

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：23302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460374

研究課題名(和文)慢性炎症と臓器線維化に関わるスフィンゴ脂質シグナリングの解明と新規治療戦略

研究課題名(英文) A Novel Strategy for Controlling Chronic Inflammation and Fibrosis: Targeting Sphingolipid Signaling

研究代表者

多久和 典子 (Takuwa, Noriko)

石川県立看護大学・看護学部・教授

研究者番号：70150290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺線維症などの臓器線維化はそのメカニズムが解明されておらず、未だに良い治療法がない。私達は血液中に存在する脂質メディエーター(ホルモンのように作用する脂溶性物質)のスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)の作用の過剰が心臓の線維化に関わっていることをS1P産生酵素の遺伝子改変マウスを用いて以前に見出している。本研究ではブレオマイシン(抗がん剤)による肺線維化のモデルを用いて、S1Pが肺線維化の増悪に関与していることをS1P受容体遺伝子を欠損したノックアウトマウスとこのS1P受容体に対する選択的阻害薬を用いて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanism for organ fibrosis is not understood to date, with useful medicine to be developed. In our bloodstream is a lipid mediator named sphingosine-1-phosphate (S1P), which acts via 5 members of the S1P receptors to play diverse roles. S1P is also involved in pathophysiology of many kinds of diseases and disorders. We previously discovered that too much production of S1P in the heart in transgenic mice, which expressed high levels of S1P synthesizing enzyme, developed heart fibrosis spontaneously with age. In the present study we examined whether and how S1P signaling is involved in development of bleomycin (an anticancer chemotherapeutic that induce lung fibrosis as a side effect)-induced lung fibrosis. We found that one of the S1P receptors mediates aggravation of lung fibrosis, by using knockout mice and the S1P receptor subtype-specific antagonist, which is a promising candidate for treatment of human organ fibrosis.

研究分野：病態生理

キーワード：スフィンゴシン-1-リン酸 情報伝達 慢性炎症 臓器線維化

## 1. 研究当初の背景

スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、S1P 産生酵素 (SphK1/2) が産生するスフィンゴ脂質メディエーターであり、G 蛋白共役型受容体 (GPCR) S1PR1~5 を介して多彩な作用を発揮する。S1PR2 は、我々が当初オーファン受容体としてクローニングし、リガンド S1P を同定し、Rho 活性化を介して細胞遊走の抑制を媒介する最初の GPCR として報告した。本研究代表者は S1PR2 ノックアウトマウス (S1PR2KO), SphK1 トランスジェニック (SphK1Tg) マウスを作成し、これら分子の生体における生理学的・病態生理学的意義を検討してきた。その結果、がん細胞に発現する S1PR2 ががん細胞の遊走・浸潤・血行性転移を抑制的に制御すること、加えて、宿主の血管内皮と骨髄由来マクロファージに発現する S1PR2 ががん血管新生を抑制的に制御すること、また、血管内皮に発現する S1PR2 が S1PR1 とともに血管透過性制御に極めて重要な役割を果たしていること等を明らかにしてきた。さらに SphK1Tg マウスは加齢に伴い心筋組織の線維化を自然発症する事を見出し、その分子機構として S1PR3-TGF $\beta$  交叉活性化の存在を突き止め、S1P 情報伝達系が生体において臓器線維化に關与する事を世界に先駆けて報告した。

## 2. 研究の目的

臓器線維化は、心不全・肝不全・腎不全・呼吸不全など、さまざまな臓器の機能不全状態に共通して認められる病理組織像であり、その進行により臓器機能不全は非代償性、致死性のものとなる。臓器線維化の背景には感染性・非感染性の侵襲に対する慢性炎症が存在し、慢性炎症が組織リモデリングを引き起こす結果、正常組織構築の破壊と筋線維芽細胞の増殖およびコラーゲンを主体とする細胞外基質タンパクの蓄積が進行し、線維化に至ると考えられている。しかしながら、慢性炎症が臓器線維化を引き起こす分子機構と、これに關与する情報伝達系は十分明らかではない。

近年、特発性肺線維症の肺組織 SphK 発現の上昇と気管支肺胞洗淨液の S1P 上昇が報告され、特定の S1P 産生酵素・受容体サブタイプが治療標的となる可能性が示唆されている。本研究は、S1P 情報伝達系の臓器線維化における病態生理学的役割の解明と、これに基づく新規治療戦略の分子基盤確立をめざす。

## 3. 研究の方法

S1PR2KO, SphK1 および、海外の研究者から提供を受けた異なる S1PR サブタイプの KO マウスを用い、金沢大学動物実験審査委員会の承認のもとに以下の実験を行い、同腹野生型 (WT) をコントロールとして比較検討した。

### (1) プレオマイシン (BLM) 負荷による肺血管透過性・肺組織炎症・肺線維化の検討

BLM (35 mg/kg) あるいは生理食塩水 (ヴィーグル・コントロール群) を 3 日おき腹腔内投与後、5 日後に肺血管透過性亢進と炎症の程度を、33 日後に肺線維化の程度を KO マウスと同腹 WT マウスとで比較検討した。肺血管透過性は肺湿重量測定と尾静脈投与エバンスブルーの肺組織への浸出の比色定量により評価した。肺の炎症は、気管支肺胞洗淨液 (BAL) 中の蛋白定量、細胞数・細胞種毎の数の定量と、肺組織の病理組織学的評価を行った。肺線維化は、肺組織標本シリウスレッド染色の画像解析ソフト (Image J) による定量、筋線維芽細胞のマーカー (PDGFR $\alpha$ ) の免疫組織染色とウェスタンブロット法による定量、フィブロネクチンおよびコラーゲンの肺組織発現レベルの比較により評価した。また、collagen1 $\alpha$ 2 遺伝子プロモーターの下流に GFP を接続した *Coll1 $\alpha$ 2*-GFP トランスジェニックを全身に発現するトランスジェニックマウスとの交配で得た S1PRKO/WT マウスを用いた検討も行った。

### (2) 肺組織ならびに骨髄細胞における S1PR サブタイプ発現細胞種の同定

S1PR アリルに $\beta$ -ガラクトシダーゼをノックインしたマウス (S1PR<sup>-1</sup>Xgal: 作出済み) を用い、

免疫組織染色とβ-Gal 酵素発色法を組み合わせ、肺組織・骨髄細胞における S1PR サブタイプの発現細胞種を同定した。

(3) 肺常在線維芽細胞と骨髄由来細胞の関与の有無とメカニズムの検討

上記(2)において肺常在線維芽細胞・骨髄由来マクロファージの双方に、ある S1PR サブタイプが発現することを確認した。KO/WT マウス間で骨髄移植実験を行い、骨髄系細胞に発現する当該遺伝子が線維化に関与するか否かを検討した。また、KO マウスと同腹 WT マウスの肺組織から得た培養線維芽細胞および BAL 中のマクロファージを用い、当該 S1PR サブタイプが慢性炎症・線維化に関わる分子機構を検討した。

(4) BLM 負荷による線維化関連サイトカインの発現と細胞内シグナルの検討

BAL 中のマクロファージから調整した mRNA を用いて、線維化への関与が指摘されている各種炎症性サイトカインの発現レベルを DNA マイクロアレイ解析・定量的 PCR を組み合わせ解析した。これらの下流に位置する細胞内情報伝達系の活性化をウェスタンブロットにより解析した。

(5) 薬理学的手法による当該 S1PR サブタイプの関与の検証

上記の遺伝学的な方法に加え、当該 S1PR サブタイプ特異的阻害薬の WT マウスへの全身投与により、BLM による肺線維化への関与を検証した。

#### 4. 研究成果

(1) プレオマイシン (BLM) 負荷による肺血管透過性・肺組織炎症・肺線維化の検討

BLM 投与 5 日後の肺血管透過性は当該 S1PR サブタイプの KO マウスにおいて有意に亢進を認めた。しかし、33 日後に回収した BAL 中の蛋白量、細胞数、マクロファージ数はいずれも KO マウスにおいて 50% 近い低減を認めた。また肺組織線維化の程度も、シリウスレッド組織染色、PDGFR $\alpha$  免疫組織染色・ウェスタンブロット、フィブロネクチンおよびコラーゲンの mRNA レベルのいずれにおいても KO マウスにおいて軽減していた。Col1 $\alpha$ 2-GFP $\tau$ g マウスとの交配で得られたダブル改変マウスの検討においても当該 S1PR サブタイ

プ KO マウスで肺線維化の軽減を確認した。

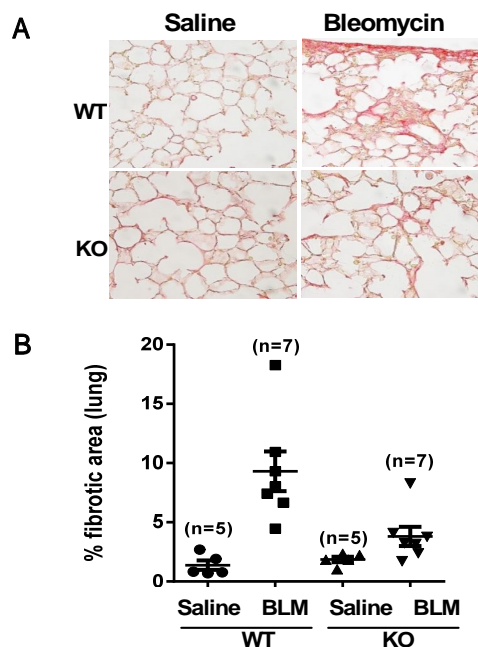


図 1. S1P 受容体サブタイプ欠損マウスはプレオマイシン (BLM) 誘発肺線維化が軽微化する (A. Silius red 染色; B. 定量化結果) [未発表]

(2) 肺組織ならびに骨髄細胞における S1PR サブタイプ発現細胞種の同定

S1PR<sup>-iXgal</sup> を用いた解析から、肺組織の線維芽細胞、血管内皮細胞・平滑筋細胞および骨髄細胞に当該 S1PR サブタイプの発現を認めた。

(3) 肺常在線維芽細胞と骨髄由来細胞の関与の有無とメカニズムの検討

肺組織から調整した初代培養線維芽細胞の検討では、BLM 存在下では KO 由来マウス線維芽細胞の増殖は WT より有意に増大を認めたが、BLM 存在下では KO/WT いずれも同程度に抑制され、高濃度では完全に抑制された。KO 由来マウス線維芽細胞は WT 線維芽細胞に比べて細胞外基質タンパク分解酵素の発現が有意に増大していた。

骨髄由来細胞の関与を検討するため、KO/WT マウス間で骨髄移植を行った後、BLM 負荷による炎症と線維化を評価した。その結果、宿主遺伝型にかかわらず、WT マウスの骨髄を移植した場合に比べて KO マウスの骨髄を移植した場合に BAL 中の細胞数・マクロファージ数、線維化の程度がいずれも有意に軽減することが分かった。

特にBAL中のマクロファージ数は宿主S1PRKOにS1PRKOの骨髄を移植したマウスで最も低かった。

以上から、骨髄由来細胞に発現する当該S1PRがBLM負荷による肺の慢性炎症と線維化を増悪させることが強く示唆された。

(4)BLM負荷による線維化関連サイトカインの発現と細胞内シグナルの検討

BLM負荷開始から22日後のBAL中に含まれるマクロファージを回収し、発現mRNAのマイクロアレイ解析を行った。またBLM負荷開始から7, 22, 33日後のサンプルを用いqPCR法による解析を行った。その結果、BLM負荷で発現上昇するサイトカインのうち、IL-6, CCL-24等は投与開始22日後に、IL-4, CTGF等は22・33日後に、IL-13等は全経過を通じて、同腹WTと比較して当該S1PRサブタイプKOマウスにおいて顕著な軽減を認めた。また、IL-4,-13の作用によりリン酸化を受け活性化されるSTAT6のリン酸化レベルはKOマウスにおいて約75%軽減していた。STAT6総タンパクレベルは不変だった。IL-4,-13それぞれの受容体発現レベルはKO/WT間で差を認めなかったことから、受容体活性化以降のシグナル伝達が当該S1P情報伝達系によって増強されることが示唆された。

(5)薬理学的手法による当該S1PRサブタイプの関与の検証

当該S1PRサブタイプの選択的阻害薬を全身投与したところ、ヴィークル・コントロールに比較してBLMによる肺線維化が有意に軽減することを見出した。

## 5. 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 総件数 1 件 )

1. Phosphatidylinositol 3-Kinase Class II  $\alpha$ -Isoform PI3K-C2 $\alpha$  is required for transforming growth factor  $\beta$ -induced Smad signaling in endothelial cells. Aki S, Yoshioka K, Okamoto Y, Takuwa N, Takuwa Y. *J Biol Chem.* 290(10):6086-105, 2015 ( 査読有り )

[ 学会発表 ] ( 総件数 2 0 件 )

1. KT Aung, S Aki, K Yoshioka, PQ Hoa, MAK Sarker, I Shahidul, N Takuwa, Y Takuwa. Phosphatidylinositol 3-kinase Class II isoforms, PI3K-C2 $\alpha$  and PI3K-C2 $\beta$  are necessary for pinocytosis in endothelial cells 第94回日本生理学会大会 2017年3月28-30日 アクトシティ浜松 ( 静岡県浜松市 )
2. PQ Hoa, K Yoshioka, S Nakamura, MAK Sarker, KT Aung, I Shahidul, S Aki, N Takuwa and Y Takuwa Phosphoinositide-specific 3'-phosphatase, myotubularin-related protein 4 (MTMR4), regulates lysosomal activity and autophagy. 第94回日本生理学会大会 2017年3月28-30日 アクトシティ浜松 静岡県浜松市 )
3. K Yoshioka, S Aki, N Takuwa, Y Takuwa. Endothelial class II PI3K-C2 $\alpha$  is necessary for vasculature formation and integrity through regulating endocytic membrane trafficking. Symposium Topic 3 " Endothelium, Health and Diseases " 第81回日本循環器学会学術集会 2017年3月17-19日 金沢都ホテル ( 石川県金沢市 )
4. S Aki, K Yoshioka, Y Okamoto, N Takuwa, PQ Hoa, MAK Sarker, KT Aung, I Shahidul, Y Takuwa Phosphatidylinositol 3-kinase class II  $\alpha$  isoform PI3K-C2 $\alpha$  is required for transforming growth factor $\beta$ -induced receptor endocytosis and endosomal signaling in endothelial cells 第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日-12月2日 パシフィコ横浜 ( 神奈川県横浜市 )
5. Y Okamoto, H Cui, K Yoshioka, N Takuwa, T Shibamoto, Y Takuwa International

- Shock Congress Symposium  
"Microcirculation and endothelial damage in sepsis and shock" 2016年10月3-5日  
東京ドームホテル(東京都文京区)
6. 多久和典子, 岡本安雄, 多久和 陽. 宿主細胞のスフィンゴシン-1-リン酸受容体を介するがん血行性転移の制御. 第26回日本病態生理学会大会 2016年8月6日金沢医科大学医学教育棟(石川県河北郡)
  7. 岡本安雄, 杜娃, 崔弘, 吉岡和晃, 多久和典子, 多久和陽 S1P2による血管新生と血管障壁機能の制御(シンポジウム:リゾリン脂質による血管新生制御)(招待講演)第58回日本脂質生化学会 2016年6月9-10日にぎわい交流館AU(あう)(秋田県秋田市)
  8. S Aki, K Yoshioka, Y Okamoto, N Takuwa, Y Takuwa. Phosphatidylinositol 3-kinase class II $\alpha$  isoform PI3K-C2 $\alpha$  is required for transforming growth factor  $\beta$ -induced receptor endocytosis and endosomal signaling in endothelial cells 第2回春期特別日本血管生物医学会シンポジウム 2016年6月3日 大阪大学微生物病研究所谷口記念講堂(大阪府吹田市)(招待講演)
  9. Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor-2 (S1P2) aggravates lung fibrosis through altering alveolar macrophage polarization and cellular senescence in mice. JJuan Zhao, Y Okamoto, K Yoshioka, N Takuwa, T Wada, Y Inagaki, C Takahashi, Y Takuwa 日本生化学会北陸支部第34回大会 2016年5月28日 金沢大学宝町キャンパス 医学部記念館(石川県金沢市)
  10. Aki S, Yoshioka K, Okamoto Y, Takuwa N, Takuwa Y. PI3K-C2 $\alpha$  is required for TGF $\beta$ -induced receptor endocytosis and endosomal signaling in endothelial cells 第93回日本生理学会 2016年3月22-24日 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)(シンポジウム:血管形成と分化を制御するシグナル機構)(招待講演)
  11. JJ Zhao, Y Okamoto K Yoshioka S Aki PQ Hoa, MAK Sarker, KT Aung N Takuwa, Y Inagaki, C Takahashi, T Wada, Y Takuwa. Deletion of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor-2 (S1P-2) inhibits lung fibrosis through altering alveolar macrophage polarization and senescence in mice. BMB2015(第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会) 2015年12月1-4日 神戸ポートアイランド(神戸ポートピアホテル 神戸国際会議場 神戸国際展示場 神戸商工会議所)(兵庫県神戸市)
  12. 安藝 翔, 吉岡 和晃, 岡本 安雄, 多久和典子, 多久和 陽. クラス II PI3-キナーゼ PI3K-C2 $\alpha$  はエンドソーム上での TGF $\beta$ /Smad2/3 シグナリングに必須である. 第62回 中部日本生理学会 2015年11月13日-14日 富山大学 五福キャンパス 黒田講堂(富山県富山市)
  13. Y Okamoto, H Cui, K Yoshioka, N Takuwa, Y Takuwa. Sphingosine 1-phosphate receptor-2 plays a protective role against anaphylaxis and acute lung injury. 第10回スフィンゴセラピー(STC)研究会 2015年6月16-18日 ホテルアローレ(石川県加賀市)
  14. Y Takuwa, JJ Zhao, Y Okamoto, K Yoshioka and N Takuwa. Role of S1P2 in inflammation and fibrosis. 14th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases Plenary Lecture 2015年7月12-15日 ブダペスト(ハンガリー)

- (招待講演)
15. 安藝 翔、吉岡 和晃、岡本 安雄、多久和 典子、多久和 陽 クラス II $\alpha$  型 PI3K-C2 $\alpha$  はエンドソーム上での TGF $\beta$ /Smad2/3 シグナリングに必須である 第 57 回 日本脂質生化学会 2015 年 5 月 28-29 日一橋大学一橋講堂(東京戸千代田区)
  16. Y Okamoto, H Cui, K Yoshioka, N Takuwa, S Aki, JJ Zhao, HQ Pham, MAK Sarker, S Koizumi, Y Takuwa Sphingosine 1-phosphate receptor-2 plays a protective role against lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury 第 92 回 日本生理学会大会 2015 年 3 月 21-23 日 神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)
  17. 安藝翔、吉岡和晃、多久和 典子、岡本安雄、多久和陽 クラス II 型 PI3 キナーゼ-C2 $\alpha$  による TGF $\beta$  血管内皮作用の調節機構 第 61 回中部日本生理学会 2014 年 11 月 6-7 日 名古屋市立大学桜山キャンパス(愛知県名古屋市)
  18. 安藝 翔、吉岡 和晃、岡本 安雄、多久和 典子、多久和 陽. クラス II $\alpha$ 型 PI3K-C2 $\alpha$ は ALK5 内在化及び足場タンパク SARA のエンドソームへの動員を制御し TGF $\beta$ 1-Smad2/3 を介した血管新生を調節する. 第56回 日本脂質生化学会 2014年 6月 6-7日 近畿大学東大阪キャンパス(大阪府東大阪市)
  19. Y Takuwa, Y Okamoto, K Yoshioka, N Takuwa. Distinct role of S1P2 in the functional regulation of vascular endothelium and smooth muscle The 18th International Vascular Biology Meeting 2014 (IVBM 2014) Symposium Lipid Mediator 2014年 4月 14-17日 みやこめっせ(京都府京都市) (招待講演)
  20. Y Okamoto, H Cui, K Yoshioka, N Takuwa,

T Shibamoto, Y Takuwa. Sphingosine -1-phosphate receptor-2 (S1P2) negatively regulates eNOS and protects against acute vascular barrier disruption. The 18th International Vascular Biology Meeting 2014 (IVBM 2014) 2014 年 4 月 14-17 日 みやこめっせ(京都府京都市)

[ 図書 ] ( 総件数 2 件 )

1. Vascular endothelial S1P2 receptor limits tumor angiogenesis and hyperpermeability. Takuwa N, Okamoto Y, Yoshioka K and Takuwa Y. (2015) *In: Springer Japan; Bioactive Lipid Mediators: Current Reviews and Protocols. Yokomizo T & Murakami M (eds.) Pp.237-252, ( 総ページ数 426 頁 )*

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

多久和 典子 (Takuwa, Noriko)

石川県立看護大学・看護学部・教授

研究者番号 : 70150290