

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591119

研究課題名(和文)スフィンゴリン脂質シグナル制御による新しい気管支喘息治療へのアプローチ

研究課題名(英文)The new strategy of asthma treatment by controlled the sphingosine signals.

研究代表者

小林 和幸 (KOBAYASH, KAZUYUKI)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50403275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：喘息マウスの肺組織ではS1PR1とS1PR3の発現が亢進していた。S1PRの非選択的阻害薬)、選択的拮抗薬(S1PR1、3拮抗薬であるVPC23019、S1PR2特異的拮抗薬JTE013)を投与したところ、いずれのマウスにおいても気道炎症が抑制された。また、気道過敏性も抑制され、肺胞洗浄液中のIL-4、IL-13の発現低下も見られた。阻害薬を投与経路変え、比較したが、気道内の蛋白量に差異は見られなかった。FTY720投与マウスでは抗原取り込みが抑制されるのに対して、JTE013では正常であったことから、S1PR2は抗原取り込み能に関与することなく、喘息の気道炎症に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemistry showed the increase of Sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) and S1PR3 in alveolar and bronchial epithelial cells in asthma model mice. The number of eosinophil granulocytes and eosinophil peroxidase (EPO) activity in bronchial alveolar fluid (BAL) suppressed by administration of non-selective S1PR inhibitor (DMS, FTY720) or selective agonists (S1PR1,3; VPC23019 and S1PR2; JTE013). These mice treated by S1PR inhibitors showed the suppression of airway hyperreactivity and the expression of IL-4 and IL-13 in BAL. There were no difference of protein levels in BAL between tracheal and intra-penetril injection of every inhibitors.

The uptake of antigen in dendritic cells was suppressed by FTY720 administration, while that in mice administered by JTE043 was not influenced. These data demonstrated that S1PR2 influences the airway inflammation of asthma not concerned the antigen uptake of dendritic cells.

研究分野：医歯薬学

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：気管支喘息 スフィンゴシン1リン酸 樹状細胞

### 1. 研究開始当初の背景

Sphingosine 1-phosphate は生理活性をもつリン脂質であり、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。

これまで我々の研究室では、肺の様々な病態において S1P、および SPHK がどのような役割を果たすのかについて研究を行ってきた。肺線維化の病態において、線維芽細胞の筋線維芽細胞への形質転換は重要であることが知られている。S1P が細胞の分化や増殖に関わることから、我々は S1P がこの線維芽細胞の形質転換に関与するのではないかと考え実験を行った。まず S1P を肺線維芽細胞に投与したところ Rho kinase を介して筋線維芽細胞への形質転換が引き起こされることを発見し、論文に発表した (Urata Y. et al. Kobe J. Med. Sci. 2005;51:17-27)。次に線維芽細胞の形質転換に最も重要なサイトカインである TGF $\beta$  のシグナル経路と S1P との関連を検討した。TGF $\beta$  により SPHK-1 が増加し、SPHK-1 を阻害することにより TGF $\beta$  による線維芽細胞の形質転換が抑制されることを明らかにし、さらにその機序を検討し、TGF $\beta$  の刺激により SPHK が増加し、S1P が産生され、それが自身の細胞膜の S1P 受容体 (S1P2, S1P3) をトランスアクチベーションし、Rho kinase を介して線維芽細胞の形質転換に関わるという結論を得た (Kono Y. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007;37:395-404)。以上の実験より肺線維化の病態に S1P および SPHK-1 が関わっていることが示唆され、新たな治療法に結びつく可能性があることを提唱してきた。

また、一方で、われわれは気道炎症の病態における気道上皮細胞から杯細胞への形質転換にも着目し、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この仮説の基、研究を継続的に行っている。ヒト気道上皮細胞に IL-13 を投与することで杯細胞へ形質転換する *in vitro* の系において、SPHK-1 と気道粘液の主成分であるムチン蛋白 (MUC5AC) が、RNA レベルにおいても蛋白レベルにおいても、同じ細胞に局在を示すことを示し、SPHK の阻害剤である N,N-dimethylsphingosine (DMS) の投与によって杯細胞への形質転換が抑制されるこ

とを最近報告した (Kono Y. Pulm Pharmacol Ther. 2010 Feb;23(1):36-42)。以上より S1P 及び SPHK は気道炎症において、気道粘膜下の線維化や粘液産生などに重要な役割を果たしていることが細胞実験系において示された。気道における線維化や杯細胞化、粘液産生増多は気管支喘息の慢性期 (リモデリング) に見られ、気管支喘息の難治化の重要なファクターであることから、スフィンゴシンを介したシグナル伝達を制御することで、気管支喘息のリモデリングを抑制、難治性喘息の治療が可能になるのではないかと考えられる。

### 2. 研究の目的

以前に我々が報告した Sphingosine 1-phosphate (S1P) を中心としたスフィンゴリン脂質が、細胞実験において線維芽細胞や気道上皮細胞の形質転換に関与する実験データを基に、気管支喘息モデルマウスを用いて生体におけるスフィンゴリン脂質と気管支喘息の病態 (特に気道の線維化や杯細胞増成などの気道リモデリング) との関係を探ることにし、S1P とその受容体を介するシグナル伝達を修飾することで、気管支喘息の表現型を制御可能かについて検討する。

### 3. 研究の方法

気管支喘息モデルマウスを用いて SPHK の活性、局在を明らかにする。また、SPHK の阻害薬や S1P の各受容体のアゴニストの投与、各受容体のノックダウンによって気管支喘息の表現型がどのように変化するか解析することで、気管支喘息におけるスフィンゴリン脂質の役割を明らかにする。

実験 1) 卵白アルブミン (OVA) 感作、吸入喘息モデルマウスを作成する。マウス喘息モデルにおける SPHK、各 S1P の受容体 (S1PR) の発現部位を免疫染色を用いて確認した。

実験 2) S1P の非選択的阻害薬である DMS; N,N-dimethylsphingosine や FTY720 の投与によって気管支喘息における気道炎症がどのように修飾されるかを、以下の項目について検討した。

気道過敏性: メサコリン吸入に対する気道過敏性を Buxco 社製の ELAN system を用いて気道抵抗と気道コンプライアンスを測定することで評価した。

気管支洗浄 (BAL): BAL 液中の細胞数、蛋白量、白血球分画、Th1、Th2 サイトカイン (IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-5、IL-13) の測定を行った。

マウス肺組織のパラフィン切片を作成し、気道への炎症細胞浸潤の程度を評価した。

実験 3) S1P が血管透過性を制御するとの報告も見られることから、S1P 阻害薬の投与を

腹腔内と経気管内より行い、肺胞洗浄液中の蛋白濃度や尾静脈より投与した Evansblue の肺胞洗浄液中の濃度を比較した。

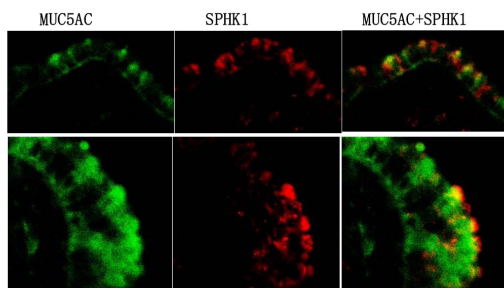
実験 4) 喘息モデルマウスに FTY-720、選択的 S1P2 受容体拮抗薬 JTE-013、S1P1・S1P3 受容体拮抗薬 VPC23019 を腹腔内投与し BALF 中の細胞分画を評価した。

実験 5) SIP 受容体拮抗薬投与による樹状細胞の抗原取り込み能への影響を検討する目的で、喘息モデルマウスに蛍光 OVA を投与した後に FTY-720、JTE-013、を腹腔内投与した。肺の氷結標本を作製し、リンパ節を蛍光免疫染色した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験 1 の結果

SPHK は気道上皮細胞に発現亢進が見られ、特に粘液産生細胞での現亢進が MUC5AC との二重染色で確認された。

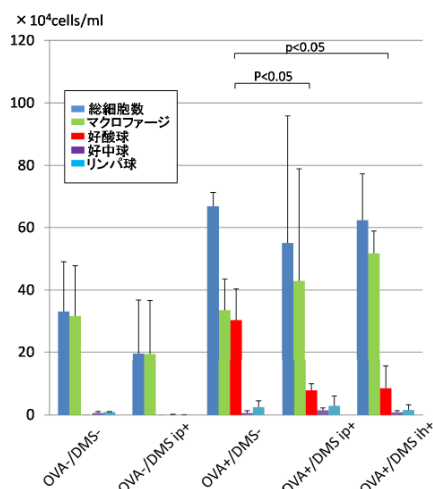


各 S1P 受容体 (S1PR1 ~ S1PR5) の発現を喘息モデルマウスから採取した肺組織で検討したところ、気道上皮細胞、肺胞上皮細胞ともに S1P3 受容体抗体で強く染色された。次いで S1P1 受容体抗体で強く染色された

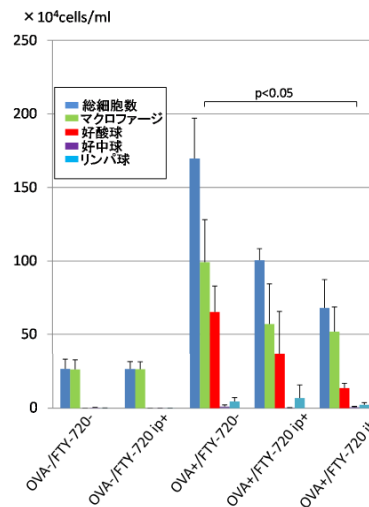
##### (2) 実験 2 の結果

DMS や FTY720 の投与によって、喘息モデルマウスの BAL 中の好酸球数は有意に低下した。

##### < DMS 投与実験 >

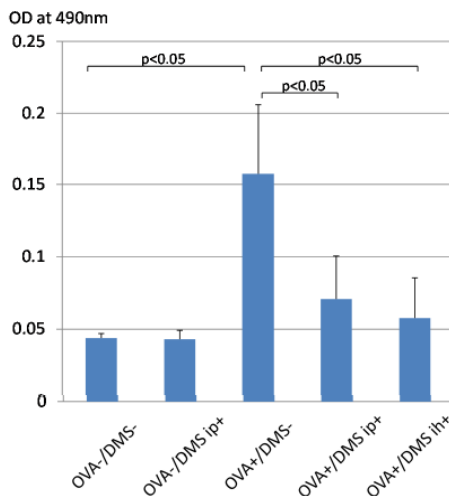


##### < FTY720 投与実験 >



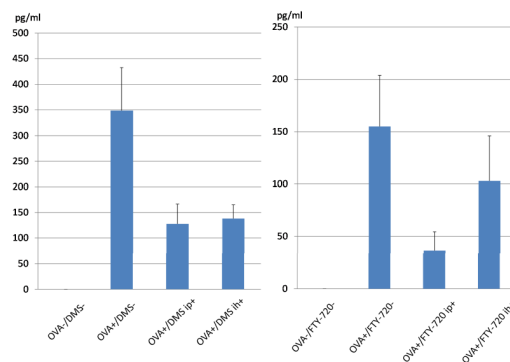
DMS や FTY720 の投与によって、喘息モデルマウスの BAL 中の EPO 活性も有意に低下した。

##### < DMS 投与実験 >

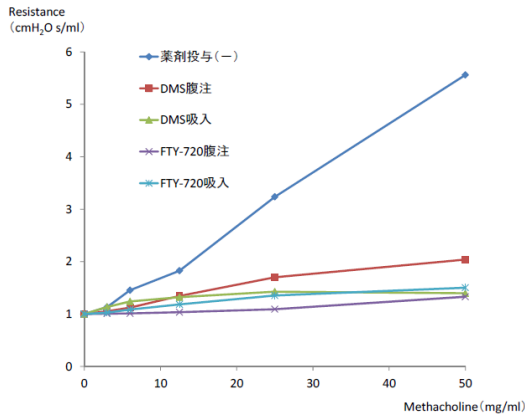


DMS や FTY720 の投与で、喘息モデルマウスの BAL 中の IL-4, IL-13 濃度は低下した。

##### < IL-13 濃度 >

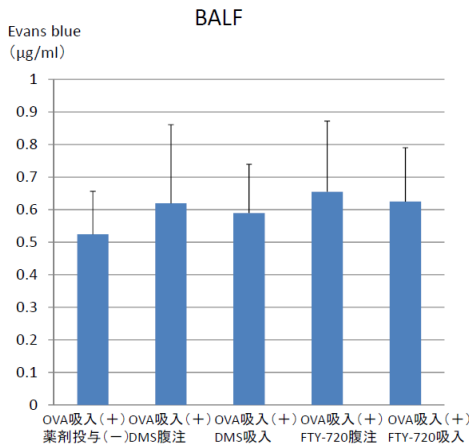


DMS や FTY720 の投与によって、喘息モデルマウスの気道過敏性が抑制された。



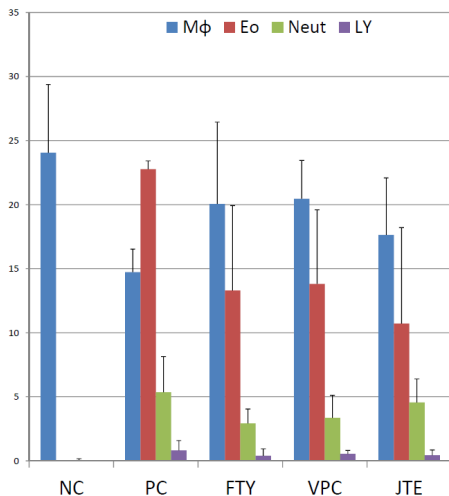
(3) 実験3の結果

DMS や FTY720 の投与経路によって、気道内への蛋白漏出の程度には差が見られなかった。  
< 漏出した Evansblue 濃度 >



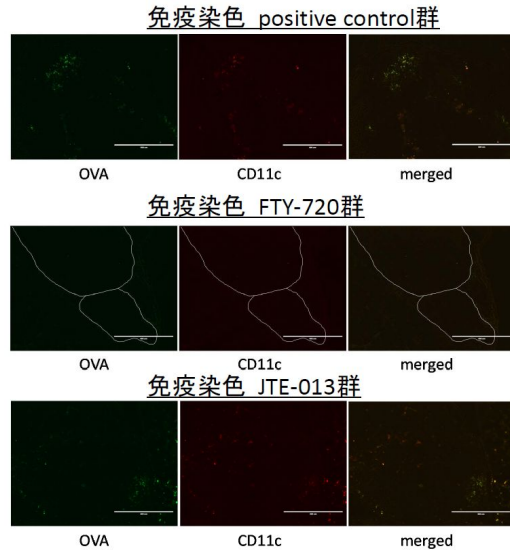
(4) 実験4の結果

今回使用した S1P 受容体のいずれの選択的拮抗薬を投与したマウスでは、気道内への好酸球浸潤が抑制された。



(5) 実験5の結果

FTY-720 投与群の CD11c 陽性樹状細胞に OVA の取り込みは認められなかった。一方、JTE-013 投与群の CD11c 陽性樹状細胞には OVA の取り込みが認められた。



【実験の結果のまとめ】

S1P 受容体を制御することで、喘息における好酸球性気道炎症、粘液産生、気道過敏性が抑制されることがわかり、FTY720 投与マウスでは抗原取り込みが抑制されるのに対して、JTE013 では抗原取り込みは正常であったことから、S1PR2 は抗原取り込み能に関与することなく、喘息の気道炎症に関与していることが示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

S1P 受容体のアドニスト/アンタゴニスト投与による気管支喘息の表現型の変化に対する検討

第 54 回日本呼吸器学会学術講演会

2014 年 4 月 25 日

大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル(大阪)

河良崇、永野達也、田村大介、立原素子、大寺博、小林和幸、船田泰弘、西村善博

喘息モデルマウスにおける DMS と FTY-720 の作用に対する検討

第 52 回日本呼吸器学会学術講演会

2012 年 4 月 20 日

神戸コンベンションセンター

河良崇、小林和幸、石川結美子、船田泰弘、

小谷義一、西村善博

DMSとFTY720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10日  
グランドプリンスホテル新高輪 国際館  
河良崇、小林和幸、石川結美子、船田泰弘、  
小谷義一、西村善博

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

西村 善博 (NISHIMURA, Yoshihiro)  
神戸大学・医学部附属病院・特命教授  
研究者番号：20291453

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・大学院医学研究科・特命講師  
研究者番号：60437465

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：