◆ 総 説 ◆

血小板由来生理活性脂質スフィンゴシン 1-リン酸の研究の新展開

矢 富 裕*

Recent Advances in the Research of Sphingosine 1-Phosphate,
a Platelet-derived Bioactive Lipid

Yutaka YATOMI*

Key words: platelet, sphingosine 1-phosphate, lysophospholipid, Endothelial Differentiation Gene, vascular biology

緒 言

グリセリン脂質同様、スフィンゴ脂質のシグナル伝達への関与は疑いのないものとなっているが、血栓・止血領域において中心的な役割を果たす血小板も例外ではない。特に、スフィンゴシン (sphingosine ; Sph) キナーゼの産物であるスフィンゴシン 1-リン酸 (Sph 1-phosphate ; Sph-1-P) は血小板に豊富に蓄積され、活性化に伴って細胞外へ放出され、細胞間メディエーターとして種々の作用を呈する。1996 年に本誌に総説を書く機会を与えていただいた¹⁾頃には、Sph-1-P は細胞内セカンド・メッセンジャーとして作用すると考える研究者が多かった (図 1 左)。また、血小板自身以外への Sph-1-P の作用に関する知見が乏しく、血栓・止血さらには血管生物学における Sph-1-P の意義に関しては不明の部分が多かった。しかし、その後、Sph-1-P の細胞表面受容体としての Endothelial Differentiation Gene (EDG) ファミリーが同定され²⁾³⁾、さらには、その下流の情報伝

達経路が明らかとなり、細胞間メディエーターとしての Sph-1-P の役割が確立されるに至った (図 1 右)。また、Sph-1-P は血漿 (血清) 中にも検出されること、そして、EDG ファミリーに属する Sph-1-P 受容体が血管を構成する細胞上に発現されていることが明らかとなり、Sph-1-P は、血小板由来脂質メディエーターとして、血管生物学上重要な役割を果たすと考えられるようになってきている (図 2)。

本稿では、血小板由来 Sph-1-P の血管生物学における役割に関して、最近の知見をまとめた。類似のテーマに関する他の総説もご参照いただき^{4)~6)}、本総説における引用文献の不足を補っていただきたい。なお、リゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid ; LPA) は、Sph-1-P と同じく血小板由来リゾリン脂質性メディエーターと考えられており、しかも、その細胞膜上の受容体もやはり EDG ファミリーであり、Sph-1-P との機能分担が注目されるが、紙面の都合上ここでは触れない。我々の検討では、LPA の産生は、単に血小板活性化に伴ってホス

* 山梨医科大学 医学部 臨床検査医学講座 [〒 409-3898 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東 1110]
Department of Laboratory Medicine, Yamanashi Medical University
Tel : 055-273-9694 Fax : 055-273-6924 e-mail:yatomiy@res.yamanashi-med.ac.jp

図1 Sph-1-Pの作用機構：細胞内メッセンジャーとしての作用（左）と細胞外受容体アゴニストとしての作用（右）

（左）いくつかの細胞においては、Sph-1-Pが細胞内セカンドメッセンジャーとして作用するとされており、PDGFや血清で刺激したSwiss3T3細胞での検討が詳細になされている。このような細胞では、無刺激時にはSph-1-Pレベルは主にその開裂酵素により低レベルに保たれており、刺激により活性化されるSphキナーゼにより、一過性に細胞内Sph-1-Pレベルが上昇する。

（右）細胞表面受容体アゴニストとしてのSph-1-Pは、7回膜貫通型受容体であるEDG-1, 3, 5, 6, 8に結合し、種々のG蛋白質(G)を介し、カルシウム, cAMPをはじめとするセカンドメッセンジャーの変動を制御する。

細胞外受容体アゴニストとしてのSph-1-Pの作用が、EDG受容体の同定さらにはその下流の情報伝達経路の解明により実体が明らかになっているのに比し、細胞内メッセンジャーとしてのSph-1-Pの作用は、その細胞内標的が明らかになっておらず、その実体に関しては不明の部分が多い。これに関しては、以前の文献も参照されたい⁶⁾。

ファチジン酸からホスホリパーゼA₂により産生されるというこれまで考えられていたような単純な図式では説明できないと思われる。Sph-1-PとLPAに関して、血小板における産生と血管内皮細胞に対する効果を比較した、我々の最近の論文を参照されたい⁷⁾。

1. 活性化血小板由来生理活性脂質としてのSph-1-P

1.1. 血小板におけるSph-1-Pの豊富な蓄積とその放出

血小板におけるスフィンゴ脂質代謝の特殊性については以前記述した¹⁾⁶⁾。つまり、血小板では、Sphをリン酸化してSph-1-P産生を導くSphキナーゼの活性が非常に高い一方、Sph-1-Pを分解する酵素であるSph-1-Pリアーゼ(開裂酵素)の活性が欠如している。従って、血小板はSph-1-Pを豊富に含むことになる。重要なことに、血小板に豊富に貯蔵されているSph-1-Pは、血小板活性化に伴って細胞外へ放出される。この刺激依存性のSph-1-P放出は、プロテインキナーゼCの活性化とよく相関することが明らかとなっているが⁷⁾⁸⁾、分子レベルでの機序は解明されていない。おそらく、ある種のABCトランスポーターが関与しているものと思われる。活性化血小板からのSph-1-P放出を*in vitro*でアルブミンの存在下・非存在下の両者において観察した場合、前者の場合に圧倒的に強い放出が認められる⁷⁾。血小板活性化に伴い、フリップ-フロップ等の機構によりSph-1-Pが細胞外からアクセスされやすい状態になり、これをアルブミンが引き抜くと予想している。実際、アルブミンと標識Sph-1-Pを混合してゲル濾過カラムで分画した場合、アルブミンの蛋白ピークとSph-1-Pの放射活性ピークが完全に重なり、アルブミンがSph-1-Pのキャリアの一つとして働く可能性が想定された⁷⁾。また、後述する血管内皮細胞に対するSph-1-Pの作用の大部分は、アルブミンの存在下でもその活性がマスクされないことを確認している⁷⁾。

1.2. 血漿(血清)構成員としてのSph-1-P

上述したように、Sph-1-Pは活性化血小板から放出され、当然、生体内では血漿中に放出されることになる。実際、血漿・血清において、Sph-1-Pは検出され、我々の検討では、血漿Sph-1-P濃度は191 nM、血清Sph-1-P濃度は

484 nM であった⁹⁾。血清と血漿の Sph-1-P レベルの差は、活性化血小板からの放出を反映したものと考えられる。また、血漿 Sph-1-P の源の一つとして、体内で活性化された血小板が想定される。他のグループはこれより高い数値を報告しているが¹⁰⁾¹¹⁾、このような血中 Sph-1-P 濃度は、その強い生理活性を考えると高すぎる印象がある。報告されている EDG の解離定数は数十 nM 以下であり²⁾³⁾、計算上は、生体の血管内皮に発現している EDG ファミリー Sph-1-P 受容体は、リガンドで飽和されていることになってしまう。この点に関して、最近、きわめて重要な報告があった。血漿 Sph-1-P のかなりの部分がアルブミンよりもむしろ HDL, LDL などのリポ蛋白質 (特に前者) に結合している、また、このリポ蛋白質結合型の Sph-1-P は、EDG-3 を介するホスホリパーゼ C 活性化/カルシウム動員を指標とする限りにおいては生物活性を失っているというものである¹¹⁾。従って、血中における Sph-1-P 測定濃度とその実際の有効 (作用) 濃度とは解離があるわけである。Sph-1-P の動脈硬化への関与を示すデータが蓄積されており、血中成分としての Sph-1-P の分布・変動を明らかにすることは今後の重要な課題と考えられる。

さらには、最近、Sph キナーゼの細胞外への放出と細胞外での Sph-1-P 産生機構の可能性が報告された¹²⁾。この論文では、血管内皮細胞においてもこの機序が想定されているが、我々の検討では、血漿に Sph を添加しても Sph-1-P は決して産生されない⁹⁾。

2. Sph-1-P の血管生物学における役割

次に、活性化血小板由来 Sph-1-P の血管生物学における機能的役割に関して記述したい。これらの大部分は、*in vitro* での Sph-1-P 添加実験に基づくものであり、現時点ではあくまでも可能性があるに過ぎないこと、また、膨大な報告の中からピックアップしたものであり、重要

図 2 血小板由来生理活性脂質としての Sph-1-P 活性化血小板から放出される Sph-1-P は、EDG 受容体を発現している血管内皮細胞や血管平滑筋細胞に多彩な効果を及ぼす。一方、血小板上にも EDG (-6) が発現しているが³⁷⁾、血小板アゴニストとしての Sph-1-P は、その作用が弱く、実際に EDG-6 を介して作用しているかどうかははっきりしていない。

な報告を引用しきれていないかもしれないことを承知していただきたい。また、我々が最初に報告した Sph-1-P による血小板活性化作用には、きわめて高濃度の Sph-1-P を要し¹⁾⁶⁾、高親和性 Sph-1-P 受容体である EDG が明らかになった現在、その生理的意義は疑問である。Sph-1-P との関連では、血小板はその貯蔵庫として最も重要な存在意義を有すると考えられる (図 2)。

2.1. Sph-1-P の血管内皮細胞に対する作用

2.1.1. EDG 受容体の血管内皮細胞における発現 (図 2)

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) をホルボールエステルで刺激することにより発現が誘導される遺伝子として以前より知られていた EDG-1 は、その構造からリガンド不明の (G 蛋白質共役型) オープン受容体とされていたが、1998 年に Sph-1-P の受容体であることが

図3 スフィンゴ脂質による血管内皮細胞の生存能制御

血小板は活発に Sph を取り込み、これを Sph-1-P へと変換して放出する。Sph は血管内皮細胞に対してアポトーシスを惹起するが、Sph-1-P は逆に生存・増殖に促進的に作用し、これは EDG-1 を介すると考えられている。内皮細胞自身は Sph-1-P を供給することができず、内皮細胞への Sph-1-P 供給源としての血小板の重要性が想定される。このような、スフィンゴ脂質を介する、血小板による内皮細胞の生存維持さらには統合性維持の機構が生体内でも働いている可能性がある。

報告された³⁾。その後、ホモロジーを有するファミリ構成員が次つぎと報告され、現在、Edg-1~8 が報告されるにいたっている²⁾。このうち、EDG-1, 3, 5, 6, 8 が Sph-1-P 受容体とされ、残りの EDG-2, 4, 7 が LPA 受容体とされている²⁾。この EDG ファミリーの中で、血管内皮細胞上には Sph-1-P 受容体として EDG-1, 3 が発現していること、そして、EDG-1 は Gi と、EDG-3 は Gi, Gq, G 13 と関連していることが報告されている¹³⁾。

2.1.2. Sph-1-P による血管内皮細胞の増殖、生存維持 (図 3)

Sph-1-P は内皮細胞に対して強い生のシグナルをもたらす。つまり、Sph-1-P は細胞増殖促進作用を示すとともに、増殖因子除去によるアポトーシスを回避する^{13)~16)}。これらの作用は百日咳毒素感受性であり、EDG-1, 3 (主に前者) を介すると考えられている¹³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。一方、Sph-1-P の前駆物質である Sph は、ミトコンドリアを介する経路によりアポトーシスを惹起す

る¹⁴⁾¹⁷⁾。血小板は、Sph を活発に取り込み細胞内で Sph-1-P へと変換してこれを放出する⁶⁾¹⁴⁾。逆に、内皮細胞は、血小板と異なり、細胞内の Sph-1-P レベルはその開裂酵素活性により低く保たれており、また、刺激依存性の Sph-1-P 放出も認めない¹⁴⁾。従って、内皮細胞に作用する Sph-1-P の源は内皮細胞自身ではなく血小板と考えられる。血小板は、Sph を Sph-1-P へと変換して内皮細胞に提供することにより、内皮細胞の生存能維持に関与しているとも考えられ、スフィンゴ脂質を介した血小板-血管内皮細胞クロストークの存在が示唆される (図 3)。

さらには最近、HDL や LDL などのリポ蛋白質に結合している Sph-1-P が内皮細胞保護作用を示し、このことが HDL の内皮細胞保護作用さらには抗動脈硬化作用を説明しようという興味深い報告がなされている¹⁵⁾。また、LDL が酸化されるにつれ、リゾホスファチジルコリン含量の増加、Sph-1-P 含量の減少が認められ、それとともに LDL の内皮細胞保護作用が失われ、逆に細胞毒性が出現することも示されている¹⁵⁾。

2.1.3. Sph-1-P による血管内皮細胞の細胞骨格再編成、遊走反応

Sph-1-P は、血管内皮細胞に対して劇的な細胞骨格再編成を惹起することが HUVEC をはじめとする種々の細胞で示されている⁷⁾¹³⁾¹⁸⁾。この際、内皮細胞が発現する二つの Sph-1-P 受容体、つまり、EDG-1 と EDG-3 を介する経路の相乗作用が重要と考えられる¹³⁾¹⁸⁾。Sph-1-P により内皮細胞の遊走が強力に惹起されることが Boyden's chamber 法等により示されているが、この反応は、百日咳毒素によってもボツリヌス毒素 (さらには Rho キナーゼ阻害剤である Y-27632) によっても阻害される¹³⁾¹⁸⁾。内皮細胞遊走における、二つの経路すなわち、EDG-1 → Gi → Rac → 葉状仮足形成と EDG-3 → G 13 → Rho → 焦点接着・ストレスファイバー形成の共同作用の重要性が想定されている。特に、EDG-1 を介する経路が重要であり、Akt を

介する EDG-1 のリン酸化が、Rac の活性化さらには遊走に重要であることが示されている¹⁹⁾。

2.1.4. 血管新生因子としての Sph-1-P

その強力な内皮細胞の増殖・遊走促進作用から予想されるように、Sph-1-P は血管新生 (増強) 因子として作用することが、*in vitro* ならびに *in vivo* のアッセイで確認されている⁴⁾¹³⁾²⁰⁾。さらには、Sph-1-P が血管内皮細胞のバリア機能高めることが示され、血管統合性の維持さらには新生血管の安定化に寄与することが想定されている²¹⁾。Sph-1-P が、血小板由来血管新生因子として、糖尿病網膜症や癌の浸潤、転移等に関与する可能性が考えられ、今後の研究の発展が期待される。

2.1.5. Sph-1-P による一酸化窒素 (NO) の産生

血管内皮細胞は多くの生理活性物質を分泌しているが、この中で特に NO は、血管の収縮弛緩や血流量の調節、血小板凝集・血栓形成能の抑制、平滑筋細胞の遊走・増殖の抑制、さらには単球の接着・侵入の抑制など多彩かつ重要な作用を有している。これらの抗炎症作用、抗動脈硬化作用により、血管内皮由来の NO は血管壁の病的構築の異常を制御すると考えられている。種々の原因で血管内皮細胞障害が生じると、NO 産生の低下により、その血管保護作用が失われ、動脈硬化の発症・進展に繋がる。

Sph-1-P が血管内皮 NO 合成酵素 (eNOS) を活性化して NO 産生を高めること、この際、EDG-1 を介する Gi さらには PI 3-キナーゼの活性化、それに引き続く Akt の活性化と eNOS リン酸化が重要なシグナルであることが報告された¹⁶⁾²²⁾²³⁾。Sph-1-P による eNOS 活性化能は、強力な刺激剤として知られているブラジキニンと同等と報告されているが、後者の場合、Akt の活性化や eNOS のリン酸化が認められないことから、同じ G 蛋白質連関受容体アゴニストでも eNOS 活性化機序が異なるという点で興味深い²²⁾。また、この Sph-1-P による NO

の産生が、Sph-1-P によるアポトーシス抑制作用 (上述) に関与しているという報告もなされている¹⁶⁾。

2.1.6. Sph-1-P による接着分子の発現

E-セレクトインは TNF- α やインターロイキン-1 などの炎症性サイトカインの刺激に伴って一過性に炎症局所の血管内皮細胞に発現し、白血球を接着して炎症局所へ遊走させる。この接着の初発段階の後、活性化白血球上ではインテグリンが活性化され、やはり、刺激に依存して内皮細胞に発現した免疫グロブリンスーパーファミリー接着分子 (ICAM-1, VCAM-1) と結合する。この第二段階の細胞接着反応により、白血球が血管外へ遊走する。この白血球と内皮細胞の接着反応は、各種炎症病変、動脈硬化などの血管障害の発症、進展に関与しており、炎症性サイトカインによる接着分子の発現は、病態との関連できわめて重要な現象である。

TNF- α は、血管内皮細胞において、転写因子 NF-KB の活性化を介して E-セレクトインと VCAM-1 の発現を高めるが、Sph-1-P にも同様な強い作用が認められると報告された²⁴⁾。さらには、TNF- α 刺激により Sph キナーゼが一過性に活性化されて Sph-1-P 産生が高まること、TNF- α 刺激時の接着分子の発現亢進と Sph キナーゼ活性化がともに Sph キナーゼの阻害剤であるジメチルスフィンゴシン (DMS)²⁵⁾ により抑制されることより、Sph-1-P が TNF- α による接着分子発現の際に細胞内セカンドメッセンジャーとして作用すると結論づけられた²⁴⁾。しかし、一方では、Sph-1-P 自体が E-セレクトインの発現も NF-KB の活性化も惹起しないとの報告もある²⁶⁾。また、我々も、TNF- α 刺激による Sph キナーゼ活性の変化は認めていない (未発表)。Sph-1-P が、細胞内メッセンジャーか細胞間 (外) メディエーターか議論を引き起こしているが (図 1)、内皮細胞における接着分子発現もその 1 例である。DMS は確かに Sph キナーゼを抑制するが、その特異性は高くなく²⁷⁾、それを使用した結果の解釈に

は注意が必要である。

2.2. Sph-1-P の血管平滑筋細胞に対する作用 (図 2)

以前から、血管平滑筋細胞は、血管内皮細胞と異なり、Sph-1-P により細胞遊走が抑制されることが知られていたが、これはおそらく、細胞遊走を抑制する EDG-5 の発現によると考えられる²⁸⁾²⁹⁾。一方、血管平滑筋に EDG-1 を発現させると Sph-1-P の増殖反応・遊走反応が促進されること、子犬の内膜平滑筋細胞には EDG-1 が強く発現していることが示され³⁰⁾、いわゆる平滑筋細胞の形質転換と、EDG 発現さらには Sph-1-P に対する応答性の変化との関連を明らかにすることは重要と思われる。

犬の摘出心モデルを用いた検討では、Sph-1-P は、冠動脈収縮(血流量減少)とそれによると考えられる心収縮能の低下を引き起こした³¹⁾。Sph-1-P による血管平滑筋収縮の反映と考えられ、虚血性心疾患への関与が想定される。同様に、Sph-1-P は、(おそらくは EDG-5 → Rho/Rho キナーゼ経路を介して) 犬の脳底動脈の収縮を惹起することが示され、くも膜下出血後の血管攣縮への関与が考察されている³²⁾。同様な仕事は、腎血管でも示されており、これに関してはカルシウム流入を阻害すると抑制されることが示されている³³⁾。血管トーンスの保持・増強における Sph-1-P の重要性を示すものと考えられる。

2.3. EDG-1 のノックアウトマウス

上記のように、血管系における Sph-1-P/EDG シグナリングの重要性が示唆されていたが、EDG-1 のノックアウトマウスの報告がなされた³⁴⁾。このマウスは、胎生 12.5-14.5 日の間に、出血により子宮内で死亡したとされている。出血前の内皮細胞の形態は正常であり、いわゆる血管発生 (vasculogenesis) や血管新生 (angiogenesis) は正常であったが、血管平滑筋細胞/周皮細胞による血管の補強がなされず血管の成熟が不完全なことで出血したと考察されている。この背景には、EDG-1/Rac 系のシグナル

の欠如により、Sph-1-P で惹起される遊走反応が惹起されず、平滑筋細胞の血管周囲への適切な配置がなされなかったことがあるとされている。Sph-1-P が直接、血管平滑筋細胞上の EDG-1 に作用して遊走を惹起する可能性とともに、Sph-1-P がまず内皮細胞上の EDG-1 に作用し、そこからの液性因子の分泌等を介して二次的に平滑筋を遊走させる可能性もあると考えられている³⁴⁾。いずれにしても、Sph-1-P とその受容体の血管生物学における重要性を個体レベルで示したものとして注目され、さらなる解析が待たれる。

2.4. その他

肝障害の進展・肝線維化における活性化血小板の関与は以前より論議されており、肝線維化過程において中心的役割を果たす肝星細胞に対する活性化血小板由来生理活性物質の効果を明らかにすることは重要である。星細胞は、Sph-1-P 受容体として EDG-1/5 を発現していること、Sph-1-P により増殖能と収縮能が高まることが明らかとなっている³⁵⁾。また、腎メサンギウム細胞の増殖は、糸球体腎炎の発症と密接に関連するが、この現象に関しても活性化血小板の関与が以前より報告されている。メサンギウム細胞は、やはり EDG ファミリーの Sph-1-P 受容体を発現しており、Sph-1-P に反応して増殖が高まる³⁶⁾。これらの現象の真の病態生理学的意義の解明は今後の課題であるが、活性化血小板由来生理活性脂質としての Sph-1-P の多機能性はますます広がりを見せる様相である。

結 語

活性化血小板由来生理活性脂質である Sph-1-P は、血管内皮細胞・平滑筋細胞にとどまらず、種々の細胞に対し、主に EDG 受容体を介して多彩な作用を発揮する。Sph-1-P により惹起される細胞応答、これに関与する受容体と下流の情報伝達機構を明らかにしていくことは、血管生物学の発展に大きく寄与することになると考

えられる。さらには、Sph-1-P 受容体である EDG の特異的アゴニスト・アンタゴニストの開発は、種々の病態を制御するための重要な医薬品のターゲットになると予想される。

文 献

- 1) 矢富 裕: 血小板におけるスフィンゴ脂質の機能と代謝. 日本血栓止血学会誌 **7**: 219-226, 1996.
- 2) Takuwa Y, Okamoto H, Takuwa N, Gonda K, Sugimoto N, Sakurada S: Subtype-specific, differential activities of the EDG family receptors for sphingosine-1-phosphate, a novel lysophospholipid mediator. *Mol Cell Endocrinol* **177**: 3-11, 2001.
- 3) Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, Spiegel S, Hla T: Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* **279**: 1552-1555, 1998.
- 4) English D, Garcia JG, Brindley DN: Platelet-released phospholipids link haemostasis and angiogenesis. *Cardiovasc Res* **49**: 588-599, 2001.
- 5) Levade T, Auge N, Veldman RJ, Cuvillier O, Negre-Salvayre A, Salvayre R: Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology. *Circ Res* **89**: 957-968, 2001.
- 6) Yatomi Y, Ozaki Y, Ohmori T, Igarashi Y: Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **64**: 107-122, 2001.
- 7) Yatomi Y, Ohmori T, Rile G, Kazama F, Okamoto H, Sano T, Satoh K, Kume S, Tigyi G, Igarashi Y, Ozaki Y: Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells. *Blood* **96**: 3431-3438, 2000.
- 8) Yatomi Y, Yamamura S, Ruan F, Igarashi Y: Sphingosine 1-phosphate induces platelet activation through an extracellular act ion and shares a platelet surface receptor with lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **272**: 5291-5297, 1997.
- 9) Yatomi Y, Igarashi Y, Yang L, Hisano N, Qi R, Asazuma N, Satoh K, Ozaki Y, Kume S: Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J Biochem* **121**: 969-973, 1997.
- 10) Murata N, Sato K, Kon J, Tomura H, Okajima F: Quantitative measurement of sphingosine 1-phosphate by radioreceptor-binding assay. *Anal Biochem* **282**: 115-120, 2000.
- 11) Murata N, Sato K, Kon J, Tomura H, Yanagita M, Kuwabara A, Ui M, Okajima F: Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J* **352**: 809-815, 2000.
- 12) Ancellin N, Colmont C, Su J, Li Q, Mittereder N, Chae SS, Stefansson S, Liau G, Hla T: Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *J Biol Chem* **277**: 6667-6675, 2002.
- 13) Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T: Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* **99**: 301-312, 1999.
- 14) Hisano N, Yatomi Y, Satoh K, Akimoto S, Mitsumata M, Fujino MA, Ozaki Y: Induction and suppression of endothelial cell apoptosis by sphingolipids: a possible in vitro model for cell-cell interactions between platelets and endothelial cells. *Blood* **93**: 4293-4299, 1999.
- 15) Kimura T, Sato K, Kuwabara A, Tomura H, Ishiwaru M, Kobayashi I, Ui M, Okajima F: Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* **276**: 31780-31785, 2001.
- 16) Kwon YG, Min JK, Kim KM, Lee DJ, Billiar TR, Kim YM: Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J Biol Chem* **276**: 10627-10633, 2001.
- 17) Kazama F, Yatomi Y, Ohmori T, Hosogaya S, Ozaki Y: Elevated expression of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 4/4L genes in vascular endothelial cells undergoing sphingosine-induced apoptosis (Letter). *Thromb Haemostas* **85**: 572-573, 2001.
- 18) Ohmori T, Yatomi Y, Okamoto H, Miura Y, Rile G, Satoh K, Ozaki Y: Gi-mediated Cas tyrosine phosphorylation in vascular endothelial cells stimulated with sphingosine 1-phosphate: possible involvement in cell motility enhancement in cooperation with Rho-mediated pathways. *J Biol Chem* **276**: 5274-5280, 2001.
- 19) Lee MJ, Thangada S, Paik JH, Sapkota GP, Ancellin N, Chae SS, Wu M, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Alessi DR, Hla T: Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol Cell* **8**: 693-704, 2001.
- 20) Wang F, Van Brocklyn JR, Hobson JP, Movafagh S, Zukowska-Grojec Z, Milstien S, Spiegel S: Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a Gi-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J Biol Chem* **274**: 35343-35350, 1999.
- 21) Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT, Bamberg JR, English D: Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest* **108**: 689-701, 2001.
- 22) Igarashi J, Bernier SG, Michel T: Sphingosine 1-phosphate and activation of endothelial nitric-oxide synthase. differential regulation of Akt and MAP kinase pathways by EDG and bradykinin receptors in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **276**: 12420-12426, 2001.
- 23) Morales-Ruiz M, Lee MJ, Zollner S, Gratton JP, Scotland R, Shiojima I, Walsh K, Hla T, Sessa WC: Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells. *J Biol Chem* **276**: 19672-19677, 2001.
- 24) Xia P, Gamble JR, Rye KA, Wang L, Hii CS, Cockerill P, Khew-Goodall Y, Bert AG, Barter PJ, Vadas MA:

- Tumor necrosis factor- α induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14196-14201, 1998.
- 25) Yatomi Y, Ruan F, Megidish T, Toyokuni T, Hakomori S, Igarashi Y: N,N-Dimethylsphingosine inhibition of sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate activity in human platelets. *Biochemistry* **35**: 626-633, 1996.
- 26) Masamune A, Igarashi Y, Hakomori S: Regulatory role of ceramide in interleukin (IL)-1 β -induced E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. Ceramide enhances IL-1 β action, but is not sufficient for E-selectin expression. *J Biol Chem* **271**: 9368-9375, 1996.
- 27) Yang L, Yatomi Y, Satoh K, Igarashi Y, Ozaki Y: Sphingosine 1-phosphate formation and intracellular Ca²⁺ mobilization in human platelets: evaluation with sphingosine kinase inhibitors. *J Biochem* **126**: 84-89, 1999.
- 28) Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, Takuwa Y: Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol Cell Biol* **20**: 9247-9261, 2000.
- 29) Tamama K, Kon J, Sato K, Tomura H, Kuwabara A, Kimura T, Kanda T, Ohta H, Ui M, Kobayashi I, Okajima F: Extracellular mechanism through the Edg family of receptors might be responsible for sphingosine-1-phosphate-induced regulation of DNA synthesis and migration of rat aortic smooth-muscle cells. *Biochem J* **353**: 139-146, 2001.
- 30) Kluk MJ, Hla T: Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res* **89**: 496-502, 2001.
- 31) Sugiyama A, Yatomi Y, Ozaki Y, Hashimoto K: Sphingosine 1-phosphate induces sinus tachycardia and coronary vasoconstriction in the canine heart. *Cardiovasc Res* **46**: 119-125, 2000.
- 32) Tosaka M, Okajima F, Hashiba Y, Saito N, Nagano T, Watanabe T, Kimura T, Sasaki T: Sphingosine 1-phosphate contracts canine basilar arteries in vitro and in vivo: possible role in pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* **32**: 2913-2919, 2001.
- 33) Bischoff A, Finger J, Michel MC: Nifedipine inhibits sphingosine-1-phosphate-induced renovascular contraction in vitro and in vivo. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* **364**: 179-182, 2001.
- 34) Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL: Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* **106**: 951-961, 2000.
- 35) Ikeda H, Yatomi Y, Yanase M, Satoh H, Maekawa H, Ogata I, Ozaki Y, Takuwa Y, Mochida S, Fujiwara K: Biological activities of novel lipid mediator sphingosine 1-phosphate in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol* **279**: G304-G310, 2000.
- 36) Hanafusa N, Yatomi Y, Yamada K, Hori Y, Nangaku M, Okuda T, Fujita T, Kurokawa K, Fukagawa M: Paracrine effects of sphingosine 1-phosphate on renal mesangial cells. *Nephrol Dial Transpl* **17**: 580-586, 2002.
- 37) Motohashi K, Shibata S, Ozaki Y, Yatomi Y, Igarashi Y: Identification of lysophospholipid receptors in human platelets: the relation of two agonists, lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FEBS Lett* **468**: 189-193, 2000.