

# 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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/30255">http://hdl.handle.net/2297/30255</a>

## 【総説】

## 第9回 高安賞最優秀賞受賞論文

## 論文 「Sphingosine-1-phosphate receptor-2 deficiency leads to inhibition of macrophage proinflammatory activities and atherosclerosis in ApoE-deficient mice」

Journal of Clinical Investigation誌

第120巻第1号 3979頁～3995頁 2011年11月掲載

王 飛, 岡本安雄, 居軒 功, 吉岡和晃, 杜 娃,  
 戚 勛, 多久和典子, 権太浩一, 山本靖彦, 大川龍之介,  
 西内 巧, 杉本直俊, 矢富 裕, 三森国敏, 浅野雅秀,  
 木下 誠, 多久和陽 共著

## ApoE欠損動脈硬化マウスにおいてスフィンゴシン-1-リン2型受容体遺伝子欠失はマクロファージの炎症活性と動脈硬化を抑制する

王 飛 (わん ふえい)  
 岡本 安雄 (おかもと やすお)  
 多久和 陽 (たくわ よう)

## はじめに

脂質メディエーターであるスフィンゴシ-1-リン酸 (S1P) は, 1990年代初めまでは, 細胞膜に豊富に存在するスフィンゴミエリンやスフィンゴ糖脂質の分解過程で産生される中間代謝産物と考えられていた (図1). 1991年, 線維芽細胞に対するS1Pの増殖作用の発見を契機として, 腫瘍細胞, 神経細胞, 血管平滑筋, 血管内皮細胞をはじめ様々な細胞種に対して, 細胞増殖作用, 細胞運動・形態調節作用, 細胞分化作用など多彩な作用を有することが明らかにされた<sup>1)</sup>. 当初, S1Pのこれらの生物活性は細胞内作用による可能性が示唆されたが, 1998年以降, S1Pに対する5種の特異的Gタンパク共役型受容体S1P<sub>1</sub>~5が同定された (表1). このうち, S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub>は全身のほとんどすべての臓器・組織に広範に発現しており, 細胞内情報伝達経路も詳しく解析されている主要な受容体である. 遺伝子改変マウスの解析などによりこれまでに明らかになっているS1Pの生理機能, 病態生理機能を, 表1にまとめる. これまでに集積した知見は, S1Pシグナル系が生体では主に白血球・炎症細胞の動員・活性調節, 血管機能 (血管新生, 血管バリア機能, 内皮健全性) の調節, 発生 (神経系, 心血管系など) に関わっていることを明らかにした<sup>2)</sup>. 5種のS1P受容体サブタイプの存在, 受容体の複数のシグナル経路への共役,

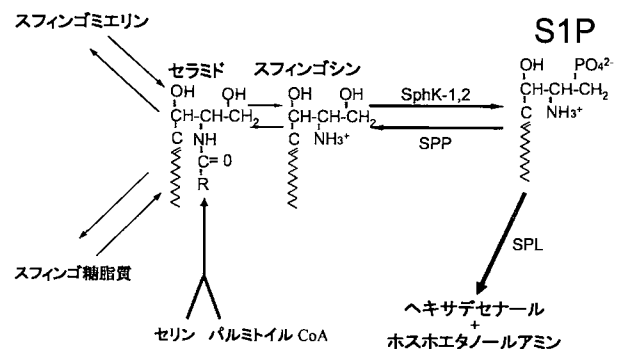


図1. S1Pの合成・分解系. 略号は本文を参照.

ならびに一つの細胞における複数の受容体の共存がS1Pシグナル系に多様性を与えている. S1P受容体のシグナル伝達経路は各受容体サブタイプ間で部分的に共通しているものの, サブタイプごとに独自のシグナル伝達経路を活性化する (表1). 各S1P受容体サブタイプによって活性化されるシグナル伝達経路を筆者らの検討を中心にまとめると, S1P<sub>1</sub>はGiを介して, PI3-キナーゼ-Akt/Rac, Ras-ERK (extracellular signal-regulated kinase) 両経路の活性化, ホスホリパーゼC (PLC) の活性化, アデニール酸シクラーゼの抑制に共役している. S1P<sub>3</sub>は, S1P<sub>1</sub>と同様にGiを介してRas-ERK, Rac活性化に共役するほかに, Gqを介してPLCの活性化に, G12/13を介し

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 <sub>1</sub>	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 <sub>2</sub>	G <sub>12/13</sub>	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- $\kappa$ Bを介した炎症性遺伝子発現
S1P <sub>3</sub>	G <sub>q</sub> G <sub>12/13</sub> 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 <sub>4</sub>	G <sub>q</sub> , G <sub>12/13</sub> G <sub>s</sub> (?)	リンパ系組織 肺	不明	?
S1P <sub>5</sub>	G <sub>q</sub> , G <sub>12/13</sub> G <sub>s</sub>	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。S1P<sub>2</sub>はG<sub>12/13</sub>を介したRho活性化が最も優勢なシグナル経路である<sup>1,2)</sup>。

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<sup>2,3)</sup>。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<sup>1,2)</sup>。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)<sup>4)</sup>。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- $\alpha$ )、インターフェロン (INF- $\gamma$ )、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S1P<sub>1</sub>アゴニストは、血管内皮細胞のS1P<sub>1</sub>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、S1P<sub>1</sub>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、S1P<sub>1</sub>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<sup>4)</sup>。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、S1P<sub>1</sub>、S1P<sub>3</sub>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、S1P<sub>2</sub>の役割は不明であった。

S1P<sub>2</sub>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<sup>-/-</sup>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S1P<sub>2</sub><sup>+/+</sup>マウス, S1P<sub>2</sub><sup>+/-</sup>マウスおよびS1P<sub>2</sub><sup>-/-</sup>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<sup>5)</sup>. S1P<sub>2</sub><sup>-/-</sup>マウスでは, S1P<sub>2</sub><sup>+/+</sup>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. S1P<sub>2</sub><sup>-/-</sup>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S1P<sub>2</sub><sup>+/+</sup>

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(S<sup>1177</sup>, eNOSの活性化をひき起こすリン酸化部位)のリン酸化はS1P<sub>2</sub><sup>-/-</sup>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S1P<sub>2</sub>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

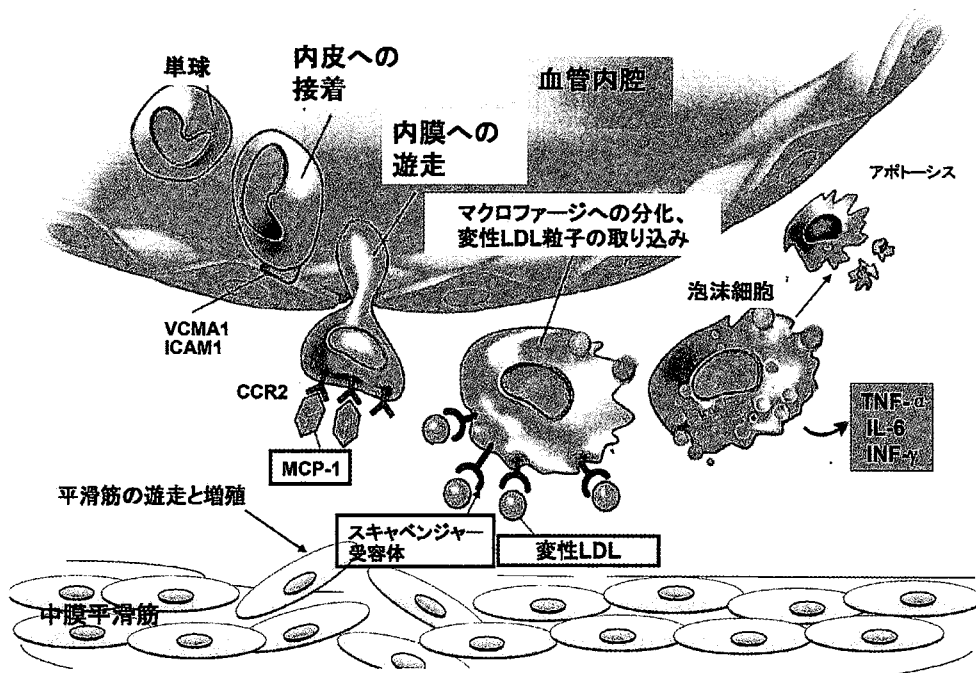


図2. 動脈硬化における単球, マクロファージ, 内皮, 平滑筋の関与

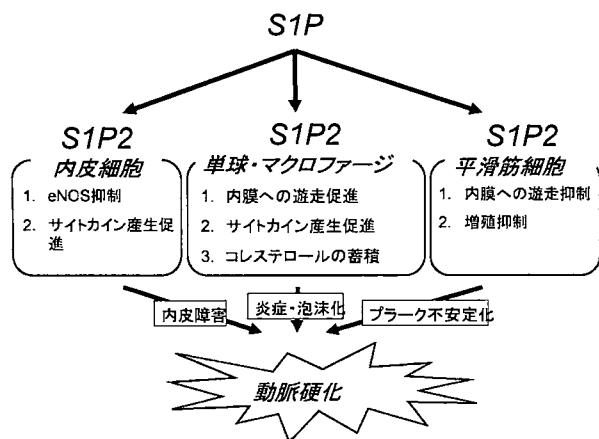


図3. 動脈硬化におけるS1P<sub>2</sub>受容体の役割

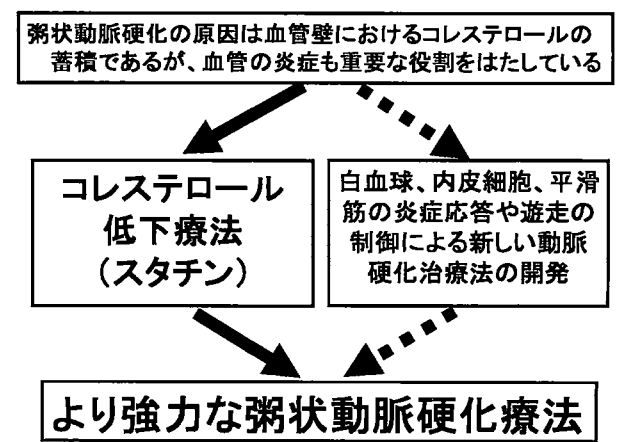


図4. S1P<sub>2</sub>を標的とした動脈硬化の治療の可能性

ァージ)に発現しているS1P<sub>2</sub>受容体の粥状動脈硬化における関与を検討した。S1P<sub>2</sub><sup>-/-</sup>マウス骨髄を移植したS1P<sub>2</sub><sup>+/+</sup>マウス(ApoE<sup>-/-</sup>背景)では、S1P<sub>2</sub><sup>+/+</sup>マウス骨髄を移植したS1P<sub>2</sub><sup>+/+</sup>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S1P<sub>2</sub>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。

S1P<sub>2</sub>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

S1P<sub>2</sub>はG<sub>12/13</sub>に共役してRhoおよびRhoキナーゼを活性化化する。S1P<sub>2</sub><sup>+/+</sup>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、S1P<sub>2</sub><sup>-/-</sup>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S1P<sub>2</sub><sup>+/+</sup>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、S1P<sub>2</sub><sup>-/-</sup>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、S1P<sub>2</sub><sup>+/+</sup>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S1P<sub>2</sub>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、S1P<sub>2</sub><sup>-/-</sup>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S1P<sub>2</sub><sup>+/+</sup>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、S1P<sub>2</sub><sup>-/-</sup>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S1P<sub>2</sub><sup>-/-</sup>マウスマクロファージではS1P<sub>2</sub><sup>+/+</sup>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、S1P<sub>2</sub>、Rhoキナーゼ、NF-κBに依存していた。その他、S1P<sub>2</sub><sup>-/-</sup>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、S1P<sub>2</sub><sup>-/-</sup>マウスから単離した肺毛細血管内皮細胞において、S1P<sub>2</sub><sup>+/+</sup>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、S1P<sub>2</sub><sup>+/+</sup>内皮とは逆に、S1PはS1P<sub>2</sub><sup>-/-</sup>内皮においてはeNOSリン酸化を高めた。これは、S1P<sub>2</sub>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。S1P<sub>2</sub><sup>-/-</sup>マウス由来の血管平滑筋の増殖は、S1P<sub>2</sub><sup>+/+</sup>マウスと比較して亢進していた。

S1P<sub>2</sub><sup>+/+</sup>マウスにS1P<sub>2</sub>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、S1P<sub>2</sub>はS1P<sub>1</sub>やS1P<sub>3</sub>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。S1P<sub>2</sub>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S1P<sub>2</sub>選択的遮断薬を同定した。S1P<sub>2</sub>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