

機関番号：23302

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590288

研究課題名 (和文) スフィンゴシン-1-リン酸情報伝達系の生体における病態生理学的役割の  
解明研究課題名 (英文) Pathophysiological roles of the sphingosine-1-phosphate  
signaling system in vivo

研究代表者

多久和 典子 (NORIKO TAKUWA)

石川県立看護大学看護学部健康科学講座 教授

研究者番号：70150290

研究成果の概要 (和文)： スフィンゴシン-1-リン酸 (以下 S1P と略称) は、S1P 産生酵素 (SphK1)により生成され、血漿中を運ばれて様々な細胞が持つ細胞膜受容体 (S1PR1～5) に作用し、多彩な生物効果を発揮するホルモン様脂質分子である。本研究は、SphK1 および S1PR から構成される S1P 情報伝達系の生体における病態生理学的役割を明らかにする目的で、複数の遺伝子改変マウスを作出し、その表現型を解析することにより検討した。その結果、世界に先駆けて以下の成果が得られた。(1) SphK1 を強発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを作出し、急性心筋虚血障害を軽減すること、一方で、過剰な S1P が心筋細胞の S1PR3 受容体を介して心筋線維化を自然発症させることを見出した。(2) S1PR2 遺伝子欠損 (ノックアウト, KO) および、S1PR2KO かつマーカー蛋白 LacZ 遺伝子の S1PR2 遺伝子座へのノックインマウスを作出し、S1PR2 受容体が血管壁・骨髄細胞に発現し、がん血管新生・がん増大を強力に抑制する作用を有することを見出した。

研究成果の概要 (英文)： Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a plasma lipid mediator that is produced by sphingosine kinase 1 (SphK1) in erythrocytes to mediate diverse biological activities via 5 members of the G protein-coupled S1P receptor subtypes. We previously cloned S1PR2 as an orphan G protein-coupled receptor and identified S1P as the physiological ligand. In fact S1PR2 turned out to be the first G protein-coupled receptor that negatively regulates cell migration. In the present study we generated SphK1 transgenic mice and S1PR2 knockout mice to investigate *in vivo* roles for the S1P signaling system. We found that SphK1 transgenic mice show resistance against acute myocardial ischemia whereas they develop spontaneous cardiac remodeling and fibrosis through mechanisms involving S1PR3 and transactivation of TGF $\beta$  signaling pathway and reactive oxygen-dependent processes. We also found that deletion of S1PR2 resulted in enhancement of tumor angiogenesis and tumor growth. Studies in cultured lung endothelial cells and bone marrow transplantation experiments indicated that S1PR2 expressed on vascular endothelial cells and bone marrow-derived myeloid cells in concert inhibit tumor angiogenesis, resulting in suppression of tumor progression, providing molecular basis for anti-angiogenic cancer therapy with S1PR2-selective agonist.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：細胞生理

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：スフィンゴシン-1-リン酸、遺伝子改変動物、がん血管新生、心筋リモデリング

### 1. 研究開始当初の背景

S1P は、細胞増殖の促進、細胞運動の促進あるいは抑制などの多彩な作用を発揮する脂質メディエーターとして注目を集め、我々を含む国内外の研究グループにより 5 種の G 蛋白共役型受容体 (S1PR1~5) を介して作用することが明らかとなった。我々はさらに、S1PR1・S1PR3 が S1P に対する化学遊走を媒介すること、これに対し、S1PR2 は細胞遊走の抑制を媒介する最初の G 蛋白共役型受容体であることを明らかにした。実際、S1P により細胞遊走・マトリゲル浸潤が強力に抑制されるマウス悪性黒色腫 B16 細胞において、内因性に発現する S1PR2 が S1P の抑制効果を媒介していることを始めて明らかにした (Arikawa et al., 2003)。S1PR1 欠損マウスは血管成熟の異常により胎生致死であること、S1PR1 はがん血管新生の促進作用を有することが報告された (Hla らのグループ)。また、主要な S1P 産生酵素である SphK1 については、NIH3T3 線維芽細胞 SphK1 安定強発現株がヌードマウス皮下移植により腫瘍原性を示すことから、癌遺伝子であると報告され (Vadas らのグループ)、当該分野での通説となった。しかしながら、生体において、SphK1 強発現が実際腫瘍原性を示すか否かの報告は無く、SphK1 の発がん、あるいはがん進展における病態生理学的役割は不明であった。また、細胞運動が必須の要素となるがん血管新生において、S1PR2 の果たす役割については知られていなかった。

### 2. 研究の目的

(1) SphK1 を全身に強発現する Tg マウスを作出し、SphK1 が癌遺伝子であるか否か、他の表現型を示すか否かを検証する。

(2) S1PR2KO マウス、および S1PR2KO/LacZ ノックインマウスを作出し、① S1PR2KO マウスの表現型、② S1PR2 発現の組織分布、③ がん血管新生・がん進展における S1PR2 の役割を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) CAG プロモーターを用い SphK1 を全身に強発現する SphK1Tg マウスの複数系統を作出し、高発現系では心臓を含む多数の臓器で 20~40 倍の SphK 活性を確認した。

(2) E14.1 マウス ES 細胞を用い、遺伝子組み換え技術を用いて定法により S1PR2KO、

S1PR2KO/LacZ knock in マウスを作出した。解析手法は免疫組織染色、LacZ 活性染色、定量的 RT-PCR 法その他を用いた。

### 4. 研究成果

(1) SphK1Tg マウスは正常に出生、成長し、血算・血液生化学、心拍数、血圧等一般検査所見に異常を認めなかった。血漿・血清の S1P レベルは正常範囲だったが、心筋組織 S1P は 2 倍近くに上昇していた。培養細胞での検討から、SphK1 はストレスに対する生存シグナルを媒介すると考えられているが、冠動脈結紮による心筋急性虚血モデルにおいて、SphK1Tg マウスの心筋障害は同腹野生型に比し約 2/3 に軽減されることが分かった。一方で、SphK1Tg マウスは雌雄ともに心筋の空泡変性・軽度凝固壊死とこれに伴う線維化を 12 週令より自然発症した (図 1)。心筋線維化は加齢とともに進行し、一部個体では心エコーで拡張型心筋症の所見を呈した。

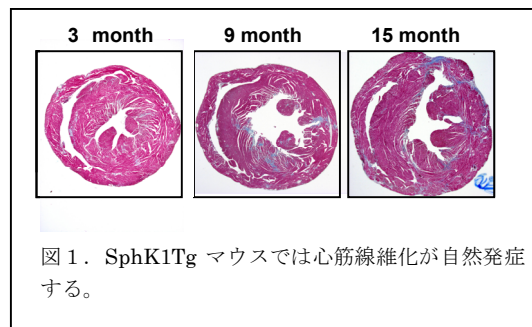


図 1. SphK1Tg マウスでは心筋線維化が自然発症する。

心筋組織の解析により、心筋リモデリングに関与が示唆されている低分子量 G 蛋白 Rho と Rac の活性化、TGFβ 情報伝達系のトランスアクティベーション (Smad3 リン酸化)、酸化ストレスマーカー上昇を認めた。Rho・Rac 活性化阻害剤であるピタバスタチン、あるいは活性酸素消去剤 MPG を生後 4 週令から投与すると心筋線維化が著明に抑制された。一方、アンジオテンシン II 受容体遮断薬は無効であった。心筋細胞に発現する主要な S1P 受容体は S1PR3 であることから、S1PR3KO マウスとの交配により、S1PR3 欠損の遺伝的背景で解析したところ、Smad3 リン酸化と心筋線維化が軽減されることが分かった。以上から、心筋細胞に発現する S1PR3 が少なくとも一部関与し、TGFβ 情報伝達系とのクロストーク、Rho・Rac 活性化と活性酸素による組織障害などの機序によって S1P 過剰による心筋リモデリングを引

き起こすことが明らかとなった。

(2) まず、S1PR2 遺伝子座に LacZ 遺伝子をノックインしたマウスを樹立し、LacZ 活性発現を指標として、各臓器における S1PR2 発現細胞を同定した。多くの臓器で血管内皮と血管平滑筋が S1PR2 を発現している主要な細胞であった。腫瘍内にも S1PR2 発現細胞が認められた。免疫染色と LacZ 活性染色の二重染色により、これらの S1PR2 陽性細胞は、腫瘍血管の内皮細胞と中膜平滑筋細胞の両細胞、および腫瘍内に浸潤している表面マーカー CD11b (骨髄単球系細胞マーカー) 陽性、CD45 (汎骨髄細胞マーカー) 陽性の骨髄由来細胞と同定した。

S1PR2 ノックアウトマウスにレイス肺癌、B16 黒色腫瘍細胞を移植したところ、腫瘍増殖が亢進していた (図 2)。抗内皮マーカー (CD34) 抗体、抗平滑筋マーカー (NG2, desmin) 抗体を用いた免疫染色により、S1PR2 ノックアウトマウスでは野生型マウスに比較して、いずれの腫瘍でも腫瘍内の新生血管密度が増加していた。新生血管では、平滑筋・周皮細胞両者のマーカーである desmin、周皮細胞マーカー NG2 いずれのマーカーの陽性血管も S1PR2 ノックアウトマウスで有意に増加しており、S1PR2 ノックアウトマウスでは血管の壁細胞集積が亢進、すなわち、血管の成熟・安定化が促進されていた (図 3)。

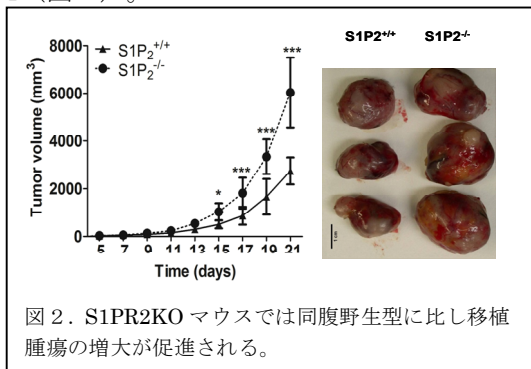


図 2. S1PR2KO マウスでは同腹野生型に比し移植腫瘍の増大が促進される。

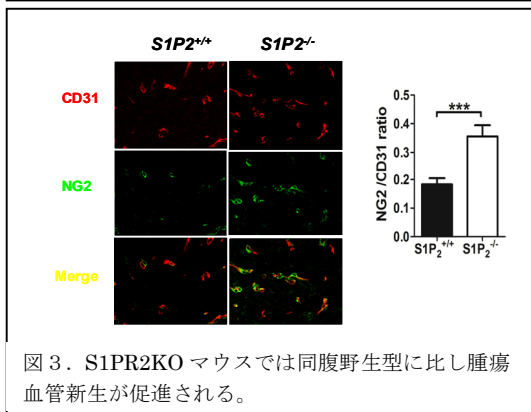


図 3. S1PR2KO マウスでは同腹野生型に比し腫瘍血管新生が促進される。

マウスに FITC 標識高分子デキストランを

静脈注射した後に摘出した腫瘍の切片を蛍光顕微鏡観察したところ、S1PR2 ノックアウトマウスでは血液灌流のある機能血管の数が実際に増加していることが明らかになった。

マウスから単離した血管内皮細胞の機能を検討したところ、S1PR2 ノックアウトマウスの血管内皮細胞では、増殖、細胞遊走、毛細血管様管腔形成能が、野生型内皮細胞に比較して亢進していた。この分子機構として、細胞運動の分子スイッチである低分子 G タンパク Rac の活性亢進および増殖・遊走の両者に関わるリン酸化酵素 Akt 活性の亢進が見られた。S1PR2KO マウス内皮細胞を腫瘍細胞とともに皮下に植えたところ、野生型内皮細胞と腫瘍細胞の移植に比較して、血管新生、腫瘍増殖がともに亢進していた。これらの結果より、内皮細胞の S1PR2 が、腫瘍増殖と血管新生を抑制することが明らかとなった。

S1PR2 ノックアウトマウスでは、腫瘍内に浸潤している表面マーカー CD11b<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup> の骨髄由来細胞が増加し、これらの細胞は S1PR2 を発現していた。単離した野生型マウスの骨髄細胞は S1P により遊走が強く抑制されたが、S1PR2 ノックアウトマウスの骨髄細胞では遊走はむしろ促進した。野生型マウスに S1PR2 ノックアウトマウス骨髄を移植すると、腫瘍増殖と血管新生が亢進した。一方、S1PR2 ノックアウトマウスに野生型マウス骨髄を移植すると、腫瘍増殖は低下した。以上の結果より、内皮細胞および骨髄細胞の両者に発現している S1P2 受容体が腫瘍血管新生を抑制すると結論された。

## 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 11 件)

- ① Takuwa N., Du W., Kaneko E., Okamoto Y., Yoshioka K. and Takuwa Y. (査読有り) Tumor-suppressive sphingosine-1-phosphate receptor-2 counteracting tumor-promoting sphingosine-1-phosphate receptor-1 and sphingosine kinase 1 — Jekyll Hidden behind Hyde. **Am J Cancer Res** 1:460-481, 2011.
- ② Okamoto Y., Wang F., Yoshioka K., Takuwa N. and Takuwa Y. (査読有り)

- Sphingosine-1-phosphate-specific G protein-coupled receptors as novel therapeutic targets for atherosclerosis. **Pharmaceuticals** 4:117-137, 2011. doi:10.3390/ph4010117 <http://www.mdpi.com/1424-8247/4/1/117/pdf>
- ③ Takuwa Y., Du W., Qi X., Okamoto Y., Takuwa N. and Yoshioka K. (査読有り) Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in angiogenesis. **World J Biol Chem** 1:298 -306, 2010. doi:10.4331/wjbc.v1.i10.298. <http://www.wjgnet.com/1949-8454/full/v1/i10/298.htm>
- ④ Wang F., Okamoto Y., Inoki I., Yoshioka K., Du W., Qi X., Takuwa N., Gonda K., Yamamoto Y., Ohkawa R., Nishiuchi T., Sugimoto N., Yatomi Y., Mitsumori K., Asano M., Kinoshita M. and Takuwa Y. (査読有り) Sphingosine-1-phosphate receptor-2 deficiency leads to inhibition of macrophage proinflammatory activities and atherosclerosis in Apoe-deficient mice. **J Clin Invest.** 120:3979-3995, 2010.
- ⑤ Qi X, Okamoto Y, Murakawa T, Wang F, Oyama O, Ohkawa R, Yoshioka K, Du W, Sugimoto N, Yatomi Y, Takuwa N., Takuwa Y. (査読有り) Sustained delivery of sphingosine-1-phosphate using poly(lactic-co-glycolic acid)-based microparticles stimulates Akt/ERK-eNOS mediated angiogenesis and vascular maturation restoring blood flow in ischemic limbs of mice. **Eur J Pharmacol.** 634:121-31, 2010.
- ⑥ Du W, Takuwa N., Yoshioka K, Okamoto Y, Gonda K, Sugihara K, Fukamizu A, Asano M, Takuwa Y. (査読有り) S1P<sub>2</sub>, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, negatively regulates tumor angiogenesis and tumor growth in vivo in mice. **Cancer Res.** 70:772-81, 2010.
- ⑦ Takuwa N., Ohkura S, Takashima S, Ohtani K, Okamoto Y, Tanaka T, Hirano K, Usui S, Wang F, Du W, Yoshioka K, Banno Y, Sasaki M, Ichi I, Okamura M, Sugimoto N, Mizugishi K, Nakanuma Y, Ishii I, Takamura M, Kaneko S, Kojo S, Satouchi K, Mitumori K, Chun J, Takuwa Y. (査読有り) S1P<sub>3</sub>-mediated cardiac fibrosis in sphingosine kinase 1 transgenic mice involves reactive oxygen species. **Cardiovasc Res.** 85:484-93, 2010.
- ⑧ Takabatake M, Takuwa Y, Takuwa N., Yasuno H, Matsumoto S, Shibutani M, Mitsumori K. (査読有り) A case report of a renal mixed epithelial and stromal tumor in a heterozygous S1P<sub>2</sub> receptor deficient mouse. **J Vet Med Sci.** 70:483-5, 2008.
- ⑨ Takashima S, Sugimoto N, Takuwa N., Okamoto Y, Yoshioka K, Takamura M, Takata S, Kaneko S, Takuwa Y. (査読有り) G<sub>12/13</sub> and G<sub>q</sub> mediate S1P<sub>2</sub>-induced inhibition of Rac and migration in vascular smooth muscle in a manner dependent on Rho but not Rho kinase. **Cardiovasc Res.** 79:689-97, 2008.
- ⑩ Takuwa Y, Okamoto Y, Yoshioka K, Takuwa N. (査読有り) Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system. **Biochim Biophys Acta.** 1781:483-8, 2008.
- ⑪ Oyama O, Sugimoto N, Qi X, Takuwa N., Mizugishi K, Koizumi J, Takuwa Y. (査読有り) The lysophospholipid mediator sphingosine-1-phosphate promotes angiogenesis in vivo in ischaemic hindlimbs of mice. **Cardiovasc Res.** 78:301-7, 2008.

〔学会発表〕(招待講演 4 件, 計 20 件)

- ① Yoshioka K, Yoshida K, Cui H, Aki S, Kuntal B, Takuwa N, Okamoto Y, Takuwa Y. Class II PI 3 kinase-C2 $\alpha$  is essential for angiogenesis and barrier function. 第 88 回日本生理学会 (誌上開催) 2011 年 3 月 28-30 日 横浜
- ② Okamoto Y, Wang F, Inoki I, Yoshioka K, Takuwa N, Takuwa Y. Deficiency of sphingosine-1-phosphate receptor-2 inhibits proinflammatory activities of macrophages and atherosclerosis in apoE-deficient mice. 第 88 回日本生理学会 (誌上開催) 2011 年 3 月 28-30 日 横浜
- ③ Yoshioka K, Takuwa N, Okamoto Y, and Takuwa Y. Class II PI 3-kinase C2 $\alpha$  is required for angiogenesis and barrier integrity. 第 18 回 日本血管生物医学学会学術集会/第 8 回日韓合同血管生物学シンポジウム 2010 年 12 月 大阪
- ④ Takuwa N, Du W, Yoshioka K, Okamoto Y, and Takuwa Y. The host cell sphingosine-1-phosphate receptor S1P2 negatively regulates tumor angiogenesis and tumor progression in vivo. 第 69 回日本癌学会学術総会 ワークショップ 2010 年 9 月 23 日 大阪
- ⑤ Takuwa N. Bimodal actions of the cardiac sphingosine-1-phosphate signaling revealed in sphingosine kinase 1 transgenic mice: S1P3-mediated, Rho- and active oxygen- dependent, chronic progression of spontaneous cardiac remodeling and cardioprotection against acutely imposed ischemia/reperfusion injury. The 27th Naito Conference "Membrane Dynamics and Lipid Biology [I]" 2010 年 6・7 月 札幌
- ⑥ Takuwa N, Du W, Yoshioka K, Okamoto Y, and Takuwa Y. (招待講演) S1P2 受容体によるがん血管新生抑制とそのメカニズム 第 52 回日本脂質生化学会シンポジウム 1 「リゾ脂質受容体研究の新展開」 2010 年 6 月 伊香保
- ⑦ Takuwa N, Ohkura S, Takashima S, Ohtani K, Usui S, Okamoto Y, Wang F, Du W, Yoshioka K, and Takuwa Y. Bimodal actions of the cardiac sphingosine-1-phosphate signaling revealed in sphingosine kinase 1 transgenic mice: S1P3-mediated, Rho- and active oxygen- dependent, chronic progression of spontaneous cardiac remodeling and cardioprotection against acutely imposed ischemia/reperfusion injury in sphingosine kinase 1 transgenic mice. 第 87 回日本生理学会大会 2010 年 5 月 盛岡
- ⑧ Okamoto Y, Seok Y-M, Azam MA, Sato A, Yoshioka K, Wang F, Hong C, Takuwa N, and Takuwa Y. The role of vascular Ca<sup>2+</sup>-PI3KC2 $\alpha$ -Rho axis in hypertension of spontaneously hypertensive rats. 第 87 回日本生理学会大会 2010 年 5 月 盛岡
- ⑨ Yoshioka K, Yoshida K, Aki S, Kuntal B, Du W, Qi, X, Wang F, Takuwa N, Okamoto Y, and Takuwa Y. Physiological role of class II PI3K-C2 $\alpha$  for vascular formation: conditional knockout mouse study. 第 87 回日本生理学会大会 2010 年 5 月 盛岡
- ⑩ Takuwa N, S. Ohkura, S. Takashima, K. Ohtani, Y. Okamoto, S. Usui, K. Yoshioka, M. Takamura, S. Kaneko and Y. Takuwa. Cardiac remodeling and fibrosis in sphingosine kinase 1 transgenic mice through an S1P<sub>3</sub> receptor-mediated, reactive oxygen species-dependent process. The 74<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 2010 年 3 月 京都
- ⑪ 威 勳, 岡本安雄, 村川智美, 尾山治, 王飛, 吉岡和晃, 杜娃, 杉本直俊, 多久和典子, 多久和陽 マウス後肢虚血モデルにおける徐放化 S1P 製剤を用い

- た血管新生療法 第 56 回中部日本生理学会 2009 年 12 月 金沢
- ⑫ 杜 娃, 多久和 典子, 吉岡 和晃, 岡本 安雄, 多久和 陽 脂質メディエーター S1P による S1P2 受容体を介した腫瘍血管新生の抑制 第 56 回中部日本生理学会 2009 年 12 月 金沢
- ⑬ 多久和 典子, 大倉誓一郎, 高島伸一郎, 大谷啓輔, 薄井荘一郎, 岡本安雄, 王 飛, 杜 娃, 吉岡和晃, 多久和 陽 心筋リモデリングにおけるスフィンゴシン-1-リン酸情報伝達系の病態生理学的役割—スフィンゴシンキナーゼ 1 トランスジェニックマウスを用いた検討— 第 56 回中部日本生理学会 2009 年 12 月 金沢
- ⑭ 戚 勳, 岡本安雄, 村川智美, 王飛, 尾山治, 吉岡和晃, 杜娃, 多久和 典子, 多久和 陽 マウス後肢虚血モデルにおける徐放化 S1P 製剤を用いた血管新生療法 第 17 回日本血管生物医学会 2009 年 10 月 東京
- ⑮ Wa Du, 多久和 典子, 吉岡和晃, 岡本安雄, Xun Qi, Fei Wang, Hong Cui, Kuntal Biswas, 杉原一司, 浅野雅秀, 多久和 陽. (招待講演) The role of S1P<sub>2</sub>, the angiogenesis inhibitory receptor for sphingosine-1-phosphate, in tumor growth and angiogenesis *in vivo*. 第 82 回日本生化学会 2009 年 10 月 神戸
- ⑯ Du W, Takuwa N, Yoshioka K, Okamoto Y, Asano M, Takuwa Y. (招待講演) Host cell S1P<sub>2</sub> receptor negatively regulates tumor growth and angiogenesis *in vivo*. 4<sup>th</sup> International Conference on Phospholipase A<sub>2</sub> and Lipid Mediators 2009 年 5 月 東京
- ⑰ Takashima S, Sugimoto N, Takuwa N, Okamoto Y, Yoshioka K, Takamura M, Kaneko S and Takuwa Y. G<sub>12/13</sub> and G<sub>q</sub> coordinately mediate S1P<sub>2</sub>-induced inhibition of Rac and migration in vascular smooth muscle in a Rho-dependent manner. 第 73 回日本循環器学会大会 2009 年 3 月 大阪
- ⑱ 多久和 陽, 杜 娃, 戚 勳, 尾山 治, 岡本安雄, 吉岡和晃, 多久和 典子 (招待講演) スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) シグナリングと血管新生 Sphingosine-1-phosphate signaling and angiogenesis (シンポジウム, リゾリン脂質の新しい機能 Novel roles of lysophospholipids) 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008 年 12 月 神戸
- ⑲ Du W, Takuwa N, Yoshioka K, Okamoto Y, Asano M and Takuwa Y. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P<sub>2</sub>) negatively regulates tumor growth and angiogenesis *in vivo*. 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 名古屋
- ⑳ 戚 勳, 村川智美, 尾山 治, 杉本直俊, 王 飛, 杜 娃, 吉岡和晃, 岡本安雄, 多久和 典子, 水岸貴代美, 多久和 陽 徐放化 S1P 製剤による虚血後血管新生の促進 第 50 回日本脂質生化学会 2008 年 6 月 徳島
- [図書] (計 1 件)
- ① Takuwa Y, Wang F, Okamoto Y, Yoshioka K. and Takuwa N. Role of sphingosine-1-phosphate signaling in atherosclerosis. *In: Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biochemistry*, Chun J., Hla T., Spiegel S., Moolenaar W. eds., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, U.S.A. 2011 (in press).
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