

Sphingosine-1-phosphate receptor-2 deficiency leads to inhibition of macrophage proinflammatory activities and atherosclerosis in Apoe-deficient mice

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/30255

表1. S1P受容体の機能

Receptor	Gタンパク質共役	mRNA分布	ノックアウトマウス表現型	細胞レベルでの機能
S1P ₁	Gi	ほとんどの臓器	胎生致死 血管成熟障害 脳発達異常 リンパ球体内移行の異常	化学遊走 (リンパ球、血管内皮細胞、内膜平滑筋など) 細胞増殖・生存 細胞間接着 (内皮)
S1P ₂	G _{12/13}	ほとんどの臓器	てんかん 難聴 前庭性失調 動脈硬化軽減 産仔生存低下	化学反発・遊走抑制 (平滑筋、内皮、マクロファージ、腫瘍細胞など) 細胞増殖抑制 NF- κ Bを介した炎症性遺伝子発現
S1P ₃	G _q G _{12/13} Gi	ほとんどの臓器	敗血症モデルで炎症軽快 血管内皮NO産生低下 S1Pによる昇圧・徐脈の消失	化学遊走 分化
S1P ₄	G _q , G _{12/13} G _s (?)	リンパ系組織 肺	不明	?
S1P ₅	G _q , G _{12/13} G _s	脳、脾臓、皮膚	NK細胞体内移行の異常	化学遊走 細胞生存

てRhoの活性化に共役している。S1P₂はG_{12/13}を介したRho活性化が最も優勢なシグナル経路である^{1,2)}。

S1P合成の律速酵素はスフィンゴシンをリン酸化するスフィンゴシンキナーゼ (SphK) である (図1)。SphKには2つのサブタイプ、SphK1とSphK2が存在するが、この二つの合成酵素の役割分担は十分に明らかとなっていない。SphK1とSphK2の二重KOマウスは血管系や神経系の発生異常により胎生致死であり、胎児組織中のS1Pは検出レベル以下の低値であることから、生体内でS1Pを合成する酵素はSphK1とSphK2のみであり、これら両酵素が発生に必須の役割をはたす^{2,3)}。S1Pは、S1Pリアーゼ (S1P lyase, SPL) による長鎖アルデヒドとホスホエタノールアミンへの分解と、S1P phosphatase (SPP) による脱リン酸化の二つの経路によって分解される。

S1Pは血漿中に約 10^{-7} Mオーダーの濃度で存在し、その多くはアルブミンやhigh-density lipoprotein (HDL)・low-density lipoprotein (LDL) などのリポ蛋白質に結合しており、遊離型S1Pの濃度は10 nM程度と見積もられている。HDL・LDL結合型のS1Pは血液中のS1Pリザーバーとして働いているものと考えられる^{1,2)}。これまでに報告されているHDLやLDLの血管細胞作用の一部はこれらに結合しているS1Pが担っている可能性がある。血漿S1Pの主要な起源は、赤血球と血管内皮であるとの考えが有力である。血清中のS1P濃度は血漿濃度よりも数倍高いが、これは、血小板に豊富に貯蔵されているS1Pが血小板凝集に際して大量に細胞外へ放出されるためと考えられる。

動脈硬化とS1Pシグナル系

粥状動脈硬化は、血管壁の傷害による慢性炎症性病変であり、白血球 (単球/マクロファージ, Tリンパ球など) が内皮細胞に接着後内皮下に浸潤する (図2)⁴⁾。このうち、単球はマクロファージへと分化し、酸化LDLを細胞内に取り込み泡沫細胞となる。炎症細胞、内皮細胞は、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターフェロン (INF- γ)、ケモカイン (MCP-1) などのサイトカインを産生し、単球動員やマクロファージ泡沫化の一層の促進、血管内皮障害ならびに血管平滑筋の内膜への遊走・増殖を引き起こし、粥状動脈硬化が進展する。

S1PやS1P₁アゴニストは、血管内皮細胞のS1P₁を介して白血球の内皮接着 (VCAM-1およびICAM-1の発現抑制) を抑制すること、S1PおよびHDLに結合しているS1Pは内皮の一酸化窒素 (NO) 合成酵素eNOSを活性化することや、S1P₁がマクロファージ炎症活性を抑制することから、S1Pが抗動脈硬化因子である可能性が示唆された。一方、S1P₁の役割については逆の報告もあり、実験成績の一致をみない⁴⁾。インビボでは、動脈硬化モデルマウス (ApoE欠損マウスおよびLDL受容体欠損マウス) において、FTY720の長期投与がリンパ球の減少と粥状動脈硬化抑制を引き起こした。このように、S1P₁、S1P₃が抗動脈硬化作用あるいは逆に催動脈硬化作用を及ぼすのかは判然としていない。また、S1P₂の役割は不明であった。

S1P₂欠損マウスでは、粥状動脈硬化が著名に改善する高コレステロール食を与えたApoE^{-/-}背景 (アポタン

パクapoE欠損によりコレステロール代謝異常を呈する)のS1P₂^{+/+}マウス, S1P₂^{+/-}マウスおよびS1P₂^{-/-}マウスの大動脈粥状動脈硬化病変を比較すると, ホモKOマウスでは70%の抑制, ヘテロKOマウスでは30%の抑制が観察された⁵⁾. S1P₂^{-/-}マウスでは, S1P₂^{+/+}マウスに比較して, 血中コレステロール, 中性脂肪, リポタンパクプロファイルの差異は認められなかった. 粥状動脈硬化病巣のマクロファージ浸潤は低下し, α-平滑筋アクチン(α-SMA)陽性の平滑筋細胞密度は逆に増加していた. S1P₂^{-/-}マウス大動脈における炎症性サイトカインTNF-α, IFN-γ, IL-6, MCP-1のmRNA発現はS1P₂^{+/+}

マウスに比較して低下し, 逆に抗炎症性サイトカインIL-10の発現は亢進していた. 抗動脈硬化作用を及ぼすメディエーター一酸化窒素(nitric oxide, NO)を産生する内皮型NO合成酵素eNOSのタンパク発現量は差が見られなかったが, eNOSのアミノ酸セリン1177(S¹¹⁷⁷, eNOSの活性化をひき起こすリン酸化部位)のリン酸化はS1P₂^{-/-}マウス大動脈で顕著に亢進していた.

粥状動脈硬化病巣ではプラーク内のマクロファージ, α-SMA陽性の平滑筋細胞, プラーク表面の血管内皮がS1P₂を発現していた. そこで, 骨髓移植(BMT)によりキメラマウスを作製し, 骨髓由来細胞(単球/マクロフ

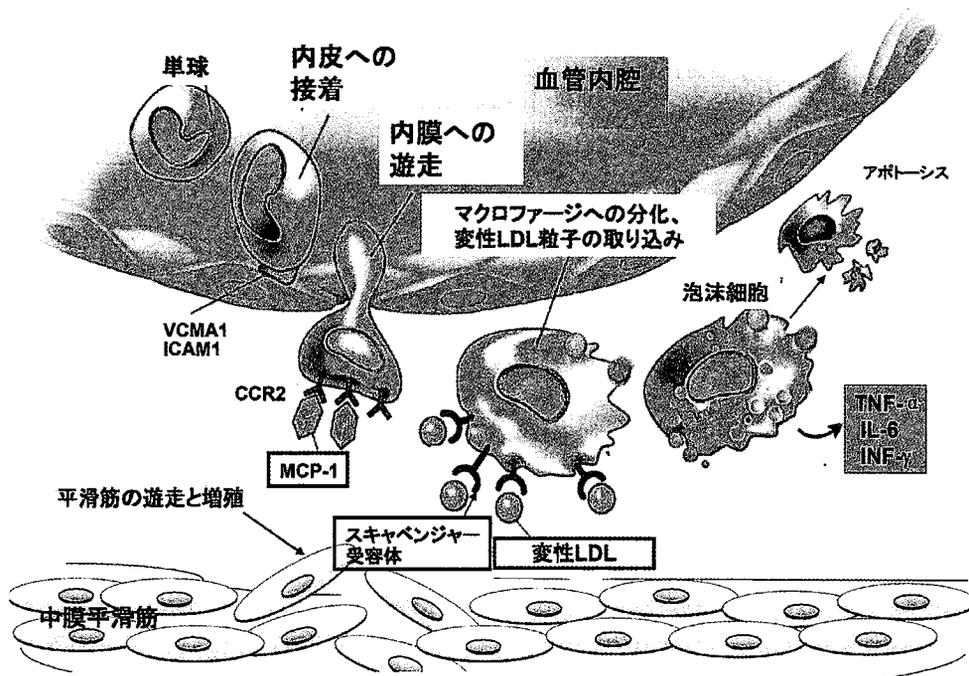


図2. 動脈硬化における単球, マクロファージ, 内皮, 平滑筋の関与

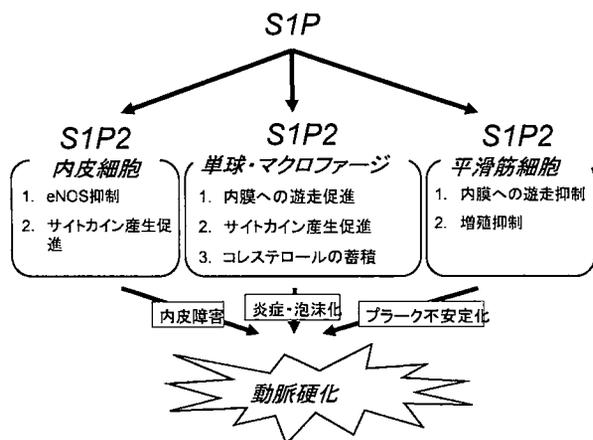


図3. 動脈硬化におけるS1P₂受容体の役割

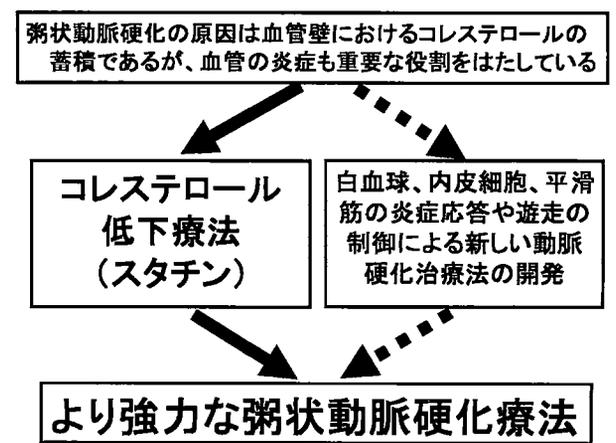


図4. S1P₂を標的とした動脈硬化の治療の可能性

ァージ)に発現しているS1P₂受容体の粥状動脈硬化における関与を検討した。S1P₂^{-/-}マウス骨髄を移植したS1P₂^{+/+}マウス(ApoE^{-/-}背景)では、S1P₂^{+/+}マウス骨髄を移植したS1P₂^{+/+}マウスと比較して、粥状動脈硬化病変面積が約50%低下していた。すなわち、これらの結果から、骨髄由来細胞、単球/マクロファージに発現しているS1P₂が粥状動脈硬化主要な役割をはたしていることが示された。

S1P₂欠損マクロファージの炎症活性、コレステロール取り込みは抑制されている

S1P₂はG_{12/13}に共役してRhoおよびRhoキナーゼを活性化化する。S1P₂^{+/+}マウスから単離したマクロファージでは、S1P刺激によりRhoが活性化されたが、S1P₂^{-/-}マウスマクロファージでは、S1PはRhoを活性化しなかった。これと一致して、S1PはS1P₂^{+/+}マクロファージでは、Rhoキナーゼ基質であるMYPT-1と呼ばれるタンパクをリン酸化した。一方、S1P₂^{-/-}マクロファージでは、このタンパクをリン酸化しなかった。さらに、S1P₂^{+/+}マクロファージでは、S1Pは炎症反応を惹起する中心的な転写因子であるNF-κBをリン酸化(活性化)し、これはS1P₂選択的遮断薬JTE-K1およびRhoキナーゼ阻害薬Y-27632で抑制された。対照的に、S1P₂^{-/-}マウスマクロファージでは、S1PはNF-κBを活性化しなかった。さらに、S1PはS1P₂^{+/+}マクロファージにおいてのみ、炎症性サイトカインのTNF-α mRNA発現を、Rhoキナーゼ、NF-κB依存的に増加させた。また、酸化LDLの取り込み能は、S1P₂^{-/-}マウスマクロファージでかなり低下していた。これと一致して、酸化LDLを取り込むスカベンジャー受容体であるCD36の発現はS1P₂^{-/-}マウスマクロファージではS1P₂^{+/+}マクロファージより低下していた。培養マクロファージでは、CD36の発現は、S1P₂、Rhoキナーゼ、NF-κBに依存していた。その他、S1P₂^{-/-}マクロファージを静脈内投与した後の粥状病巣への集積(ホーミングアッセイ)は低下していた(図3)。

また、S1P₂^{-/-}マウスから単離した肺毛細血管内皮細胞において、S1P₂^{+/+}マウスと比較して、S1PによるRhoキナーゼ、NF-κB活性化が大幅に低下し、マクロファージに対して化学遊走作用をおよぼすケモカインMCP-1の発現が低下していた。さらに、S1P₂^{+/+}内皮とは逆に、S1PはS1P₂^{-/-}内皮においてはeNOSリン酸化を高めた。これは、S1P₂がRhoキナーゼを介してホスファチジルイノシトール3-リン酸の3' 特異的ホスファターゼであるPTENを活性化する結果、eNOSリン酸化酵素Aktを抑制したことによる。S1P₂^{-/-}マウス由来の血管平滑筋の増殖は、S1P₂^{+/+}マウスと比較して亢進していた。

S1P₂^{+/+}マウスにS1P₂選択的遮断薬JTE-K1を長期投与すると、プラーク面積が減少し、マクロファージ密度の低下と平滑筋密度の増加が観察された。また、単離したマクロファージでは酸化LDL取り込みが低下し、コレステロールの排出が亢進していた。

おわりに

以上の実験成績は、S1P₂はS1P₁やS1P₃とは異なり、独自の作用により粥状動脈硬化病変の形成に促進的にはたっていることを明らかにした。S1P₂の作用は、S1P標的細胞の種類と作用機構の両面において多岐にわたる(図3)。主要な標的細胞は、マクロファージであり、Rhoの下流でRhoキナーゼ-NF-κBを介してコレステロール蓄積、サイトカイン産生を高め、泡沫細胞化を促進する。また、Rac抑制を介して単球の内皮下浸潤を促進する。内皮では、NF-κBを介してサイトカイン産生を促進し、Akt抑制を介して抗動脈硬化メディエーターであるNO産生を抑制する。この他、血管平滑筋の増殖および内膜遊走の抑制は、プラークを不安定化させる可能性がある。さらに、本研究では、長期投与により抗動脈硬化作用を示す有望なS1P₂選択的遮断薬を同定した。S1P₂遮断薬は脂質代謝に影響することなく主として炎症抑制により粥状動脈硬化を強力に抑制することから、スタチンとの併用により、顕著な抗動脈硬化作用が期待される(図4)。

謝辞

御指導をいただいた多久和 陽教授、岡本安雄准教授、吉岡和晃助教、多久和典子非常勤講師(石川県立看護大学教授)に心から感謝いたします。また、ともに研究をし、ご協力、励ましをいただいた教室員の皆様や共同研究者に深く感謝いたします。

文献

- 1) Takuwa, Y.: Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1582; 112-120, 2002.
- 2) Takuwa, Y.: Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system. *Biochim. Biophys. Acta*, 1781; 483-488, 2008.
- 3) Takuwa Y, Du W, Qi X, Okamoto Y, Takuwa N, Yoshioka K. Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in angiogenesis. *World J Biol Chem*. 2010; 1: 298-306.
- 4) Okamoto Y, Wang F, Yoshioka K, Takuwa N, Takuwa Y. Sphingosine-1-Phosphate-Specific G Protein-Coupled Receptors as Novel Therapeutic Targets for Atherosclerosis. *Pharmaceuticals* 2011; 4: 117-137.
- 5) Wang, F. et al.: Sphingosine-1-phosphate receptor-2 deficiency leads to inhibition of macrophage proinflammatory activities and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*. 2010; 120; 3979-3995.



Profile

2005年：中国広州市南方医科大学卒業
 2005年：金沢大学医学系研究科博士課程入学
 2010年：金沢大学医学系研究科(循環医学専攻・血管分子生理学(旧第一生理学))修了。博士研究員として引き続き、多久和研究室で研究中。
 趣味：読書、映画鑑賞