

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590965

研究課題名（和文） スフィンゴシンを介した気道粘液産生の制御

研究課題名（英文） The control of airway mucus secretion via sphingosine signals

研究代表者

西村 善博 (NISHIMURA YOSHIHIRO)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20291453

研究成果の概要（和文）：ヒト気道上皮細胞を air-liquid 培地で培養し、IL-13 刺激による杯細胞への分化を検討した。IL-13 により SPHK1 と MUC5AC の発現亢進がみられ、SPHK 阻害薬である DMS 投与により MUC5AC 発現が抑制された。SPHK1 は IL-13 による ERK1/2 リン酸化シグナルに関与して粘液産生を制御していた。次に喘息マウスモデルに、SPHK 阻害薬を投与したところ、喘息が抑制された。

研究成果の概要（英文）：We cultured normal human bronchial epithelial cells in an air-liquid interface and treated with IL-13 to induce their differentiation into goblet cells. Sphingosinekinase1 (SphK1) and MUC5AC expression was increased by IL-13 treatment at both protein and mRNA levels. N,N-dimethylsphingosine (DMS), a potent SphK inhibitor, decreased MUC5AC expression up-regulated by IL-13 treatment. DMS inhibited IL-13-induced ERK1/2 phosphorylation. These results suggest that SphK1 is involved in MUC5AC production induced by IL-13 upstream of ERK1/2 phosphorylation, and independent of STAT6 phosphorylation.

Next we utilized the mouse asthmatic model and found that both SphK and MUC5AC expression were increased and co-localized in airway epithelium. The number of eosinophil and eosinophil peroxidase activity, levels of cytokine were improved by administration of DMS, SphK inhibitor, and FTY-720, sphingosine 1-phosphate agonist, without worsening pulmonary vascular permeability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード： スフィンゴシン、気管支喘息、粘液産生

## 1. 研究開始当初の背景

気道上皮細胞の杯細胞化生は、感染、気管支喘息、閉塞性肺疾患(COPD)、気管支拡張症などの粘液産生過多の病態に大きく関わ

る。粘液は生理的な状態では気道上皮細胞を保護する働きがある一方、過分泌下では、慢性的な呼吸器症状の原因となるのみならず、粘液栓を形成し気道閉塞をきたし窒息死の

原因となる場合もある。未だ本邦で年間2,000人以上ある喘息死の原因はこの粘液栓によるところが大きい。従って、粘液過分泌の改善は気道炎症の病態における治療戦略の1つとして非常に重要である。

杯細胞化生はIL-13およびEGFRを介するシグナルにより誘導されると報告されるようになった。IL-13が生理的培養状態で直接的に気道上皮細胞の粘液発現を誘導することや、杯細胞化生が多く認められる喘息やCOPD患者において、血中や気道中でのIL-13の発現が亢進しているということが報告されている。IL-13受容体の下流シグナルについては、MEK/ERK、p38MAPK、PI3Kなどを介する系が示唆されているが詳細な機序は明らかでない。また、EGFRを介するシグナルに関してはIL-13同様不明な点が多いが、LipopolysaccharideやオキシダントストレスによりTGF $\alpha$ が誘導され、EGFRを介して杯細胞を誘導するという報告がある。IL-13がTGF $\alpha$ を増加させEGFRを介して杯細胞化生を誘導する一方で、EGFRをブロックした状態でIL-13刺激により杯細胞化生を誘導するという報告もあり、IL-13とEGFRの各々のシグナルの相互関係についても未だ明らかでない。

スフィンゴシ 1-リン酸 (Sphingosine 1-phosphate: S1P)は生理活性を持つリン脂質であり、スフィンゴシンキナーゼ (Sphingosine kinase: SPHK)によりスフィンゴシンから生成され、細胞の分化、増殖、走化性、アポトーシス、炎症などに関わることが呼吸器領域以外の分野においても多く報告されている。SPHKは特に肺組織に豊富に発現しており、気道上皮細胞、II型肺胞上皮細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞等での発現が確認されている。近年、様々な気道炎症の病態にS1Pが関わっているという報告がなされるようになっており、喘息患者の肺胞洗浄液中のS1Pが増加するという報告や、気道上皮細胞においてS1PがホスホリパーゼDの活性を介してIL-8の産生を誘導するという報告などがある。

## 2. 研究の目的

我々はS1Pが気道上皮細胞の粘液産生・分泌機序について中心的な役割を担っているのではないかという実験仮説を立てた。ヒト正常気道上皮細胞、マウス喘息モデルを用いて、IL-13刺激により杯細胞化生を起こす過程でS1P、およびSPHKがどのように関与するかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

気道上皮細胞の杯細胞化生にS1PおよびSPHKが関与していることをマウスおよびヒト正常気道上皮細胞を用いて検討し、その

シグナル経路を明らかにする。

(1) ヒト正常気道上皮細胞をair-liquid interface法を用いて細胞培養を行い、インターロイキン-13(IL-13)による細胞刺激を行い、Goblet cells (杯細胞)に分化させる系を用いてS1P、SPHKの発現を検討した。

(2) 杯細胞化生におけるIL-13シグナルへのスフィンゴリン脂質の関与について、SPHK阻害薬や各MAP kinaseの阻害薬を用いて検討した。

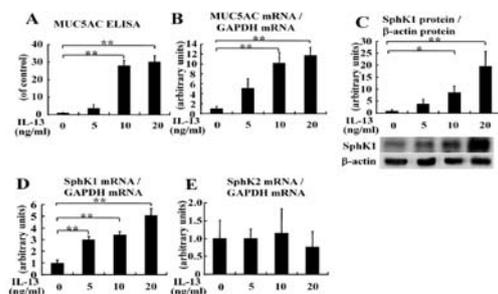
(3) BALB/cマウスに卵白アルブミン(OVA)を感作させ、喘息モデルマウスを作製した。免疫染色を行い気道上皮細胞、杯細胞のSPHKの発現を調べた。

(4) 喘息モデルマウスに非特異的SPHK阻害薬であるdimethylsphingosine(DMS)とS1PアゴニストであるFTY-720をそれぞれ腹腔内注射並びに吸入を行い、喘息の表現型解析を行った。

## 4. 研究成果

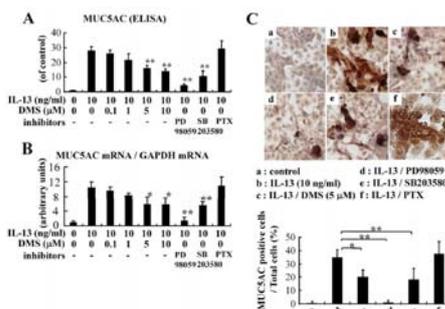
(1) ヒト気道上皮細胞にIL-13刺激を行い、上清中のタンパクと細胞内RNAを解析

SPHK1とMUC5ACのタンパク、RNAともに増加が認められた。一方でSPHK2の発現は変化を認めなかった。

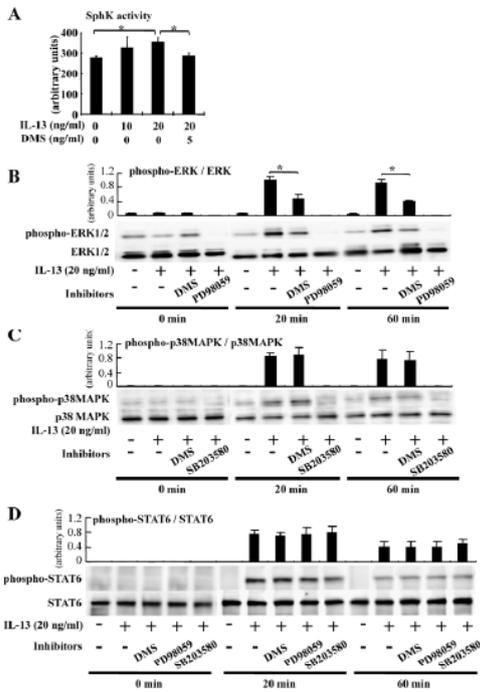


(2) 杯細胞化生におけるIL-13シグナルへのスフィンゴリン脂質の関与

① DMSの投与効果を検討したところ、SPHK1とMUC5ACのタンパク、RNA発現レベルはいずれも低下していた。

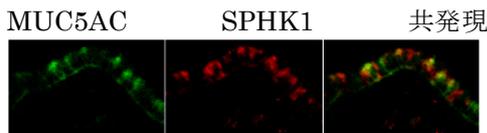


② DMS の SPHK1 および MUC5AC 発現抑制効果について MAP kinase を解析した。DMS は IL-13 による ERK1/2 のリン酸化を抑制していたが、p38 MAPK や STAT6 のリン酸化には影響を与えていなかった。



(3) 喘息モデルマウスの気道における SPHK の発現を免疫染色で検討

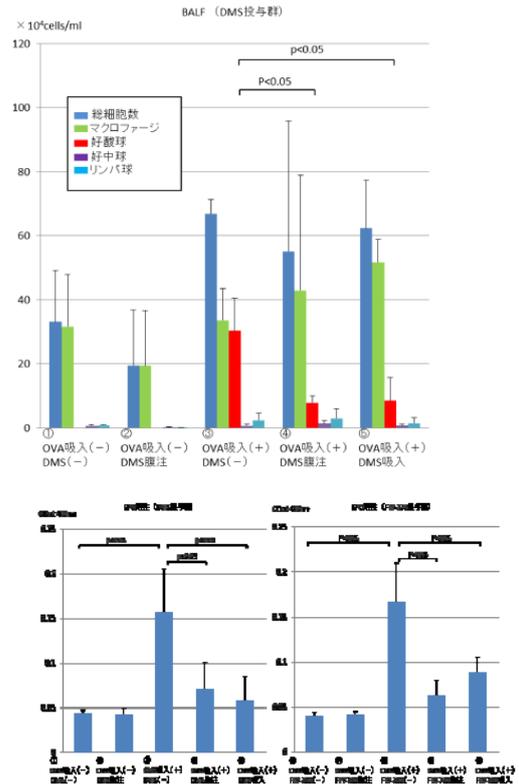
気道上皮細胞に SPHK の発現がみられ、二重染色で粘液の主成分である MUC5AC と SPHK の発現の共発現を認めた。



(4) BALB/c マウスに卵白アルブミン (OVA) を感作させ、喘息モデルマウスを作製した。

喘息モデルマウスに非特異的 SphK 阻害薬である DMS と S1P アゴニストである FTY-720 を腹腔内注射並びに吸入させた。

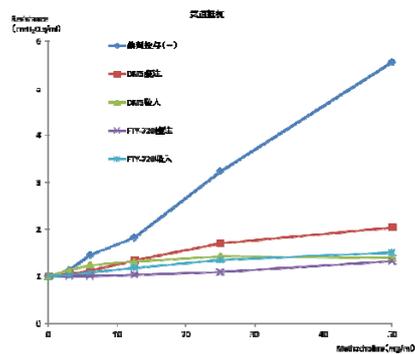
①上記のマウスの BALF (肺胞洗浄液) を採取した。BALF 中の細胞数をカウントし、EPO 活性や IL-4、IL-5、IL-13 の濃度を測定した。DMS や FTY-720 を投与することで BALF 中の好酸球数は減少し、EPO 活性は低下した。IL-4 や IL-5、IL-13 などの Th2 型サイトカイン濃度も低下した。投与方法による有意な差は認められなかった。



② 上記のマウスに Evans blue dye を尾静脈注射し、その後 DMS と FTY-720 を腹腔内並びに吸入にて投与した。薬剤投与後に BALF 中と肺組織中の Evans blue dye 濃度を測定したが、血管の透過性に有意な変化は認められなかった。また、投与経路による差も見られなかった。

③ 上記のマウスのメサコリン吸入に対する気道抵抗を Buxco 社製の Elan-system を用いて測定した。

DMS や FTY-720 を投与することで気道抵抗に改善傾向がみられた。



以上の実験結果より、IL-13 による気道上皮細胞の杯細胞化生において、SPHK1 は IL-13 による ERK1/2 リン酸化シグナルに関与して粘液産生を制御していることが明らか

かとなった。

また、喘息マウスモデルに、SPHK 阻害薬を投与したところ、喘息が抑制されることも明らかとなり、SPHK 阻害薬による新しい喘息の治療戦略法の確立に向けた研究成果が得られた。

#### 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 2 件)

(1) Kono Y, Nishiuma T, Okada T, Kobayashi K, Funada Y, Kotani Y, Jahangeer S, Nakamura S, Nishimura Y.

Sphingosine kinase 1 regulates mucin production via ERK phosphorylation.

Pulm Pharmacol Ther. 2010 23(1):36-42 査読有

(2) 西馬照明, 西村善博

スフィンゴシン 1 リン酸代謝と気管支喘息  
臨床免疫・アレルギー科, 54 巻, 65-71, 2010  
査読無

[学会発表] (計 4 件)

(1) 河良崇、小林和幸、石川結美子、山本正嗣、船田泰弘、小谷義一、西村善博

DMS と FTY-720 は喘息モデルマウスにおいて気道炎症を抑制する 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011 年 11 月 20 日東京

(2) Kawa Y, Nishimura Y, et al. The difference between intravenous and intratracheal delivery of sphingosine kinase inhibitor in asthmatic mice models. ATS 2010 International Conference. 2010 年 5 月 17 日 New Orleans, USA

(3) 西村善博、アレルギー疾患と脂質メディエーター 最近の知見 スフィンゴシン 1 リン酸代謝と気管支喘息 アレルギー治療の新たな可能性、第 59 回日本アレルギー学会秋期学術大会、2009 年 10 月 31 日、秋田

(4) 西村善博、喘息における気道炎症とリモデリング、第 17 回肺リモデリング研究会、2009 年 10 月 17 日、東京

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
該当なし。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

西村 善博 (NISHIMURA YOSHIHIRO)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：20291453

##### (2) 研究分担者

小谷 義一 (KOTANI YOSHIKAZU)  
神戸大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：90403287

船田 泰弘 (FUNADA YASUHIRO)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60437465

小林 和幸 (KOBAYASHI KAZUYUKI)  
神戸大学・大学院医学研究科・特命講師  
研究者番号：50403275

岡田 太郎 (OKADA TARO)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：80304088

西馬 照明 (NISHIUMA TERUAKI)  
神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員  
研究者番号：10379414

##### (3) 連携研究者