

# マクロファージにおけるスフィンゴシン1リン酸2型受容体 (S1P2) は肺線維症を増悪させる

著者	浅野 雄哉, 石丸 和宏, 多久和 陽
著者別表示	Asano Yuya, Ishimaru Kazuhiro, Takuwa Yoh
雑誌名	金沢大学十全医学会雑誌
巻	127
号	2
ページ	53-54
発行年	2018-07
URL	<a href="http://doi.org/10.24517/00052714">http://doi.org/10.24517/00052714</a>



## 【要約】

## 修士課程優秀論文

マクロファージにおけるスフィンゴシン1リン酸2型受容体 (S1P<sub>2</sub>) は肺線維症を増悪させる

## Exacerbation of pulmonary fibrosis in mice with macrophage-specific deletion of sphingosine-1-phosphate receptor 2

金沢大学医薬保健学総合研究科 血管分子生理学  
浅野 雄哉, 石丸 和宏, 多久和 陽

## はじめに

特発性肺線維症は、有効な治療薬のない難治性疾患であり、発症後数年以内に死亡する致死性の疾患である。このため、特発性肺線維症の成因を解明し、発症機構に基づいた新規の治療薬の開発が期待されている。

傷害を受けた組織では、血中より好中球、単球やリンパ球などの炎症性細胞が病変へ遊走する。これらの炎症性の細胞は病変を除去すると共に、組織修復応答としてさまざまなサイトカインや成長因子を放出し線維芽細胞の増殖と筋線維芽細胞への分化を引き起こす。筋線維芽細胞はコラーゲンをはじめとする細胞外基質を産生する。これらの応答が過剰となると、肺線維化を来す。肺線維化においては、上述のごとく肺組織に常在している線維芽細胞の他に、上皮、血管周皮細胞や骨髄細胞由来の線維芽細胞の関与が示唆されている。

肺組織修復過程に関与する骨髄由来細胞や線維芽細胞の細胞遊走や筋線維芽細胞分化に、生理活性脂質スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) の関与が示唆されている。S1Pは生体膜を構成するスフィンゴ脂質の代謝産物であり、細胞膜上に発現しているS1P<sub>1</sub>からS1P<sub>5</sub>までの5種のGタンパク質共役型受容体を介して細胞遊走・分化だけでなく、細胞増殖や血管新生を含む多くの重要なプロセスに関与している<sup>1)</sup>。その中でも、当研究室が同定したS1P<sub>2</sub>は三量体Gタンパク質G<sub>12/13</sub>に共役し、Akt抑制による細胞増殖の抑制、Rac抑制による細胞遊走の抑制、Rho/ROCK経路の活性化による細胞収縮といった独自の作用を有する。例えば肝線維化においては、S1P<sub>2</sub>は肝星状細胞の筋線維芽細胞への分化を促進して肝線維化を増悪させる事を報告した。しかしながら、肺線維症におけるS1P<sub>2</sub>の役割は十分に解明されていない。

最近私たちのグループは、全身性S1P<sub>2</sub>ノックアウトマウスではブレオマイシン投与による肺線維症が改善し、S1P<sub>2</sub>が肺線維症に関与している可能性を見出した<sup>2)</sup>。本研究ではマクロファージ (MΦ) 特異的S1P<sub>2</sub>ノックアウト (S1P<sub>2</sub><sup>flx/flx</sup>; LysM-Cre) マウスを作成し、肺線維症が

S1P<sub>2</sub>遺伝子のMΦ特異的ノックアウトによってどのように影響を受けるかを解析した。

## 結 果

S1P<sub>2</sub><sup>flx/flx</sup>; LysM-Cre マウスにおける肺線維症の増悪

ブレオマイシンを週に2回、4週間腹腔内投与によって生じた肺線維化の程度をS1P<sub>2</sub><sup>flx/flx</sup>; LysM-CreとS1P<sub>2</sub><sup>flx/flx</sup>マウスで比較検討した。ピクロシリウスレッド染色によりコラーゲンを染色したところ、生理食塩水を投与したコントロール群 (S1P<sub>2</sub><sup>flx/flx</sup>; LysM-Cre マウスおよびS1P<sub>2</sub><sup>flx/flx</sup>マウスの両群) では肺の血管および気道の壁にコラーゲンが染色され、肺野にはコラーゲン集積を認めなかった。一方、ブレオマイシン投与群ではS1P<sub>2</sub><sup>flx/flx</sup>; LysM-Creマウス、S1P<sub>2</sub><sup>flx/flx</sup>マウスのいずれにおいても、胸膜直下や血管、気道から周囲の肺野に伸びる末梢肺組織に、コラーゲンが集積した線維化病変が認められた。S1P<sub>2</sub><sup>flx/flx</sup>; LysM-Creマウスの線維化面積はS1P<sub>2</sub><sup>flx/flx</sup>マウスに比較して、有意に増加していた (平均値9.5% (S1P<sub>2</sub><sup>flx/flx</sup>; LysM-Cre) vs 5.5% (S1P<sub>2</sub><sup>flx/flx</sup>)).

肺胞洗浄液 (BALF) の細胞数、細胞分画、タンパクおよびコラーゲン濃度に及ぼすS1P<sub>2</sub>ノックアウトの影響

肺線維化が進行するとBALF中の細胞数や可溶性コラーゲン濃度が増加することが知られている<sup>3)4)</sup>。S1P<sub>2</sub><sup>flx/flx</sup>; LysM-Creマウス、S1P<sub>2</sub><sup>flx/flx</sup>マウスのいずれにおいても、ブレオマイシン投与によりBALFの細胞数やタンパク濃度は増加したが、ブレオマイシンを投与した両群マウス間で総細胞数、細胞の分画、可溶性コラーゲン濃度、総タンパク濃度に差を認めなかった。

## ブレオマイシン投与による老化細胞の出現

細胞老化は慢性炎症への関与が示唆されている<sup>5)</sup>。そこで、ブレオマイシン投与に伴う肺組織の細胞老化を検討した。ブレオマイシン投与により細胞老化マーカーであるサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質2A (p16<sup>INK4A</sup>) 陽性の細胞が出現した。これらp16<sup>INK4A</sup>陽性細胞は、MΦマーカーF4/80陽性であった。興味深いことに、これらの二重陽性細胞は非線維化領域に多く認められ、

線維化領域においてp16<sup>INK4</sup>陽性細胞はほとんど見られなかった。また、別の老化マーカーであるsenescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$  gal) 陽性細胞もプレオマイシン投与により出現し、SA- $\beta$  gal陽性細胞も主に非線維化領域に認められた。

**SIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>; LysM-Cre マウスにおける老化細胞の肥大**

老化した細胞は若い細胞より大きくなるといわれている<sup>6)</sup>。そこで非線維化領域を抽出し、視野当たりのSA- $\beta$  gal陽性細胞数とSA- $\beta$  gal陽性細胞の大きさを比較した。プレオマイシンを投与したSIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>; LysM-CreマウスとSIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>マウスの間で、SA- $\beta$  gal陽性細胞数に有意な差は認められなかった。しかし、SA- $\beta$  gal陽性細胞の大きさはSIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>マウスと比較してSIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>; LysM-Creマウスで有意に増大していた(平均値 149.8  $\mu$ m<sup>2</sup> (SIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>; LysM-Cre) vs 93.6  $\mu$ m<sup>2</sup> (SIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>)。)

**プレオマイシン投与によるSIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>; LysM-Cre マウス肺における肺線維化関連タンパク質発現の増加**

プレオマイシン投与後の肺組織におけるタンパク質発現やタンパク質リン酸化をウエスタンブロット法で解析した。SIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>; LysM-Creマウスの肺組織抽出液では、fibronectinタンパク質が増加していた。また、老化マーカーは、p16<sup>INK4A</sup>の他にサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質1A (p21<sup>WAF1</sup>)、p53の増加も確認できた。強力な線維化誘発因子であるTGF- $\beta$ 作用の指標であるSmad2リン酸化もSIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>; LysM-Creマウスで増加していた。さらに、Aktリン酸化がSIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>; LysM-Creマウスで増加していた。

**考 察**

本研究において、SIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>; LysM-CreマウスではSIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>マウスと比較して肺の線維化が増悪しており、M $\Phi$ のSIP<sub>2</sub>が線維化に抑制的に作用していることが明らかになった。線維化に關与する要因の一つとして、細胞の老化が報告されている。本研究より、老化している細胞はM $\Phi$ であり、老化M $\Phi$ は主として非線維化領域に分布していることが明らかになった。さらに、SIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>;

LysM-CreマウスではSIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>マウスと比較して老化細胞がより大きく、細胞老化がより進行していることが示唆された。

本研究において、SIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>; LysM-Creマウスで、プレオマイシン投与後の肺組織におけるAktリン酸化ならびに、Smad2リン酸化の増加が認められた。SIP<sub>2</sub>はPTEN活性化を介してAktリン酸化を抑制し、この経路を介して細胞生存を抑制する可能性がある<sup>7)</sup>。一方、SIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>; LysM-Creマウスでは、SIP<sub>2</sub>の欠損により肺障害時にAkt活性が増強することで細胞老化が促進し、TGF- $\beta$ の放出が増加するとともにこのM $\Phi$ はアポトーシス抵抗性となり肺線維化を増悪させる可能性が考えられる<sup>8)</sup>。本研究におけるSmad2リン酸化の増加は、TGF- $\beta$ 作用の増強を示唆しており、この可能性と一致している。また、M $\Phi$ 特異的PTENノックアウトマウスではTNF- $\alpha$ やIL-6などの炎症性サイトカインが増加し、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を介して肺線維化が増悪するとの報告<sup>8)</sup>は、Akt経路の活性亢進を介した肺線維化増悪の可能性を示唆する。

今回、プレオマイシン投与マウスのSIP<sub>2</sub>欠損細胞では、Akt活性が増加することで細胞老化が進行しSIP<sub>2</sub><sup>flax/flax</sup>; LysM-Creマウスにおける肥大細胞増加の一因となるとともに、アポトーシス抵抗性を招き線維化が増悪した可能性が考えられる。老化した細胞は細胞老化関連分泌形質(SASP)を介して炎症性関連遺伝子を発現し免疫細胞を呼び寄せる。これにより、細胞老化が線維化増悪につながると考えられる<sup>9)</sup>。

肺線維化に影響するM $\Phi$ 以外の細胞として、線維芽細胞や肺胞上皮細胞が考えられる。SIP<sub>2</sub>はマクロファージ以外の細胞にも発現していることが確認されているため、他のノックアウトマウスを用いた解析を検討している。

**参 考 文 献**

- 1) Takuwa Y. et al. *Biochim Biophys Acta*. 1831, 185-192 (2013).
- 2) Zhao J. et al. *PLOS ONE* In press (2018)
- 3) Geng X. et al. *Physiol Rep*. 4, e12965 (2016)
- 4) Pineiro-Hermida S. et al. *Sci Rep*. 27 (2017)
- 5) Munoz-Espin D. et al. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15, E-28029 (2014)
- 6) Hohn A. et al. *Redox Biol*. 11, 482-501 (2017)
- 7) Du W. et al. *Cancer Res*. 70, 772-781 (2010)
- 8) Larson-Casey J.L. et al. *Immunity*. 44, 582-596 (2016)
- 9) Kral J.B. et al. *Sci Rep*. 6, 23034 (2016)

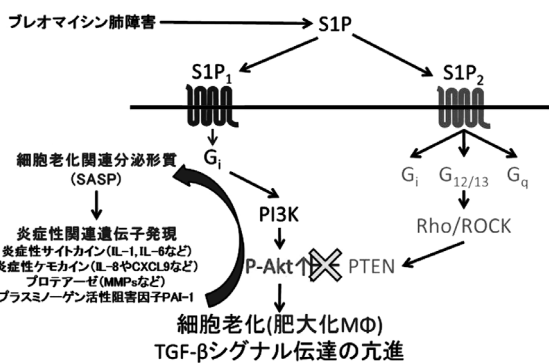


図. SIP<sub>2</sub>ノックアウトによる病態仮説



**Profile**

2016年3月 金沢大学理工学域自然システム学類卒業  
 2018年3月 金沢大学医薬保健学総合研究科医科学専攻修士課程修了