

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590970

研究課題名（和文） インスリン抵抗性に関与するガングリオシド（GM3）と喘息発症との関係

研究課題名（英文） Involvement of insulin resistance-associated ganglioside GM3 in the pathogenesis of bronchial asthma.

研究代表者

大河原 雄一（OHKAWARA YUICHI）

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40333801

研究成果の概要（和文）：

肥満やインスリン抵抗性の気管支喘息発症・増悪への関与を明らかにすることを目的に、野生型マウスとインスリン抵抗性に関与しているガングリオシド（GM3）の欠損マウスを用いて高脂肪食摂取による食事性肥満マウス喘息モデルを作成して検討した。野生型マウスでは高脂肪食摂取による肥満により、抗原吸入後の気道炎症反応が増強した。一方、インスリン抵抗性を示さないGM3欠損肥満マウスでは、野生型肥満マウスと同程度の肥満度にもかかわらず、抗原吸入後の気道炎症反応の増強は認められなかった。以上の結果から、肥満ならびにインスリン抵抗性は喘息悪化に関与することが示された。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the involvement of obesity and insulin resistance in the pathogenesis of bronchial asthma, we developed a murine allergic asthma model with high-fat diet-induced obesity. In wild type mice, high-fat diet-induced obesity increased airways inflammation after antigen inhalation. In contrast, the obesity did not increase the airways inflammation in the ganglioside GM3-deficient mice, which do not exhibit the feature of insulin resistance. These results demonstrate the involvement of obesity and insulin resistance in the pathogenesis of asthma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：呼吸器病学

キーワード：気管支喘息、肥満、インスリン抵抗性、ガングリオシド（GM3）

1. 研究開始当初の背景

（1）喘息は、気道の慢性炎症と種々の程度の気道狭窄と気道過敏性の亢進、そして臨床的には繰り返して起こる咳、喘鳴、呼吸困難を特徴とする気道の慢性炎症性疾患である。その気道炎症には、好酸球、CD4⁺T細胞、マスト細胞などの炎症細胞、気道上皮細胞、線維芽細胞をはじめとする気道構成細胞、および

種々の体液因子が関与している。以上のような事実から、喘息治療ガイドラインでは、喘息治療薬の中で最も抗炎症作用の強い吸入ステロイド薬を第一選択薬にすることを推奨している。しかし、このようなガイドラインが推奨する治療を行ってもコントロール不良な喘息患者が臨床的には多く存在することが問題視されており、その理由の一つとし

て喘息の発症、重症化、難治化の病態における患者個々の多様性が示唆されている。以前から喘息の増悪の危険因子の一つとして肥満が考えられていたが、近年になりこの肥満に基づくインスリン抵抗性が吸入抗原に対するアレルギー感作の成立やアレルギー性喘息の発症、喘息の重症化に関与していることが報告されてきている。実際、重症・難治性喘息患者に肥満が多いことから、その機序を明らかにすることは喘息の病態の多様性に対応できる新しい治療法の開発、ひいては喘息死者数の減少や医療経済的効果が得られる点で臨床的に非常に意義があると考えられる。

(2) 肥満におけるインスリン抵抗性の機序としてシアル酸を有するスフィンゴ糖脂質のガングリオシドの一分子種 GM3 が関与することが報告されている。この GM3 は細胞内情報伝達の要である細胞膜マイクロドメインに発現しており、インスリン抵抗下では細胞膜上の GM3 が正常に比較して増加し、これによってカベオラマイクロドメインからインスリン受容体を静電的相互作用によって解離させてインスリンの代謝性シグナルを抑制すると考えられている。さらに GM3 は、T 細胞膜のガングリオシドの主な構成成分でスフィンゴ糖脂質に富んだマイクロドメインに発現し、このマイクロドメインに存在するチロシンキナーゼ受容体や単量体 (Ras、Rap) または三量体 G タンパク、Src 様チロシンキナーゼ (lck、lyn、fyn)、プロテインキナーゼ C アイソザイムといった変換タンパクと密接に関係することで T 細胞の活性化やアポトーシスなどの重要な機能に関与していることも明らかにされている。以上のことから、インスリン抵抗性による喘息の発症・増悪・難治化には T 細胞膜上の GM3 が重要な役割を演じていることが推測される。

2. 研究の目的

野生型マウス、ならびにインスリン抵抗性を示さない GM3 欠損 (GM3-KO) マウスを用いて食事性肥満マウス喘息モデルを作成し、肥満ならびにインスリン抵抗性と喘息増悪との関係を検討する。

3. 研究の方法

(1) 食事性肥満マウス喘息モデルの作成

オスの野生型 C57BL/6J マウスまたはガングリオシド GM3 欠損マウスに水酸化アルミニウム (alum) をアジュバントとし、1mg/ml の濃度の卵白アルブミン (OVA) 0.5ml を 5 日間の間隔で 2 度腹腔内投与して OVA を抗原としてマウスを感作する。肥満マウスは、感作の成立する 2 回目の腹腔投与後 12 日目から高脂肪食を開始し、16 週間継続して作成する。

肥満成立後、マウスをプラスチックチャンバーに入れネブライザーを用いて抗原 (OVA 0.5mg/ml) を 4 時間間隔で 2 回、1 時間ずつ吸入させて喘息反応を惹起させる。

(2) 気管支肺胞洗浄 (BAL) と BAL 液中の細胞の検討

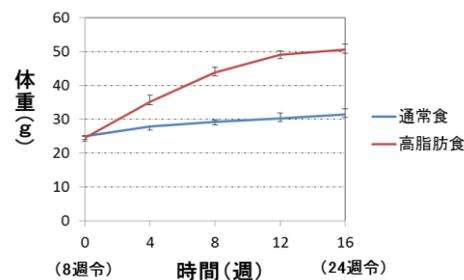
抗原吸入刺激後 1、3、5 日目にジエチル・エーテルで十分麻酔をした後、両側肺を気管ごと摘出し、0.25ml の生理食塩水で 2 回 BAL を行い、BAL 液を回収する。BAL 液中の総細胞数をカウント後、サイトスピンド細胞標本を作成し、Diff-Quick 染色により細胞分画を解析する。

(3) 肺組織の検討

BAL 後に、両側肺を 10%ホルマリンで固定し、HE 染色ならびに PAS 染色を行い、気道の炎症と気道上皮の杯細胞の変化を解析する。

4. 研究成果

(1) 野生型高脂肪食肥満マウスの体重変化
感作成立後 16 週間の高脂肪食摂取により、野生型マウスの体重は約 50g となり、通常食摂取マウスの体重の約 1.5 倍に増加した。



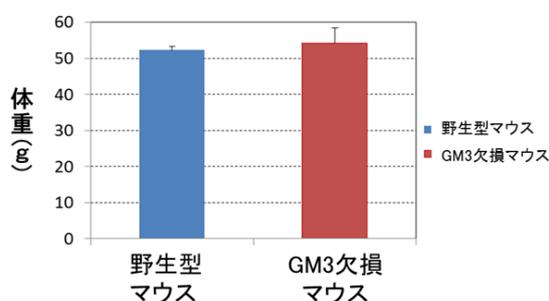
(2) 高脂肪食肥満による気道炎症の増強

高脂肪食または通常食摂取 16 週間後に OVA を吸入させ、OVA 吸入 1、3、5 日後の BAL 中の総細胞数、細胞分画を検討した。OVA 吸入 1、3 日後の BAL 液中の総細胞数と細胞分画は、通常食非肥満マウスと高脂肪食肥満マウスの間では有意な差を認めなかった。OVA 吸入 5 日では、高脂肪食肥満マウスの BAL 液中の総細胞数、好酸球数、リンパ球数が通常食非肥満マウスと比較して有意に増加していた。

(3) 高脂肪食肥満による気道周囲の炎症細胞と気道上皮杯細胞の変化

OVA 吸入 5 日目の肺組織で気道周囲の炎症細胞浸潤と気道上皮細胞の杯細胞について HE 染色と PAS 染色を行って検討した。気道周囲の炎症細胞浸潤の程度は、通常食非肥満マウスと高脂肪食肥満マウス間では明らかな差を認めなかったが、気道上皮の杯細胞への変化は高脂肪食肥満マウスでより強く認められた。

(3) 高脂肪食による野生型肥満マウスと GM3 欠損肥満マウスの体重比較



肥満による喘息の気道炎症増強にインスリン抵抗性が関与するかどうかをインスリン抵抗性を示さないガングリオシド GM3 欠損マウスを用いて、同様に検討した。OVA 腹腔感作成立後 16 週間の高脂肪食投与により、野生型マウスと GM3 欠損マウスの体重は有意差なく増加した。

(4) GM3 欠損肥満マウス喘息モデルにおける気道炎症反応

野生型肥満感作マウスと GM3 欠損肥満マウスにおいて、OVA 吸入後 5 日目の BAL 液中総細胞数と細胞分画を比較検討した結果、GM3 欠損マウスでは総細胞数、好酸球数、リンパ球数が有意に減少していることを確認した。

(5) 結論

アレルギー性マウス喘息モデルにおいて、食事性肥満は気道炎症を増悪させた。さらにその増悪には、肥満ならびにインスリン抵抗性が関与していることが確認された。以上の結果は、肥満を伴う難治性喘息の治療法の開発に有用と考えられる。

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 11 件)

- ① Okuyama K, Kashimura T, Kawano T, Ohkawara Y, Takayanagi M, Kikuchi T, Ohno I. Higher Sensitivity of Male CD4⁺ T Cells to Suppressive Effects of CD8⁺ T Cells on IL-5 Production Compared to Female CD4⁺ T Cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;158 Suppl 1:35-41. (査読有)
- ② Okuyama K, Ide S, Sakurada S, Sasaki S, Sora I, Tamura G, Ohkawara Y, Takayanagi M, Ohno I. μ -opioid Receptor-Mediated Alterations of Allergen-Induced Immune Responses of Bronchial Lymph Node Cells in a Murine Model of Stress Asthma. *Allergol Int* 2012;61:245-258. (査読有)
- ③ Okuyama K, Hamanaka Y, Kawano T,

Ohkawara Y, Takayanagi M, Kikuchi T, Ohno I. T cell subsets related with a sex difference in IL-5 production. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;155 Suppl 1:21-6. (査読有)

- ④ 大河原雄一. 吸入ステロイド薬と吸入デバイスの特色. *アレルギー・免疫* 2011;18:12-19. (査読無)
- ⑤ Okuyama K, Wada K, Sakurada S, Mizoguchi H, Komatsu H, Sora I, Tamura G, Ohkawara Y, Takayanagi M, Ohno I. The involvement of micro-opioid receptors in the central nervous system in the worsening of allergic airway inflammation by psychological stress in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;152 (4):342-52. (査読有)
- ⑥ Wada K, Okuyama K, Ohkawara Y, Takayanagi M, Ohno I. Gender differences in transcriptional regulation of IL-5 expression by bronchial lymph node cells in a mouse model of asthma. *Respirology* 2010;15(4):629-35. (査読有)
- ⑦ 大河原雄一, 山内広平. 重症度・年齢からみた治療戦略. *吸入療法* 2011;2:32-42. (査読無)
- ⑧ 大河原雄一, 山内広平. 気道リモデリングは治療可能か? :ステロイド薬. *月刊呼吸器科* 2009;15:501-507. (査読無)
- ⑨ 大河原雄一. 喫煙と喘息. *呼吸と循環* 2009;57:997-1002. (査読無)
- ⑩ 大河原雄一, 山内広平. 成人喘息と喫煙アレルギーの臨床. 2009;28:254-260. (査読無)
- ⑪ 大河原雄一. Bronchial thermoplasty 呼吸. 2009;28:479-485. (査読無)

[学会発表] (計 12 件)

- ① 大河原雄一. マウス喘息モデルにおける食餌性肥満による気道炎症増悪とインスリン抵抗性について. *アレルギー・好酸球研究会* 2011年6月18日 東京.
- ② 大野 勲, 奥山香織, 永福正和, 大河原雄一, 河野 資, 高柳元明, 井ノ口仁二. GM3 ガングリオシド分子種による CD4⁺T 選択的機能制御とアレルギー性気道炎症. 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011年11月10日 東京.
- ③ 奥山香織, 河野 資, 大河原雄一, 菊地利明, 高柳元明, 大野 勲. CD4⁺T および CD8⁺T による IL-5 産生制御の性差. 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011年11月10日 東京.
- ④ 大河原雄一, 奥山香織, 永福正和, 河野 資, 高柳元明, 井ノ口仁二, 大野 勲. 肥満, インスリン抵抗性と喘息との関係 :

- ガングリオシド(GM3)欠損肥満マウスモデルを用いた基礎的検討. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011年11月10日 東京.
- ⑤ 只野 武, 大河原雄一, 角 朝希. 未病治療における乳酸菌の有用性. 第17回日本未病システム学会学術総会 2010年11月19日 沖縄.
- ⑥ 奥山香織, 河野 資, 大河原雄一, 菊地利明, 高柳元明, 大野 勲. T細胞サブセットにおけるIL-5産生の性差の解析. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月25日 東京.
- ⑦ 奥山香織, 河野 資, 大河原雄一, 曾良一郎, 櫻田 忍, 高柳元明, 大野 勲. 精神的ストレス誘発性喘息の病態と μ -オピオイド受容体の関与. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月25日 東京.
- ⑧ 大河原雄一, 河野 資, 奥山香織, 高柳元明, 大野 勲. 肥満と喘息発症・増悪との関連:食餌性肥満マウス喘息モデルを用いた基礎的検討. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月25日 東京.
- ⑨ 大野 勲, 奥山香織, 永福正和, 大河原雄二, 河野 資, 高柳元明, 井ノ口仁一. GM3ガングリオシド分子種によるCD4⁺T選択的機能制御とアレルギー性気道炎症 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月25日 東京.
- ⑩ 奥山香織, 和田佳奈, 河野 資, 大河原雄二, 田村 弦, 曾良一郎, 高柳元明, 大野 勲. 精神的ストレス誘発性喘息におけるグルココルチコイド受容体および μ -オピオイド受容体の関与. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009年10月31日 秋田.
- ⑪ 大野 勲, 奥山香織, 永福正和, 大河原雄二, 和田佳奈, 河野 資, 高柳元明, 井ノ口仁一. アレルギー性気道炎症におけるGM3関連糖脂質の機能解析. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009年10月31日 秋田.
- ⑫ 和田佳奈, 奥山香織, 大河原雄二, 高柳元明, 大野 勲. アレルギー性気道炎症における性差のメカニズム~Th2サイトカイン発現調節の性差~ 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会 2009年6月4日 岐阜

6. 研究組織

(1)研究代表者

大河原 雄一 (OHKAWARA YUICHI)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 40333801

(2)研究分担者

大野 勲 (OHNO ISAO)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 00250762

井ノ口 仁一 (INOKUCHI JINICHI)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 70131810