

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590284

研究課題名（和文） 抗動脈硬化薬標的分子としてのスフィンゴシン-1-リン酸受容体の発生活工学的研究

研究課題名（英文） Research of developmental engineering of the sphingosine-1-phosphate receptor as a target molecules of antiatherosclerotic drug

研究代表者

岡本 安雄（OKAMOTO YASUO）

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：80293877

研究成果の概要（和文）：リゾ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（S1P）は、2型受容体（S1P2）を介して動脈硬化を促進した。また、S1P産生酵素である SphK1 も動脈硬化に対して促進的に作用した。これらの結果は、SphK1 により産生された S1P が S1P2 受容体を介して動脈硬化に対して促進的に作用することが考えられ、S1P シグナル伝達系が粥状動脈硬化の新たな治療標的となる可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：The lysophospholipid mediator sphingosine-1-phosphate (S1P) exerts a facilitative effect on atherosclerosis via S1P2 receptor. In addition, S1P-synthesizing enzyme SphK1 also has a proatherosclerotic effect. These observations suggest the possibility that the lipid mediator S1P signaling could be potential novel therapeutic targets for atherosclerosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：脂質生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：スフィンゴシン-1-リン酸，動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は、血管壁の傷害による慢性炎症性変化であると考えられており、実際に動脈硬化病変の形成には種々の炎症細胞や血小板が関与し、これらの細胞から分泌される様々なサイトカイン、ケモカイン、増殖因子、生理活性脂質などによる血管内皮細胞・血管平滑筋細胞・単球/マクロファージの相互活性化が動脈硬化病変形成に重要な役割を果たす。このうち、生理活性脂質メディエータ

ーであるスフィンゴシン-1-リン酸（S1P）の動脈硬化病変形成における役割は近年注目を集めているが、その全容はいまだ未解明の点が多い。

S1P は血漿中に存在し、また局所において様々な細胞から分泌されてパラクリン様式で作用することが示唆されており、主として S1P1, S1P2, S1P3 の3種のG蛋白質共役型受容体を介して情報伝達が行われ、免疫、炎症、癌の増殖・転移や血管新生などに密接に関連

することが明らかになってきた。S1P は活性化した血小板から放出されることから、動脈硬化病変近傍ではS1Pが高濃度であることが予測されている。また、S1P受容体が血管内皮細胞（主にS1P1とS1P3）、血管平滑筋細胞（主にS1P2とS1P3）、動脈硬化病巣に集積している泡沫細胞の前駆細胞である単球・マクロファージ（両者で異なるS1P受容体発現パターンを示す）に発現していることから、S1Pが動脈硬化に何らかの役割をはたしている可能性が考えられる。申請者らはこれまでに血管狭窄部由来の内膜平滑筋細胞ではS1PがS1P1受容体を介して血小板由来成長因子の産生を促進して動脈硬化を増悪させる可能性があること、一方、反対に中膜由来血管平滑筋細胞の遊走をS1PがS1P2受容体を介して抑制することから、動脈硬化病変の内膜肥厚を抑制する可能性も示した。つまり、S1Pは動脈硬化病変形成において、促進・抑制の二方向性の作用を及ぼしている可能性が示唆された。このように、S1Pが催動脈硬化因子あるいは逆に抗動脈硬化因子であるかについてはこれまでの報告は必ずしも一致を見ず、いぜん不明の点が多い。特に、動物個体レベルでの知見は乏しく、S1Pの動脈硬化に果たす役割は十分に理解されていない。また、前述したように、動脈硬化に関与する血管内皮細胞・血管平滑筋細胞・単球・マクロファージ/泡沫細胞はそれぞれ複数種類のS1P受容体を発現しているが、どの細胞に発現するどの受容体サブタイプが主として動脈硬化発症に関わるかについても不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、粥状動脈硬化の病態生理におけるS1P受容体の役割を解明し、その基礎的研究成果をS1P受容体を標的とした粥状動脈硬化の新規な治療法開発に応用することを目指した。

3. 研究の方法

S1P情報伝達系を構成する種々の主要分子、すなわちS1P受容体、S1P合成酵素の遺伝子改変マウスを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) スフィンゴシン1-リン酸2型 (S1P2) 受容体ノックアウト (KO) マウスは野生型マウスに比べ動脈硬化の程度が低いこと (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2011, 31:81) が報告された。申請者も同様の結果、すなわちS1P2-KOマウス (ApoE遺伝子欠損:

高コレステロール食を負荷) において、大動脈の粥状硬化巣面積減少、マクロファージ浸潤低下が観察された。野生型マウスおよびS1P2-KOマウスから腹腔マクロファージを調製し、マクロファージにおける変性LDLの取込みをDiIで蛍光標識したアセチルLDLを用いて検討した結果、野生型マクロファージと比較してS1P2-KOマクロファージでアセチルLDLの取込みの低下が認められた。以上の結果から、S1P2-KOマウスで観察される動脈硬化抑制にマクロファージの変性LDLの取込み低下が関与すると考えられた。

(2) S1P2受容体阻害薬JTE013の投与が動脈硬化を抑制すること (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2011, 31:81) が報告されたことから、マウスにJTE013を経口投与した際の薬物動態を検討した。8週齢のマウスにJTE013を25 mg/kg経口投与後、15分から12時間後に採血し、血中のJTE013濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。投与後45分で最も血中濃度が高くなり、血中薬物の消失に4時間を有した。今後、以上の結果をもとに、JTE013の動脈硬化に対する効果を中型動物である動脈硬化ウサギを用いて検討したいと考えている。

(3) S1Pは主にS1P1, S1P2, S1P3受容体を介して作用するが、S1P受容体サブタイプにおける動脈硬化に対する作用は、当初より複雑になってきた。そこで、これらの複数の受容体に作用するS1Pの産生酵素であるスフィンゴシンキナーゼ1 (SphK1) の動脈硬化に対する作用を解析する必要があると考え、動脈硬化モデルマウスApoE-KOマウスとSphK1トランスジェニック (SphK1-Tg) マウスおよびSphK1ノックアウト (SphK1-KO) マウスを交配させ、作出したマウスを用いてSphK1の動脈硬化に及ぼす効果について検討した。

①ApoE-KOマウスとSphK1-Tgマウスを交配させ、作出したマウスを用いて高コレステロール食負荷で誘発される動脈硬化巣におけるSphK1の過剰発現の効果について検討した。作出したマウスに16週間高コレステロール食負荷後、大動脈の動脈硬化巣をoil Red O染色で評価したところ、ApoE-KO/SphK1-TgマウスではApoE-KOマウスと比較して、大動脈の動脈硬化巣面積が増加した。

②ApoE-KOマウスとSphK1-KOマウスを交配させ、作出したマウスを用いて高コレステロール食負荷で誘発される動脈硬化巣におけるSphK1の遺伝子欠失の効果について検討した。作出したマウスに16週間高コレステロール食負荷後、大動脈の動脈硬化巣をoil Red O染色で評価したところ、ApoE-KO/SphK1-KOマ

ウスではApoE-K0マウスと比較して、大動脈の動脈硬化巣面積が減少した。

③ ApoE-K0/SphK1-Tg マウスおよびApoE-K0/SphK1-K0マウスから腹腔マクロファージを調製し、マクロファージにおける変性LDLの取込みをDiIで蛍光標識したアセチルLDLを用いて検討した結果、ApoE-K0マクロファージと比較してApoE-K0/SphK1-TgおよびApoE-K0/SphK1-K0マクロファージでアセチルLDLの取込みには差が認められなかった。以上の結果から、S1P産生酵素であるSphK1は動脈硬化に対して促進的に作用すると考えられた。

本研究結果から、SphK1により産生されたS1PがS1P2受容体を介して動脈硬化に対して促進的に作用することが考えられ、S1Pシグナル伝達系が粥状動脈硬化の新たな治療標的となる可能性を示唆した。

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 20 件)

- ① Biswas K, Yoshioka K, Asanuma K, Okamoto Y, Takuwa N, Sasaki T, Takuwa Y. Essential role of class II PI3K-C2 α in sphingosine-1-phosphate receptor-1 mediated signaling and migration in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 査読有, 288(4):2325-2339, 2013, doi:10.1074/jbc.M112.409656
- ② Yoshioka K, Yoshida K, Cui H, Wakayama T, Takuwa N, Okamoto Y, Du W, Qi X, Asanuma K, Sugihara K, Aki S, Miyazawa H, Biswas K, Nagakura C, Ueno M, Iseki S, Schwartz JR, Okamoto H, Sasaki T, Matsui O, Asano M, Adams HR, Takakura N, Takuwa Y. Essential role of endothelial class II PI3K-C2 α in angiogenesis and vascular barrier function. *Nature med.* 査読有, 18(10): 1560-1569, 2012, doi:10.1038/nm.2928
- ③ Takagi T, Okamoto Y, Tomita S, Sato A, Yamaguchi S, Takuwa Y, Watanabe G. Intraradial administration of fasudil inhibits augmented Rho kinase activity to effectively dilate spastic radial artery in coronary artery bypass grafting surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 査読有, 142(2):e59-65. 2011, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2011.01.055>
- 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*, 査読有, 4, 117-137, 2011, doi:10.3390/ph4010117
- ⑤ 岡本安雄, 吉岡和晃, 多久和典子, 多久和陽, スフィンゴシン-1-リン酸シグナル伝達系の新血管系における機能, *生化学*, 査読有, 83 巻 6 号, 536-544, 2011, <http://www.jbsoc.or.jp/event/magazine/pdf/83-06-10.pdf>
- ⑥ Seok YM, Azam MA, Okamoto Y, Sato A, Yoshioka K, Maeda M, Kim IK, Takuwa Y. Enhanced Ca²⁺-Dependent Activation of PI3K class II α isoform-Rho Axis in Blood Vessels of Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 56(5):934-941. 2010, 査読有, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.160853
- ⑦ Qi X, Okamoto Y, Murakawa T, Wang F, Oyama O, Ohkawa R, Yoshioka K, Du W, Sugimoto N, Yatomi Y, Takuwa N, Takuwa Y. Sustained delivery of sphingosine-1-phosphate using poly(lactic-co-glycolic acid)-based microparticles stimulates Akt/ERK-eNOS mediated angiogenesis and vascular maturation restoring blood flow in ischemic limbs of mice. *Eur J Pharmacol*; 634 (1-3) : 121-131. 2010, 査読有, doi/10.1016/j.ejphar.2010.02.038
- ⑧ Du W, Takuwa N, Yoshioka K, Okamoto Y, Gonda K, Sugihara K, Fukamizu A, Asano M, Takuwa Y. S1P2, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, negatively regulates tumor angiogenesis and tumor growth in vivo in mice. *Cancer Res.* 査読有, 70(2):772-781. 2010 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2722
- ⑨ Takuwa N, Ohkura S, Takashima S, Ohtani K, Okamoto Y, Tanaka T, Hirano K, Usui S, Wang F, Du W, Yoshioka K, Banno Y, Sasaki M, Ichi I, Okamura M, Sugimoto N, Mizugishi K, Nakanuma Y, Ishii I, Takamura M, Kaneko S, Kojo S, Satouchi K, Mitumori K, Chun J, Takuwa

Y, S1P3-mediated cardiac fibrosis in sphingosine kinase 1 transgenic mice involves reactive oxygen species. *Cardiovasc Res.* 査読有, 85(3):484-493. 2010 doi: 10.1093/cvr/cvp312

[学会発表] (計 35 件)

- ① 崔弘, 岡本安雄, 吉岡和晃, 杜娃, 多久和典子, 張威, Kuntal Biswas, 安藝翔, 趙娟娟, 九田裕一, 浅野雅秀, 芝本利重, 多久和陽, スフィンゴシン 1-リン酸特異的 2 型受容体は内皮型一酸化窒素合成酵素を抑制することによりアナフィラキシーショックに対して保護的に働く, 第 90 回日本生理学会, 2013 年 3 月 27 日, タワーホール船堀 (東京都)
- ② Yasuo Okamoto, Xun Qi, Wa Du, Noriko Takuwa, kazuaki Yoshioka, Yoh Takuwa
Function role of sphingosine-1-phosphate signaling in angiogenesis. The 1st Asia-Pacific Vascular Biology Meeting and 第 19 回日本血管生物医学会学術集会, 2011 年 12 月 9 日, 東京ステーションコンファレンス (東京都) シンポジウム, 招待講演
- ③ 戚 勛, 岡本安雄, 吉岡和晃, 王飛, 崔弘, Biswas Kuntal, 安藝翔, Dandar Erdembileg, 多久和典子, 多久和陽, ポリ乳酸-グリコール酸共重合体を基材としたスフィンゴシン-1-リン酸徐放微粒子製剤による持続性放出はマウス虚血肢において Akt/ERK-eNOS を介して血管新生および血管成熟を促進し血流を回復させる, 日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム, 2011 年 5 月 26 日, 石川県立音楽堂 (石川県金沢市)
- ④ 岡本安雄, 石英美, アザムモハマドアリ, 佐藤篤志, 吉岡和晃, 王飛, 崔弘, 多久和典子, 多久和陽, 自然発症高血圧ラットにおける血管の Ca²⁺依存性 PI3K2 α -Rho 経路の役割, 第 87 回日本生理学会大会, 2010 年 5 月 21 日, 盛岡市民文化ホール・いわて県民情報交流センター (岩手県盛岡市), シンポジウム, 招待講演

[図書] (計 3 件)

- ① 岡本安雄, 脂質メディエーター, 朝倉書店, 日本血管生物医学会編, 血管生物医学事典, 2011 年, 420 頁-421 頁

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 血管内皮関門障害に関連した疾患又は症状を予防及び/又は治療するための候補物質のスクリーニング方法

発明者: 多久和陽, 岡本安雄

権利者: 多久和陽, 岡本安雄

種類: 特許

番号: 特願 2013-033893

出願年月日: 2013 年 2 月 22 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://physiology1.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 安雄 (OKAMOTO YASUO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号: 80293877