

(別紙1)

論文の内容の要旨

氏名	小林 慧子		
論文題目	(外国語の場合は、日本語で訳文を()を付して記入すること。) An important role of ceramide metabolism in diseases, which are caused by oxidative stress (酸化ストレスが引き起こす疾患におけるセラミド代謝の重要性に関する研究)		
審査委員	区分	職名	氏名
	委員長		印
	委員		印
	委員		印
	委員		印
	委員		印
	委員		印
内 容 の 要 旨			
<p>酸化ストレスは、加齢をはじめ、動脈硬化、糖尿病合併症、非アルコール性脂肪性肝炎、アルツハイマー病などの発症に関わっている。しかしながら、組織の酸化還元状態を評価し数値化することは極めて難しく、例えば、酸化ストレスを引き起こす代表的な分子である過酸化水素や脂質ヒドロペルオキシドは、常に抗酸化系酵素によって分解されるため、細胞の酸化状態を示すには不安定な分子である。一方、体内の抗酸化物質であるビタミンCやビタミンE、グルタチオンは相補的に作用することで、酸化ストレスから細胞を守ることが明らかとなっており、酸化ストレスの間接的な指標として用いられている。しかし、酸化ストレスに起因する病態の発症機構を解明し予防を図るためには、酸化ストレスの評価のみならず酸化ストレスによって惹起される広範な代謝変化を明らかにしていくことが必要である。</p> <p>セラミドは、アポトーシスや細胞分化、細胞増殖を引き起こすことで知られる内因性生理活性脂質である。HL-60細胞を抗がん剤で処理するとアポトーシスが起るが、その過程で過酸化水素が発生し、セラミド量が増加することが知られている。このセラミドの増加はカタラーゼで処理することにより抑制されるため、セラミドは過酸化水素を介した酸化ストレスによって増加すると考えられる。セラミドはde novo経路とサルベージ経路の2つの経路で生成されることが知られており、前者の律速酵素はセリンパルミトイルトランスフェラーゼ、後者はスフィンゴミエリナーゼ(SMase)による反応であることが既にわかっている。肝臓の酸化ストレス亢進モデルとして汎用される四塩化炭素(CCl₄)中毒ラットの組織中では、セラミド量が有意に増加することが知られている。前述のHL-60細胞のアポトーシスの結果と合わせて考えると、セラミドは酸化ストレスの亢進によって増加するのではないかという仮説に至った。この仮説に基づき、本学位論文では、酸化ストレスにより生体中のセラミド代謝がどのように変化するのか、そのメカニズムの解明を目的として、以下の五つの研究を行った。</p> <p>第一章ではラットにCCl₄を投与した劇症肝炎モデルでの検討結果を述べている。CCl₄投与により、総セラミド量は肝臓、脳、腎臓、血漿中で有意に増加した。一方、グルタチオンの還元型と酸化型の比(GSH/GSSG)はCCl₄投与2時間後に肝臓、脳、腎臓、血漿中で減少していた。ビタミンCは肝臓と腎臓で減少し、ビタミンEは肝臓、腎臓、血漿で減少したが、</p>			

いずれも GSH/GSSG の減少より遅い時間帯で見られた。肝臓、脳、腎臓中でのセラミド量の増加は、セラミド代謝酵素のうち中性スフィンゴミエリナーゼ (nSMase) の活性上昇に起因することがわかった。肝臓での nSMase 活性上昇は CCl₄ 投与 2 時間後に見られたが、これは GSH/GSSG の減少と同時間であった。これらの結果から、急激に酸化ストレスが亢進する劇症肝炎モデルでは、nSMase が活性化され、全身でのセラミド増加に寄与することが示唆された。劇症肝不全においては腎臓や脳などが障害されるが、これにセラミドが関与する可能性も示唆された。

第二章では、CCl₄ 投与ラットの血漿中セラミド量の増加が、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)の選択的阻害剤である、セレコキシブによって阻害されることを見出した。CCl₄ 誘発性の肝障害は二段階に分けられる。第一段階は CCl₄ が肝細胞中で薬物代謝酵素 P450 によって代謝され、トリクロロメチルラジカルを発生することでラジカル反応が進行し、大きな酸化ストレスが惹起される。続く第二段階では Kupffer 細胞が活性化され、その結果としてホスホリパーゼ A₂ や COX-2 の活性上昇が起こると考えられている。第一章の研究結果では血漿中のセラミド増加は CCl₄ 投与後 24 時間の段階で起こっていたが、セレコキシブを投与することでこの増加は顕著に抑制された。この結果から、セレコキシブは CCl₄ 誘発性肝障害の第二段階において、COX-2 を阻害することで CCl₄ の毒性を減弱させることが示唆された。なお、CCl₄ 中毒時の第二段階で Kupffer 細胞が活性化されることは、Kupffer 細胞の数が大幅に減少している Nucling 欠損マウスを用いた研究によって後年明らかにした。

第三章では、高血糖状態が続くことで全身性の慢性的な酸化ストレスが亢進する糖尿病モデルでのセラミド動態を検討した。Wistar 系雄性ラットにストレプトゾトシン (STZ) を腹腔内投与して糖尿病を誘発したところ、STZ 投与 2 週間後には、血漿中のセラミド生成酵素である分泌型スフィンゴミエリナーゼ (sSMase) 活性が増加し、血漿中セラミド量の有意な増加が見られた。しかし、腎臓、肝臓中の nSMase 活性には変化が見られなかった。一方、腎臓のセラミド量は生成酵素の活性に変化がなかったにも関わらず、STZ 投与 8 週間後に顕著に増加し、腎障害の指標である血中尿素窒素の増加も観察された。この結果から、糖尿病による慢性的な酸化ストレスは sSMase 活性を上昇させてセラミドを増加させ、合併症である腎症などを引き起こすことが示唆された。

第四章では、動脈硬化のモデルであるアポ E ノックアウトマウス (apoE^{-/-}) の血漿中のセラミド濃度と sSMase 活性が高いことを見出した。apoE^{-/-} の血漿中の総セラミド濃度は野生型と比べてすべての週齢で高く、どちらのセラミド量も加齢により減少することがわかった。また、apoE^{-/-} の大動脈中のセラミド量は、動脈硬化が形成される時期である 15 週齢で有意な増加が認められた。これらの結果から、sSMase 活性は酸化ストレスによって増加し、セラミドを生成することで動脈硬化形成に至ることが考えられた。

第五章では、sSMase 活性が酸化還元反応により制御されることを見出した。即ち、過酸化水素により酸化されると sSMase 活性は上昇し、活性化した sSMase は抗酸化剤 GSH により不活化した。この結果に基づいて、食品に含まれる抗酸化物質が sSMase 活性を阻害するかどうか検討を行った。その結果、カテキンのうち(-)-エピカテキン 3-O-ガレート (ECg) と (-)-3'-O-メチルエピガロカテキン 3-O-ガレート (EGCg-3'-O-Me) が、sSMase 活性を強力に阻害することを明らかにした。上述の研究により、sSMase 活性は動脈硬化や糖尿病合併症の増悪に寄与することが示唆されていることから、食品中の抗酸化物質が sSMase を阻害することによって、これら病態の増悪を予防する可能性を見出した。

本学位論文では、生体内のセラミド量と SMase 活性が酸化ストレス亢進後の病態発症において極めて重要な役割を担うこと、また、生体内のセラミド動態が組織障害に至る重要なメカニズムになる可能性を示した。セラミドは表皮の角質層における脂質ラメラの構成成分であり、皮膚バリア機能に重要な働きをすることが一般に知られているが、本研究で酸化ストレスに対する生理的応答機能も併せ持つことが明らかとなった。これらの知見はメタボリックシンドロームの進展に対する食品成分による効果的な予防法を確立するにあたって、新しい視点をもたらすものと考えている。

(別紙2)

論文審査の結果の要旨

氏 名			
論文題目	(外国語の場合は、日本語で訳文を()を付して記入すること。) An important role of ceramide metabolism in diseases, which are caused by oxidative stress (酸化ストレスが引き起こす疾患におけるセラミド代謝の重要性に関する研究)		
審査委員	区分	職 名	氏 名
	委員長		印
	委 員		印
	委 員		印
	委 員		印
	委 員		印
	委 員		印
要 旨			
<p>酸化ストレスは、加齢をはじめ、動脈硬化、糖尿病合併症、非アルコール性脂肪性肝炎、アルツハイマー病などの発症に関わっていることが知られている。酸化ストレスを引き起こす代表的な分子である過酸化水素や脂質ヒドロペルオキシドは、常に抗酸化系酵素によって分解されるため、細胞の酸化状態を示すには不安定な分子である。そのため、相補的に作用することにより酸化ストレスから細胞を守ることが明らかとなっている生体内抗酸化物質のビタミン C やビタミン E、グルタチオンが酸化ストレスの間接的な指標として用いられている。しかしながら、酸化ストレスに起因する病態の発症機構を解明し予防を図るためには、酸化ストレスの間接的評価だけでは不十分であり、酸化ストレスによって惹起される広範な代謝変化を明らかにしていくことが必要と考えられる。</p> <p>セラミドは、アポトーシスや細胞分化、細胞増殖を引き起こすことで知られる内因性生理活性脂質であり、過酸化水素を介した酸化ストレスによって増加すること、肝臓の酸化ストレス亢進モデルとして汎用される四塩化炭素(CCl₄)中毒ラットの組織中で有意に増加することが報告されている。これらの知見から、セラミドは酸化ストレスの亢進によって増加するのではないかという仮説に立脚し、本学位論文では、酸化ストレスによる生体中のセラミド代謝動態の解明を目的として、以下の五つの研究を行っている。</p> <p>第一章ではラットに CCl₄ を投与した劇症肝炎モデルを用い、各組織におけるセラミド量および酸化ストレスの間接的指標であるグルタチオン、ビタミン C、E の動態を明らかにしている。CCl₄ 投与により、総セラミド量は肝臓、脳、腎臓、血漿中で有意に増加した。一方、グルタチオンの還元型と酸化型の比 (GSH/GSSG) は CCl₄ 投与 2 時間後に肝臓、脳、腎臓、血漿中で減少した。ビタミン C は肝臓と腎臓で減少し、ビタミン E は肝臓、腎臓、血漿で減少したが、いずれも GSH/GSSG の減少より遅い時間帯で観察された。さらに、肝臓、脳、腎臓中でのセラミド量の増加は、セラミド代謝酵素のうちスフィンゴミエリンからセラミドを生成する酵素の一種である中性スフィンゴミエリナーゼ (nSMase) の活性上昇に起因することも明らかにしている。肝臓での nSMase 活性上昇は CCl₄ 投与 2 時間後に見られたが、これ</p>			

は GSH/GSSG の減少と同時間であった。これらの結果は、急激に酸化ストレスが亢進する劇症肝炎モデルでは、nSMase が活性化され全身でのセラミド増加を誘導すること、劇症肝不全においては腎臓や脳などが障害されるが、これにもセラミドが関与する可能性を示唆するものである。

第二章では、CCl₄ 投与ラットの血漿中セラミド量の増加がシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)の選択的阻害剤であるセレコキシブによって阻害されることを見出している。CCl₄ 誘発性の肝障害は、CCl₄ が肝細胞中で薬物代謝酵素 P450 によって代謝され、トリクロロメチルラジカルを発生することでラジカル反応が進行し、大きな酸化ストレスが惹起される第一段階と、Kupffer 細胞が活性化され、その結果としてホスホリパーゼ A₂ や COX-2 の活性上昇が起こる第二段階からなると考えられている。第一章の研究結果では血漿中のセラミド増加が CCl₄ 投与後 24 時間の段階で起こっていたが、セレコキシブを投与することでその増加は顕著に抑制されることを明らかにした。

第三章では、高血糖状態が続くことで全身性の慢性的な酸化ストレスが亢進する糖尿病モデルでのセラミド動態を検討している。ストレプトゾトシン (STZ) 誘発 Wistar 系雄性糖尿病ラットにおいて、STZ 投与 2 週間後には、血漿中のセラミド生成酵素である分泌型スフィンゴミエリナーゼ (sSMase) 活性が増加し、血漿中セラミド量の有意な増加が見られた。しかし、腎臓、肝臓中の nSMase 活性には変化が認められなかった。一方、腎臓のセラミド量は生成酵素の活性に変化がなかったにも関わらず、STZ 投与 8 週間後に顕著に増加し、腎障害の指標である血中尿素窒素の増加も観察された。糖尿病による慢性的な酸化ストレスにおいては、sSMase 活性上昇によってセラミドが増加し、合併症である腎症などを引き起こす可能性を示唆する結果を得ている。

第四章では、動脈硬化のモデルであるアポ E ノックアウトマウス (apoE^{-/-}) において血漿中のセラミド濃度と sSMase 活性が高いことを見出している。apoE^{-/-} の血漿中の総セラミド濃度は野生型と比べてすべての週齢で高く、どちらのセラミド量も加齢により減少することがわかった。また、apoE^{-/-} の大動脈中のセラミド量は、動脈硬化が形成される時期である 15 週齢で有意な増加が認められた。これらの結果は、sSMase 活性が酸化ストレスによって増加し、セラミドを生成することで動脈硬化形成に至ることを示唆している。

第五章では、sSMase 活性が酸化還元反応により制御されることを見出している。過酸化水素による酸化は sSMase 活性を上昇させ、活性化した sSMase は抗酸化剤 GSH により不活化し、可逆性を示すことが明らかとなった。さらに、食品中に含まれる抗酸化物質が sSMase 活性を阻害しうかを検討したところ、(-)-エピカテキン 3-O-ガラートと (-)-3'-O-メチルエピガロカテキン 3-O-ガラートが sSMase 活性を強力に阻害することを明らかにした。sSMase 活性が動脈硬化や糖尿病合併症の増悪に関与することが示唆されていることから、食品中の抗酸化物質が sSMase を阻害することによって、これら病態の増悪を予防する可能性を見出した。

以上、本学位論文は、生体内のセラミド動態と SMase 活性が酸化ストレス亢進後の病態発症、増悪において極めて重要な役割を果たす可能性を初めて体系的に示したものである。セラミドは表皮の角質層における脂質ラメラの構成成分であり、皮膚バリア機能に重要な働きをすることが一般に知られているが、本研究により酸化ストレスに対する生理的応答機能も併せ持つことが明らかとなった。これらの知見はメタボリックシンドロームの進展に対する食品成分による効果的な予防法を確立するにあたって、新しい視点をもたらすものと評価できる。

本学位論文の第一章の内容は、論文提出者を第四執筆者（共同執筆者 10 名中）とする査読付き英文誌 (Toxicology (2009) 261, 33-40)、第二章の内容は、論文提出者を第五執筆者（共同執筆者 9 名中）とする査読付き英文誌 (Biol. Pharm. Bull. (2010) 33, 707-709) に掲載されている。さらに、第三章、第四章、第五章の内容は、論文提出者を第一執筆者として、それぞれ査読付き英文誌である Med. Chem. Commun. (2011) 2, 536-541、Biol. Pharm. Bull. (2013) 36, 1192-1196 および J. Nutr. Sci. Vitaminol. (2016) 62, 125-131 に掲載されている。

よって、本学位申請論文は、奈良女子大学博士（学術）の学位を授与されるに十分な内容を有していると判断した。