

論文内容の要旨

論文提出者氏名 村上 憲

論文題目

Knock out of S1P3 receptor signaling attenuates inflammation and fibrosis in bleomycin-induced lung injury mice model.

論文内容の要旨

肺線維症は、治療抵抗性の予後不良な疾患である。肺が障害されることにより炎症細胞の増加、サイトカインの放出そして最終的に線維芽細胞の活動の増加が起きる。そして、肺実質のリモデリングにより最終的に、肺線維症に至る。様々なサイトカインと成長因子がこれらの反応に関与しているが、TGF- β やCTGFが肺線維症の病因で最も重要な役割を果たすことが知られている。

スフィンゴシトリン酸 (S1P) は、5種類のG蛋白質共役受容体 (S1P1-5) を介して、細胞増殖、分化、遊走、血管形成を含む多くの重要な細胞プロセスに関連する生理活性物質である。好中球においてS1P1、S1P4、S1P4は健康人と肺炎患者両方で発現しているのに対し、S1P3は肺炎患者の好中球のみで発現しているなどS1P3レセプターが肺の炎症や線維化と関わることを示唆する報告がいくつか存在するが、肺疾患におけるS1P3の役割の解明は未だ不十分である。我々は、S1P3レセプター・シグナリングの役割を解明するために、S1P3 KOマウスを用いてプレオマイシン誘導された肺線維症モデルを作成し分析した。

7~10週齢のS1P3ノックアウトマウス (S1P3KO) (n=5~8) とC57BL/6J野生型マウス (WT) (n=5~9) に対し、プレオマイシン塩酸塩溶液30 μ L (2.15U/kg) の経気管支投与を行った。対照群マウスには、同量の生理食塩水の経気管支投与を行った。プレオマイシン投与後7日目に各群マウスの気管支腔洗浄液 (BALF) を採取した。また、投与後7日、28日目の各群マウスの肺を採取し、肺組織のパラフィン切片を作成した。採取したパラフィン切片に対し、H&E染色、マッソン・トリクローム染色を行い、肺の炎症、線維化を比較した。また採取したBALFを分析し、S1P3KO・WT両群のBALF中の細胞数、細胞分画、サイトカイン・ケモカイン濃度、コラーゲンレベル、S1P濃度を比較した。

WTマウス9匹、S1P3KOマウス8匹に対し、プレオマイシン投与後の体重変化を週2回18日目まで測定した。結果は、WTと比較してS1P3KOマウスの体重減少の割合が有意に少なかった。プレオマイシン投与後7日目の肺組織では、軽度の線維化を伴った炎症細胞浸潤を認め、S1P3KOマウスの肺組織ではWTと比較して炎症の程度が軽度であった。また、プレオマイシン投与後28日目の肺組織では、WTで線維化が著明であったのに対し、S1P3KOマウスでは線維化軽度であった (WT : n=5, KO:n=5)。プレオマイシン投与後7日目の肺切片の肺の線維化を表すスコアであるAshcroft scoreは、WTとS1P3KOで有意な差は認めなかったが、投与後28日目では、WTに対し、S1P3KOでは有意に低値であった。プレオマイシン投与後7日目のBALF中の線維細胞数は、WTに対し、S1P3KOでは有意に少なかった (WT : n=5, KO:n=5)。しかし、細胞分画で両群に差はなかった。BALF中のコラーゲンレベルは、プレオマイシン投与後7日目、28日目ともにWTと比較して、S1P3KOマウスでは低値であった (WT : n=5, KO:n=5)。特に投与後28日目において、その差は顕著であった。ELISA分析によるプレオマイシン投与後7日目のBALF中のMCP-1濃度、TGF- β 濃度では、WTマウスとS1P3KOマウスで有意な差を認めなかったが、CTGF濃度に関しては、WTと比較してS1P3KOでは有意に低値であった (WT : n=5, KO:n=5)。生食投与を行った群に関しては、BALF

中の細胞数以外は、WTとS1P3KOで差を認めない、もしくは両群ともに感度以下であった (WT : n=3, KO : n=3)

この研究において、我々はS1P3の欠損がプレオマイシン誘導肺線維症モデルの肺の炎症と線維化の病因に重大な影響を及ぼすことを証明した。肺臓においてS1P3の炎症誘発性の役割を示唆する報告がいくつかあり、我々の結果とも一致している。一方で、S1Pが肺臓において抗炎症性の働きをするという報告もあるが、これらの報告は、S1Pの肺の炎症に対する役割は、S1Pの濃度や病気の時期、S1Pレセプターのサブタイプなどに依存することを示唆している。S1PにS1P3を介した単球マクロファージの活性化があり、*in vitro*で、骨髄由来のS1P3欠損マクロファージにおいてLPS刺激に対しMCP-1産生の低下を認めたとの報告があるが、我々の結果では、S1P3KOマウスのBALF中のマクロファージ数は低下しているにもかかわらず、MCP-1濃度は減少を認めなかった。この違いは、MCP-1がマクロファージ以外にも上皮、内皮など複数の供給源があることで説明できると考える。そして、我々の研究のような条件下ではマクロファージはMCP-1濃度あまり影響を及ぼさない可能性が考えられる。

プレオマイシンモデルやIPF患者でSphK1の発現が亢進している、プレオマイシンモデルにおいてSphK阻害薬を投与すると死亡率や線維化が改善される、IPF患者でBALF・血清中のS1Pレベルが上昇しているなど、IPFとSphK/S1Pとの関連が報告されている。このようなS1Pシグナリングが肺の線維化を促進と関係しているという報告が多数ある。しかし、その機序は完全には分かっていない。病態生理や病期、S1Pの濃度やレセプターのサブタイプなどに依存している可能性がある。我々の結果では、S1P3レセプターのノックアウトの有無に関わらず、BALF中のS1P濃度がプレオマイシン投与前と投与後7日目で変わらないかった。今までの報告と我々の結果の違いについては、SphKの産生量の違いやサンプル源の違い (全肺組織や血清とBALF)、病気の時期の違いにより説明できると考える。肺線維症の程度とBALF中のCTGF濃度は、WTとS1P3KOマウスのS1Pレベルの違いではなくS1P3の発現に依存していることを我々の結果は示している。

TGF- β は線維化の病因に関して主要な役割を果たすことが知られている。CTGFも重要な線維化促進誘導因子である。CTGFがTGF- β の下流の伝達物質であることは知られているが、CTGFがTGF- β から独立して線維化に影響を与えることを示唆する報告がいくつか存在する。我々は、線維化を軽減したS1P3KOマウスにおいて、TGF- β 濃度は減少せず、CTGF濃度のみが減少していることをBALF分析で示した。

S1PとTGF- β シグナリングが相互に干渉していることを示す研究がいくつか存在する。これらの報告は、S1Pレセプターが線維化における重要な役割を果たすことを示している。そして、我々の結果は、S1P3シグナリングがCTGF発現を介していることを示した。他方で、smad2/3シグナリングを起動させるTGF- β とは対照的に、S1PがS1P2とS1P3を介したsmad非依存性の経路によって、ヒトの肺線維芽細胞から派生した筋線維芽細胞からの細胞外マトリックス (ECM) 合成を調整しているという報告がある。これは、S1PがECM合成を誘導するためにPI3K/AktとERK1/2つのシグナリングを起動させること示しており、S1P3-CTGFの経路のもう一つのメカニズムの存在を示唆している。

我々は、本研究において、プレオマイシン誘導肺線維症モデルの炎症と線維化におけるS1P3シグナリングの重要性を示した。そして、本研究は、S1P3シグナリングがCTGF発現を介して肺線維症の発症を引き起こすことを示唆している。この経路阻害阻害剤などの肺疾患の治療ターゲットとなりうるかと考えるが、これらの疾患におけるS1P3の役割について説明するには更なる研究が必要である。