

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591131

研究課題名(和文) 気道アレルギー免疫応答に対するスフィンゴリン脂質系の役割の解明

研究課題名(英文) Role of sphingolipids in the respiratory immune system

研究代表者

西村 善博(NISHIMURA, Yoshihiro)

神戸大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：20291453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)： スフィンゴシン1リン酸(S1P)はスフィンゴシンからスフィンゴシンキナーゼにより産生され、S1P受容体(S1PR)に結合して作用するが、呼吸器領域におけるS1PRの役割や実験動物におけるS1PR阻害剤の役割については詳しく分かっていない。今回我々は、マウスの気道上皮細胞にS1PRのサブタイプのうち1から3が発現していることや、S1Pの刺激でヒトの気道上皮細胞から炎症性サイトカインが分泌されることを明らかにした。また、S1PR2の阻害剤であるJTE013の投与により好酸球性の炎症が抑制されることを明らかにした。以上の結果から、JTE013は気管支喘息の治療薬となり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Sphingosine kinase phosphorylates sphingosine to generate sphingosine 1 phosphate (S1P). S1P stimulates the five S1P receptors (S1PR), but S1PRs' roles in the respiratory system and the therapeutic effect of S1PR antagonist in experimental asthma mouse model are not well understood. Bronchial epithelial cells in mouse lung expressed S1PR1 to 3. S1P induced proinflammatory cytokine production by the bronchial epithelial cells. In experimental asthma model, JTE013 exhibited substantially attenuated eosinophilic inflammation. In conclusion, JTE013 attenuated eosinophilic inflammation via regulating proinflammatory cytokines from bronchial epithelial cells. Our results suggest that JTE013 might be a possible candidate for the bronchial asthma treatment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：スフィンゴシン1リン酸 スフィンゴシン1リン酸受容体 喘息 JTE013 TSLP IL-25 IL-33

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) はスフィンゴリン脂質の代謝産物で、細胞の増殖、移動、細胞骨格の形成などの様々な生物学的反応を制御することが知られていた。申請者らは、これまでの研究から、気管支喘息、特に気道リモデリングにおける S1P、およびスフィンゴシンキナーゼ (SPHK) の役割を明らかにしてきた。

まず、S1P が Rho kinase を介して筋線維芽細胞への形質転換を引き起こされることを発見し、論文に発表した。次に申請者らは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 のシグナル経路について検討し、TGF により SPHK-1 が増加し、SPHK-1 を阻害することにより TGF による線維芽細胞の形質転換が抑制されることを発見し、その機序として TGF の刺激により S1P が産生され、それが自身の細胞膜の S1P 受容体 (S1PR2, S1PR3) 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。

また、他のリモデリングの特徴でもある気道上皮細胞から杯細胞への形質転換にも着目し、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、同じ細胞に局在することを示し、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報告した。これらの知見から 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、臨床応用を目的として生体 (マウス) を使った実験を引き続き行った。マウス喘息モデルを作成し S1P の合成を抑制する DMS をモデルマウスに気管内投与したところ、気道の病理組織において線維化や杯細胞の増生が抑制され、リモデリングの抑制につながる可能性を報告した。また、この実験系において、同時に検討した気道内への好酸球浸潤や Th2 型サイトカインの産生が DMS で抑制されることも同時に明らかになった。すなわち、S1P は形質転換などの組織変化に関与するのみならず、気管支喘息におけるアレルギー性気道炎症の免疫応答そのものを制御している可能性が新たに見出された。

Gタンパク質共役型受容体である S1PR には 5 つのアイソタイプがあり、様々な機能を有することが知られていた。例えば S1PR1 はリ

ンパ節や胸腺からのリンパ球の移動や、樹状細胞の遊走に重要な役割を果たしている。また、炎症細胞における S1PR の発現についても解析が進んでいるが、呼吸器領域における S1PR の発現については十分に分かっていなかった。そこで、新規治療標的として、S1PR の呼吸器領域における役割やその阻害剤の作用機序を詳細に明らかにする必要があると考えられた。

2. 研究の目的

気管上皮細胞に着目して、S1PR2 阻害剤である JTE013 の抗炎症効果、作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 呼吸器領域における S1PR の発現の解析
BALB/c マウスの肺組織を取り出し、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した後、5 μm の厚みで切片を切り出した。病理切片は S1PR1 から 5 に対する抗体を使用し、ABC 法により免疫染色を行った。

(2) アレルギー性の気道炎症に対する JTE013 の効果

BALB/c マウスに卵白アルブミン (OVA) を抗原、水酸化アルミニウムをアジュバントして day0 および 7 に腹腔注射を行い、感作を成立させ、day21、22 に 1% の OVA をエアロゾル化してネブライザー吸入させ、喘息を発症させた。この喘息モデルマウスに対して day21、22 に JTE013 4 mg/kg を腹腔注射した上でエアロゾル化した OVA の吸入を行い、肺組織の HE 染色、気管支肺泡洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞の解析、ヘルパー T 細胞 (Th) 由来サイトカインの ELISA による解析を行った。

(3) 肥満細胞の分化に対する JTE013 の効果

Balb/c のマウスの骨髄細胞を取り出し、IL-3 の存在下で骨髄由来肥満細胞 (BMMC) の初代培養細胞を、培養時に JTE013 を週 2 回投与し 28 日かけて作成した。その後、RT-PCR にて肥満細胞の表面マーカーである FCRI や c-kit の発現を評価した。

(4) 樹状細胞の遊走能に対する JTE013 の効果

OVA に感作させた喘息モデルマウスに対して day21 に蛍光標識 OVA 40 $\mu\text{g}/\text{匹}$ を経気道投与し、24 時間後に胸腔内組織を採取した。採取した胸腔内組織のリンパ節に CD11 に対する抗体を使用して蛍光 2 重免疫染色を行った。

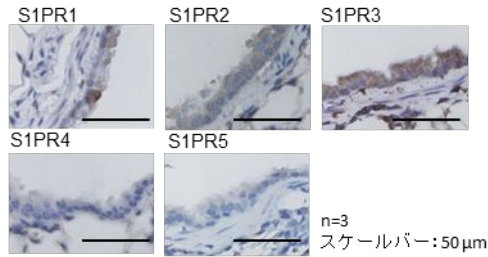
(5) 気管上皮細胞のサイトカイン分泌能の評価

ヒト気管支上皮細胞 BEAS-2B を 100 nM の S1P で 3 時間刺激し、炎症性サイトカインのプライマーを使用して各 mRNA の GAPDH に対する発現量をリアルタイム PCR により評価した。

4. 研究成果

(1) 呼吸器領域における S1PR の発現の解析
BALB/c マウスの肺における S1PR の発現を S1PR の各サブタイプに対する抗体を用いて免疫染色で解析したところ、S1PR3 が最も強く気道上皮細胞に発現しており、S1PR1 が気道上皮の一部に発現しており、S1PR2 が気道上皮の全体に弱く発現していた(図 1)。このことから、気道上皮の炎症において S1P が役割を持っている可能性が示唆された。

図 1. 気道上皮における S1PR の発現



(2) アレルギー性の気道炎症に対する JTE013 の効果

続いて BALB/c マウスを用いて OVA を抗原とする OVA 誘導性のアレルギー性急性喘息マウスモデルを作成し、その表現型に与える JTE013 の影響を解析した。まず、病理組織では気管支血管周囲の炎症細胞の浸潤が無治療群に比較して JTE013 治療群で著明に抑制されていた(図 2)。次に BAL を行ったところ、BALF 中の好酸球数の増加は無治療群に比較して JTE013 の治療群で有意に抑制されており ($p < 0.05$, 図 3) 更には Th2 由来のサイトカインの産生増加も JTE013 治療群で有意に抑制されていることが明らかとなった。以上から、JTE013 は Th2 型の免疫応答を制御していることが明らかとなった。

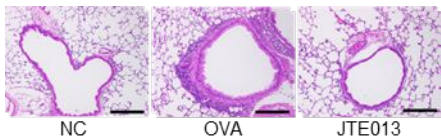


図 2.

OVA 誘導性の喘息モデルへの JTE013 の効果

図 3. 好酸球性炎症への JTE013 の効果

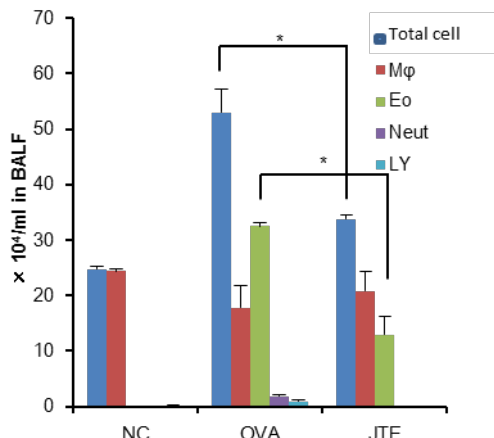
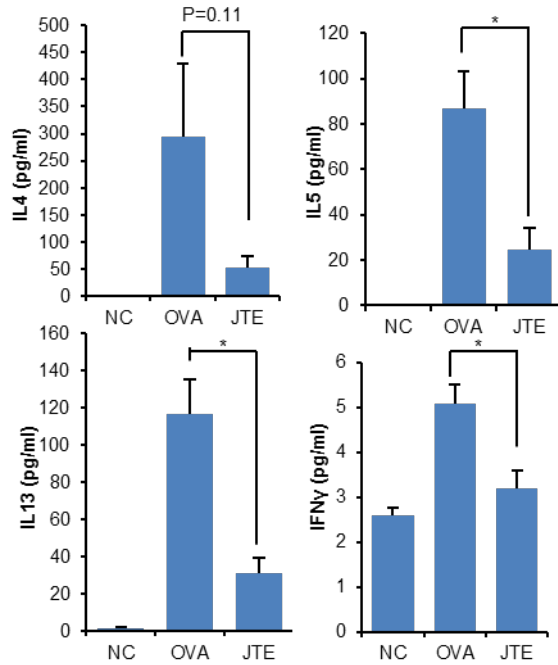


図 4. Th 由来サイトカインの産生への JTE013



の効果

(3) 肥満細胞の分化に対する JTE013 の効果

次に、JTE013 の作用点を定めるために、まず、炎症細胞に対する JTE013 の影響について解析を進めた。そこで、好酸球性の気道炎症で重要な役割を持つ肥満細胞に着目し、これまで報告のない肥満細胞の分化への JTE013 の影響を調べることとした。マウスの大腿骨由来の骨髓細胞を IL-3 の存在下で肥満細胞へと分化させる際の JTE013 治療の影響を解析したが、分化の指標である肥満細胞の表面マーカーの発現は JTE013 の存在下でも無治療群と変わらず、肥満細胞の分化には JTE013 は効果を持たないことが明らかとなった(図 5)。

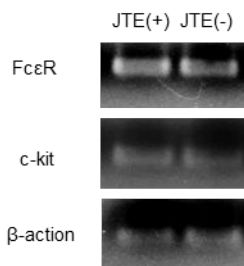


図 5. 肥満細胞の分化への JTE013 の効果

(4) 樹状細胞の遊走能に対する JTE013 の効果

続いて、樹状細胞の遊走能への影響について解析を行った。すなわち、OVA 感作後の BALB/c マウスに蛍光標識 OVA を貪食し、領域リンパ節へ移動する CD11c 陽性細胞(樹状細胞)を蛍光染色により調べたところ、蛍光標識 OVA を貪食した CD11c 陽性樹状細胞の領域リンパ節への移行に JTE013 治療群で抑制がみられた。肥満細胞の結果と合わせて、炎症細胞レベルにおいて、S1PR2 は樹状細胞の遊走能を制御することで、喘息応答を制御して

いる可能性があることが示唆された。

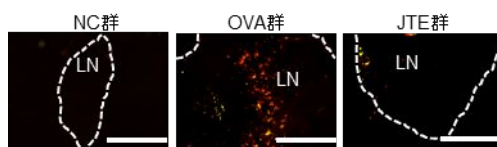


図 6. 樹状細胞の遊走能への JTE013 の効果

(5) 気管上皮細胞のサイトカイン分泌能の評価

最後に、ヒト気管上皮細胞 BEAS-2B を S1P 100 nM で 3 時間刺激した際の炎症性サイトカインの mRNA の発現量をマイクロアレイで解析したところ、上皮由来のサイトカインで樹状細胞や肥満細胞を介して Th2 型免疫応答に関わっていることが報告されている thymic stromal lymphopoietin (TSLP) や、抗原結合時に上皮から分泌されて innate immune cells からの Th2 サイトカインの分泌に関わる IL-25、IL-33 を含む複数のサイトカインで発現の増加が見られた。以上のことから、S1P は気道上皮からの炎症性サイトカインの分泌を介して Th2 型の免疫応答を制御している可能性が示唆された。

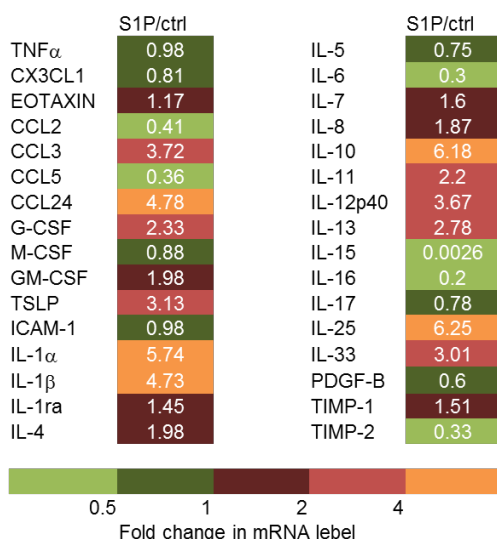


図 7. S1P 刺激による BEAS-2B 細胞からの炎症性サイトカインの分泌

以上の結果より、S1PR2 は Th2 型免疫応答を介して気管支喘息を制御しており、S1PR2 に対する阻害剤は気管支喘息の抑制効果が期待できると考えられた。今後は S1PR1 と 3 の阻害剤である VPC23019 の喘息の表現型に与える効果の検討や、TSLP や IL-25、IL-33 などのサイトカインの分泌に与える S1PR 阻害剤の効果の確認、さらにはこれらのサイトカインに対する抗体を用いて、喘息の表現型が同様に抑制されるか、確認していく予定である。

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 2 件)

Nagano T, Edamatsu H, Kobayashi K, Takenaka N, Yamamoto M, Sasaki N, Nishimura Y, Kataoka T. Phospholipase C , an effector of ras and rap small GTPases, is required for airway inflammatory response in a mouse model of bronchial asthma. PLoS One. 査読有、2014 Sep 30;9(9):e108373.

Kajimoto T, Okada T, Miya S, Zhang L, Nakamura S. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. Nat Commun. 査読有、2013;4:2712.

〔学会発表〕(計 3 件)

寺下智美、永野達也、河良崇、徳永俊太郎、國政啓、小林和幸、西村善博、スフィンゴシン 1 リン酸受容体 2 型の肥満細胞の分化、樹状細胞の遊走能における役割、第 55 回日本呼吸器学会学術講演会、2015 年 4 月 17 日、東京、東京国際フォーラム

Tatsuya Nagano、Hironori Edamatsu、Kazuyuki Kobayashi、Yoshihiro Nishimura、Tohru Kataoka、Crucial role of cell-mediated airway inflammation in mice、ATS2014、2014 年 5 月 20 日、米国、サンディエゴ

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、S1P 受容体のアゴニスト/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 日から 27 日、大阪、大阪国際会議場

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

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

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：