

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09458

研究課題名(和文) S1PR2が原発性胆汁性胆管炎の疾患特異性と病態に及ぼす影響の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the effect of S1PR2 on the disease specificity and pathophysiology of primary biliary cholangitis and its application to therapy

研究代表者

川田 一仁 (Kawata, Kazuhito)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90722968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：原発性胆汁性胆管炎(PBC)におけるSphingosine-1-phosphate receptor 2(S1PR2)の発現を他の慢性肝疾患と肝生検検体を用いて免疫組織染色で比較したが、胆管細胞でのS1PR2の発現についてPBCにおける疾患特異性は認められなかった。S1PR2 antagonistであるJTEが肝内胆管細胞のLPS誘導CX3CL1とCCL2産生をSTAT-3のリン酸化を介して抑制し、T細胞の遊走能を低下させることが解明された。従って、S1PR2 antagonistは胆管炎を改善させる作用を有する可能性があり、PBCの新規治療薬となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発性胆汁性胆管炎の唯一の保険適応のある治療薬はウルソデオキシコール酸であるが、無効例が約30%存在し、無効例に対する確立した治療薬は未だに無い。さらに進行例に対する有効な治療法は肝移植のみである。そのような状況下で、Sphingosine-1-phosphate receptor 2に対する拮抗薬が胆管細胞からのケモカイン産生を抑制し、単核球の遊走能を低下させて胆管炎を改善させる可能性を見出せた。原発性胆汁性胆管炎に対する有益な治療法が認められない中、今回の結果は新規治療薬創設へ繋がる貴重な結果と思われる。

研究成果の概要(英文)：We compared the expression of Sphingosine-1-phosphate receptor 2(S1PR2) in liver biopsy samples from chronic liver diseases including Hepatitis B, Hepatitis C, autoimmune hepatitis, non-alcoholic liver disease, and primary biliary cholangitis using immunohistochemistry. As a result, there was no difference of S1PR2 expression in intrahepatic cholangiocytes between PBC and other chronic liver diseases.

We could reveal that JTE, an S1PR2 antagonist, suppressed LPS-induced CX3CL1 and CCL2 production in cholangiocytes via phosphorylation of STAT-1T cells, and then reduced T cells migration ability. Accordingly, an S1PR2 antagonist might have the potential to be a new therapeutic reagent.

研究分野：肝臓

キーワード：原発性胆汁性胆管炎 S1PR2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原発性胆汁性胆管炎 (Primary biliary cholangitis 以下 PBC) は Th1 細胞と Th17 細胞優位な単核球細胞が肝内小型胆管に浸潤し、胆管の炎症や破壊の発生と抗ミトコンドリア抗体の発現が特徴的な中年女性に好発する肝臓に限局した自己免疫性疾患であり、厚生労働省の難治性肝疾患に認定されている。ウルソデオキシコール酸 (UDCA) のみが治療薬として保険適応があるが、UDCA は早期例の病態進展を抑える事は出来るが、線維化を完全に阻止する事は出来ない。また UDCA 無効例が約 10% に存在し、無効例に対する確立した治療薬は未だに無い。さらに stage 3,4 の進行例に対する有効な治療法は肝移植のみである。以前より我々は PBC の病態解明に注目して継続的に研究を行っており、PBC の胆管細胞や肝細胞の傷害に酸化ストレスが関与する事や、UDCA が肝細胞と胆管細胞内の抗酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 を活性化し thioredoxin と thioredoxin reductase 1 を誘導することで PBC の酸化ストレスを抑制することを報告した。しかしながら UDCA では酸化ストレスを完全に除去できず、これが線維化の進展を完全に抑制できない理由の 1 つと考えられる。現在、PBC の大きな問題点として 中年女性に好発すること 肝内小型胆管のみに炎症が発症すること UDCA に続く新たな治療薬の創設が挙げられる。

Sphingosine-1-phosphate receptor (S1PR) は G 蛋白質共役受容体の 1 種であり、5 種類のサブタイプ S1PR1-5 が存在する。特に近年 Sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) が注目され、NF- κ B の活性化やプロスタグランジンの合成、また活性酸素種や炎症性サイトカインの発現に関与することなどが報告されている。胆管細胞に存在する S1PR2 の機能については未だに検討されていない。PBC と同様に女性に好発する神経限局性の自己免疫性疾患である multiple sclerosis では mouse と human どちらも female の小脳に S1PR2 の発現が亢進していることが multiple sclerosis の疾患特異性に関与していると報告されている。また、胆汁うっ滞モデルマウスにおいて、骨髄由来単球やマクロファージの S1PR2 が motility に影響することが証明されている。従って PBC の肝内胆管細胞やリンパ球の S1PR2 の発現や機能を解明することで PBC の疾患特異性の解明から新規治療基盤の創設までできる可能性がある。

2. 研究の目的

PBC のリンパ球や肝内胆管細胞の S1PR2 の発現や機能を検討し、疾患特異性から病態に及ぼす影響について解明する。

3. 研究の方法

慢性肝疾患の S1PR2 発現の比較検討

慢性肝疾患 (C 型慢性肝炎、B 型慢性肝炎、非アルコール性脂肪性肝疾患、自己免疫性肝炎、PBC) のホルマリン固定された未染の肝生検組織を使用して免疫染色を行い、S1PR2 の発現を比較検討する。

肝内胆管細胞の S1PR2 がケモカイン産生に及ぼす影響について

Human liver bile duct carcinoma cell line (HuCCT1) を LPS 刺激下に S1PR2 antagonist JTE-013 を投与することで CX3CL1 と CCL2 の発現について比較検討する。

- I. Plating HuCCT1 1×10^5 cells/well (12well plate)
- II. JTE(10uM)もしくは DMSO 投与し 1 時間後に DDW or LPS(1ug/mL)で 48 時間培養する
- III. RNA 回収し CX3CL1mRNA と CCL2mRNA を RT-PCR で確認する

S1PR2 が肝内胆管細胞中の CX3CL1mRNA と CCL2mRNA の instability に及ぼす影響について

- I. Plating HuCCT1 1×10^5 cells/well (12well plate)
- II. LPS(1ug/mL)で 24 時間培養する
- III. JTE(10uM)もしくは DMSO 投与し 0.5 時間後に ActinomycinD (5ug/mL) を添加する
- IV. 添加後 0hr, 1hr, 3hr, 6hr 後に RNA 回収し CX3CL1mRNA と CCL2mRNA を RT-PCR で確認する

JTE による CX3CL1 と CCL2 産生抑制メカニズムについて

- I. Plating HuCCT1 1×10^5 cells/well (12well plate)
- II. JTE(10uM)もしくは DMSO 投与し 1 時間後に DDW or LPS(1ug/mL)で 24 時間培養する
- III. リン酸化阻害剤(PhosSTOP) + タンパク分解酵素阻害剤(cOmplete)を添加して細胞回収し、核抽出する
- IV. Western Blot にて NF- κ B、STAT-3、リン酸化 STAT-3 の発現について比較検討する

S1PR2 が肝内胆管細胞産生ケモカインによる T 細胞遊走能に及ぼす影響について Chemotaxis assay で検討する

- I. Plating HuCCT1 1×10^5 cells/well (12well plate)
- II. JTE(10uM)もしくは DMSO 投与し 1 時間後に DDW or LPS(1ug/mL)で 24 時間培養する

- III. Supernatant を回収、遠心して浮いている細胞を pellet down する。上清だけを 2 層チャンバの下層に添加する。
- IV. Jurkat を 3×10^5 cells/100uL で上層に添加する。
- V. 48 時間後に下層に遊走している Jurkat をカウントする

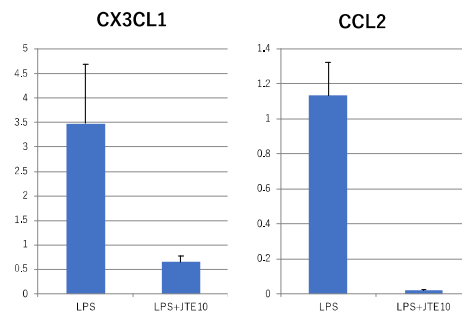
4. 研究成果

C 型慢性肝炎、B 型慢性肝炎、非アルコール性脂肪性肝疾患、自己免疫性肝炎、PBC のホルマリン固定された未染の肝生検組織を使用して S1PR2 の免疫組織染色を行った。

すべての慢性肝疾患において、胆管細胞の細胞質に S1PR2 発現の発現を認めた。肝細胞には S1PR2 の発現は認めなかった。胆管細胞に注目して慢性肝疾患ごとに比較したが、免疫染色では PBC における疾患特異性は認めなかった。

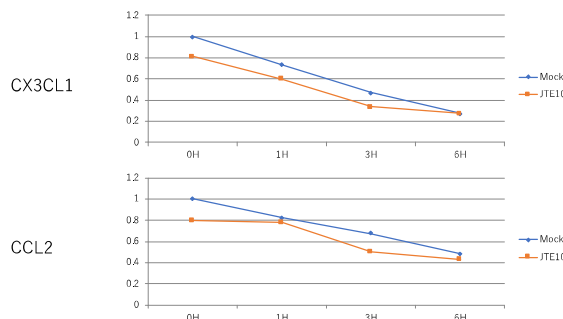
LPS 刺激により HuCCT1 cells 中の CX3CL1 mRNA、CCL2 mRNA レベルは上昇したが、LPS と共に JTE を投与することで上昇した CX3CL1 mRNA、CCL2 mRNA レベルは低下した。

胆管細胞からの LPS 刺激により発現が増加する CX3CL1 と CCL2 を S1PR2 antagonist の JTE により抑制することが示唆された。

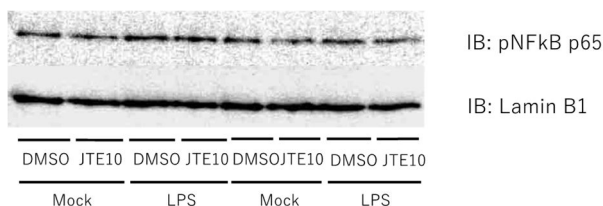


JTE による HuCC-T1 cells 中の CX3CL1 mRNA と CCL2 mRNA の instability の変化について検討したが、mock と JTE の 2 群間で有意な違いはなかった。

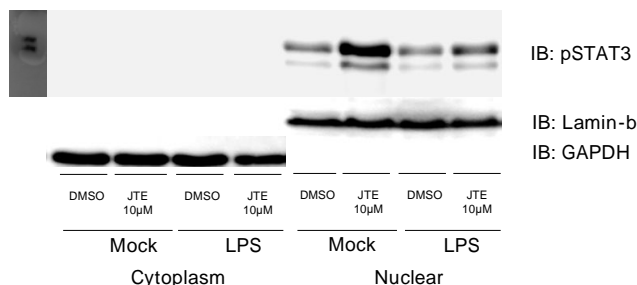
S1PR2 antagonist の JTE が CX3CL1 mRNA と CCL2 mRNA の instability に影響を及ぼしていないことが確認された。



NF- κ B の変化について検討したが、JTE による NF- κ B に及ぼす影響は認めなかった。



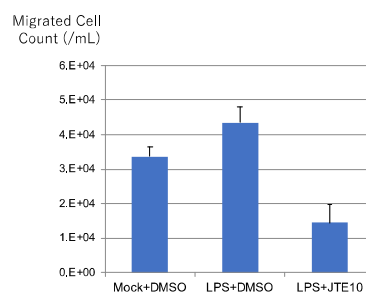
JTE を投与する事で HuCCT1 の核内のリン酸化 STAT-3 の発現が増加し、LPS と共に JTE を投与しても同様にリン酸化 STAT-1 の発現は増加していた。



JTE は NF κ B を介さずに STAT-3 をリン酸化することで、LPS により発現が上昇した CX3CL1 と CCL2 の発現を抑制していることが示唆された。

Chemotaxis assay を行い、胆管細胞が産生するケモカインによる T cells の遊走能に対する S1PR2 の影響について検討した。

コントロールに比較して LPS で優位に Jurkat cells の遊走能が上昇したが、LPS+JTE にて上昇していた遊走能は優位に低下していた。



以上より、S1PR2 antagonist JTE が肝内胆管細胞の LPS 誘導 CX3CL1 と CCL2 産生を抑制し、肝内胆管細胞への T 細胞の遊走能を低下させることが解明された。

まとめ

- 慢性肝疾患の肝生検組織を使用した免疫組織染色では胆管細胞での S1PR2 の発現について PBC における疾患特異性は認められなかった。
- S1PR2 antagonist である JTE が肝内胆管細胞の LPS 誘導 CX3CL1 と CCL2 産生を STAT-3 のリン酸化を介して抑制し、T 細胞の遊走能を低下させることが解明された。

結語

S1PR2 antagonist は胆管炎における T 細胞の遊走能を抑制し、胆管炎を改善させる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 良正 (Kobayashi Yoshimasa) (50252185)	浜松医科大学・医学部・助教 (13802)	
研究分担者	則武 秀尚 (Noritake Hidenao) (10467235)	浜松医科大学・医学部・助教 (13802)	