

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370084

研究課題名(和文)スフィンゴシン1-燐酸輸送体Spns2の哺乳類での機能

研究課題名(英文)Deciphering the function for S1P transporter, Spns2, in mammals

研究代表者

望月 直樹(Mochizuki, Naoki)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：30311426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシン1-燐酸(S1P)は、脂質メディエーターとして細胞膜に発現するS1P受容体を活性化することで機能を発揮する。S1Pは細胞内で生成され、細胞外に輸送されることで初めて脂質メディエーターとして働くことになる。本研究では、S1P輸送体Spns2の哺乳類での機能を解明することを目的とした。Spns2の遺伝子破壊マウスと血管内皮細胞特異的破壊マウスを作製して、リンパ球の移動に関してSpns2が機能していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We had identified Spns2 as a S1P transporter in zebrafish. Therefore, we aimed at studying the function of Spns2 in mammals in S1P signaling.

First, we developed global Spns2 knockout (KO) mice and analyzed the number of lymphocytes in primary and secondary lymphatic organs, because S1P is known to be essential for egress from the primary lymphatic organs. Mature T- and B- lymphocytes in the blood were decreased. Mature T-lymphocytes were accumulated in the thymus. Consistently, the number of mature T-lymphocytes was decreased in the secondary lymphatic organs. Similarly, the number of mature B-lymphocytes in the bone marrow and the secondary lymphatic organs was decreased, suggesting that the egress of T- and B-lymphocytes were decreased. The endothelium-specific Spns2 KO mice exhibited the similar phenotype found in global KO mice. These data indicate that endothelial Spns2 functions as a S1P transporter to induce the egress of lymphocytes from the primary lymphatic organs.

研究分野：循環器発生・細胞生物学

キーワード：スフィンゴシン1燐酸 ノックアウトマウス 輸送体 リンパ球 胸腺 骨髄

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)の生理作用が細胞レベルで解明されつつあるが生体での機能を発揮するための輸送体の機能が以下の点で明らかになっていなかった。我々はゼブラフィッシュでS1P輸送体Spns2を同定してその機能を明らかにしていた。

しかし、

(1) S1PトランスポーターSpns2が哺乳類で機能しているのか？またどのような作用があるのか？が不明

(2) S1Pが生体内のどの細胞で生成されるのか？が不明

(3) S1Pを生成する細胞がわかったとして、細胞のどちらに向けてSpns2輸送されるのか？によって不明

スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)がS1P受容体(S1P1-S1P5)に結合し活性化することで、様々な生物学的現象を惹起することが示されている。S1P受容体の遺伝子破壊マウスを用いた研究からも、S1P-S1P受容体シグナルの重要性は証明されてきた(S1P1受容体欠損による血管形成異常、同受容体欠損によるリンパ球の骨髄・胸腺からの血管内への遊走低下、など)。さらに、SphK(SphK1, -K2)の遺伝子欠損によってもS1Pが発生ならびに恒常性維持に必須な分子であることが証明されてきた。しかし、唯一S1P情報伝達機構を司る分子で生体での機能が明らかにされていない分子が、S1Pトランスポーターである。これまでにABCトランスポーターが細胞ではS1Pの細胞外輸送を促進することも報告されてきたが、生体でS1Pトランスポーターを証明した研究はない。我々が同定したS1PトランスポーターSpns2もゼブラフィッシュでの機能の証明と細胞でのS1Pトランスポーター機能が明らかになったに留まっている。右図に示すようにSphからS1Pが生成されて、細胞外に発現するS1P受容体に作用するには細胞外への輸送が不可欠であり、哺乳類生体でのトランスポーターの機能を明らかにすることが重要であると考えた。

S1Pは、赤血球あるいは血小板で生成され、血中S1P濃度が($\sim 1 \mu\text{M}$)に維持されている。一方、血管内皮細胞もS1Pを生成されることが報告されている。血管内皮細胞にはS1P1受容体が、血管平滑筋細胞には、S1P2, S1P3受容体が発現することから血管内皮細胞からのS1P輸送が血管へのautocrine, paracrine機構による直接作用を有している可能性が考えられているが明らかになっていなかった。生体でどの細胞がどれだけ、S1P生成に寄与しているのかは不明である。

血管内皮細胞で生成されるS1Pが血管内皮細胞に作用する場合には、S1P1-Akt-eNOSによる血管弛緩作用が主に発揮され、血管平滑筋に作用するとS1P2/S1P3-RhoキナーゼあるいはCalmodulinキナーゼによる血管収縮が主となるはずである。つまり血管内皮細胞の発現部位による差によって生理

作用が全く異なる可能性がある。S1Pが血管内腔側に発現するSpns2によって細胞外に輸送されるのか？あるいは管腔反対側に発現するのかわによって生体での血圧が変化する可能性がある。つまり局在の違いにより生理作用が相反する可能性がある。

2. 研究の目的

Spns2が哺乳類でS1Pトランスポーターとしての機能を果たしているのか？

Spns2がもし主要なS1Pトランスポーターならば、どこで発現しているのか？

もし血管内皮細胞に発現しているならば、管腔側(luminal side)・管腔反対側(abluminal side)のいずれかで発現して生理作用を発揮しているか？を明らかにしたい。

3. 研究の方法

哺乳類としてマウスを用いた解析を行う計画である。

A-1) Spns2がマウスでS1Pトランスポーターとして機能しているかを調べるために、Spns2のglobal KOを作製する。Spns2 flox/floxマウスの繁殖とglobal KOマウスの繁殖を行う。Spns2 flox/floxマウスは研究開始時に作製完了しており、global KO達成のためにCMV-Creマウスと交配して個体を得ていた。胎生致死ではなく、表面上は眼球の異常(syblepharon: 眼瞼の閉鎖・結膜の異常、角膜潰瘍)を呈するのみである。交配も可能であり、global KOマウス数増加のための繁殖を繰り返すとともにSpns2 flox/floxマウスの繁殖も行う。

A-2) Conditional Spns2KOマウスの作製
Spns2 flox/floxとの交配を予定する組織特異的Cre発現マウスの準備
以下の4種類を計画した

- ・血管内皮細胞特異的Cre発現マウス: Tie2-Cre
- ・リンパ内皮細胞特異的Cre発現マウス: Prox1ERT2-Cre (tamoxifen inducible)
- ・血小板特異的Cre発現マウス: Platelet-specific Cre: Pf4-Cre
- ・赤血球特異的Cre発現マウス: Red blood cell-specific Cre: GATA1-Cre

Tie2-Creマウスは、すでに当施設で繁殖済み。Prox1ERT2 (St. Jude Children's Hospital in MemphisのDr. Guillermo Oliverより)も入手していた。

これらのマウスを用いて

血中S1P濃度の測定 血球数(外部委託) 血圧の測定 FACSによる一次リンパ器官、二次リンパ器官のリンパ球数・分画の検討 網膜の組織学的検討 リンパ管の組織学的検討を行った。

血中S1P濃度測定 血圧を調べることで、免疫系と循環器でのSpns2の機能を明らかにする。

4. 研究成果

Spns2 global ノックアウトマウスの免疫系の異常

S1P が T リンパ球の血管内への遊走に重要であることが報告されていたために、まず免疫系について検討した。

一次免疫組織である胸腺で成熟 T リンパ球の増加を認めたことから、胸腺からの血液内への移行が障害されていることがわかった。また血中の成熟 T リンパ球が減少していたことから胸腺から血管内への T リンパ球の移動に異常があることに矛盾しない結果であった。さらに骨髄で未成熟 B リンパ球が蓄積し成熟 B 細胞が減少していた。血中でも成熟 B リンパ球が減少していることから骨髄から血管内への B リンパ球の移動の異常があることがわかった。

2 次リンパ器官である脾臓では成熟 T リンパ球が減少し B リンパ球も減少していた。リンパ節でも同様に成熟 T リンパ球が減少するとともに成熟 B リンパ球が減少していた。FACS を用いて血中ならびに胸腺での成熟 T リンパ球 (CD4, CD8 陽性細胞) を測定した結果に基づいている。B リンパ球に関しては表面マーカーとして B220 low/high IgM +/- に従って成熟あるいは未成熟 B リンパ球を測定した。

Plasma S1P 濃度を血中で測定した結果 Spns2 ノックアウトマウスでは野生型に比べて半減していた。他のスフィンゴ脂質や LPA に両者で差は認めなかったことから、Spns 2 が S1P 特異的な輸送体として哺乳類でも機能していることが予想された。骨髄移植をノックアウトマウスに行い血液細胞からの S1P の生成が血中 S1P 濃度ならびにリンパ球の一次リンパ器官からの遊走に重要であるかを検討した結果、骨髄移植をしても改善が認められなかったことから、血液細胞由来の S1P 非依存性にこれらの異常が生じていることがわかった。

Spns2 の in situ hybridization を行い発現部位を確認したところ胸腺の血管内皮細胞に発現を認めた。また、各種培養血管内皮細胞 (HUVEC, Human microvascular endothelial cell, human aortic endothelial cell, Human dermal lymphatic endothelial cell) を用いて RT-PCR を行ったところいずれも Spns 2 が発現していることがわかった。一方 HeLa 細胞や HEK293 細胞では Spns2 の発現を認めなかったことから、内皮細胞が Spns 2 の主な発現部位であることが強く示唆された。

血管内皮細胞特異的 Spns2 ノックアウトマウスの解析

Global ノックアウトマウスの結果と血管内皮細胞の発現が見られたことより、Spns2 の血管内皮細胞での発現が T リンパ球・B リ

ンパ球の一次リンパ器官からの血管内への移動を制御していると考えられた。このためにまずは Tie2-Cre マウスを用いて血管内皮細胞特異的に Spns2 の発現を抑制することにした。

Spns2 の血管特異的欠損マウスは、global ノックアウトと同様に血中の S1P が半減していた。また、胸腺でも成熟 T リンパ球の蓄積と抹消組織の脾臓、リンパ節での成熟 T リンパ球の減少、血中の成熟 T リンパ球の減少を認めた。成熟 B リンパ球に関してもグローバルノックアウトマウスと同様な結果であった。従って胸腺、骨髄からのリンパ球の血管内への移行には血管内皮細胞からの S1P が必須であることがわかった。

Spns2 は血中でも減少していることから、内皮細胞は管腔内への輸送が血中の S1P 濃度を規定し、管腔外にむいた Spns2 の輸送が一次リンパ組織におけるリンパ球の血管内への移動のために機能していることが示唆された。モノクローナル抗体の作製を試みたが最終的には、組織学的 (免疫電顕) に使用可能な抗体が作製できなかったために管腔外にむいた内皮細胞の Spns2 の決定的な証明はできなかった。

GATA1-Cre, Prox1CreERT2 も交配を始めたが血液からの S1P の輸送には関係ないと示唆されたので、これは中断した。また Prox1CreERT2 についても Tie2-Cre による血管内皮細胞特異的 Spns2 欠損による T リンパ球、B リンパ球の異常が Global ノックアウトと同じであったために解析を中断した。

ゼブラフィッシュの Spns2 変異体が二股心臓を呈することから、心臓前駆細胞の移動に S1P が重要であることがわかってきたが、S1P が如何に心臓前駆細胞の移動を制御しているかが不明であった。このためにこのメカニズムを解明することで哺乳類の心臓形成における S1P の機能を推定しようとした。しかし、Spns2 の global ノックアウトマウスは二股心臓とならなかった。このためにゼブラフィッシュでの検討を行った結果、卵黄細胞体層から Spns 2 によって輸送された S1P が内胚葉の S1P2 受容体を活性化して、さらに内胚葉の Yap1 依存性転写を調節することにより内胚葉の維持をしていることがわかった。S1P によって内胚葉が維持されることで、内胚葉が心臓前駆細胞の足場となって、両側中胚葉領域に存在している心臓前駆細胞を正中に移動可能として、原始心筒の形成を司ることがわかった。

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 8 件)

Fukui H, Terai K, Nakajima H, Chiba A, Fukuhara S, Mochizuki N. S1P-Yap1 signaling regulates endoderm formation required for cardiac precursor cell migration in zebrafish. **Dev. Cell** 31: 128-136, 2014 (査読 有)

Fukuhara S, Zhang J, Ando K, Wakayama Y, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Mochizuki N. Visualizing the cell-cycle progression of endothelial cells uncovers the mechanisms underlying intersegmental and caudal vessel formation in zebrafish. **Dev Biol.** 393: 10-23, 2014 (査読 有)

Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, Sunden Y, Arai Y, Moriwaki K, Ishida J, Uemura A, Kiyonari H, Abe T, Fukamizu A, Hirashima M, Sawa H, Aoki J, Ishii M, Mochizuki N. The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. **J. Clin. Invest.** 122 (4): 1416-1426, 2012 (査読 有)

〔学会発表〕(計 5 件)

福原茂朋、望月直樹 スフィンゴシン-1-リン酸を介した血管内皮細胞による免疫系の制御 第42回日本心臓血管作動物質学会 平成25年2月9日、奈良

Fukui H, Fukuhara S, Mochizuki N. Endodermal S1P-Yap1 signal regulated cardiogenesis by controlling cardiac precursor cell migration. EMBO/EMBL meeting from Development to Regenerative Medicine. Heidelberg, Germany. June 7-10, 2013

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：スフィンゴシン 1- 燐酸トランスポーター分子
発明者：望月直樹 他 3 名

権利者：国立循環器病研究センター、トーア
エイヨー株式会社

種類：

番号：特許 5373346

出願年月日：平成 20 年 9 月 25 日

取得年月日：平成 25 年 9 月 27 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.z-cv.jp/index.html>

http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/structural_analysis/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

望月直樹 (Naoki Mochizuki)

国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：30311426

(2) 研究分担者

中嶋洋行 (Hiroyuki Nakajima)

国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：10467657

(3) 連携研究者

福原茂朋 (Shigetomo Fukuhara)

国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：70332880