

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08395

研究課題名(和文)喘息発症・増悪化に関わる室内環境真菌糖脂質の同定およびメカニズム解明

研究課題名(英文) Identification and mechanism elucidation of indoor environmental fungal glycosphingolipids involved in onset and exacerbation of asthma

研究代表者

大河原 晋 (Ohkawara, Susumu)

横浜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20409387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：真菌は、喘息患者においてスギ、ダニに次いで陽性率が高い主要アレルゲンであり、成人喘息の難治化やリモデリングに関与することが知られている。しかしながら、これら疾患の発症機序および寄与因子については不明な点が多い。本研究では、*Aspergillus fumigatus*および*Neurospora crassa*の細胞膜外層の構成成分である糖脂質が、急性単球性白血病由来細胞株(THP-1)において炎症性メディエーター産生を亢進することを明らかにした。以上より、今回評価した真菌由来糖脂質は、これら真菌における非特異的刺激物として作用する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真菌由来糖脂質に関する研究は、構造解析について多くの報告があるが、生理作用に関する報告は少ないのが現状である。成人喘息患者における真菌皮内テスト陽性率で高値を示す環境真菌*Aspergillus fumigatus*および*Neurospora crassa*から、非特異的刺激物として作用する糖脂質を同定できたことは、喘息発症の予防および治療薬の新たな治療標的になる可能性を示すことができたと考え、社会的意義が大きいと期待される。

研究成果の概要(英文)：Fungi are major allergens with the highest positive rate after cedar and mite in asthma patients, and are known to be involved in airway remodeling of intractable asthma. However, there are many unclear points about the onset mechanism and contributing factors of these diseases. In the present study, we investigated the effects of glycosphingolipids from *Aspergillus fumigatus* and *Neurospora crassa* on inflammatory mediator production using the THP-1. These glycosphingolipids significantly increased inflammatory mediator production. These results suggest that glycosphingolipids evaluated this time may act as irritants in *Aspergillus fumigatus* and *Neurospora crassa*.

研究分野：衛生学・公衆衛生学

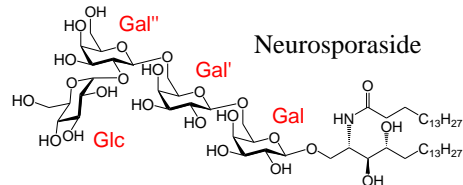
キーワード：糖脂質 真菌 喘息 免疫 室内環境 炎症性メディエーター

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

環境中の真菌は、喘息患者においてスギ、ダニに次いで陽性率が高い主要アレルゲンである。真菌には抗原種(アレルギー免疫反応の原因種)として70以上同定されているが、その抗原性、共通性など不明な点が多い。喘息に関与する環境真菌は、室内だけでなく屋外の真菌も対象となる。屋外の飛散真菌の感作例では、これらが飛散しやすい梅雨から秋に気道症状が悪化しやすく、特に若年者喘息で重症化に関与する。一方、室内塵に多く認められる耐乾性真菌は、アレルギー性気管支肺真菌症の主要原因であるとともに、成人喘息の難治化、リモデリングの原因となる。さらに2歳までの室内環境中の真菌への感作が、将来のアレルギーや喘息発症を増加させる可能性が近年のコホート研究によるメタ解析で指摘されている。

糖脂質は、真菌類の細胞膜外層の構成成分であり、感染時の生体への接着・侵入、炎症反応誘導などに関与している。最近、耐乾性真菌である *Aspergillus fumigatus* から単離された糖脂質が、樹状細胞の CD1d 分子結合能を有し、その結果、iNKT 細胞を活性化して気道過敏症を誘発すること、また、重篤な肺感染症を誘発する *Scedosporium apiospermum* 単離した糖脂質が、マクロファージに対して活性化能を有することが相次いで報告されている。この結果は、喘息発症機序の一つとして糖脂質が抗原として働くことを分子レベルで証明した非常に重要な知見である。研究分担者である大塚は、*Aspergillus fumigatus* 同様、室内環境中のアレルゲンの一つとして考えられている赤パンカビ (*Neurospora crassa*) から単離同定された糖脂質、Neurosporaside の合成法の確立に成功している。この糖脂質は、真菌細胞壁の構成成分であり炎症惹起物質としてすでに知られている  $\beta$ -D グルカンと同じ4糖構造に、スフィンゴ脂質が結合した構造を有するが、その生理的役割については報告がない。



## 2. 研究の目的

本研究では、第一に、成人喘息患者における真菌皮内テスト陽性率で高値を示す環境真菌 (*Aspergillus fumigatus*, *Neurospora crassa*) に着目し、これら真菌が産生する糖脂質の合成を行う。第二に、これら合成糖脂質の免疫細胞(単球、マクロファージ、iNKT細胞)への影響についてメカニズムも合わせ検討する。この2点を軸に、抗原として働く糖脂質を同定するとともに、真菌の喘息発症および増悪化に関する分子機構を明らかにすることで、予防法の起点となる知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) *Neurospora crassa* 産生糖脂質の合成

四糖を二糖に分けて合成していき両者を合体させるブロック型合成法と、還元末端側の糖から順序よく一つずつ糖鎖を伸張させていく直鎖型合成法により糖鎖部分を合成した。次に合成した糖鎖部分とセラミド誘導體とを縮合させ糖脂質とした。

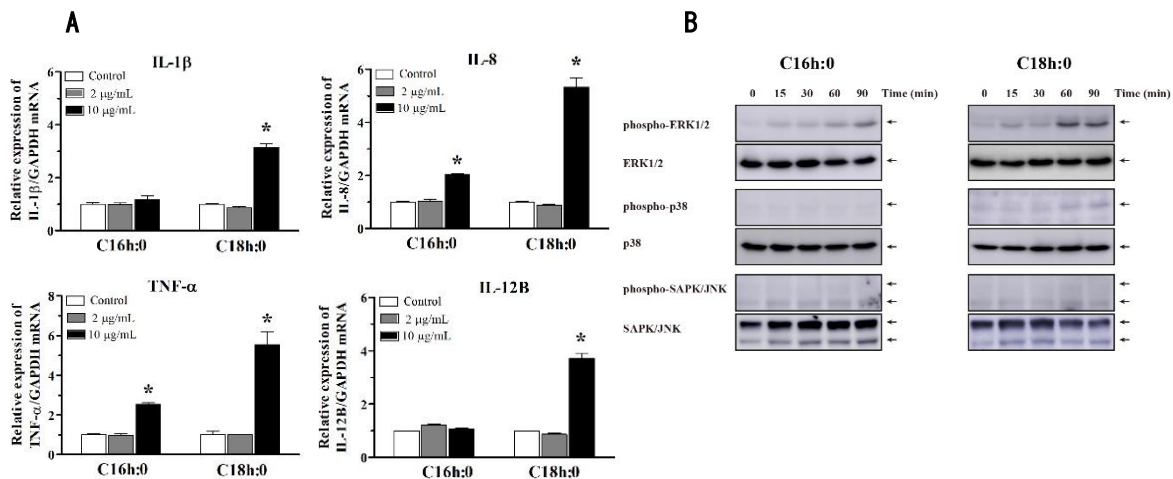
### (2) *Aspergillus fumigatus* および *Neurospora crassa* 由来糖脂質の THP-1 における活性化機構

急性単球性白血病由来細胞株 (THP-1) およびマクロファージ様に分化誘導した THP-1 (TDCC) を *Aspergillus fumigatus* 由来糖脂質 9-Me d18:24E, 8E-C16h:0 (C16h:0) および 9-Me d18:24E, 8E-C18h:0 (C18h:0) 存在下無血清 RPMI1640 培地で4時間処理後、炎症性メディエーター (IL-1, IL-8, IL-12B, TNF- $\alpha$ ) mRNA の発現量を TaqMan Probe によるリアルタイム PCR 法で解析した。各炎症性メディエーター遺伝子の発現量は、GAPDH に対する相対的な発現量として算出した。C16h:0 および C18h:0 による THP-1 の ERK1/2, p38, SAPK/JNK の活性化は、それぞれのリン酸化特異的抗体を用いた Western Blot 法により評価した。

## 4. 研究成果

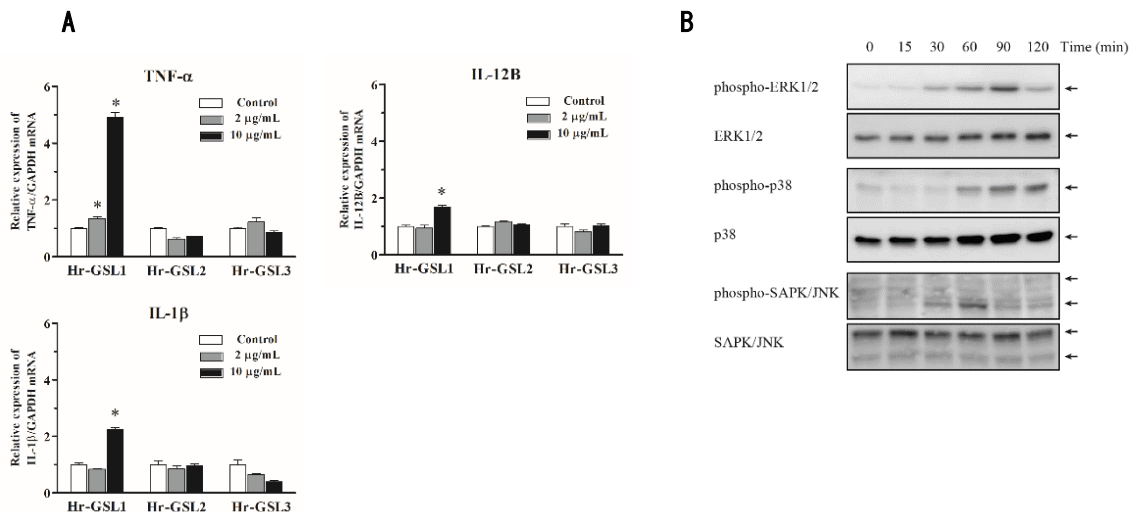
### (1) *Aspergillus fumigatus* 由来糖脂質の THP-1 における炎症性メディエーター産生およびその作用機序

THP-1 を用いて、*Aspergillus fumigatus* の主表層糖脂質である C16h:0、C18h:0 曝露後の炎症性メディエーター (IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12B, TNF- $\alpha$ ) 産生について real-time PCR 法により評価した。C16h:0 処理によって、IL-8 は 2.0 倍、TNF- $\alpha$  は 2.5 倍の mRNA 発現量の増加が認められた。C18h:0 処理では、IL-1 $\beta$  は 3.0 倍、IL-8 は 5.0 倍、IL12B は 4.0 倍、TNF- $\alpha$  は 6.0 倍の mRNA 発現量の増加が認められた (図 A)。一方、TDCC においては、C18h:0 は、IL-8、TNF- $\alpha$  mRNA の発現量を、C16h:0 は、IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$  mRNA の発現量を有意に増加させた。さらに、C16h:0、C18h:0 は、THP-1 における ERK1/2 のリン酸化を有意に亢進させることを明らかにした (図 B)。



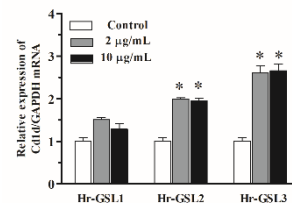
## (2) *Neurospora crassa* 由来糖脂質およびその構造異性体の THP-1 における炎症性メディエーター産生およびその作用機序

Neurosporaside (Hr-GSL3) および Man  $\alpha$  1-3Gal  $\beta$  1-6Gal  $\beta$  1-6Gal  $\beta$  1-Cer (Hr-GSL1)、Man  $\alpha$  1-3Gal  $\beta$  1-6(Glc  $\alpha$  1-4)Gal  $\beta$  1-6Gal  $\beta$  1-Cer (Hr-GSL2) 2 種類の構造異性体を含む 3 種類の糖脂質について、THP-1 における炎症性メディエーター (IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12B、TNF- $\alpha$ ) 産生について real-time PCR 法により評価した。3 種類の糖脂質のうち Hr-GSL3 は、IL-6、IL-10 mRNA の発現量を有意に増加させ、Hr-GSL2 は IL-10 mRNA の発現量を、Hr-GSL1 においては、TNF- $\alpha$  mRNA の発現量および抗原量を有意に増加させることを明らかにした (図 A)。さらに Hr-GSL1 は、THP-1 における ERK1/2、p38 および SAPK/JNK のリン酸化を有意に亢進させることを明らかにした (図 B)。



## (3) Neurosporaside および構造異性体による CD1d 産生

Hr-GSL3 および Hr-GSL1、Hr-GSL2 について、THP-1 における糖脂質抗原の提示に関わる糖タンパク質 CD1d の mRNA 発現に対する影響について検討した。3 種類の糖脂質のうち Hr-GSL2 および Hr-GSL3 は、CD1d の mRNA 発現を有意に増加させた。この応答性は Hr-GSL3 において顕著であった。以上より、Hr-GSL3 は CD1d の架橋反応を促進させる可能性が示唆された。



## (4) iNKT 細胞における炎症性メディエーター産生

末梢血単核細胞から iNKT 細胞の単離を試みたが、アッセイに供与するほどの細胞数を得ることができなかった。単離法を含め解析法の見直しを行っているところである。

## (5) 結論

以上より、免疫系細胞のモデルである THP-1 を活性化させる新たな環境真菌由来の糖脂質を同定することができた。一方で、宿主側の受容体の同定や樹状細胞、iNKT 細胞における詳細な研究は行っていない。今後も、本研究での手法や得られた結果を応用して引き続き解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大河原 晋、今田 翔子、磯部 隆史、埴岡 伸光、神野 透人、金谷 貴行、羽田 紀康、大塚 功、香川（田中）聡子
2. 発表標題 Aspergillus fumigatus由来糖脂質による炎症性サイトカイン 産生
3. 学会等名 フォーラム2018 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大河原 晋、浦田 葉月、今田 翔子、磯部 隆史、埴岡 伸光、神野 透人、金谷 貴行、羽田 紀康、大塚 功、香川（田中）聡子
2. 発表標題 線虫捕食糸状菌Hirsutella rhossiliensis由来糖脂質によるサイトカイン産生
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門松 隆夫、大河原 晋、磯部 隆史、神野 透人、香川（田中）聡子、金谷 貴行、羽田 紀康、大塚 功、埴岡 伸光
2. 発表標題 Hirsutella rhossiliensis糖脂質合成類縁体によるTHP-1細胞のLPS誘導性炎症メディエーター産生の抑制
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大塚 功  (Ohtsuka Isao)  (20389589)	九州保健福祉大学・薬学部・教授    (37604)	