

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07864

研究課題名(和文) スフィンゴ脂質シグナリングを介する老化肺病態機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of aging lung pathophysiology through sphingolipid signaling

研究代表者

石丸 和宏 (ISHIMARU, KAZUHIRO)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：70595446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：加齢による肺機能の低下とは異なる間質性肺炎・肺線維症という指定難病があり、特效薬が殆ど無く新薬開発が必要と考えられています。新薬開発の鍵は、「間質性肺炎・肺線維症がなぜ起こるのか？」という病態生理を解明することですが、原因不明な症例が多く見受けられて来ました。今回「スフィンゴ脂質代謝」という生体システムの中でS1P2受容体が肺線維症の病態に關与する可能性を見出しましたが、このS1P2を介する肺線維症病態形成機序は、肺の構成細胞間での複雑な相互作用により制御されている可能性が示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果はスフィンゴ脂質代謝、特に生理活性因子S1Pとその受容体サブタイプという斬新な観点から見いだされた、原因不明(特発性)あるいは薬剤により誘導される肺線維症・間質性肺炎の病態機序解明の糸口と考えられ、肺機能を健全に保ち長寿社会を支える可能性を秘めた画期的な治療薬開発に繋がる重要な情報基盤となる。

研究成果の概要(英文)：There is an intractable disease called interstitial pneumonia / pulmonary fibrosis, which is different from the decline in lung function due to aging, and there are almost no silver bullets, and it is thought that new drug development is necessary. The key to new drug development is to elucidate the pathophysiology of "why interstitial pneumonia / pulmonary fibrosis occur?". Indeed, many cases with unknown cause have been reported. This time, we discovered that the S1P2 receptor may be involved in the pathophysiology of pulmonary fibrosis in the biological system called "sphingolipid metabolism". But complex interactions between pulmonary constituent cells were suggested in the pathogenesis of lung fibrosis via S1P2 receptor.

研究分野：内科系臨床医学

キーワード：肺線維症 スフィンゴ脂質代謝 老年医学 間質性肺炎

1. 研究開始当初の背景

肺は、脊椎動物において酸素/二酸化炭素のガス交換を行う事により体全体の細胞活動を支える重要な器官である。このガス交換が障害される事により全身の酸素飽和度は低下し、細胞活動の低下や生体恒常性の破綻を引き起こす。この肺機能、特にガス交換効率を健全に保つ事は長寿社会を支える重要な要素である。酸素を多く含んだ肺胞気と二酸化炭素を多く含んだ肺静脈血を隔てる肺間質が、このガス交換効率に寄与している。近年、老化肺の病態として、この肺間質を炎症の主体とする間質性肺炎/肺線維症が非常に注目されている。しかし、この間質性肺炎/肺線維症は非常に難治性であり、現行では軽度から中等度症例の、肺機能低下速度を抑制する程度の治療効果に限られており、臨床利用可能な特效薬は皆無である。肺線維症は、肺間質の炎症性変化の結果あるいは治癒過程としての病態であるが、この肺線維症に陥った肺組織には、もはやガス交換能力は存在していない。そのため、肺線維症に至る前の間質性肺炎をいかに最小限に抑えるかが重要である。間質性肺炎には原因不明の特発性間質性肺炎が存在し、特発性肺線維症 (IPF; idiopathic pulmonary fibrosis)、非特異性間質性肺炎 (NSIP; non-specific interstitial pneumonia)、特異性器質化肺炎 (COP; cryptogenic organizing pneumonia) などの亜型に分類されるが、いずれも難治性であり指定難病(#85)となっている。一般的に病状は慢性進行性の経過を取り、国内では初診時からの平均生存期間が約 5 年(61~69 ヶ月)と致死率が高く、早期の創薬開発が切に望まれる分野である。これら間質性肺炎/肺線維症の発症機構をこれまでに無い様々な視点から解明する事は、患者生存期間と生活の質を改善させうる将来的な治療薬シーズ作出に有益な情報提供する事が期待できる。

一方、二次性に間質性肺炎を起こす病態として重要なのは、薬剤性(特に抗悪性腫瘍薬、分子標的治療薬による)肺障害である。日本呼吸器学会より出版された「薬剤性肺障害の診断・治療の手引き」によると、薬剤性間質性肺炎は圧倒的に「抗悪性腫瘍薬(分子標的治療薬)」による報告が多く、2004 年から徐々に増加している。これは、マルチスライス CT や内視鏡技術の発達による早期発見、臨床効果の高い抗悪性腫瘍薬が上市され集学的治療が先進した結果と考えられる。この薬剤性肺障害発症の機序についても、肺細胞群に対する直接毒性あるいは免疫系細胞の活性化機序が考えられているが、免疫関連遺伝子や薬剤代謝系遺伝子など多様な宿主因子と環境因子を含み、発症機構は殆ど不詳である。薬剤性肺障害の中には、びまん性肺胞障害(DAD; diffuse alveolar damage)を示す予後不良病態も存在するため、悪性腫瘍に対する治療技術の先進と同様に、合併症としての薬剤性肺障害の予防・治療技術の開発は急務といえる。

これまでマウスを用いた肺線維症モデルを中心に間質性肺炎・肺線維症に伴う病態形成機序が解析され、エンドセリン活性亢進、慢性炎症に伴う凝固活性異常、肺血管狭窄に伴う循環不全やレニン・アンジオテンシン系活性化の関与が論文報告され、それらの拮抗薬や抗炎症薬を用いた第 III 相試験が行われて来た。しかし、いずれも抑制効果なし、negative study(あるいは pending study)と完結されている (Nature Reviews Drug Discovery, 2017 年 11 月, DOI: 10.1038/nrd.2017.225.)。

一方、我々が研究し続けてきた細胞膜スフィンゴ脂質由来の生理活性因子 S1P とその 5 つの受容体サブタイプ(S1P1-5)のシグナル伝達経路は、培養線維芽細胞において筋線維芽細胞への分化・増殖、細胞外基質産生へ関与すること(DOI: 10.1074/jbc.M112.426726.)、ならびにプレオマイシン誘導肺線維症モデルでは肺組織内で S1P 濃度とその合成酵素 SphK1 活性が上昇している事(DOI: 10.1165/rcmb.2007-0065OC, 10.1096/fj.12-219634.)が報告されており、肺線維症の発症病態機構に強く関与している可能性が示唆されていた。

そして、当研究室で同定した S1P2 を全身性に欠損したマウスがプレオマイシン誘導肺線維症を抑制する事(DOI: 10.1371/journal.pone.0197604.)を報告し、S1P2 は肺線維化を促進する因子と考えられた。マクロファージ増殖・分化阻害剤(BLZ945; 選択的コロニー刺激因子 1 受容体阻害剤)を用いるとプレオマイシン誘導性肺線維症は有意に抑制されたため、主にマクロファージの S1P2 が肺線維化病態形成機序に重要な役割を果たしていると考えた。

しかし、S1P2 は肺を構成する I 型/II 型肺胞上皮細胞、気道上皮細胞、血管内皮細胞ならびに骨髄由来細胞を初めとする免疫系細胞全般に発現しており、どの細胞に発現している S1P2 が肺線維化抑制機構に寄与しているかまでは、明確には出来ていなかった。

2. 研究の目的

本研究はスフィンゴ脂質シグナリングという斬新な観点から、S1P2 の組織・細胞特異的条件付き遺伝子欠損(conditional knockout; CKO)マウスを用いて、特発性あるいは薬剤誘導性肺線維症を抑制しうる病態機序の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 標的となる S1P2 遺伝子を Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟んだ遺伝子座を持つマウス (S1P2 flox) を作出し、種々の肺構成細胞特異的に DNA 組換え酵素 Cre を発現するマウスを交配させた標的細胞特異的 S1P2 欠損マウスを用いて、プレオマイシン投与による薬剤性肺

線維症を惹起させ、病態形成機序を担う可能性の高い細胞(組織)群を同定する

(2)回収検体(肺胞洗浄液、血漿・組織サンプルを含む)・組織標本を用いて、蛋白質発現(ウェスタンブロット法・免疫組織染色法等)・定量 PCR 法による mRNA 発現や免疫組織染色法等を用いて、抗線維化作用を仲介する細胞群の同定と表現系に対する病態形成機序を解明する

4. 研究成果

(1) 標的となる S1P2 遺伝子を Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟んだ遺伝子座を持つマウス (S1P2 flox) の胚性幹細胞を EUCOMM(European Conditional Mouse Mutagenesis Program)より購入し、胎盤胞への注入と偽妊娠マウスへの子宮内移植によりキメラマウスを作出した。このキメラマウスと正常マウスを交配させジャームライトランスミッションを確認し、S1P2 flox マウスを得た。

(2) この成獣に、種々の肺構成細胞特異的に DNA 組換え酵素 Cre を発現するマウスを交配し、細胞特異的 S1P2 欠損マウスを作出した。各 Cre リコンビナーゼの標的細胞特異性については、赤色蛍光タンパク質発現マウス(ROSACAG-tdTomato; Jackson Laboratory Stock #007905)による細胞系譜追跡を行い、各標的細胞に特異的な抗体を用いた組織免疫染色で確認した。

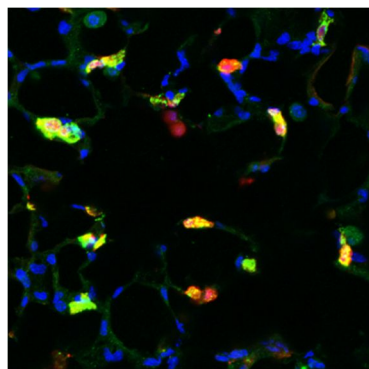


図1.細胞 X 特異的 S1P2 欠損マウス(細胞 X-Cre リコンビナーゼを共発現した S1P2 flox マウス; S1P2 X-CKO) 肺組織の免疫染色所見
 緑: anti-蛋白 X 抗体 赤: tdTomato (Cre により発現)
 青: DAPI (核染色)
 共染色された細胞を確認 (未発表)

(3) 上記手順を経て、まず 3 種類の病態形成機序を担う可能性の高い細胞(組織)特異的 S1P2 欠損マウスの交配・作出を完了し解析した。興味深い事に、ある細胞 X 特異的 S1P2 欠損マウス(S1P2 X-CKO)では肺線維化は「抑制」されたが、別の細胞 Y 特異的 S1P2 欠損マウス(S1P2 Y-CKO)では反対に肺線維化が「増悪」した。また、細胞 Z 特異的 S1P2 欠損マウス(S1P2 Z-CKO)においては、全く肺線維化の程度に影響を及ぼさなかった。肺線維化の程度と正相関を認めると報告されている BALF 内細胞数も、ほぼ同様の傾向を示した。

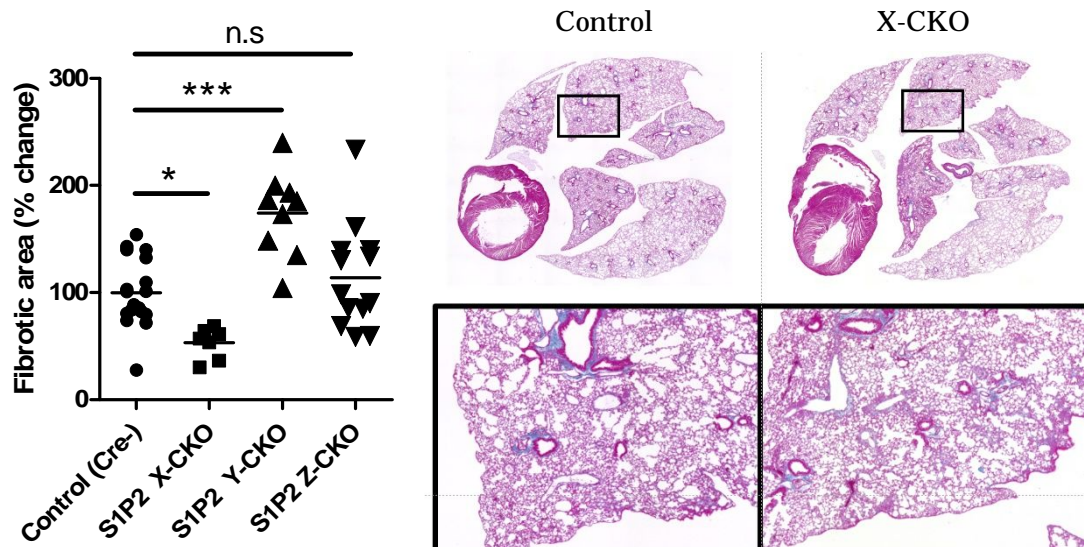


図2.細胞特異的 S1P2 欠損マウス肺のプレオマイシン誘導肺線維症領域 (左グラフ)Control 群(Cre-)と比較し、有意に肺線維化が改善する群 (S1P2 X-CKO) と増悪する群 (S1P2 Y-CKO) を認めた (右図) プレオマイシン投与後の肺組織 AZAN 染色で、X-CKO 群は青色の線維化領域が少ない (未発表, One-way ANOVA 統計)

以前に我々が報告した全身性 S1P2 欠損マウスを用いた検討では、S1P2 は肺線維症に対し促進作用を持つと考えられていたが、以上の検討より S1P2 を介する肺線維症病態形成機序は肺構成細胞間の複雑な相互作用により制御されている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Islam Shahidul, Yoshioka Kazuaki, Aki Sho, Ishimaru Kazuhiro, Yamada Hiroki, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh	4. 巻 70
2. 論文標題 Class II phosphatidylinositol 3-kinase and isoforms are required for vascular smooth muscle Rho activation, contraction and blood pressure regulation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12576-020-00745-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishimaru Kazuhiro, Yoshioka Kazuaki, Kano Kuniyuki, Kurano Makoto, Saigusa Daisuke, Aoki Junken, Yatomi Yutaka, Takuwa Noriko, Okamoto Yasuo, Proia Richard L., Takuwa Yoh	4. 巻 9
2. 論文標題 Sphingosine kinase-2 prevents macrophage cholesterol accumulation and atherosclerosis by stimulating autophagic lipid degradation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54877-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------