

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390276

研究課題名（和文） リピッドラフト制御による新たな免疫抑制剤の開発

研究課題名（英文） Development of the new immuno-suppressant based on the regulation of lipid rafts.

研究代表者

梅原 久範（UMEHARA HISANORI）

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70247881

研究成果の概要：T細胞活性化に重要なリピッドラフトについて細胞膜スフィンゴミエリンに着目して解析した。スフィンゴミエリン欠質T細胞では、有意にT細胞レセプター刺戟による細胞活性化およびそのシグナル伝達が低下していた。全身性エリテマトーデス患者ではT細胞上のリピッドラフト発現が有意に亢進しており、リピッドラフト制御による新たな免疫抑制剤が治療に有効である可能性が明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000円	4,290,000円	18,590,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：膠原病学

1. 研究開始当初の背景

近年の免疫学において、細胞活性化機構における細胞膜マイクロドメイン（リピッドラフト）の存在が脚光を浴びている。細胞膜には不飽和型脂肪酸で構成される領域とスフィンゴミエリンなどの飽和型脂肪酸とコレステロールから構成される領域が存在する。後者がリピッドラフトであり、その細胞膜内面にはチロシンキナーゼや small G 蛋白, LAT などのアダプター蛋白が特異的に局在している。細胞活性化や細胞間接着において、細胞膜上に散在していたリピッドラフトは凝集し大きなクラスターを形成する。さらに、

この凝集ラフトの中に T 細胞レセプターや Fas などの刺激分子が移行しシグナル伝達の足場を形成する。このように、リピッドラフトは細胞活性化や増殖機構の本質に関わり、その制御は膠原病などの自己免疫疾患の原因を是正すると確信される。当研究課題では、T細胞活性化に重要なリピッドラフトについてラフト形成の中心的構成脂質であるスフィンゴミエリンに着目して解析し、自己免疫疾患とくに全身性エリテマトーデスのリンパ球機能異常をリピッドラフトの面から明らかにし、細胞膜リピッドラフトを制御しうる新規免疫抑制剤の開発に結びつく新し

いアプローチを試みる。

2. 研究の目的

我々はスフィンゴミエリン合成酵素 (SMS1) の遺伝子同定に世界に先駆け成功した (Yamaoka, J. B. C. 279: 18688-18693, 2004). SMS1 欠損細胞株に, SMS1 遺伝子を導入した機能回復細胞株を樹立し, Fas 依存性アポトーシスにおける細胞膜スフィンゴミエリンの本質的な重要性を明らかにし得た. 細胞膜スフィンゴミエリンはリピッドラフト凝集と Fas の重合および細胞死シグナルに必須である FADD とカスパーゼ 8 との複合体 (DISC) 形成に必須であることを証明した. さらに, これまで不明であったリピッドラフトの凝集メカニズムが, 細胞膜スフィンゴミエリンのセラミドへの変換に基づくことを証明した. この成果は, Journal of Experimental Medicine 誌に高く評価された (Miyaji et al., *J. Exp. Medicine*, 202: 249-259, 2005.).

今回, 我々は, T 細胞活性化機構におけるリピッドラフトの重要性を明らかにする目的で, スフィンゴミエリン合成酵素 (SMS1) の si-RNA を遺伝子導入し, スフィンゴミエリンノックダウン細胞の樹立を行う. この細胞における T 細胞増殖能, 接着能, T 細胞レセプター凝集能, T 細胞活性化シグナルの変化を正常細胞と比較検討し, T 細胞活性化におけるリピッドラフトの重要性を明らかにする.

また我々は, ヒト末梢リンパ球では活性化に応じてメモリーマーカーである CD45 の発現とリピッドラフトの発現が増強することを確認した. さらに, 30 数例の全身性エリテマトーデス (SLE) 患者末梢リンパ球のラフト発現を解析した結果, T 細胞とくに CD4/CD45 陽性メモリー T 細胞におけるラフト発現が SLE の病勢に比例し増強していることを確認している. 今回の研究結果は, リピッドラフトを介した T 細胞活性化機構を解明すると同時に, SLE の免疫異常をリピッドラフトの面から明らかにし, 細胞膜リピッドラフトおよびスフィンゴミエリンを制御する免疫抑制剤の開発に寄与するものと確信する.

3. 研究の方法

(1) スフィンゴミエリン欠失細胞株の樹立 (金, 岡崎)

- ① Jurkat 細胞にスフィンゴミエリン合成酵素遺伝子 SMS1-siRNA を遺伝子導入する.
- ② Genetecin 存在下に培養を行い, スフィンゴミエリン欠損 Jurkat 細胞株を樹立する.
- ③ 樹立された細胞株を限界希釈法でクローニングを行う.
- ④ 得られた細胞株におけるスフィンゴミエリン発現を Lysenin で, Ganglioside GM1 発

現を cholera toxin で, CD3 の発現を抗 CD3mAb で FACS 解析する (現有, 金沢医科大学).

⑤ 細胞膜および細胞内スフィンゴミエリン合成酵素活性およびセラミド産生量を酵素抗体法および酵素活性測定法で行う (マルチタイプ測定装置, 平成 19 年度購入予定),

(2) 細胞膜ラフトの confocal microscopy による解析 (正木, 福島)

① 細胞膜でのスフィンゴミエリンの存在を明らかにするために, スフィンゴミエリンに特異的に結合する MBP 結合 Lysenin と PE 標識抗 MBP 抗体を用いて染色し, confocal microscopy により解析する.

② さらに, ラフト構成における ganglioside GM1 と cholesterol の存在を明らかにするために, FITC 標識 cholera toxin B および FITC 標識 cholesterol-PEG で染色し, confocal microscopy により解析する.

(3) 抗 CD3 架橋刺激による T 細胞レセプターおよびリピッドラフトの凝集を confocal microscopy により解析する (正木, 福島).

① 上記細胞を CD3 抗体により細胞を染色する.

② 2 次抗体を用いて CD3 架橋刺激を 30 分加える.

③ CD3 架橋刺激による TCR の凝集を PE 標識抗 TCR 抗体で, ラフト凝集を FITC 標識 cholera toxin B で, スフィンゴミエリン凝集を MBP 結合 Lysenin と PE 標識抗 MBP 抗体を用いて, confocal microscopy により解析する.

(4) 細胞膜ラフトの sucrose gradient による解析 (田中, 金)

① 上記細胞を CD3 抗体により細胞を染色する.

② 2 次抗体を用いて CD3 架橋刺激を 30 分加える.

③ 1% 濃度の Triton X にて両細胞を可溶化し, 20000G で 16 時間 sucrose gradient で分離する.

④ 分離分画における, Ganglioside GM1 量, Lck 量, LAT 量, tublin 量を western blotting 法で比較定量する.

⑤ 刺激前後における TCR 量の変化をスフィンゴミエリン欠失細胞および親株細胞と比較検討する.

(5) 細胞膜および細胞内のスフィンゴミエリン, セラミド量の測定 (岡崎)

① 両細胞を L-[14C]serine で標識し, 細胞を可溶化後, 細胞膜スフィンゴミエリン量およびセラミド量を TLC で展開分離し, 両細胞における含量を測定する.

② 抗 CD3 架橋刺激前後における細胞膜スフィンゴミエリンおよびセラミド量の変化

を比較検討する。

(6) T細胞活性化における細胞膜スフィンゴリエリンおよびリピッドラフトの関与。
(梅原, 金)

①両細胞を抗 CD3 抗体で刺激培養し, 活性化マーカーである CD25, CD69, CD45RO の発現を FACS 解析する (現有, 金沢医科大学)。

②両細胞を抗 CD3 抗体で刺激培養し, 産生される IFN- γ 量を ELISA 法で測定する。

(7) 全身性エリテマトーデス患者リンパ球のラフト発現の解析 (梅原, 福島, 正木)

①正常者および全身性エリテマトーデス患者よりヘパリン採血を行い, フィコール比重遠心法により末梢リンパ球を分離する。

②上記を FITC-cholera toxin, PE-CD45RO, APC-CD4 で 3 重染色し, 各リンパ球サブセットにおけるリピッドラフト発現を FACS 解析する。

③末梢リンパ球の PHA+IL-2 刺激培養において, リピッドラフトの発現変化を検討する。

④SLE 患者の各病型, 検査値, SLEDAI などと, リンパ球サブセットおよびリピッドラフト発現強度との関連を検討する。

4. 研究成果

(1) スフィンゴリエリン欠失細胞株細胞株における Fas 誘導 apoptosis の解析:

スフィンゴリエリン欠質細胞およびコントロール細胞を抗 Fas 抗体 (CH11) で刺激し, apoptosis を sub G1 法で FACS で解析し, 両細胞における apoptosis の差異を明らかにした。Fas 架橋刺激による, DISC 形成の検出, Caspase 活性の測定, ミトコンドリア膜電位の測定を行なったところ, スフィンゴリエリン欠質細胞ではそれら全てが低下していた。

(2) 細胞膜 lipid raft の confocal microscopy による解析:

スフィンゴリエリン欠失細胞株における lipid raft の形態および機能を明らかにした。細胞膜でのスフィンゴリエリンの局在を明らかにするために, スフィンゴリエリンに特異的に結合する MBP 結合 lysenin と PE 標識抗 MBP 抗体を用いて染色した。Fas 架橋刺激による Cluster 形成を FITC-, PE-標識 Fas 抗体で検出し, ラフト構成における ganglioside GM1 とスフィンゴリエリンおよび Fas の動態を明らかにした。スフィンゴリエリン欠失細胞株では, Fas の凝集が有意に抑制されていた。

(3) Fas 誘導シグナルの差異の検討:

Fas 架橋刺激に伴う, FADD, Caspase-8 と Fas との結合を western blotting および免疫沈降法を用いて検討した。リピッドラフトを sucrose gradient 法により分画し,

ganglioside GM1 量とスフィンゴリエリン量を比較検討した。Fas 刺激に伴う FADD や Caspase などのシグナル伝達物質の lipid raft への移行を検討した。スフィンゴリエリン欠失細胞では, Fas 刺激による caspase-8, caspase-3 活性が抑制されていた。また, Fas に会合する FADD, Caspase-8 量も低下していた。その結果 Fas によるアポトーシスがスフィンゴリエリン欠失細胞では障害されていることが明らかになった。

(4) スフィンゴリエリン欠失 T 細胞株の樹立とその解析:

SMS1-siRNA を Jurkat T 細胞に遺伝子導入し, スフィンゴリエリン (SM) 欠質細胞株 (SM-kd) およびコントロール細胞 (SM+) を樹立した。FACS 解析および共焦点顕微鏡で, SM-kd 細胞では, 細胞膜 SM 発現が欠質していることを確認した。また, SM に結合するライセニンに抵抗性を示した。

(5) T 細胞機能における細胞膜 SM の役割: SM-kd および SM+細胞を CD3 抗体で架橋刺激を加え細胞増殖を検討したところ, SM-kd 細胞で著明に低下していた。これは, CD3/TCR のクラスター形成が障害されているためであることを共焦点顕微鏡を用いて証明した。

(6) CD3 / TCR 架橋刺激によるシグナル経路の解析:

SM-kd および SM+細胞を CD3 抗体で架橋刺激を加えたところ, SM-kd 細胞では LAT, ZAP70 等のチロシンリン酸化が著明に低下しており, LAT と ZAP70 の会合も減少していた。

(7) シグナル伝達物質のリピッドラフト内への移行:

CD3 / TCR 架橋刺激による TCR, ZAP70, PKC のシグナル密度勾配で分離したラフト分画への移行は, SM-kd 細胞で著明に低下していた。

以上の結果より, リピッドラフトの機能をその中心的脂質であるスフィンゴリエリンの合成阻害により検討した。その結果, リピッドラフトは, Fas 誘導アポトーシスにおいても, T 細胞レセプター刺激による活性化においても, 細胞膜レセプターの効率よい凝集を誘導し, 細胞内に効率よいシグナルを伝達することに重要であることが明らかとなった。

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 7 件)

1. Jin, Z.-X., C.-R. Huang, S. Goda, L. Dong, T.

Kawanami, T. Sawaki, T. Sakai, X.-P. Tong, Y. Masaki, T. Fukushima, M. Tanaka, T. Mimori, H. Tojo, E. T. Bloom, T. Okazaki, and H. Umehara. Impaired TCR signaling through dysfunction of lipid rafts in sphingomyelin synthase 1 (SMS1)-knock down T cells. *Int. Immunology*. 査読有 20: 1427-1437, 2008.

2. Fukushima, T., L. Dong, T. Sakai, T. Sawaki, M. Tanaka, Y. Masaki, M. Kuwana, Y. Hirose, and H. Umehara. Successful treatment of amegakaryocytic thrombocytopenia with rituximab in a patient with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 査読有 17:210-214, 2008

3. Masaki, Y., L. Dong, N. Kurose, K. Kitagawa, Y. Morikawa, M. Yamamoto, H. Takahashi, Y. Shinomura, K. Imai, T. Saeki, A. Azumi, S. Nakata, E. Sugiyama, S. Matsui, T. Origuchi, S. Nishiyama, I. Nishimori, T. Nojima, K. Yamada, M. Kawano, Y. Zen, M. Kaneko, K. Miyazaki, K. Tsubota, K. Tomoda, T. Sawaki, T. Kawanami, M. Tanaka, T. Fukushima, S. Sugai, and H. Umehara. Proposal for a new clinical entity, IgG4-positive multi-organ lymphoproliferative syndrome (IgG4+MOLPS): Analysis of 64 cases of IgG4-related disorders including Mikulicz's disease and autoimmune pancreatitis. *Ann. Rheum. Dis.* 査読有 Aug.13. [Epub ahead of print] 2008

4. Dong, L., Y. Masaki, T. Takegami, Z.-X. Jin, C.-R. Huang, T. Fukushima, T. Sawaki, T. Kawanami, T. Saeki, K. Kitagawa, S. Sugai, T. Okazaki, Y. Hirose, and H. Umehara. Clonality analysis of lymphoproliferative disorders in lymphocytes infiltration from patients with Sjögren's syndrome (SS) *Clin. Exp. Immunol.* 査読有 150: 279-284, 2007.

5. Dong, L., Y. Masaki, T. Takegami, T. Kawanami, I. Kunihiro, Z.-X. Jin, C.-R. Huang, X.-P. Tong, T. Fukushima, M. Tanaka, T. Sawaki, T. Sakai, S. Sugai, T. Okazaki, Y. Hirose, and H. Umehara. Cloning and expression of two human recombinant monoclonal Fab fragments specific for EBV viral capsid antigen. *Int. Immunol.* 査読有 19:331-336, 2007.

6. Dong, L., Y. Masaki, M. Tanaka, T. Fukushima, T. Okazaki, and H. Umehara. Sjögren's syndrome and lymphoma development. *Clin. Immunol. Rev.* 査読有 3: 289-296, 2007.

7. Nakayamada, S., K. Saito, H. Umehara, N. Ogawa, T. Sumida, S. Ito, S. Minota, H. Nara, H. Kondo, J. Okada, T. Mimori, H. Yoshifuji, H. Sano, N. Hashimoto, S. Sugai, and Y. Tanaka. Efficacy and Safety of Mizoribine for the Treatment of Sjögren's syndrome : A Multicenter Open-label Clinical Trial. *Mod. Rheumatol.* 査読有 17: 464-469, 2007.

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅原 久範 (UMEHARA HISANORI)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：70247881

(2) 研究分担者

岡崎 俊朗 (OKAZAKI TOSHIROU)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：40233308

田中 真生 (TANAKA MASAO)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10332719

正木 康史 (MASAKI YASUFUMI)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40238895

福島 俊洋 (FUKUSHIMA TOSHIHIRO)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60251998

金 哲雄 (ZHE-XIONG JIN)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：90345570

(3) 連携研究者

河南 崇典 (KAWANAMI TAKAFUMI)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：20350762

澤木 俊興 (SAWAKI TOSHIOKI)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：90534694