HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	分子イメージングを用いたスフィンゴミエリンおよびスフィンゴミエリン合成酵素2の生理機能に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	杉本, 正志
Description	配架番号：2265
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12391号
Issue Date	2016-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/63291
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Masayuki_Sugimoto_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　杉本　正志

学 位 論 文 題 名

分子イメージングを用いたスフィンゴミエリンおよびスフィンゴミエリン合成酵素 2 の生理機能に関する研究

(Study of physiological functions of　sphingomyelin and sphingomyelin synthase 2 by molecular imaging)

【背景と目的】

代表的なスフィンゴ脂質（以下 SPL）であるセラミド（以下 Cer）やスフィンゴミエリン（以下 SM）は形質膜上でマイクロドメインを形成し，種々の細胞内シグナル伝達を制御する．Cer は Cer 合成酵素（以下 CerS）によってスフィンゴイド塩基に種々の鎖長のアシル基が付与されることで産生され, SM は SM 合成酵素 (以下 SMS) により Cer にホスホコリンが付与されることで産生される. SM や Cer はアシル基の鎖長により複数の分子種が存在するが, その意義は不明である．また，SPL は種々の疾患への関与が報告されている．多くの SPL 代謝酵素のノックアウト (以下 KO) マウスは胎生致死の増加など著しい表現型を示すが，SMS2 KO マウスは高脂肪食 (以下 HFD) 負荷によって惹起される脂肪肝やインスリン抵抗性が抑制されることから, SMS2 はこれらの治療標的として期待される．しかしながら，SMS2 の標的組織や分子メカニズムは十分に解明されていない．そこで本研究では，1) SM 分子種の組織内分布を可視化することで多様性の意義を考察すること，2) SMS2 の欠損による各組織における SM の量的・空間的変動を観察することで SMS2 の標的組織を探索し，これらの組織における脂質の変動と脂肪肝やインスリン抵抗性との関係を明らかにすることを目的とした.

【対象と方法】

第 1 章では, イメージング質量分析法 (以下 IMS) を用いて野生型マウスの脳における SM 分子種の組織内分布を可視化し，SM のアシル基鎖長と高次機能との関係を調査した．また，SM 分子種の分布と in situ ハイブリダイゼーションにより可視化した CerS 遺伝子の発現分布との比較や，HepG2 細胞において siRNA により CerS 遺伝子をノックダウンした際の各 SM 分子種の変動を液体クロマトグラフィー/質量分析法 (以下 LC/MS) を用いて検証することで，SM 分子種の分布を制御するメカニズムを検討した．第 2 章では，通常食 (以下 ND) あるいは HFD を与えた野生型および SMS2 KO マウスの代謝状態を体重増加，血漿生化学値，経口糖負荷試験およびインスリン負荷試験により評価した．また，各組織における SMS1 および 2 遺伝子の発現比をリアルタイム PCR 法によって検証し，SMS2 が優位に発現する組織を探索した．次に，SMS2 が高発現することを確認した組織について，SMS2 の欠損による SM の量的・空間的変動を IMS および LC/MS を用いて検証した．これらの検証により SMS2 の標的組織であることが示唆された肝臓と腎臓の表現型として，腎臓では微量アルブミン尿への影響，肝臓では病理学的解析，脂質解析および遺

伝子解析により脂肪肝への影響をそれぞれ検証した．また，肝細胞特異的に SMS2 を欠損させたマウスを作製し，肝臓の脂質解析や経口糖負荷試験およびインスリン負荷試験を行い，肝細胞の SMS2 が脂肪肝やインスリン抵抗性に及ぼす影響を検証した．さらに，肝臓以外の組織がインスリン抵抗性に及ぼす影響を検証するため，^{18}F-フルオロデオキシグルコース (以下 ^{18}F-FDG) を用いて臓器ごとの糖代謝を検証した．SMS2 の欠損により糖代謝の亢進が見られた骨格筋における脂質代謝への影響を LC/MS で測定した．

【結果】

実験 1 では，IMS を用いて脳切片上において SM 分子種の検出と同定に成功し，C18 アシル基を持つ SM (以下 C18-SM) は細胞体が豊富な灰白質に, C24 アシル基を持つ SM (以下 C24-SM) は髄鞘が豊富な白質にそれぞれ特徴的な分布を示すことを見出した．また，C18 アシル CoA を基質とする CerS1 と C18-SM が，C24 アシル CoA を基質とする CerS2 と C24-SM がそれぞれ類似した分布を示し, HepG2 細胞で CerS2 を抑制すると C18-SM は変化せず C24-SM のみ有意に減少した．

実験 2 では，SMS2 KO マウスは野生型マウスに比べ HFD 誘導性の肥満，耐糖能異常およびインスリン抵抗性が改善した．また，SMS2 と SMS1 の発現比が肝臓や腎臓で高く，脳や脂肪組織で低いことを確認した．野生型および SMS2 KO マウスの肝臓および腎臓では，SMS2 の欠損により C22-および C24-SM が減少し，肝臓および血漿において C22-Cer が有意に増加した．SMS2 の欠損によって腎機能には変化が無かったが，肝臓における脂肪蓄積や脂肪酸合成遺伝子の発現が有意に減少した．また，SMS2 の欠損により肝臓においてインスリン依存的な Akt のリン酸化が亢進した．しかしながら，肝細胞特異的な SMS2 KO マウスは脂肪肝やインスリン抵抗性の改善が認められず，肝臓において SM の減少が見られたが C22-Cer の増加は見られなかった．次に，野生型および SMS2 KO マウスに ^{18}F-FDG を投与して各組織への取り込みを評価したところ，SMS2 の欠損によって種々の骨格筋における ^{18}F-FDG の取り込みが有意に増加したが，種々の骨格筋において SM や Cer の有意な変動は認められなかった．

【考察】

実験 1 では，IMS が脂質の可視化に有用な手法であることを証明したとともに，SM 分子種の分布が CerS 遺伝子によって酵素レベルで厳密に制御されている可能性を見出した. また, C18-SM は細胞体の，C24-SM が髄鞘の機能や構造維持に重要な役割を果たしているものと考えられた．

実験 2 では，SMS2 の欠損によって脂肪肝やインスリン抵抗性が改善したが，肝細胞特異的に SMS2 を欠損させてもこれらの作用が見られず，後者は前者で見られた肝臓における C22-Cer の増加が見られなかった. C22-Cer は肝細胞の脂肪蓄積を抑制することやインスリンシグナルを正に制御することが報告されていることから，SMS2 KO マウスの表現型に C22-Cer が寄与している可能性が示唆され，肝細胞以外の細胞や組織による制御を受けている可能性が示唆された．また，SMS2 の欠損によるインスリン抵抗性の改善には，骨格筋における糖の取り込み増加が寄与している可能性を提示した．しかしながら，骨格筋において SMS2 の欠損による SM の減少が見られなかったことから，血漿の C22 -Cer 等を介した SM 非依存的なメカニズムに基づいた作用であると考えられた．

【結論】

SM はアシル基の鎖長によって生理機能が異なり，その分布は CerS によって制御されている．一方，SMS2 の欠損による脂肪肝やインスリン抵抗性の改善作用は，極長鎖 Cer など SM 非依存的なメカニズムによるパラクラインな作用に基づいている可能性がある．