

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10970

研究課題名(和文)急性肺損傷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 of acute lung injury: Targeting sphingolipid signaling

研究代表者

岡本 安雄 (Okamoto, Yasuo)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80293877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生理活性脂質スフィンゴシン1-リン酸は血管内皮細胞のバリア機能を強化することにより血管透過性を抑制することが知られている。本研究において、内皮細胞に発現するスフィンゴシン1-リン酸2型受容体が、内皮型一酸化窒素合成酵素抑制を介して急性肺損傷時の血管バリア機能破綻に防御的に働くことが示された。以上の結果から、スフィンゴシン1-リン酸2型受容体が急性肺損傷の新しい治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a lysophospholipid mediator and plays an important role in the regulation of vascular barrier function. In this study, we found that S1P2 mediates the protection from acute lung injury possibly through inhibiting endothelial nitric oxide synthase, pointing to S1P2 as a promising novel target for treating acute lung injury.

研究分野：脂質生物学

キーワード：スフィンゴシン1-リン酸 急性肺損傷

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性肺損傷/急性呼吸窮迫症候群

急性肺損傷/急性呼吸窮迫症候群は重症感染症、外傷、手術などに合併する肺野領域の炎症を伴う急性肺水腫であり、致死率の高い重篤疾患である (Ware & Matthay, *N. Engl. J. Med.* 2000)。急性肺損傷における肺水腫はマクロファージ・好中球などの炎症細胞や血管内皮細胞・肺胞上皮細胞などの肺組織を構成する細胞から放出された種々のサイトカインによる肺毛細血管のバリア機能の破綻により生じる。そのため、急性肺損傷の治療戦略として、この血管バリア機能破綻を抑制することにより肺水腫と炎症細胞浸潤を抑制できる可能性があるが、急性肺損傷に有効な治療薬は現時点ではなく、血管バリア機能破綻の分子病態の解明とそれに基づく新規治療薬の開発が急務である。

(2) スフィンゴシン1-リン酸と血管バリア機能

スフィンゴシン1-リン酸 (S1P) は生体膜を構成するスフィンゴ脂質の代謝産物であり、血管バリア機能の維持管理に重要な脂質メディエーターである (Garcia et al., *J. Clin. Invest.* 2001)。S1Pは血漿に極めて高濃度 (~1 μM) に存在し、S1P特異的G蛋白質共役型受容体であるスフィンゴシン1-リン酸1型 (S1P1) 受容体、2型受容体、3型受容体を介して生理機能を発現する (Takuwa et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 2008)。これまでの研究から、血漿S1Pは内皮S1P1受容体に作用して恒常的に血管透過性を低く保っていることが明らかとなっている (Camerer et al., *J. Clin. Invest.* 2009)。

(3) アナフィラキシーによる急性の血管バリア破綻におけるスフィンゴシン1-リン酸2型受容体の役割

研究代表者らは、スフィンゴシン1-リン酸2型 (S1P2) 受容体遺伝子座に -ガラクトシダーゼ遺伝子を挿入したマウスを作製・解析し、多くの組織において S1P2 受容体が血管内皮細胞と平滑筋細胞およびマクロファージに発現していることを明らかにした (Du et al., *Cancer Res.* 2010)。しかしながら、S1P2 受容体の血管バリア機能に及ぼす作用は不明であった。

研究代表者は、代表的な血管バリア機能障害の病態であるアナフィラキシーモデルを用いて、S1P2 受容体の血管バリア機能における役割を検討し、内皮細胞に発現する S1P2 受容体は内皮型一酸化窒素合成酵素抑制を介して、アナフィラキシーによる急性の血管バリア破綻から血管を防御していることを明らかにした。(Cui et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013)。

(4) 急性肺損傷におけるスフィンゴシン1-リン酸の役割

最近、アナフィラキシーと同様、血管バリア機能障害の病態である急性肺損傷における肺血管透過性や炎症に対してスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) が保護的に働くことが報告されている (Peng et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004; Sammani et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2010)。しかしながら、これらの先行研究では受容体におけるスフィンゴシン1-リン酸1型受容体の役割は検討されたが、スフィンゴシン1-リン酸2型 (S1P2) 受容体の機能は不明であった。そこで、研究代表者らは、急性肺損傷における S1P2 受容体の役割を検討した。急性肺損傷の動物モデルとして広く用いられているリポ多糖 (LPS) 誘発 (気道内投与) 急性肺損傷モデルを用いた予備実験の結果、LPS 投与 24 時間後、S1P2 受容体ノックアウトマウスでは野生型マウスに比較して、肺血管透過性亢進および炎症細胞の浸潤を伴った急性肺損傷が増悪していることを見出した。すなわち、LPS 誘発急性肺損傷において、S1P2 受容体は血管バリア機能破綻及び炎症細胞浸潤に対して抑制的に働くと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、急性肺損傷のマウスモデルを用いて、スフィンゴシン1-リン酸2型受容体がどのような機構により急性肺損傷時の血管バリア機能破綻に防御的に働くかを研究代表者らが作製した遺伝子改変マウスなどを用いて解析し、急性肺損傷に対するスフィンゴシン1-リン酸2型受容体選択的アゴニストの効果を検討することを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) 急性肺損傷モデル

マウス急性肺損傷モデルはリポ多糖の気管内投与およびブレオマイシン腹腔内反復投与により作製した。

(2) 血管透過性の解析

エバンスブルー色素漏出法、肺組織の乾燥重量/湿重量比の測定、Miles アッセイ、気管支肺胞洗浄液の細胞数・総タンパク量の測定を行った。

(3) マイクロアレイによる網羅的解析

ブレオマイシン誘発急性肺損傷モデルの肺を用いて、マイクロアレイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) スフィンゴシン1-リン酸2型受容体欠損によるリポ多糖誘発急性肺損傷の増悪

リポ多糖投与 24 時間後、スフィンゴシン1-リン酸2型受容体ノックアウトマウスでは野生型マウスに比較して、肺血管透過性亢進および炎症細胞の浸潤を伴った急性肺損傷

が増悪していた。

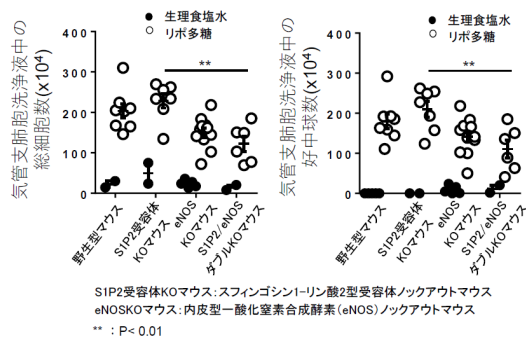
(2) スフィンゴシン 1-リン酸 2 型受容体欠損によるリポ多糖誘発急性肺損傷の増悪における一酸化窒素合成酵素阻害薬の効果

スフィンゴシン 1-リン酸 2 型 (S1P2) 受容体ノックアウトマウスで観察される急性肺損傷の増悪に一酸化窒素 (NO) の関与を検討する目的で、NO 合成酵素阻害薬 L-NAME を投与した。L-NAME は、S1P2 受容体ノックアウトマウスで見られるリポ多糖による急性肺損傷の増悪を改善した。

(3) スフィンゴシン 1-リン酸 2 型受容体欠損によるリポ多糖誘発急性肺損傷の増悪における内皮型一酸化窒素合成酵素の効果

スフィンゴシン 1-リン酸 2 型 (S1P2) 受容体ノックアウトマウスと内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) ノックアウトマウスを交配し、ダブルノックアウトマウスを作成した。eNOS 遺伝子欠損は S1P2 受容体ノックアウトマウスで見られるリポ多糖による炎症細胞の増加を抑制した (図 1)。

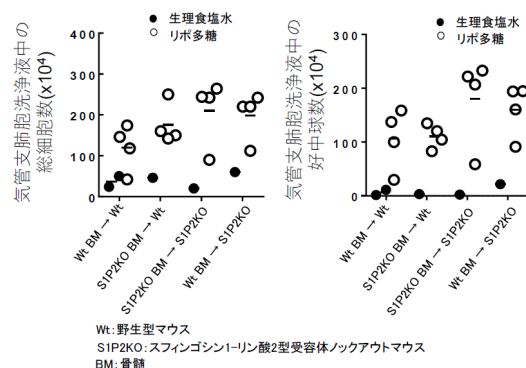
図 1



(4) 骨髄移植実験

骨髄移植法を用いて、血管内皮細胞あるいは骨髄由来マクロファージのいずれのスフィンゴシン 1-リン酸 2 型 (S1P2) 受容体が急性肺損傷における血管バリア機能破綻防御に重要であるかを検討した (図 2)。S1P2 受容体欠損骨髄を移植した野生型マウスに比べて、S1P2 受容体欠損骨髄を移植した S1P2 受容体ノックアウトマウスでは、リポ多糖による炎

図 2

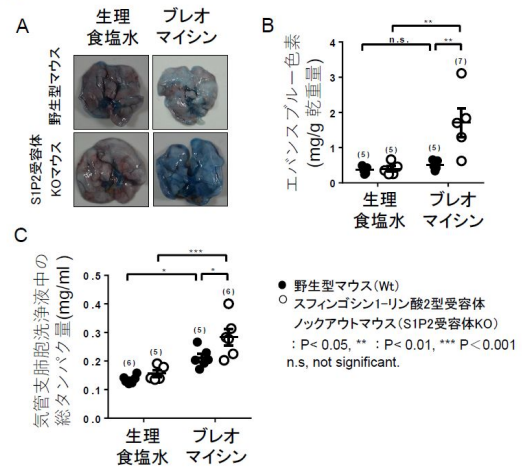


症細胞の増加傾向が認められた。また、野生型骨髄を移植した野生型マウスに比べて、野生型骨髄を移植した S1P2 受容体ノックアウトマウスでは、リポ多糖による炎症細胞の増加傾向が認められた (図 2)。以上の結果から、血管内皮細胞の S1P2 受容体が急性肺損傷における血管バリア機能破綻防御に重要であると示唆された。

(5) スフィンゴシン 1-リン酸 2 型受容体欠損による抗がん薬プレオマイシン誘発急性肺損傷の増悪

プレオマイシン投与 10 日後、スフィンゴシン 1-リン酸 2 型受容体ノックアウトマウスでは野生型マウスに比較して、肺血管透過性亢進および気管支肺胞洗浄液中の総タンパク量の増加が認められた (図 3)。

図 3



(6) マイクロアレイによる網羅的解析

プレオマイシンによる内皮細胞障害を検討するため、プレオマイシン誘発急性肺損傷モデルの肺を用いて、マイクロアレイ解析を行った。血管透過性に関与するサイトカインや接着因子の遺伝子発現変動の他に、細胞老化に関与する遺伝子群の発現増加が認められた。私たちは線維芽細胞やマクロファージの細胞老化がスフィンゴシン 1-リン酸 2 型 (S1P2) 受容体欠損で促進されることを観察していることから、S1P2 受容体欠損によるプレオマイシン誘発急性肺損傷の悪化は、S1P2 受容体欠損による内皮型一酸化窒素合成酵素の活性化の他に細胞老化促進による内皮細胞の機能低下が考えられた。

(7) スフィンゴシン 1-リン酸 2 型選択的アゴニストの効果

スフィンゴシン 1-リン酸 2 型受容体選択的アゴニスト CYM5478 の特異性

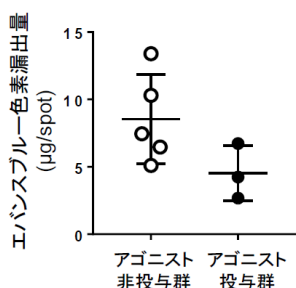
スフィンゴシン 1-リン酸 2 型 (S1P2) 受容体選択的アゴニスト CYM5478 の特異性を、S1P 受容体安定発現 Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞株を用い、細胞外シグナル伝達調節キナーゼ ERK のリン酸化を指標として検討した。

CYM5478によるERKのリン酸化はS1P2受容体以外のS1P受容体安定発現細胞株では認められず、またS1P2受容体以外のS1P受容体阻害剤により抑制されなかった。しかし、S1PによるERKのリン酸化と比べて、 V_{max} が約4分の1と低く、 EC_{50} が約100倍高い値を示した。以上の結果から、S1P2受容体選択的アゴニストCYM5478は内因性アゴニストであるS1Pと比べてアゴニスト活性は弱い、S1P2受容体に対する特異性は高いと考えられた。

血管透過性因子による皮膚血管内皮の透過性亢進反応におけるスフィンゴシン1-リン酸2型受容体選択的アゴニストCYM5478の効果

スフィンゴシン1-リン酸2型(S1P2)受容体の活性化による血管バリア破綻の抑制効果について、Milesアッセイを用いて血管透過性因子である血小板活性化因子(PAF)の皮膚血管内皮の透過性亢進反応におけるS1P2受容体選択的アゴニストCYM5478の影響を検討した。CYM5478はPAFによるエバンスブルー色素漏出に対して抑制作用を示したが、効果は弱かった。以上の結果は、血中S1PレベルがマイクロMオーダーであり、S1P2受容体が恒常的に活性化されていること、また、CYM5478のアゴニスト活性がS1Pより100倍弱いためS1P2受容体の十分な活性化が得られなかったのではないかと考え

図4
血小板活性化因子の透過性亢進反応におけるS1P2受容体選択的アゴニストCYM5478の影響



た(図4)。

以上の結果から、内皮細胞に発現するスフィンゴシン1-リン酸2型受容体が、アナフィラキシーによる急性の血管バリア破綻の防御作用と同様、内皮型一酸化窒素合成酵素抑制を介して急性肺損傷時の血管バリア機能破綻に防御的に働くことが考えられた。また、血管透過性因子による血管透過性亢進反応に対してS1P2受容体選択的アゴニストが抑制作用を示したことから、S1P2受容体が急性肺損傷の新しい治療標的となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Juanjuan Zhao, Yasuo Okamoto, Yuya Asano, Kazuhiro Ishimaru, Sho Aki,

Kazuaki Yoshioka, Noriko Takuwa, Takashi Wada, Yutaka Inagaki, Chiaki Takahashi, Takumi Nishiuchi, Yoh Takuwa. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 facilitates pulmonary fibrosis through potentiating IL-13 pathway in macrophages. *PLoS One* 13: e0197604, 2018, 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0197604. eCollection 2018.

Sei-ichiro Ohkura, Soichiro Usui, Shin-ishihiro Takashima, Noriko Takuwa, Kazuaki Yoshioka, Yasuo Okamoto, Yutaka Inagaki, Naotoshi Sugimoto, Teppei Kitano, Masayuki Takamura, Takashi Wada, Shuichi Kaneko, Yoh Takuwa. Augmented sphingosine 1 phosphate receptor-1 signaling in cardiac fibroblasts induces cardiac hypertrophy and fibrosis through angiotensin II and interleukin-6. *PLoS One* 12: e0182329, 2017, 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0182329. eCollection 2017

Juanjuan Zhao, Yasuo Okamoto, Yoh Takuwa. Sphingosine-1-phosphate receptor type 2 (S1P2) inhibits bleomycin-induced cellular senescence in murine lung fibroblasts. *Journal of the Jusen Medical Society* 125: 2-13, 2015, 査読有

岡本安雄, 脂質メディエータースフィンゴシン1-リン酸による血管障壁機能の制御, *十全医学会雑誌* 123: 114-118, 2015, 査読有

Sho Aki, Kazuaki Yoshioka, Yasuo Okamoto, Noriko Takuwa, Yoh Takuwa. Phosphatidylinositol 3-kinase class II β -isoform PI3K-C2 is required for transforming growth factor β -induced Smad signaling in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 290: 6086-6105, 2015, 査読有 doi: 10.1074/jbc.M114.601484

〔学会発表〕(計21件)

Sarker Kabir Azadul, Sho Aki, Kazuaki Yoshioka, Koji Kuno, Yasuo Okamoto, Aung Thuzar Khin, Pham Quynh Hoa, Islam Shahidul, Noriko Takuwa, Yoh Takuwa. Indispensable role of β and γ isoforms of class II phosphoinositide 3-kinases

(PI3K) in the uterine smooth muscle contraction during labor. 第95回日本生理学会大会, サポートホール高松, 高松シンボルタワー(香川県高松市), 2018

坪井一人, Rahman Iffat Ara Sonia, Hussain Zahir, 山下量平, 岡本蓉子, 宇山徹, 竹之内康広, 田中保, 岡本安雄, 徳村彰, 上田夏生. 脂質メディエーターである*N*-アシルエタノールアミンとリゾホスファチジン酸の新規生合成機構. 第28回創薬・薬理フォーラム岡山, 岡山大学医学部臨床講義棟 臨床第2講義室(岡山県岡山市), 2017

生水真紀夫, 多久和陽, 岡本安雄, 栗原裕基, 松島綱治, 久野耕司. マウス分娩過程におけるADAMTS-1の役割の解析. 2017年度生命科学系学会合同年次大会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2017

竹之内康広, 坪井一人, 大竹一男, 加園恵三, 岡本安雄. エイコサペンタエン酸による糖尿病性血管内皮機能障害に対する慢性投与の治療効果および血管への直接作用. 第132回日本薬理学会近畿部会, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府吹田市), 2017

多久和典子, 石丸和弘, 岡本安雄, 多久和陽. 抗がん剤による臓器障害におけるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)情報伝達系の関与. 第27回日本病態生理学会, 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター教育研修棟(東京都小平市), 2017,

岡本安雄. スフィンゴシン1-リン酸(S1P)2型受容体S1P2による腫瘍血管新生と血管障壁機能の制御. 第27回創薬・薬理フォーラム岡山, 岡山大学医学部臨床講義棟臨床第2講義室(岡山県岡山市), 2017

岡本安雄. 血管バリア機能におけるスフィンゴシン1-リン酸2型受容体S1P2の役割. 第392回川崎医学会講演会, 川崎医科大学別館6階大会議室(岡山県倉敷市), 2017

生水真紀夫, 多久和陽, 岡本安雄, 栗原裕基, 松島綱治, 久野耕司. マウス分娩時の子宮機能におけるADAMTS-1の役割の解析. 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2016

安藝翔, 吉岡和晃, 岡本安雄, 多久和典子, Hoa Quynh Pham, MD Azadul Kabir Sarker, Khin Thuzar Aung, Shahidul Islam, 多久

和陽. クラスII PI3-キナーゼ PI3K-C2はエンドソーム上でのTGF β /Smad2/3シグナリングに必須である. 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2016

Yasuo Okamoto, Hong Cui, Kazuaki Yoshioka, Noriko Takuwa, Toshishige Shibamoto, Yoh Takuwa. S1P2, a receptor for the lysophospholipid mediator sphingosine 1-phosphate, protects against vascular barrier disruption. The 8th Congress of the International Federation of Shock Societies. Tokyo Dome Hotel (Tokyo, Japan), 2016

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, 金沢医科大学医学教育棟4階(石川県河北郡), 2016

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. 第58回日本脂質生化学会, にぎわい交流館AUC(秋田県秋田市), 2016

Sho Aki, Kazuaki Yoshioka, Yasuo Okamoto, Noriko Takuwa and Yoh Takuwa. Phosphatidylinositol 3-kinase class II isoform PI3K-C2 is required for transforming growth factor β -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, 大阪大学微生物病研究所谷口記念講堂(大阪府吹田市), 2016

JuanJuan Zhao, Yasuo Okamoto, Kazuaki Yoshioka, Noriko Takuwa, Takashi Wada, Yutaka Inagaki, Chiaki Takahashi, Yoh Takuwa. Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor-2 (S1P2) aggravates lung fibrosis through altering alveolar macrophage polarization and cellular senescence in mice. 日本生化学北陸支部大会第34回大会, 2016. 5.28, 金沢大学宝町キャンパス医学部記念館(石川県金沢市)

Sho Aki, Kazuaki Yoshioka, Yasuo Okamoto, Noriko Takuwa, Yoh Takuwa. PI3K-C2 is required for TGF β -induced receptor endocytosis and endosomal signaling in endothelial cells. 第93回日本生理学会大会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌

市), 2016

Juanjuan Zhao, Yasuo Okamoto, Yoh Takuwa. Deletion of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor-2 (S1P2) inhibits lung fibrosis through altering alveolar macrophage polarization and senescence in mice. Gordon research conference "Glycolipid and Sphingolipid Biology", Renaissance Tuscany II Ciocco (Lucca (Barga), Italy), 2016

Juanjuan Zhao, Yasuo Okamoto, Kazuaki Yoshioka, Sho Aki, Pham Quynh Hoa, Azadul MD Kabir Sarker, Khin Thuzar Aung, Noriko Takuwa, Yutaka Inagaki, Chiaki Takahashi, Takashi Wada, Yoh Takuwa. Deletion of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor-2 (S1P2) inhibits lung fibrosis through altering alveolar macrophage polarization and senescence in mice. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 2015

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 はエンドソーム上での TGF /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, 富山大学五福キャンパス黒田講堂(富山県富山市), 2015

Yoh Takuwa, Juanjuan Zhao, Yasuo Okamoto, Kazuaki Yoshioka, Noriko Takuwa. Role of S1P2 in inflammation and fibrosis. 14 th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases. Budapest (Hungary), 2015

Yasuo Okamoto, Hong Cui, Kazuaki Yoshioka, Noriko Takuwa, Yoh 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, ホテルアローレ(石川県加賀市), 2015

- ②1 安藝翔, 吉岡和晃, 岡本安雄, 多久和典子, 多久和陽. クラス II 型PI3K-C2 はエンドソーム上でのTGF /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, 一橋講堂(東京都千代田区), 2015

〔図書〕(計2件)

岡本安雄, 多久和陽, エル・アイ・シー社, スフィンゴシン 1-リン酸、疾患モデルの作製と利用 脂質代謝異常と関連疾患<<下巻>>, 2015, 219-235

Noriko Takuwa, Yasuo Okamoto, Kazuaki Yoshioka, Yoh Takuwa. Springer Japan, Vascular endothelial S1P₂ receptor limits tumor angiogenesis and hyperpermeability, Bioactive Lipid Mediator: Current Reviews and Protocols, 2015, 237-252

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: マクロファージの増殖・分化阻害又はマクロファージの老化促進による肺線維症の抑制

発明者: 多久和陽, 岡本安雄

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2015-137937

出願年月日: 2015年7月9日

国内外の別: 国内

〔その他〕

川崎医科大学薬理学教室ウェブサイト

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/med/study/info.php?id=205>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 安雄 (Okamoto, Yasuo)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号: 80293877