

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590750

研究課題名（和文） スフィンゴシン 1 リン酸の肝障害における意義の解明

研究課題名（英文） Elucidation of a role of sphingosine 1-phosphate on liver damage

研究代表者

池田 均（IKEDA HITOSHI）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80202422

研究成果の概要：スフィンゴシン 1 リン酸が、その受容体の一つである S1P2 を介して、in vivo において肝細胞の再生を抑制し、肝線維化は促進することが、スフィンゴシン 1 リン酸受容体遺伝子改変マウスを用いた実験で明らかとなった。すなわち、スフィンゴシン 1 リン酸が実際に肝障害に関与していることが判明し、S1P2 アンタゴニストを用いた肝再生不全、肝線維化治療の確立が期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓病学

1. 研究開始当初の背景

本研究で対象の主眼とする生理活性脂質であるスフィンゴシン 1 リン酸はスフィンゴ脂質に分類される。スフィンゴ脂質とは、グリセロリン脂質、コレステロールとともに細胞膜の脂質二重層を構成し、疎水性部分にスフィンゴシンとセラミド骨格を有する脂質の総称である。これらは単に細胞内外のバリアを形成する静的な役割のみならず、細胞外

のシグナルを検知して細胞応答が発揮されるまでの精緻な情報伝達機構に関わり、ダイナミックに変動すること、また、その機構の破綻・異常が種々の病態に関連することが明らかとなってきた。すなわち、1990 年代にスフィンゴ脂質の中でもセラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン 1 リン酸の細胞内シグナル伝達物質としての役割解明が始まり、これらが細胞の生存・増殖・分化、血管系の構

築をはじめとする種々の生体反応において重要な役割を担うことが分子レベルの裏付けを伴って明らかとなった。

一方、これらスフィンゴ脂質の中でもスフィンゴシン 1 リン酸は、血小板などの細胞から刺激に依存して細胞外に放出されることが解明され、さらにこれに対する G 蛋白質共役型受容体 (S1P₁₋₅) の存在が証明された。従って、スフィンゴシン 1 リン酸は細胞内シグナル伝達物質のみならず、細胞間メディエーターとして働くことが知られるようになり注目されている。現在ではとくに血管生物学、免疫学の分野での、このスフィンゴシン 1 リン酸の重要性は万人が認めるところである。

スフィンゴシン 1 リン酸のヒト血液中濃度は我々の検討などから 0.1 μM から 1 μM の範囲にあることがわかっており、in vitro で種々の作用を発現する濃度に近く、この事実からもスフィンゴシン 1 リン酸が実際の生体内で何らかの働きを担っていることが考えられる。とくに我々は、細胞間メディエーターとしての役割に注目した。そこで、マウスにおいて静注したスフィンゴシン 1 リン酸が主に肝臓に取り込まれること、また、スフィンゴシン 1 リン酸受容体の肝臓での発現が確認されたことに基づき、肝臓がその作用発現の場の一つである可能性を想定し検討を加えてきた。その結果、スフィンゴシン 1 リン酸が、肝線維化に重要な役割を果たす星細胞 (ラット培養細胞) において増殖・収縮を促進し (Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2000)、肝臓を主に構成する肝細胞 (ラット培養細胞) においては増殖を抑制すること (Gastroenterology 2003) を明らかにし、肝構成細胞に種々の作用を及ぼし得る可能性を報告した。さらに、ex vivo でラット門脈灌流系を作成し、灌流液にスフィンゴシン 1 リン

酸を添加すると門脈圧が上昇し、この現象にスフィンゴシン 1 リン酸受容体の中でも S1P₂ が関与すること (Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004)、ラット肝線維化過程や 70% 部分肝切除後の肝再生過程でスフィンゴシン 1 リン酸受容体の肝臓での発現が変動すること (Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2000, Gastroenterology 2003) を見出し報告してきた。これらは実際に in vivo においてスフィンゴシン 1 リン酸が肝臓に作用している可能性を示すものと考えている。

2. 研究の目的

以上の研究成果を踏まえ、肝障害過程においてスフィンゴシン 1 リン酸が何らかの作用を発揮しているとの仮説の元、本研究はスフィンゴシン 1 リン酸の肝臓の病態における役割を明らかにすることを目的とするものである。

3. 研究の方法

(1) マウス急性肝障害モデル

8~10 週齢の野生型および S1P₂KO マウスに 0.5 mL/kg の四塩化炭素 (carbon tetrachloride: CCl₄) ないし 15 mg/kg の DMN を投与して急性肝障害を惹起し、96 時間まで 24 時間ごとに血液および肝臓を採取した。

(2) 肝再生の検討

肝再生は肝重量体重比、肝臓での BrdU 取込および PCNA 染色にて評価した。

(3) マウス線維肝モデル

8~10 週齢の野生型および S1P₂KO マウスに 1 mL/kg の四塩化炭素 (carbon tetrachloride: CCl₄) を週 2 回、4 週間投与して線維肝を作成した。

(4) 肝線維化の検討

肝組織をホルマリン固定後、パラフィン切片を作成し、Masson's trichrome 染色により線維化の程度を検討した。

(5)免疫組織染色

肝組織をホルマリン固定後、パラフィン切片を作成し、抗平滑筋 アクチン抗体 (Sigma) を用いて組織染色を行った。シグナルの検出には Vector M.O.M. immunodetection kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いた。

4. 研究成果

(1)S1P₂KO マウスにおける急性肝障害後の肝再生

まず、野生型および S1P₂KO マウスに CCl₄ を投与して作成した急性肝障害モデルにおける肝再生を BrdU 取込にて検討したところ、CCl₄ 投与後 48 時間目の肝細胞における BrdU 取込は S1P₂KO マウスで有意に亢進していた。

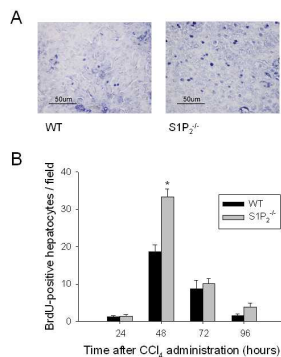


図1

この CCl₄ 投与後 48 時間目における S1P₂KO マウスの肝細胞 DNA 合成亢進は、PCNA 染色によっても確認された。野生型および S1P₂KO マウスにおいて、CCl₄ 投与後の血清 ALT 値および ALP 値には有意差は認めず、また、体重変化にも差は見られなかった。しかし、肝臓重量の体重に対する比は、CCl₄ 投与後 48 時間目で S1P₂KO マウスにおいて有意に高かった。これらの結果から、S1P₂KO マ

ウスは CCl₄ 投与後急性肝障害において肝再生が早期に起こり促進されることが明らかとなった。

次に、野生型および S1P₂KO マウスに致死量の DMN を投与し、その後の肝再生を検討した。DMN 投与後の急性肝障害においても S1P₂KO マウスでは肝細胞の PCNA 染色は 48 時間目で有意に亢進していた。DMN による急性肝障害においても、投与後 48 時間目の血清 ALT および ALP 値、体重変化には野生型および S1P₂KO マウスで差を認めず、また、肝臓重量の体重に対する比も差を認めなかった。ここで、興味深いことに、DMN 投与後のマウスの生存率は S1P₂KO マウスで有意に高かった。

(2)S1P₂KO マウスにおける肝線維化

CCl₄ を 4 週間投与したところ、S1P₂KO マウスでは野生型マウスに比して肝組織における線維沈着が有意に少なかった。

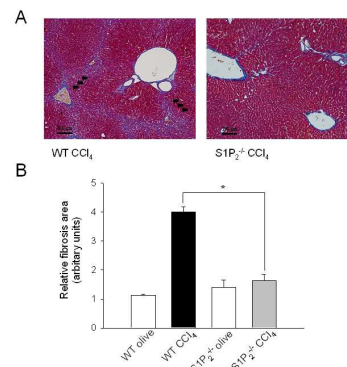


図2

線維化軽減の反映と推定されるが、CCl₄ 4 週間投与中の体重は S1P₂KO マウスで有意に増加したが、体重当たりの肝重量には S1P₂KO マウスと野生型マウスで差はなかった。肝線維化において、線維を産生する星細胞の動態を比較すべく、そのマーカーである平滑筋アクチンの染色を行ったところ、S1P₂KO マウスで染色は有意に減弱していた。従って、

S1P₂KO マウスにおける肝線維化抑制の一機序として、星細胞の増殖抑制が考えられた。

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 1 件)

Ikeda H., Watanabe N., Ishii I., Shimosawa T., Kume Y., Tomiya T., Inoue Y., Nishikawa T., Ohtomo N., Tanoue Y., Iitsuka S., Fujita R., Omata M., Chun J., Yatomi Y. Sphingosine 1-phosphate regulates regeneration and fibrosis after liver injury via sphingosine 1-phosphate receptor 2 (S1P₂). Journal of Lipid Research 2009:556-564. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

渡邊尚子、池田 均ら 肝再生および線維化におけるスフィンゴシン 1-リン酸 (sphingosine 1-phosphate : S1P) の意義について第 94 回日本消化器病学会総会 2008 年 5 月 8 日 福岡 (国際会議場)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

池田 均 (IKEDA HITOSHI)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号 : 80202422

(2) 研究分担者

富谷智明 (TOMIYA TOMOAKI)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号 : 90227637