

# 博士学位論文要旨

(平成 31 年 3 月取得分)



## T細胞の分化におけるスフィンゴミエリンの発現とその機能的役割

豊島かおる

東北医科薬科大学大学院薬学研究科

スフィンゴ脂質に分類されるスフィンゴミエリン (sphingomyelin, SM) やスフィンゴ糖脂質 (glycosphingolipid, GSL) は、形質膜上でコレステロールと共に特殊な微小領域 (脂質マイクロドメイン) を形成し、そこにシグナル伝達分子などが局在して形成された“脂質ラフト”構造は、細胞膜上の受容体を介したシグナル伝達やタンパク、脂質分子の相互作用の場として重要な役割をもつと考えられている。

T細胞は細胞性免疫の中心的役割を担うリンパ球の一群であり、胸腺において多段階の生存・増殖・分化イベントを経て成熟し、末梢組織へ移出して免疫反応を担う。胸腺細胞分化の中でも“正負の選択”と呼ばれるイベントはT細胞が自己寛容性を獲得する上で最も重要なイベントである。正負の選択を始めた胸腺細胞の分化イベントはT細胞抗原受容体 (T cell antigen receptor, TCR) などの膜受容体によって誘導されるシグナル伝達の強度によって制御される。これらのシグナルは細胞膜あるいは膜周辺分子の動的な変化を伴うため、脂質マイクロドメインがその強度や効率を調整するものと考えられる。

これまで脂質マイクロドメインの研究には、ガングリオシド (シアル酸を構成糖にもつGSLの一群) の中でもGM1とextended-GM1bに高感度に結合するコレラトキシン-Bサブユニット (cholera toxin- B subunit, CTx-B) が多く用いられてきた。しかし、胸腺細胞では末梢T細胞と比べてガングリオシドの発現量が低く、発現しているGSLの中でもCTx-B結合性ガングリオシドは少量であることも知られていた。また、近年では個々のスフィンゴ脂質分子種が別々のマイクロドメインを形成し特異的な機能をもつと考えられており、胸腺細胞における脂質マイクロドメインの生理的意義はいまだ未解明である。

本研究ではT細胞の分化過程におけるSMマイクロドメインの機能を解明することを目的とした。はじめに野生型マウスの胸腺細胞の分化過程にお

けるスフィンゴミエリン発現を解析した。SM分子が5-6分子でクラスター化している状態 (SMマイクロドメイン) のみを特異的に認識するライセニン (Lysenin, Lys) と、一分子で分散しているSMに優先的に結合するエキナトキシン (Equinatoxin II, EqtII) の2種類のSM結合性タンパク毒素を用いて解析した。その結果、胸腺細胞のSM発現量は一連の分化過程で大きく変動し、それはセラミドからSMを合成する酵素であるSM合成酵素1 (sphingomyelin synthase, SMS1) の発現レベルで厳密に制御されていることが示された。特筆すべき点は分化の初期段階からSM発現は徐々に低下し、正負の選択後に再度大きく増加することである。なかでも分散したSMの増加量は正負の選択前と比べて約2倍であったのに対し、SMマイクロドメイン発現量は10倍以上増加していた。

正負の選択におけるSMマイクロドメインの関与が考えられたためSMS1の欠損マウスを用いてその機能的意義を解析した。SMS1欠損マウスでは分化に伴うSM発現の増減が認められず、SM発現は各分化段階において著しく低下していた。このときSMS1の欠損によるSMの前駆体であるセラミドやGSLの代償的な増加は認められなかった。次に、このマウスを正負の選択のモデルとなるTCRトランスジェニックマウスと掛け合わせた。正の選択のモデルであるTCRトランスジェニックマウス (メスHY TCR Tg, OT-I TCR Tg) の系では、SMS1欠損により分化後期段階の胸腺細胞数が減少しており、正の選択の低下が認められた。負の選択のモデルであるTCRトランスジェニックマウス (オスHY TCR Tg) の系ではSMS1欠損により負の選択の亢進を認めた。これらの現象がTCR依存性の細胞死か否かを確かめるため、胸腺細胞にTCR刺激を行った結果、SMS1欠損胸腺細胞ではコントロールと比較して細胞死が亢進することが判明した。さらにSMS1欠損胸腺細胞では、TCR近位のシグナル分子であるZAP-70のリン酸化がTCR刺激に伴い亢進していた。負の選択につ

ながる ERK5 のリン酸化やアポトーシス促進分子である Bim の発現, ERK5 の下流の伝達分子の Nur77 の発現も顕著に増加しており, SMSI 欠損胸腺細胞では TCR シグナル伝達が亢進することが判明した. 野生型マウスの胸腺細胞に SM を添加した状態で TCR 刺激を行うと, SM の添加濃度依存的に TCR シグナルの減弱と生存率の増加が認められた. 以上より, 負の選択において SM マイクロドメインは TCR シグナルが誘導する細胞死に抑制的に関与することが明らかとなった.

SMSI 欠損マウスの胸腺細胞では TCR シグナル伝達の増強がみられたが, ヒト白血病 T 細胞株である Jurkat 細胞の SMSI 遺伝子のノックダウン細胞株では, 細胞の SM 量が 2 割減少しただけで SM マイクロドメインが消失し, TCR シグナル伝達が減弱することが報告されている. そこで CRISPR/Cas9 システムを用いて Jurkat 細胞に SMSI と GSL 合成の初発分子であるグルコシルセラミドの合成酵素 (Glucosylceramide synthase: GlcCerS) の変異を導入し, Jurkat 細胞において SM マイクロドメインが TCR シグナル伝達に対して抑制的か促進的のどちらに働くか再検討するとともに GSL マイクロドメインとの機能を比較した. SMSI 変異導入 Jurkat 細胞では SM マイクロドメインの発現が著しく減少しており, このとき TCR 刺激に伴う ZAP-70 のリン酸化の低下や  $Ca^{2+}$  応答の亢進が認められた. 一方で GlcCerS 変異導入細胞では TCR シグナル伝達の変化は見られなかった. さらに SMSI 変異導入 Jurkat 細胞に SMSI 遺伝子を再導入すると, SM 発現は mock 導入 Jurkat 細胞と同程度にまで回復し, このとき SMSI 変異導入細胞で見られた TCR シグナル伝達の亢進は mock 導入 Jurkat 細胞と同程度にまで低下した.

本研究により, SM マイクロドメインは TCR シグナル伝達を抑制的に制御していることが明らかとなった. SMSI 欠損胸腺細胞では正負の選択時に

SM 発現量が増加しないために, TCR 刺激の閾値が下がり TCR シグナル強度が増強されて負の選択が亢進したと考えられる. このことは TCR シグナル強度の調節に SM に富んだ脂質マイクロドメインが寄与することを示唆している. 胸腺細胞分化において SM 発現量の増減は厳密に制御されており, それが微調整されることでシグナル伝達強度が調節され, 正負の選択を決定する TCR 刺激の閾値を適正化しているものと考えられる.

自己免疫疾患患者の T 細胞ではマイクロドメイン構成脂質の質的・量的な変化が起こることが報告されている. 全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE) 患者の T 細胞では形質膜のコレステロールや GSL が増加しており, それらの発現を健常人由来 T 細胞と同程度に低下させると T 細胞の機能が回復する. 自己免疫疾患患者の T 細胞における SM 発現変化は報告されていないが, 炎症が関与するような肥満病態では血清中の SM の質的变化 (脂肪酸のアシル鎖長の変化) が起きることが知られている. 今後, 健常人と自己免疫疾患患者のヒト T 細胞における SM 発現の変化を解析し, 自己免疫疾患における SM マイクロドメインの病態生理学的意義を明確にし, 新たな診断, 治療法の開発につなげていきたい.

#### 〈参考文献〉主論文 (原著論文)

- 1) Kaoru Toshima, Masakazu Nagafuku, Toshiro Okazaki, Toshihide Kobayashi, Jin-ichi Inokuchi. Plasma membrane sphingomyelin modulates thymocyte development by inhibiting TCR-induced apoptosis. *International Immunology*, 2018. DOI: 10.1093/intimm/dxy082.
- 2) 永福正和, 豊島かおる, 堀内 隼, 井ノ口仁一. スフィンゴミエリンマイクロドメインは Jurkat 細胞の T 細胞抗原受容体依存性活性化を負に制御する. *東北医科薬科大学研究誌*, 65, 29-42, 2018.

## NPC1L1 を介した腸管からのコレステロール吸収における ガングリオシドの生理学的意義の解析

二瓶 渉

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 機能病態分子学教室

### 【研究背景・目的】

コレステロールは生体膜の構成成分の1つであり、ステロイドホルモン、胆汁酸、ビタミンD生合成の前駆物質となる重要な分子である。近年、高コレステロール血症と、それに引き続く動脈硬化の進展が先進国において主要な死因を占める心疾患、脳血管疾患のリスクファクターとして問題になっており、血中コレステロール濃度の適切な維持には多大な関心が寄せられている。生体におけるコレステロール恒常性の維持は生合成と食事からの吸収のバランスによって成り立っている。前者についてはアセチル CoA を出発物質とし、コレステロールへと至る多段階の反応について、これまでに酵素、速度論、反応機構をはじめとして詳細な解析がなされてきた。一方で、後者の食事由来コレステロールの吸収機構については多くの未解明な点が残されている。

腸管からの食事由来のコレステロール吸収は13回膜貫通タンパク質、Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) が中心的な役割を担っており、肝臓での胆汁酸からのコレステロール再吸収にも関与している。高コレステロール血症治療薬エゼチミブは NPC1L1 をターゲットとし、細胞外第二ループに直接結合する。NPC1L1 は定常状態ではエンドソームに局在し、コレステロール枯渇時には形質膜へとリクルートされ、N末端領域に対するコレステロールの結合をトリガーとして小胞輸送によ

り形質膜のコレステロールを細胞内へと取り込む(図1)。NPC1L1 はガングリオシドに富む膜マイクロドメインに局在し、生理機能を示すためには脂質ラフトの足場タンパクであるフロチリン-1, フロチリン-2が必要である。マイクロドメインの形成において、ガングリオシドとフロチリンは密接な関係にあることが報告されているものの、NPC1L1 によるコレステロール吸収においてガングリオシドが果たす役割については明らかになっていない。

以上の背景をふまえ、今回の研究では腸管からの NPC1L1 を介したコレステロール吸収においてガングリオシドがどのような役割を果たしているのかを解明することを目的とした。

### 【方法・結果・考察】

ヒト胎児腎由来の HEK293T (Human Embryonic Kidney 293T) コントロール細胞と、HEK293 T GM3S 合成酵素欠損 (GM3S KO) 細胞を用いて NPC1L1 依存的なコレステロール輸送能におけるガングリオシドの機能解析を行った。その結果、GM3S KO 細胞ではコントロール細胞と比べて NPC1L1 を介したコレステロール取り込みが抑制されていた。さらに、コントロール細胞では NPC1L1 阻害薬であるエゼチミブ処理によって細胞内へのコレステロール取り込みが抑制されていたが、GM3S KO 細胞ではエゼチミブのコレステロール取り込み抑制効果が消失していた。このことから、GM3S の欠損はエゼチミブと同様の経路・機序により NPC1L1 の機能低下を引き起こしている可能性が示唆された。さらに、コレステロール依存的な NPC1L1 の形質膜から細胞内への局在変化が NPC1L1 の機能に重要であることから、NPC1L1 の局在をリアルタイムに観察可能な系を確立し、コレステロール処理時の NPC1L1 の局在変化をコントロール細胞、GM3S KO 細胞で比較検討した。その結果、コントロール細胞では継時的に形質膜から細胞内へ NPC1L1 が取り込まれてい

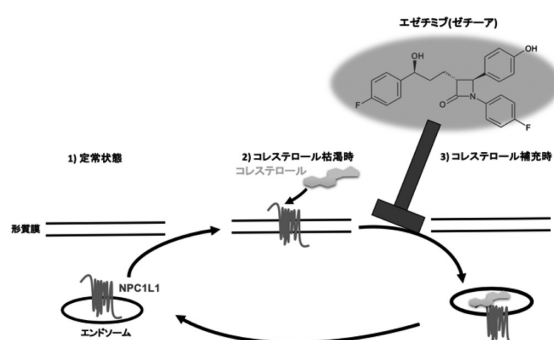


図1 NPC1L1 のリサイクリング機構

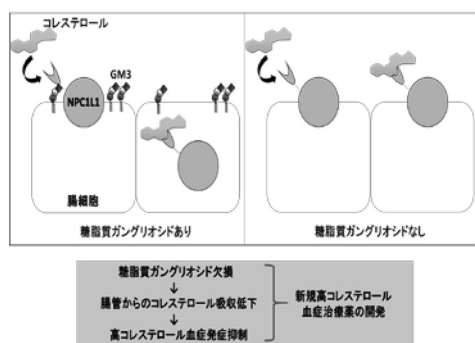


図2 新規高コレステロール血症治療標的としてのガングリオシド

たが、GM3S KO 細胞では NPC1L1 の細胞内移行が抑制されていた。以上の HEK293T 細胞を用いた実験により、ガングリオシドが NPC1L1 の機能に必要とされることが示唆された。次に、実際に腸管において NPC1L1 の機能にガングリオシドが関与しているのかどうか検討を行うために、マウスを用いて解析を行った。その結果、HEK293T 細胞をモデルとして用いた実験と同様、GM3S のノックアウトにより、マウスの腸管においてもコレステロール依存的な NPC1L1 の絨毛表面から内部への局在変化が抑制されていた。さらに、腸管からのコレステロール吸収率について検討を行った結果、GM3S のノックアウトにより腸管からの

コレステロール吸収率は有意に低下していた。以上の結果より、GM3S の欠損は NPC1L1 の機能低下、すなわち腸管からのコレステロール吸収の抑制を引き起こすことが明らかとなった。さらに、GM3S ノックアウトマウスが遺伝的な背景、食事誘導性の高コレステロール血症に対して抵抗性を示す事実から、GM3 および GM3S が新規の高コレステロール血症治療標的となりうることが示唆された (図2)。<sup>1)</sup>

#### 〈参考文献〉 主論文 (原著論文)

- 1) Nihei, W., M. Nagafuku, H. Hayamizu, Y. Odagiri, Y. Tamura, Y. Kikuchi, L. Veillon, H. Kanoh, K. Inamori, K. Arai, K. Kabayama, K. Fukase, and J. Inokuchi. NPC1L1-dependent intestinal cholesterol absorption requires ganglioside GM3 in membrane microdomains. (2018) *J. Lipid Res.* Nov;59(11):2181–2187.
- 2) Inamori, K., H. Ito, Y. Tamura, T. Nitta, X. Yang, W. Nihei, F. Shishido, S. Imazu, S. Tsukita, T. Yamada, H. Katagiri, and J. Inokuchi. 2018. Deficient ganglioside synthesis restores responsiveness to leptin and melanocortin signaling in obese KKAY mice. (2018) *J. Lipid Res.* Aug;59(8):1472–1481.

## Memantine の抗うつ作用とその作用機序解明に関する研究

高橋 浩平

東北医科薬科大学大学院薬学研究科

厚生労働省による 2016 年時点での有病率の統計調査によれば、うつ病は生涯において日本の人口の 4-7% に発症すると推定されている。このような状況下、うつ病が原因と考えられる自殺が社会問題となっており、うつ病の予防・治療に大きな関心が寄せられている。

アルツハイマー型認知症治療薬の memantine (MEM) は、大うつ病の患者に対し抗うつ作用を示すことが明らかにされた ketamine と同様に非競合的 *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体 antagonist であるが、ketamine と異なり幻覚、幻聴等といった副作用が少なく、 $\alpha 7$  nicotine 受容体や serotonin (5-HT)<sub>3</sub> 受容体に対しても遮断作用を有している。また、当教室では MEM が脳内 dopamine (DA) や 5-HT の再取り込み阻害および monoamine oxidase (MAO) 阻害作用を有することを明らかにしてきた。実際、臨床試験において MEM の長期投与がうつ病患者に対して効果的であることが報告されている。従って、MEM は既存の抗うつ薬の作用機序の基盤となるモノアミン神経系へ作用するだけでなく NMDA 受容体遮断作用などの多様な作用を有することから新たなタイプの抗うつ薬となり得る可能性が考えられる。

精神疾患モデル動物として用いられている嗅球摘出 (olfactory bulbectomy: OBX) 動物はうつ病患者の臨床症状に類似した行動学的変化や、神経化学的变化が発現するのが特徴である。さらに、病理解剖学的にも、OBX 動物の皮質・海馬・尾状核・扁桃体の萎縮ならびに脳室の拡大、神経新生の低下といった、うつ病患者でも認められる組織学的変化も確認されている。上記の異常行動や神経組織学的変化は、臨床を反映し抗うつ薬の急性ではなく慢性投与で改善する。従って、本モデルは臨床的妥当性を持ったうつ病モデルであると考えられ、古くから抗うつ薬の前臨床評価に用いられてきている。

以上示した背景を基に、うつ病モデル動物として OBX マウスを用い、本研究では、MEM の抗うつ

作用について行動薬理的に検討し、さらにそのメカニズムについて神経新生ならびに神経保護的な観点から神経化学的ならびに分子生物学的手法により検討した。

術後 6 週目における OBX マウスは情動行動障害ならびに強制水泳試験およびテールサスペンション試験において無動時間の延長が認められ、それらは MEM の急性ではなく 4 週間慢性投与によって有意に改善されたことから、MEM の慢性投与は抗うつ作用を示すことが明らかとなった。強制水泳試験やテールサスペンション試験の無動時間の延長は、noradrenaline (NAAd) 神経系や DA 神経系の機能低下が関係しており、このモノアミン神経系の機能低下が OBX マウスで認められる。本研究において、モノアミン合成における律速段階の酵素である tyrosine hydroxylase (TH) の活性を測定したところ TH は OBX マウスの海馬で有意に減少しており、この減少は MEM の慢性投与によって有意に改善されることを Western blot 法によって確認した。また、海馬 NAAd ならびに DA に関しては OBX マウスにおいて Sham マウスと比較し有意に減少していたが DA の減少のみが MEM 慢性投与によって有意に改善された。DA の代謝回転の指標である DOPAC/DA ならびに HVA/DA に関しては算出したところ MEM の慢性投与によって OBX マウスにおける DOPAC/DA ならびに HVA/DA が有意に抑制された。以前、当教室において MEM には MAO<sub>B</sub> 阻害作用ならびに DA 再取り込み阻害作用を有することを報告している。従って、MEM は海馬 DA の代謝回転を阻害し、DA を増加している可能性が示唆された。さらに、DA 受容体下流シグナル経路について検討を行ったところ protein kinase A (PKA)、DA- and cAMP-regulated phosphoprotein-32 (DARPP-32)、extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 1/2、cAMP-responsive element binding protein (CREB) のリン酸化ならびに brain-derived neurotrophic factor (BDNF) レベルが OBX マウ

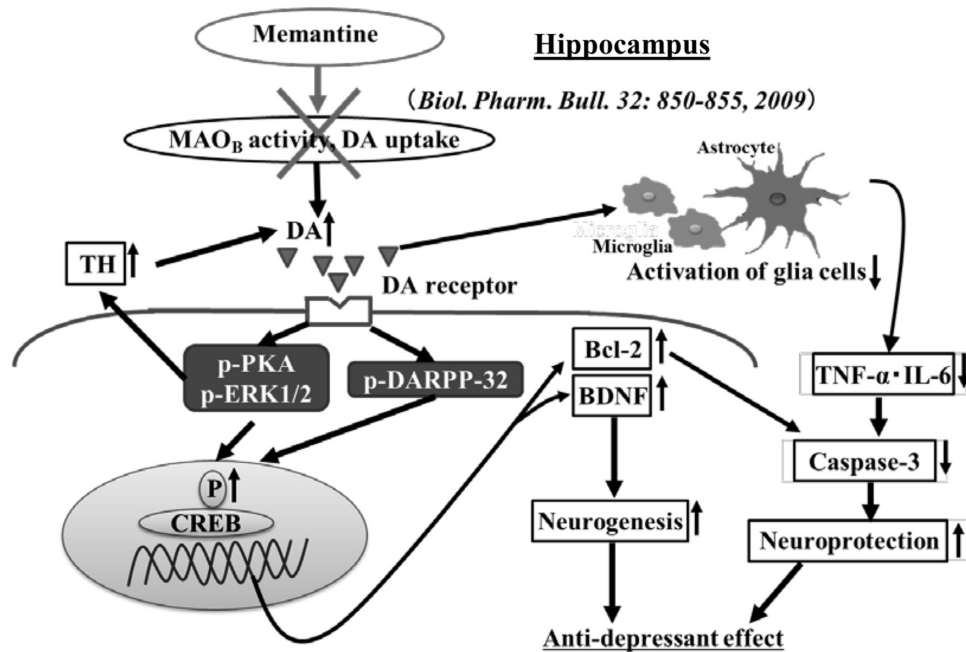


Fig. 1. Hypothesis of MEM antidepressant mechanism.

スの海馬において低下しており、これらの変化はMEMの慢性投与によって改善された。抗うつ薬の作用機序として考えられている神経新生に関与している海馬BDNFレベルがOBXマウスで低下していたことから海馬歯状回での細胞増殖ならびに神経細胞への分化の変化を神経化学的ならびに分子生物学的手法で検討した。その結果、OBXマウスの海馬歯状回での新生細胞数は有意な減少を示し、それに付随して未成熟神経細胞のマーカであるDCXならびに成熟神経細胞マーカであるNeuNの発現レベルも有意に減少していた。これらの減少もMEMの慢性投与によって有意に改善された。これらの結果よりMEMの抗うつ作用には、BDNF上昇を介した海馬歯状回での細胞増殖促進ならびに成熟神経細胞への分化が関与している可能性が示唆された。

次に神経保護的な観点から検討を行った。OBXマウスは海馬p-I $\kappa$ B- $\alpha$ ならびにp-NF- $\kappa$ B p65の活性化を介してTNF- $\alpha$ とIL-6レベルが有意に増加しており、ミクログリアのマーカであるIbalならびにアストロサイトのマーカであるGFAPの免疫蛍光強度が強くなっていることならびにMEMの慢性投与によって有意に改善されることを共焦点レーザー顕微鏡ならびにWestern blotting法によって確認した。また、MEMはOBXマウスでの海馬における抗アポトーシス性タンパクであるBcl-2レベルの減少を改善させ、アポトーシス性タ

ンパクであるBaxには影響を与えなかった。一方で、OBXマウスでの海馬におけるcleaved caspase-3レベルの上昇はMEMの投与によって有意に改善された。これらの結果からMEMは海馬内のcaspase-3活性化ならびにBcl-2/Baxのバランスを整えることによってアポトーシスを制御している可能性が示唆された。

以上、本研究で得られた結果を総括すると、MEMの慢性投与は①海馬におけるMAO阻害、DA取り込み阻害およびTHの活性化に起因してDAレベルを増加させ、DA受容体下流シグナル経路の活性化によるBDNF発現量増加を介した神経新生促進効果および②活性化ミクログリアの抑制による炎症性サイトカイン分泌抑制とBcl-2発現量増加を介した神経保護効果により抗うつ作用を示す可能性を明らかにした (Fig. 1)。従って、MEMは認知障害の進行抑制のみならず情動障害や意欲の低下等の精神症状を改善する可能性を示した。

### 主論文 (原著論文)

Takahashi K, Nakagawasai O, Nemoto W, Kadota S, Isono J, Odaira T, Sakuma W, Arai Y, Tadano T, Tan-No K. Memantine ameliorates depressive-like behaviors by regulating hippocampal cell proliferation and neuroprotection in olfactory bulbectomized mice. *Neuropharmacology*, 137: 141–155 (2018).



## Importance of *O*-GlcNAcylation in cell adhesion and migration

徐 志偉

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 細胞制御学教室

*O*-GlcNAcylation is a post-translational modification of protein serine, or threonine residue catalyzed by *O*-GlcNAc transferase (OGT) in the nucleus and cytoplasm. *O*-GlcNAcylation plays critical roles in the cellular signaling that affects the different biological functions of cells depending upon cell type. However, the molecular mechanisms that how the *O*-GlcNAcylation regulates cell migration remains unclear. Here, we used the doxycycline (DOX) inducible short hairpin RNA (shRNA) system to establish an OGT knockdown (KD) HeLa cell line and found that *O*-GlcNAcylation is a key regulator for cell adhesion, migration, and focal adhesion (FA) complex formation. The expression levels of OGT and *O*-GlcNAcylation were remarkably suppressed 24 h after induction of DOX. Knockdown of OGT significantly promoted cell adhesion, but it suppressed the cell migration on fibronectin. The immunostaining with paxillin, a marker for FA plaque, clearly showed that the number of FA was increased in the KD cells compared with that in the control cells. The *O*-GlcNAcylation levels of paxillin, talin, and focal

adhesion kinase (FAK) were downregulated in KD cells. Interestingly, the complex formation between integrin  $\beta$ 1, FAK, paxillin, and talin was greatly increased in KD cells. Consistently, levels of active integrin  $\beta$ 1 were significantly enhanced in KD cells, while they were decreased in cells overexpressing OGT. Taking together, these data suggest a novel regulatory mechanism where loss of *O*-GlcNAcylation may promote focal adhesion complex formation, thereby affecting integrin-mediated functions such as cell adhesion and migration.

### 〈参考文献〉 主論文, 参考論文

- 1) Xu, Z., Isaji, T., Fukuda, T., Wang, Y., Gu, J., *O*-GlcNAcylation regulates integrin-mediated cell adhesion and migration via formation of focal adhesion complexes. *J Biol Chem.* 2018 [In press].
- 2) Zhang, G., Isaji, T., Xu, Z., Lu, X., Fukuda, T., Gu, J., *N*-acetylglucosaminyltransferase-I as a novel regulator of epithelial-mesenchymal transition. *FASEB J.* 2019 Feb;33(2):2823 – 2835.



## Functional analysis of *N*-acetylglucosaminyltransferase-I: a novel regulator of epithelial-mesenchymal transition

張 国偉

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 細胞制御学教室

*N*-Glycans are involved in numerous biological processes such as cell adhesion, migration and invasion. To distinguish their functions of complex high mannose types of *N*-glycans, we used the CRISPR/Cas9 system to establish *N*-acetylglucosaminyltransferase I (GnT-I)-knockout cells (KO). Loss of GnT-I greatly induced cell-cell adhesion, and decreased cell migration. In addition, the expression levels of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers such as  $\alpha$ -SMA, vimentin and N-cadherin were suppressed, while the expression of claudin-1 was promoted, suggesting a mesenchymal-epithelial transition-like phenotype, an opposite process to the EMT, was occurred in the KO cells. The phosphorylation levels of Smad2 and EGFR, as well as those of integrin-mediated FAK were consistently suppressed. Furthermore, the restoration of GnT-I in the KO cells suppressed the cell-cell adhesion and augmented the expression of EMT markers as well as that of FAK activation. The expression levels of integrins were upregulated in the KO cells although their functions were decreased, while their expression levels were downregulated in the rescued

cells, which suggested a negative feedback loop between function and expression. Finally, we also found that the expression of GnT-I was important for cell survival, resistance to cancer drugs, and increased colony formation. The results of the present study clearly demonstrate that GnT-I works as a switch to turn on/off EMT, which further supports the notion that on most of surface receptors, the *N*-glycans differentially play important roles in biological functions.

### 〈参考文献〉 主論文, 参考論文

- 1) Zhang, G., Isaji, T., Xu, Z., Lu, X., Fukuda, T., Gu, J., *N*-acetylglucosaminyltransferase-I as a novel regulator of epithelial-mesenchymal transition. *FASEB J.* 2019;33(2):2823 – 2835.
- 2) Lu, X., Zhang, D., Shoji, H., Duan, C., Zhang, G., Isaji, T., Wang, Y., Fukuda, T., Gu, J., Deficiency of  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase promotes neuroinflammation by increasing the sensitivity of glial cells to inflammatory mediators. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2019;1863(3):598 – 608.



## Functional analysis of core fucosylation in neuroinflammation

陸 需

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 細胞制御学教室

In mammals, core fucosylation is catalyzed by  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase (Fut8) in N-glycans. Previously, we reported that Fut8-deficient (Fut8<sup>-/-</sup>) mice displayed an attenuation of cognitive function with inhibiting hippocampal long-term potentiation, increased locomotion and schizophrenia-like behaviors, indicating that core fucosylation plays an important role in the brain. Since neuroinflammation is a common pathological change in most brain diseases, this study was focused on investigating the effects of Fut8 in glial cells.

Surprisingly, the results of immunohistochemical staining of brain tissues with Iba-1, a marker for microglia, clearly showed a significant increase in the number of Iba-1-positive cells in untreated Fut8<sup>-/-</sup> mice by comparison with both wild-type (Fut8<sup>+/+</sup>) and hetero (Fut8<sup>+/-</sup>) mice. In addition, under inflammatory conditions stimulated by a lower dose of lipopolysaccharide, Fut8<sup>-/-</sup> mice showed an extensive increase in both the numbers and sizes of Iba-1-positive cells. Also, western blotting consistently showed increases in the expression levels of both Iba-1 and GFAP, a marker for astrocytes, in Fut8<sup>-/-</sup> mice by comparison with Fut8<sup>+/+</sup> mice.

Interestingly, stimulation with pro-inflammatory factors, such as IFN- $\gamma$  and IL-6, induced expression levels of fucosylation in primary microglia, as well as in glial cell lines. To understand the underlying mechanism, we used the CRISPR/Cas9 system to knockout (KO) the Fut8 gene in BV-2 cells, a

model cell for microglia cells, and C6 cells, a glioma cell lines. Cell motility and iNOS expression were easily induced by IFN- $\gamma$  in Fut8- KO BV-2 cells compared with wild-type (WT) cells. In a similar manner, C6 KO cells showed a higher response to IL-6-stimulated phospho-STAT3 signaling, compared with wild-type cells. This phenomenon was further confirmed by primary astrocytes treated with 2-fluoro-L-fucose, a specific inhibitor for fucosylation.

These results clearly demonstrate the importance of core fucosylation in glial cells, which regulates the states of neuroinflammation by modulating the sensitivity of glial cells to inflammatory mediators. Taken together with previous finding, suggesting disorders found in cranial nerves system of Fut8<sup>-/-</sup> mice are caused by not only neurons but also glial cells dysfunction.

### 〈参考文献〉 主論文, 参考論文

- 1) Lu, X., Zhang, D., Shoji, H., Duan, C., Zhang, G., Isaji, T., Wang, Y., Fukuda, T., Gu, J., Deficiency of  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase promotes neuroinflammation by increasing the sensitivity of glial cells to inflammatory mediators. *Biochim. Biophys. Acta.* 2019 Mar;1863 (3):598–608.
- 2) Zhang, G., Isaji, T., Xu, Z., Lu, X., Fukuda, T., Gu, J. N-acetylglucosaminyltransferase-I as a novel regulator of epithelial-mesenchymal transition. *FASEB J.* 2019 Feb;33(2):2823–2835.



## 糖尿病性腎症におけるグロボ系糖脂質の生理学的役割

新田 昂大

東北医科薬科大学大学院薬学研究科

糖尿病性腎症は、糖尿病の主要な合併症の一つであり、透析導入の主な原因疾患として問題となっている。糖尿病性腎症は、腎機能がひとたび低下・進行すると治療を行っても完全には回復せず、進行を遅らせることしかできない。したがって、早期発見と新規治療のための病態生理学的解析が重要となる。スフィンゴ糖脂質は、スフィンゴ脂質であるセラミドとグルコースやガラクトース、シアル酸などの糖で構成されている。セラミドは、スフィンゴシン塩基に脂肪酸（アシル基）がアミド結合で結合しており、多くの分子種が存在している。セラミド分子種の多様性は、アシル鎖長〔長鎖脂肪酸（C16-20）と極長鎖脂肪酸（C22-26）〕や修飾（2-水酸化・二重結合）が異なる脂肪酸によって、セラミドが構成されるため生じる。スフィンゴ糖脂質は、がん、糖尿病、神経変性疾患など、さまざまな疾患において病態生理学的役割を担っていることが知られている。しかし、糖尿病性腎症におけるスフィンゴ糖脂質の病態生理学的役割については、いまだ不明である。本研究では、糖尿病性腎症におけるスフィンゴ糖脂質の病態生理学的な意義を明らかにするために、腎臓のスフィンゴ糖脂質を解析した。その結果、糖尿病モデルマウスや高脂肪食負荷マウス、ストレプトゾトシン誘導性1型糖尿病マウスの腎臓で発現変化スフィンゴ糖脂質が異なることが判明した。食欲抑制に関与するレプチン受容体に変異した *db/db* マウスでは、グルコシルセラミドやラクツシルセラミドの発現が増加することが報告されているが、本研究でグロボ系スフィンゴ糖脂質（Gb3Cer）の発現が、コントロールマウスと比較して低いことを見いだした。糖尿病は複数の遺伝因子と環境因子の両方が発症に関与することから、糖尿病発症に複数の疾患感受性遺伝子が関与する KK マウスに高脂肪食負荷することで、スフィンゴ糖脂質の病態生理学的意義を検討した。腎臓のスフィンゴ糖脂質発現を解析した結果、*db/db* マウスとは対照的にグロボ系スフィンゴ糖脂質が発現

増加していた。*db/db* と KK マウスの腎臓で、発現変化スフィンゴ糖脂質が対照的な理由を明らかにするために、レプチン遺伝子に変異した *ob/ob* およびストレプトゾトシン誘導性1型糖尿病マウスの解析を行った。*ob/ob* マウスは、*db/db* マウスと類似の発現変化パターンを示し、*ob/ob* マウスへのレプチン投与は腎 Gb3Cer の発現量を、コントロールマウスと同レベルまで回復させた。興味深いことに、ストレプトゾトシン誘導性1型糖尿病マウスも、*ob/ob*、*db/db* マウスと同様に腎 Gb3Cer の発現が低下していた。ストレプトゾトシン誘導性糖尿病マウスは、インスリンの欠乏によりレプチンが合成・分泌される脂肪組織の激減、それに伴う低レプチン血症を呈する。また、KK マウスの場合、過食や高脂肪食負荷の結果、脂肪組織が肥大し高レプチン血症を呈する。これらの事実を踏まえると、上記の結果は、レプチンが腎臓のグロボ系糖脂質の発現に関与していることを示唆している。

最近の研究では、スフィンゴ糖脂質の構成脂肪酸が異なる分子種が、生理活性に大きな影響を与えることが示されつつある。したがって、糖尿病性腎症に関連して発現変化スフィンゴ糖脂質の分子種を解析することは、病態生理学的に重要である。本研究では、高脂肪食を8週間負荷した KK マウスの腎臓で、増加が確認されたグロボ系糖脂質の分子種解析を、液体クロマトグラフィー質量分析計を用いて行った。その結果、飽和の極長鎖分子種（C22, C23, C24）が特に増加していた。糖尿病抵抗性の C3H/HeN マウスの腎臓では、KK マウスの腎臓で発現の低い2-水酸化脂肪酸が結合した分子種が高発現していた。上記の結果より、グロボ系糖脂質の病態形成への関与が示唆されることから、糖尿病性腎症の病態形成に重要な炎症反応における、グロボ系糖脂質の炎症惹起活性の有無をヒト単球やマウス骨髄由来マクロファージを用いて評価した。その結果、極長鎖グロボ系糖脂質は、Toll-like receptor 4 (TLR4) リ

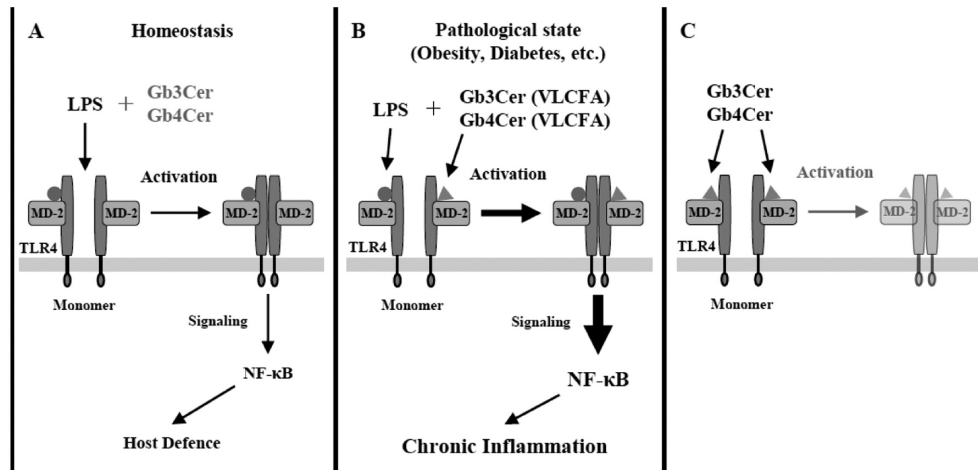


Fig. 1. Working hypothesis for the action of Gb3Cer and Gb4Cer on TLR4 signaling.

グランド (LPS, HMGB1) の存在下, TLR4 選択的なポジティブモジュレーターとして炎症促進活性を持つことが示唆された (Fig. 1).

高血糖状態の慢性な持続により, 終末糖化産物 (AGEs) の産生や酸化ストレスが誘起され, 腎臓への活性化マクロファージの浸潤やメサンギウム細胞の TLR4 発現が上昇する. 加えて, 糖尿病では LPS や HMGB1 などの血中濃度も上昇することから, 腎臓は炎症が惹起されやすい状態に陥っている. レプチンは視床下部に作用し食欲抑制やエネルギー消費亢進に関わるだけでなく, 免疫細胞に作用することで炎症性サイトカインの分泌を促進し, 炎症反応に関与する. 炎症性サイトカインは, 腎糸球体細胞のグロボ系糖脂質の発現を増加させる. したがって, 高脂肪食負荷により肥大した脂肪組織から分泌促進されたレプチンが, 腎臓のグロボ系糖脂質の発現を増加させ, 増加したグロ

ボ系糖脂質が, TLR4 リガンド存在下, TLR4 に作用することで炎症反応を促進し, 糖尿病性腎症の病態形成に関与していることが本研究より示唆される. レプチンによる腎臓のグロボ系糖脂質の発現変化メカニズムのさらなる解明により, 糖尿病性腎症の新たな診断法や治療薬開発の進展につながることを予想される.

#### 〈参考文献〉

Globo-series glycosphingolipids enhance Toll-like receptor 4-mediated inflammation and play a pathophysiological role in diabetic nephropathy, Takahiro Nitta, Hirotaka Kanoh, Kei-ichiro Inamori, Akemi Suzuki, Tomoko Takahashi, and Jin-ichi Inokuchi, *Glycobiology*, cwyl05, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwyl05>, advance online publication.



# 幼少期ストレスによる成人喘息発症機序の解明を目指したモデルマウスを用いた研究 —— 免疫寛容の誘導に対する幼少期ストレスの影響と成人喘息発症 ——

大内 竜介

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 病態生理学教室

## 【背景・目的】

気管支喘息は喘鳴や呼吸困難、繰り返す咳嗽を症状とする慢性疾患であり、気道狭窄や気道過敏性の亢進、持続する炎症により惹起される組織リモデリングが特徴的である。喘息における炎症反応は、血清 IgE 増加や好酸球浸潤により引き起こされ、これらは 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) とインターロイキン (interleukin; IL) -4, IL-5, IL-13 といった Th2 サイトカインによって生じる。健常者であれば制御性 T 細胞 (Treg) による抑制、制限を介し免疫バランスは維持されているが、喘息患者では末梢血中や喀痰中の Treg 数の減少や活性の低下が認められる。Treg による免疫反応の制御が欠如すると、免疫バランスの不均衡を引き起こし、結果として Th2 免疫反応を特徴とした気道炎症を維持・発達させてしまうと考えられている。喘息の発症には様々な因子が相互に関連しており、遺伝子素因、アレルギー素因、性差などの個体因子やアレルギーや感染症、空気汚染物質、薬、精神的ストレスなどの環境因子、そして Treg の不調などが指摘されているものの詳細なメカニズムは不明である。

そこで私は、幼少期の精神的ストレス暴露は Treg の分化誘導を抑制することにより経気道的免疫寛容の成立を妨げ、結果として Th2 に偏った免疫反応に続くアレルギー性喘息の罹患率を増加させると仮説をたて、その検証のためにアレルギー喘息モデルマウスでの幼少期ストレスが経気道的免疫寛容誘導に与える影響について検討を行った。

## 【方法】

喘息モデルマウスは BALB/c 雌性マウスを用い、生後 24 日齢 (Postnatal Day 24: PND 24) と PND 29 に卵白アルブミン (OVA) と水酸化アルミニウムの混合液を腹腔内投与し、PND 76 にエアロゾル化した OVA を吸入させて作製した。また、免疫寛容誘導は PND 18 と PND 21 に OVA を吸入させて

行い、幼少期ストレスとして PND 17 から PND 22 に母子分離ストレス (MS) を 6 日間連続して負荷した。

はじめに、MS によるストレス負荷を評価するためストレス負荷前および PND 17, PND 19, PND 22 のストレス負荷後に血液を採取し、ストレスホルモンである血漿コルチコステロン (GC) 濃度を測定した。

喘息モデルにおける免疫寛容誘導の効果とそれに対する MS の影響を検討するため、PND 81 にメサコリンに対する気道過敏性、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症性細胞や炎症性サイトカイン、血漿中 OVA 特異的 IgE の測定を行った。また、PND 81 の肺組織切片を作成し PAS 染色により粘液産生細胞数を算定した。

次に抗原感作後の全身免疫の状態と寛容誘導および MS の効果の検討のため、PND 76 抗原暴露前の脾細胞を採取し OVA 存在下で 72 時間培養を行い、脾細胞増殖性と培養上清中の炎症性サイトカインの測定を行った。そして免疫寛容誘導の中心的役割を果たしている Treg に対する MS の影響を検討するため、PND 22 に気管支リンパ節 (BLN) を採取し BLN 中の Treg についてフローサイトメトリー解析を行った。

## 【結果】

血漿 GC は MS 負荷前に比べ MS 負荷後に有意に増加し、また非 MS 負荷マウスに比べ MS 負荷マウスで有意に増加した。

喘息モデルマウスにおける抗原負荷後のメサコリンに対する気道反応性は喘息マウスに比べ寛容誘導マウスで有意に低下したが、寛容誘導に加え MS 負荷により増加回復がみられた。BALF 中の炎症性細胞や炎症性サイトカイン、血清中 OVA 特異的 IgE においても同様の結果であった。粘液産生についても気道反応性と同様の結果となった。しかし、喘息マウスと MS 負荷マウスについては、

いずれも差は見られなかった。

脾細胞の OVA に対する増殖性は免疫寛容誘導下では抑制されたが、MS 負荷により増加が見られた。免疫寛容非誘導下においては MS の有無による増殖性の変化は見られなかった。培養上清中のサイトカインについても同様に Th2 サイトカインである IL-4 について、免疫寛容誘導下での低下と MS 負荷による増加回復が見られた。

BLN 中の Foxp3<sup>+</sup>Treg についても同様に、免疫寛容誘導により増加が見られたが MS 負荷により減少していた。免疫寛容非誘導下においては MS の有無による変化は見られなかった。

### 【考察】

喘息モデルマウスにおいて、免疫寛容の誘導によって減弱した気道炎症が MS 負荷により増加回復していたこと、また、免疫寛容非誘導下では MS 負荷による変化が見られなかったことから MS は直接気道炎症を惹起するのではなく、免疫寛容の成立を阻害することによって喘息発症に関与すると考えられる。さらに、BLN 中の Treg 数が免疫寛容誘導により増加し MS 負荷によって減少して

いたことから、幼少期の精神的ストレスへの暴露は、免疫寛容の中心的役割を果たす Treg の分化誘導を抑制し、免疫寛容の成立を阻害することにより成人喘息発症を引き起こすと考えられる。

### 【結論】

本研究結果より、喘息モデルマウスにおいて MS は Treg 分化誘導を抑制することにより経気道的免疫寛容の成立を妨げ、結果として Th2 型免疫反応に続くアレルギー性喘息の発症を増加させることが示唆された。

### 〈参考文献〉主論文（原著論文）

Ryusuke Ouchi, Tasuku Kawano, Hitomi Yoshida, Masato Ishii, Tomomitsu Miyasaka, Yuichi Ohkawara, Motoaki Takayanagi, Tomoko Takahashi, Isao Ohno. Maternal separation increases susceptibility to the development of allergic airway responses by inhibiting respiratory tolerance in mice. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2018 Nov;246(3):155-165.

## 多剤耐性グラム陰性桿菌に対する抗菌化学療法と耐性獲得制御に関する研究

早川 幸子

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 臨床感染症学教室

新規抗菌薬の開発により、細菌感染症の治療成績が著しく向上した一方で、近年 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 産生菌, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP), multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* などの多剤耐性菌が相次いで出現し、世界的な脅威になっている。この耐性菌に対する対策を講じない場合、耐性菌関連感染症による死亡者数が、2050年までに1000万人/年に増加するとの予測が2014年に公表された。これを受け2015年にWHOにおいてAntimicrobial resistance (AMR) global action planが採択され、2016年には本邦でも、AMR対策アクションプランが公表された。本邦のアクションプランは、global action planの「1. 普及啓発・教育」、「2. 動向調査・監視」、「3. 感染予防・管理」、「4. 抗微生物剤の適性使用」、「5. 研究開発・創薬」に「6. 国際協力」を加えた6つのバンドルからなる。

本研究の第1章では「2. 動向調査・監視」として、わが国で臨床分離された多剤耐性菌6種を含む計260株に対し、海外から緊急導入された新規抗菌薬tigecyclineの抗菌力を調査した。

ESBL産生株を含む*Escherichia coli*, ESBL産生*Klebsiella* spp. (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*), imipenemおよびciprofloxacinの2剤耐性株を含む*A. baumannii*に対するtigecyclineの感受性率は100%であった。一方、MDRPを含む*P. aeruginosa*についてtigecyclineは全て耐性であり、ESBL産生*Proteus mirabilis*に対する感受性率は15.4%であった。以上の結果より、tigecyclineの薬剤感受性は欧米の成績と同等であり、*P. aeruginosa*と*P. mirabilis*を除く、多剤耐性グラム陰性桿菌の感染症治療に有用であると考えられた。

第2, 3章においては、「5. 研究開発・創薬」の一環として、tigecyclineの適応外菌種であり、院内感染の代表的な起因菌である*P. aeruginosa*を用い、多剤耐性の獲得をReactive oxygen species

(ROS)が助長するか否か、またそのメカニズムを解明し、抗ROS薬が耐性獲得を制御しうる可能性について検討した。

感染症発症時には、その起因菌はMinimum inhibitory concentration (MIC)以下の濃度の抗菌薬に加え、白血球より放出されるROSにも曝露される。第2章では、*P. aeruginosa* PAO-1(標準株)を用い、その代表的抗緑膿菌薬(piperacillin, levofloxacin, ceftazidime, meropenem, amikacin)への曝露、および生体内ROSの要素としてhydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )を用いて負荷を行い、多剤耐性獲得について検討した。負荷薬剤以外への交差耐性を示し多剤耐性が誘導された株について、キノロン耐性決定領域(QRDR)の遺伝子変異、および $\beta$ -ラクタム系薬の耐性遺伝子である*ampC*, *mexA*, *oprD*のmRNA発現解析を実施した。

sub-MIC piperacillinおよび $H_2O_2$ 負荷によりpiperacillin耐性に加え、levofloxacinへの交差耐性が確認された。この交差耐性のメカニズムとして、D2ポーリンをコードする*oprD*のmRNAの発現量が、親株に比し30%以下に低下した。今回確認された多剤耐性の獲得は、抗ROS薬である $\alpha$ -リポ酸誘導体「sodium zinc histidine dithiooctanamide (DHL-His-Zn)」の添加により抑制された。以上の成績からsub-MICの抗菌薬暴露に加え、ROSによる酸化ストレスが*P. aeruginosa*における多剤耐性化の重要な因子であることが示唆された。

第3章では、臨床分離株においても同様に、抗菌薬以外にROSがその多剤耐性化に関与し、さらに抗ROS薬がその出現抑制に寄与するか検討した。*P. aeruginosa*の臨床分離株20株を用いpiperacillinおよび $H_2O_2$ を用いた*in vitro*耐性誘導試験を実施した。sub-MIC piperacillinと1 mM  $H_2O_2$ にて24時間負荷した後、生残した株を同濃度の薬剤含有培地に植え継ぐ操作を5回繰り返し、piperacillinとlevofloxacinのMIC変化を観察した。交差耐性獲得メカニズムとして、QRDRの遺伝子変異の確認、および薬剤排出ポンプをコードする

*mexA*, *mexY*, *mexC* と *oprD* の mRNA の発現量を解析した。Piperacillin および levofloxacin の多剤耐性を獲得した株は、20 株中 4 株 (20%) であった。これら 4 株は、QRDR の遺伝子変異は確認されなかったが、*mexA*, *mexY*, *mexC* の発現亢進が 3 株、*oprD* の発現低下が 1 株に認められた。

本検討では、piperacillin 負荷が levofloxacin の交差耐性を誘導し、他の  $\beta$ -ラクタム系薬の meropenem と ceftazidime ではこうした傾向は確認されなかった。Ceftazidime を排出する主な薬剤排出ポンプは MexAB-OprM であるが、piperacillin は 3 種類のポンプ (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexXY-OprM) から排出される。フルオロキノロン系薬はこれら全てのポンプから排出されることが知られている。したがって、piperacillin の負荷により 3 種類のポンプ全てが同時に発現亢進したため、フルオロキノロン系薬に交差耐性を獲得したと考えられた。また meropenem の負荷株は、その強力な作用により早急に殺菌されたため耐性が生じなかったと考えられた。

これらの 4 株の遺伝子学的相同性は確認されなかったが、その多剤耐性化は、DHL-His-Zn の添加により抑制された。今回の検討から、ROS が緑膿菌臨床分離株においても多剤耐性化を助長することが明らかになった。

今回示された DHL-His-Zn の多剤耐性獲得抑制作用は、他の抗 ROS 薬として知られている ascorbic acid や glutathione と比較し、最も優れていた。DHL-His-Zn は酸化ストレスを軽減することで癌化

学療法後の脱毛を抑制するなど、すでに外用薬として臨床応用されている。In vivo でのラット腎虚血モデルにおいても組織障害を軽減するなど、血流により感染部位へ分布することが可能と考えられる。今後さらなる検討が必要ではあるが、DHL-His-Zn は酸化ストレスを軽減し、多剤耐性化を抑制する抗菌化学療法の補助薬として期待された。

### 主論文 (原著論文)

- 1) Sachiko Hayakawa, Masato Kawamura, Takumi Sato, Taizou Hirano, Toshiaki Kikuchi, Akira Watanabe, Shigeru Fujimura. An  $\alpha$ -Lipoic acid derivative, and anti-ROS agent, prevents the acquisition of multi-drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Infection and Chemotherapy, 2019; 25: 28–33.
- 2) Sachiko Hayakawa, Emiko Furukawa, Masato Kawamura, Toshiaki Kikuchi, Taizou Hirano, Akira Watanabe, Shigeru Fujimura. Exposure to reactive oxygen species and piperacillin leads to multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Clinical Microbiology, 2016; 5: 1000264.
- 3) 早川幸子, 藤村 茂, 古川恵美子, 河村真人, 宇野浩一, 佐藤寿夫, 渡辺 彰. 東北地方で臨床材料から分離された各種病原細菌に対するチゲサイクリンの抗菌力. 日本化学療法学会雑誌, 2015; 63(6): 576–579.