

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790075

研究課題名(和文)スフィンゴシン1リン酸分泌輸送体SPNS2の生理的役割の解明

研究課題名(英文)Analysis of physiological roles of sphingosine-1-phosphate transporter, SPNS2

研究代表者

久野 悠 (Hisano, Yu)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・特別研究員

研究者番号：60467636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシン1-リン酸(S1P)は細胞内で合成された後、細胞外へ放出され標的受容体に認識され、シグナルを伝える。我々は初めてのS1P放出輸送体としてSPNS2を同定した。SPNS2の生理的役割を解明するため、SPNS2-KOマウスの解析を行なった。その結果、SPNS2-KOマウスは血漿中のS1P濃度が約60%程度に減少していた。またSPNS2が血管内皮細胞においてS1P輸送体として機能しており、赤血球や血小板では機能していないことを明らかにした。またSPNS2によって供給されるS1P依存的に胸腺からT細胞が移出することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine-1-phosphate (S1P), a bioactive lipid mediator, is intracellularly synthesized, released from the cells and recognized by S1P receptors (S1PR1-S1PR5). We had identified a novel S1P transporter, SPNS2. In order to reveal the physiological roles of SPNS2 in mammals, we analyzed SPNS2-knockout (KO) mice.

S1P abundantly exists in plasma and plasma S1P is thought to originate from erythrocytes, activated platelets and endothelial cells. Vascular endothelial cells purified from SPNS2-KO mice are unable to release S1P, while S1P release from erythrocytes and platelets of SPNS2-KO mice is not changed. These results suggest that SPNS2 functions as the sole S1P transporter in endothelial cells. Furthermore, SPNS2-KO mice exhibited lymphopenia, while thymocytes are able to differentiate into mature cells and migrate towards S1P. These data indicate that S1P released by SPNS2 on endothelial cells is recognized by S1PR1 on matured thymocytes and enable thymic egress.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：S1P トランスポーター リンパ球 血管内皮細胞 脂質メディエーター

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜の主要な構成成分であるスフィンゴミエリンから合成されるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)は細胞内においてセカンドメッセンジャーとして働くだけでなく、標的細胞表面に発現する S1P 受容体(S1PR1-5)を介して細胞間情報伝達物質としても働く新しいタイプの生理活性脂質である。また S1P アナログである FTY720 が循環リンパ球数を減少させる免疫抑制剤として承認されたことから、免疫機能における S1P の役割が特に注目されている。S1P は細胞内で合成されるため、細胞間情報伝達物質として働くためには細胞内で合成された後、細胞外へと分泌される必要がある。申請者はこれまでに S1P の分泌を担う分子の探索を行ってきた結果、S1P 分泌輸送体“Spns2”の同定に成功した。

### 2. 研究の目的

本研究では哺乳類における S1P 分泌輸送体 SPNS2 の生理的役割を解明する。研究期間内に以下のことを明らかにする。

- (1)各組織における SPNS2 の発現部位を明らかにする。
- (2)生理的条件下において SPNS2 が機能している細胞を同定する。これまでに *in vitro* の実験から、SPNS2 が血管内皮細胞から血液中へ S1P を供給している可能性が考えられる。
- (3)リンパ球は血液—リンパ液—リンパ組織間を循環する細胞で、このリンパ球の循環に S1P シグナリングが重要な働きをしている。しかしリンパ球によって認識される S1P の供給機構については分かっていない。SPNS2 がリンパ球の遊走に必要な S1P を供給している可能性を考え、免疫機能における SPNS2 の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1)生理的条件下で SPNS2 が機能している細胞の同定

これまでにヒトの血管内皮細胞である HUVEC において SPNS2 が S1P 分泌輸送体として働いていることを示唆する結果を得ている。しかし siRNA 実験では非特異的な発現抑制や不完全な抑制効果などが問題となるため、より確実な結果を得るために野生型(WT)及びノックアウト(KO)マウスから血管内皮細胞を精製して、機能を調べる。

(2)SPNS2 の生理的役割の解明

SPNS2-KO マウスでは血液中の循環リンパ球数の減少が見られたため、リンパ球の遊走もしくはリンパ球の成熟自体に異常がある

可能性が考えられる。リンパ球の一種である T 細胞は胸腺で成熟した後に S1P シグナル依存的に血液中に出てくるため、胸腺の T 細胞の成熟状態を CD 抗体を用いたフローサイトメトリー解析により明らかにする。

### 4. 研究成果

(1)S1P は生体内において血液中に最も豊富に存在する。SPNS2-KO マウス及び WT マウスから血液を採取し、それぞれの S1P 濃度を測定したところ、SPNS2-KO マウスでは WT マウスと比べて約 60%程度に減少していた(図1)。

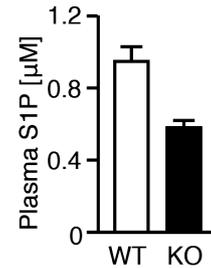


図1. KO マウスでは血液中の S1P 量が減少する

つまり SPNS2 は血液中に S1P を供給している細胞で S1P 放出輸送体として機能している可能性が考えられた。血液中に S1P を供給する細胞として赤血球や血小板といった血球細胞にまず着目し、SPNS2-KO マウスからこれらの血球細胞を調製し、各細胞からの S1P 放出活性を測定したが、WT マウス由来の血球細胞と同程度の S1P 放出活性を保持していた(図2)。

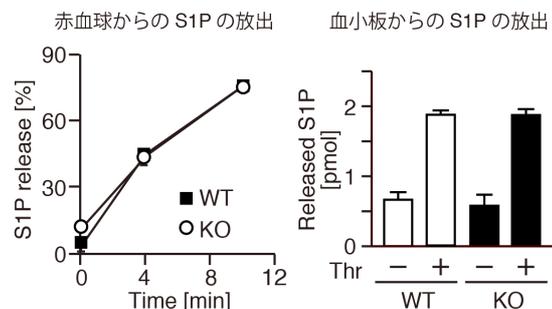


図2. SPNS2 は赤血球及び血小板において S1P 輸送体として機能していない

つぎに血液中に S1P を供給する細胞として血管内皮細胞に着目した。マウスの大動脈より血管内皮細胞を精製し、S1P 放出活性を測定したところ、WT マウス由来の血管内皮細胞では S1P が培養液中に放出されたのに対して、SPNS2-KO マウス由来の血管内皮細胞では S1P の放出が完全に失われていた(図3)。

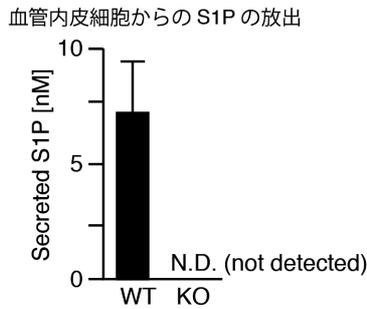


図3. SPNS2は血管内皮細胞において唯一の S1P 輸送体として機能している

さらに SPNS2 がヒトの血管内皮細胞においても機能しているのか調べた。HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) は臍帯静脈由来の血管内皮細胞で、HPAEC (Human Pulmonary Artery Endothelial Cells) は肺動脈由来の血管内皮細胞である。SPNS2 に対する siRNA をこれらの血管内皮細胞に導入することで、発現抑制を行い、S1P 放出活性の測定を行った。2種類の siRNA を用意したが、どちらの siRNA も効率良く SPNS2 の発現を抑制し、さらに細胞外への S1P の放出も抑制された(図4)。

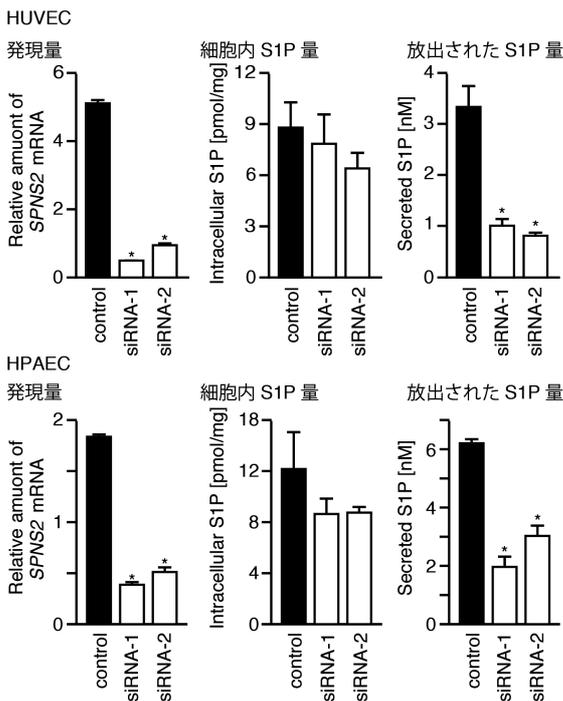


図4. ヒト由来の血管内皮細胞においても SPNS2 は S1P 放出輸送体として機能している

つまり SPNS2 はヒトの血管内皮細胞においても S1P 放出輸送体として機能していることが示された。また SPNS2-KO マウスのターゲティングベクターは *Spns2* 遺伝子を *lacZ* 遺伝子に置換するようにデザインされているため、ヘテロマウスを X-gal 染色によって *Spns2* の発現を調べることが可能である。その結果、胸腺や大静脈の血管内皮細胞において *Spns2* の発現を確認した(図5)。

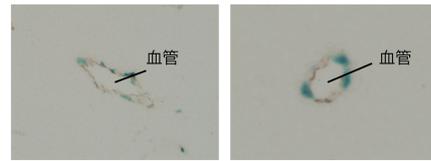


図5. *Spns2* は胸腺の血管内皮細胞に発現している (青: *Spns2*、茶: 血管内皮細胞)

これらの結果より、SPNS2 は血管内皮細胞における唯一の S1P 放出輸送体で、血液中に存在する S1P の約 40% が血管内皮細胞に由来するものと考えられる。

(2) SPNS2-KO マウスでは血液中 S1P 濃度の減少に加えて、血液中の循環リンパ球数が減少していた。特に T 細胞数が大きく減少していた(図6)。

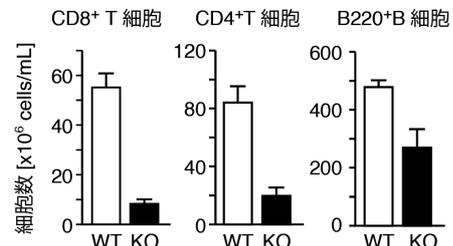


図6. SPNS2-KO マウスでは循環リンパ球数減少していた

T 細胞は胸腺で成熟した後、T 細胞表面に発現する S1PR1 受容体が活性化されることで、血液中へと移出することが可能となる。そこで SPNS2-KO マウスの胸腺について詳しく調べた。T 細胞は CD4 及び CD8 を発現していない DN (double negative) から DP (double positive)、そして CD4 もしくは CD8 の片方を発現する SP (single positive) へと分化・成熟する。SPNS2-KO マウス及び WT マウスの胸腺を解析したところ、SPNS2-KO マウスでは成熟した SP 細胞が蓄積していた(図7)。

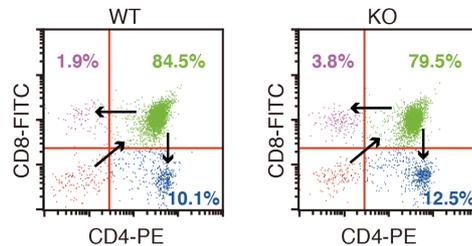


図7. SPNS2-KO マウスの胸腺には成熟した T 細胞が蓄積している

SPNS2-KO マウスの胸腺において成熟した T 細胞は S1PR1 受容体を発現しており、S1P 依存的な遊走能を保持していた(図8)。WT と比べると S1P に対する反応性が上昇していたが、これは補償機構が働き、S1PR1 受容体の発現量が増加したためと思われる。

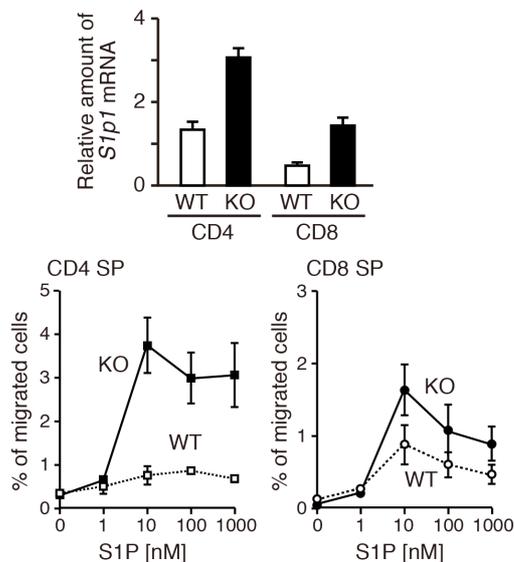


図7. SPNS2-KO マウスの成熟 T 細胞は S1P 依存的な遊走能を保持している

これらの結果は SPNS2-KO マウスの胸腺において T 細胞の成熟過程に問題はなく、胸腺から血液中への移出に必要な S1P が供給されなかった結果、SPNS2-KO マウスでは成熟 T 細胞が胸腺に蓄積していたことを示している。

(3) 血液中と胸腺の間では S1P の濃度勾配が形成されており、胸腺の成熟 T 細胞はこの S1P 濃度勾配により移出が可能となると考えられていた。SPNS2-KO マウスでは血液中の S1P 濃度が減少するものの、胸腺との濃度勾配は維持しており、成熟 T 細胞の S1PR1 受容体を活性化するには十分な濃度である。しかしながら、SPNS2-KO マウスでは成熟 T 細胞の移出が阻害されていた。これは単純な胸腺—血液間の S1P 濃度勾配が T 細胞の移出を制御しているのではなく、SPNS2 がより局所的な濃度調整を行っている、もしくは成熟 T 細胞に直接 S1P を提示している可能性が考えられる。

これまで S1P を含む脂質メディエーターのシグナル伝達機構は受容体を中心に解析が行われてきたが、本研究は情報の発信元である S1P 放出輸送体によって制御される生理機能を解析したものである。未だ多くの脂質メディエーター分泌輸送体が未解析のままだが、本研究を皮切りに本研究領域が大きく進展するものと期待される。

SPNS2-KO マウスにおいて循環リンパ球数が減少するという事は SPNS2 の活性を阻害する薬剤によって循環リンパ球数を制御し、免疫応答を抑制することが可能となる。輸送体を標的とする薬剤は少なく、70%以上の薬剤は受容体を標的としているが、SPNS2 を標的とする新しい免疫抑制剤の開発が望まれる。

## 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 8 件)

① Satoshi Ota, Yu Hisano, Yoshiya Ikawa, Atsuo Kawahara, Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish, *Genes to Cells*, 査読有, in press

② Tsuyoshi Nishi, Naoki Kobayashi, Yu Hisano, Atsuo Kawahara, Akihito Yamaguchi, Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters, *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 査読有, 1841(5):759-765, 2014

DOI: 10.1016/j.bbaliip.2013.07.012.

③ Yu Hisano, Satoshi Ota, Atsuo Kawahara, Genome editing using artificial site-specific nucleases in zebrafish, *Development, Growth & Differentiation*, 査読有, 56(1):26-33, 2014

DOI: 10.1111/dgd.12094.

④ Yu Hisano, Satoshi Ota, Shinji Takada, Atsuo Kawahara, Functional cooperation of spns2 and fibronectin in cardiac and lower jaw development, *Biology Open*, 査読有, 2(8):789-794, 2013

DOI: 10.1242/bio.20134994.

⑤ Satoshi Ota, Yu Hisano, Michiko Muraki, Kazuyuki Hoshijima, David J. Grunwald, Yasushi Okada and Atsuo Kawahara, Efficient identification of TALEN-mediated genome modifications using heteroduplex mobility assay, *Genes to Cells*, 査読有, 18(6):450-458, 2013

DOI: 10.1111/gtc.12050.

⑥ Yu Hisano, Satoshi Ota, Kazuharu Arakawa, Michiko Muraki, Nobuaki Kono, Kazuki Oshita, Tetsushi Sakuma, Masaru Tomita, Takashi Yamamoto, Yasushi Okada and Atsuo Kawahara, Quantitative assay for TALEN activity at endogenous genomic loci, *Biology Open*, 査読有, 2(4):363-367, 2013

DOI: 10.1242/bio.20133871.

⑦ Yu Hisano, Tsuyoshi Nishi, Atsuo Kawahara, The functional roles of S1P in immunity, *The Journal of Biochemistry*, 査読有, 152(4):305-311, 2012

DOI: 10.1093/jb/mvs090.

⑧ Yu Hisano, Naoki Kobayashi, Akihito Yamaguchi, Tsuyoshi Nishi, PLoS One, 査読有, e38941, 2012

DOI: 10.1371/journal.pone.0038941.

[学会発表] (計12件)

① Yu Hisano, Genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish, 2nd “International Institute for Advanced Studies” Conference of Novel Developments on the Study of Life and Biological Systems Based on Genome Engineering and Imaging Science, 2014年2月27日、京都

② Yu Hisano, TALEN-mediated gene disruption for analyzing S1P signaling in zebrafish, 19th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2013年9月20日、仙台

③ Satoshi Ota, Genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish, 19th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2013年9月20日、仙台

④ Yu Hisano, Generation and analysis of S1P receptors-deficient zebrafish using TALEN, FASEB Science Research Conference “Lysophospholipid and Other Related mediators-From Bench to Clinic”, 2013年8月6日、ニセコ

⑤ Yu Hisano, Functional analysis of sphingosine-1-phosphate (S1P) signaling using S1PRs knockout fish, 8th European Zebrafish Meeting, 2013年7月11日、Barcelona, Spain

⑥ Satoshi Ota, Genome modifications mediated by TALEN and CRISPR/Cas system in zebrafish, 8th European Zebrafish Meeting, 2013年7月11日、Barcelona, Spain

⑦ 久野 悠, TALEN を用いた S1P 受容体ノックアウトフィッシュの作製、「自然炎症」「脂質マシナリー」合同若手ワークショップ、2013年7月4日、徳島

⑧ 久野 悠, 分泌輸送体及び受容体を介した S1P シグナリングの生理的役割の解析、第85回日本生化学会大会 シンポジウム、2012年12月15日、福岡

⑨ 久野 悠, S1P シグナリング関連分子破壊

ゼブラフィッシュの作成、新学術領域研究「脂質マシナリー」第3回班会議、2012年11月13日、秋田

⑩ Satoshi Ota, TALEN-mediated genome editing in zebrafish, 18th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2012年9月22日、京都

⑪ 久野 悠, ゼブラフィッシュにおける TALEN による遺伝子改変技術の開発、第二回ゲノム編集研究会、2012年9月20日、岡崎

⑫ Satoshi Ota, Roles of S1P signaling during early embryogenesis, 10th International Conference Zebrafish Development and Genetics, 2012年6月20日、Wisconsin, USA

[図書] (計3件)

①木下政人、安齋賢、久野悠、川原敦雄、羊土社、実験医学別冊「今すぐ始めるゲノム編集」2014年、205(169-179)

② 久野悠、川原敦雄、医歯薬出版株式会社、医学のあゆみ「生命を支える脂質—最新の研究と臨床」2014年、284(1014-1018)

③ 久野悠、川原敦雄、メディカルドゥ、遺伝子医学 MOOK「最新生理活性脂質研究」、2013年、304(112-116)

[その他]

ホームページ等

<http://www.qbic.riken.jp/japanese/research/outline/lab-20.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久野 悠 (HISANO, Yu)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・特別研究員

研究者番号：60467636

### (2) 連携研究者

西 毅 (NISHI, Tsuyoshi)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：60403002