

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591445

研究課題名(和文) 関節リウマチにおけるスフィンゴシン1リン酸レセプター3(S1P3)の働き

研究課題名(英文) The role of S1P3 receptor signaling on rheumatoid arthritis

研究代表者

河野 正孝 (KOHNO, Masataka)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60405256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：今回、S1P3レセプターシグナルの関節炎における役割を解明するために、野生型およびS1P3ノックアウト(KO)マウスを用いてコラーゲン誘導関節炎(CIA)を作成し、関節炎の評価を行った。S1P3KOマウスでは第28日目以降、野生型に比べ有意に関節炎スコアの減弱を認め、また組織学的にも野生型と比較して有意な細胞浸潤の抑制、骨破壊の抑制を認めた。血清抗II型コラーゲン抗体濃度には有意差を認めなかった。S1P-S1P3レセプターシグナルはCIAモデルの病態形成、炎症惹起において重要な役割を果たしていることが示された。この経路は関節リウマチにおける有用な治療ターゲットとなりうることを示されたと考える。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that S1P is an important inflammatory mediator in the pathogenesis of arthritis, but the role of S1P3 in it is poorly understood. Thus, we examined the role of S1P3 receptor or signaling in the development of collagen-induced arthritis (CIA) in murine. S1P3<sup>-/-</sup> mice showed significantly lower arthritis severity score compared with wild type(WT) mice ( $P < 0.05$ , Mann-Whitney U test). Histopathological evaluation of paws obtained on the 42nd day showed marked reductions in synovial inflammation and bone erosion parameters in S1P3<sup>-/-</sup> mice compared with WT mice ( $P < 0.05$ ). Serum anti-type II collagen antibodies were not statistically different between WT and S1P3<sup>-/-</sup> mice. These results indicate that S1P3 receptor signaling plays an important role in the development of murine collagen-induced arthritis model. Also it is suggested that S1P-S1P3 signaling is a new therapeutic target for rheumatoid arthritis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：スフィンゴシン1リン酸 S1P3 コラーゲン誘導関節炎 炎症 関節リウマチ

## 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴシン1リン酸 (S1P) は特異的 G蛋白質共役型レセプターファミリーである S1P<sub>1-5</sub>レセプターに結合することで細胞外メディエーターとして働くと共に、細胞内メッセンジャーとしても働くということが示されている。その生理作用はきわめて強力かつ多彩で、増殖・分化・アポトーシス・形態変化・遊走・浸潤などの細胞の基本的なプロセスに影響を与えることが知られている (Spiegel S, et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4:397-407./ Hla T. Pharmacol Res. 2003;47:401-7.)。

近年、スフィンゴ脂質やスフィンゴシンキナーゼ1 (SphK1) が炎症に関与している可能性についての報告がいくつかなされている。TNF- $\alpha$  が PGE<sub>2</sub> や Cox-2 を誘導するには SphK1 や S1P が必要であること (Pettus BJ, et al. FASEB J. 2003;17:1411-21.) や、SphK1 がマクロファージや好中球の産生するアナフィラトキシンによって誘導される炎症性メディエーターの産生・放出に重要な役割を持つこと (Melendez AJ, et al. J Immunol. 2004;173: 1596-1603./ Melendez AJ, et al. J Biol Chem. 2004;279:44802- 11.) が示されている。スフィンゴ脂質のケモカイン産生への関与については、卵巣癌細胞において S1P が IL-8 発現および分泌を増加させること (Schwartz BM, et al. Gynecol Oncol. 2001;81:291-300.) や SphK1 の siRNA による抑制が TNF- $\alpha$  が誘導する内皮細胞の MCP-1 発現を抑制すること (Chen XL, et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004;287: H1452- 8.) が示されている。SphK1 はスフィンゴシンをリン酸化して S1P を産生する酵素で 1998 年 Spiegel らのグループによってラット腎臓から精製・クローニングされた (Olivera A, et al. J Biol Chem. 1998;273: 12576- 83.)。ラットの生体モデルでは SphK1 の阻害薬はショックにより誘導される急性の肺障害を、好中球遊走を抑制することで減弱することが示されている (Lee C, et al. J Trauma. 2004; 57:955- 60.)。

これまで我々は SphK1 ノックアウト (KO) マウスを用い腫瘍や炎症における SphK1 の働きについて検討し報告してきた。すなわち SphK1 KO マウスでは *Apc*<sup>Min/+</sup> マウスにおける腸管ポリープのポリープ数は変わらないが大きさが抑制され、SphK1 は腫瘍細胞の増殖に関与することを示した (Kohno M, et al. Mol Cell Biol. 2006;26:7211- 23.) が、その反面チオグリコレート誘導腹膜炎モデルや、コラーゲン誘導関節炎モデルでは SphK1 をノックアウトしても野生型マウスと比べ炎症の程度に差を認めなかった (Michaud J, et al. FEBS Lett. 2006;580:4607- 12.)。これらの結果からは炎症における S1P の働きは細胞内メッセンジャーとしてよりも S1P レセプターを介した働きが重要であることが示唆されると考えた。

S1P レセプターに関する研究では、ヒトにおいて好中球における S1P レセプターのプロファイルが肺炎患者と健康者で異なり、**S1P<sub>1,4,5</sub> は健康者、肺炎とともに発現しているが、S1P<sub>3</sub> は肺炎患者からの好中球のみに発現していることが明らかになっていること、また肺炎患者からの好中球の S1P に反応する走化性は著明に増強していることが示されている** (Rahaman M, et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2006;34:233-41.)。これらのことから炎症における S1P の働きの中で**炎症局所への細胞浸潤に S1P<sub>3</sub> レセプターシグナルが大きく関与していることが示唆される**。また S1P<sub>3</sub> はマウスの播種性血管内凝固 (DIC) モデルにおいて PAR1 の下流に位置し、敗血症症候群における軸索細胞の **PAR1-S1P<sub>3</sub> 系が炎症増強の調節において中心的役割を果たしている**ことが示されている (Nature. 2008; 452:454-8)。これらのことから炎症における S1P の働きは特に **S1P<sub>3</sub> レセプター** を介したシグナルにより発現している可能性が高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

S1P<sub>3</sub> KO マウスを用い S1P<sub>3</sub> レセプターシグナルの炎症性病態における役割を解明することで、**S1P が S1P<sub>3</sub> レセプターを介し炎症の惹起に関わる**こと及びそれが治療標的の一つとなり得ることを示す。具体的にはコラーゲン誘導関節炎モデルを用い S1P<sub>3</sub> レセプターの炎症病態への関与を証明する。また野生型と KO マウスにおけるサイトカインやケモカインの発現を検討することで、S1P<sub>3</sub> を介した炎症惹起のメカニズムを解明する。更に関節炎マウスに抗 S1P<sub>3</sub> 抗体を投与し、**S1P<sub>3</sub> 阻害が関節炎を抑制する**ことを示すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) S1P<sub>3</sub> ノックアウトマウスの確立  
C57BL/6 および 129/sv の背景を持つ S1P<sub>3</sub> KO マウス (Kono M, et al. J Biol Chem. 2004;279: 29367) に対し関節炎に適した DBA/1J マウスを 9 世代以上 backcross を行う。S1P<sub>3</sub>+/- の雄及び雌を交配し生まれた野生型及び KO マウスとその子孫を実験に用いる。

### (2) コラーゲン誘導関節炎モデル

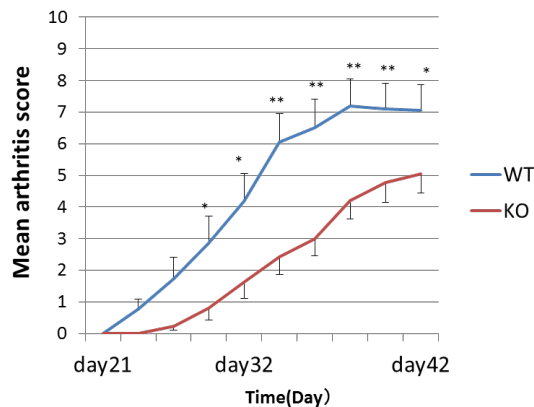
8 ~ 11 週齢の雄の野生型および KO マウスの尾根部に、ウシ型コラーゲン (コンドレックス社、チューリッヒ、スイス) 100  $\mu$ g と完全型 Freund アジュバントの乳濁液を、第 0 日に接種する。その後第 21 日にウシ型コラーゲン 100  $\mu$ g と不完全型 Freund アジュバントの乳濁液を接種することで関節炎を誘導する。関節炎の程度を第 42 日まで観察した後屠殺する。関節炎の程度は各四肢の関節炎の程度を 4 段階に

スコア化し(0~4)その合計点数(最大16)で評価する。屠殺後、関節炎組織をホルマリン固定し、H&E染色で組織の炎症の程度、軟骨破壊、骨びらん等を評価比較する。炎症は滑膜の肥厚(過形成)と滑膜・関節への炎症細胞の浸潤の程度を、軟骨破壊は軟骨表面の細胞壊死による欠損の程度を、骨びらんは骨皮質構造の破壊の程度をそれぞれスコア化(0~3)し評価した。

(3)第42日目に血清を採取し、抗タイプIIコラーゲン抗体濃度を測定した。

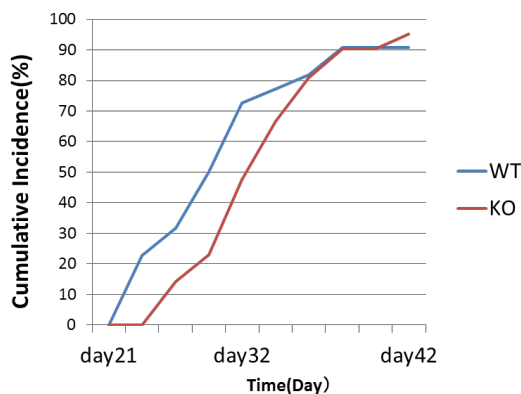
#### 4. 研究成果

##### (1)関節炎スコア



S1P3 KO(n=20)マウスでは第28日目以降、野生型(n=20)に比べ有意に関節炎スコアの減弱を認めた(\* P<0.05, \*\* P<0.01: Mann-Whitney U test, スコアは各群ともn=20の平均±標準誤差で示した)

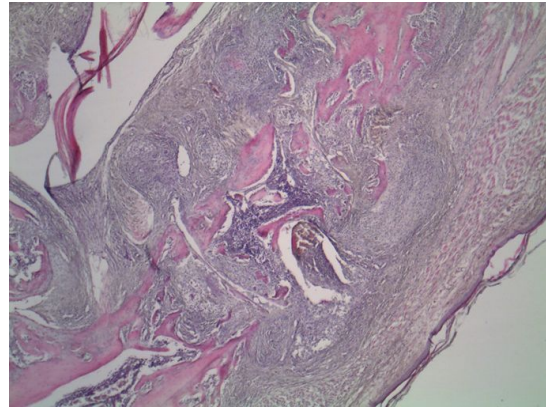
##### (2)関節炎発症率



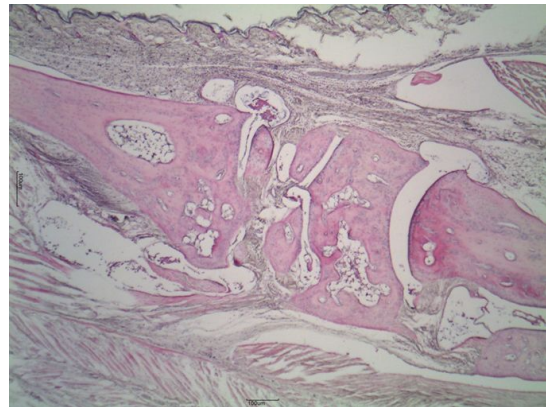
関節炎発症率は野生型(n=20)とS1P3 KO(n=20)マウスで違いを認めなかった。

##### (3)滑膜組織所見

###### 野生型

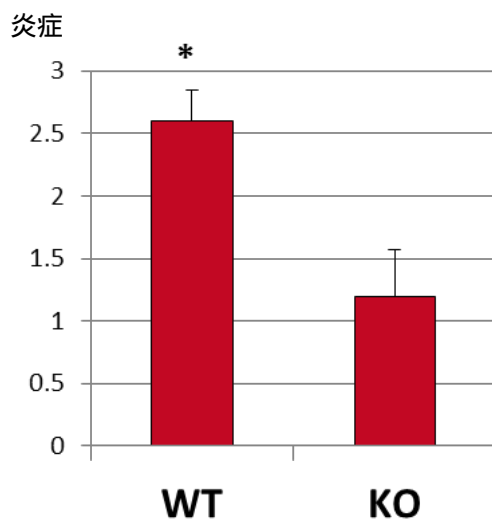


###### S1P3 KO

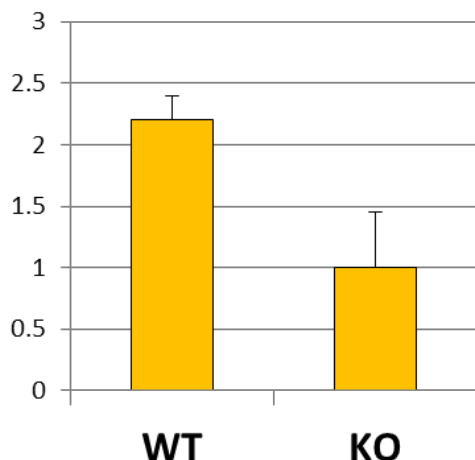


野生型では関節局所に炎症細胞浸潤、骨破壊を高度に認めるが、S1P3 KOマウスでは全体的に軽度であった。

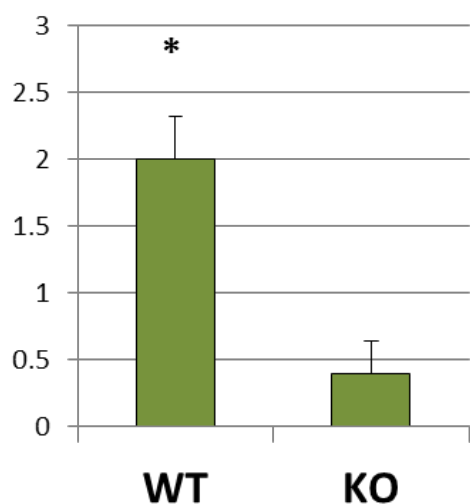
##### (4)組織学的スコア



### 軟骨破壊



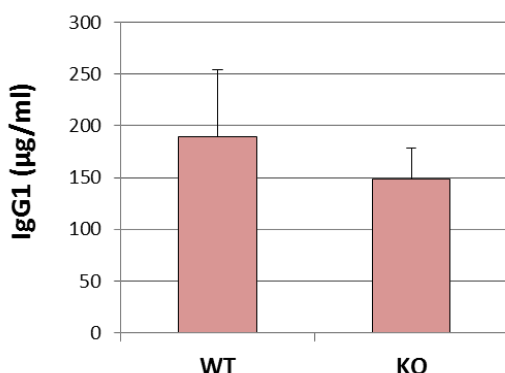
### 骨びらん



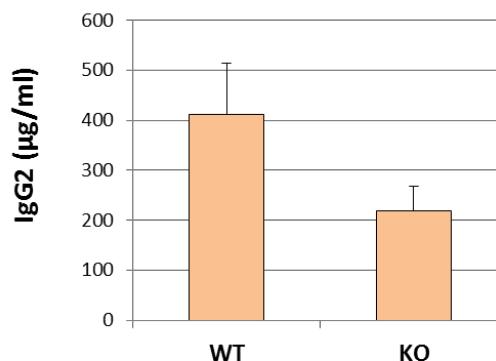
炎症所見、骨びらんで、野生型(n=5)に比較してS1P3 KO(n=5)マウスにおいて有意な低下を認めた(\* = P<0.05, Mann-Whitney U test)。軟骨破壊においては有意差は認めなかったが(P = 0.07) KO マウスにおいて低下傾向を認めた。

### (5)抗タイプ II コラーゲン抗体濃度

#### IgG1



#### IgG2a



抗タイプ II コラーゲン抗体濃度は野生型とS1P3 KO マウスにおいて有意差を認めなかった。(IgG1:P=0.71, IgG2a:P=0.37, Mann-Whitney U test. スコアは各群とも n=11 の平均 ± 標準誤差で示した)

### (6)結論

これらの結果からは S1P3 受容体シグナルはマウスコラーゲン誘導関節炎モデルの病態形成において重要な役割を果たしていることが示唆された。関節炎における S1P3 受容体シグナルの役割についてはその機序に関する更なる研究が必要であるが、関節リウマチの新たな治療ターゲットとなる可能性を示唆するものと考えられる。

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1 . 永原秀剛、河野正孝、村上憲、山本相浩、妹尾高宏、藤井渉、藤岡数記、荃田祐司、小田良、藤原宏芳、川人豊 . The role of sphingosine-1-phosphate receptor 3 signaling in murine collagen-induced arthritis. 2013 American college of rheumatology annual meeting. 2013年10月25日~30日、San Diego, USA

2 . 永原秀剛、河野正孝、村上憲、荃田祐司、藤岡数記、藤井渉、妹尾高宏、山本相浩、小田良、徳永大作、久保俊一、川人豊 . マウスコラーゲン誘導関節炎におけるS1P3の役割 . 第58回日本リウマチ学会学術集会 . 2014年4月24日~26日 . 東京

3 . 永原秀剛、河野正孝、村上憲、藤井渉、妹尾高宏、山本相浩、石野秀岳、小田良、徳

永大作、久保俊一、川人豊 . マウスコラーゲン誘導関節炎における S1P3 の役割 . 第 57 回日本リウマチ学会学術集会 . 2013 年 4 月 18 日 ~ 20 日 . 京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

河野 正孝 (KOHNO, Masataka)

京都府立医科大学・医学(系)研究科・助教

研究者番号 : 6 0 4 0 5 2 5 6

### (2) 研究分担者

中田 博 (NAKADA, Hiroshi)

京都産業大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号 : 9 0 1 1 3 1 4 1

川人 豊 (KAWAHITO, Yutaka)

京都府立医科大学・医学(系)研究科・准教授

研究者番号 : 5 0 3 3 6 7 3 1