

令和元年6月11日現在

機関番号：32701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15040

研究課題名(和文)免疫担当細胞における脂質ラフトの役割

研究課題名(英文)Role of lipid raft in immune cells

研究代表者

池田 輝雄 (Ikeda, Teruo)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：60151297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、LPSあるいはPMA刺激マクロファージ活性化におけるGM3の貪食殺菌能、TLR4受容体発現、サイトカイン発現とシグナル伝達分子機構に対する影響を解析した。GM3はPMAによる貪食作用を抑制したが、LPSへの抑制は見られなかった。ROS産生にはGM3は促進作用を示したが、LPSによるiNOS発現は抑制した。活性化M<sub>1</sub>のサイトカイン発現も抑制し、その機構はMAPK経路のERKのリン酸化とNF- $\kappa$ B経路のp65転写因子の阻害が関与した。また、GM3はLPS刺激マクロファージの細胞膜におけるTLR4発現も抑制した。これらの結果から、GM3は自然免疫応答の有効な治療薬になることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コレステロールとスフィンゴ糖脂質からなる脂質ラフトは、近年多くの微生物関連の受容体があることが明らかとなり、自然免疫細胞活性化、すなわち、病原体関連分子パターン(PAMPs)とパターン認識レセプター(PRR)による機能発現が注目されているが詳細な知見はない。本研究では、スフィンゴ糖脂質のうちGM3KOマウスからのマクロファージおよびマウスマクロファージ細胞株Raw264.7をGM3標品で全処理することにより、PAMPsによるM<sub>1</sub>の機能解析とその誘導機序を解析することで、M<sub>1</sub>活性化におけるGM3の役割について新たな知見とその他の細胞および脂質ラフトを標的とした免疫治療への応用を模索する。

研究成果の概要(英文)：In this study, I examined the role of GM3 in the phagocytosis, the production of Reactive Oxygen Species(ROS), the expression of TLR4, the expression of cytokines and its signaling pathways on GM3 synthetase knockout murine bone-derived macrophage(GM3<sup>-/-</sup> BDMC) and GM3 treated Raw 264.7 cells when induced by stimuli(eg. LPS or PMA). GM3 enhanced the phagocytosis in PMA-stimulated, but not in LPS-stimulated macrophage. GM3 enhanced the ROS production except for iNOS. Ganglioside GM3 suppresses the LPS-induced cytokine production in macrophage by suppression of NF- $\kappa$ B p65 and pERK signaling. These results indicate that GM3 is a promising suppressor of innate immunoresponses. Moreover GM3 reduced the expression of TLR4 in cell membrane of LPS-stimulated macrophage. From these results, GM3 is expected as useful therapeutic agent in the stage of innate immunological responses.

研究分野：免疫学・微生物学

キーワード：脂質ラフト マクロファージ GM3 サイトカイン シグナル伝達 貪食能 殺菌活性 LPS

### 1. 研究開始当初の背景

脂質ラフト(Lipid raft:スフィンゴ糖脂質の膜マイクロドメイン)は、PRRによる自然免疫の活性化に関与していることが近年報告されている。免疫細胞の活性化は、リガンド刺激による受容体の脂質ラフトへの移動とその結合により始まる。中でも、脂質ラフトを構成する ganglioside とシアル酸を含む glucosyl sphingolipids (GSLs) は、細胞の活性化に重要であると考えられている。脂質ラフトは細胞毎に種類や発現量が異なっているだけでなく、細胞の分化成熟、受容体との会合によっても、分化成熟、リガンド依存性による機能発現などに関与すると予想されるが、その詳細な分子機構等については不明な点が多い。各種 ganglioside 合成酵素ノックアウトマウスを用いた脂質ラフトの重要性についての解析は、アルツハイマー病などの神経伝達系では数多く実証されているが、免疫系、特に自然免疫系における解析は行われていない。一方、M $\phi$  は病原体侵入部位に常在し、感染初期に重要な自然免疫細胞の一つである。M $\phi$  の病原体による活性化は、PRRによる病原体固有の抗原パターン構造の認識によって迅速におこり、貪食作用や ROS の産生促進、あるいは炎症性サイトカイン産生による炎症の誘導などによる自然免疫機構により初期感染を終息させる重要な作用を有する。PRRには、Toll-like 受容体(TLR)を始め、マンノース受容体、グルカン受容体、スカベンジャー受容体あるいは貪食に必須とされている CD11b/CD18 などの貪食関連受容体が知られている。これら PRR は細胞膜、細胞内小胞、細胞質に発現し、その局在部位は脂質ラフトである。PRRのうち、特に自然免疫に重要な受容体である TLR4 も脂質ラフトに集合する分子の一つであり、LPS 刺激による M $\phi$  の TLR4 活性化は、免疫細胞(M $\phi$ )での脂質ラフトの役割を解析するための実験モデルとして有効であると考えられる。

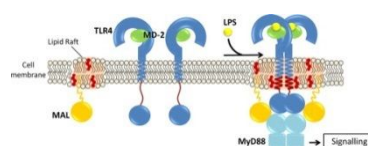
### 2. 研究の目的

脂質ラフトはコレステロールとスフィンゴ糖脂質からなる細胞膜サブドメインであり、細胞機能発現に関与する多くの受容体が局在する。その受容体のラフトへの凝集はリガンド刺激によって変化し、細胞機能発現を調整している。近年多くの微生物もこの脂質ラフト受容体のリガンドになることが明らかとなってきた。自然免疫細胞の活性化は、病原体関連分子パターン(PAMPs)がパターン認識レセプター(PRR)に結合することによって機能発現が開始される。PAMPs を認識する細胞膜上の PRR は種々知られているが、これら受容体が効率よくリガンド結合し免疫細胞を活性化するためには細胞膜上の Lipid raft への効率的な凝集に伴う細胞内へのシグナル伝達調整が重要であるが、免疫細胞での詳細における知見は皆無である。本申請研究では、スフィンゴ糖脂質のうち、各種 ganglioside 合成酵素ノックアウトマウスを使用して、PAMPs による免疫細胞のうち M $\phi$  の機能解析とその誘導機序を解析することで、M $\phi$  活性化における Lipid raft の役割についての新たな知見とその他の細胞および脂質ラフトを標的とした免疫治療への応用を模索する。

### 3. 研究の方法

#### (1)細胞

マウス骨髄由来培養マクロファージは、麻布大学生物科学総合研究所で飼育されている GM3 synthase KO マウスおよび対照としてオリエンタル酵母から購入した C57B6/n マウス 8-10 週令の骨髄から常法に従い単離し、F4/80 発現確認後使用した。マウスマクロファージ細胞株として、Raw264.7 細胞を使用した。



(2)マクロファージの活性化

ファージの活性化には、LPS および PMA を使用した。Raw264.7 細胞に対する GM 3 転嫁実験には Ganglioside GM3 sodium salt(AdipoGen)を用いた。

(3)貪食能の測定

蛍光ビーズを用いて、フローサイトメーターにより測定した。

(4)一酸化窒素および ROS の測定法

Greiss 法、NBT 測定法、DCFDA 法を用いて測定した。

(4)TLR4 発現

FITC 標識抗 TLR4 抗体を用いて膜発現 TLR4 は蛍光顕微鏡により、また細胞での TLR4 蛋白発現は WB 法により測定した。

(5)mRNA の解析

サイトカインの mRNA の解析には Perfect Real Time Primer(タカラバイオ)を用いた。

(6)シグナル伝達分子の解析

シグナル伝達分子の解析は、各分子に対する抗体を用いて WB 法により解析した。

#### 4. 研究成果

(1) GM3 の貪食に及ぼす影響

LPS および PMA の両刺激に対するマクロファージ (M ) 貪食能は増加したが、GM3 処理により PMA 刺激 M ではさらなる促進が見られたが、LPS 刺激では見られなかった。

(2) GM3 の殺菌活性に及ぼす影響

GM3 により NBT 測定では PMA の刺激による ROS 産生に増加が認められたが、LPS 刺激では差が認められなかった。DCFDA 法では、LPS および PMA 刺激 M において GM3 による ROS 産生の促進が見られた。iNOS mRNA 発現は LPS 刺激により増加したが、GM3 により著しく減少した。

(3) GM3 の TLR 4 発現への効果

LPS 刺激により TLR4 の膜での発現は増加したが、GM3 添加によりその発現は抑制された。細胞全体の TLR4 発現は WB 法によりいずれの M でも発現量に違いは見られなかった。

(4) GM3 のサイトカイン産生への作用

LPS 刺激により Cox-2 および前炎症性サイトカインの IL-1 、 IL-6, TNF の mRNA およびタンパク量は増加したが、GM3 により著しく減少した。

(5) GM3 のシグナル伝達に及ぼす効果

LPS 刺激により MAPK 経路すべてが促進したが、GM3 により ERK のリン酸化だけが阻害された。また、NF B 経路では p 65 の核内転写が GM3 により減少した。

#### 5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計 3 件)

1. Okamoto M, Asamura A, Tanaka K, Soeda T, Watanabe K, Mizuguchi H, Ikeda T. Expression of HIF-1 ODD domain fused canine caspase 3 by EGFR promoter-driven adenovirus vector induces cytotoxicity in canine breast tumor cells under hypoxia. 2018. Vet Res Commun. 40.131 - 139. 査読有. PMID: 27744530
2. Okamoto M, Suzuki T, Mizukami Y, Ikeda T. 2017. The membrane-type estrogen receptor G-protein-coupled estrogen receptor suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin 6 via inhibition of nuclear factor-kappa B pathway in murine macrophage cells. Anim Sci J. 1870-1879. 査読有. 10.1111/asj.12868.
3. Okamoto M, Soeda T, Asamura A, Tanaka K, Watanabe K, Ikeda T. 2019. Functional comparison of the human epidermal growth factor receptor and telomerase reverse transcriptase promoters in canine tumor cells. J Vet Med Sci.. 397-400. 査読有. 10.1292/jvms.18-0418

【学会発表】(計5件)

1. 森元美紗子, 永根大幹, 柴田悠貴, 斉場遼介, 岡本まり子, 上家潤一, 池田輝雄, 山下匡. ガングリオシド GM3 はアレルギー性皮膚炎を抑制する. 第89回日本生化学会大会. 2016年09月25日~2016年09月27日. 仙台国際センター・東北大学川内キャンパス、宮城
2. MITAMURA Yuko, NAKAYAMA Natsumi, IKEDA Teruo, OKAMOTO Mariko, YAMASHITA Tadashi. The role of gangliosides in CNS autoimmune disease. 第45回日本免疫学会総会(国際学会). 2016年12月05日~2016年12月07日. 那覇、沖縄
3. 横森 瑛美<sup>1</sup>、永根 大幹<sup>1</sup>、森元 美紗子<sup>1</sup>、柴田 悠貴<sup>1</sup>、斉場 遼介<sup>1</sup>、岡本 まり子<sup>2</sup>、上家 潤一<sup>3</sup>、池田 輝雄<sup>2</sup>、山下 匡<sup>1</sup>. ガングリオシド GM3KO マウスにおけるアレルギー性皮膚炎を促進する原因は肥満細胞である. 第160回日本獣医学会学術集会
4. Natsumi Nakayama Daiki Nagane, Teruo Ikeda Yoko Mitamura, Mariko Okamoto, Tadashi Yamashita, The role of gangliosides in CNS autoimmune diseases. 第46回日本免疫学会学術集会、仙台
5. 山内 章寛、永根 大幹、池田 輝雄<sup>2</sup>、荻原 喜久美、山下 匡. Bleomycin sulfate 誘発性肺傷害における GD3 合成酵素の役割. 第161回日本獣医学会学術集会。茨城

【図書】(計0件)

【産業財産権】

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

( 1 ) 研究代表者

池田 輝雄 (IKEDA, Teruo)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号 : 60151297