

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570145

研究課題名(和文)スフィンゴ脂質欠損マウスを用いた免疫系に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Basic studies of immunological function using sphingolipid-deficient mice

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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴ糖脂質 flox マウスを用い、T細胞特異的に遺伝子を欠損させた。未成熟期のT細胞では、スフィンゴ糖脂質発現の減少がわずかであったが、末梢血中のT細胞のスフィンゴ脂質はほぼ完全に消滅した。先行実験として、GM3を欠損したマウスにおけるリウマチの発症に関する研究の結果と比較した場合、GM3の一分子欠損とトータルのスフィンゴ糖脂質欠損では、発症時期および発症頻度に大きな差は観察されなかった。一方、大腸炎発症と増悪におけるスフィンゴ脂質の関与が示唆される結果が得られた。細胞内セラミドの存在量とセラミドを基質として合成されるスフィンゴ脂質の存在費率によるものであると示唆された。

研究成果の概要(英文)：T cell specific deletion using gene deficient mice of sphingolipids demonstrated the complete loss of them in peripheral blood stream. Previous studies demonstrated that GM3 knockout mice showed rheumatism become early onset and aggravated. The total deletion of sphingolipids and GM3, one molecule of sphingolipids showed little difference. On the other hand, a remarkable difference was observed in the colitis model mice. This suggests that amount of ceramide and ceramide-derivatives in cytoplasm participate colitis resistant phenotype of sphingolipids-deficient mice.

研究分野：生物学

キーワード：スフィンゴ脂質 遺伝子改変動物 モデルマウス

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ糖脂質は、脊椎動物の組織・細胞に広く発現して、外界からの病原微生物やその毒素、構成成分に対する受容体として、あるいは細胞間相互作用における認識分子として機能すると考えられてきた。一方、申請者が樹立した糖鎖欠損マウス群の解析結果より、生体における恒常性破綻が、様々な組織病変と病態を惹起することが示唆された。関節リウマチ誘導モデルにおいて、CD4<sup>+</sup>細胞のサイトカイン分泌量および、そのエフェクター細胞の反応性の違いに起因すると考えられる発症時期の早期化とその炎症症状の重篤化の知見を得た。これによりスフィンゴ糖脂質と炎症の関係を明らかにすること、さらに、炎症反応を介した細胞内シグナル伝達や免疫反応における役割を解明することが望まれる。

2. 研究の目的

免疫系におけるスフィンゴ脂質の多様な機能を解析し、その役割を明らかにする。

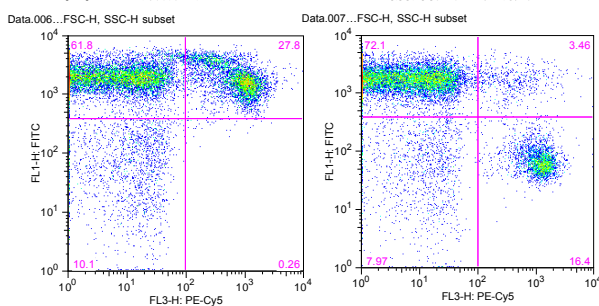
3. 研究の方法

代表研究者が米国 NIH で作製したノックアウトマウス等を用い、フィンゴ糖脂質を欠損させたT細胞の特徴を明らかにすることを主眼として研究を遂行する。免疫関連疾患モデルマウスを作製し、これらの病態に関して解析する。

4. 研究成果

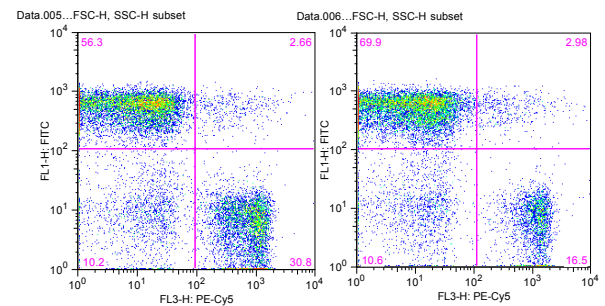
(1) *Ugcg* (胚性致死) の flox マウスと神経特異的 Cre マウスや II 型コラーゲン特異的 Cre マウスを掛け合わせることで組織特異的コンディショナルマウスを作成した。これと同じ手法で Lck-Cre マウスを用い、T細胞特異的にスフィンゴ糖脂質を欠損させたマウスを作製した(図1)。その結果、末梢における成熟T細胞では、完全にスフィンゴ糖脂質を欠損させることができた(図2)。また、同時にT細胞数の減少を見いだした。

図1 成熟T細胞はスフィンゴ糖脂質が欠損する



X軸: T細胞 (CD3) Y軸: スフィンゴ糖脂質 (CT)  
左: *Ugcg*<sup>flox/flox</sup> 右: *Ugcg*<sup>-/-</sup>

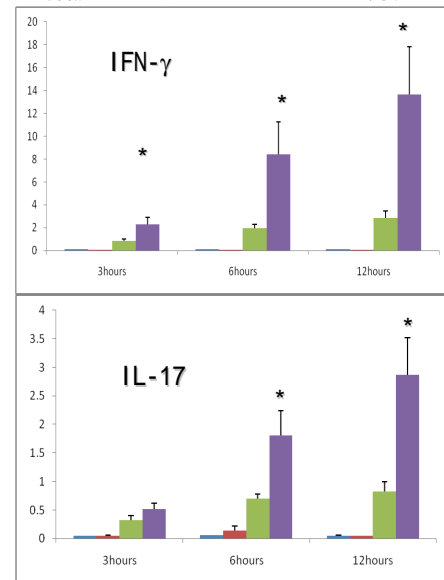
図2 スフィンゴ糖脂質が欠損するとT細胞は減少する



X軸: T細胞 (CD3) Y軸: B細胞 (B220)  
左: *Ugcg*<sup>flox/flox</sup> 右: *Ugcg*<sup>-/-</sup>

(2) 関節リウマチ誘導モデルにおいて、CD4<sup>+</sup>細胞のサイトカイン分泌量に差異が観察された。図は、関節リウマチの発症と重篤度において重要とされるCD4<sup>+</sup>細胞が産生するサイトカインを示した(図3)。いずれにサイトカインにおいても、スフィンゴ脂質ノックアウトマウスにおける発現量の上昇が観察された。

図3 CD4<sup>+</sup>細胞におけるサイトカイン分泌量



■ WT PMA/Ionomycin- ■ KO PMA/Ionomycin-  
■ WT PMA/Ionomycin+ ■ KO PMA/Ionomycin+

(3) 各ノックアウトマウスから骨髓細胞を採取し、肥満細胞への増殖・分化さらにヒスタミン分泌に差異があるかを調べた。その結果、骨髓細胞の増殖率に関しては、GM3ノックアウトマウス由来骨髓細胞では高く、GD3、GalNAc-Tノックアウトマウス由来骨髓細胞では低い傾向が観察された。また、増殖停止後、肥満細胞への分化に関しては、前例と逆の傾向が観察された。これら詳細は現在解析中である。

(4) デキストラン硫酸ナトリウム投与における誘導性大腸炎モデルにおいて、セラミド蓄積との関連が示唆される先行研究の結果が得られた。GM3、GD3、GalNAc-TおよびSMS-2各ノックアウトマウスを用い当該モデルにおける発症とその重篤度を分析した。初期実験の結果、GalNAc-Tにおいて発症の早期化と重篤である結果が得られた。今後、デキストラン硫酸ナトリウムの至適投与濃度の決定と大腸炎モデルに続く発癌モデルの作製とその解析を計画中である。

(5) コナヒョウヒダニ由来アレルゲンを塗布することで誘発できるアトピー性皮膚炎モデルマウスを作製した。スフィンゴミエリンを欠損したマウスを用いた場合、早期の発症と7日目において重症化が観察された。さらに長期観察した結果、寛解が観察された。今後、組織学的解析および発症時のサイトカイン等の発現等詳細に解析する予定である。

#### 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12件)

Sasazawa F, Onodera T, Yamashita T, Seito N, Tsukuda Y, Fujitani N, Shinohara Y, Iwasaki N. (2014) Depletion of gangliosides enhances cartilage degradation in mice. *Osteoarthritis Cartilage*. 22(2): 313-22. 査読有

Lee. H., Lee. JK., Bae. YC., Yang. SH., Okino. N., Schuchman. EH., Yamashita. T., Bae. JS., Jin. HK. (2014) Inhibition of GM3 synthase attenuates neuropathology of niemann-pick disease type C by affecting sphingolipid metabolism. *Mol Cells*. 37(2):161-171. 査読有

Koo, TB., Han, MS., Yamashita, T., Seong, WJ., Choi. JY. (2013) Differential expression of the metastasis suppressor KAI1 in

decidual cells and trophoblast giant cells at the feto-maternal interface. *BMB Rep*. 46(10):507-512. 査読有

Yoon JH, Jung SM, Park SH, Kato M, Yamashita T, Lee IK, Sudo K, Nakae S, Han JS, Kim OH, Oh BC, Sumida T, Kuroda M, Ju JH, Jung KC, Park SH, Kim DK, Mamura M. (2013) Activin receptor-like kinase5 inhibition suppresses mouse melanoma by ubiquitin degradation of Smad4, thereby derepressing eomesodermin in cytotoxic T lymphocytes. *EMBO Mol Med*. 2013 5(11): 1720-39. 査読有

Niimi, K., Nishioka, C., Miyamoto, T., Takahashi, E., Miyoshi I., Itakura, C., Yamashita, T. (2013) Improvement of spontaneous alternation behavior deficit by activation of  $\alpha 4 \beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor signaling in the ganglioside GM3-deficient mice. *Biomed Res*. 34(4): 189-195. 査読有

Nagahori, N., Yamashita, T., Amano, M., Nishimura, S. (2013) Effect of ganglioside GM3 synthase gene knockout on the glycoprotein N-glycan profile of mouse embryonic fibroblast. *Chembiochem*. 14(1):73-82. 査読有

Yokoyama, M., Takegawa, Y., Yamashita, T. (2012) Establishment of an analytical method for sialyl glycoprotein extraction from the experimental hormone-induced estrous cycle of the mouse ovary. *J. Glycom. Lipidom*. S4-001. 査読有

Nagahori, N., Uchida, M., Kinjo, M. and Yamashita T. (2012) Use of carbohydrate-conjugated nanoparticles for an integrated approach to functional imaging of glycans and understanding of their molecular mechanisms. Curr. Pharmaceutical Biotech. 13(14): 2612-2616. 査読有

Yamashita, T. (2012) Recent Advances in the Study of Glycosphingolipids. Curr. Pharmaceutical Biotech. 13 (14): 2663-2668. 査読有

Nagafuku, M., Okuyama, K., Onimaru, Y., Suzuki, A., Odagiri, Y., Yamashita, T., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Takayanagi, M., Ohno, I., Inokuchi, J. (2012)\_CD4 and CD8 T cells require different membrane gangliosides for activation. PNAS. 109(6):E336-42. 査読有

Seito, N., Yamashita, T., Tsukuda, Y., Matsui, Y., Urita, A., Onodera, T., Mizutani, T., Haga, H., Fujitani, Y., Shinohara, Y., Minami, A., Iwasaki, N. (2012) Interruption of glycosphingolipid synthesis enhances osteoarthritis development. Arthritis Rheum. 2012 64(8):2579-88. 査読有

Tsukuda, Y., Iwasaki, N., Seito, N., Nakayama, M., Fujitani, Y., Shinohara, Y., Kasahara, Y., Onodera, T., Suzuki, K., Asano, T., Minami, A., Yamashita, T. (2012) Ganglioside GM3 has an essential role in the pathogenesis and progression of

rheumatoid arthritis. PLoS One. 7(6):e40136. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

山下匡 免疫反応から見たスフィンゴ糖脂質の役割は、生体にとってプラスにもマイナスにも働く第 9 回 バイオオプティクス研究会 2012, Dec, 7-8.

山下匡, 丸野慎也, 濱中すみ子, 平林義雄 スフィンゴミエリン合成酵素 2 ノックアウトマウスの毛及び皮膚の脂質に関する研究 第 10 回 バイオオプティクス研究会 2013, Dec, 6-7.

Tadashi Yamashita. Ganglioside GM3 has an essential role in the pathogenesis and progression of rheumatoid arthritis. Korean Society of Molecular and Cellular Biology Division of Lipid Biologys Symposuim. Pusan National University, 2014. 2. 7.

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

s  
名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

山下 匡 (Yamashita Tadashi)  
麻布大学・獣医学部獣医学科・教授  
研究者番号：30220338

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：