

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461182

研究課題名(和文) 過敏性肺炎の新たな治療標的としてのスフィンゴシン1-リン酸シグナル伝達系の解析

研究課題名(英文) The role of sphingosine 1-phosphate signaling in hypersensitivity pneumonitis

研究代表者

土屋 公威 (Tsuchiya, Kimitake)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10579189

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)：過敏性肺炎では肺へのリンパ球流入が炎症反応を促進する。本研究ではハト糞抽出物(PDE)の吸入による過敏性肺炎のマウスモデルを用いて、リンパ球循環の過程に重要であるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)シグナル伝達系の役割を検討した。PDE吸入モデルマウスにおいて、S1P受容体の機能的アンタゴニストであるFTY720(フィンゴリモド塩酸塩)の投与により、リンパ球、好中球の肺への浸潤が抑制され気管支肺胞洗浄液(BAL)細胞中のIL-17A mRNA発現が低下したが、肺線維化は変化しなかった。次に、SphK1の阻害による影響を同様に検討したが、SphK阻害薬投与による肺線維化抑制は明らかでなかった。

研究成果の概要(英文)：In hypersensitivity pneumonitis, the influx of lymphocytes induce inflammation in the lung. In this study, we used the hypersensitivity pneumonitis mouse model that inhaled PDE (pigeon dropping extracts) and investigated the role of sphingosine 1-phosphate (S1P) signaling. FTY720 (Fingolimod) is a S1P receptor modulator that inhibits lymphocyte emigration from lymphoid organs. The administration of FTY720 inhibited the influx of lymphocytes and neutrophils into the lung, and the mRNA expression of IL-17A in bronchoalveolar lavage cells. But FTY720 did not affect the fibrosis of the lung tissues. Furthermore, the SphK inhibitor did not affect the lung fibrosis induced by PDE inhalations.

研究分野：間質性肺炎

キーワード：過敏性肺炎 スフィンゴシン1-リン酸 フィンゴリモド塩酸塩

### 1. 研究開始当初の背景

過敏性肺炎は、鳥などの動物由来の蛋白・細菌・真菌などの原因抗原の吸入によって、肺で型・型アレルギーが引き起こされる間質性肺炎であり、職場や住居の環境が原因となる。型アレルギーでは、抗原がIgG抗体と免疫複合体を形成し補体の活性化などを通してマクロファージを活性化し、その後の好中球の肺への流入を促す。一方、型アレルギーでは、抗原が吸入された後に、所属リンパ節に存在する感作リンパ球が肺に流入する。実際、過敏性肺炎患者の気管支肺胞洗浄液ではリンパ球増多が見られる。リンパ球の中でもT細胞、特にTh1、Tc1、Th17の肺への集積が肉芽腫などの病変形成に重要とされる。さらに、肺線維化をきたす慢性型の過敏性肺炎になると、血清中 TARC/IP-10 比と肺組織中CCR4/CXCR3比が高くなりTh2のサブタイプも重要となってくる(Thorax 63:810, 2008)。

リンパ組織から肺局所へのT細胞の流入がその後の炎症反応を誘導すると考えられるため、T細胞の流入の機序を明らかにすることは重要である。過敏性肺炎に関与するケモカインとしては、Th1、Tc1の集積に関与するIP-10、Th2に関与するTARCは報告されているが、集積する細胞の種類が病期によっても異なりT細胞集積の機序は未だ不明な点が多い。近年では、過敏性肺炎においてTh17が重要であると報告されている。外科的肺生検の病理組織ではIL-17Rの発現が増加しており(Am J Respir Crit Care Med 173:188, 2006)、マウスモデルの肺組織ではTh1、Th2タイプのサイトカインよりIL-17が優位に増加しており、IL-17Rノックアウトマウスでの病変の軽減も報告されている(J Immunol 182:657, 2009)。以上より、Th17を含むCD4<sup>+</sup>T細胞の肺への集積を制御することが過敏性肺炎の新たな治療法につながる可能性がある。

リンパ球が体内循環する過程において、リンパ球が血中からリンパ組織へ移行する際にはCCR7とそのリガンドが重要であり、反対に、標的臓器へ移動するためにリンパ組織から移出する際には、リン脂質メディエーターであるスフィンゴシン 1-リン酸(sphingosine 1-phosphate: S1P)とその受容体のサブタイプでリンパ球上に表出するS1P<sub>1</sub>受容体の相互作用による遊走が重要である。S1Pは血小板や赤血球が供給源であり血清中に高濃度で存在し、その受容体にはS1P<sub>1</sub>~S1P<sub>5</sub>受容体の5つのサブタイプがありS1P<sub>1</sub>受容体はリンパ球で高発現である。血液中とリンパ組織中のS1Pの濃度勾配によってリンパ球の遊走が誘導されリンパ組織から移出する。

FTY720(フィンゴリモド塩酸塩)はS1P受容体の機能的アンタゴニストであり、リンパ球上のS1P受容体に作用し受容体の内

在化・分解を誘導し発現を抑制するため、リンパ球の遊走能を抑制する。Th17などのリンパ球の中枢神経への浸潤を阻止する作用があるため多発性硬化症の治療薬として承認されている。FTY720の呼吸器疾患に対する効果は、主に気管支喘息の動物モデルで報告があり、抗原曝露やLPS曝露による気道炎症が抑制される(J Clin Invest 116:2935, 2006、Am J Respir Crit Care Med 169:1245, 2004)。

以上をふまえて、FTY720は、過敏性肺炎におけるリンパ球浸潤、特にTh17を含むCD4<sup>+</sup>T細胞の浸潤を抑制することにより、肺間質の炎症、肺線維化の組織所見、さらには肺機能に対しても治療効果を持つ可能性が十分あると考えられた。

### 2. 研究の目的

過敏性肺炎の治療は、抗原からの隔離やステロイド投与であるが、長期経過で慢性化に至ると予後不良である。型アレルギーではリンパ組織から肺へのリンパ球の流入が炎症反応を促進するため、リンパ球流入の機序を明らかにすることは有効な治療法開発につながる。

本研究ではハト糞抽出物(PDE)の吸入による過敏性肺炎のマウスモデルを用いて、リンパ球循環の過程に重要であるスフィンゴシン 1-リン酸(S1P)シグナル伝達系の役割を解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ハト糞抽出物(PDE)の吸入による過敏性肺炎マウスモデルに対して、生理食塩水またはFTY720を投与する。薬剤の作用は、気管支肺胞洗浄液、肺組織中サイトカイン発現、肺病理組織所見、肺線維化スコアによって評価する。

過敏性肺炎マウスモデルの作製には、ハト糞抽出物(PDE)の吸入を用いる。PDE + alum(水酸化アルミニウム + 水酸化マグネシウム)の腹腔内投与をday -5, -3, -1に行い、PDEの気管内投与を週3回、2週間行った。最終PDE投与から48時間後にマウスから気管支肺胞洗浄液、肺組織の採取を行った。PDEのコントロールとしては生理食塩水を用いた。

(1) 気管支肺胞洗浄(BAL): マウスを気管切開しチューブを挿入。生理食塩水0.5mLでの洗浄を3回繰り返す。3回分の総細胞数をカウントし、サイトスピン検体のDiff-Quick染色標本により細胞分画を定量する。残った細胞成分は凍結保存し後にサイトカイン測定に用いる。

(2) 肺組織およびBAL細胞中のサイトカイン測定: BAL細胞成分からの測定以外にも、BALを施行せずにマウスから肺組織を採取。肺組織をRNA laterに入れ4で保存した

後、2-ME を含む RLT バッファー (RNeasy Mini kit) に移しホモジェナイザーで破碎し RNA を RNeasy Mini kit により抽出。BAL 細胞成分および肺組織から RNA を抽出し SuperScript システム (Invitrogen) により逆転写を行い cDNA を作製した。cDNA を用いて real-time PCR を行い、各種サイトカインの mRNA 発現を測定した。測定するサイトカインは IL-4、IL-13、IL-17、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 1 であり、PCR は MJ Opticon Monitor v3.1 analysis software と Mini Opticon (BIO-RAD) を用いた。

(3) 病理組織所見：BAL 後にチューブからホルマリンを注入し 10cmH<sub>2</sub>O の圧でホルマリン固定する。肺の病理組織所見は HE 染色と elastica-Van Gieson 染色を行い観察する。

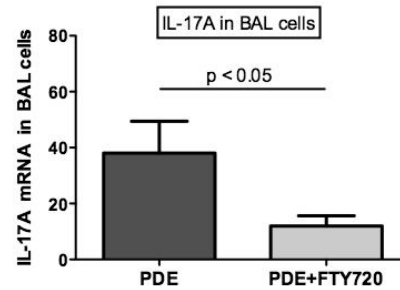
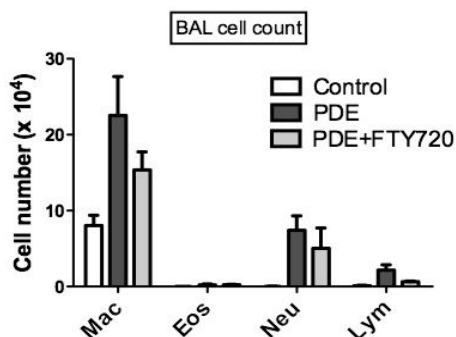
(4) 肺線維化スコア：染色した組織標本を用いて Ashcroft による肺線維化スコアにより半定量を行う。

上記の過敏性肺炎モデルに対して FTY720 の投与を行う。FTY720 の投与量は 100  $\mu$ g/kg とし、生理食塩水に溶解して腹腔内投与を行う。FTY720 投与は毎回 PDE 吸入の 1 時間前に行い、FTY720 の control は同量の生理食塩水とする。気管支肺胞洗浄液、サイトカイン発現量、病理組織所見などの比較を行う。

後半の実験では、SphK 阻害薬 (N,N-Dimethylsphingosine) の投与を行う。SphK 阻害薬の投与量は 5mg/kg とし、DMSO+PBS に溶解して腹腔内投与を行う。SphK 阻害薬の投与は毎回 PDE 吸入の 1 時間前に行い、SphK 阻害薬の control は同量の DMSO+PBS とする。

#### 4. 研究成果

結果は、鳩糞抽出物 (PDE) を吸入させたモデルマウスにおいて、FTY720 の投与によりリンパ球、好中球の肺への浸潤が抑制された。また、S1P 受容体陽性リンパ球、特に Th17 の肺浸潤抑制を反映して、BAL 細胞中の IL-17A mRNA 発現が FTY720 投与群で低下していた。



しかし、病理組織所見における肺線維化については、FTY720 投与による改善は明らかでなかった。

以上の FTY720 を用いた実験結果より、リンパ球上の S1P 受容体である S1P1 をブロックするだけでは肺線維化までは抑制できないと考えられたため、次に、線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージ上などにも発現している他の S1P 受容体サブタイプもターゲットとすることを目的として、S1P 産生の制御を治療標的とし、SphK 阻害薬による肺線維化抑制効果を同様に検討した。結果は、PDE 吸入モデルマウスにおいて SphK 阻害薬投与による肺線維化抑制効果は明らかでなかった。

#### 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 0 件)

〔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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 公威 (TSUCHIYA, Kimitake)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：10579189

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし