

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 31 年度博士課程入学

氏 名 嶋津 京子
指導教員名 岡田 晋治

論文題目 グルコシルセラミドおよびその代謝物による
腸管上皮サイトカイン産生制御機構の研究

研究の背景と目的

セラミドは表皮の最外層である角質層に豊富に含まれ、水分を保持し、刺激から皮膚を守るバリア機能に寄与している。また、その代謝物は脂質メディエーターとしてアポトーシスや細胞増殖・分化・遊走に関わる。一方、セラミドの経口摂取は皮膚でのセラミド合成酵素の発現を上げ、セラミド量を増加させることで皮膚のバリア機能を向上させることが報告されている。しかし、日常のセラミド摂取量に対して極わずかな摂取量で皮膚保湿効果がみられること、吸収率が極めて低いこと、その上、皮膚にて植物由来のスフィンゴイド塩基が検出されないことを考慮すると、経口摂取したセラミドやその代謝物が皮膚に達して効果を発揮しているとは考えづらく、その作用メカニズムの全体像はまだ十分に解明されていない。

最近では、植物由来セラミドの経口摂取により脾細胞における IFN- γ や IL-2 の産生能が上昇し、免疫応答を Th1 優位に調節するといった免疫機能への関与が示唆されている。腸管を形成する腸管上皮細胞は食品成分を吸収するだけでなく、物理的バリアとしての機能や様々な異物に対して迅速に免疫応答を誘導する働きがある。本研究では、植物由来グルコシルセラミドおよびその代謝物が、吸収されずとも腸管において免疫系に関連するなんらかの作用を有すると考え、ヒト結腸腺癌細胞株 HT-29 を腸管上皮細胞モデルとして検証を行った。

第1章 グルコシルセラミドの腸管上皮細胞モデルにおける新規機能の解析

第一節 グルコシルセラミドおよび代謝物の抗ウイルス応答に対する影響

合成二本鎖 RNA リガンドである Poly(I:C)は IFN- β の産生を誘導し、その誘導能力を調べることは宿主の抗ウイルス免疫応答への関与を評価するためのモデルとして確立されている。そこで、腸管上皮細胞株 HT-29 における植物由来グルコシルセラミドやその代謝物であるスフィンガジエニンあるいは動物由来のスフィンゴシンの Poly(I:C)に対する抗ウイルス応答を調節する能力を評価した。その結果、スフィンガジエニン *cis* 型とともに 18 時間培養した HT-29 では、Poly(I:C)単独刺激により誘導される *IFNB* の発現を高めることが示され、腸管上皮においてスフィンガジエニンが抗ウイルス応答を高める能力をもつ可能性が示唆された。

第二節 植物由来スフィンゴイド塩基による発現変動遺伝子の網羅的解析

スフィンガジエニン (*cis*) の腸管での作用を調べるために、DNA マイクロアレイ法により *IFNB* の発現誘導が高まっている時点における遺伝子発現を網羅的に解析した。発現変動遺伝子の機能分類により *IFNB* の発現誘導だけでなく、初期の自然免疫応答に関与することが示唆された。また、パターン認識受容体に関する経路が活性化傾向にあること、複数の TLR リガンドおよび TLR が上流の活性化因子として予測された。また、興味深いことに発現変動遺伝子の多くが脂質合成の場である小胞体に濃縮されており、脂質の生合成・代謝関連の機能を活性化する能力があることが示唆された。

第2章 グルコシルセラミドおよびその代謝物の腸管上皮細胞モデルにおけるサイトカイン産生への影響

第一節 グルコシルセラミドおよび代謝物の *IFNB* 発現への影響

植物由来スフィンガジエニン (*cis*) の *IFNB* 発現誘導が、添加のタイミングやリガンド刺激の有無、種類により変化するかを検証した。その結果、Poly(I:C)単独刺激と比較して、Poly(I:C)との共存下ではいずれのスフィンゴイド塩基も *IFNB* の発現を有意に上昇させた。一方、他のリガンド刺激として LPS との共刺激による影響を評価したところ、スフィンガジエニンのみ、LPS 刺激単独と比較して *IFNB* の発現を上昇させた。刺激のない状況にて代謝物単独の効果を評価したところ、スフィンガジエニン (*cis*) 自体に抗ウイルス応答を誘導する効果があることが示された。

第二節 グルコシルセラミドおよび代謝物の *TNF* 発現への影響

TLR リガンド刺激は I 型 IFN の誘導だけでなく、炎症性サイトカインも誘導する。そこで、スフィンゴイド塩基の炎症性サイトカイン *TNF* の遺伝子発現への影響を調べたところ、Poly(I:C)単独刺激と比較し、Poly(I:C)とスフィンゴイド塩基の添加で有意に *TNF* の発現が上昇していた。大変興味深いことに LPS 刺激下では、LPS 単独刺激と比較し、LPS とスフィンゴイド塩基を添加したものでは *TNF* の発現が有意に減少していた。また、スフィンガジエニン (*cis*) は単独でも *TNF* の発現を有意に上昇させた。

第3章 グルコシルセラミドおよびその代謝物のサイトカイン産生に関わる経路および

受容体の探索

第一節 グルコシルセラミドおよび代謝物のサイトカイン発現に対する TLR 阻害剤の影響

スフィンゴイド塩基は Poly(I:C) に対する *IFNB* 応答を高め、LPS に対する *TNF* 応答を弱める可能性が示唆された。Poly(I:C) や LPS に対するサイトカインの誘導にはそれぞれ TLR3 および TLR4 が関与する。そこで、endosomal TLR を阻害するキナクリンを TLR3 の阻害剤として、TLR4 からのシグナル伝達を遮断するペプチドインヒビター (VIPER) を TLR4 に対する阻害剤として用いて、スフィンゴイド塩基によるサイトカイン発現誘導への影響を調べた。

その結果、TLR3 を含む endosomal TLR の機能を阻害すると、Poly(I:C) 刺激、LPS 刺激、無刺激のいずれの状況下においても、スフィンゴイド塩基の添加でみられた *IFNB* 誘導は抑制されたが、Poly(I:C) 刺激および無刺激下におけるスフィンゴイド塩基による *TNF* 誘導は抑制するものの、LPS 刺激下における *TNF* 発現には影響しなかった。また、Poly(I:C) 刺激下における *TNF* 誘導に関しては endosomal TLR 阻害によりほぼ完全に解除された。一方、TLR4 を阻害すると、Poly(I:C) 刺激、LPS 刺激、無刺激のいずれの状況下においてもスフィンゴイド塩基添加による *IFNB* および *TNF* 誘導が抑制された。TLR3 リガンドである Poly(I:C) 刺激においては完全な抑制ではないものの、LPS 刺激下や刺激のない状態では *IFNB* の発現誘導がほぼ完全に解除された。このことから、スフィンゴイド塩基のサイトカイン産生には endosomal TLR および TLR4 の両方が関連すること、さらに Poly(I:C) 刺激下での *TNF* 誘導には endosomal TLR が、LPS 刺激下での *IFNB* 発現誘導には TLR4 が強く関連することが示唆された。

第二節 グルコシルセラミドおよび代謝物のサイトカイン発現に関する経路への影響

TLR3 を含む endosomal TLR および TLR4 との関連が示唆されたので、I 型 IFN の産生に関わる TRIF 経路および炎症性サイトカインの分泌をもたらす MyD88 経路の転写調節因子の活性化をウエスタンブロッティングにより調べた。I 型 IFN の産生に関わる IRF3 は Poly(I:C) 刺激下のスフィンゴシンで有意に減少し、経路の活性化に必要なリン酸化 IRF3 (pIRF3) は LPS 刺激下のスフィンガジエニン (*trans*) で増加傾向にあった。一方、炎症性サイトカインの産生に関わる I κ B は Poly(I:C) 刺激下のグルコシルセラミドおよびスフィンガジエニン (*cis*) で有意に増加し、経路の活性化を示すリン酸化 I κ B (pI κ B) は Poly(I:C) 刺激下においてスフィンガジエニン (*cis*) で有意に増加、LPS 刺激下のグルコシルセラミド、スフィンガジエニン (*trans*) で減少傾向にあった。以上のことから、Poly(I:C) は TLR3 に受容されて主に I 型 IFN 発現を誘導するが、このシグナリングに対しグルコシルセラミドやその代謝物は炎症性サイトカインを誘導する経路を活性化する方向に作用し、一方、LPS は TLR4 に受容され、その局在に応じて炎症性サイトカインや I 型 IFN を誘導するが、このシグナリングに対し炎症性経路を不活性化し、I 型 IFN 経路を活性化する方向に作用していることが示唆された。

第三節 グルコシルセラミドおよび代謝物のサイトカイン発現に関する TLR 受容体への影響

スフィンゴイド塩基のサイトカイン産生作用に対して endosomal TLR、TLR4 およびその関連経路の関与が示されたため、受容体の発現への影響について解析した。まずグルコシルセラミドおよびスフィンゴイド塩基の *TLR3* および *TLR4* 発現への影響を調べたところ、*TLR3* 発現は、*IFNB* の発現が誘導される 6、9 時間においてスフィンゴイド塩基添加で減少していた。一方、*TLR4* 発現はスフィンガジエニン添加 3、6、9 時間において増加していた。一般に腸管上皮では *TLR3* は豊富に発現しているが、定常状態では *TLR4* の発現は低いとされ、炎症時など通常と異なる状況下で発現が上昇することが報告されている。そのため、スフィンガジエニン添加 6 時間における *TNF* 誘導は、スフィンガジエニン添加による *TLR4* の発現増加の影響を受けているかもしれない。

さらに、ヒト *TLR3* あるいは *TLR4* 遺伝子と誘導性 *SEAP* (分泌型胎児アルカリホスファターゼ) レポーター遺伝子をトランスフェクションしたヒト胎児腎細胞 HEK293 を用いて、スフィンガジエニン (*cis*) と TLR の相互作用を調べたところ、この系においてスフィンガジエニンは *TLR3* または *TLR4* と相互作用を示さなかった。しかし、それぞれの相対するリガンドとスフィンガジエニンの共存下ではリガンド単体の時と比較して高い活性が示された。

総括

本研究によりセラミドの代謝物であるスフィンゴイド塩基にはサイトカイン産生を調節する効果があること、その種類や強弱はスフィンゴイド塩基の種類や存在するリガンドによって変化することが明らかとなった。

Poly(I:C)存在下でのスフィンゴイド塩基による *TNF* 誘導は endosomal TLR の阻害により解除され、LPS 存在下および無刺激下でのスフィンガジエニンによる *IFNB* 誘導は *TLR4* のシグナル伝達を遮断することで解除された。さらに、Poly(I:C)刺激下ではスフィンゴイド塩基で炎症性経路を活性化する方向に、LPS 刺激下では炎症性経路を不活性化し、I 型 IFN 経路を活性化する方向に作用していることが示唆された。以上のことから、スフィンゴイド塩基は *TLR3* で受容したシグナルを炎症性経路を活性化させる方向にシフトさせ、また、スフィンガジエニンは *TLR4* で受容したシグナルを I 型 IFN 経路を活性化する方向にシフトさせることが示唆された。LPS は膜に局在する *TLR4* に受容された場合は炎症性サイトカインを誘導し、エンドソーム上の *TLR4* に受容された場合は I 型 IFN を誘導することが知られている。今回の結果から、スフィンガジエニンは *TLR4* の局在を膜上からエンドソーム上へ移動させるなどして炎症性経路を不活性化し、I 型 IFN 経路を活性化させる可能性が示唆された。スフィンゴイド塩基は細胞内シグナリングに作用して免疫応答に偏りが生じないよう調節し、恒常性維持に貢献しているのかもしれない。