

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：16101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790909
 研究課題名（和文）S1P を標的とした肺線維症の病態解析と新規治療法
 研究課題名（英文）The role of S1P signaling in-pulmonary fibrosis, and S1PR1-S1P pathway may be an effective molecular therapeutic strategy for fibrotic lung disease
 研究代表者 東 桃代(AZUMA MOMOYO)
 徳島大学・病院・特任助教
 研究者番号：10403750

研究成果の概要（和文）：スフィンゴシン 1 リン酸（sphingosine 1-phosphate:以下 S1P）受容体アゴニスト（FTY720）が高度の線維化形成を惹起するメカニズムの研究を行った。S1P は肺線維芽細胞にたいし増殖能、遊走能を有しており、また線維化肺、線維芽細胞には S1PR1 が発現しており、肺線維症の治療ターゲットとして S1P-S1P1 シグナルの制御が有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Here, we demonstrated that S1P promoted cell proliferation and migration of fibroblasts cells. In particular, It markedly increased S1PR1 level in lung tissue and pulmonary fibroblasts. S1P-S1P1 pathway may be an effective molecular therapeutic strategy for fibrotic lung diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床学 呼吸器内科学

キーワード：肺線維症、S1P

1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性肺線維症

我々が疾患応用を目指している特発性肺線維症（idiopathic pulmonary fibrosis : IPF）は、高度に肺線維化が進行し平均生存期間は 3～5 年の極めて予後不良の難治性疾患であり未だ明らかな生命予後を延長する治療法は確立されておらず、さらなる病態解明と新規抗線維化薬の開発が重要な課題となっている。

(2) 免疫抑制剤 FTY720

FTY720 はスフィンゴシン 1 リン酸（sphingosine 1-phosphate:以下 S1P）受容

体アゴニストで成熟リンパ球の移動を阻害し免疫抑制作用を発揮する新規の免疫抑制剤である。多発性硬化症の治療薬として FDA で承認され日本でも臨床試験が実施されている。

(3) S1P: sphingosine 1-phosphate

S1P は脂質メディエーターとして機能するシグナル分子で受容体として G タンパク質共役型 S1P 受容体ファミリー（S1P1-S1P5）と結合しシグナルを伝達し、細胞内に血管新生、増殖、分化等の多岐にわたる生命現象に関与することが知られている。

2. 研究の目的

今回我々は、S1P 受容体アゴニストである FTY720 が高度の線維化形成を惹起するという研究成果を得ており、S1P シグナルの線維化病態の解明や分子標的治療、診断などへ応用する目的で研究を行った。

2. 研究の方法

(1)線維芽細胞上の S1P レセプター (S1PR1-5) の発現の検討

Flow cytometer analysis や免疫細胞染色、また RT-PCR を用い、S1P の 5 種類のレセプター S1PR1-5 の発現を検討する。細胞は C57BL/6 マウスから樹立したマウス肺線維芽細胞株等を用いて検討を行う。

(2)線維芽細胞の遊走、増殖刺激に重要な S1P レセプターの同定

細胞遊走の検討では Boyden chamber assay を、また細胞増殖の検討では 3H-TdR uptake assay を用いる。また、細胞表面の S1PR を認識し、S1P 刺激をブロックする阻害剤 (W146 =S1PR1 選択的 agtagonist 等) を用い、S1PR1 からのシグナルの抑制を確認する。

(3)S1P シグナルの分化への関与

これまで、すでに S1PR3 を介して線維芽細胞が myofibroblast へ分化するという報告があり、この系でも FTY720, FTY720-P, S1P 刺激で分化が誘導されるか検討する。

(4)ブレオマイシン肺線維症モデル

C57BL/6 (7 week) メスマウスに、ブレオマイシンを入れた Alzet mini-osmotic pump を皮下へ埋め込み肺線維症マウスモデルを作成する。

(5)マウス肺線維症モデルにおける FTY720 投与実験と S1P レセプターの発現の検討

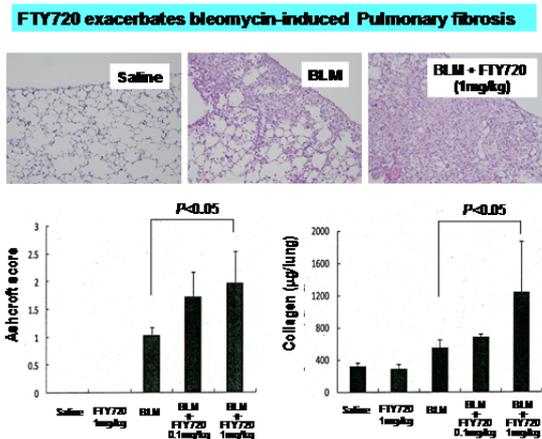
肺線維症モデルマウスに FTY720 を投与し、また線維化肺から RNA を抽出し RT-PCR また、免疫細胞染色を用い線維化肺組織の S1P の 5 種類のレセプター S1PR1-5 の発現を検討する。

4. 研究成果

(1)FTY720 による肺線維化の悪化

我々はブレオマイシン肺線維症モデルを用い S1P レセプター1 受容体アゴニストである FTY720 が用量依存性に肺線維症を増悪させることを明らかにした。(図1)

図1



(2)S1P による線維芽細胞の濃度依存性の増殖、細胞遊走活性

我々の検討でマウス肺線維芽細胞を用いた実験で線維化の進展に重要なメカニズムである線維芽細胞の増殖、遊走のシグナルの制御に S1P が関わっていること (図2), また肺線維症モデルの肺胞洗浄液中の S1P 濃度が上昇していることが明らかとなった。

図2

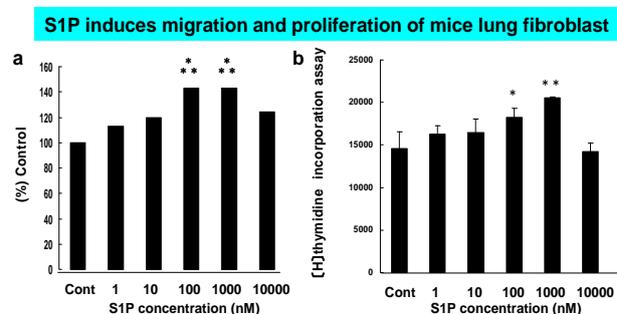
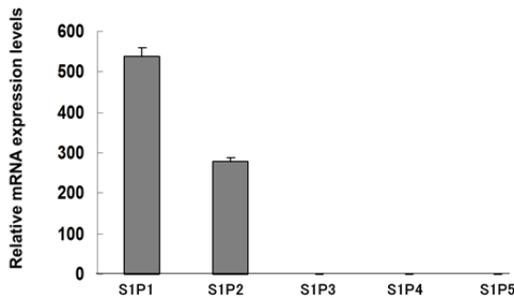


Figure 4. S1P induces (a) cell migration (b) and proliferation of mice lung fibroblast in Vitro assay. * $p < 0.05$ versus control ** $p < 0.01$ versus control *** $p < 0.001$ versus control

(3) 肺線維芽細胞の S1P レセプターの発現の検討

マウス肺線維芽細胞には、S1PR1, S1PR2 の発現を確認した。(図 3) FTY720 は、S1P 受容体ファミリー (S1P1-S1P5) のなかでも、S1PR2 以外と結合することから、FTY720 の線維芽細胞の結合レセプターは S1PR1 と示唆される。

図3

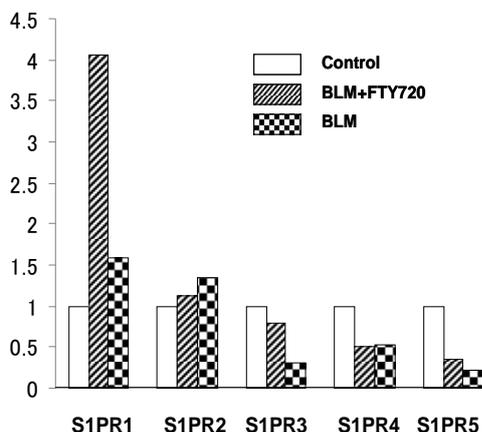


(4) 線維化肺組織での S1P レセプターの発現の検討

肺線維症モデルマウスから RNA を抽出し RT-PCR の検討から、ブレオマイシン単独群でもコントロールに比べ、S1PR1 の発現が亢進していた。また、さらに FTY720+ブレオマイシン群で高度に線維化が惹起された群ではさらに S1PR1 の発現が亢進していることが、確認された。(図 4) またさらにマウス線維化肺、IPF 患者肺を用いた免疫染色においても S1PR1 発現が確認された。(data not shown)

図4

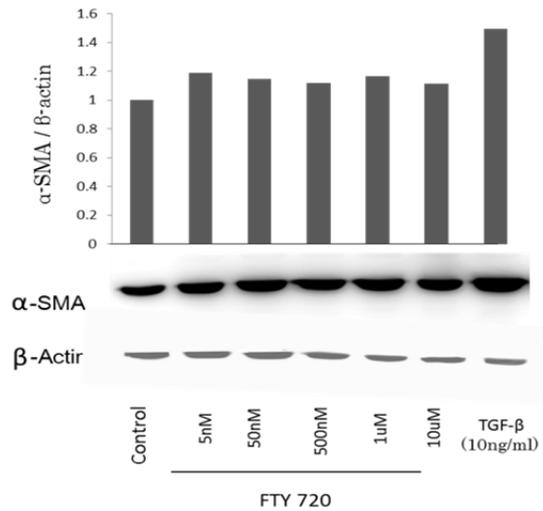
S1PR1 expression was increased Bleomycine and Bleomycine with FTY 720 in mice



(5) 肺線維芽細胞の myofibroblast への分化誘導

これまで S1PR3 を介し、線維芽細胞は FTY720 により myofibroblast へ分化するという報告があるが、FTY720 の刺激で α -SMA の発現に差は認めなかった。(図 5)

図5



(6) まとめ

スフィンゴシン 1 リン酸 (sphingosine 1-phosphate: 以下 S1P) 受容体アゴニスト (FTY720) が高度の線維化形成を惹起するメカニズムの研究を行った。S1P は肺線維芽細胞にたいし増殖能、遊走能を有しており、また線維化肺、線維芽細胞には S1PR1 が発現しており、肺線維症の治療ターゲットとして S1P-S1P1 シグナルの制御が有効である可能性が示唆された。

今回の研究で得られた成果は、国内外において新たな知見となるものであり英文の雑誌に投稿予定である。また、今後の展望としては、この成果をもとに肺線維症患者での解析を行っていく意義は十分にあると考えられ、ヒトでの病態への関与と治療応用に発展させ寄与できればと考えられる。

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 3 件)

- ① Batmunkh R, Nishioka Y, Aono Y, Azuma M, Kinoshita K, Kishi J, Makino H, Kishi M, Takezaki A, Sone S. CCN6 as a profibrotic mediator that stimulates the proliferation of lung fibroblasts via the integrin $\beta 1$ /focal adhesion kinase pathway. *J Med Invest.* 58:188-196, 2011 査読あり
- ② Kishi J, Nishioka Y, Kuwahara T, Kakiuchi S, Azuma M, Aono Y, Sone S. Blockade of Th1 chemokine receptors ameliorates pulmonary granulomatosis in mice. *Eur Respir J.* 38:415-424, 2011 査読あり
- ③ 木下勝弘, 西岡安彦, 岸昌美, 竹崎彰夫, 青野純典, 東桃代, 岸潤, 上原久典, 泉敬介, 曾根三郎. FAK シグナルの肺線維化における役割—ブレオマイシン肺線維症モデルでの検討—分子呼吸器病 15:124-127, 2011 査読なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 桃代 (AZUMA MOMOYO)
徳島大学・病院・特任助教
研究者番号：23790909

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：