

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06832

研究課題名（和文）炎症抑制性の生理活性脂質による血管の慢性炎症制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Regulation of chronic inflammation of blood vessels by a bioactive lipid mediator

研究代表者

大日方 英 (Obinata, Hideru)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50332557

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、高密度リポタンパク質(HDL)に結合して血中を循環する生理活性脂質スフィンゴシン1リン酸(S1P)と、血管内皮細胞に発現するS1P受容体S1PR1に着目して、血管内皮細胞の慢性炎症に対するS1PR1受容体の働きについて解析をおこなった。その結果、Filamin Bというタンパク質がS1PR1受容体の局在制御に重要であり、局在制御がうまくいかなくなると正常な血管内皮細胞の機能が大きく損なわれることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管内皮細胞の慢性炎症は動脈硬化症など心血管系疾患の素因となっている。本研究で、S1PR1受容体の局在制御機構の一端が明らかとなり、局在制御の乱れが血管内皮細胞の炎症反応を増悪することが明らかになった。今後、S1PR1受容体の局在制御に着目した研究を展開していくことで、慢性炎症をターゲットとした動脈硬化の新たな治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we studied the relationship between chronic inflammation of endothelial cells and the functions of S1PR1, a receptor for an anti-inflammatory lipid mediator S1P that circulates in the blood carried by high-density lipoprotein HDL. We clarified that Filamin B is critical for the regulation of the S1PR1 intracellular localization and contribute to maintaining the proper endothelial functions.

研究分野：脂質生化学

キーワード：脂質メディエーター 血管内皮細胞 Gタンパク質共役型受容体 スフィンゴ脂質 慢性炎症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2019年の日本人の死因において、心疾患(15.0%)は第2位であり、第4位の脳血管疾患(7.7%)と合わせると、第1位の悪性新生物(27.3%)に迫る勢いである。これら心血管系疾患の主な原因の1つは動脈硬化である。動脈硬化では、脂質蓄積と線維化により血管の狭窄や弾力性の低下が起こり、進行すると大動脈瘤や虚血性疾患など深刻な病態に至る。

動脈硬化の危険因子は、脂質異常症、糖尿病、高血圧、喫煙などである。近年、これら生活習慣病に対する意識が高まり、脂質異常症に対してはスタチン系薬剤などが開発されているにも関わらず、心疾患による死亡は依然として右肩上がりであり、これまでとは異なる視点からの予防法、治療法の開発は重要な課題である。

動脈硬化は、血管全域で一様に起こるわけではなく、湾曲部や分岐部など血流が乱流化している部位に好発する。血液中の液性成分は他の部位と変わらないため、乱流刺激が動脈硬化の発症に深く関わっていると考えられる。実際に、乱流下にある血管内皮細胞は、白血球接着分子の発現上昇や炎症性サイトカインの産生亢進など慢性の炎症状態に陥っており、動脈硬化の素因となっている。血流ずり応力に対するメカノセンサー候補として様々な分子が報告されているが、いずれも乱流刺激により炎症反応が亢進する分子機序を説明するには至っていない。

以上のような背景から、本研究の核心となる学術的問いは、「乱流下にある血管内皮細胞が慢性の炎症状態に陥るのはなぜか?」というものである。この問いに取り組み、乱流刺激から慢性の炎症反応に至る分子機序を明らかにすることは、血管の慢性炎症をターゲットとした動脈硬化の新たな予防法、治療法の開発に向けた重要なステップであると考えられる。

2. 研究の目的

上記の「問い」に対するアプローチとして、本研究では、高密度リポタンパク質(HDL)に結合して血中を循環する生理活性脂質スフィンゴシン1リン酸(S1P)と、血管内皮細胞に発現するS1P受容体S1PR1に着目して研究を行う。その理由は以下の4点である。

1. S1P-S1PR1受容体シグナルは血管内皮細胞の炎症を抑制する

S1P-S1PR1受容体シグナルは血管内皮細胞間の接着結合を強化し、血管透過性を下げることで、組織への白血球浸潤や血漿成分の漏出などの炎症反応を抑制する(*Obinata and Hla, Int Immunol 2019*)。また、申請者らは、HDLの抗炎症作用の大部分はHDL上のS1Pにより発揮され、S1P-S1PR1受容体シグナルが血管内皮細胞の炎症性遺伝子発現を抑制することを報告している(*Galvani et al. Sci Signal 2015*)。

2. S1PR1受容体欠損により動脈硬化が増悪する

申請者らは、血管内皮細胞特異的なS1P₁受容体欠損により動脈硬化が増悪することを報告している(*Galvani et al. Sci Signal 2015*)。通常は動脈硬化抵抗性の下行大動脈でも動脈硬化が増悪することから、S1Pの炎症抑制シグナルが動脈硬化の抑制に重要だと示唆される。

3. S1PR1受容体はメカノセンサー下流のシグナル伝達に関与する

血管内皮細胞は層流刺激に晒されると、種々の細胞内シグナルが活性化され、血流の向きに細胞が配向する。申請者らはS1PR1受容体の発現抑制により、これらの反応が消失することを報告している(**Jung and *Obinata et al. Dev Cell 2012*)。

4. S1PR1受容体は動脈硬化好発部位で細胞表面への局在が損なわれている

申請者らは、下行大動脈(層流下)の血管内皮細胞ではS1PR1受容体が細胞表面に局在するのに対して、乱流下にある動脈硬化好発部位においては細胞内に内在化し、血中S1Pに反応できな

い状態にあることを報告している(*Jung and *Obinata et al. Dev Cell 2012)。

S1PR1 受容体はリンパ球にも発現するが、血中では S1P により脱感作し、すべての S1PR1 受容体が内在化している。一方、血管内皮細胞の S1PR1 受容体は、層流下では血中 S1P に晒されているにも関わらず脱感作せず細胞表面に局在するのに対し、乱流下では内在化してしまう。これらの先行研究で得た知見から、以下の仮説の立案に至った。

血管内皮細胞には S1PR1 受容体を細胞表面に局在させる機構があり、血中 S1P からの持続的シグナル伝達により炎症反応を抑制する。動脈硬化好発部位では乱流刺激によりこの機構が破綻して S1PR1 受容体が内在化し、S1P シグナルが途絶するため炎症反応が亢進する。

この仮説を検証するために、

(1) 血管内皮細胞における S1P₁ 受容体の局在制御メカニズム

(2) S1PR1 受容体の内在化と炎症反応亢進の因果関係

の解明を目的として研究を行う。

3. 研究の方法

目的 1 血管内皮細胞における S1PR1 受容体の局在制御メカニズムを明らかにする

予備実験により、血管内皮細胞において細胞表面への局在が損なわれる S1P₁ 受容体の変異体、および発現抑制により S1PR1 受容体が内在化するタンパク質を同定しており、実現可能性が高い。候補タンパク質は血管内皮細胞に高発現するタンパク質であり、ヒトの動脈硬化病変部で発現量の減少が報告されている。候補タンパク質による S1P₁ 受容体の局在制御メカニズムを明らかにするために、以下の実験を行う。

➤ S1PR1 受容体と候補タンパク質の相互作用の確認

共免疫沈降法と質量分析計を用いた分析により、S1PR1 受容体と候補タンパク質を含むタンパク質複合体の解析を行う。また、相互作用に重要なタンパク質ドメインを特定する。

➤ S1PR1 受容体内在化経路の特定

候補タンパク質の発現抑制による S1PR1 受容体内在化経路を特定するために、各種阻害剤、RNA 干渉による発現抑制などにより、クラスリン、カベオリン、ユビキチン化などの関与を検討する。

➤ 候補タンパク質の S1P₁ 受容体特異性の確認

候補タンパク質による受容体局在制御が血管内皮細胞に発現する他の受容体にも及ぶか確認する。

目的 2 S1PR1 受容体の局在制御の破綻が炎症反応亢進につながることを明らかにする

S1PR1 受容体局在と炎症反応の因果関係を明らかにするために、以下の実験を行う。

➤ S1PR1 受容体局在が血管内皮細胞の炎症性応答に及ぼす影響の解析

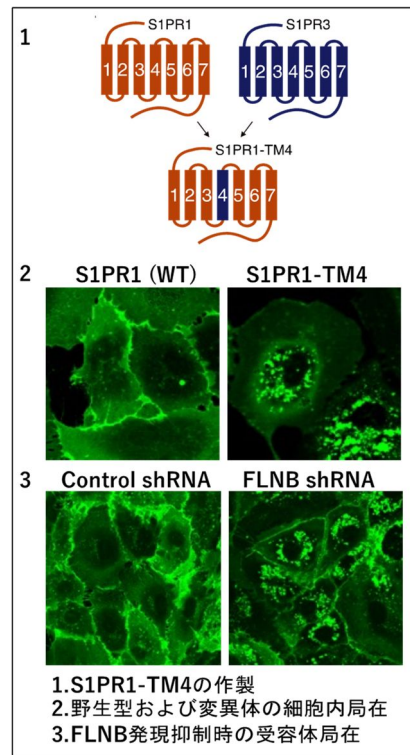
受容体変異あるいは候補タンパク質の発現抑制により S1PR1 受容体の細胞表面への局在が損なわれた細胞に、炎症性刺激を加えた際の細胞応答の変化を観察する。また、内在化抵抗性の受容体変異体(樹立済み)や、受容体内在化経路の阻害による、炎症性細胞応答の変化を観察する。細胞応答は、炎症マーカータンパク質の発現および細胞バリア機能の変化により評価する。また、次世代シーケンサーを用いて遺伝子発現変化の網羅的解析を行う。

4. 研究成果

目的 1 血管内皮細胞における S1PR1 受容体の局在制御メカニズムを明らかにする

リンパ球に発現する S1PR1 受容体は血中 S1P に反応して、脱感作により内在化している。この

過程で、S1PR1 受容体の第 4 膜貫通ドメイン(TM4)と相互作用するタンパク質 CD69 が、内在化促進に働くという報告がなされていた。そこで、S1PR1 受容体の TM4 を他の受容体サブタイプである S1PR3 受容体と入れ替えた変異体(S1PR1-TM4、右図 1)を作製し検討したところ、293 細胞では細胞表面に発現し S1P 刺激による活性化が観察される(正常に機能する)のに対し、血管内皮細胞では S1P 刺激がない状態でも内在化することを見出した(右図 2)。「血管内皮細胞には TM4 と相互作用して S1PR1 受容体の局在を制御するタンパク質が存在する」という仮説のもと、野生型および変異体それぞれの近傍に存在するタンパク質を近接標識法(TurboID 法)で標識し、プロテオームの手法により比較を行なった。その結果、野生型 S1PR1 受容体においてのみ標識される候補タンパク質群の中から FLNB を見出した。血管内皮細胞で FLNB の発現を RNA 干渉法により抑制すると、S1PR1 受容体のリン酸化が亢進し、S1PR1 受容体が内在化することを明らかにした(右図 3)。



FLNB の発現を RNA 干渉法により抑制すると、S1PR1 受容体のリン酸化が亢進し、S1PR1 受容体が内在化することを明らかにした(右図 3)。FLNB の発現抑制による S1PR1 受容体の内在化は、クラスリン被覆小胞依存的であり、小胞輸送で重要な役割を果たすダイナミンに対する阻害剤で完全に消失した。また、同じく血管内皮細胞に発現する別の S1P 受容体サブタイプである S1PR3 受容体や、クラスリン被覆小胞依存的な内在化のモデル受容体として頻用される アドレナリン受容体の細胞表面への局在やリガンド刺激による内在化は、FLNB の発現抑制により変化はなく、FLNB による受容体の局在制御は S1PR1 受容体に特異性を持つことが示唆された。

目的 2 S1PR1 受容体の局在制御の破綻が炎症反応亢進につながることを明らかにする

先行論文で、血管内皮細胞の TNF 刺激により ICAM 等の炎症性マーカーの発現が亢進し、S1P の共刺激により炎症性反応が抑制されていることが示されていたため、本研究でも炎症性細胞応答を解析するモデル系として用いる予定であったが、予備検討の結果、S1P による炎症抑制反応が十分に観察されなかったため、炎症性反応への関与を十分に検討することができなかった。最近、S1P を単体ではなく HDL に結合した状態で用いないと炎症抑制効果がないことが報告されており、今後 HDL に結合した S1P を用いた検討を加えていく予定である。一方、炎症制御機構として重要な血管内皮細胞間の接着結合については、FLNB の発現抑制により弱まることが明らかとなり、S1PR1 受容体の局在制御の破綻が炎症反応亢進につながることを示唆された。

今後、S1PR1 受容体の局在制御と炎症反応の関係をより詳細に検討していくとともに、本研究で得られた知見を in vivo の研究へと発展させ、S1PR1 受容体の活性化制御機構を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zhao Xian, Kiyozuka Keisuke, Konishi Akimitsu, Kawabata-Iwakawa Reika, Minamishima Yoji Andrew, Obinata Hideru	4. 巻 299
2. 論文標題 Actin-binding protein filamin B regulates the cell-surface retention of endothelial sphingosine 1-phosphate receptor 1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 104851 ~ 104851
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.104851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kiyozuka Keisuke, Zhao Xian, Konishi Akimitsu, Minamishima Yoji Andrew, Obinata Hideru	4. 巻 174
2. 論文標題 Apolipoprotein M supports S1P production and conservation and mediates prolonged Akt activation via S1PR1 and S1PR3	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 253 ~ 266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Xian Zhao, Keisuke Kiyozuka, Akimitsu Konishi, Yoji Andrew Minamishima, Hideru Obinata
2. 発表標題 Filamin B regulates the cell surface retention of endothelial sphingosine 1-phosphate receptor 1
3. 学会等名 International conference on bioactive lipids in cancer inflammation and disease progression（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xian Zhao, Keisuke Kiyozuka, Akimitsu Konishi, Yoji Andrew Minamishima, Hideru Obinata
2. 発表標題 Filamin B regulates the endocytosis of endothelial sphingosine 1-phosphate receptor 1
3. 学会等名 第95回日本生化学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideru Obinata
2. 発表標題 Cell-surface retention of endothelial sphingosine 1-phosphate receptor 1 modulates the signaling efficiency
3. 学会等名 FASEB Summer Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hideru Obinata, Xian Zhao, Keisuke Kiyozuka, Akimitsu Konishi, Yoji Andrew Minamishima
2. 発表標題 Actin-binding protein Filamin B regulates endothelial sphingosine 1-phosphate receptor 1 functions by keeping the receptor on cell-surface
3. 学会等名 第96回日本生化学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	南嶋 洋司 (Minamishima Yoji Andrew) (20593966)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授 (12301)	
研究 分担者	川端 麗香 (Kawabata-Iwakawa Reika) (90721928)	群馬大学・未来先端研究機構・講師 (12301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	ツァオ シェン (Zhao Xian)	群馬大学・大学院医学系研究科・大学院生 (12301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	清塚 啓介 (Kiyozuka Keisuke)	群馬大学・大学院医学系研・大学院生 (12301)	
研究協力者	小西 昭充 (Konishi Akimitsu)	大学院医学系研・講師 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関