

令和元年6月17日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K08140

研究課題名(和文)皮膚アレルギーの病態をコントロールするスフィンゴ脂質の役割に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research on the role of sphingolipid controlling the pathogenesis of skin allergy.

研究代表者

山下 匡 (YAMASHITA, TADASHI)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：30220338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴ脂質の中のGM3合成酵素(GM3S)遺伝子を欠損したGM3S欠損(GM3S-KO)マウスにおいて、アレルギー性皮膚炎が促進された。その原因を探索した結果、骨髄細胞から分化誘導した成熟肥満細胞の超微細構造の変化として、GM3S-KO肥満細胞では細胞内顆粒の細胞膜への偏在を見出した。一方、肥満細胞におけるGM3の役割に着目した場合、細胞膜に存在するGM3は、肥満細胞の脱顆粒を抑制的に制御すること、また、欠損により過剰なアレルギー反応を惹起していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガングリオシドは、スフィンゴ糖脂質の中で特にシアル酸を含有する分子であり、細胞の情報伝達に關与する細胞膜脂質ラフトを構成するとともに、炎症において重要な役割を果たすことが報告されています。本研究課題では、皮膚アレルギーの増悪因子としてのガングリオシドの關連を明らかにした。一方、当該分子種を外部から効果的に投与することができれば、新たな治療方法の提示に繋がるものと考えられる。さらに、本実験の派生形として、ガングリオシド以外のスフィンゴ脂質についても検討を加えており、疾病に關わる資質の役割の一端を明らかにできたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Allergic dermatitis was promoted in GM3S deficient (GM3S-KO) mice that lacked the GM3 synthetase (GM3S) gene in sphingolipids derivatives. One of the possible reasons that GM3S-KO mast cells presented uneven distribution of intracellular granules to the cell membrane as a change in the ultrastructure of mature mast cells induced to differentiate from bone marrow cells. On the other hand, when focusing on the role of GM3 in mast cells, it is revealed that GM3 present in the cell membrane suppresses mast cell degranulation and that it caused an excess allergic reaction by deficiency.

研究分野：糖鎖生化学

キーワード：ガングリオシド 遺伝子改変動物 アレルギー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

現在、全国民の約 30%がアレルギー疾患に罹患している。とくに、アトピー性皮膚炎など皮膚アレルギーは、幼児期から成人期まですべての年齢層で問題となっている。これまでの研究により、皮膚のバリア機能と免疫系がアレルギー病態の発症機構に関与すると考えられているが、その詳細な病態の解明には至っていない。

ganglioside は細胞膜を構成する脂質であり、シグナル伝達の足場となるラフトの形成を担っており、細胞間の情報伝達や免疫機構に関与していると考えられている。予備的検討により、C57BL/6 野生型 (WT) マウスと ganglioside GM3 合成酵素欠損 (GM3S-KO) マウス背部にコナヒョウダニ由来アレルギー軟膏を塗布し、アレルギー性皮膚炎を経時的に評価したところ、GM3S-KO マウスにおいてより重度の皮膚炎症状が観察された。さらに皮膚組織においては、皮膚組織の肥厚、肥満細胞及び好中球の浸潤も観察された。これらの知見は、皮膚に存在する GM3 がアレルギー耐性に関与することを強く示唆している。一方、GM3 による免疫担当細胞への役割を中心とするアレルギー抑制機構は未だ十分には明らかとなっていない。

申請者の研究グループは、細胞膜構成成分であるスフィンゴ糖脂質 ganglioside に着目し研究を遂行している。これまでの研究では、インスリンレセプターの選択的リン酸化の亢進 (*PNAS*. 2003, 100(6): 3445-9.)、炎症像を伴わない神経細胞死 (*PNAS*. 2005, 102(8): 2725-30.)、高次機能の異常 (*BBRC*. 2011, 406(4): 524-8.) 等、スフィンゴミエリンでは、マイクロドメインの変調 (*JBC*. 2011, 268(32): 28544-55.)、アテローム性動脈硬化症の軽減 (*Circ Res*. 2009, 105(3): 295-303.) 等を報告している。

2. 研究の目的

現在までのアレルギー研究により、アレルギー病態には皮膚バリア機能と免疫機能による制御が報告されている。本研究は、GM3S-KO マウスの皮膚バリア機能と免疫機能に着目し、皮膚アレルギー病態における GM3 の役割をとおり、皮膚炎発症に関わる複数の要因を分子レベル、細胞レベルで明らかにし、ターゲットを決めた発症予防法や治療法の確立が目的である。

3. 研究の方法

使用マウス：スフィンゴ脂質欠損マウス (GM3S-KO)

- ① 骨髄移植後、アレルギー軟膏を塗布し、発症および組織学・生化学的に解析。
- ② アレルギー誘発後の皮膚透過性と炎症に関わるシグナル解析。
- ③ マクロファージ、T/B 細胞、肥満細胞を用いた炎症反応への応答性の解析。
- ④ 質量分析によるアレルギー関連脂質分子の同定、それら分子を用いた培養細胞および *in vivo* におけるアレルギー抑制効果の検証

4. 研究成果

GM3S-KO 骨髄キメラマウスを作製しアレルギー軟膏を塗布によりアレルギーを誘導した結果、肥満細胞の機能にその原因が起因することを明らかにした。GM3S-KO 骨髄由来肥満細胞では、無刺激状態であっても β -ヘキソサミニダーゼの放出率が常に更新している結果が得られた。一方、IgE 刺激やイオノフォアによる刺激に対しては、野生型骨髄由来肥満細胞同様の反応が観察された。また、骨髄由来肥満細胞の形態は、野生型で顆粒が均一に細胞内に分布しているのに対し GM3S-KO では、細胞質の辺縁に偏在している像が観察された

さらに肥満細胞の解析においては、KO マウスのそれにおいて機能亢進と刺激による反応性の上

昇が観察された。皮膚バリアに関するGM3Sの機能に関して、他の疾患モデルにおいては、脂質成分が皮膚バリア機能に影響を及ぼす結果が得られたが、当該モデルにおいては、それほど顕著な差が観察されなかった。一方、GM3S-K0骨髄細胞における分子シグナル解析では、K0マウスより採取した骨髄細胞から肥満細胞に分化誘導した細胞において、エキソサイトーシスの亢進が観察され、さらに、各種免疫系細胞の解析を行った結果、肥満細胞の細胞膜の完全性が低下し、細胞内へのカルシウム流入が増加することが明らかとなった。GM3S-K0マウスにおける脂質解析と脂質ミセルによる実験的アレルギー治療に関して、脂質解析は先行実験として終了している。治療に関しては、各種脂質を供給する企業を共同研究者として今後進めて行く。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 2016 年 第 89 回日本生化学会
- ② 2017 年 第 90 回日本生化学会
- ③ 2018 年 第 91 回日本生化学会
- ④ 2018 年 第 161 回日本獣医学会

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：永根大幹

ローマ字氏名：ナガネ マサキ

所属研究機関名：麻布大学

部局名：獣医学部

職名：講師

研究者番号（8 桁）：10772064

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。