

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22249041

研究課題名(和文) スフィンゴミエリンKOマウスを用いた自己免疫疾患の発症機序の解明と治療法への応用

研究課題名(英文) Study for the pathogenesis of autoimmune diseases using sphingomyeline knock out mouse

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,900,000円、(間接経費) 10,770,000円

研究成果の概要(和文)：リピッドラフトの主要構成脂質であるスフィンゴミエリン合成酵素(SMS1)ノックアウトマウスを用いて、自己免疫疾患の発症機序を解析した。SMS1-KOマウスでは、T細胞の活性化の障害により、増殖能やサイトカイン産生能が著しく低下していた。また、ConA誘導実験的肝炎モデルにおいては、有意に肝炎の発症が抑制されていた。また、SMS1-KOマウスのDBAマウスへのバッククロスにより、コラーゲン誘導関節炎発症モデルを樹立した。その結果、SMS1-KOマウスでは関節炎の発症が有意に抑制されていた。以上より、自己免疫性疾患発症におけるリピッドラフトの重要性が証明された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the pathogenesis of autoimmune diseases using sphingomyelin synthase 1 knockout (SMS1-KO) mouse. In vivo study showed that T cell function was impaired and cytokine production was decreased. By concanavalin A-induced hepatitis model, SMS1-KO mouse showed the amelioration of hepatitis. In addition, using collagen-induced arthritis model, we confirmed the amelioration of arthritis in SMS1-KO mouse. These results indicate that sphingomyelin has important roles in the pathogenesis of autoimmune diseases such as autoimmune hepatitis and rheumatoid arthritis through impaired functions of lipid rafts.

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・アレルギー内科学

キーワード：スフィンゴミエリン リピッドラフト ノックアウトマウス 自己免疫性疾患 関節リウマチ

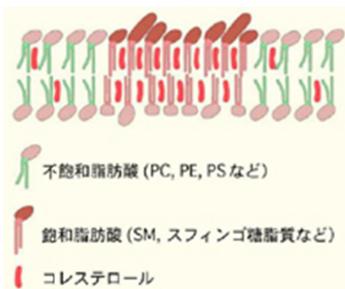
1. 研究開始当初の背景

細胞活性化機構に関して、免疫学領域では細胞膜マイクロドメイン(リピッドラフト)の存在が目玉されている。細胞膜には不飽和型脂肪酸で構成される膜領域とスフィンゴミエリン(SM)などの飽和型脂肪酸とコレステロールから構成される膜領域が存在し、後者がリピッドラフトである。

細胞活性化刺激時や細胞同士の接着において、細胞膜上に散在しているリピッドラフトが凝集し大きなクラスターを形成する。この凝集したラフトの中にT細胞レセプターやFasなどの膜レセプターが移行しシグナル伝達の足場を形成する。このように、細胞活性化およびアポトーシスシグナルにおいては、リピッドラフトが重要な機能を発揮している。

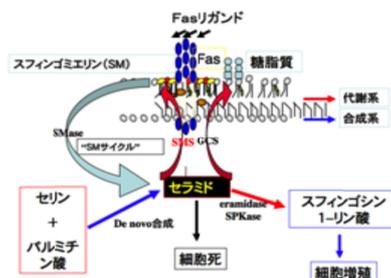
リピッドラフトは、飽和型脂肪酸であるSMを主体にGanglioside GM1とcholesterolが密に凝集した細胞膜領域で、リピッドラフトの膜内側にはチロシンキナーゼ、アダプター蛋白、small G蛋白などシグナル伝達に重要な分子が特異的に局在している(図1)。

(図1)



我々は、これまで一貫して細胞内脂質とリピッドラフトの重要性について研究を続けてきた。(Kondo et al. *J. Biol. Chem.* 275:8872-8879, 2000, Kondo et al. *J. Biol. Chem.* 275:7668-7676, 2000, Kondo et al. *Mol. Pharm.* 61:620-627, 2002, Kondo et al. *Cell Death Different.* 9:682-692, 2002, Kawase et al. *BBA* 1584: 104-114, 2002, Iwase et al. *J. Biol. Chem.* 278:9813-9822, 2003, Watanabe et al. *Cancer Res.* 64:1000-1007, 2004, Uchida et al. *Cancer Res.* 64: 6271-6279, 2004, Taguchi et al. *Blood* 104: 3285-3293, 2004, Miyaji et al. *J. Exp. Medicine*, 202: 249-259, 2005, Jin et al. *Int. Immunol.* 20:1427-37, 2008.)。さらに、世界に先駆けてスフィンゴミエリン合成酵素の遺伝子(SMS1)の同定に成功した(Yamaoka et al. *J. Biol. Chem.* 2004: 279: 18688-18693)。さらに、SMに特異的に結合するライセニンを用いることにより、SMをターゲットにしてラフト機能を解析する手法を確立し、リピッドラフトのT細胞活性化およびアポトーシスにおける重要性を解析した。その結果、リピッドラフトが、細胞の活性化やアポトーシスの本質に関わ

っていることを明らかにした(図2)。(図2)



2. 研究の目的

前述のごとく、リピッドラフトの解析は免疫研究における中心的課題である。しかし、リピッドラフト組成の中心であるSMを標的とした解析や、これを臨床応用に向けた報告は未だなされていない。我々は、世界に先駆けてSMS1遺伝子の同定に成功し、さらに、その欠損株や合成回復株も作成した。また、リピッドラフト解析に必要な手段や試料を有しており、当該分野では世界に一步先ん出ている。今回、国立長寿医療センター研究所 渡辺研博士が作成したSMS1-KOマウスを用いることにより、細胞の増殖や分化および活性化におけるリピッドラフトの機能がより明らかになるものと信ずる。さらに、このマウスを用いて臨床疾患モデルを作成し、リピッドラフトの解析を臨床成果に結びつけるトランスレーショナルリサーチを実践したい。

これまで発症原因が不明で、治療が困難であった自己免疫疾患における細胞膜リピッドラフトの関与を明らかにすることは、細胞膜SMを標的とした免疫調節剤の開発に繋がるものと確信する。

今回の研究課題では、世界に先駆けてSMS1-KOマウスを用いて、自己免疫性肝炎および関節リウマチ(RA)の発症メカニズムを解析し、自己免疫疾患の病因をラフト機能の面から明らかにする。その成果は膠原病などの自己免疫疾患の原因を是正する根本的治療法に繋がると確信する。今回、SMS1ノックアウトマウスと実験的関節リウマチを容易に発症するDBAマウスとの交配を重ね、SMS1ノックアウトDBAマウスを樹立した。このマウスでコラーゲン誘導関節炎モデル(CIA)を用いて、関節リウマチ発症におけるリピッドラフトの関与を明らかにした。

3. 研究の方法

今回我々は、常法通りにSMS1ノックアウトキメラマウスを作成し、B6マウスと交配し、SMS1ノックアウトマウス(SMS1-KO)を樹立しえた(国立長寿医療センター研究所 渡辺研博士作成)。

(1) リピッドラフトの解析: SMS1遺

伝子発現を確認後、このノックアウトマウスの表現型を明らかにし、胸腺、脾臓、末梢血におけるリンパ球ポピュレーションとライセニン感受性、および CD3 抗体架橋刺激による細胞増殖能、同刺激によるサイトカイン産生能を測定し SMS1-KO マウスの免疫機能を解析した。

SMS1-KO マウスリンパ球細胞膜の SM 量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 により解析した。

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 により解析した。

刺激前後における TCR 量の変化を SMS1-KO マウス T 細胞で比較検討した。CD3 架橋刺激による CD25, CD69, CD45RO の発現を FACS 解析する。さらに CD3 刺激により産生される IL-2, IFN- γ 量を ELISA 法で測定した。

- (2) 自己免疫性肝炎の解析：さらに、この SMS1-KO マウスを用いて、ConA 誘導肝炎モデルを利用し、その発症様式、発症頻度、重症度などを解析した。

Homo, Wild マウスの尾静脈から 5mg/kg 相当の Concanavaline A を注射した。

経時的に採血し、血清中の IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-6, TNF- α , IL-12, IL-18 などのサイトカイン産生を RT-PCR にて測定した。

24 時間の時点でマウスを屠殺し、血液採取後、肝臓および脾臓の病理標本を作成し肝炎重症度を検討した。

- (3) 関節リウマチ(RA) の解析：

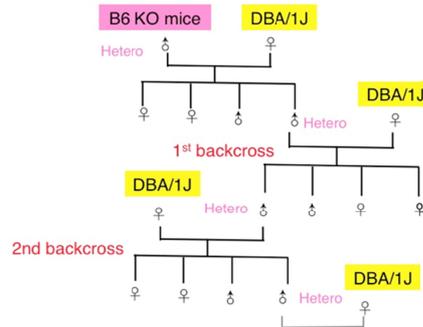
SMS1-KO マウスは C57/BL6 バックグラウンドのノックアウトマウスである。論文的には、C57/BL6 マウスにコラーゲン誘導関節炎を 60%–70% 発症させたとの報告(Eur. J. Immunol. 30:1568, 2000)がみられるも、一般的には発症率は低い。我々の検討でも、純系 C57/BL6 における発症率は、約 50% 強であった。

一方、DBA 系マウスはコラーゲン誘導関

節炎が高率に発症することが知られており、我々の系においてもほぼ 100% の発症を得ている。従って、C57/BL6 バックグラウンドの SMS1-KO マウスを DBA マウスと高配を重ね、DBA バックグラウンドの SMS1-KO マウスを樹立した(図3)。

(図3)

Backcross



8 世代以降の SMS1-KO/DBA マウスを用いて、以下の検討を行なった。

6 週齢の SMS1-KO/DBA マウスの Homo, Wild 各々 10 匹以上に、熱処理結核菌溶液と II 型コラーゲン溶液との混合溶液(エマルジョン)を調整し、皮内に注意深く注入した。アジュバンド免疫は、21 日目に行なった。(100 μ g CII + 250 μ g M.tuberculosis)

4 肢の腫脹関節点数と関節腫脹経を連日測定した。

ピーク時における関節の病理標本を作成し、滑膜増殖および軟骨破壊などの程度を評価した。

関節組織における IL-6, TNF- α , IL-1 α , β , IFN- γ , IL-2 などのサイトカイン産生を RT-PCR 法で測定した。

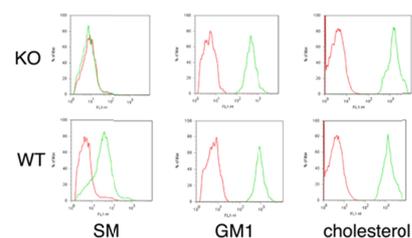
コラーゲン注入後の血清中 IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-6, TNF- α , IL-12, IL-18 などのサイトカイン産生を測定した。

4. 研究成果

- (1) リピッドラフトの解析：

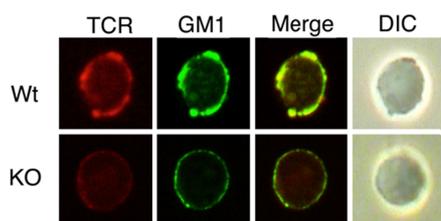
T リンパ球細胞膜上のラフトの存在をライセニンを用いて標識し、FACS および共焦点顕微鏡で解析した。SMS1-KO マウスリンパ球上のラフト発現が著明に低下していた(図4)。

(図4)

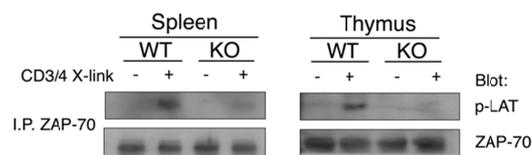


CD3 架橋刺激による T リンパ球の活性化を検討したところ、SMS1-KO マウスにおいては、リピッドラフトの凝集能の低下 (図 5)、細胞増殖能の低下、IL-2 および IFN- γ 産生能の低下が認められた。この低下は、チロシンキナーゼ ZAP-70 の活性低下と会合するアダプター蛋白 LAT のリン酸化の減少 (図 6) など T 細胞レセプターからのシグナル経路の異常に起因するものであった。

(図 5)

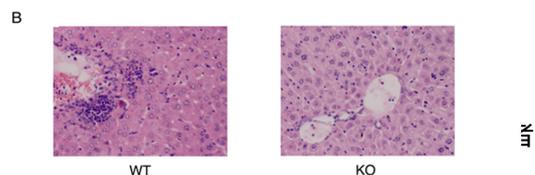
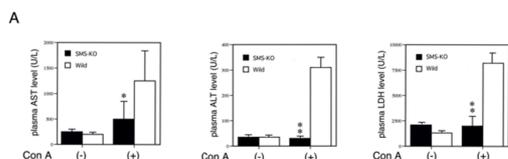


(図 6)



(2) 自己免疫性肝炎の解析 :

ConA-誘導肝炎モデルにおいて、SMS1-KO マウスでは、リンパ球の浸潤と肝細胞障害が著明に抑制されており、自己免疫性肝炎発症には、リンパ球上のリピッドラフトの関与が重要であることが証明された (図 7) (図 7)



(3) 関節リウマチ (RA) の解析 :

8 世代以降の SMS1-KO/DBA マウスを用いて、CIA 誘発実験を行って以下の結果を得ている。

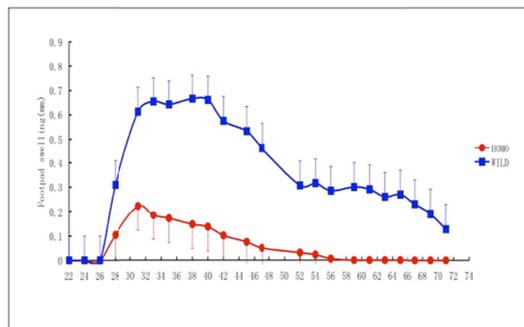
SMS1-KO マウスでは、typeII collagen 注入 28 日以後の関節腫脹は有意に抑制されていた (図 8)。

CIA 発症ピーク時における血中サイトカ

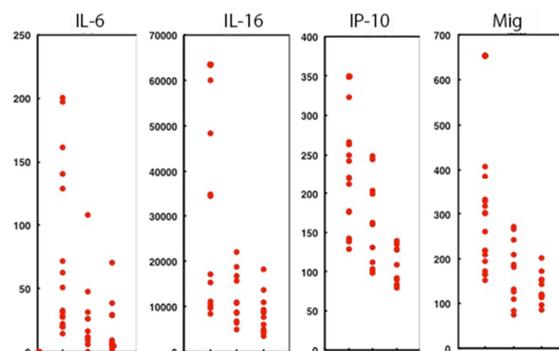
イン・ケモカイン産生量は、SMS1-KO マウスでは野生型マウスと比べ、IL-6 と IL-16 が有意に低下していた。また、ケモカインでは、Mig と IL-10 が有意に低下していた (図 9)。

(図 8)

ノックアウトマウスにおけるコラーゲン誘導関節炎



(図 9)



(4) まとめと考察

我々は、細胞膜リピッドラフトの主要構成脂質であるスフィンゴミエリンの細胞活性化における重要性を既に in vitro において明らかにしてきた。今回、SMS1-KO マウスを用いて、生体内におけるリピッドラフトの重要性を検討した。SMS1-KO マウスの T 細胞は、抗原刺激に対して低応答性を示し、各細胞増殖やサイトカイン産生能に障害を示した。その原因は、リピッドラフトに会合するチロシンキナーゼおよびアダプター蛋白 LAT のチロシンリン酸化の低下であった。

SMS1-KO にマウスにおける ConA 誘導関節炎モデルでは、肝炎の誘発が有意に低下していた。同様に、コラーゲン誘導関節炎モデルでは、関節炎の発症が有意に抑制されていることを明らかにした。このように、リピッドラフトは、免疫細胞の活性化を介して、自己免疫疾患の発症に深く関わっていることを in vitro および in vivo 両方において明らかにすることが出来た。

自己免疫疾患の治療のためにリピッドラフトを制御しうる新たな免疫抑制剤の開発が望まれる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

1. Sugimoto N, Shido O, Matsuzaki K, Katakura M, Hitomi Y, Tanaka M, Sawaki T, Fujita Y, Kawanami T, Masaki Y, Okazaki T, Nakamura H, Koizumi S, Yachie A and Umehara H. Long-term Heat Exposure Prevents Hypoxia-Induced Apoptosis in Mouse Fibroblast Cells. *Cell biochemistry and biophysics*: 2014. (in press) (10.1007/s12013-014-9912-9) (査読あり)
2. Fujita Y, Fujii T, Mimori T, Sato T, Nakamura T, Iwao H, Nakajima A, Miki M, Sakai T, Kawanami T, Tanaka M, Masaki Y, Fukushima T, Okazaki T and Umehara H. Deficient leptin signaling ameliorates systemic lupus erythematosus lesions in MRL/Mp-Fas lpr mice. *Journal of immunology* 192: 2014. 979-984. (10.4049/jimmunol.1301685) (査読あり)
3. Sugimoto N, Matsuzaki K, Ishibashi H, Tanaka M, Sawaki T, Fujita Y, Kawanami T, Masaki Y, Okazaki T, Sekine J, Koizumi S, Yachie A, Umehara H and Shido O. Upregulation of aquaporin expression in the salivary glands of heat-acclimated rats. *Scientific Reports* 3: 2013. 1763. (10.1038/srep01763) (査読あり)
4. Dong L, Chen Y, Masaki Y, Okazaki T and Umehara H. Possible Mechanisms of Lymphoma Development in Sjogren's Syndrome. *Current Immunology Reviews* 9: 2013. 13-22. (10.2174/1573395511309010003) (査読あり)
5. Chen Y, Sun W, Gao R, Su Y, Umehara H, Dong L and Gong F. The role of high mobility group box chromosomal protein 1 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 52: 2013. 1739-1747. (10.1093/rheumatology/ket134) (査読あり)
6. Taniguchi M, Kitatani K, Kondo T, Hashimoto-Nishimura M, Asano S, Hayashi A, Mitsutake S, Igarashi Y, Umehara H, Takeya H, Kigawa J and Okazaki T. Regulation of autophagy and its associated cell death by "sphingolipid rheostat": reciprocal role of ceramide and sphingosine 1-phosphate in the mammalian target of rapamycin pathway. *The Journal of biological chemistry* 287: 2012. 39898-39910. (査読あり) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23035115)
7. Sugimoto N, Shido O, Matsuzaki K, Ohno-Shosaku T, Hitomi Y, Tanaka M, Sawaki T, Fujita Y, Kawanami T, Masaki Y, Okazaki T, Nakamura H, Koizumi S, Yachie A and Umehara H. Cellular heat acclimation regulates cell growth, cell morphology, mitogen-activated protein kinase activation, and expression of aquaporins in mouse fibroblast cells. *Cell Physiol Biochem* 30: 2012. 450-457. (10.1159/000339038) (査読あり)
8. Nakajima H, Koizumi K, Tanaka T, Ishigaki Y, Yoshitake Y, Yonekura H, Sakuma T, Fukushima T, Umehara H, Ueno S, Minamoto T and Motoo Y. Loss of HITS (FAM107B) expression in cancers of multiple organs: tissue microarray analysis. *International journal of oncology* 41: 2012. 1347-1357. (10.3892/ijo.2012.1550) (査読あり)
9. Nakajima H, Ishigaki Y, Xia QS, Ikeda T, Yoshitake Y, Yonekura H, Nojima T, Tanaka T, Umehara H, Tomosugi N, Takata T, Shimasaki T, Nakaya N, Sato I, Kawakami K, Koizumi K, Minamoto T and Motoo Y. Induction of HITS, a newly identified family with sequence similarity 107 protein (FAM107B), in cancer cells by heat shock stimulation. *International journal of oncology* 37: 2012. 583-593. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20664927) (査読あり)
10. Murakami K, Tanaka M, Usui T, Kawabata D, Shiomi A, Iguchi-Hashimoto M, Shimizu M, Yukawa N, Yoshifuji H, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Umehara H and Mimori T. Follistatin-related protein/follistatin-like 1 evokes an innate immune response via CD14 and toll-like receptor 4. *FEBS Lett* 586: 2012. 319-324. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22265692) (査読あり)
11. Kawanami T, Sawaki T, Sakai T, Miki M, Iwao H, Nakajima A, Nakamura T, Sato T, Fujita Y, Tanaka M, Masaki Y, Fukushima T, Hirose Y, Taniguchi M, Sugimoto N, Okazaki T and Umehara H. Skewed production of IL-6 and TGFbeta by cultured salivary gland epithelial cells from patients with Sjogren's syndrome. *PLoS One* 7: 2012. e45689. (10.1371/journal.pone.0045689) (査読あり)
12. Fujita Y, Yanagida H, Mimori T, Jin ZX, Sakai T, Kawanami T, Sawaki T, Masaki Y, Fukushima T, Okazaki T and Umehara H. Prevention of fasting-mediated bone

- marrow atrophy by leptin administration. Cellular immunology 273: 2012. 52-58. (10.1016/j.cellimm.2011.11.007) (査読あり)
13. Dong L, Watanabe K, Itoh M, Huan CR, Tong XP, Nakamura T, Miki M, Iwao H, Nakajima A, Sakai T, Kawanami T, Sawaki T, Masaki Y, Fukushima T, Fujita Y, Tanaka M, Yano M, Okazaki T and Umehara H. CD4+ T-cell dysfunctions through the impaired lipid rafts ameliorate concanavalin A-induced hepatitis in sphingomyelin synthase 1-knockout mice. International immunology 24: 2012. 327-337. (10.1093/intimm/dxs008) (査読あり)
14. Asano S, Kitatani K, Taniguchi M, Hashimoto M, Zama K, Mitsutake S, Igarashi Y, Takeya H, Kigawa J, Hayashi A, Umehara H and Okazaki T. Regulation of cell migration by sphingomyelin synthases: sphingomyelin in lipid rafts decreases responsiveness to signaling by the CXCL12/CXCR4 pathway. Molecular and cellular biology 32: 2012. 3242-3252. (10.1128/MCB.00121-12) (査読あり)
15. Yano M, Watanabe K, Yamamoto T, Ikeda K, Senokuchi T, Lu M, Kadomatsu T, Tsukano H, Ikawa M, Okabe M, Yamaoka S, Okazaki T, Umehara H, Gotoh T, Song WJ, Node K, Taguchi R, Yamagata K and Oike Y. Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1-null mice. The Journal of biological chemistry 286: 2011. 3992-4002. (10.1074/jbc.M110.179176) (査読あり)
16. Shakor AB, Taniguchi M, Kitatani K, Hashimoto M, Asano S, Hayashi A, Nomura K, Bielawski J, Bielawska A, Watanabe K, Kobayashi T, Igarashi Y, Umehara H, Takeya H and Okazaki T. Sphingomyelin synthase 1-generated sphingomyelin plays an important role in transferrin trafficking and cell proliferation. The Journal of biological chemistry 286: 2011. 36053-36062. (10.1074/jbc.M111.228593) (査読あり)
17. Fujiwara K, Kitatani K, Fukushima K, Yazama H, Umehara H, Kikuchi M, Igarashi Y, Kitano H and Okazaki T. Inhibitory effects of dietary glucosylceramides on squamous cell carcinoma of the head and neck in NOD/SCID mice. International journal of clinical oncology / Japan Society of Clinical Oncology 16: 2011. 133-140. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/quer y.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt>

[=Citation&list_uids=21057846](#) (査読あり)

[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 和一 (OKAZAKI, Kazuichi)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：70145126

岡崎 俊朗 (OKAZAKI, Toshiro)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：40233308

渡辺 研 (WATANABE, Ken)
独立行政法人国立長寿医療研究センター
ー・運動器疾患研究部・研究室リーダー
研究者番号：10342966

(3) 連携研究者

河南 崇典 (KAWANAMI, Takafumi)
金沢医科大学・医学部・講師
研究者番号：20350762

藤田 義正 (FUJITA, Yoshimasa)
金沢医科大学・医学部・講師
研究者番号：70450880