

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590716

研究課題名（和文） 脂質メディエーター作用制御による新たな肝障害治療の試み

研究課題名（英文） A novel treatment for liver injury by modulation of lipid mediator effects

研究代表者

池田 均（IKEDA HITOSHI）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80202422

研究成果の概要（和文）：脂質メディエーターの一つであるスフィンゴシン1リン酸の作用を、受容体アンタゴニストによって抑制するとの方法を用いて、肝障害の中でも難治疾患である肝硬変症の、重大な合併症の一つである門脈圧亢進症を、ラットおよびマウスのモデルで治療することに成功した。本法は血圧をはじめ、全身への副作用が少なく、ヒトへの応用も十分期待される。

研究成果の概要（英文）：Portal hypertension is well known as one of critical complications of liver cirrhosis. We have successfully treated portal hypertension in rodent models by inhibiting an effect of sphingosine 1-phosphate, a lipid mediator, with its receptor antagonist. Because our strategy had minimal side effects such as a reduction of arterial pressure, its application in human should be further examined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究で着目したスフィンゴシン1リン酸はスフィンゴ脂質に分類され、細胞膜の脂質二重層の構成成分であることが知られていたが、細胞内シグナル伝達物質としての役割が明らかとなり、さらに、血小板などの細胞から刺激に依存して放出されることが解明され細胞の外においても存在すること、また、G蛋白質共役型受容体（S1P₁₋₅）の存在も証明され、細胞間メディエーターとして働くことが知られるようになり注目されてきて

いる。

(2) 従来の私共の検討より、スフィンゴシン1リン酸の受容体は肝臓において豊富に発現していること、スフィンゴシン1リン酸が肝細胞の増殖を *in vitro* で抑制し、*in vivo* においても肝再生を抑制すること、スフィンゴシン1リン酸が肝星細胞の増殖および収縮を *in vitro* で促進し、*ex vivo* で門脈圧を亢進させ、*in vivo* で肝線維化を促進することが明らかとなっていた。

2. 研究の目的

(1) 種々の肝障害におけるスフィンゴシン 1 リン酸の関与について動物モデルを用いて明らかにし、受容体アンタゴニストによりスフィンゴシン 1 リン酸作用を制御することにより肝疾患の新たな治療法の確立を目指すことを目的とした。

(2) とくに着目した疾患が門脈圧亢進症であった。門脈圧亢進症は肝障害に中でも難治である肝硬変症の重大な合併症であり、食道静脈瘤破裂や難治性胸腹水の原因となる。これらの急性の病態を改善させるため、まず短期的、緊急的にスフィンゴシン 1 リン酸作用を制御することを考えた。致死状況を改善するための急性期の対応であれば、長期使用による副作用の可能性を最小とし、受容体アンタゴニスト利用が現実的と期待された。

3. 研究の方法

(1) 門脈圧亢進症モデルとして胆管結紮ラットおよびマウスを採用した。ともに胆管結紮後 4 週目において、頸動静脈および回腸結腸静脈より門脈にカニューレーションし、動脈圧、門脈圧測定およびスフィンゴシン 1 リン酸受容体アンタゴニストなどの薬剤注入に供した。

(2) スフィンゴシン 1 リン酸受容体アンタゴニストの門脈圧への影響については、経静脈的な短期投与により行った。

(3) スフィンゴシン 1 リン酸受容体アンタゴニスト作用機序の解明のため、血管収縮に働く Rho/Rho kinase の動態を蛋白、mRNA レベルで検討した。

4. 研究成果

(1) 従来、私共はスフィンゴシン 1 リン酸が、その受容体の中でもスフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 を介して、正常ラットの門脈圧を上昇させることを見出していた。このことから、スフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 の肝臓における発現量が門脈圧変化に重要であると推定された。この点を確認するため、門脈圧亢進症を来す胆管結紮ラットおよびマウスでスフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 発現を検討したところ、約 2 倍に亢進していることが判明した (図 1)。

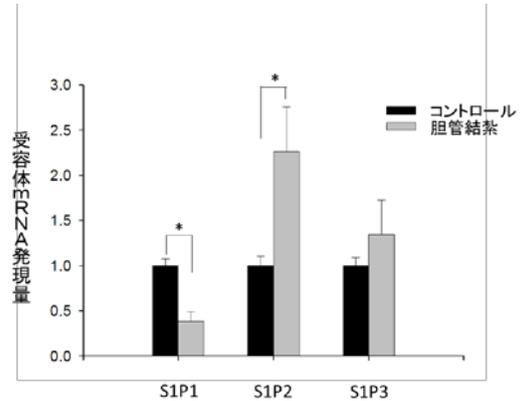


図 1 胆管結紮 4 週後の肝臓のスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) 受容体 1~3 mRNA 発現量 (Hepatology 2012;56:1427 より改変)

(2) さらにスフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 が、胆管結紮を行った肝臓内の、どの細胞で発現が高くなるかについては、スフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 の遺伝子座に LacZ をノックインさせてスフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 発現細胞を検索可能とした遺伝子改変マウスを用いて検討した。結果として門脈周囲の線維芽細胞および肝小葉の星細胞と考えられる細胞に高い発現が確認された。これらの細胞は門脈圧調節に寄与していることが知られている。

(3) 次に門脈圧亢進症ラットにスフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 のアンタゴニスト (拮抗剤) として JTE-013 を投与し、門脈圧をはじめとする血行動態の変化を観察した。スフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 アンタゴニストは、投与量に相関して胆管結紮ラット門脈圧を低下させた。一方、門脈圧が正常な対照ラットにおいて、スフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 アンタゴニストは門脈圧に影響を及ぼさなかった (図 2)。

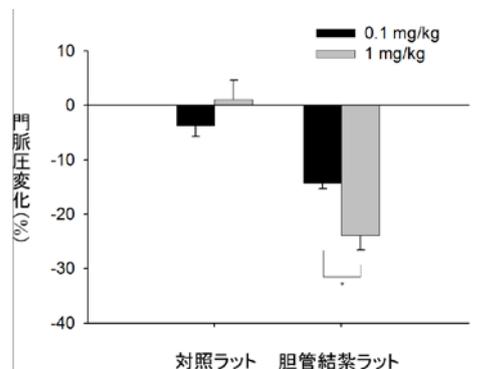


図 2 スフィンゴシン 1 リン酸受容体拮抗剤の門脈圧への影響

(0.1~1 mg/kg)
(Hepatology 2012;56:1427 より改変)

(4) 一方、スフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 アンタゴニストは胆管結紮ラットおよび対照ラットの平均動脈圧には影響を及ぼさなかった (図 3)。すなわち、スフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 アンタゴニストの圧低下作用は亢進した門脈選択的に発現するものと考えられた。

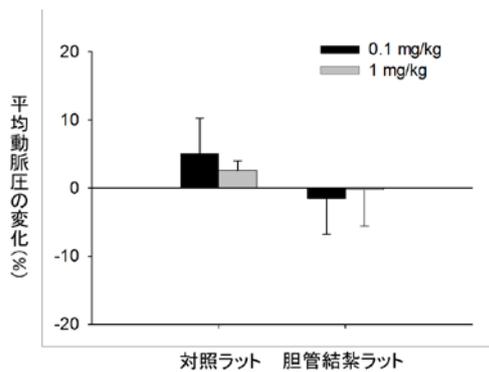


図 3 スフィンゴシン 1 リン酸受容体拮抗剤の平均動脈圧への影響
(0.1~1 mg/kg)
(Hepatology 2012;56:1427 より改変)

(5) スフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 アンタゴニストによる門脈圧低下機序を検討した。以前、私共はスフィンゴシン 1 リン酸が *ex vivo* でラット門脈圧を亢進させることを見出し、その機序としてスフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 を介した Rho/Rho kinase 活性化が関与していることを報告した。

このため、まず門脈圧が亢進している胆管結紮ラット肝臓での Rho kinase 活性を検討したところ。対照の正常ラットに比して亢進していることが明らかとなった (モエシンリン酸化により測定)。一方、胆管結紮ラットにスフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 アンタゴニストを投与すると亢進していた Rho kinase 活性は有意に低下することが明らかとなった (図 4)。

これらの結果から、スフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 アンタゴニストの門脈圧低下作用には Rho kinase 活性抑制が関与していることが示唆された。

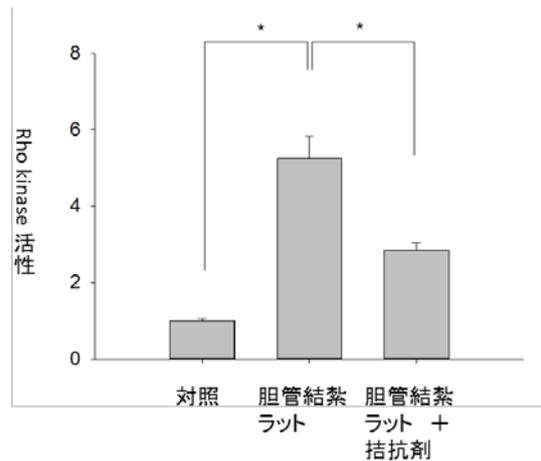


図 4 スフィンゴシン 1 リン酸受容体拮抗剤の Rho kinase 活性への影響
(Hepatology 2012;56:1427 より改変)

(6) スフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 アンタゴニストとして用いた JTE-013 のスフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 への特異性を確認するためにスフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 遺伝子欠損マウスに胆管結紮を行い、JTE-013 を作用させた。結果としてスフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 遺伝子欠損マウスでは門脈圧の上昇は顕著でなく、JTE-013 を作用させても門脈圧には変化を認めなかった。一方、野生型マウスでは胆管結紮により門脈圧は上昇し、JTE-013 により門脈圧は低下した (図 5)。

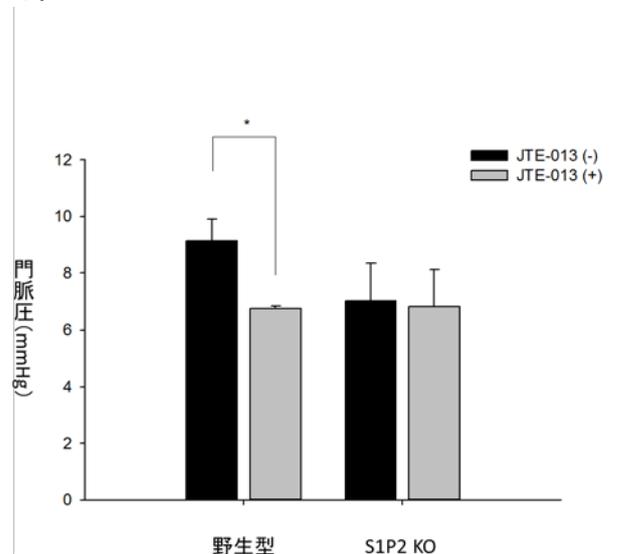


図 5 スフィンゴシン 1 リン酸受容体拮抗剤の受容体欠損胆管結紮マウスへの影響
(Hepatology 2012;56:1427 より改変)

(7) 今回、門脈圧亢進において Rho/Rho kinase の重要性が確認された。生体内において Rho/Rho kinase 調節因子は多数存在する。この中でスフィンゴシン 1 リン酸が実際に、どれほどの役割を果たしているかについて、スフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 遺伝子欠損マウスにおいて胆管結紮を行い経時的に肝臓の Rho kinase 活性を測定したところ、活性亢進は有意に抑制された。従って、実際の生体内において、スフィンゴシン 1 リン酸が肝臓の Rho kinase 活性の調節因子として働いていることが示唆された。

(8) 以上よりスフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 アンタゴニストが門脈圧亢進症の治療薬として有望であると考えられた。現状で用いられている門脈圧亢進症治療薬剤である β 遮断剤は、効果が十分でなく、全身血圧も低下させてしまうという欠点があった。スフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 アンタゴニストには、このような副作用がなく有利である。また、スフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 アンタゴニストは門脈圧が亢進していないラットの門脈圧には作用せず、つまり、病的に亢進している門脈にのみ作用するとの利点があった。

実際の臨床の場での応用を考えた場合、まず、食道静脈瘤破裂例など緊急に門脈圧を下げる必要のある症例が良い適応となる。このような状況下、全身血圧に作用しないことは治療薬として大変重要である。

長期投与については、いずれの肝臓病薬でも問題となる副作用の点が心配される。しかしながら、スフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 遺伝子欠損マウスは胎生～幼少期の神経障害がクリアされれば、とくに問題となる表現型は報告されていない。このことから、重大な副反応は少ないことも期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

①Kurano M, Tsukamoto K, Ohkawa R, Hara M, Iino J, Kageyama Y, Ikeda H, Yatomi Y. Liver involvement in sphingosine 1-phosphate dynamism revealed by adenoviral hepatic overexpression of apolipoprotein M. *Atherosclerosis in press*. doi:p11: S0021-9150(13)00266-9. 10.1016/j.atherosclerosis.2013.04.024. 査読有

②Takuwa Y, Ikeda H, Okamoto Y, Takuwa N, Yoshida K. Sphingosine 1-phosphate as a mediator involved in development of

fibrotic diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1831;185-192, 2013. doi: 10.1016/j.bbaliip.2012.06.008. 査読有

③Kageyama Y, Ikeda H, Watanabe N, Nagamine M, Kusumoto Y, Yashiro M, Satoh Y, Shimosawa T, Shinozaki K, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Yokota H, Koyama T, Ishimaru K, Okamoto Y, Takuwa Y, Koike K, Yatomi Y. Antagonism of sphingosine 1-phosphate receptor 2 causes a selective reduction of portal vein pressure in bile duct-ligated rodents. *Hepatology* 56;1427-1438, 2012. doi: 10.1002/hep.25780. 査読有

④池田均 リゾリン脂質と肝臓疾患 臨床検査 56;209-212, 2012. 査読無

[学会発表] (計 3 件)

①池田均 肝障害におけるリゾリン脂質メディエーターの作用～とくに肝線維化について～ 第 5 回 SMART C 講演会 平成 24 年 6 月 16 日 東京

②池田均、影山祐子、矢富裕、小池和彦 門脈圧亢進症におけるスフィンゴシン 1 リン酸の関与 第 25 回肝類洞壁細胞研究会 平成 23 年 12 月 17 日 東京

③池田均、渡邊尚子、富谷智明、井上有希子、西川尚子、大友夏子、田上靖、小池和彦 受容体 S1P2 を介したスフィンゴシン 1 リン酸作用抑制による門脈圧亢進症治療の可能性 第 46 回日本肝臓学会総会 平成 22 年 5 月 28 日 山形

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 均 (IKEDA HITOSHI)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：80202422

(2) 研究分担者

富谷 智明 (TOMIYA TOMOAKI)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号：90227697