



Title	分子イメージングを用いたスフィンゴリエリンおよびスフィンゴリエリン合成酵素2の生理機能に関する研究
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12391
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65208
Type	doctoral thesis
File Information	Masayuki_Sugimoto.pdf



学 位 論 文

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)

2016 年 9 月
北海道大学
杉本 正志

学 位 論 文

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)

2016 年 9 月
北海道大学
杉本 正志

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
緒言	3
略語表	8
第 1 章	12
緒言	13
実験方法	16
結果	23
考察	43
結論	47
第 2 章	48
緒言	49
実験方法	51
結果	60
考察	94
結論	104
総括	105
謝辞	107
引用文献	108

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の学術雑誌に発表した。

1. **Masayuki Sugimoto**, Yoichi Shimizu, Takeshi Yoshioka, Masato Wakabayashi, Yukari Tanaka, Kenichi Higashino, Yoshito Numata, Shota Sakai, Akio Kihara, Yasuyuki Igarashi, Yuji Kuge. Histological analyses by matrix-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry reveal differential localization of sphingomyelin molecular species regulated by particular ceramide synthase in mouse brains. *Biochim. Biophys. Acta*. **1851**, 1554-1565 (2015).
2. **Masayuki Sugimoto**, Masato Wakabayashi, Yoichi Shimizu, Takeshi Yoshioka, Kenichi Higashino, Yoshito Numata, Tomohiko Okuda, Songji Zhao, Shota Sakai, Yasuyuki Igarashi, Yuji Kuge. Imaging Mass Spectrometry Reveals Acyl-Chain- and Region-Specific Sphingolipid Metabolism in the Kidneys of Sphingomyelin Synthase 2-Deficient Mice. *PLoS ONE* **11**, e0152191 (2016).
3. **Masayuki Sugimoto**, Yoichi Shimizu, Songji Zhao, Naoyuki Ukon, Ken-ichi Nishijima, Masato Wakabayashi, Takeshi Yoshioka, Kenichi Higashino, Yoshito Numata, Tomohiko Okuda, Nagara Tamaki, Hisatoshi Hanamatsu, Yasuyuki Igarashi, Yuji Kuge. Characterization of the role of sphingomyelin synthase 2 in glucose metabolism in whole-body and peripheral tissues in mice. *Biochim. Biophys. Acta*. **1861**, 688-702 (2016).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. **杉本 正志**, 志水 陽一, 若林 雅人, 吉岡 健, 東野 賢一, 沼田 義人, 酒井 祥太, 木原 章雄, 五十嵐 靖之, 久下 裕司. 超高質量分解能イメージング質量分析装置によるスフィンゴミエリン分子種の組織内分布可視化に関する検討. 日本分子イメージング学会第10回総会・学術集会, 2015年5月20日-21日, 東京都.
2. **Masayuki Sugimoto**, Yoichi Shimizu, Takeshi Yoshioka, Masato Wakabayashi, Yukari Tanaka, Kenichi Higashino, Yoshito Numata, Shota Sakai, Akio Kihara, Yuji Kuge, Yasuyuki Igarashi. Molecular imaging of tissue distribution of sphingomyelin species produced by particular ceramide synthase and

sphingomyelin synthase. *Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and related Diseases 14th International Conference*, July 12-15, 2015, Budapest, Hungary.

3. **Masayuki Sugimoto**, Yoichi Shimizu, Songji Zhao, Naoyuki Ukon, Ken-ichi Nishijima, Masato Wakabayashi, Takeshi Yoshioka, Kenichi Higashino, Yoshito Numata, Nagara Tamaki, Yasuyuki Igarashi, Yuji Kuge. Sphingomyelin synthase 2 deficiency enhances glucose clearance and tissue uptake in mice. *Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and related Diseases 14th International Conference*, July 12-15, 2015, Budapest, Hungary.
4. **Masayuki Sugimoto**, Yoichi Shimizu, Takeshi Yoshioka, Masato Wakabayashi, Yukari Tanaka, Kenichi Higashino, Yoshito Numata, Shota Sakai, Akio Kihara, Yasuyuki Igarashi, Yuji Kuge. A novel ultrahigh resolution imaging mass spectrometry visualizes distribution of sphingomyelin molecular species in the mouse tissue section. *2016 World Molecular Imaging Congress*, September 2-5, 2015, Honolulu, Hawaii.
5. **杉本 正志**, 志水 陽一, 趙 松吉, 右近 直之, 西嶋 剣一, 吉岡 健, 東野 賢一, 沼田 義人, 玉木 長良, 五十嵐 靖之, 久下 裕司. ^{18}F -FDG を用いたスフィンゴミエリン合成酵素 2 欠損マウスの糖代謝に関する検討. 第55回日本核医学会総会・学術集会, 2015年11月5日-7日, 東京都.
6. **杉本 正志**, 志水 陽一, 若林 雅人, 吉岡 健, 東野 賢一, 沼田 義人, 酒井 祥太, 木原 章雄, 五十嵐 靖之, 久下 裕司, 分子イメージングを用いたスフィンゴミエリン分子種の組織内分布と制御機構の解明. 第8回セラミド研究会学術集会, 2015年10月29日-30日, 札幌市.
7. **杉本 正志**, 志水 陽一, 若林 雅人, 吉岡 健, 東野 賢一, 沼田 義人, 酒井 祥太, 趙 松吉, 五十嵐 靖之, 久下 裕司. イメージング質量分析法を用いたスフィンゴミエリン合成酵素 2 欠損マウスの腎臓におけるスフィンゴミエリン代謝の解析. 日本分子イメージング学会第11回総会・学術集会, 2016年5月28日-29日, 神戸市.

緒言

スフィンゴ脂質 (SPL) はスフィンゴイド塩基に種々の鎖長のアシル基がアミド結合したセラミド (Cer) を母体骨格とした脂質の総称であり、スフィンゴイド塩基の 1 位水酸基に種々の極性基が付与することで両親媒性の性質を持つ。SPL 生合成系の最終産物であるスフィンゴミエリン (SM) は、極性基としてホスホコリンが付与されている¹。

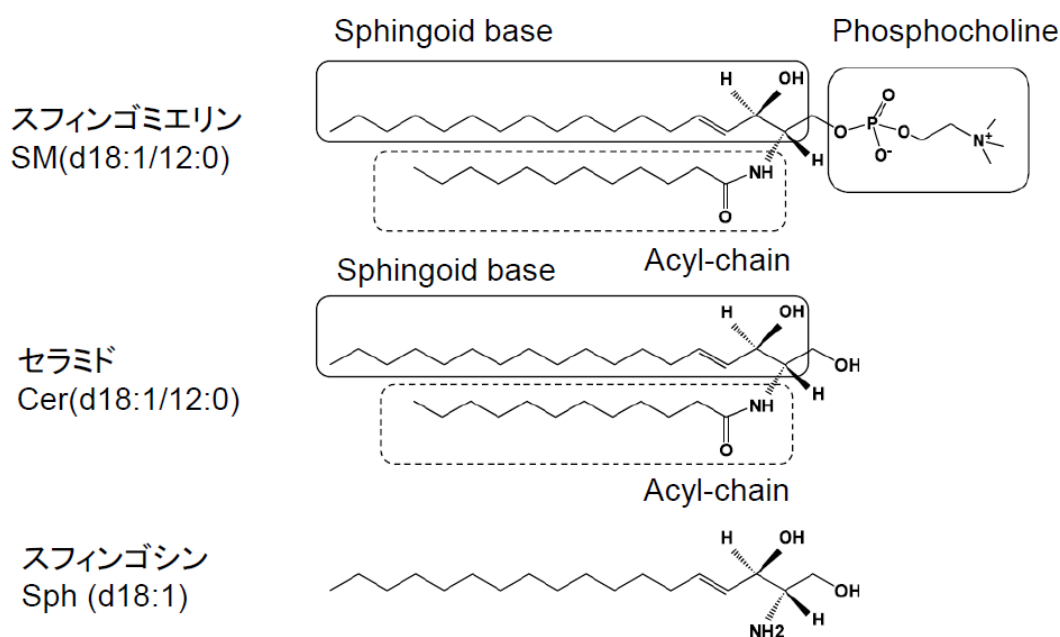


図 1. SPL の構造.

スフィンゴイド塩基に種々の鎖長のアシル CoA がアミド結合した Cer を母体骨格とし、SM では極性基としてホスホコリンが付与されている。Sph (スフィンゴシン) が主要なスフィンゴイド塩基となる。図は文献 1 を改変し引用。

SPL の生理機能は多岐に渡っており、生体膜の主要な構成成分である他、形質膜上でマイクロドメインを形成し²⁻⁵、種々の細胞内シグナル伝達を制御していることが明らかとなっている⁶⁻⁸。SPL の合成系は L-セリンとパルミトイル CoA の縮合反応から始まり、Cer の合成までは小胞体で行われる。セリンパルミトイル転移酵素によって L-セリンとパルミトイル CoA から 3-ケトスフィンガニンが生成され、3-ケトスフィンガニン還元酵素の作用によりスフィンガニンが産生される。スフィンガニンはセラミド合成酵素 (CerS) によって種々の鎖長の

アシル基が付与されることでジヒドロセラミド (DhCer) に変換され、ジヒドロセラミド脱水素酵素によって Cer が産生される⁹⁻¹²。Cer は極性基として種々の糖が付与されることでスフィンゴ糖脂質 (GSL) に変換される。小胞体でガラクトースの付与を受けてガラクトシルセラミド (GalCer) に変換される他、輸送小胞によりシスゴルジ装置に輸送され、UDP-グルコースセラミドグルコシル転移酵素 (Ugcg) の作用によりグルコシルセラミド (GlcCer) に変換される。GlcCer はトランスゴルジ装置に輸送される過程でラクトシルセラミド (LacCer) を経てガングリオシドへと変換されていく^{9,13-15}。一方、一部の Cer はセラミド輸送タンパク質によって直接トランスゴルジ装置に輸送される^{16,17}。これらの Cer はスフィンゴミエリン合成酵素 (SMS) によってホスホコリンが付与され、SM となる¹⁸⁻²⁰。SMS にはトランスゴルジ装置で SM を産生する SMS1 と、トランスゴルジ装置および形質膜で SM を産生する SMS2 がクローニングされている¹⁸⁻²⁰。

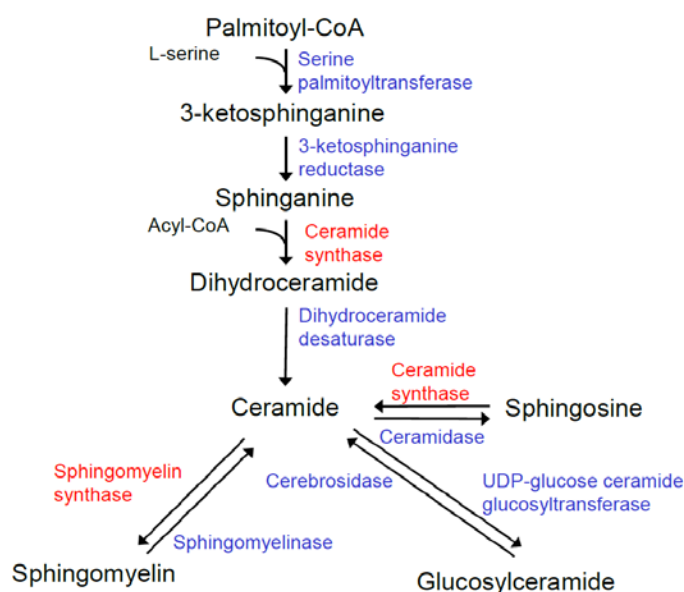


図 2. SPL の生合成経路.

SPL の合成系は L-セリンとパルミトイル CoA の縮合反応から始まる。3-ケトスフィンガニン、スフィンガニンを経て CerS によって種々の鎖長のアシル基が付与されることで DhCer に変換され、ジヒドロセラミド脱水素酵素によって Cer が産生される。Cer は UDP-グルコースセラミドグルコシル転移酵素の作用により GlcCer に変換される他、SMS によってホスホコリンが付与され、SM となる。図は文献 12 を基に作成。

SM は母体骨格である Cer の分子内アシル基の鎖長に基づき、多様な分子種が存在する。その分子組成は細胞や臓器によって大きく異なる²¹。例えば、神経細胞は主に C18-SPL を合成するが²²、オリゴデンドロサイトやシュワン細胞は主に C24-SPL を合成する^{23, 24}。SPL はアシル基の鎖長によって細胞内局在も異なることが知られており、極長鎖アシル基を持つ SPL は形質膜に濃縮されている²⁵。このように、SM をはじめ SPL は分子内のアシル基の鎖長によって細胞レベルで局在が異なっており、分子種ごとに異なった生理機能を有する可能性が指摘されている。実際、C24 極長鎖アシル基を持つ SPL は膜の流動性維持、マイクロドメインの形成やシグナル伝達の制御等、長鎖アシル基を持つ SPL が有さない性質を持つ事が報告されている²⁶⁻²⁸。しかしながら、SM 分子内アシル基の鎖長が生理機能にどのような影響を及ぼすかは十分に解明されていない。

液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) は脂質分子の測定に汎用される手法であるが、タンデム質量分析法 (MS/MS) を用いることで、より特異かつ高感度に脂質分子を分析することが可能になった²⁹。これらの技術の進歩によって脂質分子の量的・質的変動が詳細に解析され、脂質分子の生理機能の解明が飛躍的に進んでいる³⁰。一方で、これらの手法は試料のホモジナイズと脂質成分の抽出が必要なため、分子の位置情報を得ることができないという欠点がある。したがって、組織学的な手法を用いて脂質分子の分布情報を補填することは非常に有用であると期待されるが、脂質分子は比較的単純な構造を持ちながら多様な分子種が存在し、分子を特異的に認識するプローブを作製することが困難なため、従来の組織学的手法では可視化が困難であった。しかし、近年、質量分析計を用いて分子を可視化する手法であるイメージング質量分析法 (IMS) を用いた脂質分子の組織学的解析に関する研究が盛んに行われている³¹。

そこで第 1 章では、IMS を用いてマウスの脳切片上における SM 分子種の組織内分布を可視化し、分布情報から各分子種の生理機能につながる知見を得ることを目的とした。

前述したように SM は他のスフィンゴ脂質と同様、マイクロドメインの形成

や細胞内シグナル伝達の制御に重要である他、種々の疾患への関与も報告されている²⁰。代表的な例として遺伝性の疾患であるニーマンピック病が知られている。ニーマンピック病では、SMを分解する酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASMase) 遺伝子に変異が生じ、酵素活性が著しく低下することでSMが過剰に蓄積し、神経障害により乳児期に死亡する (A型) 他、肝臓、脾臓および肺などの肥大と機能不全を来す (B型)³²。SMS1 ノックアウト (KO) マウスは胎生致死の増加、ミトコンドリア機能異常による白色脂肪組織の減少や膵β細胞でのインスリン産生能の低下が報告されているが^{33,34}、SMS2 KO マウスでは目立った表現型は見られず、高脂肪食 (HFD) 負荷によって惹起される肥満、インスリン抵抗性および脂肪肝が抑制されることが報告されている³⁵⁻³⁷。

インスリン抵抗性は2型糖尿病 (T2DM) の代表的な初期症状である³⁸。肥満はインスリン抵抗性の主要な原因であり、内臓脂肪の過剰蓄積は異所性脂肪蓄積とそれに付随する臓器障害を引き起こす。肝臓にトリアシルグリセロール (TG) が蓄積した脂肪肝は、インスリン抵抗性と密接に関係する³⁹。脂肪肝とインスリン抵抗性の因果関係は十分には解明されていないが、WAT由来のアセチルCoAが肝臓においてインスリン抵抗性を引き起こすことが報告されている⁴⁰。また、骨格筋はインスリン依存的な糖の取り込みにおいて最も重要な組織であり、骨格筋におけるインスリン抵抗性もT2DMの主な原因である⁴¹。そのメカニズムは不明な点が多く残されているが、WAT由来の遊離脂肪酸 (FFA) やジアシルグリセロール (DG) が筋細胞内に蓄積し、インスリンシグナルを障害する他⁴²⁻⁴⁴、腎機能障害にも関与する⁴⁵。近年、FFAやDGのみならずCerやGM3などのSPLも脂肪肝やインスリン抵抗性に関与することが相次いで報告されている⁴⁶⁻⁴⁸。したがって、SMS2は脂肪肝やインスリン抵抗性の治療標的としての可能性が期待されるが³⁵⁻³⁷、その標的組織や分子メカニズムはよく分かっていない。

そこで第2章では、通常食 (ND) あるいはHFDを与えた野生型 (WT) マウスとSMS2 KOマウスの各組織におけるSPLの量的・質的・空間的変動をLC-MS/MSおよびIMSを用いて解析するとともに、組織特異的なSMS2 KOマウスの表現型解析や¹⁸F-フルオロデオキシグルコース (¹⁸F-FDG) を用いた陽電子放出断層撮影法 (PET) 等の手法により、SMS2の脂肪肝・インスリン抵抗性制御におけ

る標的組織を探索し， SPL の量的・質的変動と病態との関係を明らかにすることを目的とした．

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである.

AC	anterior commissure
AGC	automatic gain control
Alb	albumin
ALT	alanine aminotransferase
AO	anterior olfactory nucleus
ASMase	acid sphingomyelinase
AST	aspartate aminotransferase
AUC	area under the blood concentration-time curve
CASI	continuous accumulation of selected ions
CC	corpus callosum
CD36	cluster of differentiation 36
Cer	ceramide
CerS	ceramide synthase
CID	collision-induced dissociation
CPu	caudate putamen
Cre	creatinine
CT	computed tomography
CV	Cresyl-Violet
Cx	cortex
D3V	dorsal third ventricle
ddMS ²	data-dependent MS/MS
DG	diacylglycerol
DHB	2,5-dihydroxybenzoic acid
DhCer	dihydroceramide
Dia	diaphragm
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
Elovl	fatty acid elongase
ER	endoplasmic reticulum
ES cell	embryonic stem cell
eWAT	epididymal white adipose tissue
F	fornix
FAO	fatty acid oxidation
FAT	fatty acid translocase

FBS	fetal bovine serum
FFA	free fatty acid
Fi	fimbria hippocampi
FTICR-MS	Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry
GalCer	galactosylceramide
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Gas	gastrocnemius
Gb3	globotriaosylceramide
GCL	granule cell layer
GlcCer	glucosylceramide
Glu	gluteus maximus
GLUT	glucose transporter
GM	gray matter
GSIS	glucose stimulated-insulin secretion
GSL	glycosphingolipid
H&E	hematoxylin and eosin
Het	heterozygous
HexCer	hexosylceramide
HFD	high fat diet
Hip	hippocampus
HOMA-R	homeostasis model assessment-insulin resistance
Hy	hypothalamus
iBAT	intrascapular brown adipose tissue
IC	internal capsule
IMS	imaging mass spectrometry
IRb	insulin receptor b subunit
ISH	in situ hybridization
ITO	indium tin oxide
ITT	insulin tolerance test
KB	Kluver–Barrera
KO	knockout
LacCer	lactosylceramide
LC/ESI-MS/MS	liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry
LC/MS	liquid chromatography/mass spectrometry
LcKO	liver-conditional knockout

LFB	Luxol Fast-Blue
LV	lateral ventricle
MALDI-MS	matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
Mb	midbrain
Md	medulla
Med	renal medulla
ML	molecular layer
MS/MS	tandem mass spectrometry
mWAT	mesenteric white adipose tissue
ND	normal diet
NEFA	non-esterified fatty acid
OB	olfactory bulb
OGTT	oral glucose tolerance test
ONL	olfactory nerve fiber layer
OT	optic tract
PCL	Purkinje cell layer
PCR	polymerase chain reaction
PET	positron emission tomography
Pn	pons
Pv	renal pelvis
Qua	quadriceps femoris
siRNA	small interfering RNA
SM	sphingomyelin
SMS	sphingomyelin synthase
SN	substantia nigra
Sol	soleus
Spi	spinotrapezius
SPL	sphingolipid
SUV	standardized uptake value
T2DM	type 2 diabetes mellitus
TC	total cholesterol
TG	triacylglycerol
TOF-MS	time of flight mass spectrometry
Ugcg	UDP- glucose ceramide glucosyl transferase
VS	ventral striatum
WM	white matter

WT	wild-type
α -Gal A	α -galactosidase A
^{18}F -FDG	2-deoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose
3V	third ventricle
4V	fourth ventricle

第 1 章

イメージング質量分析法を用いたマウスの脳切片上におけるスフィンゴミエリン分子種の分布とその制御機構の解明

緒言

SM はマクロドメインの形成や細胞内シグナル伝達の制御に重要である他、種々の疾患への関与も報告されている生理活性脂質である²⁰。SM は母体骨格である Cer の分子内アシル基の鎖長に基づき、多様な分子種が存在し、その分子組成は細胞や臓器によって大きく異なる²¹。しかしながら、その多様性の意義や制御メカニズムについては未だ不明である。

SMS1 および SMS2 が Cer 分子種に対して基質特異性を有するという報告はされていないが、CerS は 6 種類のアイソザイムが同定されており、それぞれが特定の鎖長のアシル CoA に対して基質特異性を持ち、発現する細胞・組織が異なることが報告されている^{12, 21} (表 1)。

表 1. CerS アイソザイムの基質特異性と組織分布。

CerS アイソザイム	アシル CoA	発現組織
CerS1	C18	脳, 骨格筋
CerS2	C22, C24	ユビキタス, 肝臓・腎臓に高発現
CerS3	≥ C26	皮膚, 精巣
CerS4	C18, C20	心臓, 肺
CerS5	C16	ユビキタス
CerS6	C16	ユビキタス, 腎臓・腸に高発現

表 1 に示すように、CerS1 は C18-アシル CoA に対して基質特異性を示し、脳や骨格筋に高発現する²²。一方、CerS2 は C22–C24-アシル CoA を基質として好み、発現は普遍的であるが特に肝臓や腎臓において高発現する^{49–51}。したがって、組織学的解析により SM 分子種ごとの組織内分布と CerS 等の代謝酵素の発現パターンを比較することによって、SM 分子の多様性の意義や制御メカニズムの解明につながる知見が得られるものと期待される。

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法質量分析装置 (MALDI-MS) を用いた IMS は脂質を含む多様な分子の可視化に有用であると期待されており (図 3)^{31, 52–54}、近年、特にグリセロリン脂質や SPL をはじめとした脂質の可視化に関

する報告が相次いでなされている⁵⁵⁻⁵⁹。

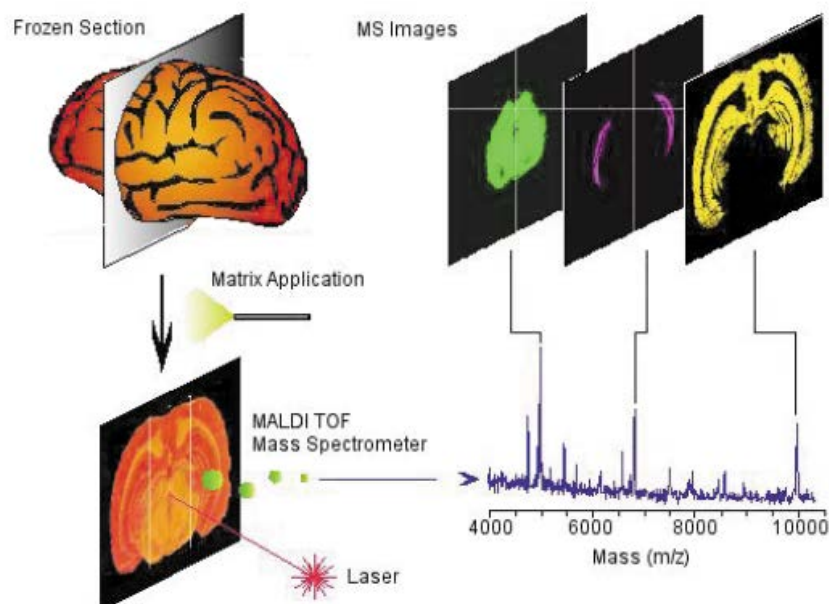


図 3. IMS の概要.

凍結組織切片を作製し、マトリックスをスプレーにより塗布する。その後、試料を MALDI-MS に導入し、任意の関心領域においてレーザーを順次照射し位置情報を記録したマススペクトルを取得する。その後、特定の質量電荷比 (m/z) についてピーク強度から画像を再構成する。図は文献 52 より引用。

IMS では目的分子のプレカーサーイオンの m/z によって分子を認識するが、組織切片上で MS/MS を行うことで、分子の構造情報から分子の特異性を確かめることが可能である^{55, 60, 61}。MALDI-MS においては、飛行時間型 (TOF)-MS が汎用される。TOF-MS はイオンに一定の電圧をかけて加速し運動エネルギーを与えて飛行させ、分子の質量によって検出器に到達する時間が異なるという原理を利用したものである⁶²。一方、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (FTICR)-MS は強磁場中でのイオンのサイクロトロン運動を利用した MS であり、超高質量分解能を有する ($>500,000$)。生体内脂質の評価においては、類似した質量の分子が多く存在するため一般的な TOF-MS の質量分解能 ($<80,000$) では特定の標的分子を特異的に検出する事が困難な場合があるが、FTICR-MS を用いることで、TOF-MS では判別困難であった脂質分子を特異的に検出できるものと期待されている^{63, 64}。そこで本研究では、MALDI-FTICR-MS を用いた IMS により、

マウスの脳切片上における SM 分子種ごとの分布を可視化するとともに，CerS 遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) によって可視化し，両者の分布を比較して SM 分子種の生理機能と制御メカニズムを考察することを目的とした．

実験方法

1. 動物

本研究の動物実験は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に則り実施した。C57BL/6N マウス (雄性, 4 週齢) を CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan) から購入し, アイソトープ総合センター内動物飼育室において温度および湿度を一定に制御した飼育環境下, 12 時間の照明周期で 1 週間馴化飼育した。ND (4.6% fat, CE-2; CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) および水は自由摂取で与えた。5 週齢時に 4 時間絶食した後, イソフルラン麻酔下で解剖し, 組織を採取した。採取した組織は粉末ドライアイス上で凍結し, 実験に使用するまで -80°C で保存した。

2. 細胞培養およびトランスフェクション

HepG2 細胞は 1.0 mg/mL グルコース含有ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, Nacalai Tesque, Suita, Japan) に 10% ウシ胎児血清 (FBS, GE Healthcare Life Sciences (Logan, Utah) および 1% antibiotic-antimycotic ($100\times$) liquid (Life Technologies, Carlsbad, CA) を添加した培地中で 37°C , 5% CO_2 条件下で培養した。製造業者のプロトコルに従い, Lipofectamine RNA iMAX Transfection Reagent (Life Technologies) と Silencer Select siRNA (Life Technologies, Negative Control Number 1, part number: 4390843; Negative Control Number 2, part number: 4390846; CerS2 Number 1, part number: 4427037, ID: s26788; CerS2 Number 2, part number: 4427037, ID: s26789; SMS2 Number 1, part number: 4392420, ID: s46645; SMS2 Number 2, part number: 4392420, ID: s46646) を Opti-MEM (Life Technologies) でそれぞれ希釈した。希釈した small interfering RNA (siRNA) は希釈した Lipofectamine RNA iMAX Transfection Reagent と混合し (1:1, v/v), 室温で 5 分間放置した。細胞を 1 穴あたり 1×10^5 細胞の密度で 24 穴プレートに播種し, siRNA-脂質混合物を 1 穴あたり 1.2 pmol の siRNA と $1\text{ }\mu\text{L}$ の Lipofectamine RNA iMAX Transfection Reagent の量で添加した。6 時間培養後に培地を交換し, 24 時間トランスフェクションした後に 10% Lipoprotein-depleted serum (LPDS, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) を添加した培地に交換し, 72 時間培養した。

3. 脂質の抽出

動物組織からの総脂質の抽出は Bligh&Dyer の変法により実施した⁶⁵。具体的には、凍結組織片 (50 mg) を凍結乾燥し、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を添加した生理食塩水 0.5 mL を加え、ビーズ式ホモジナイザー (Micro Smash MS-100R, Tomy Seiko Co., Ltd, Tokyo, Japan) を用いてホモジナイズした。ホモジネイト 50 μ L に対し 400 μ L の水を加えた。標品は SM (d18:1/16:0), SM (d18:1/18:0), SM (d18:1/18:1), SM (d18:1/24:0), SM (d18:1/24:1), Cer (d18:1/16:0), Cer (d18:1/18:0), Cer (d18:1/18:1), Cer (d18:1/22:0), Cer (d18:1/24:0), Cer (d18:1/24:1), GalCer (d18:1/24:1) および LacCer (d18:1/24:1) (Avanti-Polar Lipids Inc., Alabaster, AL) 各 10 μ g/mL を用いた。試料および標品に SM および Cer 内部標準溶液 (SM (d18:1/16:0-d31) および Cer (d18:1/16:0-d31), Avanti-Polar Lipids Inc., Alabaster, AL) を 50 ng/mL の濃度で溶解させた 1 mL のクロロホルム/メタノール(1:1, v/v) 混合液を加えて 10 分間攪拌した。13,000 $\times g$, 4 $^{\circ}$ C で 3 分間遠心分離し、下層の有機層を新しいチューブに回収した。残った水層に 500 μ L のクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) を加えて 10 分間攪拌した後、13,000 $\times g$, 4 $^{\circ}$ C で 3 分間遠心分離し、再度下層を回収して最初に回収した有機層に加えて総脂質抽出物とした。抽出物は 40 $^{\circ}$ C に加温して窒素ガスを吹き付け、乾固させた。その後、500 μ L のクロロホルム/メタノール (1:1, v/v) 混合液を加えて再溶解し、6 μ L の 8 N 水酸化カリウム溶液を加えて 37 $^{\circ}$ C で 2 時間鹼化した。その後、抽出物に 180 μ L の 0.67 N 塩酸溶液を加えて攪拌し、13,000 $\times g$, 4 $^{\circ}$ C で 3 分間遠心分離して下層の有機層を新しいチューブに回収した。残った水層に 500 μ L のクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) 混合液を加えて 10 分間攪拌した後、13,000 $\times g$, 4 $^{\circ}$ C で 3 分間遠心分離し、再度下層を回収して最初に回収した有機層に加えて SPL 抽出物とした。SPL 抽出物は 40 $^{\circ}$ C に加温して窒素ガスを吹き付け、乾固させた後、400 μ L のクロロホルム/メタノール/水 (50:400:50, v/v) 混合液を加えて再溶解した。

細胞からの総脂質の抽出は過去の報告に従い実施した⁶⁶。具体的には、50 ng/mL の濃度で内部標準を溶解させた 300 μ L の 2-プロパノールを各ウェルに加え、テフロン性のセルスクレーパーを用いて細胞をスクラップした後、チューブに抽出物を回収した。回収した抽出物に 900 μ L の n-ヘキサンを加えた。各ウェルを 300 μ L の 2-プロパノールで 2 回リンスし、回収した抽出物に加えた。

13,000 ×g, 4 °C で 3 分間遠心分離し、有機層を新しいチューブに回収した後、40 °C に加温して窒素ガスを吹き付け、乾固させた。その後、330 µL のクロロホルム/メタノール/水 (50:400:50, v/v) を加えて再溶解した。遠心分離後に残った残渣は室温で一晩放置して乾燥させ、100 µL の Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) を加えて溶解した。13,000 ×g, 4 °C で 3 分間遠心分離した後、上清を回収して Micro BCA Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) を用いて製造業者のプロトコルに従いタンパク質濃度を測定した。

4. LC/ESI-MS/MS を用いた脂質の測定と同定

液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化-タンデム質量分析法 (LC/ESI-MS/MS) による脂質の測定は UltiMate 3000 HPLC (Thermo Fisher Scientific Inc.) と Q Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて実施した。4 µL の脂質抽出物を UltiMate 3000 HPLC に注入し、ACQUITY UPLC BEH C18 column (1.7 µm, 2.1 × 100 mm; Waters Co., Milford, MA) により分離した。カラム温度は 60 °C に設定した。LC は移動相 A (水, 1%酢酸アンモニウム, 0.1%ギ酸, 0.00005%リン酸の混合液) と移動相 B (50%アセトニトリル, 50% 2-プロパノール, 1%酢酸アンモニウム, 0.1%ギ酸の混合液) を用いたリニアグラジエントで行い、流速は 0.4 mL/min とした。グラジエントは 0–43 分 (B 0–50%), 43–48 分 (B 50–100%), 48–50 分 (B 100–50%) の設定で実施した。脂質の測定は陽イオンモードで行った。マススペクトルはフルスキャンモードで取得し、Data-dependent MS/MS (ddMS²) スペクトルは MS/MS モードで取得した。マススペクトルは m/z 200 における質量分解能を $R = 70,000$, スキャンレンジを m/z 200–1,300 にそれぞれ設定して取得した。ddMS² スペクトルは m/z 200 における質量分解能を $R = 17,500$, スキャンレンジを m/z 200–2,000 にそれぞれ設定して取得した。MS の automatic gain control (AGC) target は 1×10^6 , maximum injection time は 100 ms にそれぞれ設定した。ddMS² も同様に、AGC target は 5×10^4 , maximum injection time は 50 ms にそれぞれ設定した。Heated-ESI パラメータは sheath gas flow rate を 50 units, auxiliary gas flow rate を 13 units, ion spray voltage を 3.80 kV, ion transfer capillary temperature を 350 °C, auxiliary gas heater temperature を 425 °C にそれぞれ設定した。Stepped

normalized collision energy は 25, 35 and 45 eV に設定した.

脂質の同定は過去の報告に従い Lipid Search software (Mitsui Knowledge Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行った⁶⁷. ペアレントサーチモードとプロダクトサーチモードを使用した. 標的脂質は $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ または $[M+NH_4]^+$ として検出した. 試料中の各脂質濃度は標準品を用いた標準曲線から算出した. 動物組織中脂質含量においては $\mu\text{g/g tissue dry weight}$ を算出後, 総 SM あるいは Cer 中の存在比率で表示した. 細胞中脂質含量においては, $\mu\text{g/mg protein}$ で表示した.

5. MALDI-IMS 用試料の作製

凍結組織切片は CM3050 Cryostat (Leica, Solms, Germany) を用いて厚さ 10 μm で作製した. 得られた凍結組織切片をインジウム-スズ酸化物 (ITO) スライドガラス (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) 上に置き, 乾燥させた. 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) 溶液 (30 mg/mL DHB, 20 mM 酢酸カリウム, 50%メタノール, 0.2%トリフルオロ酢酸) をマトリックスとして Image Prep (Bruker Daltonics) を用いて ITO スライドガラス上に塗布した.

6. MALDI-IMS

MALDI-FTICR-MS を用いた IMS 解析は 7T solariX XR system (Bruker Daltonics) を用いて実施した. 標的分子を検出するため, m/z 400 における質量分解能を 590,000 に設定し, m/z 500–900 をマスレンジとして continuous accumulation of selected ions (CASI) 機能を用いポジティブイオンモードで測定した. Smart Beam II laser は 2,000 Hz, レーザーパワー50%, レーザー径 50 μm , ラスター幅 80 μm にそれぞれ設定して MALDI によるイオン化を行った. フルスキャンモードで得られたプレカーサーイオンは衝突誘起乖離 (CID) による断片化と CASI 機能を用いてプロダクトイオンのマススペクトルを得ることで分子の構造情報を取得した. マススペクトルの解析は Data Analysis v4.3 (Bruker Daltonics) を用いて行った.

取得したマススペクトルから FlexImaging v4.0 (Bruker Daltonics) を用いてデ

ータ処理と画像の構成を行った。全ての画像データは実効値によって補正した。脂質の同定は LIPID MAPS website (www.lipidmaps.org/tools/index.html) のマス解析ツールを用いて行った。

7. RNA の抽出とリアルタイム PCR

細胞および動物組織からの総 RNA の抽出は Trizol RNA Separation Reagent (Life Technologies) と RNeasy Mini kit (Qiagen, Venlo, the Netherlands) を用いて製造業者のプロトコルに従い実施した。逆転写は SuperScript III First-Strand Synthesis system for RT-PCR (Life Technologies) と PCR Thermal Cycler SP (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) を用いて製造業者のプロトコルに従い行った。リアルタイム PCR は SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc.) と 7500 Real-time PCR system (Life Technologies) を用いて製造業者のプロトコルに従い実施した。本研究でリアルタイム PCR に用いたプライマーは表 2 に示した。目的遺伝子の発現量は動物組織においては *Gapdh*, 細胞においては *18S rRNA* の発現量でそれぞれ補正した。各組織の *CerS* 遺伝子の発現量は前脳における *CerS1* に対する発現比率で表示し、細胞における *CERS2* および *SGMS2* の発現量は陰性対照 siRNA No.1 に対する発現比率で表示した。

表 2. リアルタイム PCR に用いたプライマーの一覧.

Primers	Sequences 5'-3'
Mouse	
<i>Gapdh</i> Forward	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
<i>Gapdh</i> Reverse	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG
<i>CerS1</i> Forward	GGTCAGATGCGTGAAGTGGAA
<i>CerS1</i> Reverse	GGATAGAGTCCTGGATGGCTGAA
<i>CerS2</i> Forward	CGTGTCTATGCCAAAGCCTCA
<i>CerS2</i> Reverse	GTCTGGTAGAAATGTTCCAAGGTG
<i>CerS3</i> Forward	GCTGGATGGAAGCAGACGTGTA
<i>CerS3</i> Reverse	TAGTGCAAAGGCAGGATCAGAGTG
<i>CerS4</i> Forward	CATGACTGCTCCGACTACCTG
<i>CerS4</i> Reverse	GAATATGAGGCGCGTGTAGAA
<i>CerS5</i> Forward	ACGTGAGCGGCTCTGTACCA
<i>CerS5</i> Reverse	GAGCACCTGCAGGATCAGGA

<i>CerS6</i> Forward	CACCTGGGCAGACCTGAAGA
<i>CerS6</i> Reverse	TGGCACATGGTTTGGCTATGA
Human	
<i>18SrRNA</i> Forward	TTTGCAGTACTCAACACCAACATC
<i>18SrRNA</i> Reverse	GAGCATATCTTCGGCCCACAC
<i>CERS2</i> Forward	CATCCGAGCTGGGACTCTAATCA
<i>CERS2</i> Reverse	GGGTACACCAGGGTGCAATG
<i>SGMS2</i> Forward	ATTTCTGGTGGTGGATTGTCCATA
<i>SGMS2</i> Reverse	CACTCAGCAGCCAGCAGATTA

8. ISH

ISH は Ourgenic Co., Ltd. (Naruto, Japan) に委託して行った。具体的には、粉末ドライアイスで凍結させて脳を 10 μ m の厚さで凍結組織切片を作製し、ポジティブチャージしたスライドガラス上に置いた。その後、mRNA ISH kit (QuantiGeneViewRNA, Panomics Inc., Fremont, CA) を用いて製造業者のプロトコルに従い ISH を行った。マウス *CerS1* 特異的プローブ (accession number NM_138647, 134–1,299 nt) およびマウス *CerS2* 特異的プローブ (NM_029789, 36–1,337 nt) の設計および合成は Panomics Inc. が実施した。標的遺伝子に特異的なプローブを設計するため、各オリゴヌクレオチドの特異性は BLAST データベース (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) で確認し、*in silico* でスクリーニングした。また、非特異的なシグナルの検出を避けるため、“ZZ” 法を用いた。プローブと増幅産物は各対のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせた。ファーストレッド色素の検出を行うため、アルカリフォスファターゼで処理し色素を沈殿させた。ハイブリダイズした標的 mRNA は BIOREVO BZ-9000 imaging microscope と image joint software (Keyence, Osaka, Japan) を用いて検出・撮像した。画像の撮像およびバーチャルスライドの作製は Biopathology Institute Co., Ltd. (Kunisaki, Japan) に委託した。また、ポジティブコントロールとしてグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子特異的なプローブを用いて、ネガティブコントロールとしてプローブ無しの条件下で ISH を行った。

9. 組織学的解析

脳の形態学的評価は Ourgenic Co., Ltd. に委託し、ヘマトキシリン&エオジン (H&E) 染色およびクリュバー・バレラ (KB) 染色により実施した。H&E 染色で

は、凍結組織切片を 10%ホルムアミドで固定し、マイヤーヘマトキシリン溶液で 5 分間染色した後、水で洗浄しエオジン Y 溶液で 1 分間染色した。KB 染色では、凍結組織切片を 95%エタノールで水和し、0.1 %ルクソールファーストブルー (LFB) を用いて 60 °C で 12 時間染色した後、70%エタノールで洗浄し、0.1% クレシル・バイオレット (CV) で 5 分間染色した。画像の撮像、バーチャルスライドおよび脳地図の作製は Biopathology Institute Co., Ltd. が実施した。

10. 統計学的解析

結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で表示した。統計学的解析は SAS v9.4 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて Dunnett の多重比較検定により行い、 $p<0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した。

結果

1. マウスの脳における SM および Cer の組成と CerS ファミリーの遺伝子発現パターンの評価

LacCer 等の GSL はスフィンゴイド塩基として d18:1 Sph と d20:1 Sph のいずれかを有するのに対し、SM は d18:1 をスフィンゴイド塩基とすることが報告されている⁶⁸。MALDI-FTICR-MS では同一分子量を持つ異なる分子、すなわち異なる鎖長のスフィンゴイド塩基とアシル基の組み合わせを持つ複数の分子 (d18:1/18:0 と d20:1/16:0 等) を判別することは不可能であると予想され、アシル基の鎖長を決定できない可能性が考えられた。そこで、まず、LC/ESI-MS/MS を用いてマウスの脳抽出物の SM および対照脂質として LacCer の検出および MS/MS による構造解析を行った。

プレカーサーイオンである [SM (36:1)+H]⁺ (*m/z* 731.6061) についてポジティブイオンモードで MS/MS 解析を行うと、ホスホコリン由来のプロダクトイオンである [PCho+H]⁺ (*m/z* 184.0733) と d18:1 Sph 由来のプロダクトイオンである [Sph (d18:1)-2H₂O+H]⁺ (*m/z* 264.2686) のみが検出されたことから、[SM (36:1)+H]⁺ は SM (d18:1/18:0) であると同定された (図 4)。一方、プレカーサーイオンである [LacCer (38:1)+H]⁺ (*m/z* 918.6876) について MS/MS 解析を行うと d20:1 Sph 由来のプロダクトイオンである [Sph (d20:1)-2H₂O+H]⁺ (*m/z* 292.2999) が検出されたことからこの分子は LacCer (d20:1/18:0) であると同定され、プレカーサーイオンである [LacCer (36:1)+H]⁺ (*m/z* 890.6563) について MS/MS 解析を行うと Sph (d18:1) 由来のプロダクトイオンである [Sph (d18:1)-2H₂O+H]⁺ (*m/z* 264.2686) が検出されたことからこの分子は LacCer (d18:1/18:0) であると同定された (図 4)。これらの結果から、過去の報告と同様、マウスの脳における SM は大部分がスフィンゴイド塩基として Sph (d18:1) を有するものであることが示され⁶⁸、MALDI-FTICR-MS を用いて SM のアシル基鎖長を決定できるものと判断した。

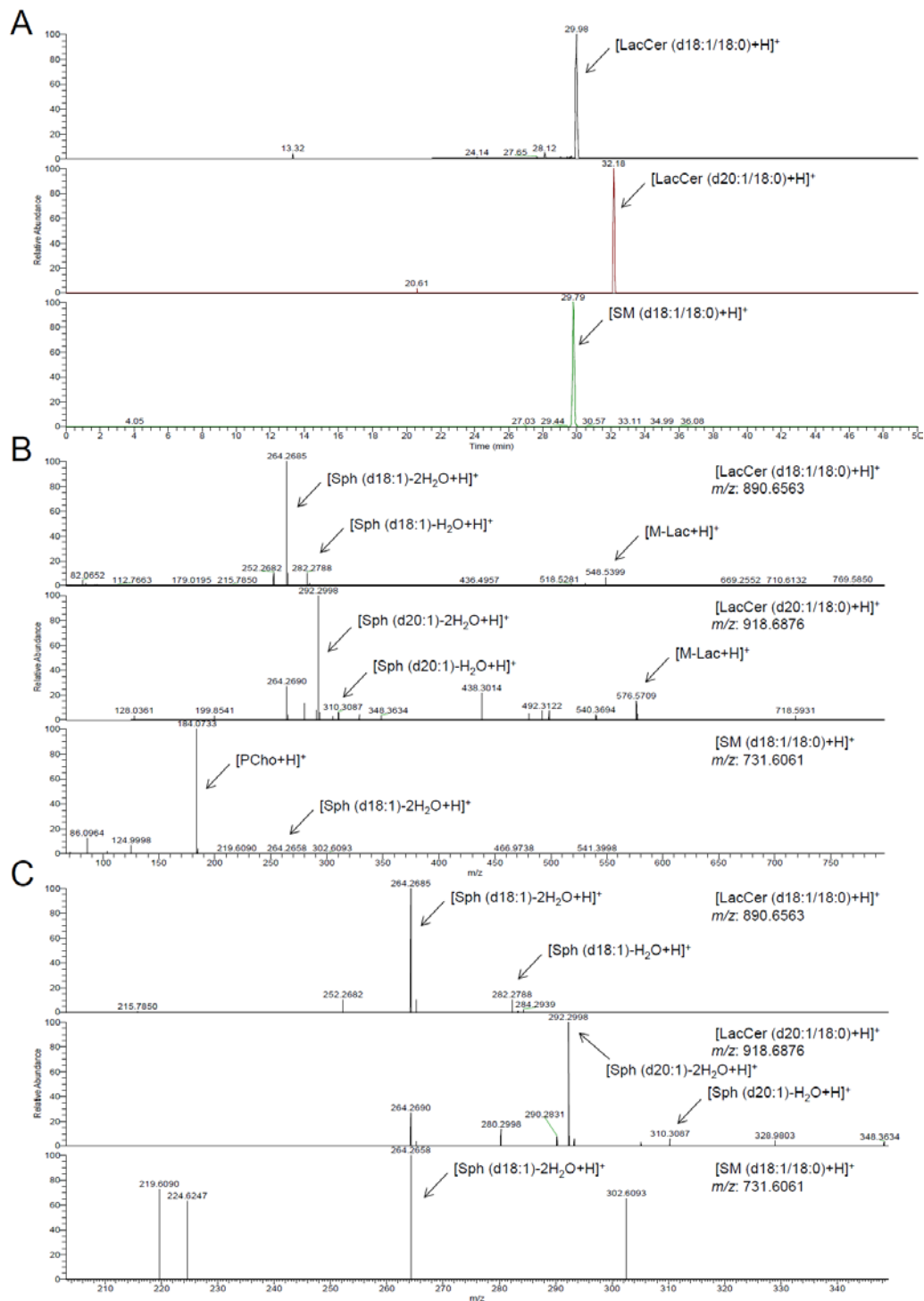


図 4. マウスの脳抽出物における LC/ESI-MS/MS を用いた LacCer (d18:1/18:0), LacCer (d20:1/18:0) および SM (d18:1/18:0) の解析. LC/ESI-MS/MS 解析によって得られたクロマトグラム (A), m/z 70–790 (B), m/z 204–348 (C) におけるプロダクトイオンのマスペクトルを示す. 各脂質について, スフィンゴイド塩基とアシル基がそれぞれ同定されている.

次に，マウスの前脳および小脳抽出物中の SM および Cer の組成を LC/ESI-MS/MS により評価した．その結果，前脳および小脳において SM (d18:1/18:0) と SM (d18:1/24:1) が主要な SM 分子種であることを確認した (図 5A および B). また, Cer についても同様に Cer (d18:1/18:0) および Cer (d18:1/24:1) が主要な Cer 分子種であることを確認した (図 5C, D). 続いて，前脳および小脳における CerS ファミリーの遺伝子発現を調べた．LC/ESI-MS/MS を用いた脂質解析の結果から，C16 アシル基を持つ SM や Cer は前脳および小脳でほとんど見られなかったが，C16 アシル基を基質として好む *CerS6* は比較的高発現した (図 5). 一方で，C22–C24 極長鎖アシル CoA を基質とする *CerS2* と C18 長鎖アシル CoA を基質とする *CerS1* が比較的高発現していることを確認した (図 5E, F).

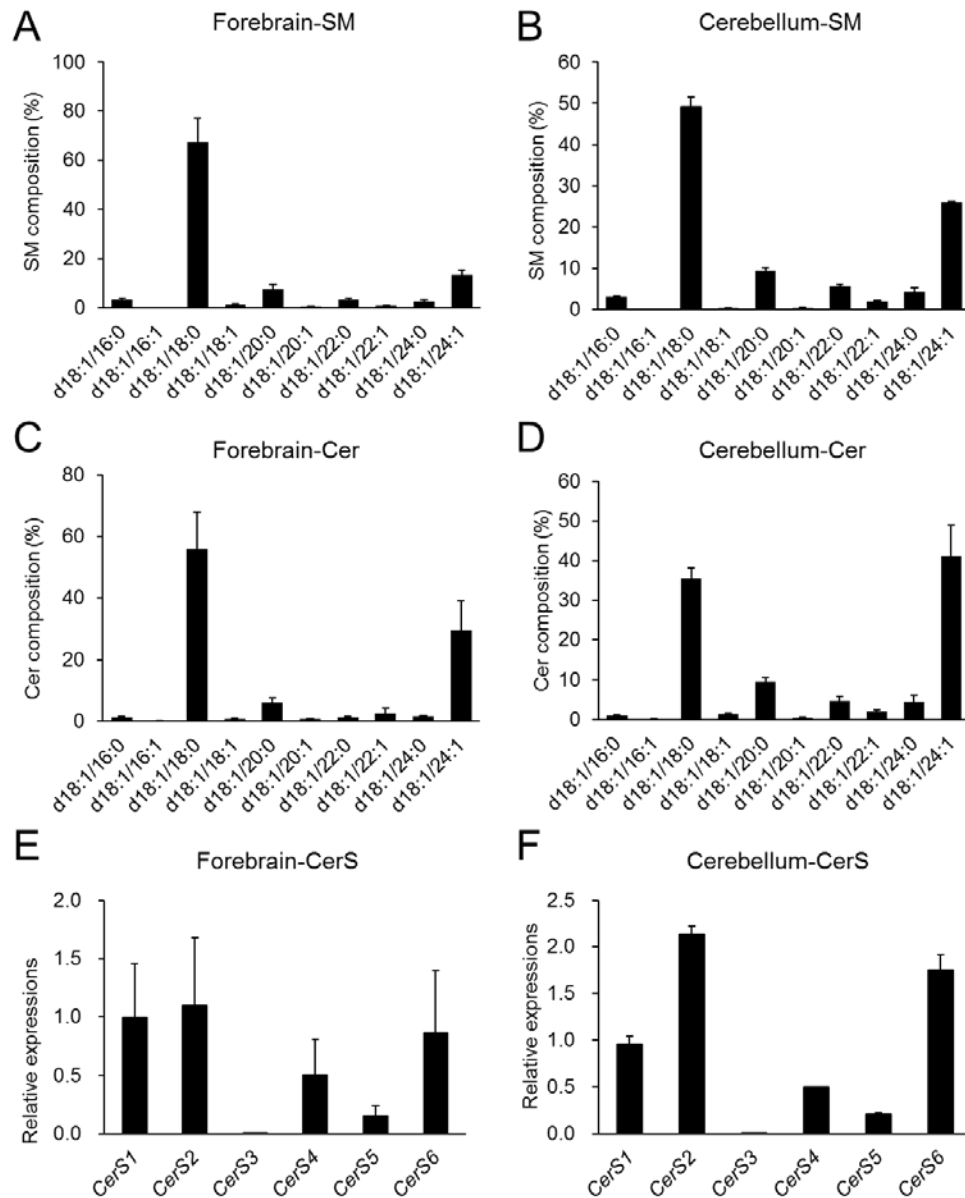


図 5. マウスの前脳および小脳における SM と Cer の組成と CerS 遺伝子の発現パターン. 前脳 (A) および小脳 (B) における SM の組成, 前脳 (C) および小脳 (D) における Cer の組成, 前脳 (E) および小脳 (F) における CerS 遺伝子の発現パターンを示す. 各 SM および Cer 分子種は総 SM および Cer 量を 100%とした際の存在比率で表した (A-D). 各 CerS 遺伝子の発現量は *Gapdh* の発現量で補正し, *CerS1* の発現量を 1 とした際の相対的発現量として示した (E, F). 結果は平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3) で示した. 脳では C18 アシル基を持つ SM および Cer, 次いで C24 アシル基を持つ SM および Cer が高濃度で存在し, それらのアシル CoA を基質とする *CerS1* や *CerS2* の発現が見られる.

同様に、肝臓および腎臓抽出物中の SM および Cer の組成を LC/ESI-MS/MS により評価した。その結果、肝臓は C22 や C24 極長鎖アシル基を持つ SM および Cer が主要な SPL であり、腎臓は C16 や C24 極長鎖アシル基を持つ SM および Cer が主要なであった (図 6A–D)。また脳とは異なり、肝臓、腎臓いずれも C18 アシル基を持つ SM や Cer の存在量は微量であった。これらの結果と相関し、肝臓および腎臓において *CerS2* が高発現しており、腎臓では *CerS6* も比較的高発現していた(図 6E, F)。また、脳で発現が認められた *CerS1* は肝臓、腎臓ともに発現がほとんど認められなかった。これらの結果から、少なくとも *CerS1* および *CerS2* の遺伝子発現パターンは SM や Cer の組成と概ね相関することが示唆された。

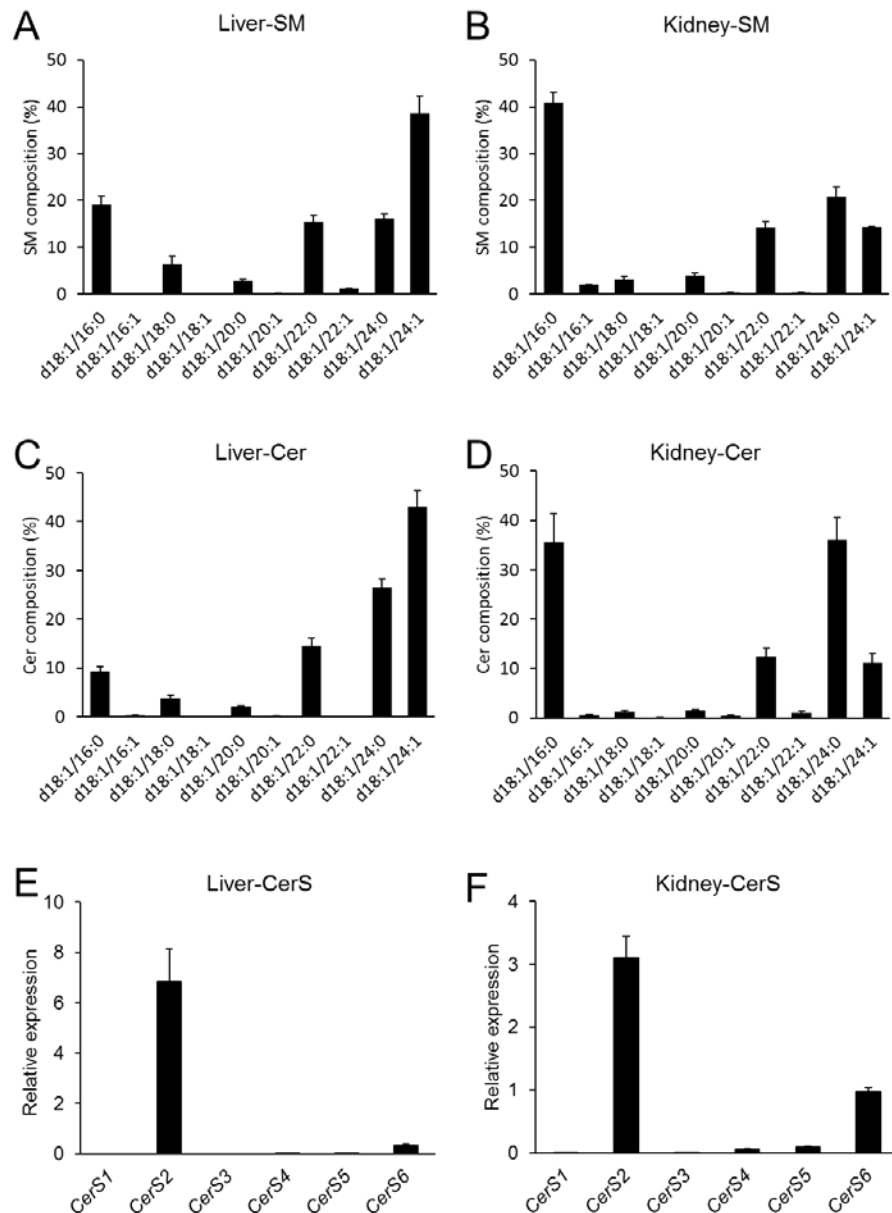


図 6. マウスの肝臓および腎臓における SM と Cer の組成と CerS 遺伝子の発現パターン. 肝臓 (A) および腎臓 (B) における SM の組成, 肝臓 (C) および腎臓 (D) における Cer の組成, 肝臓 (E) および腎臓 (F) における CerS 遺伝子の発現パターンを示す. 各 SM および Cer 分子種は総 SM および Cer 量を 100%とした際の存在比率で表した (A-D). 各 CerS 遺伝子の発現量は *Gapdh* の発現量で補正し, *CerS1* の発現量を 1 とした際の相対的発現量として示した (E, F). 結果は平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3$) で示した. 肝臓は C22-C24 アシル基を持つ SM や Cer が高濃度で分布し, それらのアシル CoA を基質とする *CerS2* が高発現する. 一方, 腎臓は C22-C24 アシル基に加えて C16 アシル基を持つ SM や Cer も高濃度で分布し, それらのアシル CoA を基質とする *CerS6* の発現も見られる.

2. 標品を用いた MALDI-FTICR-MS による SM の検出

MALDI-FTICR-MS を用いて脳切片上における SM 分子種の組織内分布を評価するにあたり、まず標品を用いて各 SM および GSL 分子種の m/z を確認した。標品は SM (d18:1/16:0), SM (d18:1/18:0), SM (d18:1/18:1), SM (d18:1/24:0), SM (d18:1/24:1) および GalCer (d18:1/24:1) を使用し、各標品 50 ng を ITO スライドガラス上にスポットして乾燥させ、DHB 溶液を塗布して MALDI-FTICR-MS のポジティブイオンモードで IMS 解析した。その結果、各 SM および GalCer 分子種はカリウム付加イオンとして [SM (d18:1/16:0)+K]⁺ (m/z 741.53), [SM (d18:1/18:0)+K]⁺ (m/z 769.56), [SM (d18:1/18:1)+K]⁺ (m/z 767.55), [SM (d18:1/24:0)+K]⁺ (m/z 853.66), [SM (d18:1/24:1)+K]⁺ (m/z 851.65), [GalCer (d18:1/14:1)+K]⁺ (m/z 848.65)のように検出された (図 7)。また、FTICR-MS の高い質量分解能により標品から得られた同位体の分布パターンを確認したところ、同位体の天然存在比から算出された各脂質の理論ピークと第一あるいは第二同位体まで理論ピークと同様のピークが得られた (図 7)。

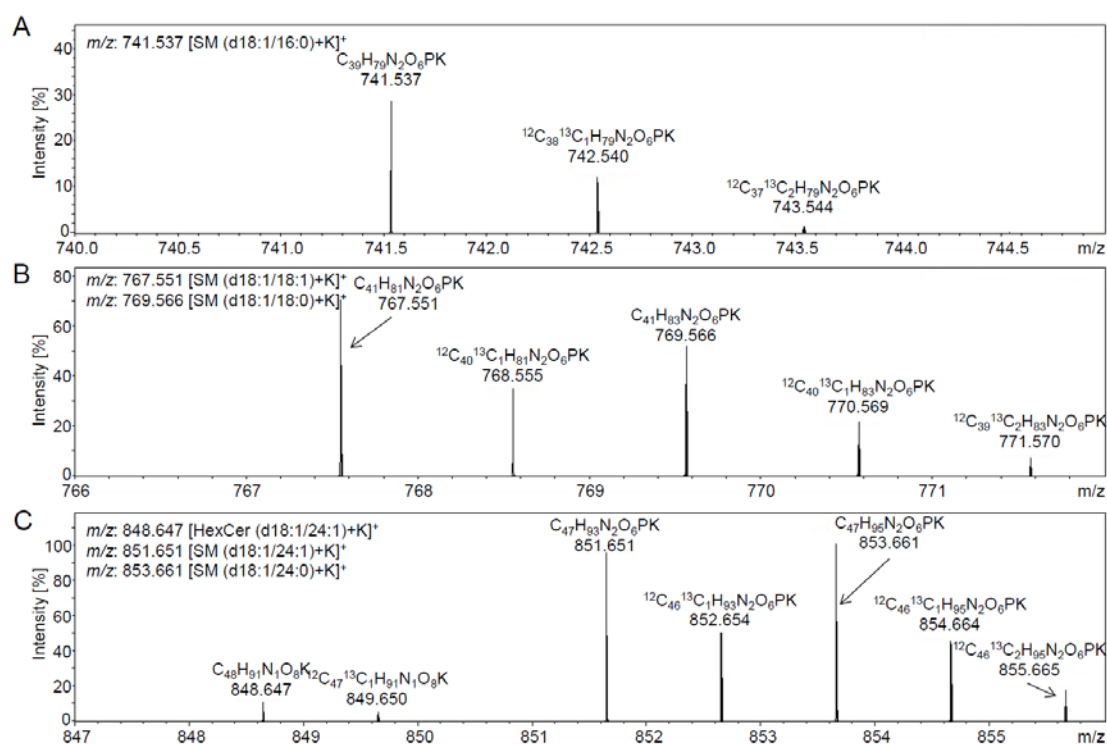


図 7. MALDI-FTICR-MS による SM および GalCer 標品のマスペクトル。 50

ng の各標品混合物から得られた m/z 740–745 (A), 766–772 (B), and 847–856 (C) におけるマスペクトルを示す. 各脂質標品について, 同位体の天然存在比から算出された各脂質の理論ピークと第一あるいは第二同位体まで理論ピークと同様のピークが見られる.

続いて, 各脂質標品から得られたプレカーサーイオンについて, ITO スライドガラス上で CID による断片化を行った. その結果, 各 SM 分子種について, プレカーサーイオンからホスホコリン由来の 59 u および 183 u のニュートラルロスを確認した (図 8). したがって, MALDI-FTICR-MS は同位体分布と構造情報による確認によって特異的に標的分子を検出できていることが示唆された.

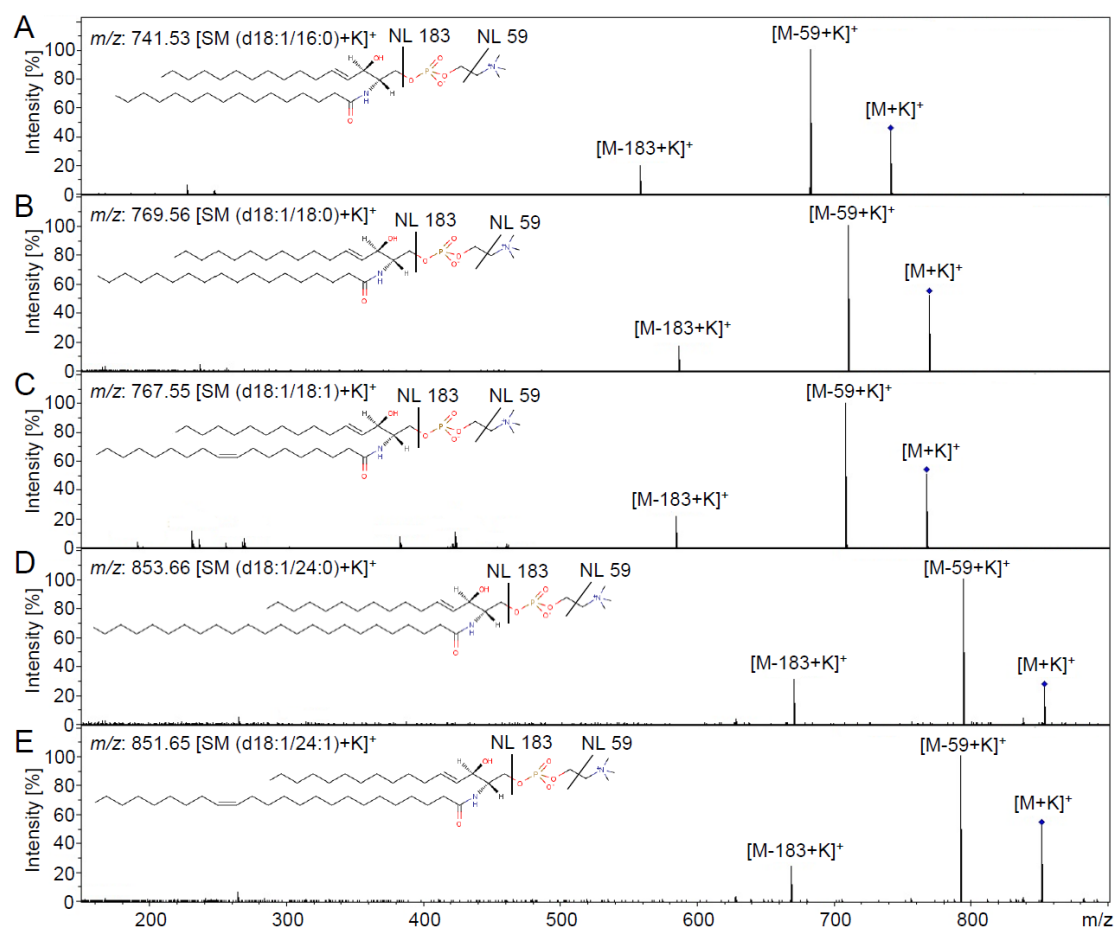


図 8. ITO スライドガラス上での SM 標品の MS/MS 解析. SM (d18:1/16:0) (A), SM (d18:1/18:0) (B), SM (d18:1/18:1) (C), SM (d18:1/24:0) (D) および SM (d18:1/24:1) (E) の各 m/z から 59 u および 183 u がニュートラルロスしたマスペクトルを示す. 各脂質分子がホスホコリンを有していることが分かる.

MALDI-IMS は MALDI の性質上、定量評価が困難であるとされている。そこで、SM 標品混合液を ITO スライドガラス上にスポットし、脂質濃度とイオン強度との関係を検証した。SM 混合液のスポット周囲に関心領域を設定し、平均イオン強度を算出した。その結果、SM (d18:1/16:0), SM (d18:1/18:0), SM (d18:1/18:1), SM (d18:1/24:0) および SM (d18:1/24:1) において、3–300 pg の範囲で脂質濃度とイオン強度との間に良好な直線関係が見られた (表 3)。これらの結果から、MALDI-FTICR-IMS で取得されたシグナル強度は脂質の存在量を反映しているものと考えられた。

表 3. MALDI-FTICR-IMS における SM 標品の濃度とイオン強度との関係。

SM species	Observed <i>m/z</i>	Averaged Intensities			R^2
		300 pg	30 pg	3 pg	
d18:1/16:0	741.5378	26652416	2936522	283597	0.9999
		± 6053895	± 399269	± 131599	
d18:1/18:1	767.5516	63949312	5269675	488060	0.9998
		± 7827226	± 551402	± 165657	
d18:1/18:0	769.5671	38218069	4038837	570715	1.0000
		± 5675980	± 1173243	± 171020	
d18:1/24:1	851.6529	38946688	5925120	1011664	0.9986
		± 14297676	± 541362	± 225944	
d18:1/24:0	853.6629	43828736	7990144	1359525	0.9960
		± 11142832	± 1320577	± 212954	

MALDI-FTICR-MS で取得された SM 標品の m/z , 平均イオン強度および R^2 を示す。データは平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3$) で表した。各脂質標品について、量とシグナル強度の間に直線関係が見られる。

3. マウス前脳切片を用いた MALDI-FTICR-MS による SM の検出

次に、マウスの前脳切片を用いて MALDI-FTICR-MS による SM および hexosylceramide (HexCer) の検出を試みた。MALDI-FTICR-MS の CASI 機能を $500 < m/z < 900$ に設定し、ポジティブイオンモードにより前脳切片の異なる領域

からマスペクトルを取得した (図 9B-E). その結果, 脳の領域ごとに異なるパターンのマスペクトルが得られ, 6 ピークが SM ($[\text{SM (d18:1/16:0)+K}]^+$, $[\text{SM (d18:1/18:0)+K}]^+$, $[\text{SM (d18:1/18:1)+K}]^+$, $[\text{SM (d18:1/22:0)+K}]^+$, $[\text{SM (d18:1/24:0)+K}]^+$, $[\text{SM (d18:1/24:1)+K}]^+$), 1 ピークが $[\text{HexCer (d18:1/24:1)+K}]^+$ であると推定された.

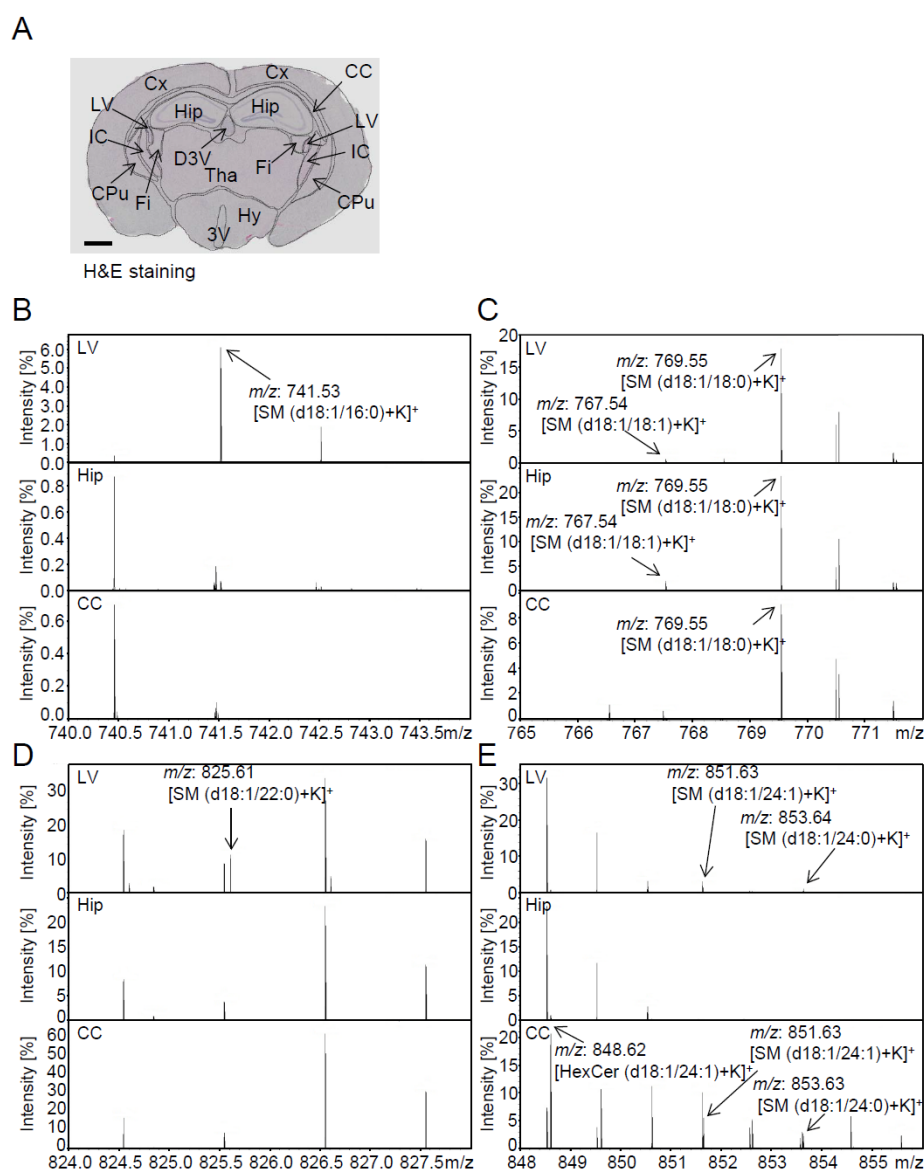


図 9. MALDI-FTICR-MS を用いてマウス前脳切片から取得した SM および HexCer のマスペクトル. 前脳切片の H&E 染色画像 (A). 側脳室 (LV), 海馬 (Hip) および脳梁 (CC) から得られた m/z 740–744 (B), 765–772 (C), 824–828 (D)

and 848–856 (E) のマスペクトルを示す. スケールバー = 1 mm. 大脳皮質 (Cx), 視床下部 (Hy), 海馬采 (Fi), 視床 (Tha), 内包 (IC), 背側第三脳室 (D3V), 第三脳室 (3V), 尾状核被殻 (CPu). LV, Hip, CC の領域毎に SM 分子の存在比率が異なる.

さらに SM および HexCer が特異的に検出されているか否かを確認するため, 各ピークの同位体分布を確認し標品と比較した (図 7, 10). その結果, 標品と同様に第一あるいは第二同位体まで理論ピークと同様のピークが得られた (図 10).

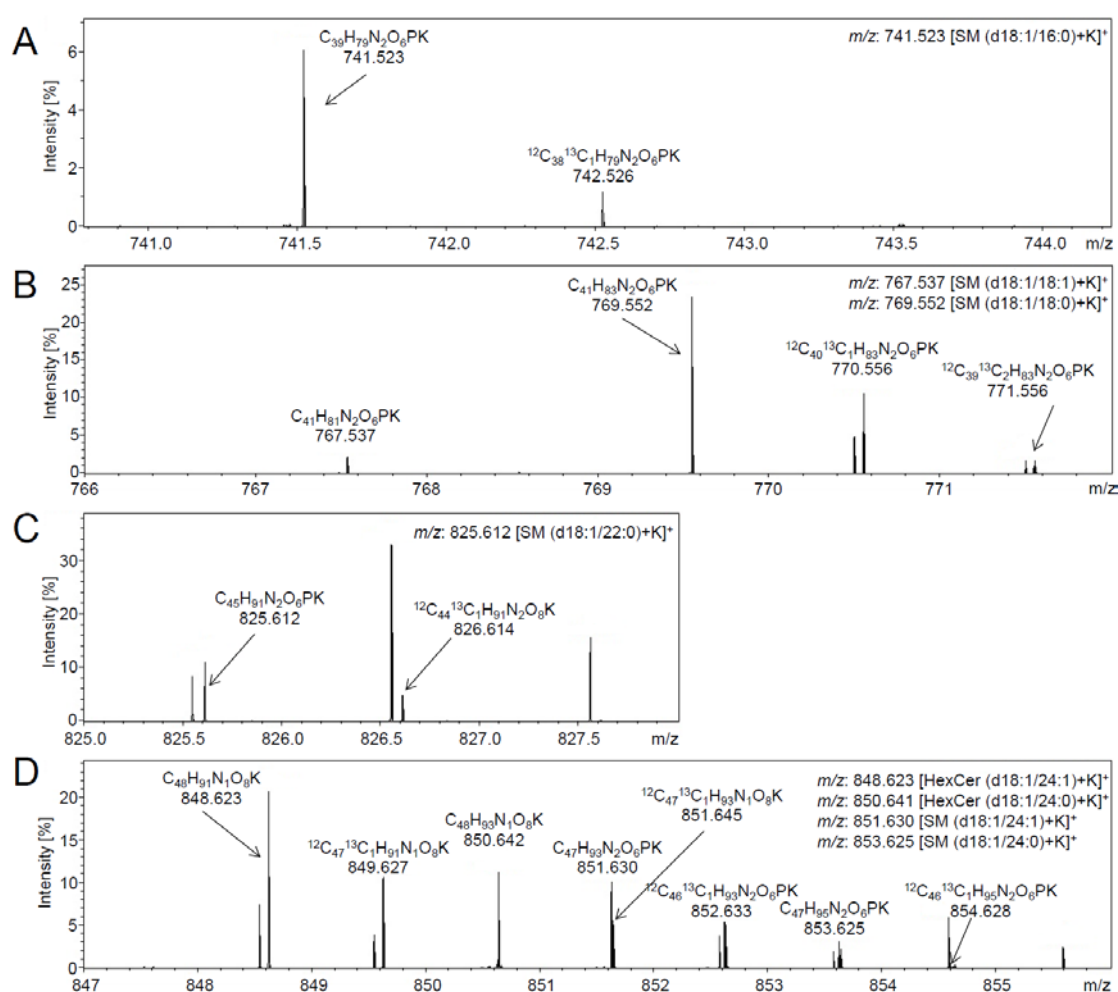


図 10. MALDI-FTICR-MS を用いてマウス前脳切片から取得した SM および HexCer の同位体分布. マウス前脳切片から得られた m/z 740.5–744.5 (A), 766–772 (B), 825–828 (C), 847–856 (D) におけるマスペクトルを示す. 各脂質について第一あるいは第二同位体まで理論ピークと同様のピークが見られる.

続いて、脳切片上より得られたプレカーサーイオンについて、CID による断片化を行った。その結果、標品と同様に、各 SM 分子種についてプレカーサーイオンからホスホコリン由来の 59 u および 183 u のニュートラルロスを確認した (図 11)。したがって、MALDI-FTICR-MS は脳切片上においても特異的に標的分子を検出できていることが示唆された。

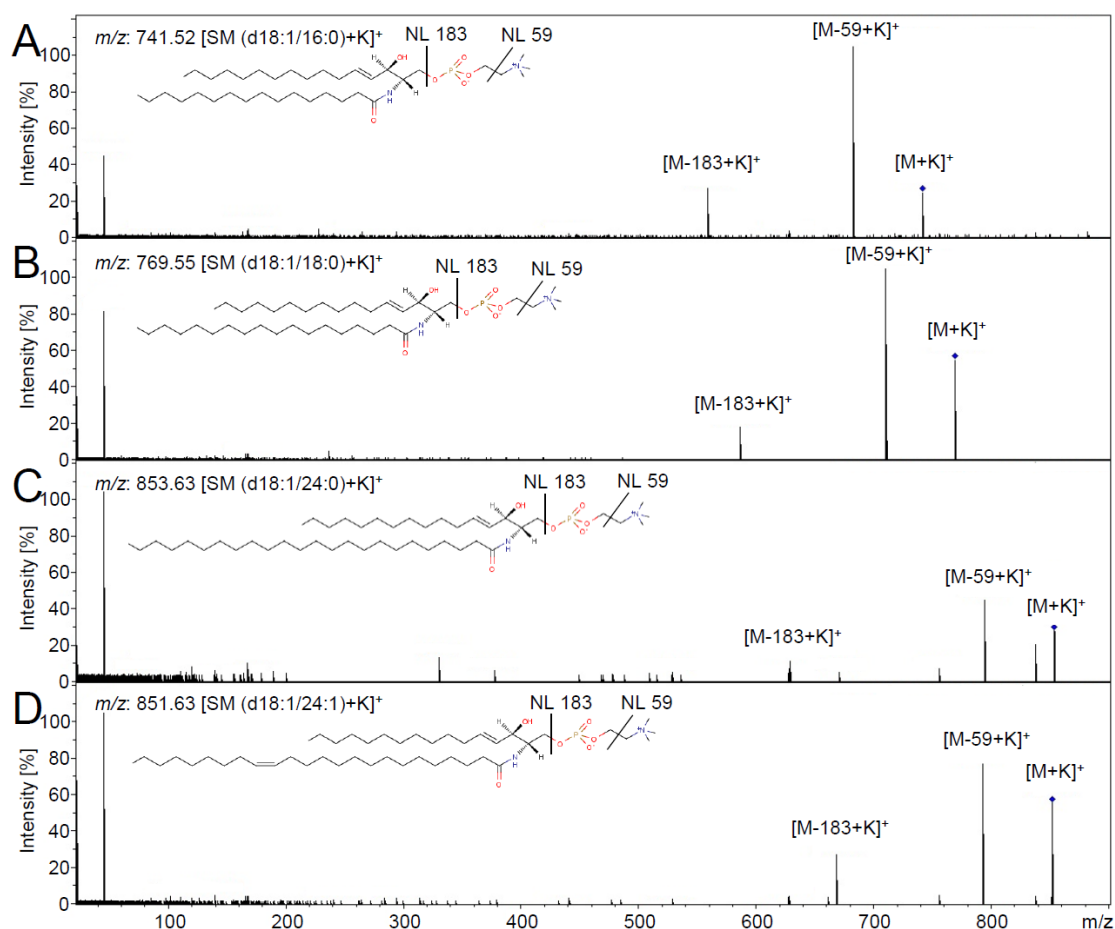


図 11. マウス前脳切片上で検出された SM 分子種の MS/MS 解析. SM (d18:1/16:0) (A), SM (d18:1/18:0) (B), SM (d18:1/24:0) (C) および SM (d18:1/24:1) (D) の各 m/z から 59 u および 183 u がニュートラルロスしたマススペクトルを示す. 各脂質分子がホスホコリンを有していることが分かる。

4. MALDI-FTICR-IMS を用いたマウス前脳切片上における SM 分子種の可視化

続いて、マウス前脳切片上で得られたマススペクトルから画像を再構成し、MALDI-FTICR-IMS による SM 分子種の可視化を行った。その結果、SM (d18:1/16:0) と SM (18:1/22:0) は側脳室、第三脳室および背側第三脳室に特徴的

な分布を示した (図 12A, D). 一方, SM (d18:1/18:0) は灰白質に広く分布しており, 海馬, 視床下部, 尾状核被殻および大脳皮質に分布が見られた (図 12B). SM (d18:1/18:1) はシグナルが弱く存在量が少ないことが示唆されたが, SM (d18:1/18:0) と類似した分布が見られた (図 12C). 対照的に, SM (d18:1/24:0) と SM (d18:1/24:1) は髄鞘が豊富な白質に特徴的な分布を示し, 視床, 内包, 脳梁および海馬采に分布が見られた (図 12E, F). HexCer (d18:1/24:1) も SM (d18:1/24:0) と SM (d18:1/24:1) と同様に白質に分布が認められた (図 12G). これらの結果から, SM は分子内のアシル基鎖長によって脳内分布が明確に異なることが示された (図 12H).

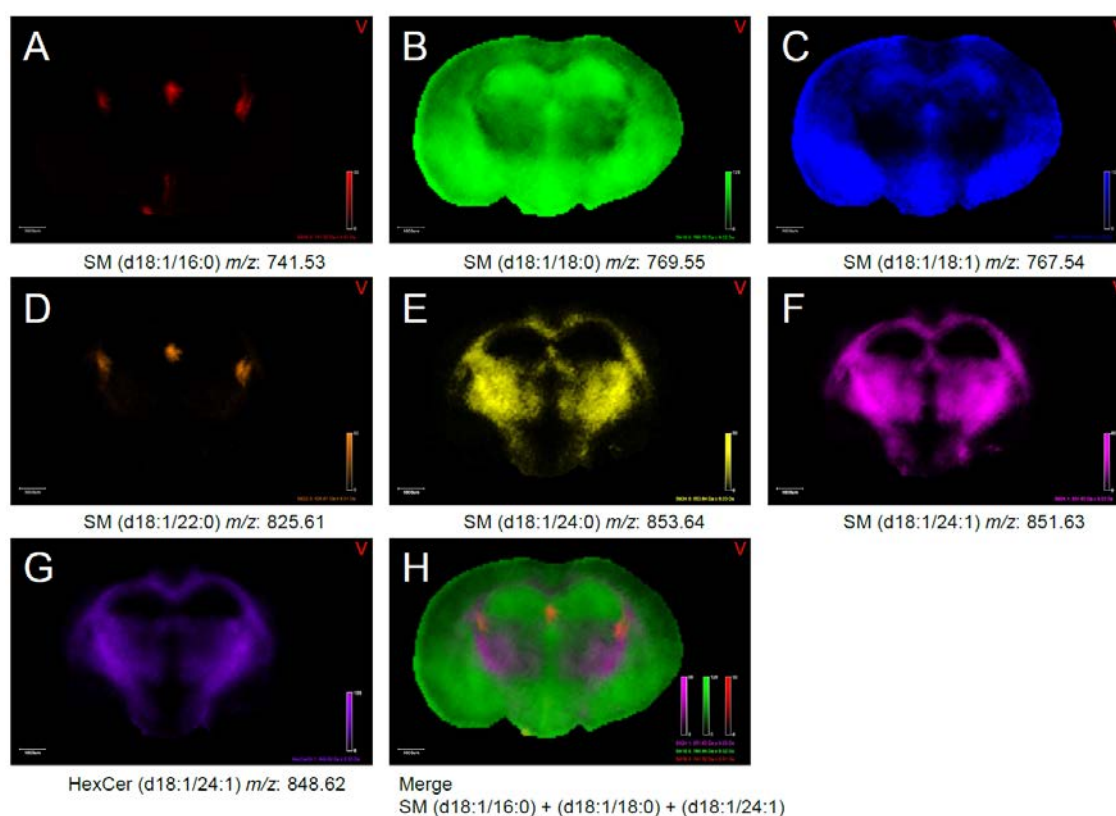


図 12. FTICR-IMS によるマウス前脳切片における SM 分子種の可視化. SM (d18:1/16:0) (A), SM (d18:1/18:0) (B), SM (d18:1/18:1) (C), SM (d18:1/22:0) (D), SM (d18:1/24:0) (E), SM (d18:1/24:1) (F), HexCer (d18:1/24:1) (G) および SM (d18:1/16:0), SM (d18:1/18:0), SM (d18:1/24:1) のマージ画像 (H) を示す. スケールバー = 1 mm. SM 分子がアシル基の鎖長ごとに異なった脳内分布を示している.

5. マウスの小脳切片を用いた MALDI-FTICR-MS による SM の検出

次に, マウスの小脳切片を用いて MALDI-FTICR-MS による SM および HexCer の検出を試みた. その結果, 前脳と同様に領域ごとに異なるパターン of マスペクトルが得られ, 6 ピークが SM ($[\text{SM (d18:1/16:0)+K}]^+$, $[\text{SM (d18:1/18:0)+K}]^+$, $[\text{SM (d18:1/18:1)+K}]^+$, $[\text{SM (d18:1/22:0)+K}]^+$, $[\text{SM (d18:1/24:0)+K}]^+$, $[\text{SM (d18:1/24:1)+K}]^+$), 1 ピークが $[\text{HexCer (d18:1/24:1)+K}]^+$ であると推定された (図 13B-E).

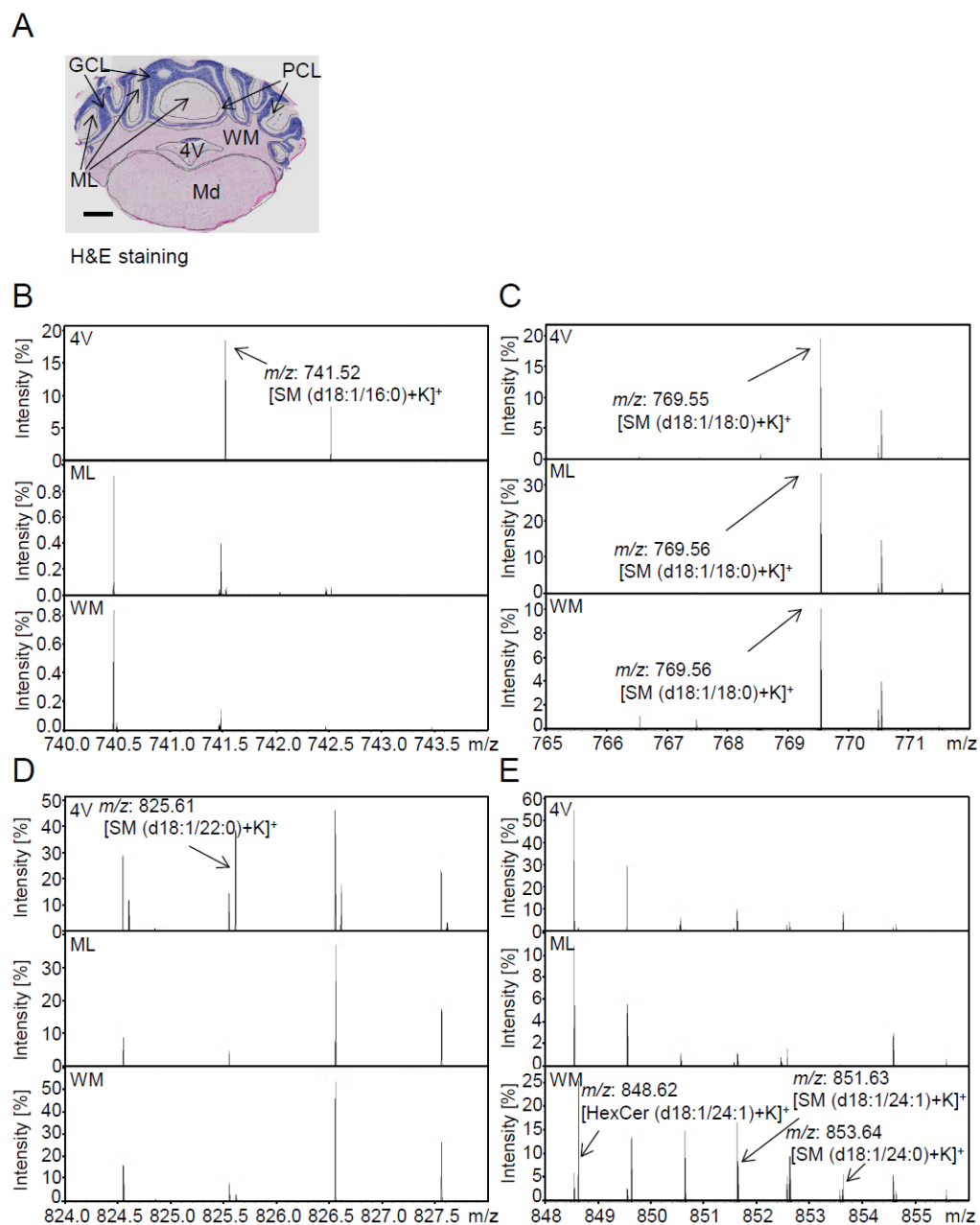


図 13. MALDI-FTICR-MS を用いてマウス小脳切片から取得した SM および HexCer のマススペクトル. 小脳切片の H&E 染色画像 (A). 第四脳室 (4V), 分子層 (ML) および白質 (WM) から得られた m/z 740–744 (B), 765–772 (C), 824–828 (D) and 848–856 (E) のマススペクトルを示す. スケールバー = 1 mm. 顆粒細胞層 (GCL), プルキンエ細胞層 (PCL), 延髄 (Md). 4V, ML, WM の領域毎に SM 分子の存在比率が異なる.

6. MALDI-FTICR-IMS を用いたマウス小脳切片上における SM 分子種の可視化

続いて, MALDI-FTICR-IMS を用いてマウス小脳切片上における SM 分子種の可視化を行った. その結果, SM (d18:1/16:0) と SM (18:1/22:0) は第四脳室に特徴的な分布を示した (図 14A, D). 一方, SM (d18:1/18:0) および SM (d18:1/18:1) は分子層, 顆粒細胞層およびプルキンエ細胞層に分布が見られた (図 14B, C). また, SM (d18:1/24:0), SM (d18:1/24:1), HexCer (d18:1/24:1) は白質や延髄に特徴的な分布を示した (図 14E–G). これらの結果から, SM は分子内のアシル基鎖長によって, 小脳においても前脳と同様に分布が明確に異なることが示された (図 14H).

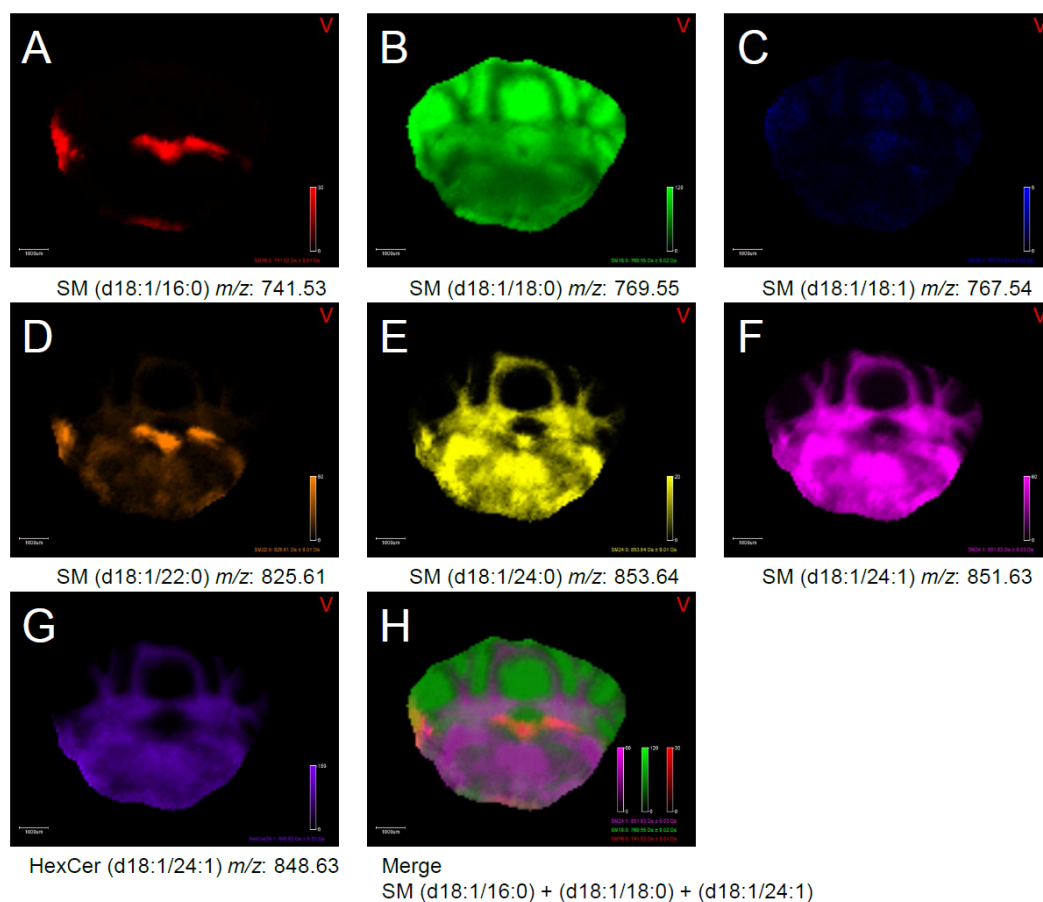


図 14. FTICR-IMS によるマウス前脳切片における SM 分子種の可視化. SM (d18:1/16:0) (A), SM (d18:1/18:0) (B), SM (d18:1/18:1) (C), SM (d18:1/22:0) (D), SM (d18:1/24:0) (E), SM (d18:1/24:1) (F), HexCer (d18:1/24:1) (G) および SM (d18:1/16:0), SM (d18:1/18:0), SM (d18:1/24:1)のマージ画像 (H) を示す. スケールバー = 1 mm. SM 分子がアシル基の鎖長ごとに異なった脳内分布を示している.

7. MALDI-FTICR-IMS と ISH を用いたマウス脳切片上における SM 分子種と CerS 遺伝子の組織内分布の比較

次に、マウスの脳切片上において SM が分子内アシル基の鎖長によって分布が異なるメカニズムを解明するため、ISH による CerS1 および CerS2 遺伝子の発現分布の評価を試みた。まず、試料の状態を確認するため陽性対照として *Gapdh* 特異的プローブを用いて ISH を行った。その結果、脳切片上において広範囲に *Gapdh* の発現が見られ、試料の状態は良好であることが確認された (図 15A)。次に、ISH によって非特異的なシグナルが検出されないことを確認するため、陰性対照としてプローブ無しの条件下で ISH を実施した。その結果、非特異的な

シグナルは検出されず，標的遺伝子特異的なプローブを用いることで標的遺伝子の特異的に検出できることが示された (図 15B).

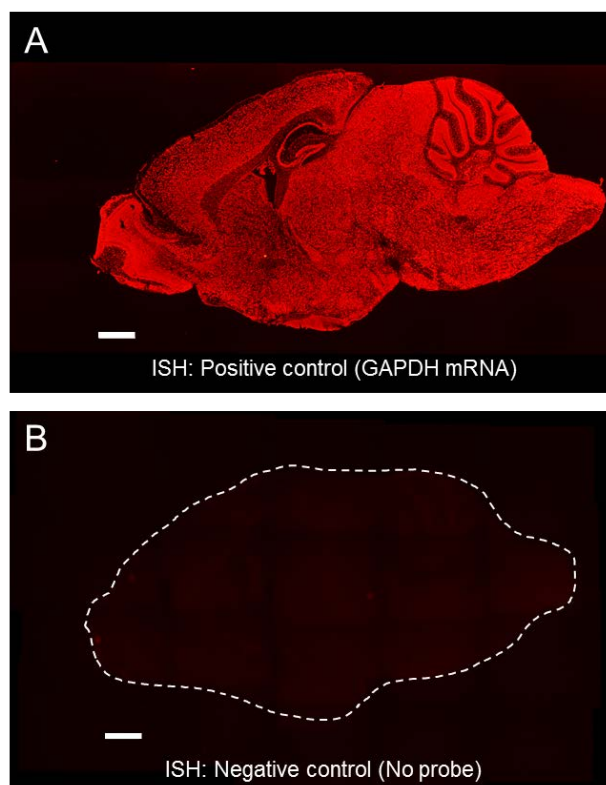


図 15. ISH を用いた陽性対照 (*Gapdh*) と陰性対照 (プローブ無し) のマウス脳切片上におけるシグナルの検出. *Gapdh* に対する特異的プローブおよびプローブ無しにおいて取得した ISH 画像を示す. スケールバー = 1 mm. *Gapdh* に対するプローブでは良好なシグナルが得られているが，プローブ無しでは非特異的なシグナルは得られていない.

続いて，KB 染色によって灰白質と白質の識別を行った (図 16B, C). その結果，ニューロン特異的に存在するニッスル小体が CV によって染色され (図 16C, 黒矢印で示す)，髄鞘特異的に存在するミエリンが LFB によって染色された (図 16C, 白矢じりで示す). 続いて，ISH を用いて *CerS1* および *CerS2* の発現分布を，MALDI-FTICR-IMS を用いて SM (d18:1/18:0) および SM (d18:1/24:1) の分布をそれぞれ評価し，両者の組織内分布を比較した. その結果，*CerS1* と SM (d18:1/18:0) は主に CV 陽性の灰白質に分布が見られ，顆粒層，海馬，視床下部，尾状核被殻，前嗅核，腹側線条体，黒質および大脳皮質に分布した (図 16B, D, F). 対照的に，

CerS2 と *SM* (d18:1/24:1)は LFB 陽性の白質に分布が見られ、脳梁、海馬采、中脳、橋、延髄、前交連および視索に分布した (図 16B, E, G). これらの結果から、*SM* 分子種ごとの組織内分布は、対応するアシル CoA を基質とする *CerS* の発現分布によって制御されている可能性が示された。

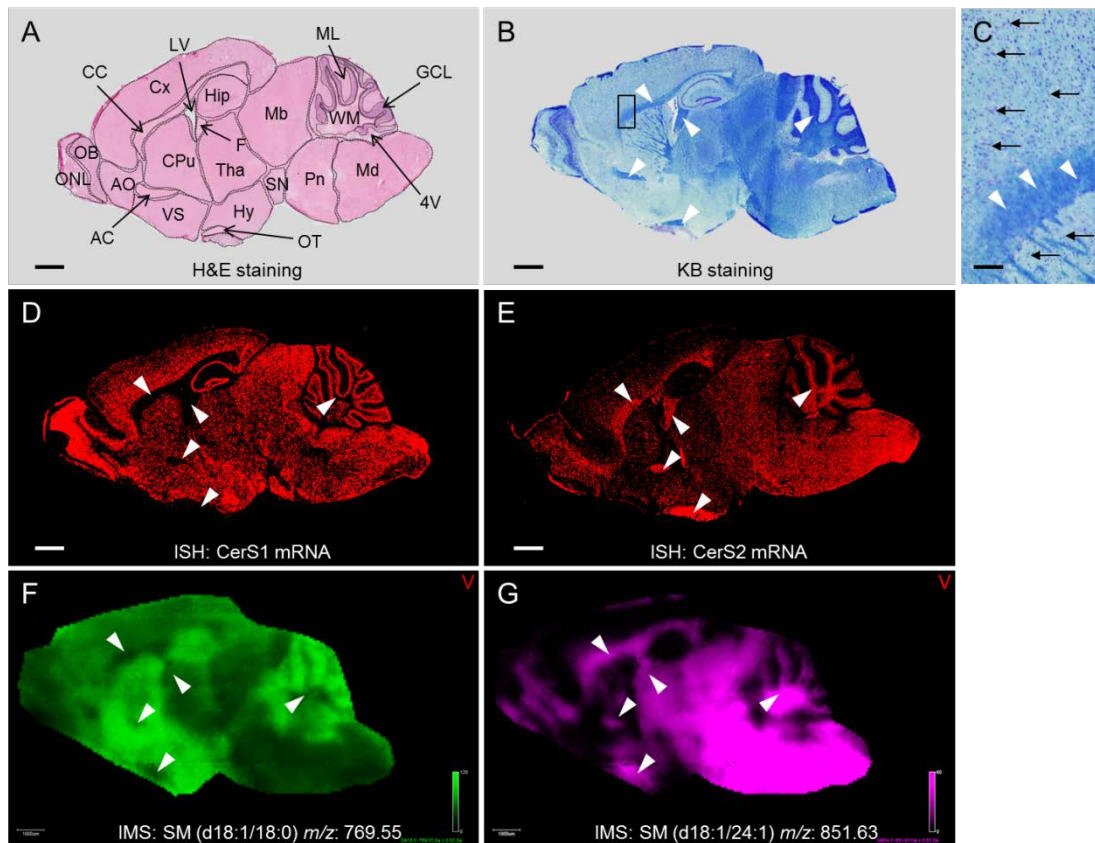


図 16. マウス脳切片上における *CerS* 遺伝子と *SM* 分子種の分布の比較. マウス脳切片の H&E 染色 (A) および KB 染色 (B, C) 像. CV 陽性ニッスル小体 (黒矢印) と LFB 陽性髄鞘 (白矢じり) を示す. ISH により可視化した *CerS1* (D) および *CerS2* (E) の分布. MALDI-FTICR-IMS により可視化した *SM* (d18:1/18:0) (F) および *SM* (d18:1/24:1) (G) の分布. A, B, D, E, F および G はスケールバー = 1 mm for, C はスケールバー = 200 μ m. 顆粒細胞層 (GCL), 海馬 (Hip), 視床下部 (Hy), 尾状核被殻 (CPu), 前嗅核 (AO), 腹側線条体 (VS), 黒質 (SN), 大脳皮質 (Cx), 脳梁 (CC), 中脳 (Mb), 橋 (Pn), 延髄 (Md), 前交連 (AC) および視索 (OT), 脳弓 (F), 嗅神経層 (ONL), 嗅球 (OB). *CerS1* と *SM* (d18:1/18:0) は主に灰白質に分布が見られ, *CerS2* と *SM* (d18:1/24:1) は主に白質に分布が見られる.

8. HepG2 細胞における CerS2 および SMS2 遺伝子ノックダウンによる SM 分子種の応答性の確認

MALDI-FTICR-IMS と ISH を用いた検証により見出した事実を証明するため、*in vitro* の系において CerS 遺伝子をノックダウンした際に特定の SM 分子種が減少するか否かの検討を行った。神経細胞は siRNA を用いたノックダウンの条件設定が困難であったため、CerS2 が高発現する HepG2 細胞を用いて CerS2 遺伝子をノックダウンした際の SM 分子種の応答を検証した。HepG2 細胞を *CERS2* に対する 2 種類の異なる siRNA で処置したところ、いずれの siRNA 処置においても陰性対照に対して *CERS2* の発現量が顕著に減少した (図 17A)。予想した通り、CerS2 遺伝子のノックダウンによって C22 および C24 極長鎖アシル基を持つ SM が特異的に減少した (図 17B)。また、比較対象として、Cer のアシル基鎖長に対して基質特異性を示さない SMS2 遺伝子のノックダウンも行った。HepG2 細胞を *SGMS2* に対する 2 種類の異なる siRNA で処置したところ、いずれの siRNA 処置においても陰性対照に対して *SGMS2* の発現量が顕著に減少した (図 17C)。CerS2 のノックダウンとは異なり、SMS2 遺伝子のノックダウンによって複数の SM 分子種が普遍的に減少した (図 17D)。これらの結果から、SM の細胞内組成は SMS2 ではなく CerS2 によって制御されていることが示唆され、SM 分子種の組織内分布も同様のメカニズムによって制御されている可能性が示唆された。

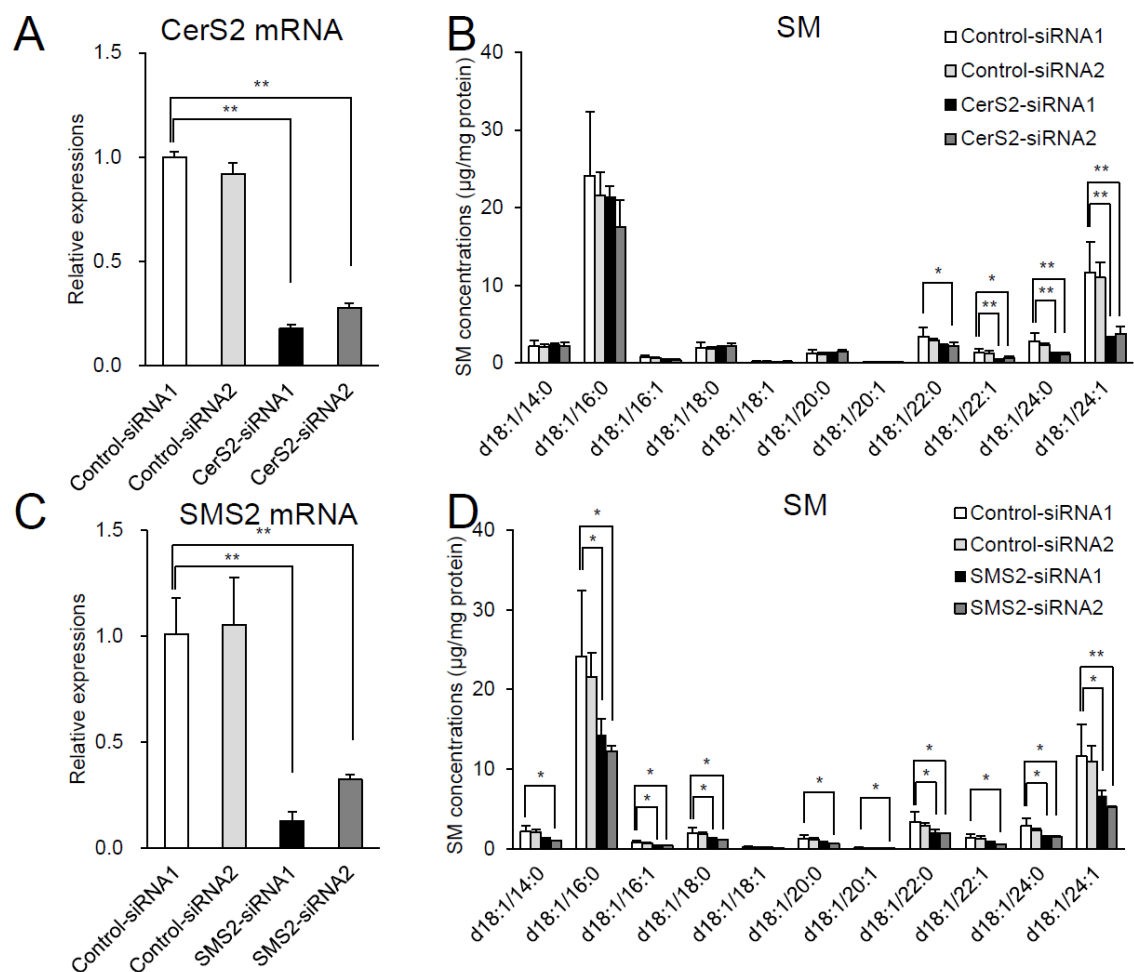


図 17. HepG2 細胞における CerS2 あるいは SMS2 遺伝子をノックダウンした際の SM 分子種の応答. 陰性対照 siRNA あるいは *CERS2* に対する特異的な siRNA で処置した際の細胞中 CerS2 発現量 (A) および SM 分子種含量 (B) を示す. 陰性対照 siRNA あるいは *SGMS2* に対する特異的な siRNA で処置した際の細胞中 *SGMS2* 発現量 (C) および SM 分子種含量 (D) を示す. データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した ($n=3$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$. *CERS2* をノックダウンすると C22 および C24 アシル基を持つ SM が減少するが, *SGMS2* をノックダウンすると SM が普遍的に減少する.

考察

SM はスフィンゴイド塩基に種々の鎖長のアシル基がアミド結合した構造を持つことから、多様な分子種が存在することが知られているが、その生理的意義は明らかにされていなかった。近年の LC/ESI-MS/MS 技術の飛躍的な進歩により、脂質の網羅的解析が可能となったことから、SM を含め SPL の組成が組織、細胞間さらには細胞内局在が異なることが明らかとされている^{21, 25}。このことから、SPL の組成は独自のメカニズムで制御され、分子内アシル基の鎖長によって生理機能が異なる可能性がある。組織学的解析による分布情報は、分子の生理機能を考察する上で重要であるが、これまで脂質は可視化が困難であった。本研究では、MALDI-FTICR-IMS を用いてマウスの脳切片上における SM 分子種を可視化し分布情報を得るとともに、それらの代謝酵素である CerS ファミリーの分布と比較した。

MALDI-IMS は標的分子を認識するプローブが必要ないことから、生体内脂質の可視化に有用であると期待されている。しかしながら、生体内には類似した質量の分子が多く存在するため、一般的な TOF-MS の質量分解能では特定の標的分子を特異的に検出する事が困難な場合がある。一方で、高質量分解能を有する FTICR-MS を用いることで、TOF-MS では判別困難であった脂質分子を特異的に検出できるものと期待されている^{63, 64}。そこで、まず本研究では MALDI-FTICR-IMS を用いて SM 標品および組織切片を用いて SM の検出感度と特異性を確認した。SM 標品を用いた検討では、得られたマススペクトルと SM 分子種の同位体分布理論値との比較、MS/MS による構造解析の結果から、MALDI-FTICR-MS は目的分子を特異的に検出できていることを確認した。一方で、MALDI-FTICR-MS の検出感度では、MS/MS による構造解析からホスホコリンの有無しか決定できないため、LC/ESI-MS/MS による構造解析を組み合わせることで、分子の同定精度をより高めることが可能であることを確認した。また、MADLI-MS はしばしば定量精度が問題視されるが、SM 標品を用いて脂質濃度とシグナル強度の間に良好な直線関係を確認した。したがって、同一測定内であれば MALDI-FTICR-MS で得られたイオンのシグナル強度は標的分子の存在量を反映し、定性的な評価が可能であるものと推察された。

また、本研究では、IMS を用いて、マウスの脳切片上において SM (d18:1/18:0) が灰白質に、SM (d18:1/24:0) や SM (d18:1/24:1) が白質に分布することを明らかにした。Delvolve らは、MALDI-Linear Ion Trap-MS を用いた IMS によってラットの脳切片上で SM (d18:1/18:0) が灰白質に、SM (d18:1/24:1) が白質に分布することを報告している⁵⁹。これらの報告は本研究で得られた結果と相関するものである。これらの事実は、SM の分子内アシル基鎖長と組織内分布の関係が、手法や動物種に関わらず再現される結果であることを示している。しかしながら、SM 分子種の組織内分布がどのようなメカニズムで制御されているかについてはこれまで示されていなかった。

SPL の組成が組織や細胞間で異なることはよく知られている²¹。例えば、C24 極長鎖アシル基を持つ SM や Cer は肝臓や腎臓の主要な分子種であり⁴⁹⁻⁵¹、C18 長鎖アシル基を持つ SM や Cer は脳や骨格筋の主要な分子種である²²。本研究においても同様の傾向が確認されている。一方で、アシル CoA の組成も組織間で異なるが、アシル CoA と Cer の組成は相関が見られないことが報告されている⁶⁹。これらの報告から、SM や Cer の組成はアシル CoA ではなく合成酵素の分布によって制御されている可能性が考えられる。SM は SMS1 あるいは SMS2 によって Cer から産生されるが、これらの酵素は Cer のアシル基鎖長に対して基質特異性は示さないとされている¹⁸⁻²⁰。対照的に、CerS は 6 種のアイソザイムが存在し、それぞれが独自の基質特異性と組織分布を示す^{12, 21}。例えば、CerS1 は C18 長鎖アシル CoA を基質として好み脳や骨格筋に発現するが、CerS2 は C22 および C24 極長鎖アシル CoA を基質とし、幅広い組織に発現する^{12, 21}。本研究においても、SM (d18:1/18:0) や Cer (d18:1/18:0) が高濃度に分布する前脳や小脳において CerS1 遺伝子の発現が見られたのに対し、これらの SPL が微量にしか存在しない肝臓や腎臓では CerS1 遺伝子の発現が非常に低いことを確認した。対照的に、SM (d18:1/24:1) や Cer (d18:1/24:1) はいずれの組織にも存在し、CerS2 遺伝子も全ての組織で発現が認められた。これらの結果は、組織間で CerS 遺伝子の発現分布と SM および Cer 分子種の組成は CerS の基質特異性の点で相関することを示しており、SM 分子種の分布は Cer の段階で CerS によって制御されている可能性が示唆された。

さらに、本研究では同様のメカニズムにより SM の組織内分布が制御されているという仮説を立て、MALDI-FTICR-IMS と ISH によって SM 分子種と CerS 遺伝子をそれぞれ可視化し、両者の脳内分布の比較を行った。CerS2 は主に白質に発現が見られ、視床、脳梁、海馬采、前交連および視索に強く発現していた。同様に、SM (d18:1/24:0) や SM (d18:1/24:1) もミエリンが豊富な白質に分布が見られた。対照的に、CerS1 は灰白質に広く発現しており、海馬、視床下部、尾状核被殻、前嗅核、腹側線条体、黒質および大脳皮質に発現が見られた。同様に、SM (d18:1/18:0) も神経細胞が豊富な灰白質に分布していた。本研究では組織中の存在量と分子のイオン化効率の問題で MALDI-FTICR-IMS を用いて Cer を可視化することはできなかったが、Roux らは銀ナノ粒子と MALDI-LTQ-Orbitrap-MS を用いた IMS によってマウスの脳切片で Cer (d18:1/18:0) が灰白質に分布し、Cer (d18:1/24:1) が白質に分布することを報告している⁷⁰。このことから、SM 分子種の脳内分布は Cer の段階で CerS によって制御されている可能性が示唆された。さらに、HepG2 細胞において CerS2 をノックダウンすると、対応する極長鎖アシル基を持つ SM のみが減少したことから、本研究の仮説が一部証明されたものと考えられる。

SM のアシル基と CerS との関係性を明らかにする上で、GSL の組織内分布に関する情報は重要である。GSL は特に脳において、SM と並んで Cer の主要な代謝物である。一部の Cer は脳の小胞体において UDP-ガラクトースセラミド転移酵素 (Cgt) の活性で GalCer に変換されるが、その他の Cer は輸送小胞によりシスゴルジ装置に輸送され、Ugcg の活性により GlcCer に変換された後、トランスゴルジ装置に輸送される過程で LacCer, GM3 へと変換されていく^{9, 13-15}。通常、MALDI-FTICR-MS や LC/ESI-MS/MS では GalCer と GlcCer の区別はできないため HexCer として同定されるが、脳において主要な HexCer は GalCer であり、肝臓や腎臓において主要な HexCer は GlcCer であることが報告されている^{22, 51}。また、GlcCer とそれに続く LacCer やガングリオシドは主に C18 長鎖アシル基を持つものに対し、GalCer とそれに続くスルファチドは C22 や C24 極長鎖アシル基を持つことが知られている⁷¹。本研究では、MALDI-FTICR-IMS を用いて HexCer (d18:1/24:1) が SM (d18:1/24:0) や SM (d18:1/24:1) と同様に脳の白質に分布することを示した。また、後藤らが金ナノ粒子と MALDI-TOF-MS を用いてマウス脳

切片上の GSL を可視化した報告では、C24 アシル基を持つスルファチドが白質に分布し、C18 アシル基を持つガングリオシド (GM3 (d18:1/18:0), GM2 (d18:1/18:0), GM1 (d18:1/18:0) および GD1 (d18:1/18:0)) が灰白質に分布することが示されている⁷¹。その上、Ugcg は C18 アシル基を持つ LacCer やガングリオシドが豊富な灰白質に高発現することが報告されており⁷², Cgt は C24 アシル基を持つ GalCer やスルファチドが豊富な白質に高発現することが報告されている⁷³。これらの事実から、GSL も SM と同様、組織内分布は分子内アシル基鎖長に基づいて CerS により Cer の段階で決定されているものと考えられる。

これら SPL の分子の多様性の意義は未だ十分には解明されていないが、C18 長鎖アシル基を持つ SPL は脳において神経細胞が豊富な灰白質に、C24 極長鎖アシル基を持つ SPL はシュワン細胞とミエリン豊富な白質にそれぞれ特徴的な分布を示す。Ginkel らは CerS1 KO マウスを作製し、CerS1 を欠損させることで C18 アシル基を持つ Cer, SM およびガングリオシドが著しく減少し、オリゴデンドロサイトミエリン糖タンパク質の発現も減少することを報告した²²。一方、CerS2 を欠損させたマウスでは、C24 極長鎖アシル基を持つ Cer, SM および GalCer が減少し、髄鞘の形成不全が起こることが報告されている^{51, 74}。これらの知見から、C18 アシル基を持つ SPL はオリゴデンドロサイトの機能維持に、C24 アシル基を持つ SPL は髄鞘の構造維持にそれぞれ重要な脂質であることが示唆される。しかしながら、SM 特異的な生理機能については解明されておらず、今後の更なる研究が必要である。

結論

本研究では, MALDI-FTICR-IMS を用いてマウスの脳切片上における SM 分子種の可視化を行い, ISH を用いて CerS 遺伝子の発現分布との比較を行った. その結果, SM は分子内アシル基の鎖長によって脳内分布が異なり, 対応する CerS 遺伝子の分布と相関することが明らかとなった. 本研究により得られた知見は, MALDI-FTICR-IMS が組織切片上における SM の可視化に有用な手法であることを証明するとともに, 酵素レベルで厳密に分布が制御された各 SM 分子は特定臓器の高次構造や機能維持に重要な役割を果たしていることを示唆したという点で有意義である.

第 2 章

スフィンゴミエリン合成酵素 2 の標的
組織の探索と脂肪肝およびインスリン
抵抗性における役割の解明

緒言

内臓脂肪の過剰蓄積は異所性脂肪蓄積とそれに付随する臓器障害を引き起こす。WAT から放出される FFA や DG は、肝臓において肝機能障害やインスリン抵抗性を引き起こす他、骨格筋でのインスリン抵抗性や腎機能障害に関与することも指摘されている⁴⁰⁻⁴⁵。さらに、近年、FFA や DG のみならず Cer や GM3 などの SPL も肥満やインスリン抵抗性に関与することが相次いで報告されている⁴⁶⁻⁴⁸。

SPL の一つである SM はマイクロドメインの形成や細胞内シグナル伝達の制御に重要である他、ニーマンピック病をはじめとした種々の疾患への関与が報告されている生理活性脂質である^{20,32}。しかしながら、SMS1 KO マウスは耐性致死の増加、ミトコンドリア機能異常による白色脂肪組織の減少や膵β細胞でのインスリン産生能の低下が報告されており^{33,34}、創薬の標的としては難易度が高いと予想される。一方で、SMS2 KO マウスでは目立った表現型は見られず、HFD 負荷によって惹起される肥満、インスリン抵抗性および脂肪肝が抑制されることが報告されている³⁵⁻³⁷。そのメカニズムの一部として、SMS2 KO マウスでは肝臓中の総 SM 含量が減少し、マイクロドメインを介して脂肪酸トランスポーターである cluster of differentiation 36 (CD36) /脂肪酸トランスロカーゼ (FAT) による脂肪酸の取り込みが抑制されることが報告されている^{35,36}。また、ヒト SMS2 を肝臓に過剰発現させたマウスでは肝臓中の総 SM 含量が増加し、HFD により惹起される脂肪肝が憎悪することが明らかとなっている^{37,75}。そのメカニズムは十分に解明されていないが、SMS2 KO マウス由来の肝細胞は WT マウス由来の肝細胞に比べてインスリンシグナルが亢進し、それには形質膜上の SM/Cer 比の低下が寄与していること、肝臓の SMS2 が直接肝脂肪蓄積を制御していることが報告されている^{36,37}。

近年、CerS ファミリーの KO マウスの表現型に関する報告が相次いでなされており、Cer のアシル基鎖長が脂肪肝やインスリン抵抗性の発症に対して異なる作用を示すことが明らかとなっている。CerS6 KO マウスは WT マウスに比べて HFD 誘導性のインスリン抵抗性や脂肪肝が軽減されたことから、C16-Cer がインスリン抵抗性や脂肪肝の憎悪に関与することが指摘されている⁷⁶。一方、CerS2

KO マウスは WT マウスに比べて HFD 誘導性のインスリン抵抗性が悪化したこと、CerS2 ヘテロ接合 (Het) KO マウスは WT マウスに比べて HFD 誘導性の肥満や脂肪肝が悪化したことから、C22 あるいは C24 極長鎖アシル基を持つ Cer がインスリンシグナルを正に制御する可能性が指摘されている^{77,78}。これらの知見から、Cer を含む SPL のインスリン抵抗性や脂肪肝発症への寄与においてアシル基の鎖長が重要であることが示唆される。

LC/ESI-MS/MS は脂質分子の網羅的解析に汎用されるゴールドスタンダードであり、脂質分子の生理機能の解明が飛躍的に進んでいる^{29,30}。これらの手法は分子の位置情報を得ることができないが、我々は第 1 章の研究において MALDI-FTICR-IMS を用いた SM の可視化に成功しており、SM はアシル基の鎖長に応じて脳内の分布が異なることを明らかとし、SM も Cer と同様、アシル基の鎖長によって生理機能が異なる可能性を提示した。LC/ESI-MS/MS を用いた SPL の量的・質的変動の解析に MALDI-FTICR-MS を用いた空間的変動の解析を組み合わせることは、SMS2 の標的組織を探索する上で非常に有用であると考えられる。

そこで第 2 章では、1) 組織学的手法、生化学的手法により SMS2 KO マウスの脂肪肝やインスリン抵抗性をはじめとする表現型を確認すること、2) リピドミクス等の手法を用いて SMS2 の標的組織ならびにそれらの組織における脂質変化を探索するとともに、脂肪肝等の表現型への関与を解明することを目的とした。

実験方法

1. 動物

本研究の動物実験は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」および「塩野義製薬株式会社 動物実験適正運用委員会」に承認された実験計画書に則り実施した。塩野義製薬株式会社における動物実験は国際実験動物ケア評価認証協会に承認された動物実験施設内で実施した。

SMS2 KO マウスは共同研究者の五十嵐らが過去の報告に記載された手法で C57BL/6N バックグラウンドを用いて作製した系統を使用した³⁵。同系統の SMS2 Het KO マウスを塩野義製薬株式会社油日ラボラトリーズ (Aburahi, Japan) に導入し、同系交配して得られた WT あるいは SMS2 KO マウスをそれぞれ同系交配して維持されたものを使用した。これらの雄性マウスを北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設内動物飼育室あるいはアイソトープ総合センター内動物飼育室に搬入し、温度および湿度を一定に制御した飼育環境下において 12 時間あるいは 13 時間明-11 時間暗の照明周期で 1 週間馴化飼育した。

SMS2 肝臓特異的 KO (LcKO) マウスは共同研究者の奥田らが作製した系統を使用した。loxP-floxed (fl) SMS2 マウスを作製するため、過去に報告された方法により相同遺伝子組換え用ベクターを作製した (図 18A)^{79, 80}。得られたターゲティングベクターはマウス胚性幹 (ES) 細胞に導入した⁸¹。組換えクローンと思われる ES 細胞は標的配列に特異的なプライマー (forward 5'-TTCCTGACTAGGGGAGGAGTAGAAG-3', reverse 5'-ACCATATGGTGGAGCCAAAATGG-3') を用いて確認した。キメラマウスは過去に報告された方法で作製した^{81, 82}。得られた雄性のキメラマウス (SMS2^{fl/+}) は雌性の CAG-FLPe Het トランスジェニックマウス⁸³ と交配し、得られた SMS2^{ΔNeofl/+}; FLPe^{tg/+} マウスは CAG-FLPe を除去するために WT マウスと交配した。得られた SMS2^{ΔNeofl/+} マウスは同系交配し、ホモ接合性の SMS2^{ΔNeofl/ΔNeofl} マウスを得た。また、雄性のヘテロ接合性 SMS2^{fl/+} マウスを雌性の CMV-Cre トランスジェニックマウス⁸⁴ と交配し、SMS2 Het KO (SMS2^{+/-}; CMV-Cre^{tg/+}) マウスを得た。CMV-Cre を除去しアルブミン (Alb)-Cre を導入するため、SMS2^{+/-}; CMV-Cre^{tg/+} マウスを Alb-Cre トランスジェニック (Alb-Cre^{tg/tg}) マウス⁸⁵ と交配

した. SMS2 LcKO ($\text{SMS2}^{\Delta\text{Neofl}/-}; \text{Alb-Cre}^{\text{tg}/+}$) マウスを得るために, $\text{SMS2}^{+/-}; \text{Alb-Cre}^{\text{tg}/+}$ マウスと $\text{SMS2}^{\Delta\text{Neofl}/\Delta\text{Neofl}}$ マウスを交配した. 得られたマウスの遺伝子型は標的遺伝子特異的なプライマー (forward 5'-ATTAAAATATTGGATCCAGGCGTG-3', reverse 5'-GAGTATGCTAGGTTGCAGCTAATTC-3') を用いて調べた (図 18B). 各組織における *Sgms2* の発現量を調べたところ, 肝臓においてのみ *Sgms2* が欠損していた (図 18C). CAG-FLPe トランスジェニックマウス (C57BL/6-Tg(CAG-flpe)36Ito/ItoRbr) はナショナルバイオリソースプロジェクトを通して RIKEN BRC (Wako, Japan) から入手した. CMV-Cre (B6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn/J) あるいは Alb-Cre (B6.Cg-Tg(Alb-cre)21Mgn/J) トランスジェニックマウスは Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から入手した.

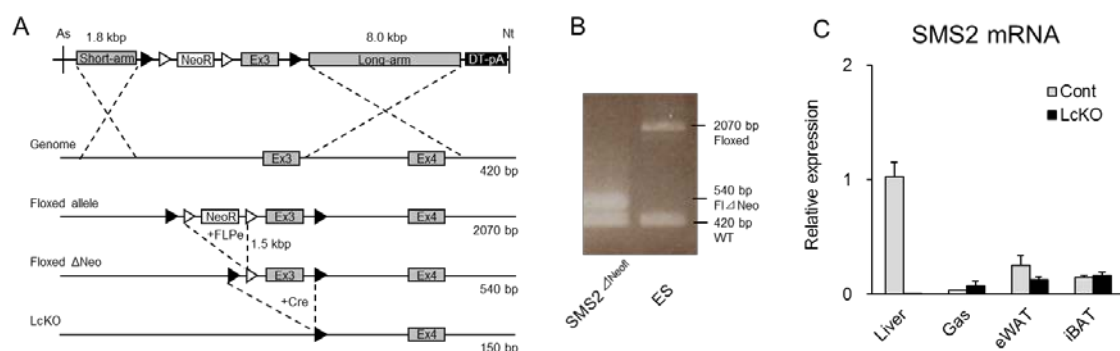


図 18. SMS2 LcKO マウスの作製法. ターゲッティングベクターの模式図を示す (A). *Sgms2* 遺伝子の Exon3 の両端に loxP を導入した. 黒三角は loxP, 白三角は FRT を表す. 得られた $\text{SMS2}^{\Delta\text{Neofl}}$ マウスと ES 細胞の遺伝子型判定の結果を示す (B). 肝臓, 腓腹筋 (Gas), 副睾丸周囲白色脂肪組織 (eWAT) および肩甲骨間褐色脂肪組織 (iBAT) における *Sgms2* の発現量を示す. データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n=4/\text{群}$) で表す. 肝臓においてのみ SMS2 が欠損している.

2. SMS2 KO マウスにおける代謝実験

WT および SMS2 KO マウス (6–8 週齢) に ND あるいは HFD (34.9% fat, 58Y1; TestDiet, St. Louis, MO) を 3–23 週間与え, 体重を週 1 回 12 週間測定した. 飼料および水は自由摂取させた. その後, IMS および LC/ESI-MS/MS を用いた脂質解析を行うため, 一部の動物を 10 週齢時に 16 時間絶食した後, イソフルラン麻酔下で解剖し, 組織を採取した. 採取した組織は粉末ドライアイス上で凍結し,

実験に使用するまで -80°C で保存した。また、残りの動物において OGTT を 17 週齢, ITT を 19 週齢でそれぞれ施行した。 ^{18}F -FDG を用いた糖代謝の評価は 20–21 週齢で実施した。各組織におけるインスリンシグナルの評価は 15 または 31 週齢で行った。血液および組織の採取は 15, 20 または 31 週齢において 16 時間絶食後にイソフルランによる吸入麻酔下で行った。血液は 5 mM EDTA を加えて 13,000 $\times g$, 4°C で 3 分間遠心分離し、血漿を回収した。血漿と組織サンプルは瞬間凍結し解析を行うまで -80°C で保存した。

3. SMS2 Het KO マウスにおける代謝実験

WT および SMS2 Het KO マウス (5–10 週齢) に HFD を 10 週間与え、体重を週 2 回 4 週間測定した。OGTT は 20 週齢で実施した。血液および組織の採取は 15, 20 または 31 週齢において 16 時間絶食後にイソフルランによる吸入麻酔下で行った。血液は 5 mM EDTA を加えて 13,000 $\times g$, 4°C で 3 分間遠心分離し、血漿を回収した。血漿と組織サンプルは瞬間凍結し解析を行うまで -80°C で保存した。

4. SMS2 LcKO マウスにおける代謝実験

対照 (SMS2 Het KO) および SMS2LcKO マウス (6–7 週齢) に HFD を 32 週間与え、体重を週 1 回 10 週間測定した。OGTT は 20–21 週齢, ITT は 25–26 週齢で実施した。血液および組織の採取は 31–32 週齢において 16 時間絶食後にイソフルランによる吸入麻酔下で行った。血液は 5 mM EDTA を加えて 13,000 $\times g$, 4°C で 3 分間遠心分離し、血漿を回収した。血漿と組織サンプルは瞬間凍結し解析を行うまで -80°C で保存した。

5. 経口糖負荷試験 (OGTT) およびインスリン負荷試験 (ITT)

OGTT においては、マウスを 16 時間絶食し、グルコース溶液 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を SMS2 KO マウスにおける代謝実験では 2 g/kg, SMS2 Het KO マウスおよび SMS2 LcKO マウスにおける代謝実験では 1 g/kg でそれぞれ経口投与した。ITT においては、マウスを 5 時間絶食し、インスリン溶液 (Humulin R, Eli Lilly & Co., Indianapolis, IN) を ND 給餌条件下では 0.3 U/kg, HFD 給餌条件下では 0.75 U/kg でそれぞれ腹腔内投与した。グルコースま

たはインスリン溶液投与前後 (0, 15, 30, 60, 90 および 120 分後) に採血し, 血糖値と血漿インスリン値を測定した.

6. 脂質の抽出と LC/ESI-MS/MS を用いた測定

SMS2 KO マウスおよび SMS2 LcKO マウスにおける代謝実験では, 総脂質および SPL を第 1 章で述べた方法を用いて抽出した. 内部標準は SM (d18:1/16:0-d31), Cer (d18:1/16:0-d31), TG (17:0/17:1/17:0-d5) および GlcCer (d18:1/17:0) を用いた. また, LC/ESI-MS/MS を用いた脂質の測定および同定も第 1 章で述べた方法に準じて実施した. SM, Cer および GlcCer は標品を用いて定量し, 組織中含量においては $\mu\text{g/g tissue dry weight}$, 血漿中含量においては $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ表した. TG および DG の組織中含量においては内部標準に対する面積比で表した.

SMS2 Het KO マウスにおける代謝実験では, 水分を含んだ組織を用いて第 1 章で述べた方法に従い SPL を抽出した. LC/ESI-MS/MS による解析は UPLC system (Waters Corp.) と API5000 triple quadrupole mass spectrometer (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) を用いて実施した. 脂質の分離は Acquity UPLC BEH C18 column (100 $\times$ 2.1 mm i.d., 1.7 μm ; Waters Corp.) を用い, LC は移動相 A (水, 1% 酢酸アンモニウム, 0.1% ギ酸, 0.00005% リン酸の混合液) と移動相 B (50% アセトニトリル, 50% 2-プロパノール, 1% 酢酸アンモニウム, 0.1% ギ酸の混合液) を用いたリニアグラジエントで行い, 流速は 0.6 mL/min とした. グラジエントは 0–0.5 分 (25% B), 0.5–2 分 (65% B), 2–6.5 分 (85% B), 6.5–7.5 分 (95% B), 7.5–8.5 分 (99% B) の設定で実施した. SM および Cer の定量解析は Analyst 1.4 data system (AB SCIEX) を用いて行った.

また, いずれの実験においても肝臓中 TG 含量は項目 8 に記載の通り, トリグリセリド E-テストワコー (Wako Pure Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan) による測定も実施した.

7. MALDI-FTICR-IMS

凍結組織切片の作製および MALDI-FTICR-IMS は第 1 章の実験方法に記載さ

れたプロトコルで行った.

8. 生化学的解析

血糖値は Precision Exceed (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) を用いて測定した. 血漿インスリン値は超高感度マウスインスリン測定キット (Morinaga Institute of Biological Science, Inc., Yokohama, Japan) で測定した. HOMA-R は過去の報告に準じて算出した⁸⁶. TG, 総コレステロール (TC) および非エステル化脂肪酸 (NEFA) の血漿あるいは組織抽出物中濃度はトリグリセリド E-テストワコー (Wako Pure Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan), コレステロール E-テストワコー (Wako Pure Chemical Co., Ltd.) および NEFA C-テストワコー (Wako Pure Chemical Co., Ltd) を用いて測定した. 血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) とアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 濃度はトランスアミナーゼ CII-テストワコー (Wako Pure Chemical Co., Ltd.) で測定した.

9. RNA の抽出とリアルタイム PCR

動物組織からの総 RNA の抽出とリアルタイム PCR は第 1 章の実験方法に記載されたプロトコルで行った. 逆転写は PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio Inc.) を用いて製造業者のプロトコルに従い行った. リアルタイム PCR に用いたプライマーは第 1 章の表 1 および本章表 4 に示した配列を使用した. 目的遺伝子の発現量は *Rn18s* あるいは *Gapdh* の発現量で補正し, ND を与えた WT マウスに対する発現比率で表示した. 各組織の *Sgms1* と *Sgms2* の発現量は, *Sgms1* に対する発現比率で表示した.

表 4. リアルタイム PCR に用いたプライマーの一覧.

Primers	Sequences 5'-3'
<i>Rn18s</i> Forward	TTCTGGCCAACGGTCTAGACAAC
<i>Rn18s</i> Reverse	CCAGTGGTCTTGGTGTGCTGA
<i>Sgms1</i> Forward	ACCACCGTGTGCTTCTGTATCCTA
<i>Sgms1</i> Reverse	AAATGGCTTACAGCCCTGTCTTTG
<i>Sgms2</i> Forward	GATTACTTCGACCGGGTCAA
<i>Sgms2</i> Reverse	GCACAGGTAACGTAGTGACA

<i>Elovl1</i> Forward	TCCCTTTGAACCCTTCACTGCT
<i>Elovl1</i> Reverse	ATCAGCTCGTGGTACAAGTTCACAA
<i>Elovl2</i> Forward	GCAGCTGAAGGCCTTTGATAATG
<i>Elovl2</i> Reverse	AGGTAAGAGTCCAGCAGGAACCAC
<i>Elovl3</i> Forward	TGGTCCTTCTTCCTGGCAAT
<i>Elovl3</i> Reverse	AGGATGATGAAGGCCGTGT
<i>Elovl4</i> Forward	GAGTTCTATCGCTGGACCTGGAC
<i>Elovl4</i> Reverse	AGAGCGTGCTTATGCTTATCGTTG
<i>Elovl5</i> Forward	ACATCTGGTGGTTTGTGATGAACTG
<i>Elovl5</i> Reverse	TGAGGACATGGATGAAGCTGTTG
<i>Elovl6</i> Forward	TCAACGAGAACGAAGCCATCC
<i>Elovl6</i> Reverse	AGTCAGCGACCAGAGCACGA
<i>Elovl7</i> Forward	CAATGGGACCAGCCTACCAGA
<i>Elovl7</i> Reverse	TCTGGCCTATGTGGATAGTGACAAG
<i>Smpd1</i> Forward	TGGGACTCCTTTGGATGGG
<i>Smpd1</i> Reverse	CGGCGCTATGGCACTGAAT
<i>Ugcg</i> Forward	GGAATGGCCTTGTTTCGGCT
<i>Ugcg</i> Reverse	CGGCTGTTTGTCTGTTGCC
<i>Gba</i> Forward	GCCAGGCTCATCGGATTCTTC
<i>Gba</i> Reverse	CACGGGGTCAAGAGAGTCAC
<i>Mttp</i> Forward	CTCTTGGCAGTGCTTTTTCTCT
<i>Mttp</i> Reverse	GAGCTTGTATAGCCGCTCATT
<i>Sreb1</i> Forward	TGACCCGGCTATTCCGTGA
<i>Sreb1</i> Reverse	CTGGGCTGAGCAATACAGTTC
<i>Fasn</i> Forward	GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT
<i>Fasn</i> Reverse	TGGGTAATCCATAGAGCCCAG
<i>Scd1</i> Forward	CTGGCACATCAACTTCACCA
<i>Scd1</i> Reverse	TCAGCTACTCTTGTGACTCC
<i>Dgat1</i> Forward	TCCGTCCAGGGTGGTAGTG
<i>Dgat1</i> Reverse	TGAACAAAGAATCTTGACAGACGA
<i>Dgat2</i> Forward	GCGCTACTTCCGAGACTACTT
<i>Dgat2</i> Reverse	GGGCCTTATGCCAGGAAACT
<i>Cd36</i> Forward	AATGAGACTGGGACCATTG
<i>Cd36</i> Reverse	AAGCAACAAACATCACCAC

<i>Ppara</i> Forward	GATTGTGCACGTGCTTAAGC
<i>Ppara</i> reverse	GACTCGGTCTTCTTGATGAC
<i>Pgc1a</i> Forward	TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT
<i>Pgc1a</i> Reverse	CCACTTCAATCCACCCAGAAAG
<i>Cpt1a</i> Forward	CTCCGCCTGAGCCATGAAG
<i>Cpt1a</i> Reverse	CACCAGTGATGATGCCATTCT
<i>Cpt1b</i> Forward	GCACACCAGGCAGTAGCTTT
<i>Cpt1b</i> Reverse	CAGGAGTTGATTCCAGACAGGTA
<i>Fabp3</i> Forward	ACCTGGAAGCTAGTGGACAG
<i>Fabp3</i> Reverse	TGATGGTAGTAGGCTTGGTCAT
<i>Insr</i> Forward	AGAACAAGGCTCCTGAGAG
<i>Insr</i> Reverse	GGGGATGTGTTTCATCATAG
<i>Slc2a4</i> Forward	ATCTTGATGACCGTGGCTC
<i>Slc2a4</i> Reverse	ATACTGGAAACCCATGCCG
<i>Pdha1</i> Forward	GAAATGTGACCTTCATCGGCT
<i>Pdha1</i> Reverse	TGATCCGCCTTTAGCTCCATC
<i>G6pc</i> Forward	AAGTTGCTCCCATTCCGCTT
<i>G6pc</i> Reverse	TTGTGTGTCTGTCCCAGGAT
<i>Pck1</i> Forward	CGGCTACATCCCTAAGGAAA
<i>Pck1</i> Reverse	GAGCTCCCTCTCAATTTTCGT
<i>Cs</i> Forward	GGACAATTTTCCAACCAATCTGC
<i>Cs</i> Reverse	TCGGTTCATTCCCTCTGCATA
<i>Sdhb</i> Forward	AATTTGCCATTTACCGATGGGA
<i>Sdhb</i> Reverse	AGCATCCAACACCATAGGTCC
<i>Cox5a</i> Forward	GCCGCTGTCTGTTCCATTC
<i>Cox5a</i> Reverse	GCATCAATGTCTGGCTTGTTGAA
<i>Hadha</i> Forward	TGCATTTGCCGCAGCTTTAC
<i>Hadha</i> Reverse	GTTGGCCCAGATTTTCGTTCA
<i>Ech1</i> Forward	GCTACCGCGATGACAGTTTC
<i>Ech1</i> Reverse	TCAGAGATCGAAGGCTGATGTT
<i>Cpt2</i> Forward	CAGCACAGCATCGTACCCA
<i>Cpt2</i> Reverse	TCCCAATGCCGTTCTCAAAAT
<i>Cact</i> Forward	GACGAGCCGAAACCCATCAG
<i>Cact</i> Reverse	AGTCGGACCTTGACCGTGT
<i>Ddit3</i> Forward	CTGGAAGCCTGGTATGAGGAT
<i>Ddit3</i> Reverse	CAGGGTCAAGAGTAGTGAAGGT

<i>Atf3</i> Forward	GAGGATTTTGCTAACCTGACACC
<i>Atf3</i> Reverse	TTGACGGTAACTGACTCCAGC
<i>Xbp1</i> Forward	AGCAGCAAGTGGTGGATTTG
<i>Xbp1</i> Reverse	GAGTTTTCTCCCGTAAAAGCTGA
<i>Ccl2</i> Forward	AGCAGCAGGTGTCCCAAAGA
<i>Ccl2</i> Reverse	GTGCTGAAGACCTTAGGGCAGA
<i>Tnfa</i> Forward	ACTCCAGGCGGTGCCTATGT
<i>Tnfa</i> Reverse	GTGAGGGTCTGGGCCATAGAA
<i>Il6</i> Forward	CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA
<i>Il6</i> Reverse	CCAGTTTGGTAGCATCCATCATTTC

10. 組織学的解析

第1章に示したプロトコルに従い H&E 染色を行った。

11. ウェスタンブロットによるインスリンシグナルの評価

ND あるいは HFD を与えた各マウスを 16 時間絶食し、イソフルランによる吸入麻酔下においてインスリン溶液 (Humulin R, Eli Lilly & Co.) を 125 U/kg で静脈内投与した。肝臓、腓腹筋および腸間膜白色脂肪組織 (mWAT) を 3, 5, 7 分後にそれぞれ採取し、各組織を瞬間凍結後、分析まで -80 °C で保存した。凍結組織は Pierce Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets (Thermo Fisher Scientific Inc.) および 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Thermo Fisher Scientific Inc.) を添加した RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific Inc.) 中でビーズ式ホモジナイザーを用いて破碎した。ホモジネイトは 13,000 ×g, 4 °C で 3 分間遠心分離し、上清を回収した。ライセートのタンパク質濃度は BCA Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて測定し、Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を加えて 100 °C で 3 分間還元させた。1 レーンあたり 8–40 µg 相当のタンパク質を e-PAGE (Atto Corp., Tokyo, Japan) にアプライし、4–20% SDS-PAGE を行った後、iBlot Dry Blotting System (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて polyvinylidene fluoride membrane に転写した。ブロッキングは ECL Prime Blocking Reagent (GE Healthcare UK Ltd., Amersham, UK) を用いて実施し、抗体は以下の抗体を用いた: anti-phospho Akt Ser⁴⁷³ (1:2,000, Cell Signaling Technologies, Beverly, MA), anti-Akt (1:1,000, Cell Signaling Technologies), anti-phospho-insulin receptor β subunit (IRβ) Tyr^{1162/1163} (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA),

anti-IR β (1:1,000, Cell Signaling Technologies) and anti-rabbit secondary antibody (1:5,000, Life Technologies). 化学発光は Amersham ECL Prime (GE Healthcare UK Ltd.) および ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare UK Ltd.) を用いて検出し, Multi Gauge software v3.1 (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan) で定量解析した. 各組織におけるインスリンシグナルは, リン酸化 IR β と総 IR β あるいはリン酸化 Akt と総 Akt の比率で算出した.

12. ^{18}F -FDG の血中クリアランスと組織取り込みの評価

^{18}F -FDG は Hokkaido University Hospital (Sapporo, Japan) より供給されたものを使用した. マウスは 16 時間絶食後にイソフルランで吸引麻酔した. ^{18}F -FDG 溶液 (17.8 ± 0.1 MBq/マウス) を静脈内投与した 1 分後にグルコース溶液 (2 g/kg) を経口投与した. ^{18}F -FDG 溶液の投与前および後 (1, 15, 30, 60, 90, 120 分) に採血を行い, 血糖値を測定した. また, 残りの血液は血漿を分離した後, インスリン値を測定した. PET-コンピューター断像撮影 (CT) スキャンは Inveon small-animal PET/SPECT/CT system (Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN) を用いて過去の方法に準じ^{87,88}, ^{18}F -FDG 投与 100 分後に実施した. PET スキャン中は, イソフルラン吸入麻酔下で各マウスの体温を 35.1 ± 0.1 °C に維持した. 各組織の ^{18}F -FDG 取り込みを評価するため, 過去の報告に従い standardized uptake value (SUV) を算出した⁸⁹. 各組織は ^{18}F -FDG 投与 120 分後に採取し, 重量を測定した. 血漿および各組織サンプルの放射活性は gamma counter (Wizard 3" 1480 Automatic Gamma Counter, PerkinElmer, Inc., Waltham, MA) で測定した. 各サンプルの放射活性は percent injected dose (%ID) を算出し, 血漿量および体重 ($\%ID/mL \times kg$) あるいは組織重量および体重 ($\%ID/g \times kg$) で補正した. ^{18}F -FDG の集積比率は組織/血液比 (T/B ratio) で表した.

13. 統計学的解析

データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表した. 統計学的解析は SAS v9.4 を用いた two-way ANOVA と *post hoc* Tukey-Kramer, Bonferroni-Dunn test による多群間比較検定により行った. $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した.

結果

1. SMS2 の欠損による体重増加および血漿生化学値における作用

SMS2 の欠損による体重や血漿生化学値に及ぼす影響は過去に報告されているが^{35,36}, これらの表現型は飼育環境の影響が大きく, 糖・脂質代謝と密接に関係することから, 本研究において再現性を確認した. 過去の報告と同様, ND 給餌条件下では SMS2 の欠損による体重の有意な変化は見られなかったが, HFD 給餌条件下では SMS2 の欠損によって体重増加が有意に抑制された (図 19A, B). これらの結果から, SMS2 の欠損により HFD 誘導性の肥満が抑制されることが示唆された.

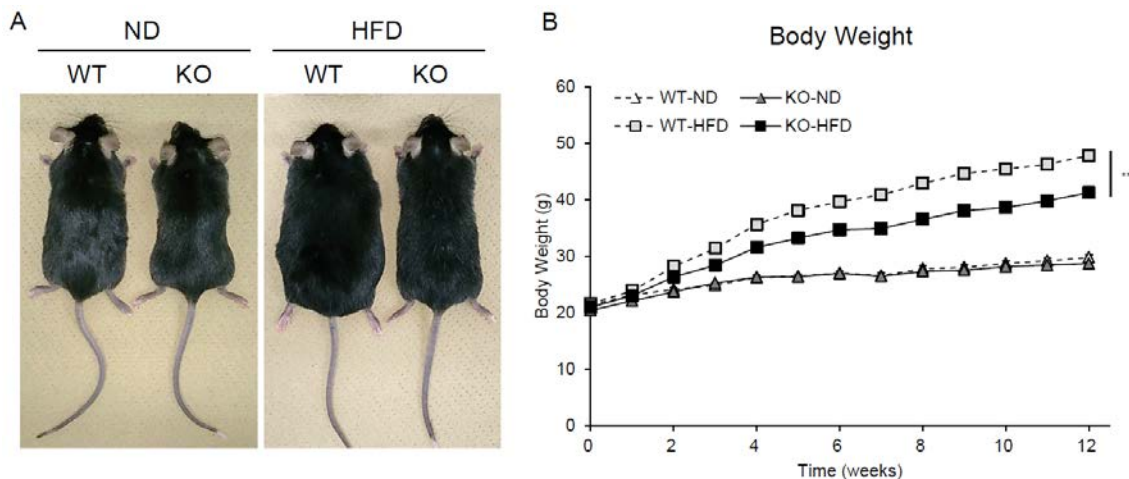


図 19. SMS2 の欠損が体重に及ぼす影響. ND あるいは HFD を 12 週間与えた WT および SMS2 KO マウスの代表的な肉眼所見 (A) および体重増加の推移 (B). データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n=20-27$ /群) で表す. 統計学的解析は two-way ANOVA と *post hoc* Bonferroni-Dunn test で行い, 対応する WT マウスに比べて $p<0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した. $**p<0.01$. SMS2 KO マウスは WT マウスに比べて HFD 給餌による体重増加が抑制されている.

また, 血漿脂質代謝パラメータでは, TC および TG 値は ND, HFD いずれの給餌条件下でも SMS2 の欠損による有意な変化は認められなかったが, NEFA 値は ND 給餌条件下において SMS2 の欠損により有意に増加した (図 20A-C). 血漿肝機能マーカーである ALT および AST 値は, ND 給餌条件下では両群の間に有意な変化が見られなかったが, HFD 負荷による増加が SMS2 の欠損によって

有意に抑制された (図 20D, E). 一方, 糖代謝パラメータでは, 血糖値は ND, HFD いずれの給餌条件下でも SMS2 の欠損による有意な変化が認められなかった. 血漿インスリン値および HOMA-R については, ND 給餌条件下では両群の間に有意な変化が見られなかったが, HFD 負荷による増加が SMS2 の欠損によって有意に抑制された (図 20F-H). これらの結果から, SMS2 の欠損によって HFD 誘導性の肝機能障害とインスリン抵抗性が改善する可能性が示唆された.

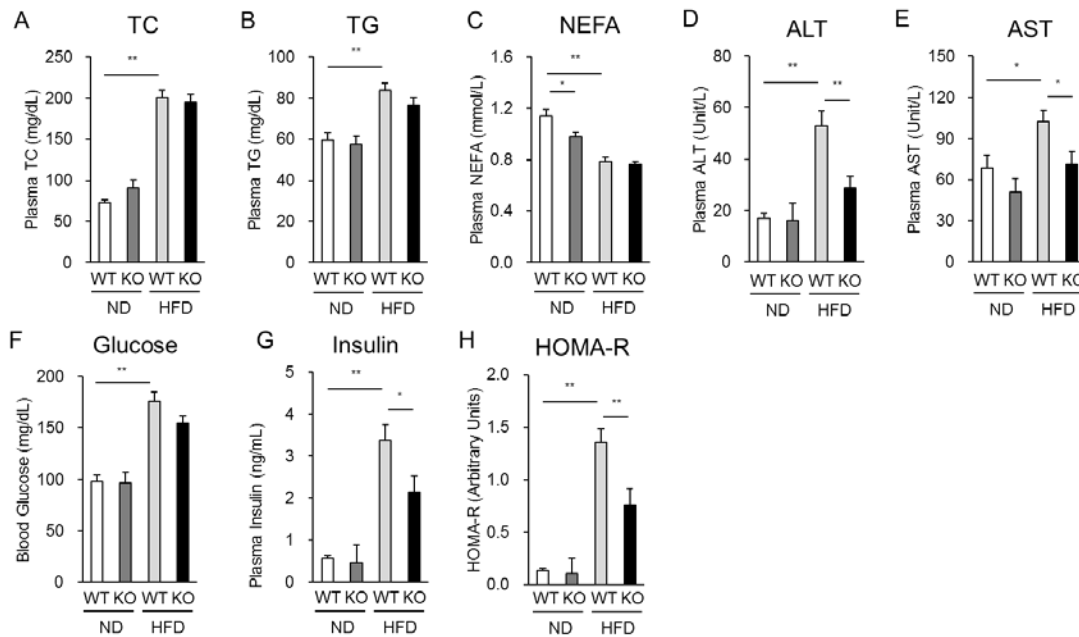


図 20. SMS2 の欠損が血漿生化学値に及ぼす影響. ND あるいは HFD を 12 週間与えた WT および SMS2 KO マウスの血漿 TC (A), TG (B), NEFA (C), ALT (D), AST (E) 値, 血糖値 (F), 血漿インスリン値 (G) および HOMA-R (H). データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=20-27/群) で表す. 統計学的解析は two-way ANOVA と *post hoc* Tukey-Kramer test で行い, 対応する WT マウスに比べて $p < 0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. SMS2 KO マウスは WT マウスに比べて HFD により惹起される肝機能障害やインスリン抵抗性が抑制されている.

2. SMS2 の欠損による耐糖能およびインスリン感受性亢進作用

次に, SMS2 の欠損による耐糖能およびインスリン感受性への作用を検証するため, OGTT および ITT を施行した. OGTT では血糖値に加えてインスリン値の経時変化も測定し, グルコース依存的インスリン分泌 (GSIS) を評価した.

OGTT においては, ND, HFD いずれの給餌条件下でも SMS2 KO マウスは WT マウスに比べ耐糖能が有意に改善し, GSIS が有意に減少した (図 21A-D). また, ITT においても, ND, HFD いずれの給餌条件下でも SMS2 KO マウスは WT マウスに比べインスリン感受性が有意に亢進した (図 21E, F). これらの作用は, いずれも ND 給餌条件下よりも HFD 条件下の方が両群の差が顕著であった. これらの結果から, 過去の報告と同様に^{35,36}, SMS2 の欠損によってインスリン感受性が亢進することで全身の糖代謝が亢進する可能性が示唆された.

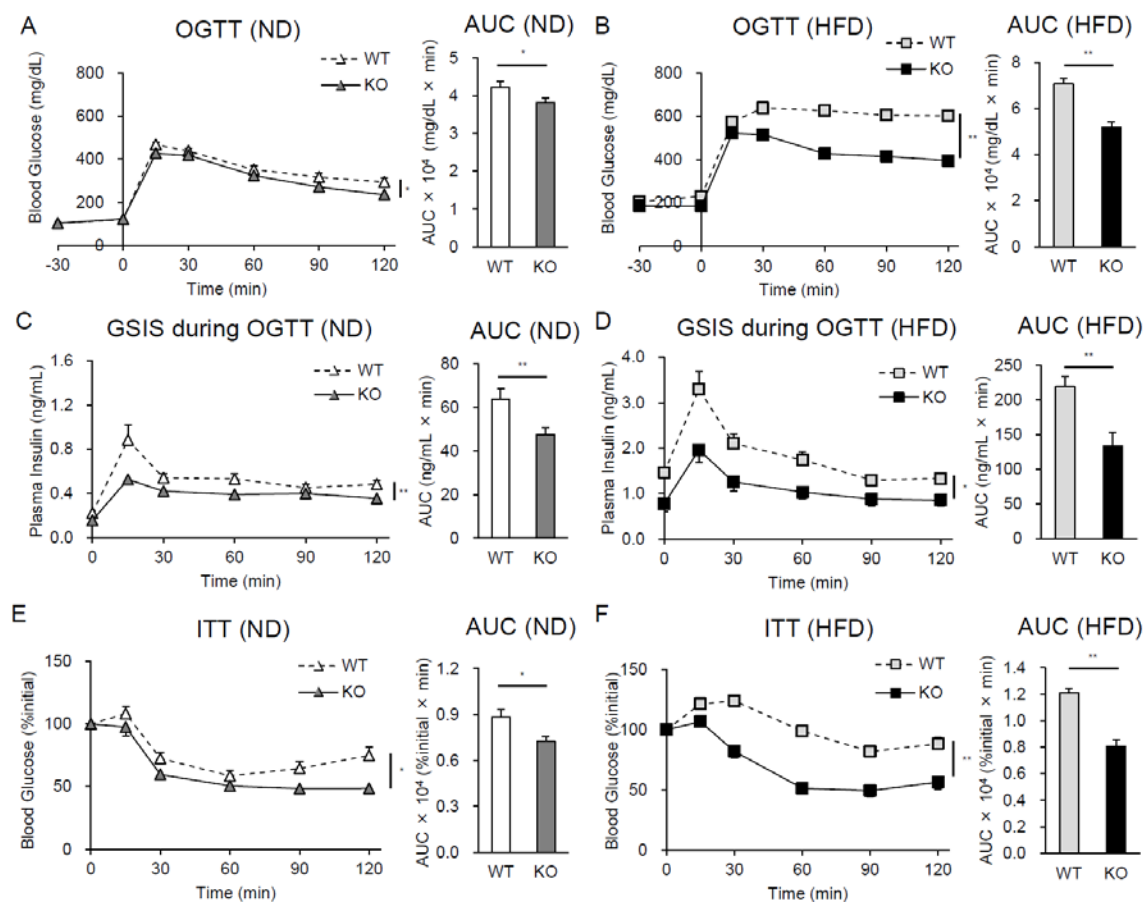


図 21. SMS2 の欠損が耐糖能およびインスリン感受性に及ぼす影響. ND あるいは HFD を 8 週間与えた WT および SMS2 KO マウスの OGTT を実施した際の血糖値の推移と血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) (A, B), 血漿インスリン値の推移と AUC (C, D) を示す. ND あるいは HFD を 10 週間与えた WT および SMS2 KO マウスの ITT を実施した際の血糖値の推移と AUC を示す (E, F). データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=11-19/群) で表す. 統計学的解析は two-way ANOVA と Bonferroni-Dunn test あるいは Student's unpaired *t*-test で行い, 対応する WT マウスに比べて $p < 0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

SMS2 KO マウスは WT マウスに比べて耐糖能やインスリン感受性が亢進している。

3. WT および SMS2 KO マウスの各組織における SMS1 と SMS2 遺伝子の発現量の比較

次に、SMS2 の標的組織を探索するため、ND を与えた WT マウスの肝臓、腎臓、脳、eWAT、胃、小腸上部および下部における *Sgms1* と *Sgms2* の発現比率をリアルタイム PCR により検討した。その結果、脳や eWAT では *Sgms1* の発現量が *Sgms2* に比べ著しく高かったが、肝臓、腎臓、胃、小腸上部および下部においては *Sgms2* の発現量が *Sgms1* よりも高かった (図 22)。この結果から、これらの組織における SM の *de novo* 合成は SMS2 に依存している可能性が示唆された。一方、SMS2 KO マウスにおいては WT マウスに比べ *Sgms1* の発現量に変化は見られず、全ての組織において *Sgms2* の発現が認められなかった。これらの結果から、インスリン抵抗性や糖尿病に関連が深く、SMS2 の発現量が高い肝臓と腎臓に注目し、以降の検討を行うこととした。

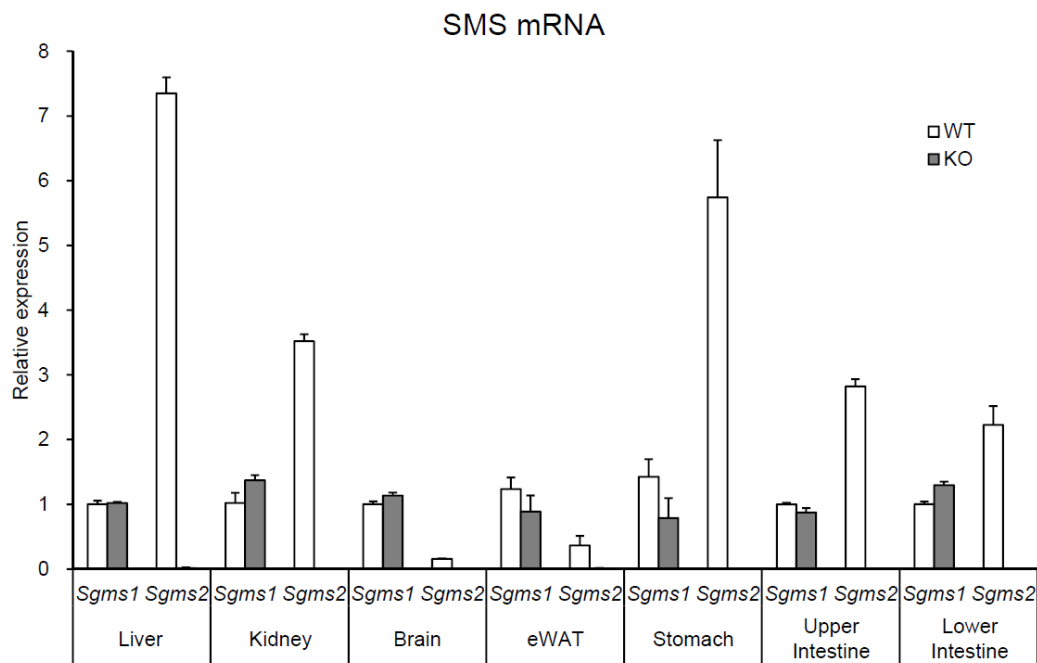


図 22. WT および SMS2 KO マウスの各組織における *Sgms1* と *Sgms2* 発現量の比較。目的遺伝子の発現量を *Gapdh* の発現量で補正し、WT マウスの各組織における *Sgms1* に対する発現比率で示す。データは平均値 ± 標準誤差 (n = 3) で示す。肝臓、腎臓および消化管では *Sgms2* が高発現したが、脳や eWAT では *Sgms1*

が高発現した.

4. MALDI-FTICR-IMS を用いた腎臓切片上の SM 分子種組織内分布の可視化

まず, IMS によってマウスの肝臓および腎臓における SM の分布を可視化できることを確認するため, ND を与えた WT マウスの腎臓切片を用いて, MALDI-FTICR-IMS による SM 分子種の可視化と組織内分布の評価を行った. MALDI-FTICR-MS を用いて腎臓切片で得られたマススペクトルから, SM (d18:1/16:0; m/z 741.53), SM (d18:1/18:0; m/z 769.55), SM (d18:1/22:0; m/z 825.62), SM (d18:1/24:1; m/z 851.64) および SM (d18:1/24:0; m/z 853.65) を検出・同定した (図 23). 腎臓切片上では, SM (d18:1/16:0), SM (d18:1/22:0), SM (d18:1/24:0) および SM (d18:1/24:1) のシグナルが強く検出された一方で, SM (d18:1/18:0) と SM (d18:1/18:1) は弱いシグナルが検出された (図 23).

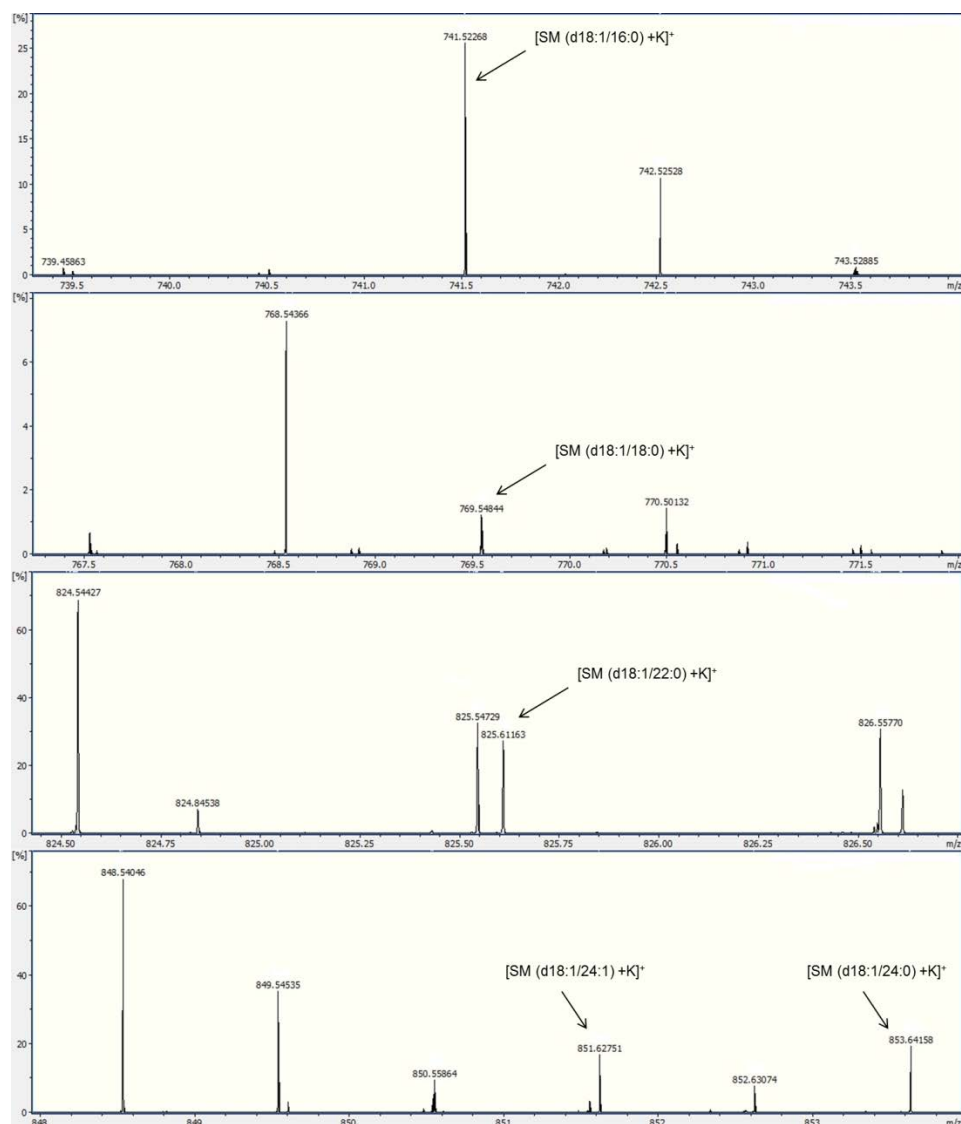


図 23. MALDI-FTICR-MS を用いて WT マウスの腎臓切片から得られたマスペクトル。マスレンジ m/z 739–854 のマスペクトルを示す。矢印は[SM (d18:1/16:0) +K]⁺, [SM (d18:1/18:0) +K]⁺, [SM (d18:1/22:0) +K]⁺, [SM (d18:1/24:0) +K]⁺および[SM (d18:1/24:1) +K]⁺と同一化されたピークを示す。

続いて、MALDI-FTICR-MS により得られたマスペクトルから画像を構成し、IMS による各 SM 分子種の可視化を行った。興味深いことに、腎臓切片上で SM はアシル基の鎖長に応じて異なる組織内分布を示した (図 24)。SM (d18:1/16:0) は腎皮質と髄質の境界部分に特徴的な分布を示した (図 24B)。一方で、SM (d18:1/22:0) は髄質において高濃度に分布した (図 24E)。SM (d18:1/24:0) は腎皮質と髄質に分布が見られ (図 24F)、SM (d18:1/24:1) は主に腎皮質に分布が見ら

れた (図 24G).

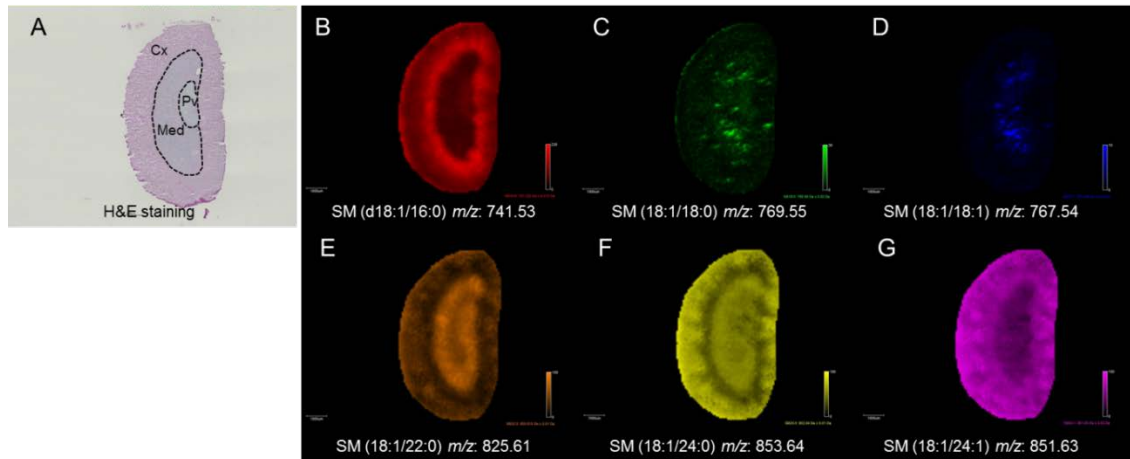


図 24. MALDI-FTICR-IMS を用いた WT マウスの腎臓切片における SM の組織内分布の可視化. 腎臓切片の H&E 染色像 (A). 腎皮質 (Cx), 髄質 (Med) および腎盂 (Pv) を破線で区切った. MALDI-FTICR-IMS により可視化した[SM (d18:1/16:0) +K]⁺ (B), [SM (d18:1/18:0) +K]⁺ (C), [SM (d18:1/18:1) +K]⁺ (D), [SM (d18:1/22:0) +K]⁺ (E), [SM (d18:1/24:0) +K]⁺ (F)および[SM (d18:1/24:1) +K]⁺ (G)の分布. スケールバー = 1 mm. アシル基の鎖長に応じて SM 分子種ごとに異なった分布が見られる.

5. MALDI-FTICR-IMS を用いた肝臓切片上の SM 分子種組織内分布の可視化

同様に, ND を与えた WT マウスの肝臓切片を用いて, MALDI-FTICR-IMS による SM 分子種の可視化と組織内分布の評価を行った. まず, MALDI-FTICR-MS を用いて肝臓切片で得られたマススペクトルから, SM (d18:1/16:0; *m/z* 741.53), SM (d18:1/18:0; *m/z* 769.55), SM (d18:1/22:0; *m/z* 825.62), SM (d18:1/24:1; *m/z* 851.64) および SM (d18:1/24:0; *m/z* 853.65) の 5 種類の SM 分子種を検出・同定した (図 25). 肝臓切片上においては SM (d18:1/22:0), SM (d18:1/24:0) および SM (d18:1/24:1) のシグナルが強く検出された一方で, SM (d18:1/16:0), SM (d18:1/18:0) および SM (d18:1/18:1) のシグナルは非常に弱いものであった (図 25).

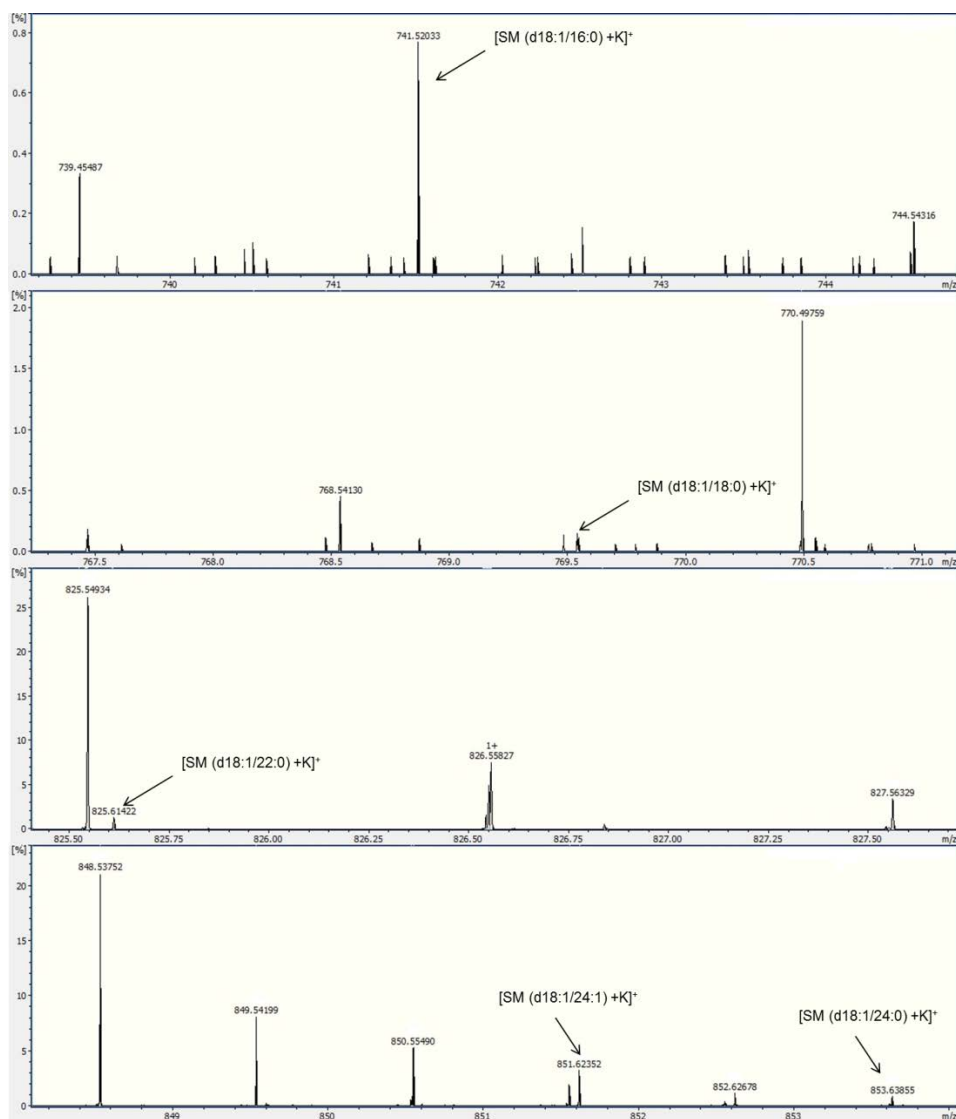


図 25. MALDI-FTICR-MS を用いて WT マウスの肝臓切片から得られたマスペクトル。マスレンジ m/z 739–854 のマスペクトルを示す。矢印は[SM (d18:1/16:0) +K]⁺, [SM (d18:1/18:0) +K]⁺, [SM (d18:1/22:0) +K]⁺, [SM (d18:1/24:0) +K]⁺および[SM (d18:1/24:1) +K]⁺と同定されたピークを示す。

MALDI-FTICR-MS により得られたマスペクトルから画像を構成し、IMS による各 SM 分子種の可視化を行った。その結果、肝臓は比較的均一な組織であることからいずれの SM も普遍的な分布を示したが (図 26)、血管において SM (d18:1/16:0) と SM (d18:1/18:0) が高濃度で分布し、血液中の SM 組成を反映しているものと推察された (図 26 A–C)。

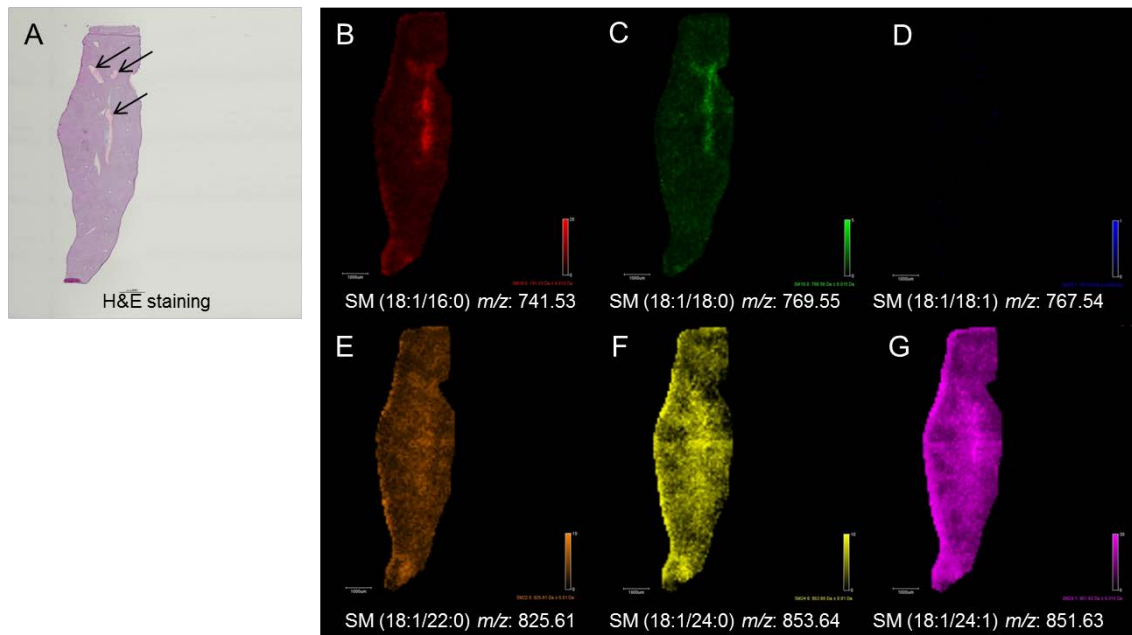


図 26. MALDI-FTICR-IMS を用いた WT マウスの肝臓切片における SM の組織内分布の可視化. 肝臓切片の H&E 染色像 (A). 矢印は血管領域を表す.

MALDI-FTICR-IMS により可視化した[SM (d18:1/16:0) +K]⁺ (B), [SM (d18:1/18:0) +K]⁺ (C), [SM (d18:1/18:1) +K]⁺ (D), [SM (d18:1/22:0) +K]⁺ (E), [SM (d18:1/24:0) +K]⁺ (F)および[SM (d18:1/24:1) +K]⁺ (G) の分布. スケールバー = 1 mm. 肝臓切片上では SM 分子が普遍的に分布するが, 血管部分には SM (d18:1/16:0) や SM (d18:1/18:0) が比較的高濃度で分布する.

6. LC/ESI-MS/MS, MALDI-FTICR-IMS およびリアルタイム PCR を用いた WT マウスと SMS2 KO マウスの腎臓における SPL 代謝の比較

次に, LC/ESI-MS/MS を用いて ND あるいは HFD を 3 週間与えた WT および SMS2 KO マウスの腎臓における SM と Cer 分子種の量的変化を比較した. HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスは ND を与えた WT および SMS2 KO マウスに比べ腎臓中で C18–C22 アシル基を持つ SM や Cer が増加し, C24 アシル基を持つ SM や Cer が減少する傾向が見られた (図 27A, B). 一方, ND 給餌下においては SMS2 KO マウスは WT マウスに比べ腎臓中で C24 極長鎖アシル基を持つ SM が減少し, 同じく C24 アシル基を持つ Cer が増加傾向を示した (図 27A, B). HFD 給餌下においては SMS2 KO マウスは WT マウスに比べ腎臓中で C18–C24 アシル基を持つ SM が減少する傾向が見られ, C22–C24 アシル基を持つ Cer が

増加傾向を示した (図 27A, B). また腎臓において SPL の代謝を制御する SMS, CerS および脂肪酸伸長酵素 (Elovl) ファミリーの遺伝子発現を検証したが, これらの遺伝子において SM および Cer の分子種ごとの変動を説明できるような変動は認められなかった (図 27C-E).

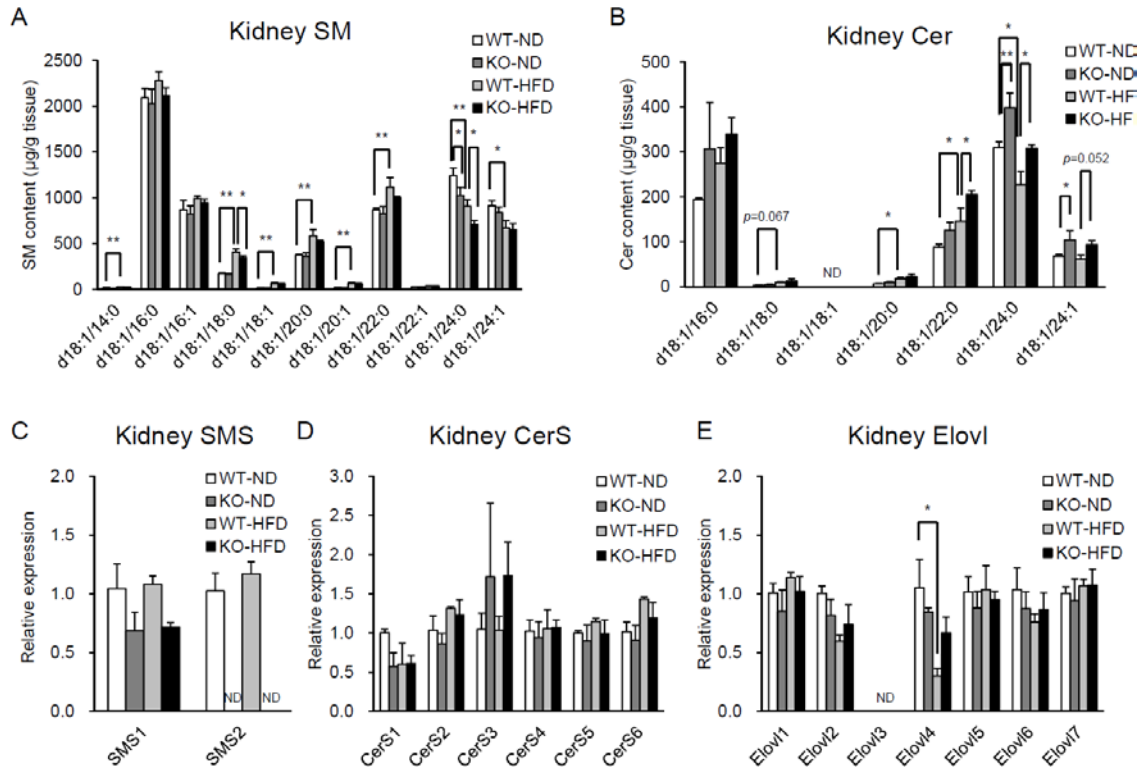


図 27. ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスの腎臓における SPL 代謝の比較. LC/ESI-MS/MS を用いて測定した各マウスの腎臓中 SM (A) および Cer (B) 含量を示す. 組織中 SM および Cer 含量は内部標準である SM (d18:1/16:0-d31) と Cer (d18:1/16:0-d31) で補正し, 乾燥組織重量当たりの脂質量 ($\mu\text{g/g tissue}$) で表す. リアルタイム PCR を用いて測定した各マウスの腎臓における SMS (C), CerS (D) および Elovl (E) mRNA 発現量を示す. 組織中遺伝子発現量は 18S rRNA の発現量で補正し, ND を与えた WT マウスに対する発現比率で表示する. データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n=3$) で示す. 統計学的解析は two-way ANOVA と *post hoc* Tukey-Kramer test による多群間比較検定を用いて行い, $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

続いて、これらのマウスの腎臓切片を用いて MALDI-FTICR-IMS による SM 分子種の分布解析を行った。SM (d18:1/16:0) はいずれのマウスにおいても腎臓切片上で腎皮質と髄質の境界領域に特徴的な分布を示し、これらの領域に着目しても HFD 負荷や SMS2 の欠損による明らかな変化は認められなかった (図 28B)。SM (d18:1/18:0) はシグナル強度が非常に弱く、HFD 負荷や SMS2 の欠損による変化を評価することは困難であった (図 28C)。また、LC/ESI-MS/MS を用いた定量解析では顕著な変化を検出できていなかったが、MALDI-FTICR-IMS を用いた解析では、SM (d18:1/22:0) は腎臓切片上において主に髄質に分布し、SMS2 の欠損によってこれらの領域で減少が見られた (図 28D)。同様に、SM (d18:1/24:0) は腎皮質と髄質に、SM (d18:1/24:1) は腎皮質にそれぞれ分布し、HFD 負荷や SMS2 の欠損によって主にこれらの領域内で顕著な減少が認められた (図 28E, F)。

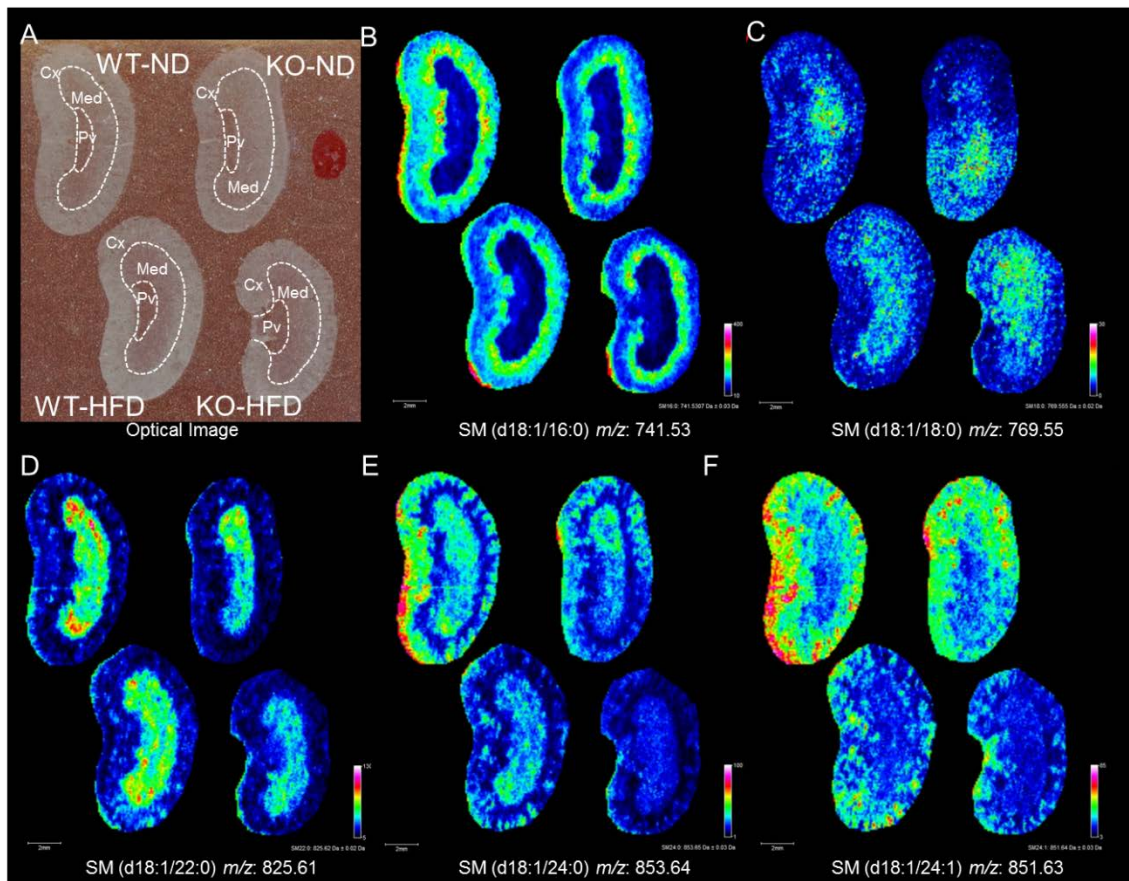


図 28. ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスの肝臓における SPL 代謝の比較。各マウスから得られた肝臓切片の光学画像 (A)。矢印は血管領域を表す。MALDI-FTICR-IMS を用いて可視化した[SM (d18:1/16:0) +K]⁺ (B),

[SM (d18:1/18:0) +K]⁺ (C), [SM (d18:1/22:0) +K]⁺ (D), [SM (d18:1/24:0) +K]⁺ (E) および[SM (d18:1/24:1) +K]⁺ (F)を示す. スケールバー = 2 mm.

7. SMS2 の欠損による腎機能への影響

続いて, SMS2 および SM 各分子種の腎臓における機能を検証するため, ND あるいは HFD を 12 週間与えた WT および SMS2 KO マウスから尿を採取し, 腎機能マーカーである尿中アルブミン/クレアチニン比への影響を評価した. いずれのマウスも HFD を負荷することで尿中アルブミン/クレアチニン比 が有意に増加したが, ND, HFD いずれの給餌条件下においても SMS2 の欠損による影響は認められなかった (図 29).

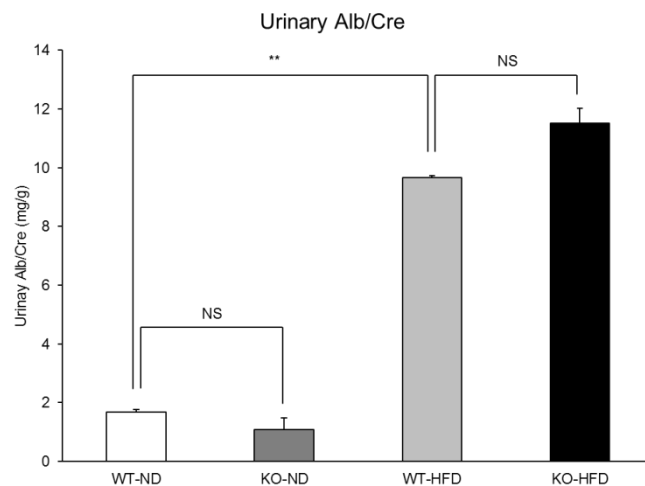


図 29. SMS2 の欠損が尿中アルブミン/クレアチニン比に及ぼす影響. ND あるいは HFD を 21 週間与えた WT および SMS2 KO マウスの尿中アルブミン (Alb)/クレアチニン (Cre) 比. データは平均値 ± 標準誤差 (n=8–12/群) で示す. 統計学的解析は two-way ANOVA と *post hoc* Tukey–Kramer test で行い, 対応する WT マウスに比べて $p < 0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した. $**p < 0.01$. SMS2 の欠損による腎機能の改善は見られない.

8. LC/ESI-MS/MS, MALDI-FTICR-IMS およびリアルタイム PCR を用いた WT マウスと SMS2 KO マウスの肝臓における SPL 代謝の比較

次に, LC/ESI-MS/MS を用いて ND あるいは HFD を 3 週間与えた WT および

SMS2 KO マウスの肝臓における SM と Cer 分子種の量的変化を比較した. まず, HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスは ND を与えた WT および SMS2 KO マウスに比べ肝臓中で C18–C22 アシル基を持つ SM や Cer が増加し, C24 アシル基を持つ SM や Cer が減少した (図 30A, B). 一方, ND 給餌下においては SMS2 KO マウスは WT マウスに比べ肝臓中で C22, C24 極長鎖アシル基を持つ SM が減少し, C16–C24 アシル基を持つ Cer が増加傾向を示した (図 30A, B). HFD 給餌下においては SMS2 KO マウスは WT マウスに比べ肝臓中で C18–C24 アシル基を持つ SM が減少し, C20–C24 アシル基を持つ Cer が増加傾向を示した (図 30A, B). 肝臓において HFD 負荷や SMS2 の欠損により SM や Cer がアシル基の鎖長によって異なる挙動を示すメカニズムを考察するため, SPL の代謝を制御する SMS, CerS および Elovl ファミリーの遺伝子発現を検証した. しかしながら, これらの遺伝子において SM および Cer の分子種ごとの変動を説明できるような変動は認められなかった (図 30C–E).

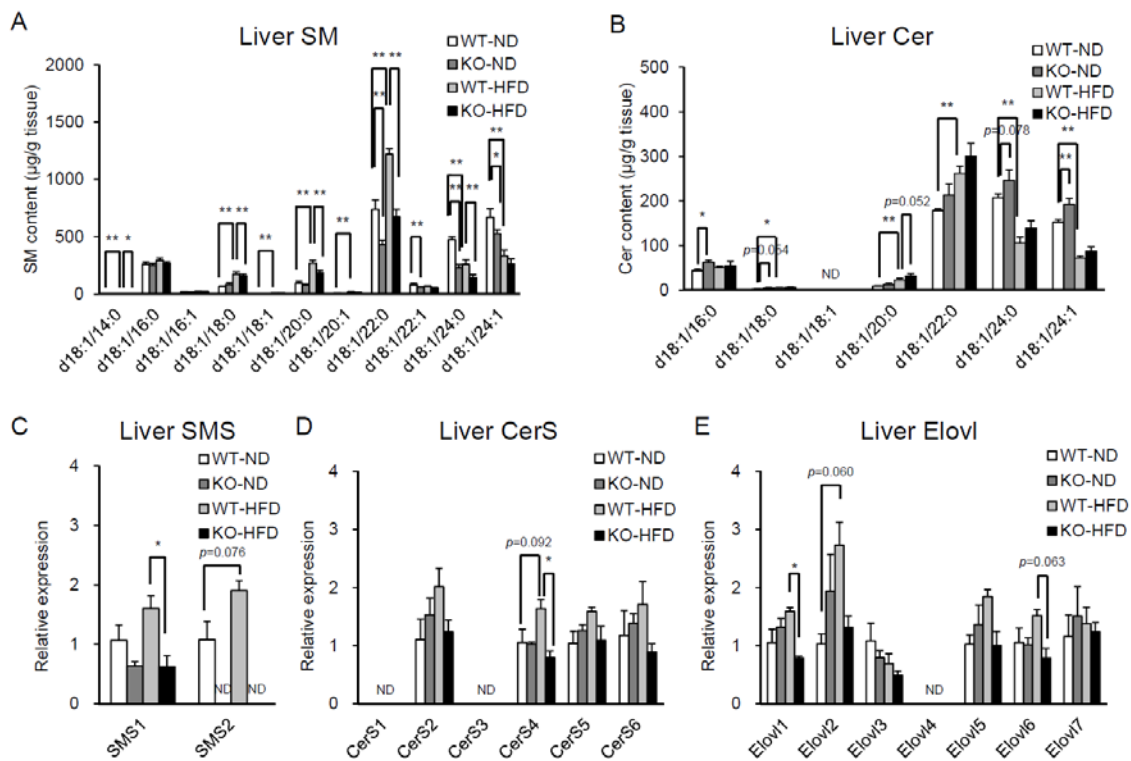


図 30. ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスの肝臓における SPL 代謝の比較. LC/ESI-MS/MS を用いて測定した各マウスの肝臓中 SM (A) および Cer (B) 含量を示す. 組織中 SM および Cer 含量は内部標準である SM (d18:1/16:0-d31) と Cer (d18:1/16:0-d31) で補正し, 乾燥組織重量当たりの脂質量

($\mu\text{g/g tissue}$)で表す. リアルタイム PCR を用いて測定した各マウスの肝臓における SMS (C), CerS (D) および Elovl (E) mRNA 発現量を示す. 組織中遺伝子発現量は *Rn18s* の発現量で補正し, ND を与えた WT マウスに対する発現比率で表示する. データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n=3$) で示す. 統計学的解析は two-way ANOVA と *post hoc* Tukey-Kramer test による多群間比較検定を用いて行い, $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$.

続いて, これらのマウスの肝臓切片を用いて MALDI-FTICR-IMS による SM 分子種の分布解析を行った. 全ての群のマウスにおいて, 肝臓切片上で SM (d18:1/16:0) と SM (d18:1/18:0) の非常に弱いシグナルが検出されたが, 血管部分に強いシグナルが見られた (図 31B, C). また, LC/ESI-MS/MS を用いた定量解析の結果と同様, MALDI-FTICR-IMS を用いた解析においても, WT マウスの肝臓では HFD 負荷によって SM (d18:1/22:0) が顕著に増加し, SM (d18:1/24:0) と SM (d18:1/24:1) が減少した (図 31 D–F). 飼料の種類によらず, SMS2 KO マウスの肝臓では野生型マウスに比べ SM (d18:1/22:0), SM (d18:1/24:0) および SM (d18:1/24:1) が減少した (図 31 D–F). シグナル強度が非常に弱いため, SMS2 KO マウスの肝臓においてこれらの SM 分子種における HFD 負荷の影響は認められなかった (図 31 D–F).

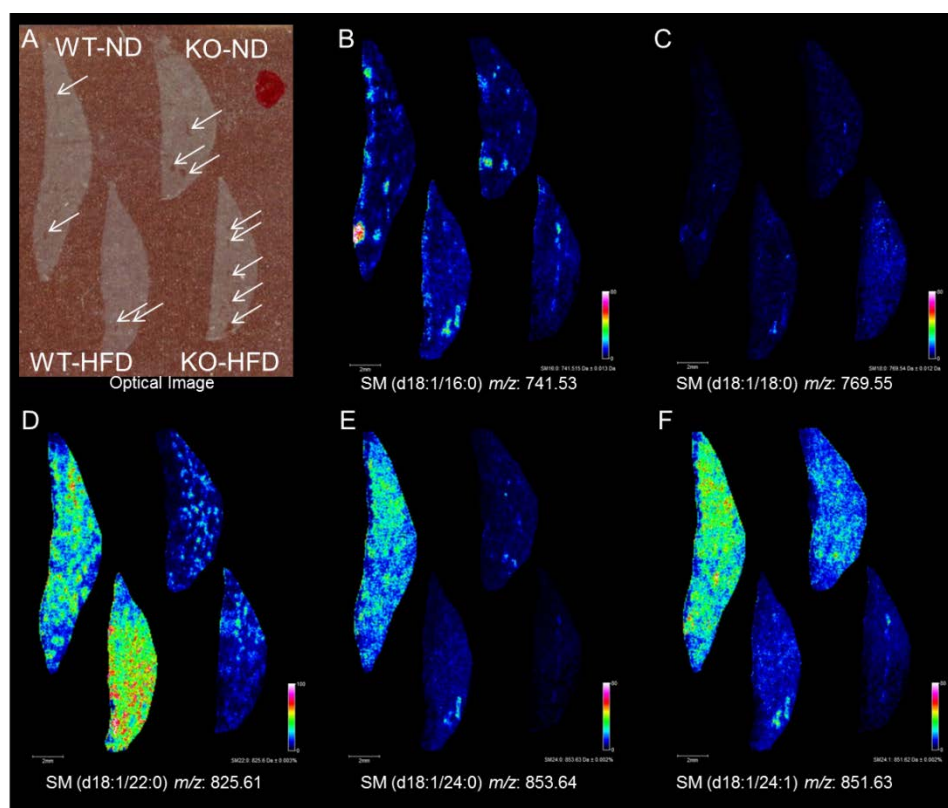


図 31. ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスの肝臓における SPL 代謝の比較. 各マウスから得られた肝臓切片の光学画像 (A). 矢印は血管領域を表す. MALDI-FTICR-IMS を用いて可視化した $[\text{SM (d18:1/16:0)} + \text{K}]^+$ (B), $[\text{SM (d18:1/18:0)} + \text{K}]^+$ (C), $[\text{SM (d18:1/22:0)} + \text{K}]^+$ (D), $[\text{SM (d18:1/24:0)} + \text{K}]^+$ (E) および $[\text{SM (d18:1/24:1)} + \text{K}]^+$ (F) を示す. スケールバー = 2 mm.

9. ND あるいは HFD を長期負荷した WT および SMS2 KO マウスの肝臓中 SPL 含量および血漿 SPL 濃度の比較

次に, SMS2 の欠損による肝臓中の SM 組成の変化と脂肪肝等の病態との関係を検証するため, HFD を 12 週間負荷して脂肪肝やインスリン抵抗性を発症させた WT および SMS2 KO マウスの SPL 含量を測定した. ND 給餌下においては, SMS2 KO マウスは WT マウスに比べ肝臓の C22 および C24 極長鎖アシル基を持つ SM が有意に減少し, 対応する HexCer が増加した (図 32 A–C). HFD 給餌下においては, SMS2 KO マウスは WT マウスに比べ肝臓の C18–C22 のアシル基を持つ SM が有意に減少したが, HFD 負荷によって C24-SM が顕著に減少したため SMS2 の欠損による有意な減少は認められなかった (図 32A). また, SMS2 の欠損により肝臓において SM (d18:1/22:0) が増加し, C16–C22 のアシル基を持

つ HexCer が増加した (図 32B, C). さらに, HFD 負荷によって C18–C24 のアシル基を持つ DhCer が増加し, SMS2 の欠損により DhCer (18:1/24:1) が有意に減少した (図 32D). 同様に, 血漿中の SPL 濃度を測定した. ND 給餌下においては, SMS2 KO マウスは WT マウスに比べ血漿中で SM (d18:1/24:0) が有意に減少し, C24 アシル基を持つ Cer ならびに HexCer が増加した (図 32E–G). HFD 給餌下においては, SMS2 KO マウスは WT マウスに比べ血漿中で C16–C24 のアシル基を持つ SM が有意に減少し, C20–C24 のアシル基を持つ Cer および HexCer (d18:1/22:0) が増加した (図 32E–G). また, HFD 負荷によって C20–C22 のアシル基を持つ DhCer が有意に増加したが, SMS2 の欠損による明確な影響は認められなかった (図 32H).

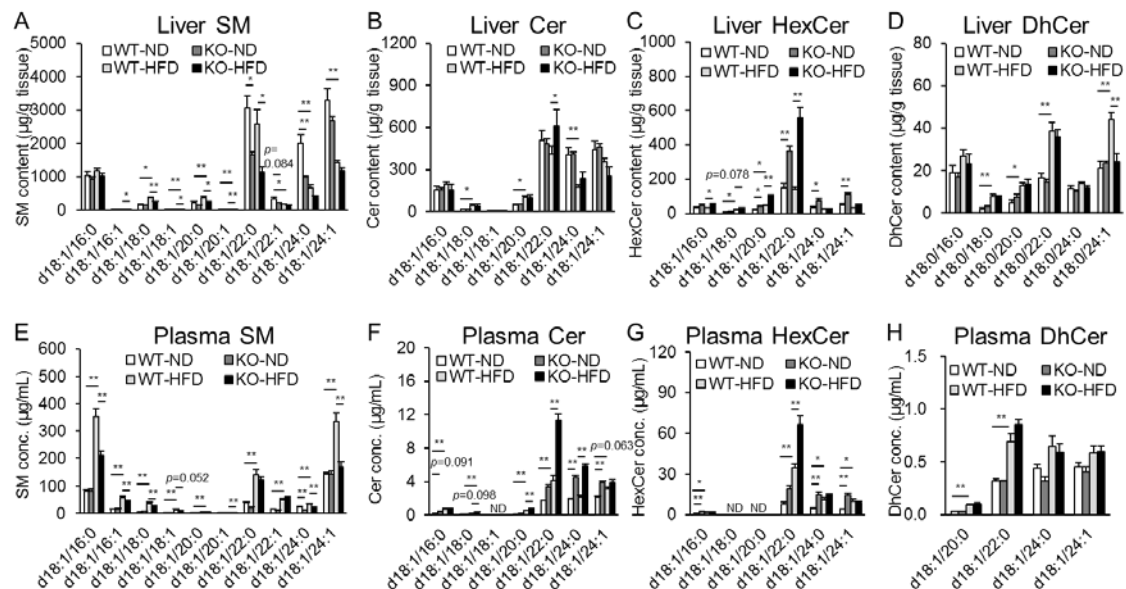


図 32. SMS2 の欠損が肝臓および血漿における SPL 組成に及ぼす影響. ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスの肝臓における SM (A), Cer (B), HexCer (C) および DhCer (D) 含量, 血漿における SM (E), Cer (F), HexCer (G) および DhCer (H) を示す. データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=6/群) で表す. 統計学的解析は two-way ANOVA と *post hoc* Tukey–Kramer test で行い, 対応する WT マウスに比べて $p<0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した. * $p<0.05$, ** $p<0.01$. SMS2 の欠損によって肝臓および血漿中で SM 分子種の減少と極長鎖アシル基を持つ Cer や HexCer の増加が見られる.

10. SMS2 の欠損が肝臓における異所性脂肪蓄積に及ぼす影響

肝臓における異所性脂肪蓄積はインスリン抵抗性の発症に深く関与することが報告されており^{39,40}, SMS2 の欠損は脂肪肝や肝臓におけるインスリン抵抗性を抑制することが報告されていることから³⁵⁻³⁷, SMS2 の欠損が肝臓における異所性脂肪蓄積や糖・脂質代謝に及ぼす影響を検討した. 本研究においても, SMS2 KO マウスは WT マウスに比べて, HFD 誘導性の肝肥大が顕著に抑制されており (図 33A, C), 脂肪滴の形成も抑制された (図 33B). また, SMS2 の欠損によって肝臓中の TG および DG 含量も顕著に減少し, リピドミクスを行ったところ主に飽和および一価不飽和脂肪酸を多く含む分子種の減少が顕著であり, 多価不飽和脂肪酸を多く含む分子種の減少は軽微であった (図 33D-H). また, TC の蓄積も有意に抑制されたが, NEFA の蓄積量については有意な変化が認められなかった (図 33I, J).

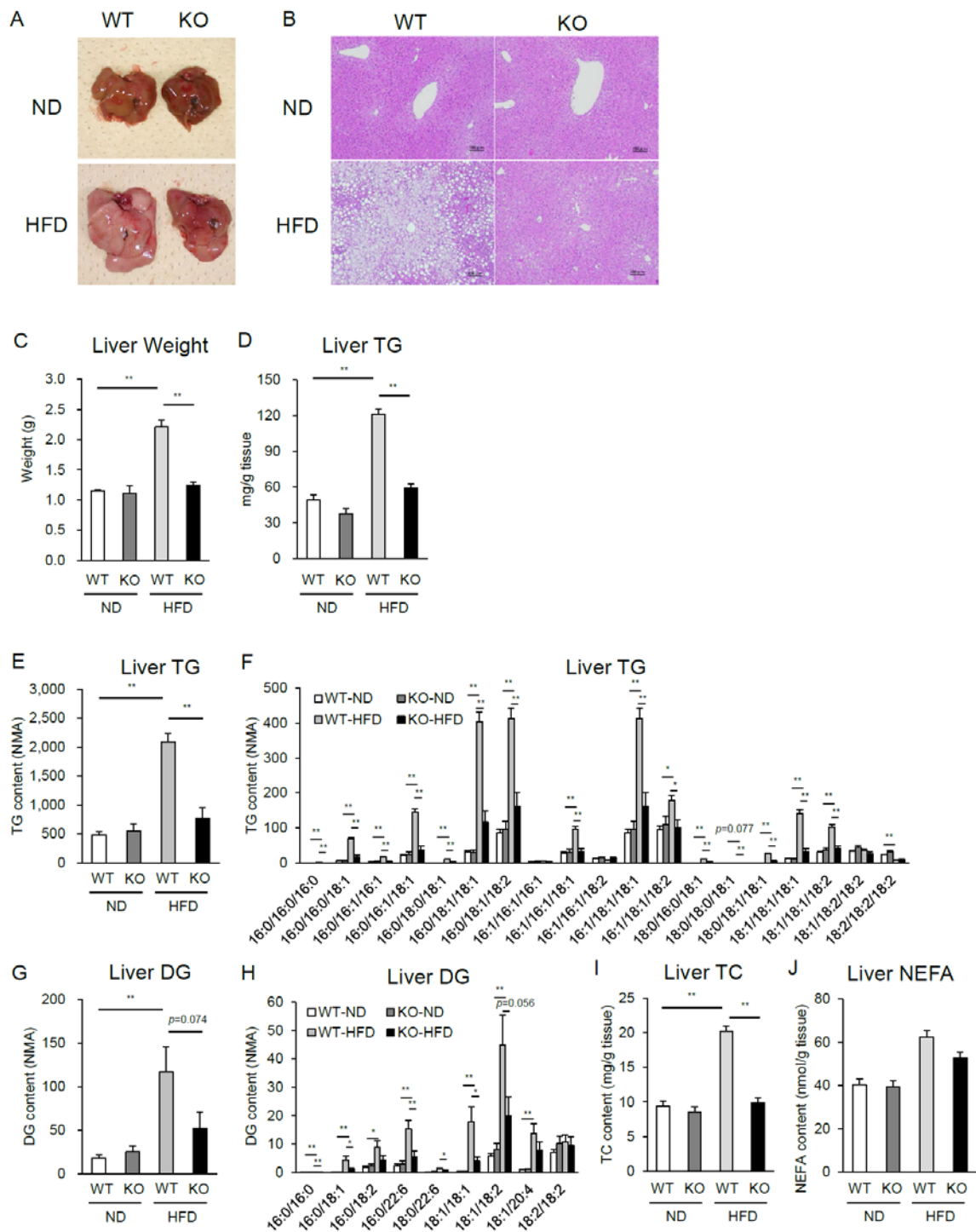


図 33. SMS2 の欠損が肝臓における異所性脂肪蓄積に及ぼす影響。ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスの肝臓肉眼所見 (A), H&E 染色画像 (B), 肝重量 (C), 肝臓における TG 含量 (D), リピドミクスを用いて測定した総量 (E) および分子種ごと (F) の TG 組織中含量, 総量 (G) および分子種ごと (G) の DG 組織中含量, TC (H) および NEFA (E) 組織中含量を示す。データは

平均値 ± 標準誤差 (n=6/群) で表す. 統計学的解析は two-way ANOVA と *post hoc* Tukey–Kramer test で行い, 対応する WT マウスに比べて $p<0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した. * $p<0.05$, ** $p<0.01$. スケールバー = 100 μm . SMS2 の欠損によって HFD により誘導される脂肪肝が抑制される.

11. SMS2 の欠損が肝臓における糖・脂質代謝やミトコンドリア, 小胞体ストレス応答, 炎症に及ぼす影響

小胞体ストレス応答や慢性炎症は脂肪肝やインスリン抵抗性の発症に関与することが報告されている⁹⁰. そこで, SMS2 の欠損が肝臓への異所性脂肪蓄積を抑制する分子メカニズムを解明するため, ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスの肝臓における糖・脂質代謝, ミトコンドリア機能, 小胞体ストレス応答および炎症に関わる遺伝子の発現量を検証した. HFD 給餌条件下において, SMS2 の欠損は肝臓において脂肪酸合成 (*Fasn*, *Scd1*), 伸長 (*Elovl1*, *Elovl6*), 取り込み (*Cd36*), 酸化 (*Pgc1a*) および SPL 代謝 (*Sgms1*, *CerS2*, *CerS6*, *Smpd1*) を抑制した (図 34A, B). また, HFD 給餌条件下において, SMS2 の欠損は糖代謝 (*Pdha1*), ミトコンドリア産生 (*Cs*), 小胞体ストレス応答 (*Atf3*) および炎症 (*Ccl2*, *Tnfa*) を減少させた一方で, 糖新生やミトコンドリア脂肪酸酸化に関わる遺伝子は変化が認められなかった (図 34C–G). これらの結果から, SMS2 の欠損による脂肪肝抑制作用には, HFD によって誘導される脂肪酸合成, 小胞体ストレス応答および炎症反応の抑制が関与している可能性があり, これらの表現型が SMS2 の欠損による肝臓でのインスリン感受性亢進に寄与している可能性が示唆された.

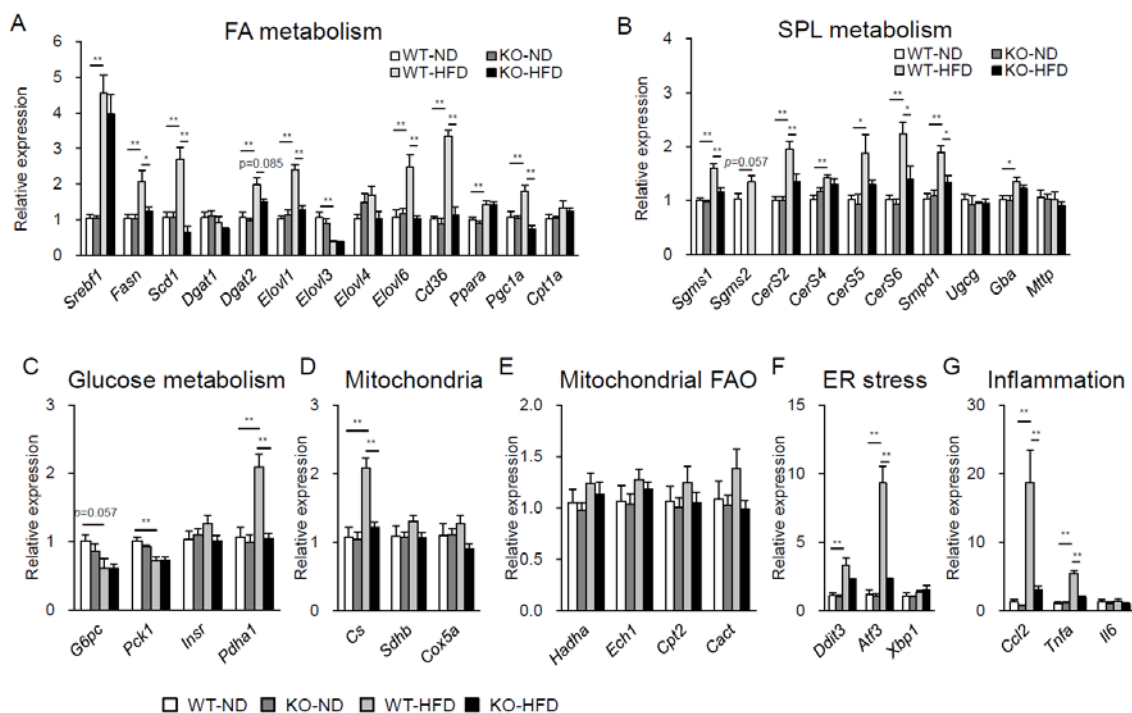


図 34. SMS2 の欠損が肝臓における糖・脂質代謝およびミトコンドリア機能に及ぼす影響。ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスの腓腹筋における脂肪酸合成 (A), SPL 代謝 (B), 糖代謝 (C), ミトコンドリア産生 (D) および脂肪酸酸化 (E), 小胞体 (ER) ストレス応答 (F) および炎症 (G) に関わる遺伝子発現量を示す。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=6/群) で表す。統計学的解析は two-way ANOVA と *post hoc* Tukey-Kramer test で行い、対応する WT マウスに比べて $p<0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。SMS2 の欠損によって HFD により誘導される脂肪酸合成の亢進が抑制される。

12. WT および SMS2 Het KO マウスにおける体重、糖代謝および SPL 代謝の評価

肝臓の SMS2 ならびに極長鎖アシル基を持つ Cer および HexCer と脂肪肝やインスリン抵抗性との関連を検証するため、WT マウスと SMS2 Het KO マウスに HFD を給餌し表現型を比較した。SMS2 KO マウスとは異なり、SMS2 Het KO マウスは WT マウスに比べて有意な体重増加の抑制は認められず (図 35A), 肝臓中 TG 含量や血漿 ALT 値はむしろ増加する傾向が認められた (図 35B, C)。また、空腹時血糖値および血漿インスリン値の減少も認められなかった (図 35D, E)。さらに、耐糖能を調べるために OGTT を施行したが、WT マウスと SMS2 Het KO マウスはいずれも糖負荷後の血糖値や血漿インスリン値が同様に推移した

(図 35F, G). また, 肝臓中の SM および Cer 含量を測定したところ, SMS2 Het KO マウスは WT マウスに比べて C16–C24 のアシル基を持つ SM が減少し, Cer (d18:1/24:1) が増加傾向を示したが, Cer (d18:1/22:0) の増加は見られなかった (図 35H, I). 同様に血漿中の SM および Cer 含量を測定したところ, SMS2 Het KO マウスは WT マウスに比べて C20–C24 のアシル基を持つ SM が減少し, Cer (d18:1/24:1) が有意に増加したが, Cer (d18:1/22:0) の増加は見られなかった (図 35J, K).

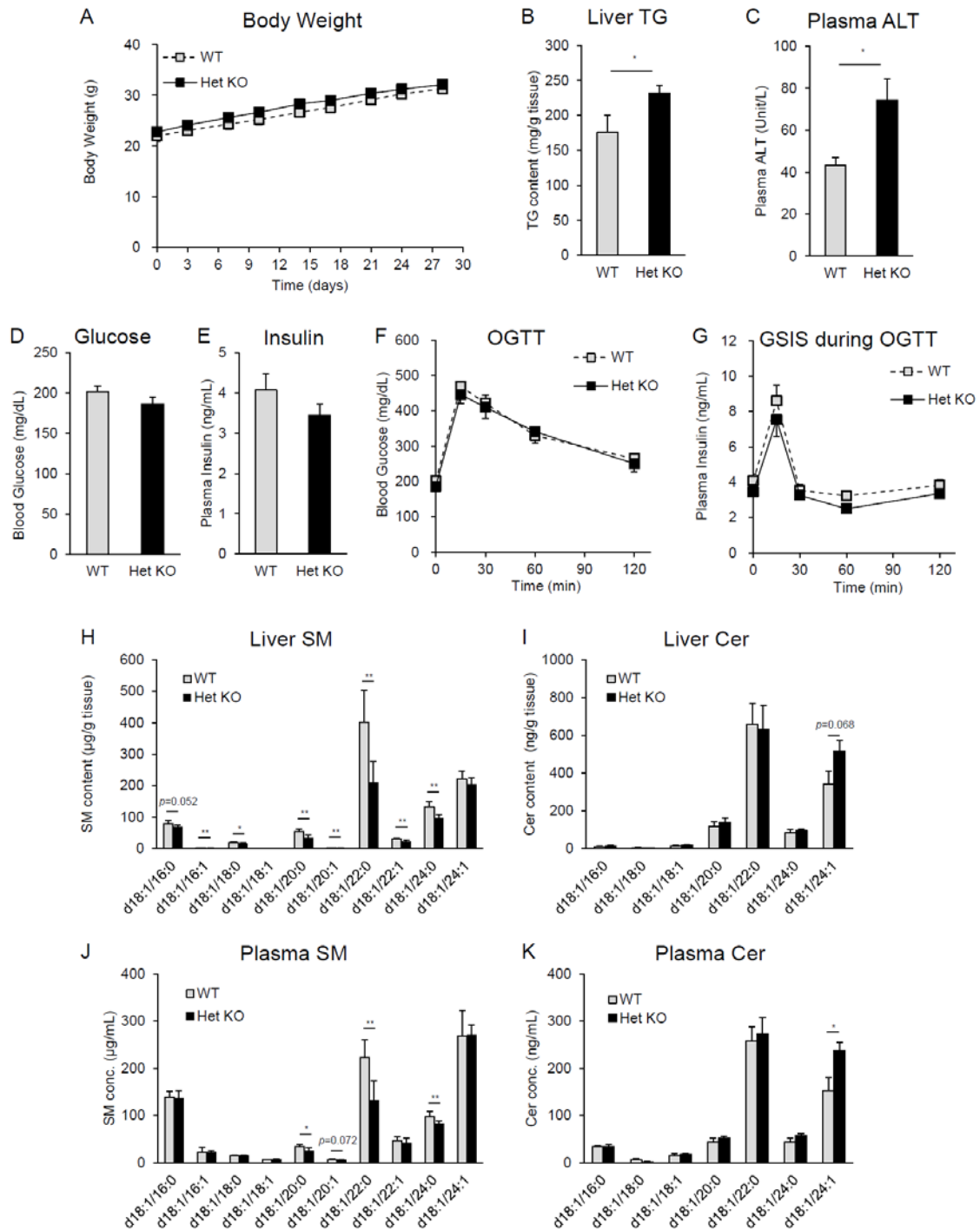


図 35. HFD 給餌下における SMS2 Het KO マウスの体重, インスリン抵抗性および SPL 代謝に関する表現型. HFD を与えた WT および SMS2 Het KO マウスにおける体重増加 (A), 肝臓中 TG 含量 (B), 血漿 ALT (C), 空腹時血糖 (D) および血漿インスリン (E) 値を示す. OGTT (F) および OGTT 中の GSIS (G) を示す. 肝臓における SM (H) および Cer (I) 含量, 血漿における SM (J) および Cer (K) 濃度を示す. データは平均値 ± 標準誤差 (n=10/群) で表す. 統計学的解析は

two-way ANOVA と *post hoc* Bonferroni–Dunn test (A, F, G) あるいは Student’s unpaired *t*-test (B–E, H–K) で行い, WT マウスに比べて $p < 0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した. SMS2 Het KO マウスは WT マウスと比較して肝臓や血漿における SM の減少が見られるものの体重増加やインスリン抵抗性の有意な変化は認められない.

13. 対照および SMS2 LcKO マウスにおける体重, 糖代謝および SPL 代謝の評価

肝臓の SMS2 ならびに血漿における極長鎖アシル基を持つ Cer および HexCer と脂肪肝やインスリン抵抗性との関連をさらに詳細に検証するため, 肝細胞特異的に SMS2 を欠損させた SMS2 LcKO マウスを作製し, 脂肪肝やインスリン抵抗性の改善が見られなかった SMS2 Het KO マウスを対照マウスとして両者の表現型を比較した. 驚いたことに, 肝臓の SMS2 がほぼ完全に消失しているにも関わらず, SMS2 KO マウスで見られた HFD 負荷による肥満や体重増加の抑制作用は認められなかった (図 37A, B). また, SMS2 LcKO マウスは対照マウスに比べて肝肥大, 肝重量および肝臓中 TG 含量に変化が見られなかった他 (図 37C–E), 血漿 ALT および AST 値も有意な変化が認められなかった (図 37F, G). さらに, 空腹時血糖値 および血漿インスリン値の減少が見られず (図 37H, I), OGTT および ITT の成績も有意な改善が認められなかった (図 37J, K). また, 対照および SMS2 LcKO マウスの肝臓および血漿における SPL の組成を比較した. 対照マウスに比べ, SMS2 LcKO マウスは肝臓において C20–C24 アシル基を持つ SM が減少し, Cer (d18:1/24:1) および C16–C24 アシル基を持つ HexCer が増加した (図 37L–N). 血漿では, 対照マウスに比べて SMS2 LcKO マウスは C20–C24 アシル基を持つ SM が減少し, C22–C24 アシル基を持つ Cer および HexCer が増加した (図 37O–Q). これらの結果から, 肝細胞の SMS2 は体重増加, 脂肪肝およびインスリン抵抗性の抑制に対する寄与が小さく, 血漿の SPL 組成は肝臓の代謝活性の影響を一部受けていることが示唆されたが, Cer (d18:1/22:0) の増加が見えなかったことから遠隔組織の影響も受けている可能性が示唆された.

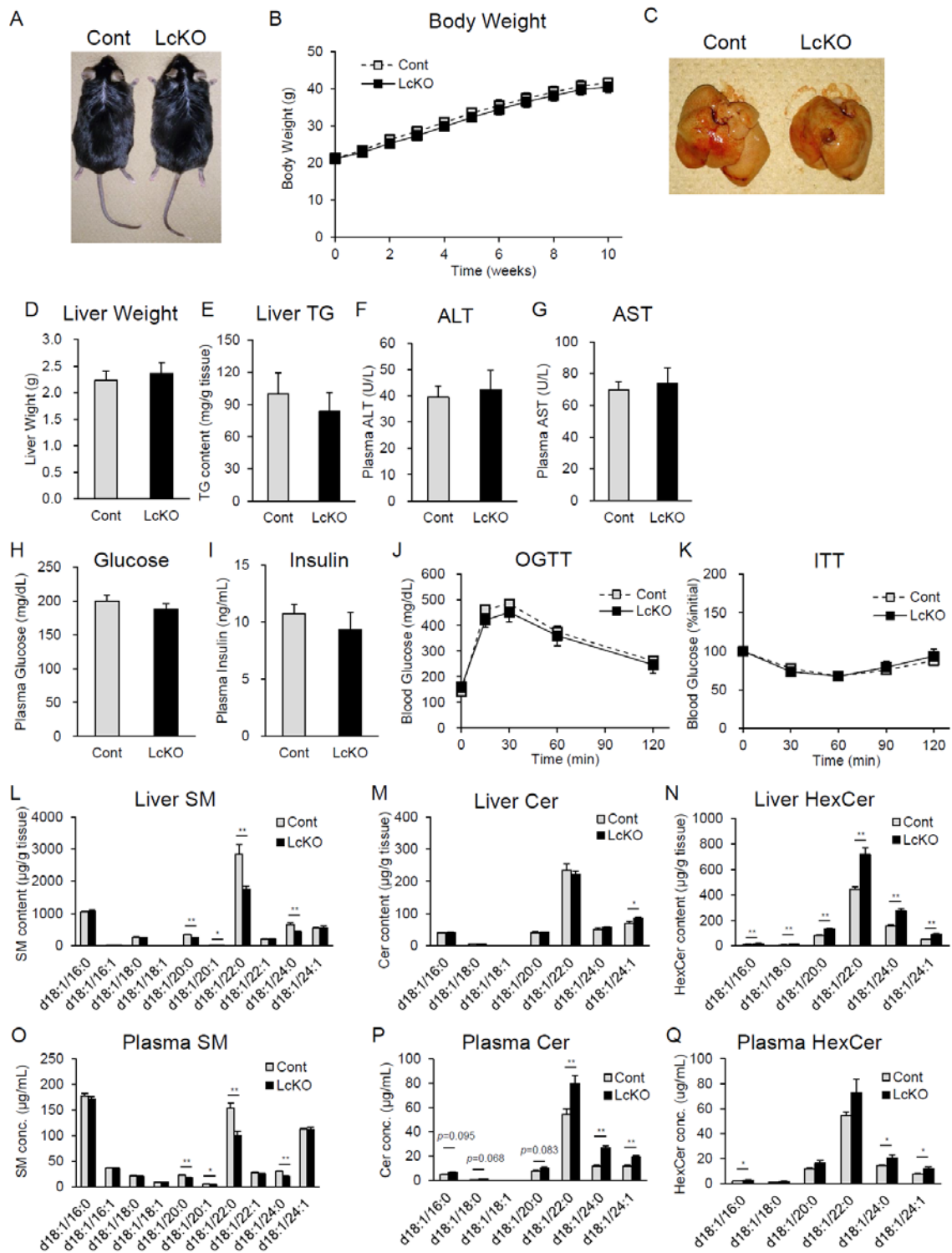


図 37. HFD 給餌下における SMS2 LcKO マウスの体重およびインスリン抵抗性に関する表現型. HFD を与えた対照および SMS2 LcKO マウスにおける肉眼所見 (A), 体重増加 (B), 肝臓肉眼所見 (C), 肝臓重量 (D), 肝臓中 TG 含量 (E), 血漿 ALT (F) および AST (G) 値, 空腹時血糖値 (H), 血漿インスリン値 (I) を

示す. OGTT (J) および ITT (K) における血糖値の推移を示す. HFD を与えた対照および SMS2 LcKO マウスの肝臓における SM (L), Cer (M) および HexCer (N) 含量, 血漿における SM (O), Cer (P) および HexCer (Q) 濃度を示す. データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=10/群) で表す. 統計学的解析は Student's unpaired *t*-test で行い, 対照マウスに比べて $p<0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した. データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=10/群) で表す. 統計学的解析は two-way ANOVA と *post hoc* Bonferroni–Dunn test (B, J, K) あるいは Student's unpaired *t*-test (D–I, L–Q) で行い, 対照マウスに比べて $p<0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した. SMS2 LcKO マウスは対照マウスと比較して体重増加, 脂肪肝およびインスリン抵抗性の有意な変化は認められないが, 肝臓や血漿において SM の減少と一部の Cer および HexCer の増加が見られる.

14. SMS2 の欠損による各組織におけるインスリンシグナルの検討

肝細胞の SMS2 が脂肪肝および全身のインスリン抵抗性にあまり寄与していない可能性が示唆されたことから, SMS2 KO マウスが WT マウスに比べてどの組織でインスリン感受性が亢進しているかを検証した. 具体的には, 主なインスリン標的組織である肝臓, 骨格筋 (腓腹筋) および WAT におけるインスリン誘導性の IR β および Akt のリン酸化への影響を検証した. WT マウスに比べて, SMS2 KO マウスの肝臓では, HFD 給餌条件下においてインスリン依存的な IR β と Akt のリン酸化の増強が見られたが, ND 給餌条件下では Akt のみリン酸化の増強が見られた (図 38A). 腓腹筋においても, WT マウスに比べて SMS2 KO マウスは HFD 給餌条件下においてインスリン依存的な IR β と Akt のリン酸化の増強が見られたが, ND 給餌条件下では Akt のみリン酸化の増強が見られた (図 38B). mWAT においては, WT マウスに比べて SMS2 KO マウスは HFD 給餌条件下においてインスリン依存的な Akt のリン酸化が増強したが, ND 給餌条件下では両群間に有意な変化が見られなかった (図 38C).

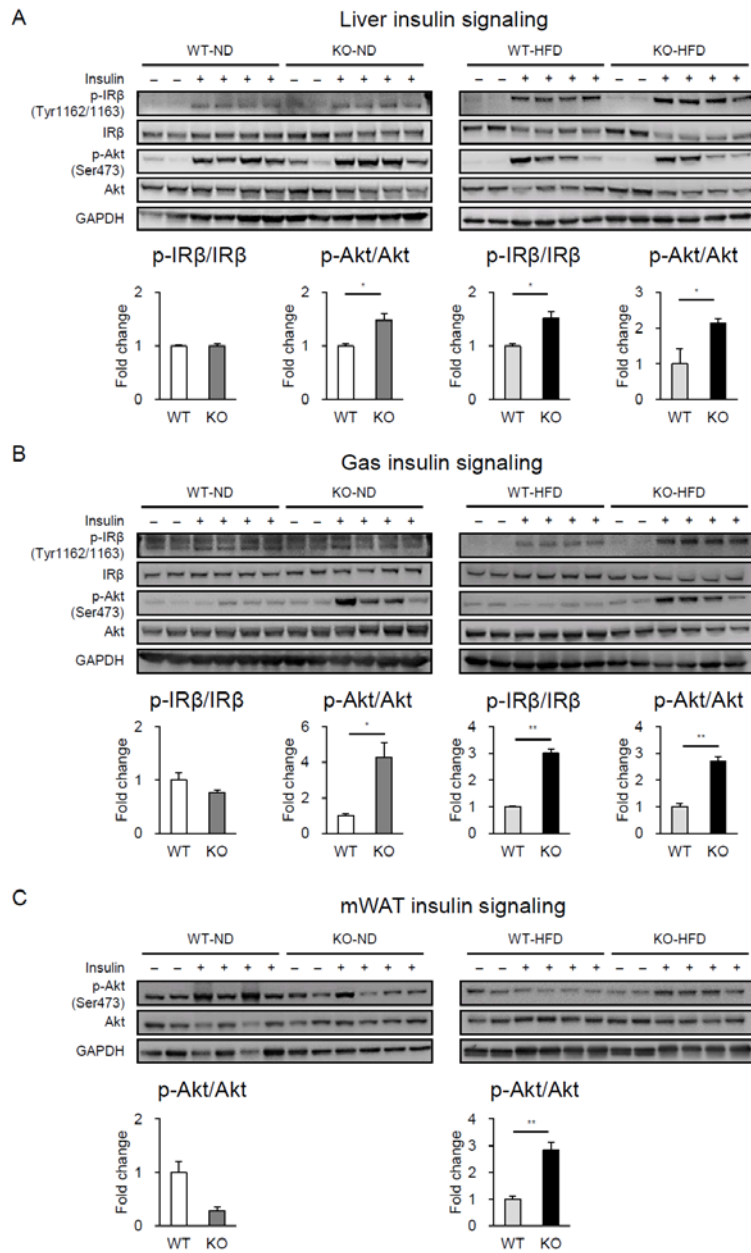


図 38. SMS2 の欠損がインスリン標的組織におけるインスリンシグナルに及ぼす影響。ND あるいは HFD を 12 週間与えた WT および SMS2 KO マウスの肝臓 (A), 腓腹筋 (Gas) (B) および mWAT (C) における p-Akt/Akt と p-IRβ/IRβを示す。データは平均値 ± 標準誤差 (n=4-8/群) で表す。統計学的解析は Student's unpaired *t*-test で行い、対応する WT マウスに比べて $p<0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

15. SMS2 の欠損による血中グルコースクリアランスおよび組織取り込み亢進作用

SMS2 の欠損によってインスリンシグナルの亢進が見られた臓器のうち、全身の糖取り込みの 70%を担うとされている骨格筋に着目した^{エラー! 参照元が見つかりません。}そこで、ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスにおける ^{18}F -FDG の代謝を検討した。全身の糖利用は ^{18}F -FDG の投与後 120 分間における血中クリアランスで、組織取り込みは ^{18}F -FDG の投与 120 分後における T/B 比でそれぞれ評価した。いずれのマウスにおいても ND 給餌条件下では ^{18}F -FDG が速やかにクリアランスされたが、HFD 給餌条件下では緩やかにクリアランスされた(図 39A, B)。また、ND、HFD いずれの給餌条件下においても、SMS2 の欠損によって血中 ^{18}F -FDG のクリアランスが有意に亢進した(図 39A, B)。

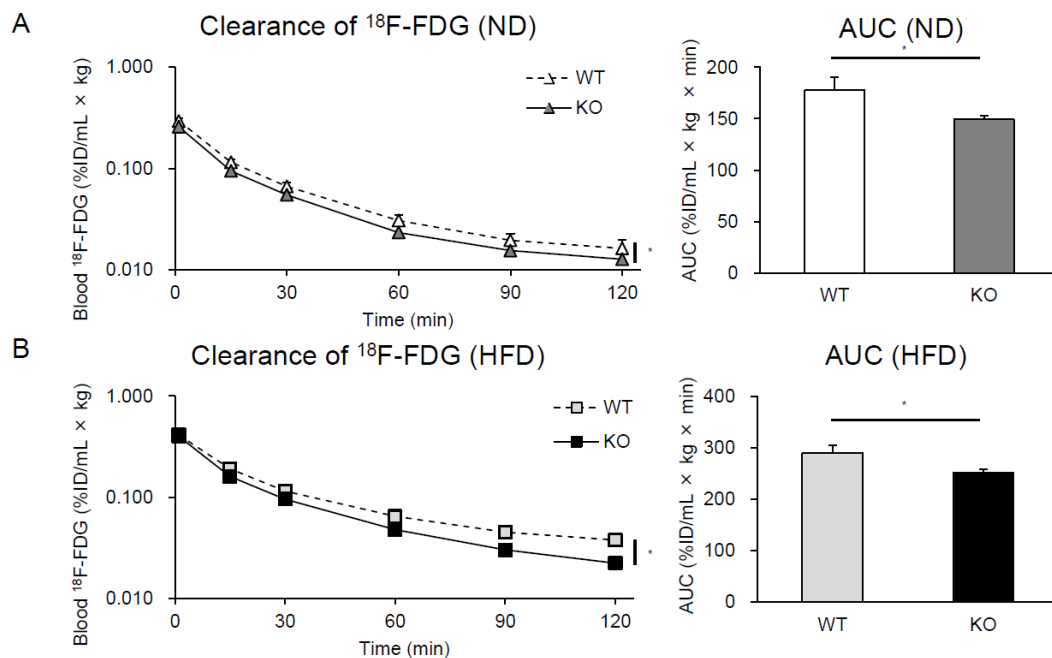


図 39. SMS2 の欠損が血中 ^{18}F -FDG のクリアランスに及ぼす影響. ND (A) あるいは HFD (B) を 12 週間与えた WT および SMS2 KO マウスにおける血中 ^{18}F -FDG 濃度の経時変化. データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=8/群) で表す. 統計学的解析は two-way ANOVA と Bonferroni–Dunn test あるいは Student’s unpaired t-test で行い、対応する WT マウスに比べて $p < 0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. SMS2 KO マウスは WT マウスに比べて血中からの ^{18}F -FDG の消失速度が速かった。

また、各マウスの組織における ^{18}F -FDG の取り込みを T/B 比により評価した。その結果、ND 給餌条件下ではいずれの組織においても WT マウスと SMS2 KO

マウスの間に有意な変化は認められなかった (図 40A). 一方, HFD 給餌条件下では WT マウスに比べ SMS2 KO マウスの大腿四頭筋, 腓腹筋, ヒラメ筋, 僧帽筋, 大臀筋, 横隔膜, 心臓等の筋肉系組織における ^{18}F -FDG の取り込みが増加傾向を示した他, 肝臓や脳への取り込みも増加した (図 40B). さらに, PET-CT を用いて同様の評価を行ったところ, ND 給餌条件下では両者の間に有意な変化が認められなかったが, HFD 給餌条件下では WT マウスに比べ SMS2 KO マウスの大腿四頭筋, 腓腹筋, 僧帽筋, iBAT, 心臓において ^{18}F -FDG の取り込みが増加傾向を示した (図 40C-E).

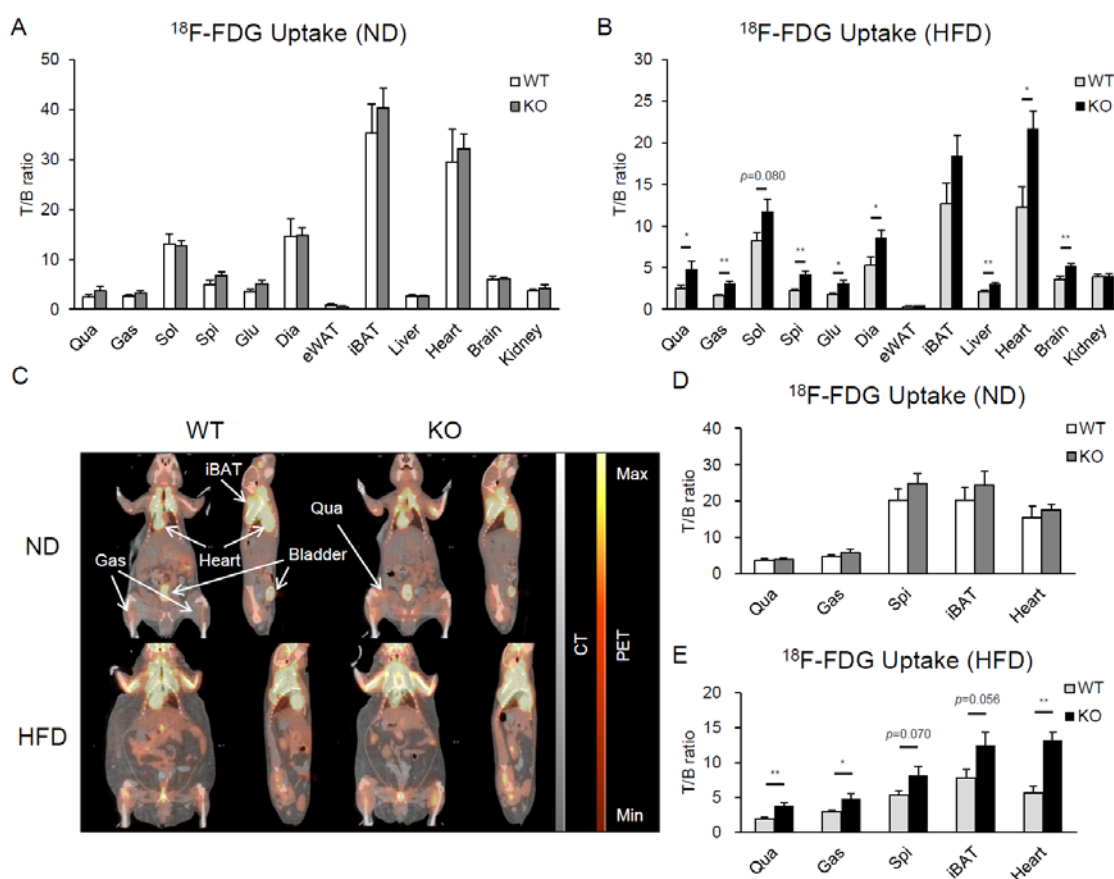


図 40. SMS2 の欠損が ^{18}F -FDG の組織分布に及ぼす影響. ND (A) あるいは HFD (B) を 12 週間与えた WT および SMS2 KO マウスの各組織における ^{18}F -FDG の取り込みを示す. データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n=8$ /群) で表す. 統計学的解析は Student's unpaired *t*-test で行い, 対応する WT マウスに比べて $p<0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した. * $p<0.05$, ** $p<0.01$. HFD 給餌下において SMS2 KO マウスは WT マウスに比べて骨格筋における ^{18}F -FDG の集積割合が増加した.

16. 各骨格筋における SMS1 と SMS2 の遺伝子発現比率

骨格筋への糖の取り込み増加が SMS2 の欠損による全身の糖代謝亢進に寄与していることが示唆されたことから、それらが SMS2 によって直接制御されているか否かを検討するため、各組織における *Sgms1* と *Sgms2* の発現量を比較した。その結果、SMS2 の欠損によって ^{18}F -FDG の取り込みが亢進したヒラメ筋、腓腹筋、大腿四頭筋、心臓および横隔膜では、いずれも *Sgms1* が *Sgms2* に比べて圧倒的に高発現しており、これらの組織における SM の産生は主に SMS1 によって制御されている可能性が示唆された (図 41)。SMS2 KO マウスでは、いずれの組織においても *Sgms2* の発現が消失していた。

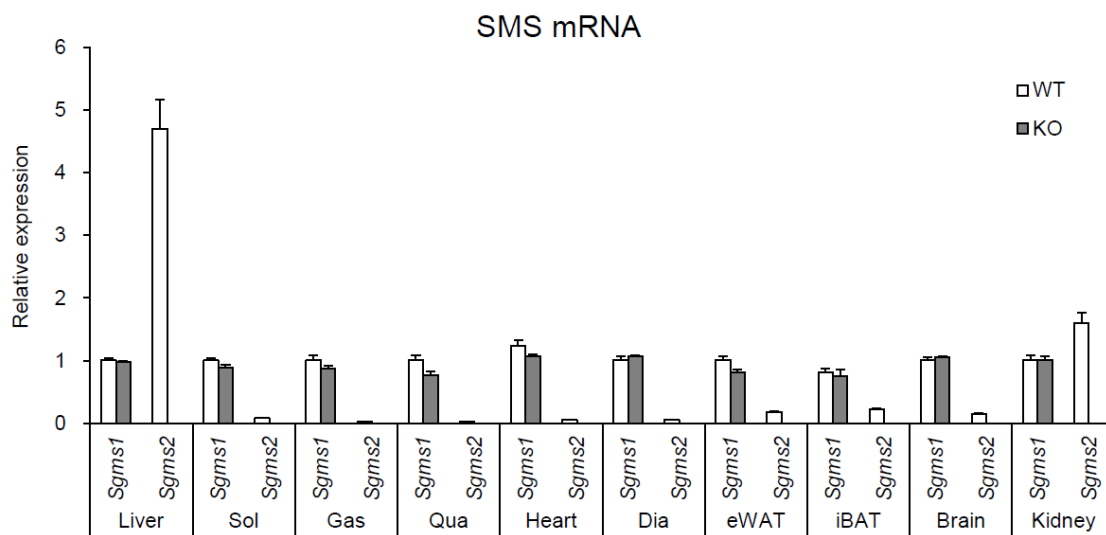


図 41. ND 給餌条件下の WT および SMS2 KO マウスの各組織における *Sgms1* と *Sgms2* の発現比率. 各組織において WT マウスの *Sgms1* に対する発現比率で表す. データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=6/群) で表す. 各骨格筋や心臓における *Sgms2* の発現量は低かった.

17. ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスの各筋肉系組織における SPL 含量の比較

続いて、SMS2 の欠損によって骨格筋および心臓において SM や Cer 等の SPL が変動するか否かを LC/ESI-MS/MS を用いて検証した。まず、いずれのマウスにおいても HFD 負荷によって、腓腹筋や大腿四頭筋では SM (d18:1/18:0) が減

少し、心臓では SM (d18:1/18:0) が増加して SM (d18:1/24:1) が減少するなど、SM の組成に変化が見られた (図 42A–O). 一方で、ヒラメ筋、腓腹筋、大腿四頭筋および横隔膜の SPL においては ND, HFD いずれの給餌条件下でも SMS2 の欠損による明確な影響は認められず (図 42A–I, M–O), 心臓においては HFD 負荷により増加した SM (d18:1/16:0) や SM (d18:1/18:0) が SMS2 の欠損によって減少し、Cer (d18:1/22:0) や Cer (d18:1/24:0) が増加した (図 42J–L). これらの結果から、SMS2 の欠損による骨格筋におけるインスリン感受性の亢進ならびに糖取り込みの増加は、SM 非依存的なメカニズムに依存している可能性が示唆された.

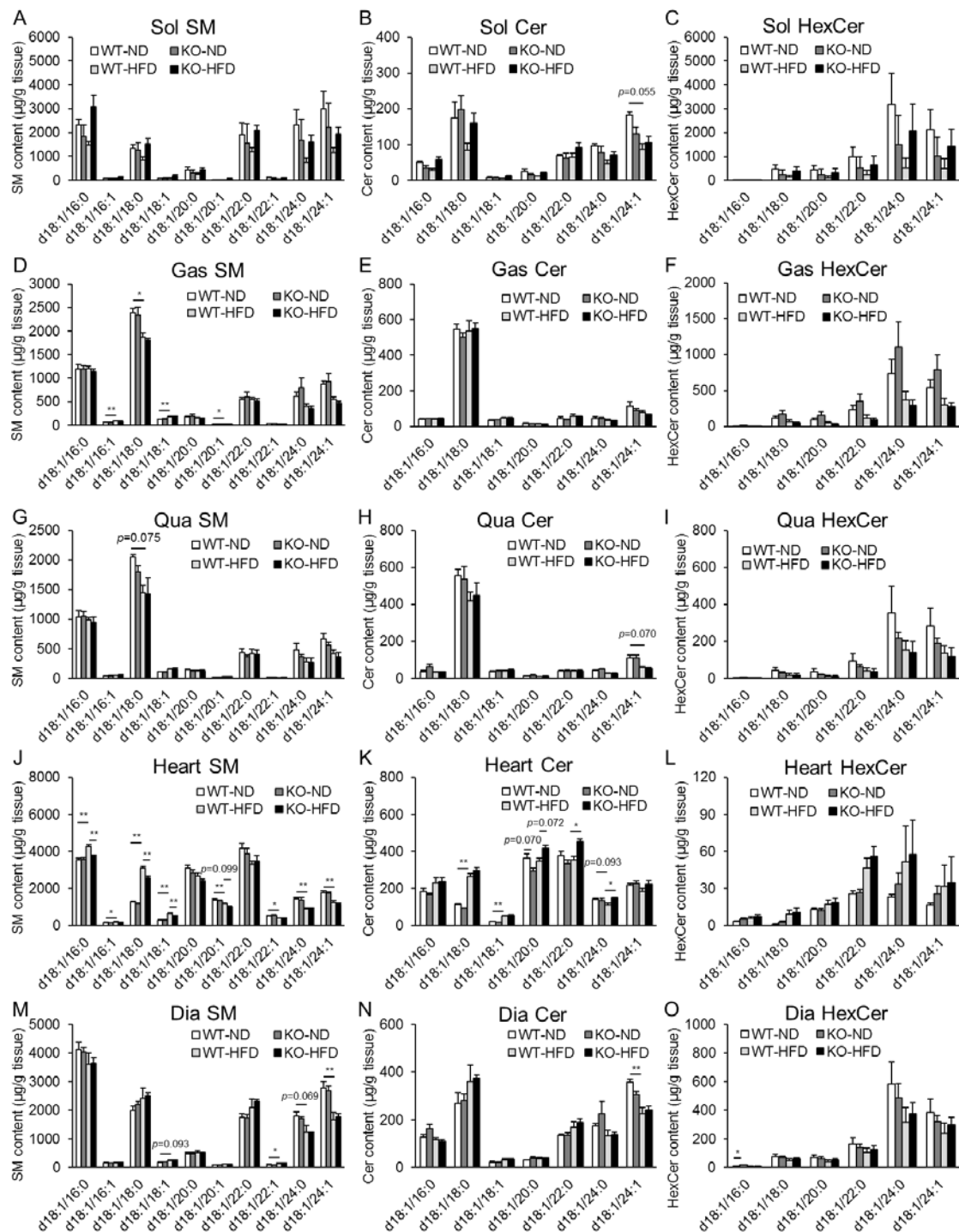


図 42. SMS2 の欠損が各骨格筋および心臓の組織分布に及ぼす影響. ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスのヒラメ筋 (Sol) における SM (A), Cer (B) and HexCer (C) 含量, 腓腹筋 (Gas) における SM (D), Cer (E), HexCer (F) 含量, 大腿四頭筋 (Qua) における SM (G), Cer (H), HexCer (I) 含量, 心臓における SM (J), Cer (K), HexCer (L) 含量, 横隔膜 (Dia) における SM (M), Cer (N),

HexCer (O) 含量を示す。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=4/群) で表す。統計学的解析は two-way ANOVA と *post hoc* Tukey-Kramer test で行い、対応する WT マウスに比べて $p<0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。SMS2 の欠損によって各骨格筋では明確な脂質変化が見られないが、心臓では一部の SM 分子種の減少が見られた。

17. SMS2 の欠損が骨格筋における糖・脂質代謝に及ぼす影響

骨格筋における異所性脂肪蓄積はインスリン抵抗性の発症に深く関与することが報告されていることから⁴²⁻⁴⁴，SMS2 の欠損が骨格筋における異所性脂肪蓄積に及ぼす影響を検討した。HFD を負荷することにより、腓腹筋において TG および DG 含量が顕著に増加した (図 43A-D)。一方、ND 給餌条件下では WT マウスと SMS2 KO マウスの間に腓腹筋中 TG および DG 含量に差は見られず、HFD 給餌条件下では WT マウスに比べ SMS2 KO マウスの腓腹筋において TG および DG 含量の減少傾向が見られたが、有意ではなかった (図 43A-D)。また、腓腹筋における NEFA 含量においても、SMS2 の欠損による明らかな変化は認められなかった (図 43E)。これらの結果から、SMS2 の欠損による骨格筋におけるインスリン感受性の亢進には、異所性脂肪蓄積の抑制以外のメカニズムも存在している可能性が示唆された。

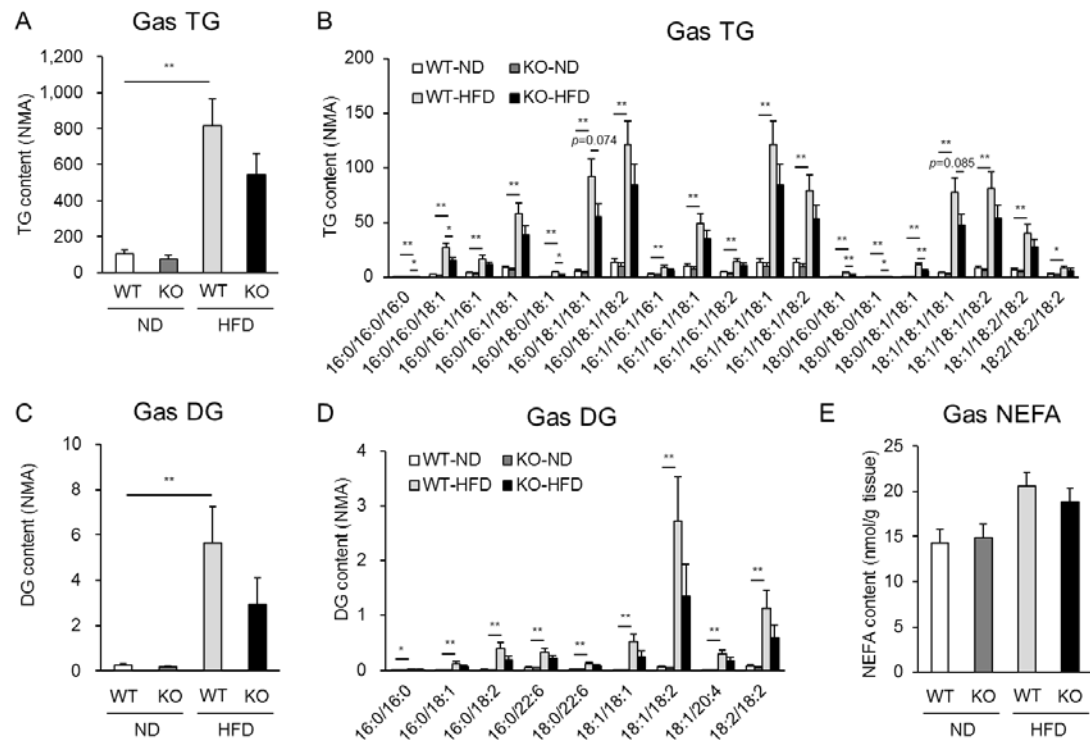


図 43. SMS2 の欠損が骨格筋における異所性脂肪蓄積に及ぼす影響. ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスの腓腹筋における総 (A) および分子種ごと (B) の TG 組織中含量, 総 (C) および分子種ごと (D) の DG 組織中含量, および NEFA 組織中含量 (E) を示す. データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=6/群) で表す. 統計学的解析は two-way ANOVA と *post hoc* Tukey-Kramer test で行い, 対応する WT マウスに比べて $p < 0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. 腓腹筋において SMS2 の欠損による有意な TG および DG の減少は見られなかった.

骨格筋, 特にミトコンドリアにおける脂肪酸酸化はインスリン抵抗性の発症と深く関与していることから⁹²⁻⁹⁴, ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスの腓腹筋における糖・脂質代謝, ミトコンドリア産生や脂肪酸酸化に関わる遺伝子の発現量を検証した. HFD の負荷によって, 脂肪酸合成 (*Srebf1*, *Fasn*, *Dgat1*), 伸長 (*Elovl1*), 取り込み (*Fabp3*), 酸化 (*Cpt1b*) に関わる遺伝子が増加した他, SPL 合成 (*Sgms2*, *CerS4*) およびミトコンドリア脂肪酸酸化 (*Hadha*, *Ech1*, *Cpt2*) に関わる遺伝子も増加した (図 44A-E). 一方, 糖輸送担体 (GLUT) 4 をコードする *Slc2a4* は HFD を与えることで減少した (図 44C). SMS2 を欠損させることによる影響では, HFD 給餌条件下において *Fasn*, *Fabp3*, *CerS1*

および *Ech1* が減少した (図 44A-E). これらの結果から, ミトコンドリアの過負荷により生じた FAO 亢進が, SMS2 の欠損によって維持あるいは抑制される傾向が示唆された.

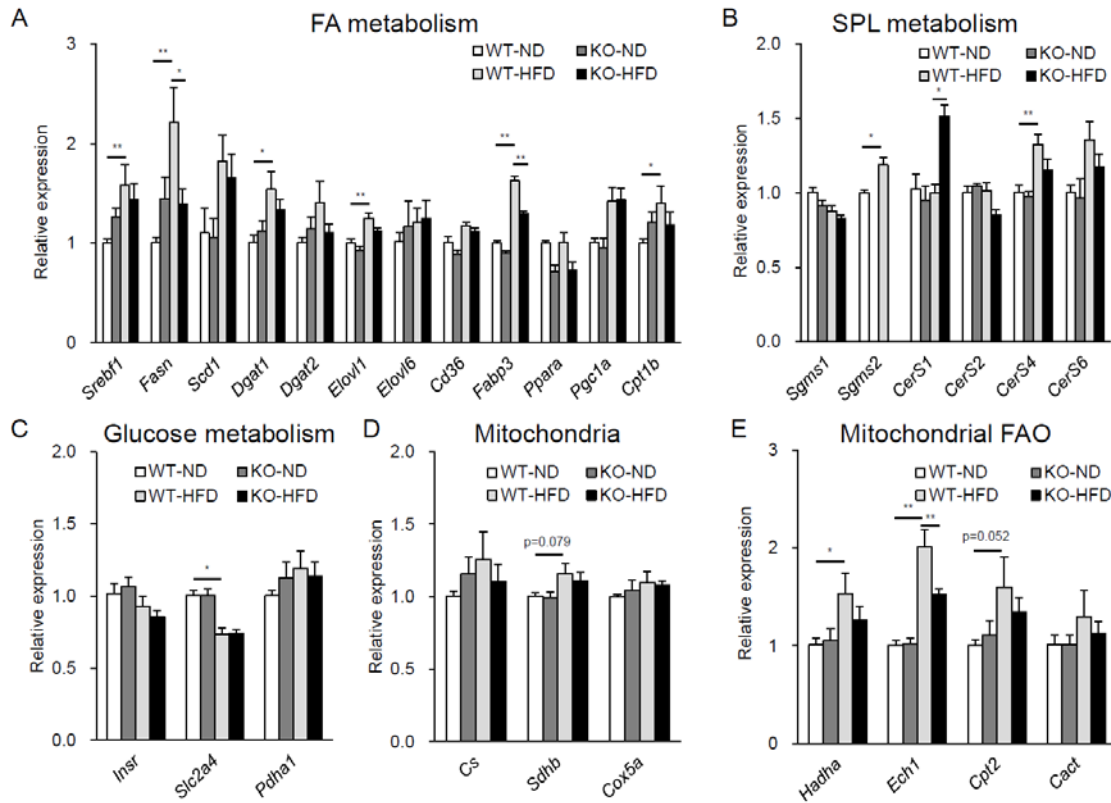


図 44. SMS2 の欠損が骨格筋における糖・脂質代謝およびミトコンドリア機能に及ぼす影響. ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスの腓腹筋における脂肪酸合成 (A), SPL 合成 (B), 糖代謝 (C), ミトコンドリア産生 (D) および脂肪酸酸化 (FAO) (E) に関わる遺伝子発現量を示す. データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=6/群) で表す. 統計学的解析は two-way ANOVA と *post hoc* Tukey-Kramer test で行い, 対応する WT マウスに比べて $p < 0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. 腓腹筋において SMS2 の欠損により HFD 負荷によって誘導される FAO の亢進が抑制される傾向が見られた.

考察

SMS2 KO マウスは HFD 誘導性の脂肪肝やインスリン抵抗性が抑制されることが報告されていたが³⁵⁻³⁷, SMS2 の標的組織やメカニズムは明らかとされていなかった. 本研究では, リピドミクスにより SMS2 の寄与が大きい組織を探索し, SMS2 の欠損による脂質変化と病態改善作用との関係を検証した.

まず, SMS2 KO マウスの代謝状態を確認した. その結果, SMS2 の欠損によって HFD 負荷により誘導される体重増加, 耐糖能異常, インスリン感受性の低下が抑制された. また, ND 給餌下においては, SMS2 KO マウスは WT マウスに比べて, 体重増加に変化は見られなかったが耐糖能やインスリン感受性の亢進が見られた. これらの変化は HFD 給餌下でより顕著であったことから, SMS2 の欠損によるインスリン感受性の亢進には, 体重増加の抑制に依存的, 非依存的両方のメカニズムが存在する可能性が示唆された. これらの表現型における SMS2 の標的組織を探索するため, SMS1 よりも SMS2 の遺伝子発現量が高い肝臓と腎臓に着目し, MALDI-FTICR-IMS と LC/ESI-MS/MS を用いて ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスの肝臓および腎臓における SM の量的・空間的変動の解析を行った. MALDI-FTICR-IMS を用いた解析により, SMS2 KO マウスの肝臓および腎臓における SM のアシル基の鎖長および組織内の領域特異的な変化を見出した.

MALDI-IMS は MALDI の性質上, 定量評価が困難であるとされているが, 近年, 組織懸濁液と安定同位体を用いて MALDI-IMS の定量性が確認されている⁹⁵. また, 本研究においても第 1 章で SM 標品混合液を用いて, 脂質濃度とイオン強度の間には良好な直線関係が認められ, MALDI-FTICR-IMS で得られたシグナル強度は組織切片上の標的分子含量を反映するものであることを確認した.

肥満に伴う異所性脂肪蓄積は, 肝臓や腎臓などで臓器障害を引き起こす. 特に, WAT から放出される FFA や DG は, インスリン抵抗性, 脂肪肝および腎機能障害への関与が指摘されている^{38, 45}. SM や Cer をはじめとする SPL もまたインスリン抵抗性や脂肪肝に深く関与する^{35, 37, 96}. Cer やスフィンゴシンの細胞中濃度が急性腎不全の発症過程で変化することが報告されている他^{97, 98}, HFD 負

荷に伴う腎臓中への Cer の過剰な蓄積が腎機能障害に関与していることが報告されている⁹⁹。また、ファブリー病は α -ガラクトシダーゼ A (α -Gal A) の活性が消失もしくは著しく低下することで血管壁、腎臓、心臓等の臓器にグロボトリアシルセラミド (Gb3) が蓄積し、臓器障害を引き起こすライソゾーム病である¹⁰⁰。ファブリー病のモデルマウスである α -Gal A KO マウスの腎臓を用いた MALDI-FTICR-IMS による解析では、腎皮質に複数の分子種の Gb3 が過剰に蓄積していることが報告されている¹⁰⁰。加えて、腎臓は脳や肝臓と並んで SM が多く含まれる臓器である¹⁰¹。これらの知見は SM もまた腎臓の機能や構造維持に重要な分子である可能性を示唆するものである。

本研究では、LC/ESI-MS/MS と MALDI-FTICR-IMS を用いて、HFD 負荷によって肝臓と腎臓で C18–C22 アシル基を持つ SM および Cer が増加し、C24-SM および Cer が減少することを示した。次に、HFD 負荷による SPL の組成変化のメカニズムを検証するため、リアルタイム PCR により肝臓や腎臓における *CerS* や *Elovl* の発現量を測定したが、SPL の組成変化を説明できるような遺伝子の変化は見られなかった。一方で、HFD は ND に比べて C24:0 や C24:1 脂肪酸含量が少ないことが報告されている¹⁰²。これらの事実から、HFD 負荷による SPL の組成変化は酵素レベルで制御されたものではなく餌由来の脂肪酸組成によるものであると推察された。

SMS2 は主に形質膜上で SM の *de novo* 合成を司る酵素である^{35,36}。SMS2 の肝臓における SPL 代謝や肝機能については複数の報告がされているが^{35–37}、腎臓における役割は明らかにされていない。LC/ESI-MS/MS を用いて ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスの肝臓および腎臓抽出物中の SM および Cer 含量を測定したところ、SMS2 を欠損させたことによる腎臓の SPL の変化は肝臓よりも軽微であった。腎臓における SMS1 の SPL 代謝への寄与に関する報告はないが、腎臓においては *Sgms1* の発現量が *Sgms2* よりも低いことから、SMS1 の腎臓における SM の *de novo* 合成への寄与は SMS2 と同程度かそれ以下であると推察される。本研究では、MALDI-FTICR-IMS を用いて腎臓切片上の SM 分子種の分布を可視化した。その結果、主に SM (d18:1/22:0) が髄鞘に分布し、SM (d18:1/24:0) や SM (d18:1/24:1) が皮質に分布した。また、SMS2 を欠損

させることで、各 SM 分子が主要な分布部位において顕著に減少した。したがって、MALDI-FTICR-IMS を用いることで、LC/ESI-MS/MS では明らかにすることが出来なかった腎臓領域ごとの SMS2 の欠損による SM 含量の変化が示された。これらの知見から、SMS2 の腎臓内領域およびアシル基鎖長特異的な SM の *de novo* 合成への関与が示唆された。

HFD 負荷により引き起こされる腎機能障害に対する SMS2 欠損の応答を検証したが、明確な改善が見られなかった。腎臓においては SMS2 の欠損による SM や Cer の変化が小さい上、HFD 負荷モデルにおける腎機能障害が比較的マイルドであることから¹⁰³、SM の腎機能における役割を明らかにするためには、より顕著な病態モデルでの検証が必要であると考えられる。また、CerS2 あるいは CerS6 KO マウスが腎臓において目立った表現型が見られないことが報告されている^{51, 104}。CerS2 KO マウスは、WT マウスに比べて腎臓中の C22–C24-SM が顕著に減少するが、C16-SM が代償的に増加し、総 SM 含量が維持される⁵¹。一方、CerS6 KO マウスは、WT マウスに比べて腎臓中の C16-SM が顕著に減少するが、C22–C24-SM がマイルドに増加することで、総 SM 含量が維持される¹⁰⁴。これらの知見から、CerS2 あるいは CerS6 の欠損によって引き起こされる代償的な SM の増加が、これらのマウスにおいて腎機能を維持している可能性がある。しかしながら、本研究で示されたように C16-SM、C22-SM および C24-SM の腎臓内分布がそれぞれ大きく異なることから、異なる分子種の SM が代償的な役割を果たしているとは考えにくく、腎臓における SM の役割を解明するには脂質の組織学的解析をより詳細に行っていく必要があると考えられる。

次に、WT マウスに比べて SMS2 KO マウスの肝臓では主に極長鎖アシル基を持つ SM が減少し、対応する Cer や HexCer が増加する傾向を確認したことから、SMS2 の欠損が肝臓における表現型に及ぼす影響を検証した。過去に報告されている通り^{35–37}、SMS2 の欠損によって HFD 負荷により引き起こされる脂肪肝やそれに伴う肝機能異常が抑制された。また、肝臓におけるインスリンシグナルも WT マウスに比べて SMS2 KO マウスで亢進していた。

肥満はインスリン抵抗性の最たる原因であることは周知された事実である¹⁰⁵。

その一方で、近年、インスリン抵抗性や異所性脂肪蓄積は体重や body mass index (BMI) とは独立した現象である可能性も指摘されている¹⁰⁶。そのメカニズムは今なお不明な点が多いが、WAT から放出された FFA が肝臓や骨格筋に蓄積し、インスリン抵抗性を引き起こすものと考えられている⁴²。また、肝臓や骨格筋に蓄積した DG もプロテインキナーゼ C の活性化を介してインスリン抵抗性を惹起する^{92, 93, 107-109}。ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスの肝臓における TG, DG および NEFA 含量と脂肪酸の代謝に関わる遺伝子の変動を検証したところ、HFD 給餌下において、WT マウスに比べて SMS2 KO マウスの肝臓では TG や DG 含量が有意に減少し、脂肪酸合成 (*Fasn*, *Scd1*, *Elovl1* および *Elovl6*)、取り込み (*Cd36*)、酸化 (*Pgc1a*) に関わる遺伝子の発現が減少した。また、HFD 給餌下で SMS2 の欠損により肝臓において糖からの脂肪合成に関わる *Pdha1* が減少した他、ミトコンドリア生合成 (*Cs*)、小胞体ストレス応答 (*Atf3*)、炎症 (*Ccl2*, *Tnfa*) に関わる遺伝子の発現が減少した。これらの結果から、SMS2 を欠損させると、脂肪酸合成や小胞体ストレス応答の抑制など様々なメカニズムを介して脂肪肝や肝臓でのインスリン抵抗性が改善すると考えられた。

多くの研究で、Cer がインスリン抵抗性に関与することが明らかにされている^{96, 110}。過去の報告において、WT および SMS2 KO マウスの初代培養肝細胞を用いた検討から形質膜における SM の減少と Cer の増加がインスリンシグナルの亢進に関与することが指摘されている³⁶。また、近年、脂肪肝やインスリン抵抗性における Cer の役割はアシル基の鎖長によって異なる可能性が指摘されている。Turpin らは CerS6 KO マウスが WT マウスに比べて HFD 誘導性のインスリン抵抗性や脂肪肝が軽減されたことから、C16-Cer がインスリン抵抗性や脂肪肝の憎悪に関与することを報告した⁷⁶。一方、Park らは CerS2 KO マウスが WT マウスに比べて HFD 誘導性のインスリン抵抗性が悪化し肝臓においてインスリンシグナルが抑制されることを報告しており⁷⁷、Raichur らは CerS2 Het KO マウスが WT マウスに比べて HFD 誘導性の肥満や脂肪肝が悪化したことから、C22 あるいは C24 極長鎖アシル基を持つ Cer がインスリンシグナルを正に制御する可能性を指摘している⁷⁸。また、Park らは CerS2 KO マウス由来の肝細胞は、WT マウス由来の肝細胞に比べてインスリン依存的な CD36/FAT の膜移行と脂肪酸の取り込みが低下する一方で、C22 あるいは C24 極長鎖アシル基を持つ Cer を肝

細胞に外部添加すると CD36/FAT の発現量が減少することを報告している¹¹¹. これらの知見は、脂肪肝やインスリン抵抗性に対して C16-Cer は促進、C24-Cer は抑制に働く可能性を示唆するものである. 本研究では、ND, HFD いずれの給餌下においても、WT マウスに比べて SMS2 KO マウスは肝臓や血漿において C22-C24 アシル基を持つ Cer および HexCer 濃度が増加することを確認しており、これらが肝臓におけるインスリン抵抗性や脂肪肝の改善に寄与している可能性がある. また、SMS2 の欠損によって Cer や HexCer が増加するメカニズムを考察するため、肝臓において SPL 代謝に関わる遺伝子の発現変動を検証した. *Elovl1* や *CerS2* は C22-C24 極長鎖アシル基を持つ SPL の合成に中心的な役割を果たしているが^{51, 112}, 肝臓において SMS2 の欠損によるこれらの遺伝子の増加は認められず、HFD 給餌下ではむしろ有意に減少した. 通常のマウスにおいて肝臓における *CerS2* mRNA 発現量と酵素活性は正相関することが報告されているが⁵⁰, HFD 負荷などのストレス環境下での関係は報告されていない. その上、*CerS2-6* の酵素活性はリン酸化によって制御されることが示されており¹¹³, SMS2 と *CerS2* の酵素活性の関係は今後の更なる検証が必要である. 一方で、長鎖アシル基を持つ SPL とは異なり、極長鎖アシル基を持つ SPL は SMS2 と同様に形質膜に濃縮されている²⁵. したがって、SMS2 の欠損により基質となる C22-C24 アシル基を持つ Cer が蓄積し、代謝が HexCer に流れたことでこれらの脂質が増加した可能性も考えられる.

Li らは肝細胞の形質膜における SM 減少と Cer の増加がインスリンシグナルの亢進に重要であることを示しているが、ピルビン酸負荷試験の結果から SMS2 の欠損が肝臓での糖新生に及ぼす影響は非常に小さいことを指摘している³⁶. また、ヒト SMS2 トランスジェニックマウスの表現型解析によって、肝臓において SMS2 が直接脂肪蓄積を制御していることが示されている³⁷. しかしながら、肝臓の SMS2 が全身のインスリン抵抗性や肥満に対してどの程度寄与しているのかを示した報告は無い. そこで、本研究では、肝細胞特異的に SMS2 を欠損させた SMS2 LcKO マウスを作製し、肝臓の SMS2 と肥満や全身のインスリン抵抗性との関係を検証した. HFD 負荷により、SMS2 LcKO マウスは対照マウスと同程度に体重が増加した. また、両群間で肝臓中の TG 含量や血漿 ALT および AST 値においても有意な変化は認められず、空腹時血糖値、インスリン値、OGTT

や ITT の成績も同程度であったことから、肝細胞の SMS2 が脂肪肝や全身のインスリン抵抗性に及ぼす影響は非常に小さいものであると考えられた。最近の研究では、肝臓と WAT など、遠隔組織が血中の SPL を介して互いにインスリン抵抗性や脂肪肝の発症に寄与している可能性が指摘されている¹¹⁴。肝細胞特異的に SMS2 を欠損させた際の肝臓や血漿における SM や Cer の変化が全身で SMS2 を欠損させた際の変化よりもマイルドであったことから、肝臓や血漿の SPL は肝臓のみならず WAT や小腸など他の組織から分泌された SPL の影響を受けている可能性があり、これらが脂肪肝にも寄与している可能性が考えられた。また、SMS2 LcKO マウスの作製にはアルブミンプロモーターが用いられていることから、SMS2 は肝細胞特異的に欠損しており、クッパー細胞や肝星細胞など他の細胞においては SMS2 が発現しているものと考えられる。Li らの報告において肝臓で SMS2 が直接脂肪蓄積を制御していることが示されているが、ヒト SMS2 トランスジェニックマウスの作製にはアポリポタンパク E/C-I プロモーターが使用されており⁷⁵、これらのタンパク質はマクロファージ等にも発現していることから、肝細胞以外の細胞が脂肪肝に寄与している可能性も考えらる。

また、Li らは SMS2 KO マウスは WT マウスに比べて肝臓でインスリンシグナルが亢進した他、WAT および骨格筋で 2-デオキシグルコースの取り込みが増加したことから、全身の糖代謝におけるこれらの組織の寄与を指摘している³⁶。しかしながら、全身の糖代謝における各組織の寄与度や、骨格筋部位ごとのインスリン依存的な糖の取り込みやクリアランスに関する詳細な解析はなされていない。そこで本研究では、SMS2 の欠損によるインスリン感受性亢進の責任臓器を探索するため、主要なインスリン標的臓器である肝臓、骨格筋および WAT を ND あるいは HFD を与えた WT および SMS2 KO マウスから採取し、これらの組織におけるインスリンシグナルを IR β および Akt のリン酸化を指標に検証した。その結果、SMS2 の欠損によって ND 給餌下では肝臓および腓腹筋において Akt のリン酸化が亢進し、HFD 給餌下では肝臓および腓腹筋において IR β および Akt のリン酸化が亢進した。これらの結果から、SMS2 KO マウスにおける糖代謝亢進の責任組織の一つとして骨格筋が寄与している可能性が示唆された。

空腹時血漿インスリン値や HOMA-R はインスリン抵抗性をスクリーニングす

る代表的な指標である⁸⁶。OGTT や ITT も耐糖能異常やインスリン感受性の評価に汎用される¹¹⁵。しかしながら、これらの方法では組織特異的なインスリン抵抗性や糖代謝を評価することは不可能である。高インスリン正常血糖クランプはインスリン抵抗性をより詳細に診断できる方法である¹¹⁵。この方法は臨床のみならずモデル動物を用いた非臨床試験においても指摘基準とされるが¹¹⁶、特に小動物で施行するには高度な技術が必要である。グルコースアナログである¹⁸F-FDG は主に腫瘍の診断に臨床応用されている PET プローブである^{117, 118}。¹⁸F-FDG は通常のグルコースと同様に種々の GLUT を介して細胞内に取り込まれ、ヘキソキナーゼによってリン酸化される¹¹⁹。しかしながら、¹⁸F-FDG は解糖に必要な 2' 水酸基を有さないことから、それ以降の代謝を受けずに細胞内に蓄積する。¹⁸F-FDG を用いたインスリン抵抗性および T2DM の診断も試みられており、T2DM の患者やインスリン抵抗性のモデル動物において組織特異的な¹⁸F-FDG の分布が病態と相関することが報告されている^{120, 121}。これらの知見から、¹⁸F-FDG は組織特異的な糖利用の評価において簡便なツールとなりうる¹²²。

そこで、肝臓以外の臓器が糖代謝に寄与しているか否かを検証するため、¹⁸F-FDG を用いて各組織における糖の取り込みを評価した。本研究では、GSIS 依存的な糖の取り込みを評価するため、¹⁸F-FDG 投与後に糖負荷を行った。OGTT および ITT の結果と同様に、ND、HFD いずれの給餌下においても SMS2 の欠損により血中¹⁸F-FDG のクリアランスが亢進し、SMS2 の欠損によって全身の糖代謝が亢進しているものと考えられた。また、本研究では組織中における糖代謝の簡便な指標である¹⁸F-FDG の T/B 比^{90, 123}についても検証した。糖の取り込みにおける分子メカニズムは細胞によって異なることが知られている。グルコースは主に GLUT を介して細胞内に取り込まれるが、GLUT1 は多くの組織に発現している一方で、GLUT2 は肝臓、GLUT3 は脳、GLUT4 は骨格筋、心臓および脂肪組織に高発現する¹²⁴。¹⁸F-FDG は内因性のグルコースと同様に、各細胞に各々の GLUT を介して細胞内に取り込まれ、ヘキソキナーゼの活性によってリン酸化されることにより蓄積する⁸⁸。しかしながら、肝細胞においてはグルコース-6-ホスファターゼの強い活性によって脱リン酸化され細胞外へ排出されることから、肝臓においては¹⁸F-FDG の集積比率が取り込み量を反映しないことが知られている¹²⁵。対照的に、¹⁸F-FDG は骨格筋や心臓においてはインスリン依

存的な GLUT4, 脳においてはインスリン非依存的な GLUT3 によってそれぞれ不可逆的に細胞内に取り込まれる¹²⁶. 本研究では, HFD 給餌下において, SMS2 KO マウスは WT マウスに比べて骨格筋 (大腿四頭筋, 腓腹筋, ヒラメ筋, 僧帽筋, 大臀筋, 横隔膜) および心臓における ^{18}F -FDG の T/B 比が増加した. ^{18}F -FDG は心臓に高濃度で分布するが, 心臓におけるインスリン依存的な糖の取り込みは骨格筋や全身におけるインスリン依存的な糖代謝と常に相関するわけではないことが報告されている^{120, 126}.

これらの知見から, HFD 給餌下で SMS2 の欠損により亢進した血中 ^{18}F -FDG のクリアランスには, 骨格筋における取り込み量の増加が大きく寄与しているものと考えられる. また, HFD 給餌下において, WT マウスに比べて SMS2 KO マウスは脳においても ^{18}F -FDG の集積比率が増加した. そのメカニズムは不明であるが, 本研究では ^{18}F -FDG と同時にグルコースを投与しており, SMS2 の欠損によってグルコースのクリアランスが亢進したために脳において ^{18}F -FDG の取り込みが相対的に増加した可能性が考えられる. 対照的に, ND 給餌下では SMS2 の欠損によって血中 ^{18}F -FDG のクリアランスが亢進したにもかかわらず, 骨格筋や心臓を含む各組織において ^{18}F -FDG の集積比率の増加が認められなかった. その理由は不明であるが, HFD 給餌下に比べ, ND 給餌下における WT マウスと SMS2 KO マウスの血中 ^{18}F -FDG クリアランスの差が小さいことから, 各組織に分布した ^{18}F -FDG の集積比率の差が捉えられなかったものと推察した. また, 同様の傾向が腓腹筋におけるインスリンシグナルでも捉えられている. 重要なことは, ND 給餌下においても WT マウスに比べて SMS2 KO マウスは全身の糖代謝が亢進したが, HFD 給餌下において両者の差が顕著であったことであり, 前述したように SMS2 を欠損させることによる糖代謝の亢進には体重増加の抑制に基づかないメカニズムが存在する可能性が示唆される.

一方で, 各骨格筋における SMS2 の発現量は SMS1 に比べてはるかに低く, SMS2 を欠損させることによる SM の有意な減少は認められなかった. 骨格筋における SPL 含量を部位ごとに測定したが, いずれの部位においても WT マウスと SMS2 KO マウスの間に SM, Cer および HexCer の有意な変化が認められず, これらの組織では SMS2 の遺伝子発現量も SMS1 に比べて極めて低いことを確

認した。しかしながら、Li らは WT マウスに比べて SMS2 KO マウスの骨格筋では SM 含量や SMS2 の酵素活性が有意に減少したと報告しており³⁶、本研究で得られた結果と異なる。その原因は不明であるが、マウスの週齢、飼育環境、骨格筋の部位などが異なっていた可能性が考えられる。その一方で、WT マウスに比べて SMS2 KO マウスの骨格筋では糖の取り込みが亢進することは2つの独立した研究で再現されており、SMS2 の欠損による骨格筋での糖の取り込み亢進作用は、SM の減少に依存しないメカニズムに基づく現象である可能性が示唆される。

また、本研究では SMS2 を欠損させることによる骨格筋での脂肪蓄積への影響も検証した。HFD 給餌下において、WT マウスに比べて SMS2 KO マウスの腓腹筋における TG や DG 含量の減少が見られたが、肝臓程の明確な変化は認められなかった。近年、骨格筋におけるミトコンドリアでの脂肪酸酸化の異常な亢進とインスリン抵抗性が密接に関連することが指摘されている⁹²⁻⁹⁴。本研究においても、HFD 負荷により腓腹筋において *Cd36* や *Fabp3* 等の脂肪酸酸化に関わる遺伝子の発現が増加した他、ミトコンドリア生合成 (*Cs*, *Sdhb*, *Cox5a*) や脂肪酸酸化 (*Hadha*, *Ech1*, *Cpt2*, *Cact*) に関わる遺伝子の発現が増加した。SMS1 を欠損させると膵臓や WAT においてミトコンドリアの機能異常が見られることが報告されている^{33, 34}。本研究では、WT マウスに比べて SMS2 KO マウスの骨格筋では、HFD 負荷によって増加したミトコンドリア機能に関連する遺伝子の発現が維持あるいは抑制されることを確認した。これらの結果から、SMS1 の欠損とは異なり SMS2 の欠損はミトコンドリアの機能異常は来さず、HFD 負荷によるミトコンドリアの過負荷を維持あるいは抑制する可能性が示唆された。しかしながら、SMS2 の欠損による骨格筋における脂肪蓄積やミトコンドリア脂肪酸酸化の抑制作用はマイルドであり、糖代謝の亢進を十分に説明できるような変化ではないと考えられる。

最近の研究では、肝臓と WAT など、遠隔組織が血中の SPL を介して互いにインスリン抵抗性や脂肪肝の発症に寄与している可能性が指摘されている¹¹⁴。本研究では、ND、HFD いずれの給餌下においても、WT マウスに比べて SMS2 KO マウスは血漿の C22-C24 アシル基を持つ Cer および HexCer 濃度が増加すること

を確認した。これらの知見から、SMS2 の欠損によって血漿の C22–C24 Cer が増加し、骨格筋にパラクライン的に作用して糖の取り込みやインスリンシグナルに影響を与えている可能性が考えられる。また、本研究では、SMS2 Het KO および LcKO マウスの表現型を解析し、これらのマウスが対照マウスに比べてインスリン抵抗性の改善が見られないことを確認した。これらの表現型に關して、対照マウスに対する血漿 Cer (d18:1/22:0) の増加率は SMS2 Het KO マウスが +6%, SMS2 LcKO マウスが +47% であり、SMS2 KO マウスの +74% に比べてマイルドであった。加えて、SMS2 KO マウスとは異なり、SMS2 Het KO マウスや SMS2 LcKO マウスは対照マウスに比べて肝臓における SM (d18:1/22:0) の有意な減少が見られたものの Cer (d18:1/22:0) の増加は認められなかった。また、SMS2 KO マウスと同様にこれらのマウスにおいても対照マウスに比べて肝臓や血漿の C22–C24 HexCer が増加したが、肝臓特異的に Ugcg を欠損させてもインスリン抵抗性や脂肪肝の改善が見られないことが報告されており¹²⁷、SMS2 の欠損による脂肪肝の抑制やインスリン抵抗性の改善は、SM や HexCer ではなく極長鎖 Cer を介したものである可能性が示唆された。

結論

SMS2 は肝臓および腎臓において SM のアシル基鎖長に特異的な *de novo* 合成に重要であり, SMS2 の欠損によって増加する C22-Cer が脂肪肝の抑制に寄与している可能性が示唆された. さらに, SMS2 を欠損させることによる全身のインスリン抵抗性の改善には, 骨格筋においてインスリン感受性が亢進することによる糖の取り込み増加が関与していることが示された. 一方, 肝細胞特異的に SMS2 を欠損させたマウスは対照マウスに比べて脂肪肝やインスリン抵抗性の改善が見られなかったことから, それらは肝細胞の SMS2 には依存しないメカニズムで制御されている可能性が示唆された.

総括

本研究で得られた知見は以下の通りである。

- 第 1 章

MALDI-FTICR-IMS を用いた脂質の組織学的解析から，SM (d18:1/18:0) と CerS1 は脳の灰白質に，SM (d18:1/24:1) と CerS2 は脳の白質にそれぞれ分布することを見出した．このことから，SM は分子内アシル基の鎖長ごとに対応する CerS 遺伝子の発現分布によって脳内分布が制御されていることが明らかとなった．すなわち，酵素レベルで厳密に分布が制御された各 SM 分子は特定臓器の高次構造や機能維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された．

- 第 2 章

LC/ESI-MS/MS による脂質の量的変動解析に併せて MALDI-FTICR-IMS を用いて脂質の組織内分布を評価することは，腎臓のような不均一な組織における脂質の量的・空間的变化の検証に有用な手法であることを確認した．また，これらの解析法により，SMS2 は肝臓および腎臓において組織内領域および SM のアシル基鎖長に特異的な SM の *de novo* 合成に重要であるとともに，これらの組織が SMS2 の標的組織であることが示唆された．SMS2 の欠損による腎機能への影響は見られなかったが，肝臓において増加した C22-Cer が脂肪肝の抑制に寄与している可能性が示唆された．さらに，SMS2 を欠損させることによる全身のインスリン抵抗性の改善には，骨格筋においてインスリン感受性が亢進することによる糖の取り込み増加が関与していることが示された．一方，肝細胞特異的に SMS2 を欠損させたマウスは対照マウスに比べて脂肪肝やインスリン抵抗性の改善が見られなかったことから，それらは肝細胞の SMS2 には依存しないメカニズムで制御されている可能性が示唆された．

本研究第 1 章では SM におけるアシル基の鎖長と生理機能との関係を直接証明するには至らなかったが，SM はアシル基の鎖長によって明確に分布が異なりそれらは酵素レベルで厳密に制御されていることを示した点で，SM の生理機能解明につながる重要な知見であると考えられる．今後は CerS1 あるいは CerS2

KO マウスの脳切片を IMS で解析し脳の形態学と比較することにより，特定の SM を減少させることによる脳の高次構造への影響の検証が期待される．

また，本研究第 2 章では肝細胞特異的に SMS2 を欠損させたマウスは対照マウスに比べて脂肪肝やインスリン抵抗性の改善が見られなかったことから，それらは肝細胞の SMS2 には依存しないメカニズムで制御されている可能性があるという新しい知見を提示した．今後，SMS2 KO マウス由来の骨髄を WT あるいは SMS2 LcKO マウスに移植し，クッパー細胞などの骨髄由来細胞の寄与を検討することや，SMS2 が比較的高発現していた小腸などの組織特異的な SMS2 KO マウスを作製し，肝臓以外の組織における SMS2 が脂肪肝に及ぼす影響を検討することが求められる．また，SMS2 KO マウスにおいて血漿中で C22-Cer が増加し，骨格筋において SM の減少を来さずに糖の取り込みが増加することを明らかとした点についても，血漿 Cer 濃度と骨格筋の糖取り込みの間に相関関係が見られることを示した新知見である．今後は両者の直接的な関係を証明することが期待される．

本研究により得られた知見が，SM の生理機能の解明および SMS2 を標的とした代謝疾患治療薬開発の一助となるものと期待する．

謝辞

本研究を行う機会を与えて下さり、また多大なご指導とご高閲を賜りました北海道大学大学院医学研究科病態情報学講座応用分子画像科学分野（アイソトープ総合センター）の久下裕司教授に深く感謝いたします。また、本研究を行うにあたり実験計画の策定や実験の手技についてご指導いただいた北海道大学大学院医学研究科病態情報学講座応用分子画像科学分野（アイソトープ総合センター）志水陽一助教（現、北海道大学大学院薬学研究院生体分析化学分野助教）に厚く御礼を申し上げます。さらに、北海道大学アイソトープ総合センターの西嶋剣一講師始め教職員の皆様、脂質生化学の視点から貴重なご助言をいただいた北海道大学大学院先端生命科学研究院生体機能研究室の五十嵐靖之教授始め研究員の皆様、北海道大学大学院薬学研究院生化学研究室の木原章雄教授、および核医学に関する専門的なご助言をいただいた北海道大学大学院医学研究科核医学分野の玉木長良教授、北海道大学大学院医学研究科トレーサー情報分析学分野の趙松吉教授始め教員の皆様に深く感謝いたします。そしてこのような研究に専念する機会を与えてくださった塩野義製薬株式会社創薬イノベーションセンターの沼田義人氏始め研究員の皆様にも感謝申し上げます。

引用文献

1. Kitatani, K. *et al.* Ceramide-centered sphingolipid metabolism. *Seikagaku* **83**, 495-505 (2011).
2. Milhas, D., Clarke, C. J. & Hannun, Y. A. Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids, *FEBS Lett.* **584**, 1887-1894 (2010).
3. Simons, K. & Gerl, M. J. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **11**, 688-699 (2010).
4. Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50 (2010).
5. Wennekkes, T. *et al.* Glycosphingolipids – nature, function, and pharmacological modulation. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 8848-8869 (2009).
6. Miyaji, M. *et al.* Role of membrane sphingomyelin and ceramide in platform formation for Fas-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* **202**, 249-259 (2005).
7. Ridgway, N. D. Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1484**, 129-141 (2000).
8. Asano, S. *et al.* Regulation of cell migration by sphingomyelin synthases: sphingomyelin in lipid rafts decreases responsiveness to signaling by the CXCL12/CXCR4 pathway. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 3242-3252 (2012).
9. Hussain, M. M., Jin, W. & Jiang, X. C. Mechanisms involved in cellular ceramide homeostasis. *Nutr. Metab. (Lond.)* **9**, 71 (2012).
10. Merrill, A. H., Jr. *et al.* Characterization of serine palmitoyltransferase activity in Chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **754**, 284-291 (1983).
11. Menaldino, D. S. *et al.* Sphingoid bases and de novo ceramide synthesis: enzymes involved, pharmacology and mechanisms of action. *Pharmacol. Res.* **47**, 373-381 (2003).
12. Levy, M. & Futerman, A. H. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life* **62**, 347-356 (2010).
13. Degroote, S., Wolthoorn, J. & van Meer, G. The cell biology of glycosphingolipids. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 375-387 (2004).
14. Jennemann, R. *et al.* Cell-specific deletion of glucosylceramide synthase in brain

- leads to severe neural defects after birth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12459-12464 (2005).
15. Ishibashi, Y. Kohyama-Koganeya, A. & Hirabayashi, Y. New insights on glucosylated lipids: metabolism and functions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1831**, 1475-1485 (2013).
 16. Hanada, K. *et al.* Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **426**, 803-809 (2003).
 17. Hanada, K. Kumagai, K. Tomishige, N. & Yamaji, T. CERT-mediated trafficking of ceramide. *Biochim. Biophys. Acta.* **1791**, 684-691 (2009).
 18. Huitema, K., van den Dikkenberg, J., Brouwers, J. F. & Holthuis, J. C. Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.* **23**, 33-44 (2004).
 19. Yamaoka, S. *et al.* Expression cloning of a human cDNA restoring sphingomyelin synthesis and cell growth in sphingomyelin synthase-defective lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 18688-18693 (2004).
 20. Taniguchi, M. & Okazaki, T. The role of sphingomyelin and sphingomyelin synthases in cell death, proliferation and migration-from cell and animal models to human disorders. *Biochim. Biophys. Acta.* **1841**, 692-703 (2014).
 21. Sassa, T. & Kihara, A. Metabolism of very long-chain fatty acids: genes and pathophysiology, *Biomol. Ther. (Seoul)* **22**, 83-92 (2014).
 22. Ginkel, C. *et al.* Ablation of neuronal ceramide synthase 1 in mice decreases ganglioside levels and expression of myelin-associated glycoprotein in oligodendrocytes. *J. Biol. Chem.* **287**, 41888-41902 (2012).
 23. Becker, I. *et al.* Differential expression of (dihydro) ceramide synthases in mouse brain: oligodendrocyte-specific expression of CerS2/Lass2. *Histochem. Cell. Biol.* **129**, 233-241 (2008).
 24. Kremser, C. *et al.* Cell-type-specific expression pattern of ceramide synthase 2 protein in mouse tissues. *Histochem. Cell. Biol.* **140**, 533-547 (2013).
 25. Sonnino, S. *et al.* Role of very long fatty acid-containing glycosphingolipids in membrane organization and cell signaling: the model of lactosylceramide in neutrophils. *Glycoconj. J.* **26**, 615-621 (2009).

26. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572 (1997).
27. Kasahara, K. & Sanai, Y. Functional roles of glycosphingolipids in signal transduction via lipid rafts. *Glycoconj. J.* **17**, 153-162 (2000).
28. Silva, L. C. *et al.* Ablation of ceramide synthase 2 strongly affects biophysical properties of membranes. *J. Lipid Res.* **53**, 430-436 (2012).
29. Ikeda, K. & Taguchi, R. Highly sensitive localization analysis of gangliosides and sulfatides including structural isomers in mouse cerebellum sections by combination of laser microdissection and hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry with theoretically expanded multiple reaction monitoring. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**, 2957-2965 (2010).
30. Arita, M. Mediator lipidomics in acute inflammation and resolution. *J. Biochem.* **152**, 313-319 (2012).
31. Goto-Inoue, N., Hayasaka, T., Zaima, N. & Setou, M. Imaging mass spectrometry for lipidomics. *Biochim. Biophys. Acta.* **1811**, 961-969 (2011).
32. Schuchman, E. H. The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **30**, 654-663 (2007).
33. Yano, M. *et al.* Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1-null mice. *J. Biol. Chem.* **286**, 3992-4002 (2011).
34. Yano, M. *et al.* Increased oxidative stress impairs adipose tissue function in sphingomyelin synthase 1 null mice. *PLOS ONE* **8**, e61380 (2013).
35. Mitsutake, S. *et al.* Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes. *J. Biol. Chem.* **286**, 28544-28555 (2011).
36. Li, Z. *et al.* Reducing plasma membrane sphingomyelin increases insulin sensitivity. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 4205-4218, (2011).
37. Li, Y. *et al.* Sphingomyelin synthase 2 activity and liver steatosis: an effect of ceramide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 suppression.

- Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 1513-1520 (2013).
38. Haffner, S. & Taegtmeier, H. Epidemic obesity and the metabolic syndrome. *Circulation* **108**, 1541-1545 (2003).
 39. Sajan, M. P. *et al.* Role of atypical protein kinase C in activation of sterol regulatory element binding protein-1c and nuclear factor kappa B (NFkappaB) in liver of rodents used as a model of diabetes, and relationships to hyperlipidaemia and insulin resistance. *Diabetologia* **52**, 1197-1207 (2009).
 40. Perry, R. J. *et al.* Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell* **160**, 745-758 (2015).
 41. DeFronzo, R. A. & Tripathy, D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **32**, Suppl 2 S157-163 (2009).
 42. Glass, C. K. & Olefsky, J. M. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab.* **15**, 635-645 (2012).
 43. Griffin, M. E. *et al.* Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* **48**, 1270-1274 (1999).
 44. Itani, S. I., Ruderman, N. B., Schmieder, F. & Boden, G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha. *Diabetes* **51**, 2005-2011 (2002).
 45. Guebre-Egziabher, F. *et al.* Ectopic lipid accumulation: A potential cause for metabolic disturbances and a contributor to the alteration of kidney function. *Biochimie.* **95**, 1971-1979 (2013).
 46. Bikman, B. T. & Summers, S. A. Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *J. Clin. Invest.* **121**, 4222-4230 (2011).
 47. Chavez, J. A. & Summers, S. A. A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab.* **15**, 585-594 (2010).
 48. Maceyka, M. & Spiegel, S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* **510**, 58-67 (2014).
 49. Pewzner-Jung, Y. *et al.* A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis: I. alterations in lipid metabolic pathways. *J. Biol. Chem.* **285**, 10902-10910 (2010).
 50. Pewzner-Jung, Y. *et al.* A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis:

- II. insights into molecular changes leading to hepatopathy. *J. Biol. Chem.* **285**, 10911-10923 (2010).
51. Imgrund, S. *et al.* Adult ceramide synthase 2 (CERS2)-deficient mice exhibit myelin sheath defects, cerebellar degeneration, and hepatocarcinomas. *J. Biol. Chem.* **284**, 33549-33560 (2009).
 52. Stoeckli, M., Chaurand, P., Hallahan, D. E. & Caprioli, R. M. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat. Med.* **7**, 493-496 (2001).
 53. Todd, P. J., Schaaff, T. G., Chaurand, P. & Caprioli, R. M. Organic ion imaging of biological tissue with secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization. *J. Mass Spectrom.* **36**, 355-369 (2001).
 54. Irie, M. *et al.* Integrated MALDI-MS imaging and LC-MS techniques for visualizing spatiotemporal metabolomic dynamics in a rat stroke model. *Metabolomics* **10**, 473-483 (2014).
 55. Jones, E. E. *et al.* On-tissue localization of ceramides and other sphingolipids by MALDI mass spectrometry imaging. *Anal. Chem.* **86**, 8303-8311 (2014).
 56. Sugiura, Y. *et al.* Visualization of the cell-selective distribution of PUFA-containing phosphatidylcholines in mouse brain by imaging mass spectrometry. *J. Lipid Res.* **50**, 1776-1788 (2009).
 57. Shrivastava, K. *et al.* Ionic matrix for enhanced MALDI imaging mass spectrometry for identification of phospholipids in mouse liver and cerebellum tissue sections. *Anal. Chem.* **82**, 8800-8806 (2010).
 58. Enomoto, H., Sugiura, Y., Setou, M. & Zaima, N. Visualization of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine and sphingomyelin in mouse tongue body by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **400**, 1913-1921 (2011).
 59. Delvolve, A. M., Colsch, B. & Woods, A. S. Highlighting anatomical sub-structures in rat brain tissue using lipid imaging. *Anal. Methods* **3**, 1729-1736 (2011).
 60. Hayasaka, T. *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight (MALDI-QIT-TOF)-based imaging mass spectrometry reveals a layered distribution of phospholipid molecular species in the mouse retina. *Rapid*

- Commun. Mass Spectrom.* **22**, 3415-3426 (2008).
61. Shimma, S. *et al.* Mass imaging and identification of biomolecules with MALDI-QIT-TOF-based system. *Anal. Chem.* **80**, 878-885 (2008).
 62. Suckau, D. *et al.* A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 952-965 (2003).
 63. Miura, D. *et al.* A strategy for the determination of the elemental composition by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry based on isotopic peak ratios. *Anal. Chem.* **82**, 5887-5891 (2010).
 64. Fujimura, Y. & Miura, D. MALDI mass spectrometry imaging for visualizing in situ metabolism of endogenous metabolites and dietary phytochemicals. *Metabolites* **4**, 319-346 (2014).
 65. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917 (1959).
 66. Castagnet, P. I. *et al.* Fatty acid incorporation is decreased in astrocytes cultured from alpha-synuclein gene-ablated mice. *J. Neurochem.* **94**, 839-849 (2005).
 67. Yamada, T. *et al.* Development of a lipid profiling system using reverse-phase liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry with rapid polarity switching and an automated lipid identification software. *J. Chromatogr. A.* **1292**, 211-218 (2013).
 68. Colsch, B. *et al.* Characterization of the ceramide moieties of sphingoglycolipids from mouse brain by ESI-MS/MS: identification of ceramides containing sphingadienine. *J. Lipid Res.* **45**, 281-286 (2004).
 69. Schiffmann, S. *et al.* Ceramide metabolism in mouse tissue. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 1886-1894. (2013)
 70. Roux, A. *et al.* Chronic ethanol consumption profoundly alters regional brain ceramide and sphingomyelin content in rodents. *ACS Chem. Neurosci.* **18**, 247-259 (2015).
 71. Goto-Inoue, N. *et al.* The detection of glycosphingolipids in brain tissue sections by imaging mass spectrometry using gold nanoparticles. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 1940-1943 (2010).
 72. Nordström, V. *et al.* Neuronal expression of glucosylceramide synthase in central

- nervous system regulates body weight and energy homeostasis. *PLOS Biol.* **11**, e1001506 (2013).
73. Fewou, S. N. *et al.* Reversal of non-hydroxy:alpha-hydroxy galactosylceramide ratio and unstable myelin in transgenic mice overexpressing UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase. *J. Neurochem.* **94**, 469-481 (2005).
 74. Ben-David, O. *et al.* Encephalopathy caused by ablation of very long acyl chain ceramide synthesis may be largely due to reduced galactosylceramide levels. *J. Biol. Chem.* **286**, 30022-30033 (2011).
 75. Liu, J. *et al.* Sphingomyelin synthase 2 is one of the determinants for plasma and liver sphingomyelin levels in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 850-856 (2009).
 76. Turpin, S. M. *et al.* Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab.* **20**, 678-686 (2014).
 77. Park, J. W. *et al.* Ablation of very long acyl chain sphingolipids causes hepatic insulin resistance in mice due to altered detergent-resistant membranes. *Hepatology* **57**, 525-532 (2013).
 78. Raichur, S. *et al.* CerS2 haploinsufficiency inhibits beta-oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance. *Cell Metab.* **20**, 687-695 (2014).
 79. Katoh, K., Takahashi, Y., Hayashi, S. & Kondoh, H. Improved mammalian vectors for high expression of G418 resistance. *Cell Struct. Funct.* **12**, 575-580 (1987).
 80. Yagi, T. *et al.* A novel negative selection for homologous recombinants using diphtheria toxin A fragment gene. *Anal. Biochem.* **214**, 77-86 (1993).
 81. Nanchi, I. *et al.* Exploring new gene integration sites for gene knock-in by gene-trapping strategy. *Transgenic Res.* **24**, 549-559 (2015).
 82. Kouno, T. *et al.* Ghrelin O-acyltransferase knockout mice show resistance to obesity when fed high-sucrose diet. *J. Endocrinol.* **228**, 115-125 (2016).
 83. Kanki, H., Suzuki, H. & Itohara, S. High-efficiency CAG-FLPe deleter mice in C57BL/6J background. *Exp. Anim.* **55**, 137-141 (2006).
 84. Schwenk, F., Baron, U. & Rajewsky, K. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* **23**, 5080-5081 (1995).

85. Postic, C. *et al.* Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 305-315 (1999).
86. Wallace, T. M., Levy, J. C. & Matthews, D. R. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* **27**, 1487-1495 (2004).
87. Magota, K. *et al.* Performance characterization of the Inveon preclinical small-animal PET/SPECT/CT system for multimodality imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **38**, 742-752 (2011).
88. Zhao, S. *et al.* Dynamic ¹¹C-methionine PET analysis has an additional value for differentiating malignant tumors from granulomas: an experimental study using small animal PET. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **38**, 1876-1886 (2011).
89. Thie, J. A. Clarification of a fractional uptake concept. *J. Nucl. Med.* **36**, 711-712 (1995).
90. Fu, S., Watkins, S. M. & Hotamisligil, G. S. The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell Metab.* **15**, 623-634 (2012).
91. DeFronzo, A., Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* **37**, 667-687 (1988).
92. Hancock, C. R. *et al.* High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7815-7820 (2008).
93. Wicks, S. E. *et al.* Impaired mitochondrial fat oxidation induces adaptive remodeling of muscle metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E3300-3309 (2015).
94. Abel, E. D. Free fatty acid oxidation in insulin resistance and obesity. *Heart Metab.* **48**, 5-10 (2010).
95. Jadoul, L., Longuespee, R., Noel, A. & De Pauw, E. A spiked tissue-based approach for quantification of phosphatidylcholines in brain section by MALDI mass spectrometry imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 2095-2106 (2015).
96. Ussher, J. R. *et al.* Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes* **59**, 2453-2464 (2010).
97. Zager, R. A. *et al.* Altered ceramide and sphingosine expression during the induction phase of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* **52**, 60-70 (1997).

98. Zager, R. A. *et al.* Altered sphingomyelinase and ceramide expression in the setting of ischemic and nephrotoxic acute renal failure. *Kidney Int.* **53**, 573-582 (1998).
99. Boini, K. M. *et al.* Role of sphingolipid mediator ceramide in obesity and renal injury in mice fed a high-fat diet. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **334**, 839-846 (2010).
100. Kuchar, L. *et al.* Fabry disease: renal sphingolipid distribution in the alpha-Gal A knockout mouse model by mass spectrometric and immunohistochemical imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 2283-2291 (2015).
101. Bickert, A. *et al.* Functional characterization of enzymes catalyzing ceramide phosphoethanolamine biosynthesis in mice. *J. Lipid Res.* **56**, 821-835 (2015).
102. Kozawa, S. *et al.* Induction of peroxisomal lipid metabolism in mice fed a high-fat diet. *Mol. Med. Rep.* **4**, 1157-1162 (2011).
103. Ortiz, A. *et al.* Translational value of animal models of kidney failure. *Eur. J. Pharmacol.* **759**, 205-220 (2015).
104. Ebel, P. *et al.* Inactivation of ceramide synthase 6 in mice results in an altered sphingolipid metabolism and behavioral abnormalities. *J. Biol. Chem.* **288**, 21433-21447 (2013).
105. Kahn, B. B. & Flier, J. S. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **106**, 473-481 (2000).
106. Scott, R. A. *et al.* Common genetic variants highlight the role of insulin resistance and body fat distribution in type 2 diabetes, independent of obesity. *Diabetes* **63**, 4378-4387 (2014).
107. Samuel, V. T. *et al.* Inhibition of protein kinase C epsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* **117**, 739-745 (2007).
108. Bezy, O. *et al.* PKC δ regulates hepatic insulin sensitivity and hepatosteatosis in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **121**, 2504-2517 (2011).
109. Szendroedi, J. *et al.* Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 9597-9602 (2014).
110. Stratford, S., Hoehn, K. L., Liu, F. & Summers, S. A. Regulation of insulin action by ceramide: dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *J. Biol. Chem.* **279**, 36608-36615 (2004).
111. Park, W. J. *et al.* Hepatic fatty acid uptake is regulated by the sphingolipid acyl

- chain length. *Biochim. Biophys. Acta.* **1841**, 1754-1766 (2014).
112. Ohno, Y. *et al.* ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **43**, 18439-18444 (2010).
 113. Sassa, T., Hirayama, T. & Kihara, A. Enzyme activities of the ceramide synthases CERS2-6 are regulated by phosphorylation in the C-terminal region. *J. Biol. Chem.* **291**, 7477-7487 (2016).
 114. Xia, J. Y. *et al.* Targeted induction of ceramide degradation leads to improved systemic metabolism and reduced hepatic steatosis. *Cell Metab.* **22**, 266-278 (2015).
 115. Matsuda, M. & DeFronzo, R. A. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* **22**, 1462-1470 (1999).
 116. Ayala, J. E., Bracy, D. P., McGuinness, O. P. & Wasserman, D. H. Considerations in the design of hyperinsulinemic-euglycemic clamps in the conscious mouse. *Diabetes* **55**, 390-397 (2006).
 117. Shiga, T. *et al.* Comparison of (18)F-FDG, (131)I-Na, and (201)Tl in diagnosis of recurrent or metastatic thyroid carcinoma. *J. Nucl. Med.* **42**, 414-419 (2001).
 118. Takei, T. *et al.* Enhanced apoptotic reaction correlates with suppressed tumor glucose utilization after cytotoxic chemotherapy: use of 99mTc-Annexin V, 18F-FDG, and histologic evaluation. *J. Nucl. Med.* **46**, 794-799 (2005).
 119. Zhao, S. *et al.* Biologic correlates of intratumoral heterogeneity in 18F-FDG distribution with regional expression of glucose transporters and hexokinase-II in experimental tumor. *J. Nucl. Med.* **46**, 675-682 (2005).
 120. Voipio-Pulkki, L. M. *et al.* Heart and skeletal muscle glucose disposal in type 2 diabetic patients as determined by positron emission tomography. *J. Nucl. Med.* **34**, 2064-2067 (1993).
 121. Cheng, C. *et al.* Evaluation of organ-specific glucose metabolism by 18F-FDG in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) knockout mice as a model of insulin resistance. *Ann. Nucl. Med.* **25**, 755-761 (2011).
 122. Glund, S. *et al.* Inhibition of acetyl-CoA carboxylase 2 enhances skeletal muscle fatty acid oxidation and improves whole-body glucose homeostasis in db/db mice.

- Diabetologia* **55**, 2044-2053 (2012).
- 123.Yokoyama, I. *et al.* Simple quantification of skeletal muscle glucose utilization by static 18F-FDG PET. *J. Nucl. Med.* **44**, 1592-1598 (2003).
- 124.Zhao, F. Q. & Keating, A. F. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr. Genomics* **8**, 113-128 (2007).
- 125.Caracó, C. *et al.* Cellular release of [18F]2-fluoro-2-deoxyglucose as a function of the glucose-6-phosphatase enzyme system. *J. Biol. Chem.* **275**, 18489-18494 (2000).
- 126.Kreissl, M. C. *et al.* Influence of dietary state and insulin on myocardial, skeletal muscle and brain [F]-fluorodeoxyglucose kinetics in mice. *EJNMMI Res.* 1:8 (2011).
- 127.Jennemann, R. *et al.* Hepatic glycosphingolipid deficiency and liver function in mice. *Hepatology* **51**, 1799-1809 (2010).