

令和元年5月16日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19453

研究課題名(和文) ALI/ARDSにおけるスフィンゴ脂質シグナル機構の解明

研究課題名(英文) S1P and S1PR3 pathway has the role of eosinophilic airway inflammation via release of CCL20 from bronchial epithelial cell

研究代表者

山本 正嗣 (YAMAMOTO, Masatsugu)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40542139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシン1リン酸は様々な生体反応を調整している。本研究の目的は、スフィンゴシン1リン酸とその受容体の関係をヒトの気管の初代培養細胞とマウスの実験モデルを用いて明らかにすることであった。まず、BEAS 2B細胞とCalu 3細胞をスフィンゴシン1リン酸で刺激をしてトランスクリプトーム解析を行ったところ、CCL20の発現更新が見られた。続いてスフィンゴシン1リン酸受容体3型をノックダウンすると、CCL20の発現が減少した。喘息のマウスモデルでは、スフィンゴシン1リン酸受容体1型と3型のアンタゴニストであるVPC23019やCCL20抗体で喘息の表現型が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究から、スフィンゴシン1リン酸とその受容体3型の経路は、気道上皮細胞からのCCL20の産生に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。気道上皮細胞は喘息の新しい治療標的として注目されており、今回の研究により気道上皮細胞を標的とする喘息の新しい分子標的治療薬の候補が発見できた。この治療薬ははまだ喘息患者の10人に1人存在するという難治性喘息患者の治療法として効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine 1 phosphate (S1P) regulates diverse biological responses. The aim of this study is to reveal the relationship between S1P and S1P receptors (S1PR) using human bronchial epithelial cells and asthma mouse model. At first, transcriptome analysis was performed from total RNA of BEAS2B and Calu-3 cells stimulated with S1P. The expression of CCL 20 was evaluated with knockdown S1PRs. Then, the effect of anti-CCL20 antibody and VPC23019, S1PR1 and 3 antagonist, was examined in the ovalbumin (OVA)-induced bronchial asthma model. Stimulation with S1P induced the expression of CCL20. Expression of CCL20 was highest in BEAS2B. The knockdown of S1PR3 reduced expression of CCL20. In the asthma mouse model, anti-CCL20 antibody and VPC23019 significantly reduced the number of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid. In conclusions, the S1P and S1PR3 pathway regulates the production of CCL20. Therefore, this pathway might have the potential to be a target for asthma treatment.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：スフィンゴ脂質 スフィンゴシン1リン酸 CCL20

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) スフィンゴ脂質の生体における役割

スフィンゴ脂質は細胞膜上の脂質ラフトと呼ばれる膜マイクロドメインに存在し、様々なチロシンキナーゼやサイトカインの刺激に引き続いて、スフィンゴミエリンからセラミド、スフィンゴシンを経て、最終的にスフィンゴシンキナーゼ (SPHK) の働きによりスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) が産生される (Rivera J. Nat Rev Immunol. 2008;8:753-63)。産生された S1P はセカンドメッセンジャーとして細胞質内へカルシウムを動員することや、ABC トランスポーターを介して細胞外に一旦くみ出された後、S1P 受容体 (S1PR) 1-5 と結合することを介して、細胞の分化、増殖、炎症、アポトーシスに参与する。現在、S1PR1-5 は内皮細胞や炎症細胞を含めて多くの細胞で発現が報告されており、免疫応答における役割が明らかにされてきているが、上皮細胞における S1PR の発現およびその意義については報告が少ない。

#### (2) 当研究科の先行研究

申請者の研究室では、以前から呼吸器の炎症性疾患におけるスフィンゴ脂質の役割に着目して研究を行ってきた。まず、ヒト肺の線維芽細胞株 WI38 が S1PR1-3 を発現していることを確認し、線維芽細胞から筋線維芽細胞への形質転換に Rho kinase を介して S1P が関与していることを報告した (Urata Y. et al. Kobe J. Med. Sci. 2005;51:17-27)。続いて、線維芽細胞の形質転換に重要な役割を果たしているトランスフォーミング増殖因子-1 (TGF- $\beta$ 1) の刺激により SPHK1 が活性化されて S1P が産生され、S1P により S1PR2、3 の転写が促進され、Rho キナーゼを介した線維芽細胞の形質転換に至ることを報告した (Kono Y. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007;37:395-404)。さらに、S1P が気道上皮細胞の粘液産生・分泌機序について中心的な役割を担っていることや、アレルギー性気道炎症にも関与していることを報告した (Nishiuma T. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008;294:L1085-93)。しかし、呼吸器領域における S1PR1-5 の局在、その役割については不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は S1P と S1PR3 の気道上皮細胞における役割をヒト気道上皮細胞株とアレルギー性気道炎症マウスモデルを用いて明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 気道上皮細胞株の培養

ATCC より BEAS 2B 細胞株と Calu3 細胞株を購入し、それぞれ BEGM 培地と EMEM 培地で 5%CO<sub>2</sub>、37℃ で培養する。

#### (2) トランスクリプトーム解析

BEAS 2B と Calu3 を 1  $\mu$ M の S1P で 2 時間刺激を行った後に、total RNA を回収し、東レに外部受託してトランスクリプトーム解析を行う。

#### (3) S1PR3 のノックダウン

ライフテクノロジーズから S1PR3 の siRNA を 2 種類購入し、取扱説明書の通りに S1PR3 のノックダウンを行う。

#### (4) VPC23019 による治療実験

クレアより 6 から 8 週齢の BALB/c 雌マウスを購入し、0 日目と 7 日目に卵白アルブミン (OVA) を水酸化アルミニウムとともに腹腔注射し感作を成立させたのち、21 日目と 22 日目に OVA をエアゾル化して吸入させ、アレルギー性気道炎症を発症させる。治療群では OVA の吸入 15 分前に 1  $\mu$ g の VPC23019 を腹腔注射する。炎症の表現型は病理切片の HE 染色像、PAS 染色像、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞のプロファイルで評価する。また、CCL20 の発現を免疫染色で確認する。

#### (5) 抗 CCL20 抗体による治療実験

OVA の吸入 15 分前に 20  $\mu$ g の抗 CCL20 抗体を腹腔注射する。炎症の表現型は BALF 中の炎症細胞のプロファイルで評価する。

### 4. 研究成果

#### (1) S1P の気道上皮細胞における役割

まず、気道上皮細胞株である BEAS 2B と Calu3 を S1P で刺激し、トランスクリプトーム解析を刺激の前後で比較したところ、両細胞で CCL20 が S1P の刺激の前後で 4 倍以上と最も大きい発現の亢進がみられた (図 1)。

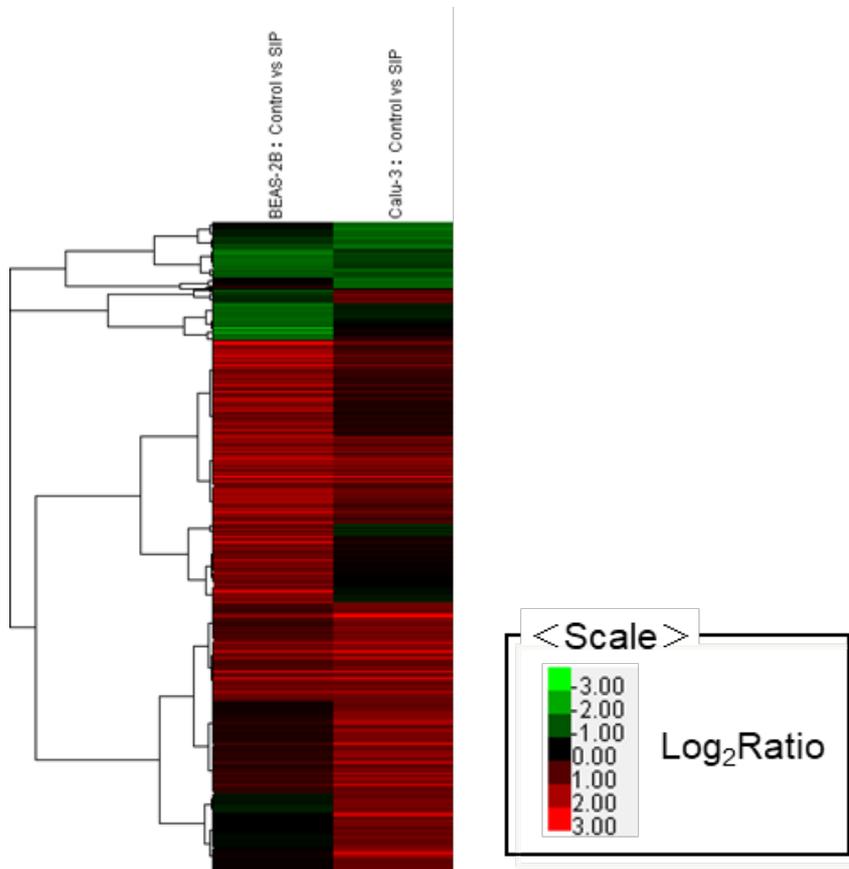


図1. トランスクリプトーム解析

以上から、スフィンゴ脂質が気道上皮細胞からのサイトカインの産生に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

(2) S1PR3 の気道上皮細胞における発現と CCL20 の産生に対する S1PR3 のノックダウン効果  
次に、S1PR3 に対する siRNA を用いて S1PR3 の発現をノックダウンしたところ、CCL20 の発現が有意に抑制されることが明らかとなった (図2、 $P < 0.05$ )。

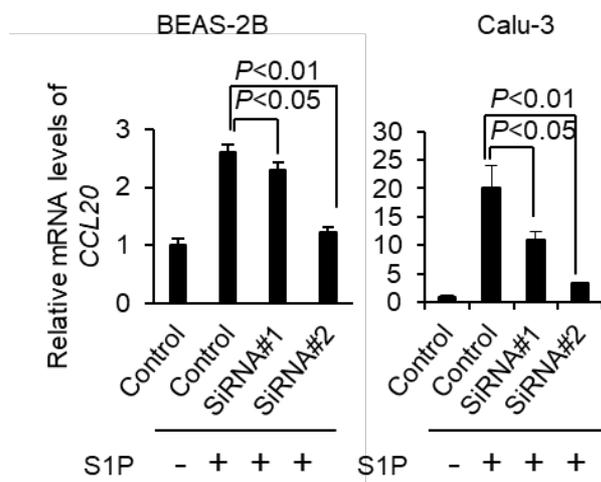


図2. S1PR3 のノックダウンの効果

上記の結果より、気道上皮からの CCL20 の産生は S1PR3 を介して行われていることが示唆された。

(3) VPC23019 による治療実験

VPC23019 の腹腔投与により、HE 染色にて卵白アルブミン投与群でみられる気管支血管周囲の炎症細胞の浸潤や、PAS 陽性細胞の増加、BALF 中の好酸球増加が VPC23019 投与群で著明に抑制されていることが明らかとなった (図3)。

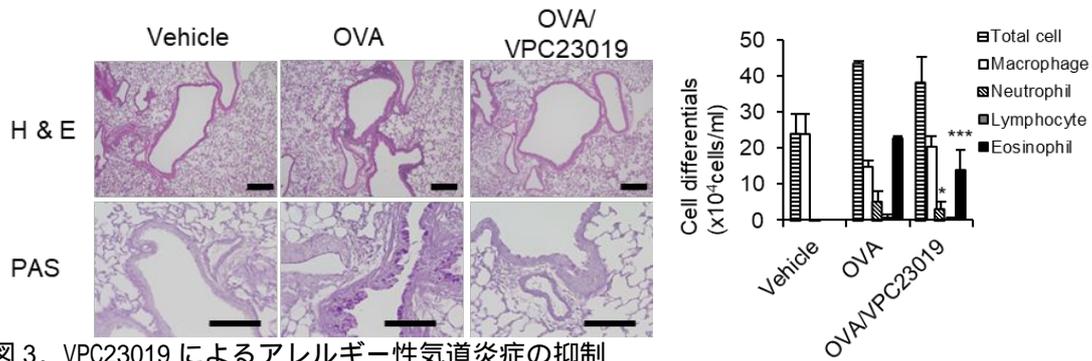


図 3. VPC23019 によるアレルギー性気道炎症の抑制

\* : P<0.05, \*\*\* : P<0.001

#### ( 4 ) CCL20 による免疫染色

VPC23019 を投与したマウスの肺病理組織を用いて、抗 CCL20 抗体で免疫染色を行ったところ、VPC23019 の投与により、CCL20 陽性細胞の著明な発現の抑制が見られた。

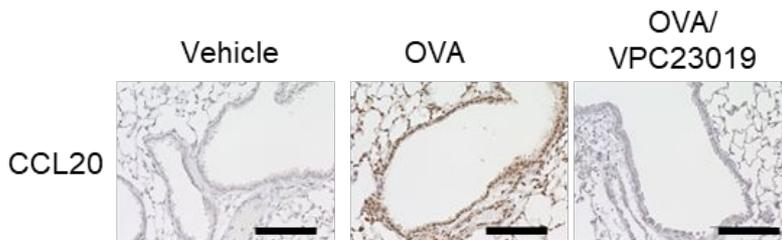


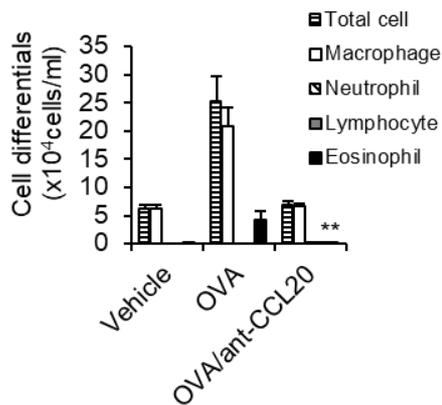
図 4. CCL20 の免疫染色

この結果より、生体内でも VPC23019 は CCL20 の発現を抑制することが明らかとなった。

#### ( 5 ) 抗 CCL20 抗体による治療実験

最後に、抗 CCL20 抗体により、アレルギー性の気道炎症が抑制をされるか治療実験を行ったところ、抗 CCL20 抗体の投与により、BALF 中の好酸球の発現が有意に抑制された( 図 5. P<0.01 )。

図 5. 抗 CCL20 抗体によるアレルギー性気道炎症の抑制



\*\* : P<0.01

以上の結果をまとめると、S1P と S1PR3 経路は CCL20 の産生に重要な役割を果たしており、アレルギー性気道炎症を上皮細胞を介して制御していることを明らかにした。本研究の成果により、S1P および S1PR3 を標的とする新規の気道炎症の治療薬の開発が進み、難治性の気道炎症の予後が改善することが期待される。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

Kawa Y, Nagano T, Yoshizaki A, Dokuni R, Katsurada M, Terashita T, Yasuda Y, Umezawa K, Yamamoto M, Kamiryo H, Kobayashi K, Nishimura Y. Role of S1P/S1PR3 axis in release of CCL20 from human bronchial epithelial cells. PLoS One. 査読有. 13(9). 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0203211.

〔学会発表〕(計 1 件)

Yuichiro Yasuda, Tatsuya Nagano, Yoshitaka Kawa, Tomomi Terashita, Kanoko Umezawa, Masahiro Katsurada, Masatsugu Yamamoto, Hiroshi Kamiryo, Kazuyuki Kobayashi, Yoshihiro Nishimura. S1P/S1PR3 pathway has the role in eosinophilic airway inflammation via release of CCL20 from bronchial epithelial cells. Asian Pacific Society of Respiriology 2018. 2018.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/resp/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：永野 達也

ローマ字氏名：NAGANO, Tatsuya

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。