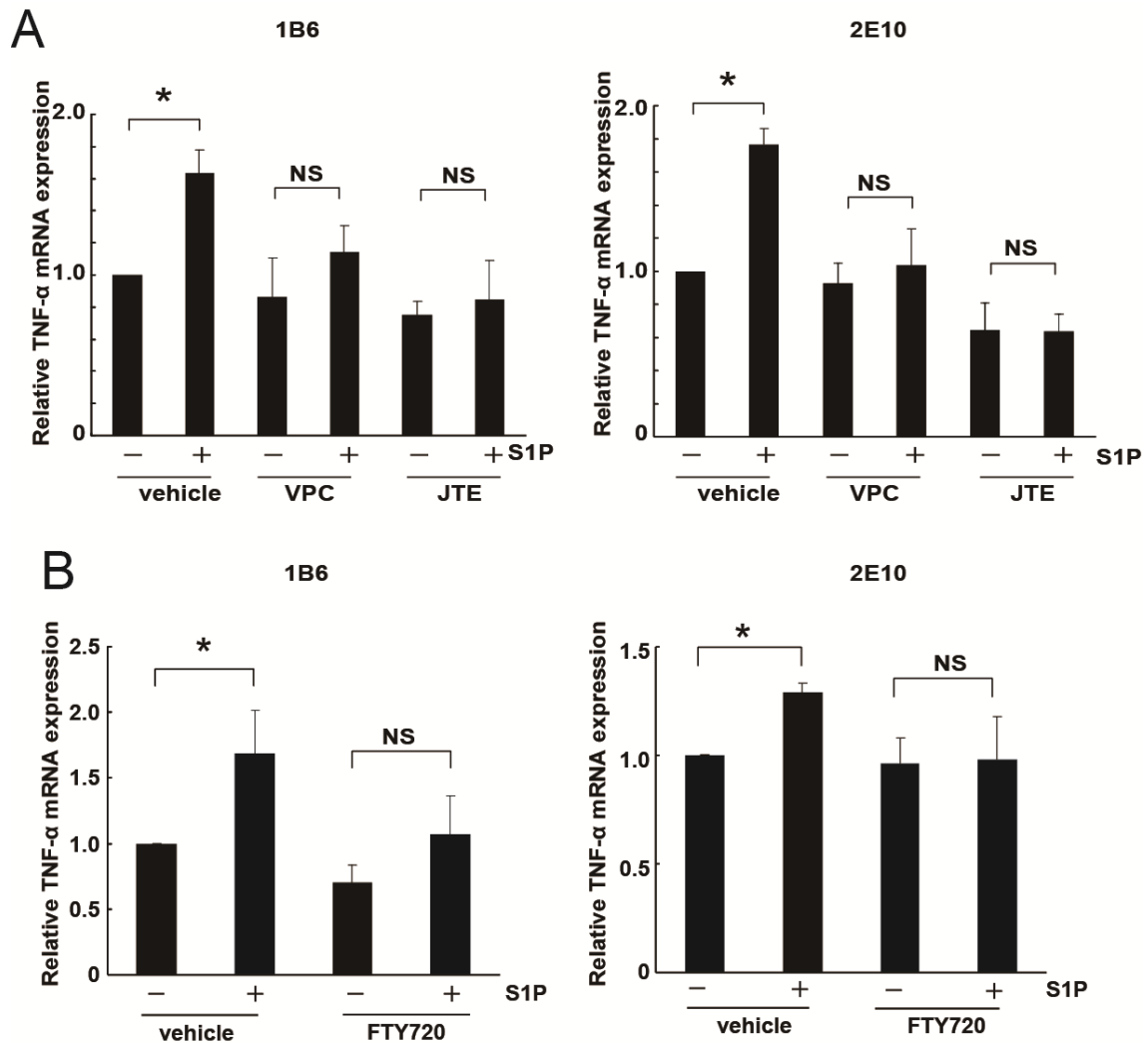


図7 S1P受容体阻害剤で処理を行った後にS1P刺激実験を行った。(A) 1B6細胞および2E10細胞を10 μM VPC23019または10 μM JTE013で30分間処理し、1 μM S1Pで刺激を行った後にTNF-αのmRNA発現量を測定した。(n=3, \*p<0.05 vs. control) (B) 1B6細胞および2E10細胞を100 nM FTY720で12時間処理し、1 μM S1Pで刺激を行った後にTNF-αのmRNA発現量を測定した。(n=4, \*p<0.05 vs. control)

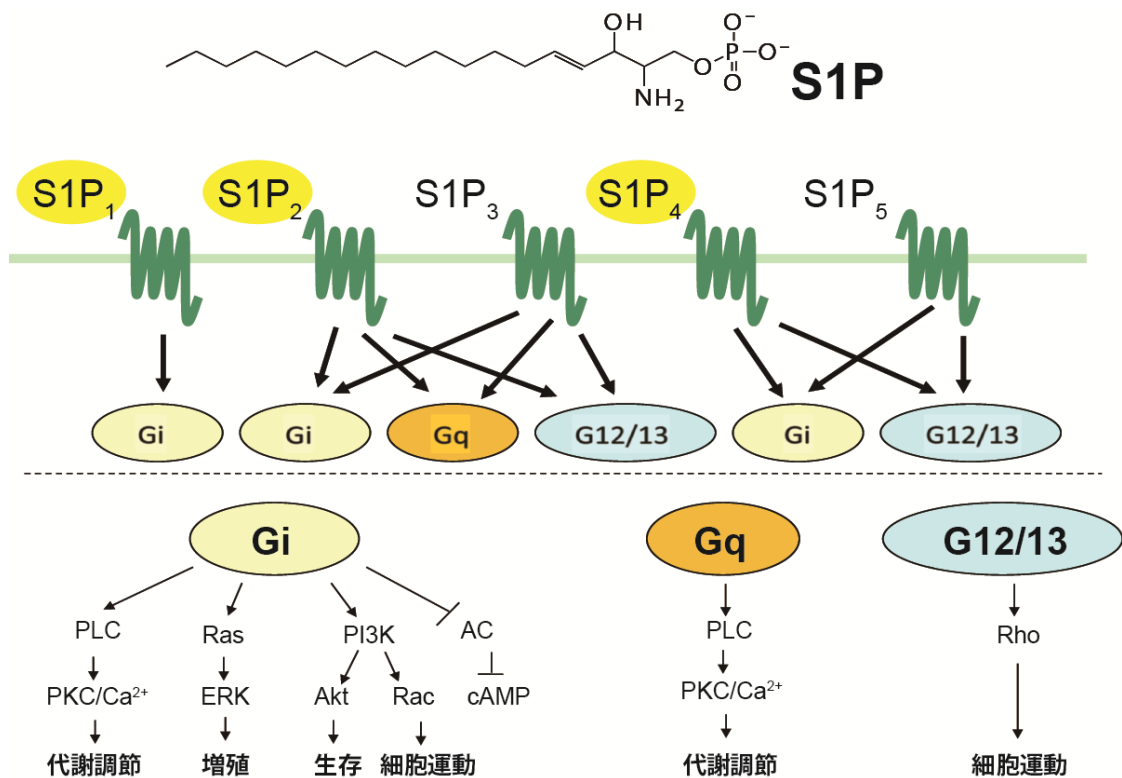
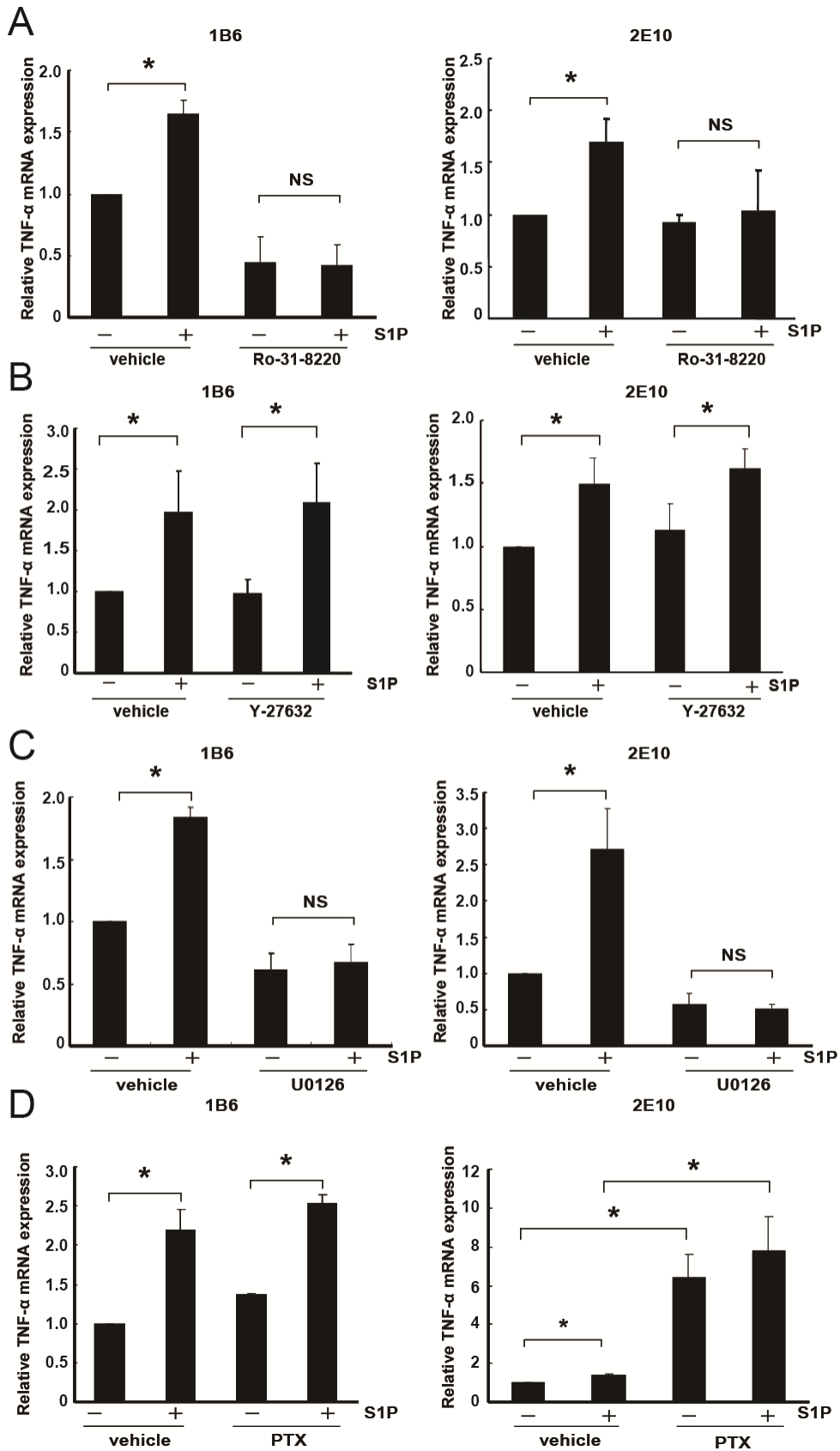


図8 S1P受容体と共役したGタンパク質下流のシグナル経路図。  
(生化学 2012;84:92-101 より引用・改変)

ROCK経路が存在するが、この経路はTNF- $\alpha$ の発現量増加には関わっていないと考えられる。次に1B6細胞および2E10細胞を10  $\mu$ MのU0126 (MAP kinase kinase; MAPKK阻害剤) で30分間処理し、1  $\mu$ MのS1Pで刺激を行ってTNF- $\alpha$ のmRNA発現量を測定した。U0126はS1PによるTNF- $\alpha$ の発現量増加を抑制した (図9 C)。1B6細胞および2E10細胞を1  $\mu$ g/mlのPTX (Gi阻害剤) で6時間処理し、1  $\mu$ MのS1Pで刺激を行ってTNF- $\alpha$ のmRNA発現量を測定した。前述の結果に反して、MAPKKの上流にあるGiの阻害剤であるPTXはS1PによるTNF- $\alpha$ 発現量増加を抑制しなかった (図9 D)。よって、Giを介した経路はTNF- $\alpha$ の発現量増加に関与していないと考えられる。



**図 9 G タンパク質下流シグナル分子の阻害剤で処理を行った後に S1P 刺激実験を行った。(A) 1B6 細胞および 2E10 細胞を 1  $\mu$ M Ro-31-8220 で 30 分間処理を行った後に 1  $\mu$ M S1P で刺激を行い、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量を測定した。(n=3, \*p<0.05 vs. control) (B) 1B6 細胞および 2E10 細胞を 10  $\mu$ M Y-27632 で 30 分間処理を行った後に 1  $\mu$ M S1P で刺激を行い、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量を測定した。(n=3, \*p<0.05 vs. control) (C) 1B6 細胞および 2E10 細胞を 10  $\mu$ M U0126 で 30 分間処理を行った後に 1  $\mu$ M S1P で刺激を行い、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量を測定した。(n=3, \*p<0.05 vs. control) (D) 1B6 細胞および 2E10 細胞を 1  $\mu$ g/ml PTX で 6 時間処理を行った後に 1  $\mu$ M S1P で刺激を行い、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量を測定した。(n=3, \*p<0.05 vs. control or S1P)**

#### 3-4. 小括

S1P は炎症性サイトカインの産生を誘導することで、炎症の惹起に参与している (Obinata et al. 2011)。本研究では、S1P によって増加する炎症性サイトカインとして TNF- $\alpha$  に着目し、実験を行った。TNF- $\alpha$  はインスリン抵抗性やアテローム性動脈硬化症の増悪因子であり、これらの病態が増悪することで心血管イベントの発生につながる (Suginami et al. 2010)。ヒトの血液中での S1P 濃度は 300-800 nM であるという報告があるため (Sugiura et al. 2012)、今回の実験では 1  $\mu$ M S1P で刺激実験を行った。1  $\mu$ M S1P 刺激によって NKT 細胞ハイブリドーマの TNF- $\alpha$  発現量は増加した。 $\alpha$ -GalCer は V $\alpha$ 14/ J $\alpha$ 18 iNKT 細胞の特異的なリガンドであり、 $\alpha$ -GalCer 刺激は IL-4 や IFN- $\gamma$  産生を誘導する (Ohmura et al. 2010)。本研究で、 $\alpha$ -GalCer 刺激は NKT 細胞ハイブリドーマの TNF- $\alpha$  産生量を増加させることが明らかとなった。 $\alpha$ -GalCer 刺激による TNF- $\alpha$  発現量増加作用は、1B6 細胞よりも 2E10 細胞において顕著だった。S1P の存在下では、 $\alpha$ -GalCer 刺激による 2E10 細胞の TNF- $\alpha$  産生量増加はさらに増大した。 $\alpha$ -GalCer 刺激によって NKT 細胞は Th1 サイトカインである TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  を産生するが、S1P

は NKT 細胞ハイブリドーマの IFN- $\gamma$  の産生量に影響を及ぼさなかった。S1P は  $\alpha$ -GalCer 刺激による NKT 細胞の IL-4、IL-10、IL-13 の産生量増加を抑制するという報告もあり (Hwang et al. 2009)、S1P による TNF- $\alpha$  の増加は TNF- $\alpha$  に特異的に見られる現象ではないかと考えられる。マウス脾臓より分離した iNKT 細胞も、 $\alpha$ -GalCer 刺激によって TNF- $\alpha$  発現量を増加させた。有意な増加ではなかったが、S1P 刺激によってもマウス脾臓 iNKT 細胞は TNF- $\alpha$  発現量を増加させる傾向が見られた。S1P 刺激を行うためには血清の影響を除くために血清飢餓処理を行う必要があるが、無血清培地はマウスより採取した細胞の培養に不適であったため、NKT 細胞ハイブリドーマと比較して反応性が弱くなっている可能性がある。マウス iNKT 細胞を用いた実験はさらなる実験法の改良を行っていく予定である。

NKT細胞ハイブリドーマにはS1P受容体のうちS1P<sub>1</sub>、S1P<sub>2</sub>、S1P<sub>4</sub>が発現していることがわかった。この結果は、マウスNKT細胞のS1P受容体発現について調べた以前の報告の結果と一致する (Allende et al. 2008)。S1P受容体阻害剤を用いた実験では、VPC23019 (S1P<sub>1/3</sub> アンタゴニスト) と (S1P<sub>2</sub>アンタゴニスト) の両方ともS1PによるTNF- $\alpha$ 発現量増加を抑制した。VPC23019よりもJTE013を用いた時に、より強い抑制が見られた。S1PはS1P<sub>2</sub>を介してマクロファージにおけるTNF- $\alpha$ のmRNA発現量を増加させるという報告もある (Wang et al. 2010)。このことより、TNF- $\alpha$ の発現量増加にはS1P受容体の中でもS1P<sub>2</sub>の寄与が大きいのではないかと考えられる。この結果に反して、S1P<sub>2</sub>以外のS1P受容体に作用するFTY720も、S1PによるTNF- $\alpha$ の発現量増加を抑制した。そのため、S1P<sub>2</sub>以外の受容体も寄与していると考えられる。各S1P受容体はGタンパク質と共役している。S1P受容体と共役したGタンパク質の下流に経路の中で、どのシグナル分子が関与しているのかを調べるために阻害剤実験を行った。ROCK阻害剤であるY-27632とGi阻害剤であるPTXはS1Pによって誘導されたTNF- $\alpha$ の発現量増加を抑制しなかった。この結果より、Rho/ROCK経路とGi経路はS1PによるTNF- $\alpha$ 発現量増加に関与していないことがわかった。MAPKKの阻害剤であるU0126はS1PによるTNF- $\alpha$ の発現量増加を抑制したが、MAPKKの上流にあるGiを阻害しても抑制が見られなかったため、S1PによるTNF- $\alpha$ 発



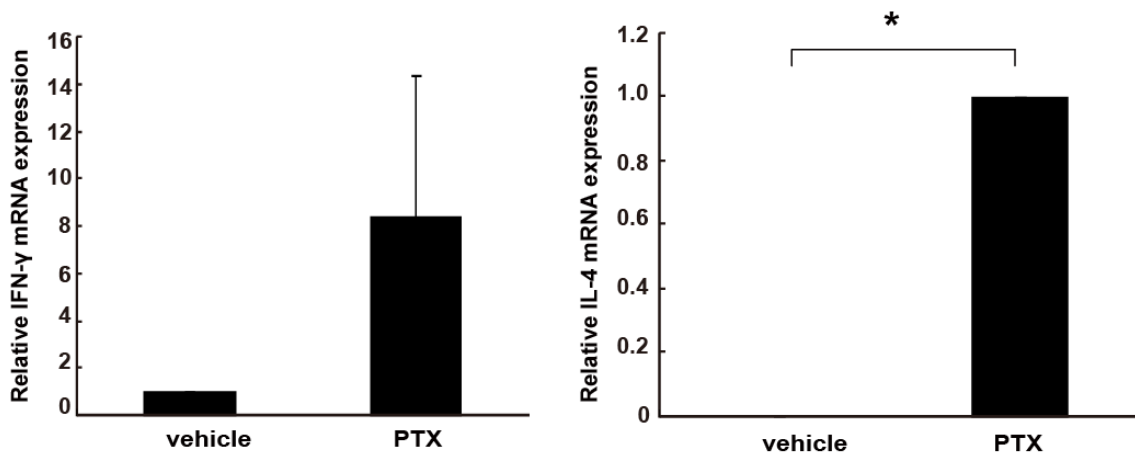


図 10 1B6 細胞および 2E10 細胞を 1  $\mu$ g/ml PTX で 6 時間処理を行った後に 1  $\mu$ M S1P で刺激を行い、IFN- $\gamma$  (左) と IL-4 (右) の mRNA 発現量を測定した。(n=3, \*p<0.05 vs. vehicle)

現量増加にMAPKKは直接関与していないのではないかと考えられる。PTX処理は2E10細胞において、むしろTNF- $\alpha$ の発現量を増加させた。PTXはTNF- $\alpha$ 以外にも2E10細胞のIL-4およびIFN- $\gamma$ の発現量を増加させた(図10)。PTX処理は何らかの作用でTCRを介した活性化を引き起こした可能性があるが、その詳細な機構は不明である。図11のように、PKC阻害剤であるRo-31-8220はS1PによるTNF- $\alpha$ の発現量増加を抑制した。NKT細胞ハイブリドーマに発現しているS1P受容体の中で、下流シグナルにPKCがあるGqと共役しているのはS1P<sub>2</sub>だけである。よって、NKT細胞ハイブリドーマのS1PによるTNF- $\alpha$ 発現量増加には、S1P<sub>2</sub>/Gq/PLC/PKCが関与しているのではないかと考えられる。

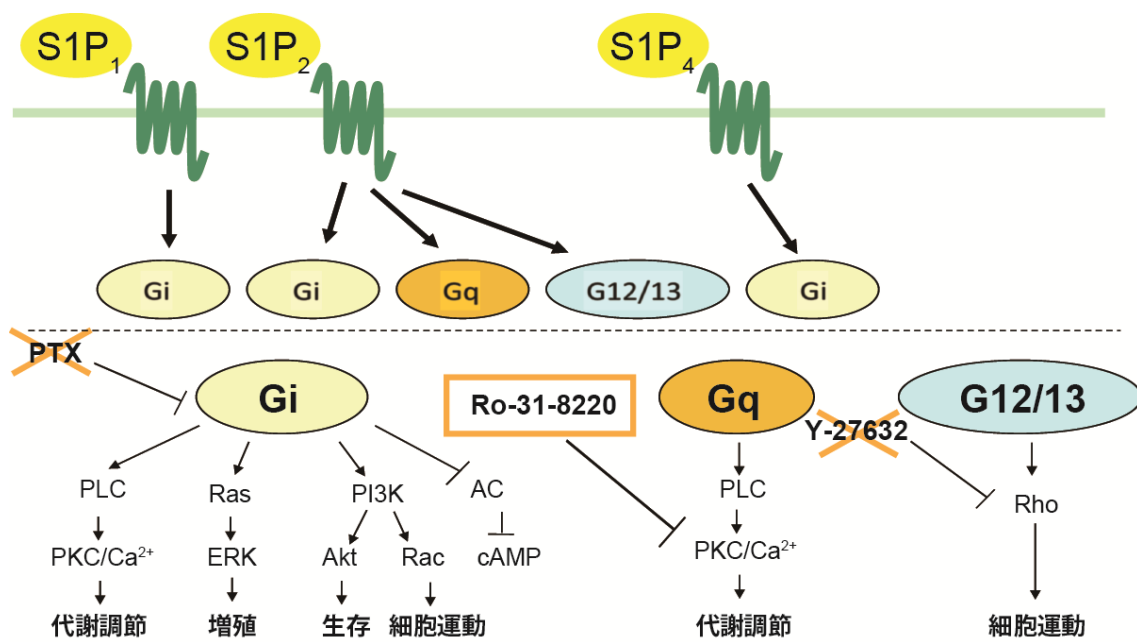


図 11 PKC 阻害剤 Ro-31-8220 は S1P による TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量増加を抑制した。(生化学 2012;84:92-101 より引用・改変)

## 第4章 NKT細胞ハイブリドーマのS1Pに対する遊走性の検討

### 4-1. S1P受容体はNKT細胞ハイブリドーマの遊走に関与している

S1PはT細胞の遊走を制御している(Wei et al. 2005)。図12のように、血液中ではS1Pは300 nMより高い高濃度となっており、細胞表面上のS1P受容体発現レベルは低くなっている。2次リンパ組織ではS1Pが10 nM未満の低濃度に保たれていて、S1Pが低濃度のリンパ組織では細胞表面のS1P受容体が再発現し、S1Pの濃度勾配に従ってリンパ組織外へ移出するモデルが示されている(Nofer et al. 2007)。また、免疫抑制剤FTY720(フィンゴリモド)はT細胞のS1P受容体を介した移出を阻害することで免疫抑制作用を示す(Choi et al. 2011)。フィンゴリモド(商品名:ジレニア<sup>®</sup>)は2011年9月に日本国内初の経口多発性硬化症治療薬として製造販売承認を取得した。S1P受容体を介したNKT細胞ハイブリドーマの遊走を調べるため、ボイデンチャンバーの仕組みを利用したケモタキセルを用いて以下の実験を行った。S1Pを加えた培地を下部チャンバーに入れ、上部チャンバーにNKT細胞ハイブリドーマを入れて24時間インキュベートを行い、ケモタキセル膜上の細胞を染色して顕微鏡で観察を行った(図13)。

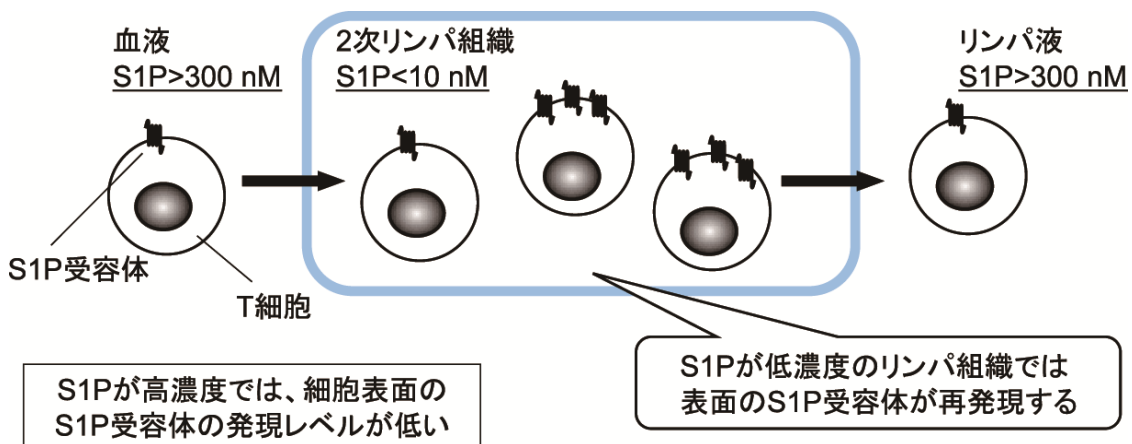


図12 S1Pの濃度勾配に従ったT細胞の移出モデル図

(YAKUGAKUZASSHI 2009;129:655-665 より引用・改編)

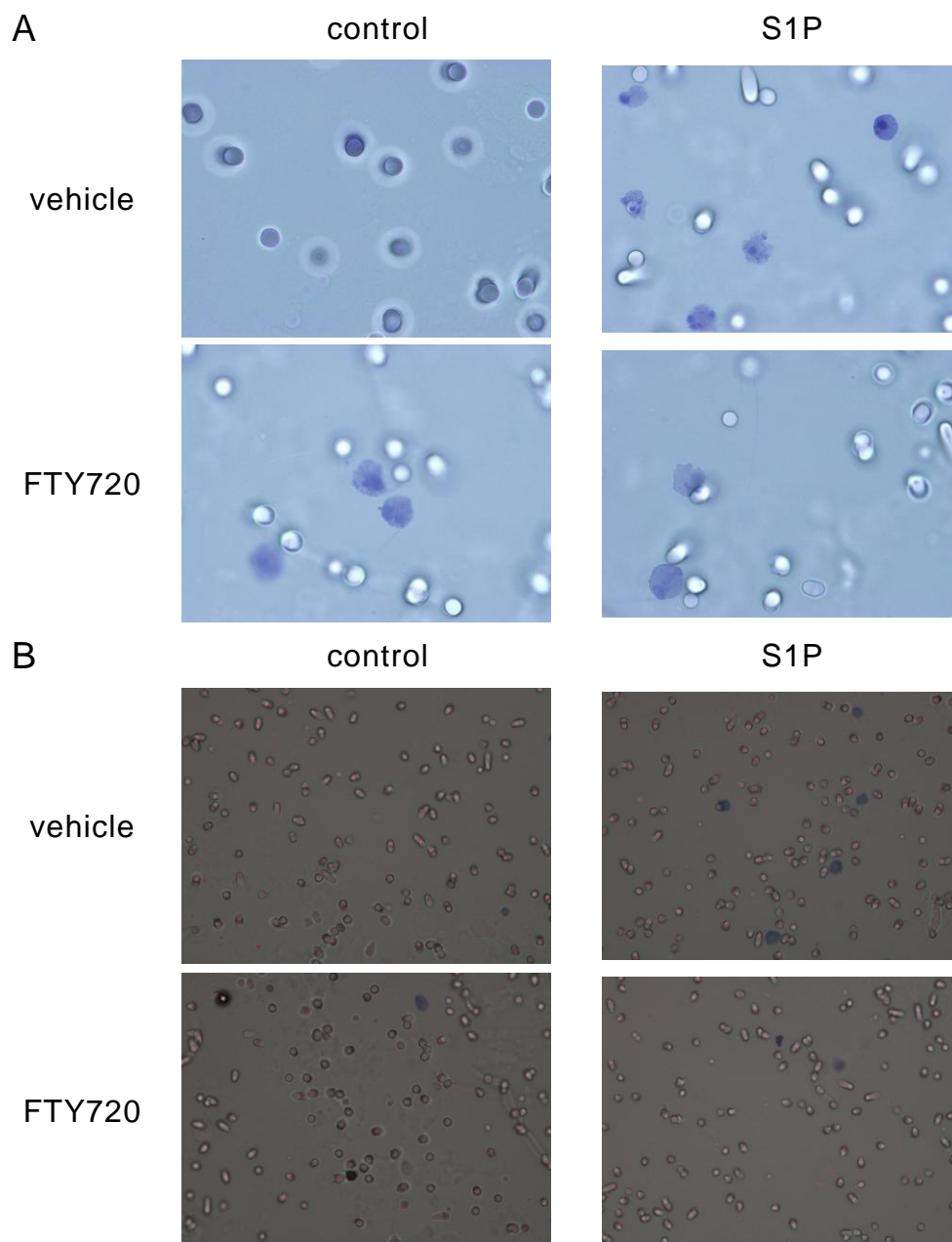


図 13 ケモタキセル膜上の細胞を顕微鏡で観察した。(A, B) S1P に誘導される NKT 細胞ハイブリドーマの遊走をケモタキセルを用いて観察した。1B6 細胞および 2E10 細胞を 100 nM FTY720 で 12 時間処理し、ケモタキセル上部チャンバーに播種した。下部チャンバーには 1  $\mu$ M S1P を加えた。24 時間インキュベートを行った後に、膜を切り取り細胞を固定・染色後、顕微鏡で観察した。倍率は 600 倍 (A) と 400 倍 (B) で観察した。

膜上の細胞数を計数し、コントロールを 100%として比較した。S1P が存在することにより NKT 細胞ハイブリドーマの下部チャンバーへの遊走は増加し、FTY720 で処理を行うと遊走は阻害された (図 14)。よって、S1P による NKT 細胞ハイブリドーマの遊走促進は S1P 受容体を介した作用であると考えられる。

#### 4-2. S1P と CXCL16 は NKT 細胞ハイブリドーマの遊走を促進する

次に NKT 細胞に特異的なケモカインリガンドである CXCL16 に対する NKT 細胞ハイブリドーマの遊走を調べた。CXCL16 はケモカイン受容体 CXCR6 に特異的なリガンドである (Jiang et al. 2005)。CXCR6 は NKT 細胞や活性化した T 細胞に発現している。そこで、RT-PCR によって NKT 細胞ハイブリドーマにおける CXCR6 の発現を調べた。1B6 細胞および 2E10 細胞の両方で CXCR6 の発現が確認できた (図 15 A)。CXCL16 をケモタキセルの下部チャンバーに入れてインキュベートを行うと、3 時間後および 24 時間後において有意に NKT 細胞ハイブリドーマの遊走を増加さ

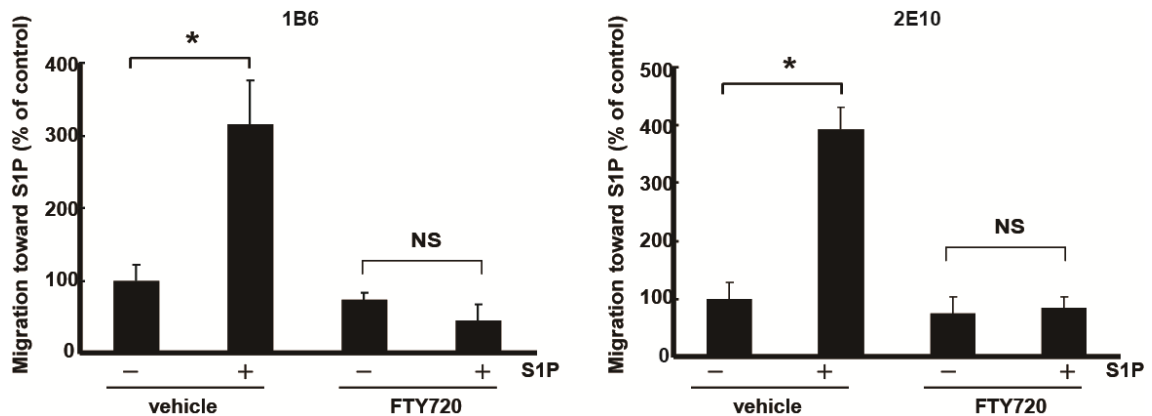
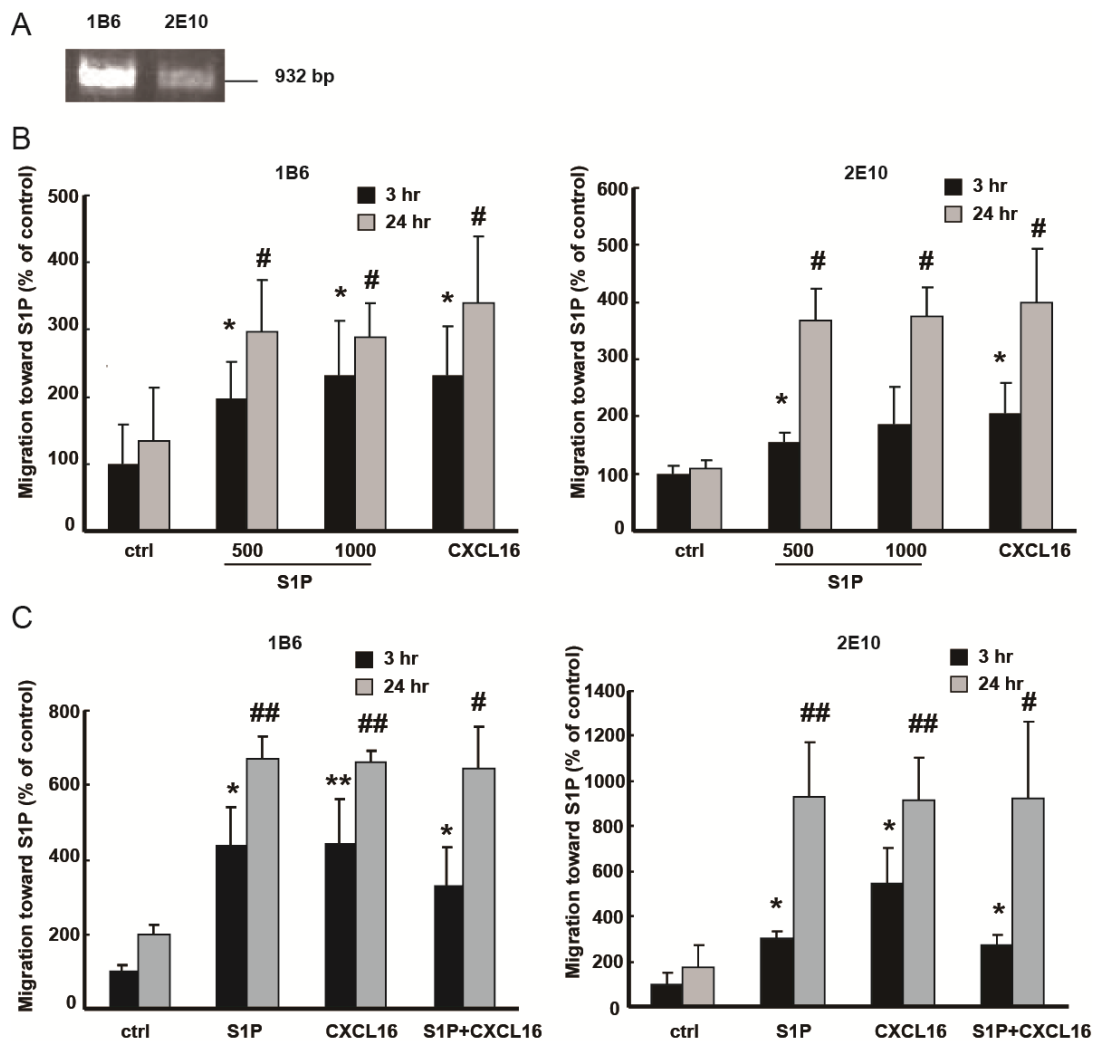


図 14 1B6 細胞および 2E10 細胞を 100 nM FTY720 で 12 時間処理し、ケモタキセル上部チャンバーへ播種した。下部チャンバーには 1000 nM S1P を加え、24 時間インキュベートを行った。(n=3, \*p<0.05 vs. vehicle)

せた (図 15 B)。500 nM および 1000 nM の S1P による遊走促進作用は CXCL16 による遊走促進作用と同等であった (図 15 B)。S1P と CXCL16 を併用しても、さらなる遊走の増加は見られなかった (図 15 C)。

#### 4-3. S1P 受容体下流にある G タンパク質の経路は NKT 細胞ハイブリドーマの遊走制御に関与している

S1P受容体はGタンパク質と共役して細胞の遊走を制御するというモデルが示されている。S1P<sub>1</sub>はGiと共役しており、GDP-GTP交換因子 (guanine nucleotide exchange factor) である Rac-GEF を介して Rac を活性化させ、細胞遊走を促進する。S1P<sub>3</sub>はGiとG12/13の両方と共役しているが、Giを介した経路の寄与が大きいいため、細胞遊走促進の方向に働く。これに対し



**図 15 CXCL16 と S1P に対する遊走性を調べた。(A)NKT 細胞ハイブリドーマの CXCR6 発現を RT-PCR 法で調べた。(B) 500 nM または 1  $\mu$ M S1P および 150 ng/ml CXCL16 をケモタキセル下部チャンバーに加え、1B6 細胞と 2E10 細胞を上部チャンバーに播種し、インキュベートを行った。(n=6 (1B6- 3 hours), n=5 (1B6- 24 hours), n=4 (2E10- 3 hours), n=3 (2E10- 24 hours), \*p<0.05 vs. 3 hour control. #p<0.05 vs. 24 hour control) (C) 500 nM S1P および 150 ng/ml CXCL16 をケモタキセル下部チャンバーに加え、1B6 細胞と 2E10 細胞を上部チャンバーに播種し、インキュベートを行った。(n=4 (1B6- 3 hours, 2E10- 24 hours), n=3 (1B6- 24 hours, 2E10- 3 hours, \*p<0.05 vs. 3 hour control, \*\*p<0.01 vs. 3 hour control, #p<0.05 vs. 24 hour control, ##p<0.01 vs. 24 hour control)**

て S1P2 は Gi と G12/13 の両方と共役しているが、G12/13 を介した経路の寄与が大きい。よって Rho が活性化し、GTPase 活性化タンパク質 (GTPase-activating protein) である Rac-GAP を介して Rac の活性化を抑制し、細胞遊走を抑制する (Sugimoto et al. 2003)。そこで、S1P による NKT 細胞ハイブリドーマの遊走制御に関与している経路を調べるために以下の実験を行った。10  $\mu$ M の Y-27632 で 30 分間処理をした後にケモタキセルで 24 時間インキュベートした。Y-27632 処理を行うことで NKT 細胞ハイブリドーマの遊走が増加した (図 16 A)。1  $\mu$ g/ml の PTX で 6 時間処理をした後にケモタキセルで 24 時間インキュベートした。PTX 処理を行うことで S1P による遊走増加が抑制された (図 16 B)

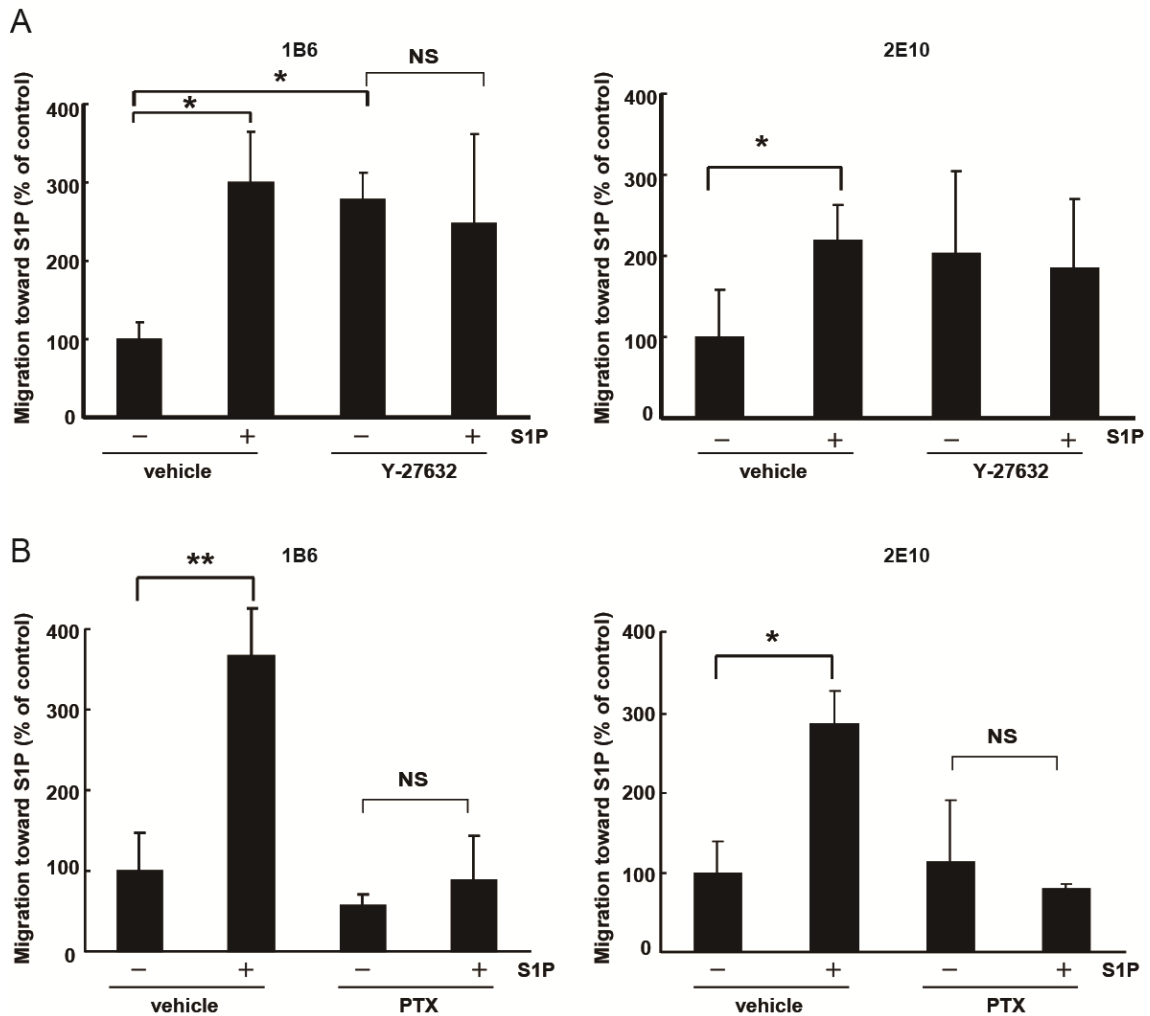


図 16 (A) 1B6 細胞および 2E10 細胞を 10 nM Y-27632 で 30 分間処理した後にケモタキセル上部チャンバーに播種し、下部チャンバーに S1P を加えて 24 時間インキュベートを行った。(n=3 (1B6), n=4 (2E10), \*p<0.05 vs. vehicle without S1P treatment) (B) 1B6 細胞および 2E10 細胞を 1  $\mu$ g/ml PTX で 6 時間処理した後にケモタキセル上部チャンバーに播種し、下部チャンバーに S1P を加えて 24 時間インキュベートを行った。(n=3, \*p<0.05 vs. vehicle without S1P treatment. \*\*p<0.01 vs. vehicle without S1P treatment)



#### 4-4. 小括

S1P受容体の制御はアテローム性動脈硬化症など様々な動物の疾患モデルにおいて病態改善に有効である (Nofer et al. 2007, Potì et al. 2013)。S1PがNKT細胞を介して疾患にどのように寄与しているのかを調べるために、S1PによるNKT細胞ハイブリドーマの遊走制御機構について検討した。1B6細胞と2E10細胞の遊走はS1Pによって増加し、S1Pによる遊走増加はFTY720によって抑制された。FTY720はNKT細胞のサイトカイン産生を抑制するが、遊走は抑制しないという報告がある (Hwang et al. 2010)。しかしこの報告では有意ではないもののFTY720による遊走抑制傾向は見られ、FTY720がNKT細胞ハイブリドーマの遊走を抑制するという実験結果は不自然ではない。1B6細胞と2E10はマウスの胸腺腫細胞を用いて作製された細胞株であるため、T細胞に近い反応が見られたのではないかと考えられる。CXCL16はNKT細胞に特異的なケモカインリガンドである (Johnston et al. 2003, Jiang et al. 2005)。NKT細胞ハイブリドーマはCXCR6陽性で、CXCL16に対する遊走が観察された。NKT細胞ハイブリドーマのS1Pに対する遊走はCXCL16に対する遊走と同等であった。S1PとCXCL16を併用しても、さらなるNKT細胞ハイブリドーマの遊走増大は見られなかった。Small GTPaseであるRhoファミリーはアクチン重合と細胞運動を制御していることが知られている。S1P<sub>2</sub>はROCKを介さずにRacの活性化を抑制するRhoを活性化することによって、細胞の遊走を抑制するという報告がある (Sugimoto et al. 2003)。この報告とは異なり、ROCK阻害剤であるY-27632処理を行うとNKT細胞ハイブリドーマの遊走は増加したため、NKT細胞ハイブリドーマのS1Pを介した遊走制御にはRhoキナーゼが関与しているのではないかと考えられる。Gi阻害剤であるPTXはS1PによるNKT細胞ハイブリドーマの遊走を抑制したため、NKT細胞ハイブリドーマのS1Pを介した遊走制御にはGi経路が関与していると考えられる。S1P受容体を介したT細胞の移出にはS1P<sub>1</sub>の寄与が大きいことが知られており、NKT細胞の遊走もまたGiと共役しているS1P<sub>1</sub>の寄与が大きいのではないかとと思われる。高脂肪食を与えたマウスでは脂肪組織でNKT細胞が増加し (Ohmura et al. 2010)、ApoE<sup>-/-</sup>マウスではNKT細胞がアテローム部位の炎症増大に寄与し

ている (Nakai et al. 2004)。よって、NKT細胞の遊走機構を解明することはメタボリックシンドロームの病態制御に貢献できると考えられる。

## 第5章 ヒト血漿中 S1P 濃度の解析

### 5-1. 血漿中 S1P 濃度は BMI および血漿中 PAI-1 濃度と正の相関を示す

これまでの報告で、肥満モデルマウスである *ob/ob* マウスでは血漿中 S1P 濃度が高いこと (Samad et al. 2006)、血漿中の遊離 S1P レベルは冠動脈疾患の重症度と相関すること (Sattler et al. 2010)、ヒト肝癌細胞 HepG2 細胞 (Asakura et al. 2011) とマウス 3T3-L1 脂肪細胞 (Ito et al. 2013) で S1P 刺激によりプラスミノゲンアクチベーター1 (Plasminogen activator inhibitor-1; PAI-1) 産生が増加することが明らかとなっている。PAI-1 はセリンプロテアーゼ機能を持ち、組織型プラスミノゲンアクチベーター (tissue-type plasminogen activator; t-PA) とウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター urokinase-type plasminogen activator (u-PA) の両者を阻害することで血栓形成に寄与している (Vykoukal et al. 2011)。また、前述の実験結果より、S1P が炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  を増加させることも判明した。そこで、合併症を持たない高血圧症および脂質異常症の患者の血漿中 S1P 濃度を測定し、病態との相関を解析した。さらに、血漿中の PAI-1 および TNF- $\alpha$  の濃度も測定した。患者の年齢分布と男女比を図 17 に、患者背景および各臨床検査値を表 2 に示した。

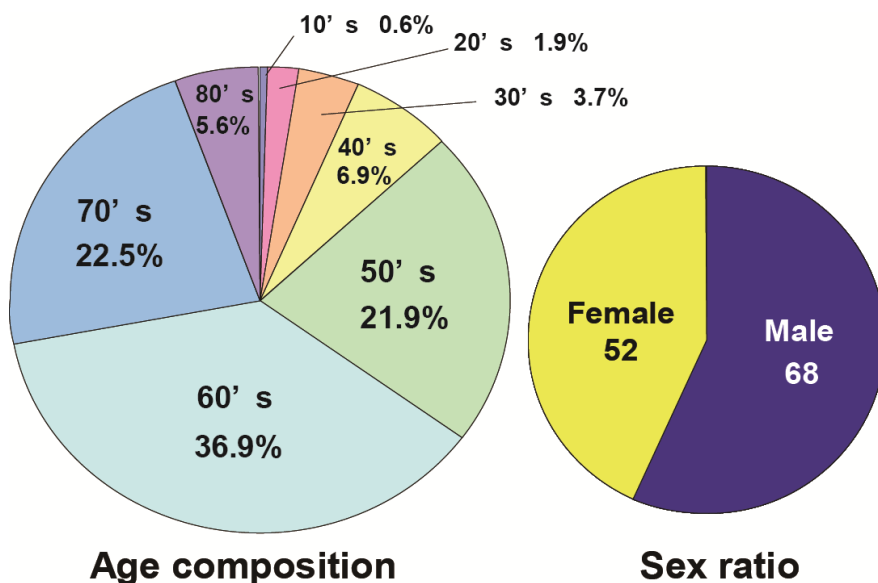
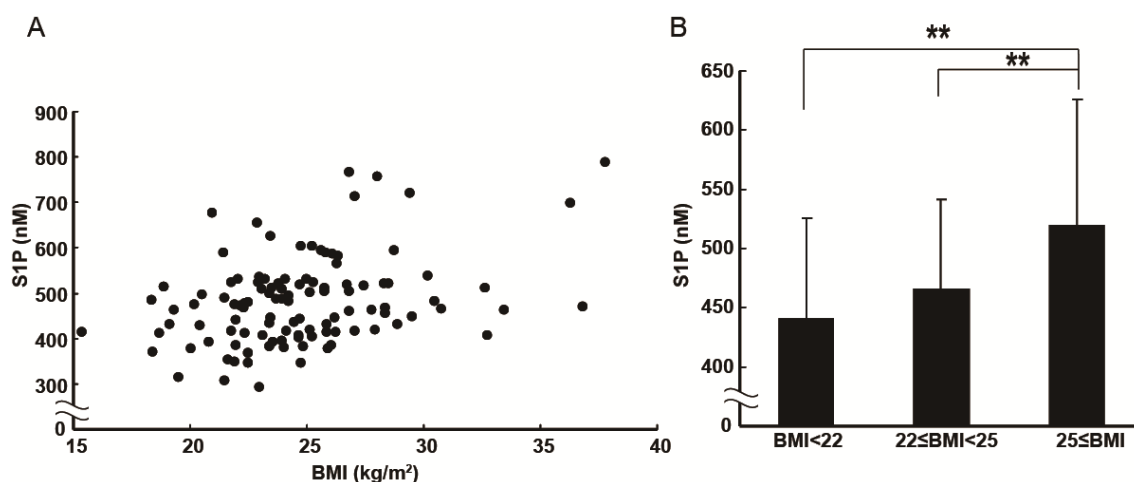


図 17 患者の年齢の分布 (左) および男女比 (右)

Variables	Total patients (n=120)
Age (years old)	61±13
Sex (male/female)	68/52
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.8±3.9
SBP (mmHg)	139±21
DBP (mmHg)	82±12
WBC (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	5.8±1.5
RBC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	4.3±0.5
Hemoglobin (g/dl)	13.7±1.6
Hematocrit (%)	41.0±4.2
Platelets (10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	27.3±27.7
Blood glucose level (mg/dl)	112±23
HbA1c (%)	5.3±0.8
Insulin (μg/dl)	15.1±32.7
HOMA-R	4.41±10.6
LDL-cholesterol (mg/dl)	112±29
HDL-cholesterol (mg/dl)	65±17
Total cholesterol (mg/dl)	197±32
Triglyceride (mg/dl)	121±86
Creatinine (mg/dl)	0.8±0.2
CRP (mg/dl)	1.0±1.2
Urinary albumin (mg/g Cr)	31.9±72.5
S1P (nM)	481±95
PAI-1 (ng/ml)	7.9±6.9

**表2 患者の臨床検査値**



**図 18 肥満と血漿中 S1P の関連について調べた。(A) 患者の BMI と血漿中 S1P 濃度について相関分析を行った。(Kendall  $\tau = 0.205$ , significance probability = 0.001) (B) BMI が 25 以上、22 以上 25 未満、22 未満の 3 グループに分けてそれぞれの平均血漿中 S1P 濃度を比較した。(\*\* $p < 0.01$ )**

患者の血漿中 S1P 濃度と臨床検査値との相関分析を行った結果、肥満度を示す指標である BMI と有意な相関が見られた (図 18 A)。血漿中 S1P 濃度はこの他にヘモグロビンとヘマトクリット値と相関があり、ヘモグロビンとヘマトクリット値を介入させると S1P と BMI の間の相関は見られなくなった (results not shown)。日本肥満学会のガイドラインでは、BMI が 25 以上の場合を肥満と定義している。そこで、BMI が 25 以上、22 以上 25 未満、22 未満の 3 グループに分けてそれぞれの平均血漿中 S1P 濃度を比較した。その結果、BMI が 25 以上の肥満者のグループは、他の 2 グループよりも有意に平均血漿中 S1P 濃度が高いという結果が得られた (図 18 B)。次に血漿中 PAI-1 濃度を測定し、血漿中 S1P 濃度と相関分析を行った。その結果、PAI-1 濃度と S1P 濃度との間に有意な相関が見られた (図 19)。以前の報告とも一致して、PAI-1 は BMI と強い相関を示した (results not shown)。PAI-1 はヘモグロビンおよびヘマトクリット値とは相関がなかった (results not shown)。

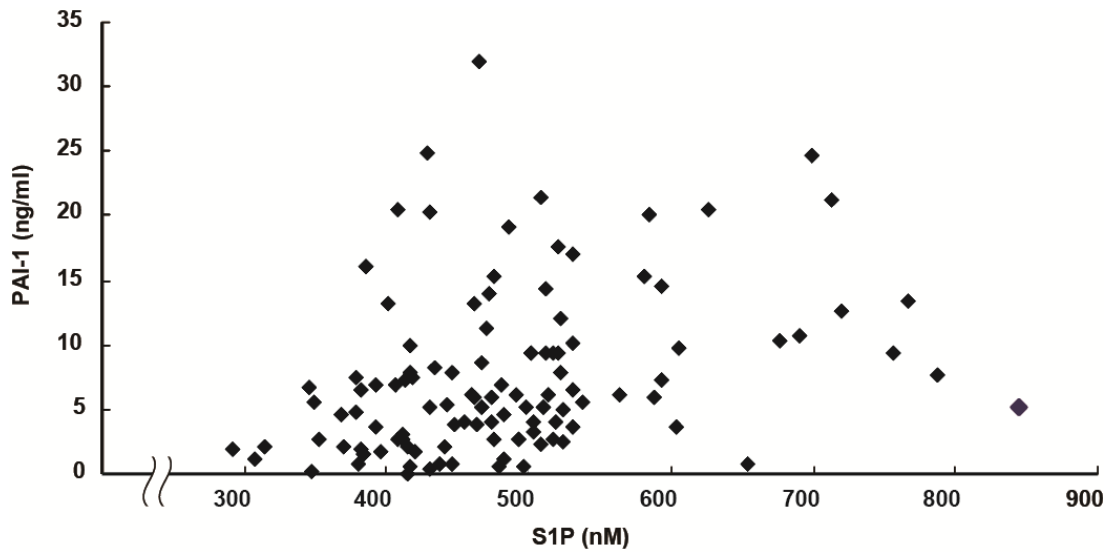


図 19 血漿中 S1P 濃度と血漿中 PAI-1 濃度について相関分析を行った。(Kendall  $\tau = 0.265$ , significance probability  $< 0.001$ )

## 5-2. 血漿中 S1P 濃度が高い患者は血漿中 PAI-1 および TNF- $\alpha$ のレベルが高く、FMD 値が低い傾向となる

前述の解析結果より、BMI が 25 以上の肥満者では血漿中 S1P 濃度が高く、500 nM 以上となっていることが明らかになった。そこで、血漿中 S1P 濃度が 500 nM 以上のグループと 500 nM 未満のグループに分けて比較を行った。S1P が 500 nM 以上のグループでは血漿中 TNF- $\alpha$  濃度が有意に高かった (図 20 A)。S1P が 500 nM 以上のグループでは血漿中 PAI-1 濃度も高かった (図 20 B)。FMD は非侵襲的な血管内皮機能測定検査で、内皮機能が低下していると NO 産生量が減少し、FMD の値が低くなる (Sugiura et

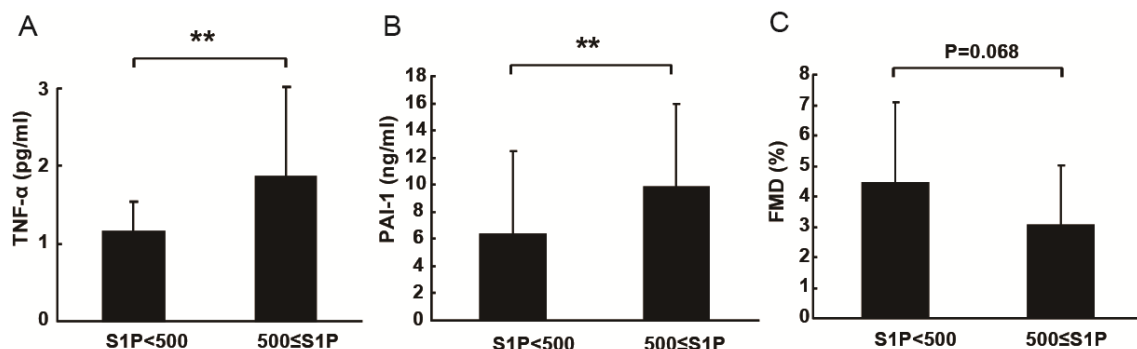


図20 血漿中S1P濃度と心血管疾患との関連を調べた。(A) S1Pレベルが高いグループ ( $\ge 500\text{ nM}$ ,  $n=8$ ) とS1Pレベルが低いグループ ( $< 500\text{ nM}$ ,  $n=36$ ) の血漿中TNF- $\alpha$ 濃度を比較した。( $p^{**}<0.01$ ) (B) S1Pレベルが高いグループ ( $\ge 500\text{ nM}$ ,  $n=39$ ) とS1Pレベルが低いグループ ( $< 500\text{ nM}$ ,  $n=70$ ) の血漿中PAI-1濃度を比較した。( $p^{**}<0.01$ ) (C) S1Pレベルが高いグループと ( $\ge 500\text{ nM}$ , 13) S1Pレベルが低いグループ ( $< 500\text{ nM}$ ,  $n=33$ ) のFMDを比較した。

al. 2013)。S1Pが500 nM以上のグループではFMDの値が低い傾向が見られた (図20 C)。

### 5-3. 小括

肥満モデルマウスの *ob/ob* マウスでは正常マウスに比べて血漿中S1P濃度が高いという報告に一致して (Samad et al. 2006)、肥満者では非肥満者に比べて血漿中S1P濃度が高いという結果が得られた。血漿中S1P濃度はBMIと強い相関が見られた。血漿中S1Pは患者のウエスト径とも有意な相関があり、肥満度と強い相関があることを支持している (data not shown)。血漿中のS1Pは主に赤血球由来であるため (Fyrst et al. 2010)、血漿中S1P濃度とヘモグロビンあるいはヘマトクリット値の間には相関があった (data not shown)。血漿中S1P濃度と患者のBMIの間には有意な相関があったが、ヘモグロビンあるいはヘマトクリット値を介入させるとその相関

は見られなくなった (data not shown)。肥満によって S1P の増加が引き起こされたと考えられるが、どのようなメカニズムで S1P の増加が起こっているのかについて、今後さらなる詳細な解析が必要であると考えられる。以前、マウス 3T3-L1 脂肪細胞を低酸素状態におくと S1P の放出を増加させることを報告した (Ito et al. 2013)。肥満では脂肪組織は低酸素状態となっている (Yin et al. 2009, Shin et al. 2012)。肥満者では低酸素状態になった脂肪組織が S1P の産生を増加させている可能性がある。また、マウス 3T3-L1 細胞は S1P 刺激によって PAI-1 の産生を増加させる (Ito et al. 2013)。患者の血漿中 S1P 濃度と血漿中 PAI-1 濃度について相関分析を行った結果、S1P と PAI-1 の間にも有意な相関が見られた。S1P と BMI の間の相関とは異なり、S1P と PAI-1 の相関はヘモグロビンあるいはヘマトクリット値を介させても有意な相関が消えることはなかった。この結果より、S1P と PAI-1 の相関は独立した関係であると考えられる。血漿中 PAI-1 濃度が高いと心血管イベントの発生リスクが高くなる (Vykoukal et al. 2011)。S1P レベルの上昇に伴って血漿中 PAI-1 濃度が増加することで、PAI-1 の t-PA および u-PA 阻害作用により血栓症や冠動脈疾患の発生を招く可能性がある。

血漿中 S1P 濃度と BMI の間に有意な相関があることが示された。BMI が 25 以上の肥満者のグループでは平均血漿中 S1P 濃度が高く、その濃度は 500 nM より高い値となった。血漿中 S1P 濃度が 500 nM 以上のグループでは、血漿中 TNF- $\alpha$  濃度が有意に高かった。この結果より、S1P が高濃度の環境下では NKT 細胞は TNF- $\alpha$  の産生を増加させる可能性がある。血漿中 S1P 濃度が 500 nM 以上のグループでは、血漿中 PAI-1 濃度も有意に高かった。これは S1P 刺激によってヒト肝癌細胞 HepG2 (Asakura et al. 2011) とマウス 3T3-L1 脂肪細胞 (Ito et al. 2013) で PAI-1 の産生が増加するという以前の研究結果と一致する。血管内皮機能の指標となる FMD を測定すると、血漿中 S1P 濃度が 500 nM 以上のグループでは FMD の値が低い傾向が見られた。血漿中 TNF- $\alpha$  濃度が増加したために、血管内皮機能が障害されている可能性がある。これらの解析結果は、血漿中の S1P は冠動脈疾患の予測マーカーになり得ることを示した以前の報告と一致する (Deutschman et al. 2003)。



しかし、S1Pは心筋梗塞を減少させるという報告と反しているため (Knapp et al. 2009)、さらなる詳細な解析を行う必要がある。

## 第6章 総括

本研究により、S1PがNKT細胞のTNF- $\alpha$ 産生を増加させること、S1PはNKT細胞ハイブリドーマの遊走を増加させること、肥満者では血漿中S1P濃度が高いことが明らかになった(図21)。

S1PによるTNF- $\alpha$ の発現量増加には、S1P<sub>2</sub>、Gq、PKCが関与していることが示唆される。NKT細胞はメタボリックシンドロームにおける炎症反応に重要な役割を果たしていると考えられる。TNF- $\alpha$ 発現量増加に関与しているNKT細胞上のS1P<sub>2</sub>はメタボリックシンドロームをコントロールするための有用な治療ターゲットになり得る。

S1PはNKT細胞ハイブリドーマのTNF- $\alpha$ 産生だけでなく、遊走も制御していることがわかった。NKT細胞は胸腺で分化し、脾臓や肝臓などの二次リンパ組織や末梢組織へ移行する。NKT細胞のサイトカイン産生制御機構とともに、NKT細胞の遊走制御機構も病態の解析には重要である。本研究の結果より、S1PがNKT細胞の移出を制御している可能性が示された。患者の血漿中S1P濃度の解析結果より、血漿中S1P濃度と肥満の間に有意な相関が存在することがわかった。肥満によって線溶系阻害因子PAI-1が増加することは以前から示されており、肥満者で増加したS1PがPAI-1産生に寄与していることが考えられる。

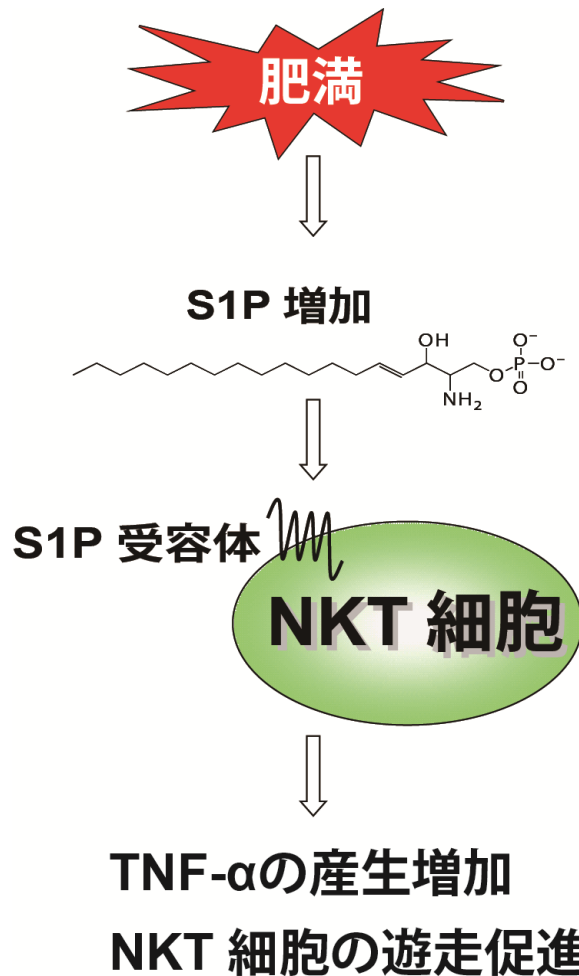


図21 肥満によって増加したS1PがNKT細胞のTNF- $\alpha$ 産生と遊走を誘導する

本研究はNKT細胞、S1P、肥満を総合的に解析した初の研究である。肥満によって増加したS1PがNKT細胞の炎症性サイトカイン産生や遊走を増大させ、心血管イベント発生のリスクを高めている可能性がある。NKT細胞は疾患を進展させることも多いが、例えば自己免疫疾患ではNKT細胞の炎症抑制的な作用が弱まっていることが知られている (Miyake 2008)。よって、NKT細胞の免疫反応全てを抑制することは治療上有益ではないと思われる。そこで、S1Pのように肥満時に増加するNKT細胞を制御する物質をターゲットとすることで、副作用の少ない治療法の開発を期待できる。そのために、S1PがNKT細胞の免疫反応を制御する分子機構および、肥満によってS1Pが増加するメカニズムについてさらに詳細な解析を続けていくことが望まれる。

## 参考文献

- Allende ML, Zhou D, Kalkofen DN, Benhamed S, Tuymetova G, Borowski C, Bendelac A, Proia RL. 2008. S1P1 receptor expression regulates emergence of NKT cells in peripheral tissues. *FASEB J* **22**: 307-315.
- Andoh Y, Fujii S, Iwabuchi K, Yokota T, Inoue N, Nakai Y, Mishima T, Yamashita T, Nakagawa T, Kitabatake A, Onoe K, Tsutsui H. 2006. Lower prevalence of circulating natural killer T cells in patients with angina: a potential novel marker for coronary artery disease. *Coron Artery Dis* **17**: 523-528.
- Asakura T, Iwaki S, Okada H, Sobel BE, Fujii S. 2011. Posttranscriptional regulation of expression of plasminogen activator inhibitor type-1 by cAMP in HepG2 liver cells. *J Biochem* **150**: 687-694.
- Benaud C, Oberst M, Hobson JP, Spiegel S, Dickson RB, Lin CY. 2002. Sphingosine 1-phosphate, present in serum-derived lipoproteins, activates matriptase. *J Biol Chem* **277**: 10539-10546.
- Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* **15**: 535-562.
- Bendelac A, Savage PB, Teyton L. 2007. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* **25**: 297-336.
- Berdyshev EV, Gorshkova IA, Garcia JG, Natarajan V, Hubbard WC. 2005. Quantitative analysis of sphingoid base-1-phosphates as bisacetylated derivatives by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* **339**: 129-136.

- Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. 2011. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol* **11**: 131-142.
- Billich A, Bornancin F, Dévay P, Mechtcheriakova D, Urtz N, Baumruker T. 2003. Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases. *J Biol Chem* **278**: 47408-47415.
- Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. 2013. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol* **13**: 101-117.
- Brinkmann, V, Billich A, Baumruker T, Heining P, Schmouder R, Francis G, Aradhye S, Burtin P. 2010. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* **9**: 883-897.
- Brinkmann V, Pinschewer D, Chiba K, Feng L. 2000. FTY720: a novel transplantation drug that modulates lymphocyte traffic rather than activation. *Trends Pharmacol Sci* **21**: 49-52.
- Chiba K. 2009. [New therapeutic approach for autoimmune diseases by the sphingosine 1-phosphate receptor modulator, fingolimod (FTY720)]. *Yakugaku Zasshi* **129**: 655-665.
- Choi JW, Gardell SE, Herr DR, Rivera R, Lee CW, Noguchi K, Teo ST, Yung YC, Lu M, Kennedy G, Chun J. 2011. FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 751-756.
- Cox CL, Stanhope KL, Schwarz JM, Graham JL, Hatcher B, Griffen SC, Bremer AA, Berglund L, McGahan JP, Keim NL, Havel PJ. 2011. Circulating

concentrations of monocyte chemoattractant protein-1, plasminogen activator inhibitor-1, and soluble leukocyte adhesion molecule-1 in overweight/obese men and women consuming fructose- or glucose-sweetened beverages for 10 weeks. *J Clin Endocrinol Metab* **96**: E2034-2038.

Cuvillier O, Ader I. 2011. Hypoxia-inducible factors and sphingosine 1-phosphate signaling. *Anticancer Agents Med Chem* **11**: 854-862.

Deutschman DH, Carstens JS, Klepper RL, Smith WS, Page MT, Young TR, Gleason LA, Nakajima N, Sabbadini RA. 2003. Predicting obstructive coronary artery disease with serum sphingosine-1-phosphate. *Am Heart J* **146**: 62-68.

Diegelmann J, Seiderer J, Niess JH, Haller D, Göke B, Reinecker HC, Brand S. 2010. Expression and regulation of the chemokine CXCL16 in Crohn's disease and models of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* **16**: 1871-1881.

Fujisaka S, Usui I, Ikutani M, Aminuddin A, Takikawa A, Tsuneyama K, Mahmood A, Goda N, Nagai Y, Takatsu K, Tobe K. 2013. Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in an HIF-1 $\alpha$ -dependent and HIF-1 $\alpha$ -independent manner in obese mice. *Diabetologia*.

Fyrst H, Saba JD. 2010. An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat Chem Biol* **6**: 489-497.

Goto D, Fujii S, Kaneko T, Furumoto T, Sugawara T, Tarikuz Zaman AK, Imagawa Dong SJ, Nakai Y, Mishima T, Sobel BE, Kitabatake A. 2003. Intracellular signal transduction modulating expression of plasminogen activator inhibitor-1 in adipocytes. *Biochem Pharmacol* **65**: 1907-1914.

- Hisano Y, Nishi T, Kawahara A. 2012. The functional roles of S1P in immunity. *J Biochem* **152**: 305-311.
- Hornung M, Werner JM, Farkas S, Schlitt HJ, Geissler EK. 2011. Migration and chemokine receptor pattern of colitis-preventing DX5+NKT cells. *Int J Colorectal Dis* **26**: 1423-1433.
- Hwang SJ, Kim JH, Kim HY, Kim S, Chung DH. 2010. FTY720, a sphingosine 1-phosphate receptor modulator, inhibits CD1d-restricted NKT cells by suppressing cytokine production but not migration. *Lab Invest* **90**: 9-19.
- Ishii I, Friedman B, Ye X, Kawamura S, McGiffert C, Contos JJ, Kingsbury MA, Zhang G, Brown JH, Chun J. 2001. Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3. *J Biol Chem* **276**: 33697-33704.
- Ito S, Iwaki S, Koike K, Yuda Y, Nagasaki A, Ohkawa R, Yatomi Y, Furumoto T, Tsutsui H, Sobel BE, Fujii S. 2013. Increased plasma sphingosine-1-phosphate in obese individuals and its capacity to increase the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in adipocytes. *Coron Artery Dis* **24**: 642-650.
- Iwabuchi K. 2011. Development and function of natural killer T (NKT) cells. *Kitasato Igaku* **41**: 99-109
- Iwaki S, Yamamura S, Asai M, Sobel BE, Fujii S. 2012. Posttranscriptional regulation of expression of plasminogen activator inhibitor type-1 by sphingosine 1-phosphate in HepG2 liver cells. *Biochim Biophys Acta* **1819**: 1132-1141.

- Ji Y, Sun S, Xu A, Bhargava P, Yang L, Lam KS, Gao B, Lee CH, Kersten S, Qi L. 2012. Activation of natural killer T cells promotes M2 Macrophage polarization in adipose tissue and improves systemic glucose tolerance via interleukin-4 (IL-4)/STAT6 protein signaling axis in obesity. *J Biol Chem* **287**: 13561-13571.
- Jiang X, Shimaoka T, Kojo S, Harada M, Watarai H, Wakao H, Ohkohchi N, Yonehara S, Taniguchi M, Seino K. 2005. Cutting edge: critical role of CXCL16/CXCR6 in NKT cell trafficking in allograft tolerance. *J Immunol* **175**: 2051-2055.
- Johnston B, Kim CH, Soler D, Emoto M, Butcher EC. 2003. Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR alpha beta NKT cell subsets. *J Immunol* **171**: 2960-2969.
- Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R. 2003. Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**: 1111-1117.
- Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H, Taniguchi M. 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* **278**: 1626-1629.
- Kharel Y, Lee S, Snyder AH, Sheasley-O'Neill SL, Morris MA, Setiady Y, Zhu R, Zigler MA, Burcin TL, Ley K, Tung KS, Engelhard VH, Macdonald TL, Pearson-White S, Lynch KR. 2005. Sphingosine kinase 2 is required for modulation of lymphocyte traffic by FTY720. *J Biol Chem* **280**: 36865-36872.
- Knapp M, Baranowski M, Czarnowski D, Lisowska A, Zabielski P, Górski J, Musiał W. 2009. Plasma sphingosine-1-phosphate concentration is



reduced in patients with myocardial infarction. *Med Sci Monit* **15**: CR490-493.

Kobayashi N, Yamaguchi A, Nishi T. 2009. Characterization of the ATP-dependent sphingosine 1-phosphate transporter in rat erythrocytes. *J Biol Chem* **284**: 21192-21200.

Kotas ME, Lee HY, Gillum MP, Annicelli C, Guigni BA, Shulman GI, Medzhitov R. 2011. Impact of CD1d deficiency on metabolism. *PLoS One* **6**: e25478.

Kyriakakis E, Cavallari M, Andert J, Philippova M, Koella C, Bochkov V, Erne P, Wilson SB, Mori L, Biedermann BC, Resink TJ, Libero G De. 2010. Invariant natural killer T cells: linking inflammation and neovascularization in human atherosclerosis. *Eur J Immunol* **40**: 3268-3279.

Lantz O, Bendelac A. 1994. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med* **180**: 1097-1106.

Leong WI, Saba JD. 2010. S1P metabolism in cancer and other pathological conditions. *Biochimie* **92**: 716-723.

Lo CG, Xu Y, Proia RL, Cyster JG. 2005. Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J Exp Med* **201**: 291-301.

Lucore CL, Sobel BE. 1988. Interactions of tissue-type plasminogen activator with plasma inhibitors and their pharmacologic implications. *Circulation* **77**: 660-669.

- Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S. 2012. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol* **22**: 50-60.
- Mantell BS, Stefanovic-Racic M, Yang X, Dedousis N, Sipula IJ, O'Doherty RM. 2011. Mice lacking NKT cells but with a complete complement of CD8+ T-cells are not protected against the metabolic abnormalities of diet-induced obesity. *PLoS One* **6**: e19831.
- Matsuda JL, Mallewaey T, Scott-Browne J, Gapin L. 2008. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr Opin Immunol* **20**: 358-368.
- Matsuyuki H, Maeda Y, Yano K, Sugahara K, Chiba K, Kohno T, Igarashi Y. 2006. Involvement of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor type 1 and type 4 in migratory response of mouse T cells toward S1P. *Cell Mol Immunol* **3**: 429-437.
- Miyake S. 2009. [Immunoregulation by iNKT cells]. *Yakugaku Zasshi* **129**: 649-653.
- Miyake S, Yamamura T. 2005. Therapeutic potential of glycolipid ligands for natural killer (NK) T cells in the suppression of autoimmune diseases. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **5**: 315-322.
- Nagai N, Van Hoef B, Lijnen HR. 2007. Plasminogen activator inhibitor-1 contributes to the deleterious effect of obesity on the outcome of thrombotic ischemic stroke in mice. *J Thromb Haemost* **5**: 1726-1731.
- Nakai Y, Iwabuchi K, Fujii S, Ishimori N, Dashtsoodol N, Watano K, T. Mishima, C. Iwabuchi, S. Tanaka, J. S. Bezbradica, T. Nakayama, M. Taniguchi, S. Miyake, T. Yamamura, A. Kitabatake, S. Joyce, L. Van

- Kaer, and K. Onoé. 2004. Natural killer T cells accelerate atherogenesis in mice. *Blood* **104**: 2051-2059.
- Nyambayar D, Iwabuchi K, Hedlund E, Murakawa S, Shirai K, Iwabuchi C, Kon Y, Miyazaki Y, Yanagawa Y, Onoé K. 2007. Characterization of NKT-cell hybridomas expressing invariant T-cell antigen receptors. *J Clin Exp Hematop* **47**: 1-8.
- Obinata H, Hla T. 2012. Sphingosine 1-phosphate in coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol* **34**: 73-91.
- Odegaard JI, Chawla A. 2012. Connecting type 1 and type 2 diabetes through innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a007724.
- Ohkawa R, Nakamura K, Okubo S, Hosogaya S, Ozaki Y, Tozuka M, Osima N, Yokota H, Ikeda H, Yatomi Y. 2008. Plasma sphingosine-1-phosphate measurement in healthy subjects: close correlation with red blood cell parameters. *Ann Clin Biochem* **45**: 356-363.
- Ohmura K, Ishimori N, Ohmura Y, Tokuhara S, Nozawa A, Horii S, Andoh Y, Fujii S, Iwabuchi K, Onoé K, Tsutsui H. 2010. Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**: 193-199.
- Olivera A, Kohama T, Tu Z, Milstien S, Spiegel S. 1998. Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. *J Biol Chem* **273**: 12576-12583.
- Park SH, Roark JH, Bendelac A. 1998. Tissue-specific recognition of mouse CD1 molecules. *J Immunol* **160**: 3128-3134.
- Potì F, Gualtieri F, Sacchi S, Weißen-Plenz G, G Varga, Brodde M, Weber C, Simoni M, Nofer JR. 2013. KRP-203, sphingosine 1-phosphate receptor

- type 1 agonist, ameliorates atherosclerosis in LDL-R<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**: 1505-1512.
- Rosen H, Stevens RC, Hanson M, Roberts E, Oldstone MB. 2013. Sphingosine-1-phosphate and its receptors: structure, signaling, and influence. *Annu Rev Biochem* **82**: 637-662.
- Samad F, Hester KD, Yang G, Hannun YA, Bielawski J. 2006. Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity: a potential mechanism for cardiovascular and metabolic risk. *Diabetes* **55**: 2579-2587.
- Sanchez T, Hla T. 2004. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem* **92**: 913-922.
- Satoh M, Andoh Y, Clingan CS, Ogura H, Fujii S, Eshima K, Nakayama T, Taniguchi M, Hirata N, Ishimori N, Tsutsui H, Onoé K, Iwabuchi K. 2012. Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. *PLoS One* **7**: e30568.
- Sattler KJ, Elbasan S, Keul P, Elter-Schulz M, Bode C, Gräler MH, Bröcker-Preuss M, Budde T, Erbel R, Heusch G, Levkau B. 2010. Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease. *Basic Res Cardiol* **105**: 821-832.
- Shin MK, Drager LF, Yao Q, Bevans-Fonti S, Yoo DY, Jun JC, Aja S, Bhanot S, Polotsky VY. 2012. Metabolic consequences of high-fat diet are attenuated by suppression of HIF-1 $\alpha$ . *PLoS One* **7**: e46562.
- Spiegel S, English D, Milstien S. 2002. Sphingosine 1-phosphate signaling: providing cells with a sense of direction. *Trends Cell Biol* **12**: 236-242.

- Spiegel S, Merrill AH. 1996. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J* **10**: 1388-1397.
- Spiegel S, Milstien S. 2002. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J Biol Chem* **277**: 25851-25854.
- Stetson DB, Mohrs M, Reinhardt RL, Baron JL, Wang ZE, Gapin L, Kronenberg M, Locksley RM. 2003. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J Exp Med* **198**: 1069-1076.
- Subramanian,S, Turner MS, Ding Y, Goodspeed L, Wang S, Buckner JH, O'Brien K, Getz GS, Reardon CA, Chait A. 2013. Increased levels of invariant natural killer T lymphocytes worsen metabolic abnormalities and atherosclerosis in obese mice. *J Lipid Res* **54**: 2831-2841.
- Suganami T, Ogawa Y. 2010. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol* **88**: 33-39.
- Sugimoto N, Takuwa N, Okamoto H, Sakurada S, Takuwa Y. 2003. Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the G12/13-Rho and Gi pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform. *Mol Cell Biol* **23**: 1534-1545.
- Sugiura T, Dohi Y, Yamashita S, Ohte N, Ito S, Iwaki S, Hirowatari Y, Ohkawa R, Mishima Y, Yatomi Y, Kimura G, Fujii S. 2012. Analytical evaluation of plasma serotonin and sphingosine 1-phosphate and their clinical assessment in early atherosclerosis. *Coron Artery Dis* **23**: 234-238.
- Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. 2011. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* **121**: 2094-2101.

- Sun X, Zhang M, Sanagawa A, Mori C, Ito S, Iwaki S, Satoh H, Fujii S. 2012. Circulating microRNA-126 in patients with coronary artery disease: correlation with LDL cholesterol. *Thromb J* **10**: 16.
- Takashima S, Sugimoto N, Takuwa N, Okamoto Y, Yoshioka K, Takamura M, Takata S, Kaneko S, Takuwa Y. 2008. G12/13 and Gq mediate SIP2-induced inhibition of Rac and migration in vascular smooth muscle in a manner dependent on Rho but not Rho kinase. *Cardiovasc Res* **79**: 689-697.
- Takuwa Y, Okamoto Y, Yoshioka K, Takuwa N. 2008. Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system. *Biochim Biophys Acta* **1781**: 483-488.
- Takuwa Y, Okamoto Y, Yoshioka K, Takuwa N. 2012. Sphingosine-1-phosphate signaling in physiology and diseases. *Biofactors* **38**: 329-337.
- Takuwa Y, Takuwa N, Sugimoto N. 2002. The Edg family G protein-coupled receptors for lysophospholipids: their signaling properties and biological activities. *J Biochem* **131**: 767-771.
- Townsend MJ, Weinmann AS, Matsuda JL, Salomon R, Farnham PJ, Biron CA, Gapin L, Glimcher LH. 2004. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity* **20**: 477-494.
- VanderLaan PA, Reardon CA, Sagiv Y, Blachowicz L, Lukens J, Nissenbaum M, Wang CR, Getz GS. 2007. Characterization of the natural killer T-cell response in an adoptive transfer model of atherosclerosis. *Am J Pathol* **170**: 1100-1107.
- Vykoukal D, Davies MG. 2011. Vascular biology of metabolic syndrome. *J Vasc Surg* **54**: 819-831.

- Wang F, Okamoto Y, Inoki I, Yoshioka K, Du W, Qi X, Takuwa N, Gonda K, Yamamoto Y, Ohkawa R, Nishiuchi T, Sugimoto N, Yatomi Y, Mitsumori K, Asano M, Kinoshita M, Takuwa Y. 2010. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 deficiency leads to inhibition of macrophage proinflammatory activities and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* **120**: 3979-3995.
- Wei SH, Rosen H, Matheu MP, Sanna MG, Wang SK, Jo E, Wong CH, Parker I, Cahalan MD. 2005. Sphingosine 1-phosphate type 1 receptor agonism inhibits transendothelial migration of medullary T cells to lymphatic sinuses. *Nat Immunol* **6**: 1228-1235.
- Wiman B. 1995. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in plasma: its role in thrombotic disease. *Thromb Haemost* **74**: 71-76.
- Xia P, Wang L, Gamble JR, Vadas MA. 1999. Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor-alpha inhibits apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem* **274**: 34499-34505.
- Xu CB, Hansen-Schwartz J, Edvinsson L. 2004. Sphingosine signaling and atherogenesis. *Acta Pharmacol Sin* **25**: 849-854.
- Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. 2007. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**: E1118-1128.
- Yin J, Gao Z, He Q, Zhou D, Guo Z, Ye J. 2009. Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**: E333-342.

Yin J, Miyazaki K, Shaner RL, Merrill AH, Kannagi R. 2010. Altered sphingolipid metabolism induced by tumor hypoxia - new vistas in glycolipid tumor markers. *FEBS Lett* **584**: 1872-1878.



## 謝辞

本研究を行うにあたり、6年間に渡り充実した研究環境を整えていただき、御指導、御鞭撻を賜りました名古屋市立大学薬学研究科病態解析学分野 藤井聡教授に心より御礼を申し上げます。藤井聡教授のもとで研究を行っていなければ研究者の道を志すことはなかったかもしれません。研究者としての姿勢、臨床医学の知識、国際的な視野など、数えきれないほど多くのことを学ばせていただきました。

本研究を進めるにあたり、多くの御助言を賜りました病態解析学分野 岩城壮一郎講師に深く感謝いたします。実験手法や論文の執筆、学会発表についてなど、適切なアドバイスにいつも助けられていました。

本論文を作成するにあたり、大変有益な御校閲、御助言を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科 木村和哲教授、服部光治教授、林秀敏教授に心から感謝いたします。

本研究において、NKT細胞ハイブリドーマを譲渡して下さり、NKT細胞を用いた実験法について多くの御助言をいただきました北里大学医学部免疫学教室 岩淵和也教授、佐藤雅助教に厚く御礼を申し上げます。実験手法を学ぶために免疫学教室に滞在させていただいた際は大変お世話になりました。とても有意義で楽しい時間を過ごすことができました。

本研究において、血液サンプルを収集し、臨床検査値の測定をしていただきました北海道大学大学院医学研究科 筒井裕之教授、古本智夫講師、北海道大学病院循環内科の皆様にも深く御礼を申し上げます。

本研究において、血漿中 S1P の濃度を測定していただき、S1P 測定法について御助言をいただきました東京大学医学部医学系研究科 矢富裕教授、東京医科歯科大学保健衛生学研究科 大川龍之介助教に深く御礼を申し上げます。

本研究において、ヒト血漿中 S1P の濃度解析について御助言をいただきました名古屋市立大学病院循環器内科 杉浦知範助教に深く御礼を申し上げます。

修士課程の2年間に渡り NPO 法人つくし奨学・研究基金に支援をいた

だいたおかげで、博士課程に進学し研究を続けることができました。御礼を申し上げます。

病態解析学分野の皆様には大変お世話になりました。今日まで研究を頑張ることができたのも、素晴らしい仲間にも恵まれたおかげです。これからも病態解析学の卒業生としての名に恥じぬよう、日々精進を続けていきます。

最後に、研究の道に進みたいという私の意志を尊重し、あたたかく見守ってくれた両親に心から感謝します。長い学生生活を経済的・精神的に支えてくださり、本当にありがとうございました。

平成 26 年 3 月