

スフィンゴ脂質を分子標的としたガン治療法の開発に関する研究

所属機関 金沢医科大学血液免疫内科学
研究者名 梅原久範

《研究の概要》

免疫学における細胞活性化機構において細胞膜マイクロドメイン（リピッドラフト）の存在が重要である。すなわち、細胞膜には不飽和型脂肪酸で構成される領域とスフィンゴリエリンなどの飽和型脂肪酸とコレステロールから構成される領域が存在する。後者がリピッドラフトで、細胞活性化や細胞間接着において、細胞膜上に散在していたリピッドラフトが凝集し大きなクラスターを形成していく。その過程で、凝集ラフトの中に T 細胞レセプターや Fas などの刺激分子が移行しシグナル伝達の足場を形成する。従来、ラフトの機能は、共存する GangliosideGM1 を指標に、あるいはコレステロール除去によるラフトの破壊によって研究されてきた。しかし、ラフトの中心的な構成脂質であるスフィンゴリエリンに関しては、その合成酵素が同定されていなかったことや、特異的にスフィンゴリエリンを同定する手段が存在しなかったことなどより解析が遅れていた。

我々は、世界に先駆けてスフィンゴリエリン合成酵素の遺伝子(SMS1)の同定に成功した(J. Biol. Chem. 2004; 279: 18688-18693)、さらに、スフィンゴリエリンに特異的に結合するライセニンを用いることにより、スフィンゴリエリンをターゲットとしてラフト機能を解析する手法を確立した。その結果、細胞膜スフィンゴリエリンが T 細胞レセプターを介した活性化や Fas を介したアポトーシスにおいて重要な役割を担っていることを明らかにした。これらの結果は、自己免疫疾患における活性化 T 細胞の制御や抗がん剤耐性となった腫瘍細胞の殺傷に深く関わっており、スフィンゴリエリンを標的とした新たな免疫抑制剤や抗がん剤の開発に繋がる可能性が強い。

さらに、我々は、世界に先駆けて SMS1 ノックアウトマウスの作成に成功し、その表現型および T 細胞機能について解析中である。この SMS1 ノックアウトマウスを用いて、関節リウマチのモデルであるコラーゲン誘導関節炎や自己免疫性肝炎のモデルである Concanabalin A 誘導肝炎モデルの作成に成功し、自己免疫疾患におけるスフィンゴリエリンの関与を明らかにしつつ、疾患発症を制御するための手法を解析中である。今回の我々の結果が、細胞膜リピッドラフト/スフィンゴリエリンをターゲットとした新たな免疫抑制剤の開発に結びつくことと確信する。

梅原 久範	金沢医科大学 血液免疫内科学教授	研究全般の統括 モデルマウスの解析
岡崎 俊朗	鳥取大学医学部 臨床検査医学・血液腫瘍内科教授	がん発症および抑制機序の解析
五十嵐靖之	北海道大学大学院 生命科学院院長	スフィンゴ脂質代謝の解析
矢富 裕	東京大学医学部附属病院 臨床検査医学教授	スフィンゴ脂質関連酵素の解析

研究報告

I 研究目的

申請者のグループは、1991年に世界で初めてスフィンゴ脂質セラミド (Cer) が白血病細胞の分化誘導時にシグナル伝達分子として機能することを発見し、その後のスフィンゴ脂質を介したガン研究の端緒を開いた。その後、種々のストレスによる細胞死誘導時にセラミドが、また、細胞増殖刺激ではセラミド分解産物であるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) が脂質メディエーターとして働き、セラミド/S1Pバランスの制御が白血病細胞の細胞死の制御に非常に強く相関することを多くの論文上で明らかにした。臨床的には、白血病患者由来の芽球細胞においてもセラミド代謝酵素のスフィンゴミエリン合成酵素 (SMS) やグルコシルセラミド合成酵素 (GCS) が抗ガン剤に耐性化した症例ではコントロールに比べて優位に増強するためセラミドの細胞内量が増加せず、細胞死誘導の抑制が認められることを報告した。また、Fas リガンドによる細胞死誘導時には、SMase によりセラミドが増加しアポトーシス誘導が惹起されるが、耐性の細胞では SMS や GCS、さらには Sph-kinase が活性化することでセラミド/S1Pバランスを負に誘導することで細胞死を免れる機構が証明された (図1)。すなわち、種々のスフィンゴ脂質代謝・生成酵素を介して制御されたセラミド/S1Pバランスがガンの細胞死を調節することが明らかになり、ガン細胞や動物病態モデルでのスフィンゴ脂質代謝ネットワークの動態 (“スフィンゴリピドーム”) の制御が、ガン細胞の細胞死誘導に不可欠だと考えられた。

一方、細胞の活性化や Fas を介したアポトーシスの際に、活性化レセプターや Fas が細胞膜上でクラスターを形成する。その際に、活性化の足場となるのが細胞膜マイクロドメイン (リピッドラフト) であり、その主要構成脂質がスフィンゴミエリンである (図2)。従って、スフィンゴミエリンを標的として細胞の活性化やアポトーシスを制御しうる可能性がある。

2006年に、申請者のグループは、これまでその機能が未知であったスフィンゴミエリン合成酵素 (SMS1 および SMS2) の遺伝子クローニングに成功した。ここに至り、“スフィンゴリピドーム”制御を介してセラミド/S1Pバランスを制御し、腫瘍細胞における細胞死を誘導強化すること、細胞膜リピッドラフト制御を介して細胞活性化を抑制する手法が解析可能となった。

本研究課題では、スフィンゴミエリン合成酵素のノックダウン細胞およびノックアウトマウスを作成し、リピッドラフトの細胞活性化およびアポトーシスにおける役割を明らかにする。さらに、ノックアウトマウスを用いて疾患モデルを樹立し、自己免疫疾患および腫瘍発生の機序を明らかにする。これらの成果は“スフィンゴリピドーム”を効率的に制御し、血液腫瘍疾患および自己免疫疾患に対する分子標的治療法の新規開発に繋がるものと確信する。

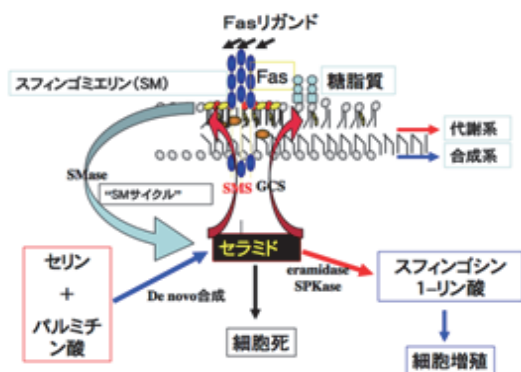


図 1

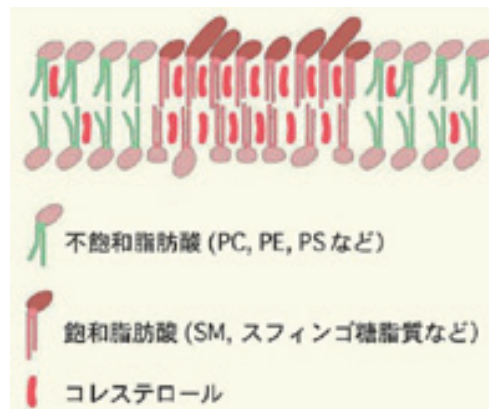


図 2

II 実験計画および材料と方法

A. *in vitro* におけるリピッドラフト/スフィンゴミエリンの解析

1) スフィンゴミエリン欠失細胞株と SMS1-KO マウス T 細胞のシグナルの解析。

a) Jurkat 細胞にスフィンゴミエリン合成酵素遺伝子 SMS1-siRNA を遺伝子導入し、ノックダウン細胞をクローニングし樹立する。この細胞を用いて T 細胞セプターを介した T 細胞活性化におけるリピッドラフトの関与を解析する。同様の検討を SMS1-KO マウスの脾臓 T 細胞で行って比較検討する。

b) 細胞膜ラフトの confocal microscopy による解析：細胞膜でのフィンゴミエリンの存在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 により解析する。さらに、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 により解析する。

c) 細胞膜ラフトの sucrose gradient による解析：CD3 刺激前後で、1%濃度の Triton X にて両細胞を可溶化し、20000G で 16 時間 sucrose gradient で分離しリピッドラフト分画を回収する。ラフト分画における、Ganglioside GM1 量、Lck 量、LAT 量、tubulin 量を western blotting 法で比較定量する。刺激前後における TCR 量の変化をスフィンゴミエリン欠失細胞および SMS1-KO マウス T 細胞で比較検討する。

d) 細胞膜および細胞内のスフィンゴミエリンおよびセラミド量の測定：両細胞を L-[14C]serine で標識し、細胞を可溶化後、細胞膜スフィンゴミエリン量およびセラミド量を TLC で展開分離し、両細胞における含量を測定する。抗 CD3 架橋刺激前後における細胞膜スフィンゴミエリンおよびセラミド量の変化を比較検討する。

e) T 細胞活性化における細胞膜スフィンゴミエリンおよびリピッドラフトの関与：両細胞を抗 CD3 抗体で刺激培養し、活性化マーカーである CD25, CD69, CD45RO の発現を FACS 解析する。両細胞を抗 CD3 抗体で刺激培養し、産生される IL-2, IFN- γ 量を ELISA 法で測定する。

B. in vivoにおけるリピッドラフト/スフィンゴリエリンの解析

1) SMS1 ノックアウトマウスの解析。

- a) 国立長寿医療センター研究所 渡辺研博士によって、常法通りに C57/BL6 バックグラウンドで 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-K0 マウス (SMS1+/-) を樹立しえた (論文未発表)。現在、B6 バッククロスにて 10 継代以上を維持している。
- b) Homozygote の SMS1-K0 マウスは sterile (不妊) であるために、Heterozygote の掛け合わせで出産させ 4 週齢において genocheck を行い、Homo、Hetero、Wild を同定する。
- c) 6 週齢、12 週齢で、Homo、Hetero、Wild の末梢血、脾臓血、胸腺のリンパ球サブセットの FACS 解析を行う。Homo、Wild マウスから MACS beads を使い CD4 陽性 T 細胞を分離する。
- d) 抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体の架橋刺激を加え、細胞増殖能を WST assay で検討する。
- e) 同上刺激による 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能を検討する。

C. 疾患モデルマウスにおけるスフィンゴリエリンの解析

1) 自己免疫性肝炎 (Concanavaline A 誘導肝炎モデル) の解析

- a) Homo、Wild マウスの尾静脈から、5mg/kg 相当の Concanavaline A を注射する。
- b) 2 時間、4 時間、8 時間、12 時間、24 時間の時点で、眼窩血管よりヘマトクリット管を用いて採血し、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 にて測定する。
- c) 同上の血清中の AST/ALT、LDH を測定し、ConA-誘導肝炎の発症ピークを決定する。
- d) Homo、Wild マウスおのおの 10 匹以上を用意し、Concanavaline A を尾静脈から注入する。
- e) 24 時間の時点でマウスを屠殺し、血液採取後、肝臓および脾臓を摘出する。
- f) 血清中の AST/ALT、LDH を測定する。
- g) 上記血清中の 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 multi-ELISA analyzer で測定を行う。
- h) 上記の肝臓および脾臓の病理標本を作成し肝炎重症度を検討する。
- i) 同時に、凍結標本より免疫組織染色法により浸潤 T 細胞の同定を行う。
- j) 同様に、凍結標本より肝臓組織での 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 にて測定する。

現在、SMS1-K0 マウスでは、Concanavalin に対する反応性が低下しているため、肝炎の発症が軽減されているという結果を得ている (図 4)。

2) 関節リウマチ (コラーゲン誘導関節炎モデル) の解析

SMS-K0 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、一般的には誘導関節炎の発症率は低い。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-K0 マウスを DBA マウスと高配を重ねている。8 世代以降の SMS1-K0/DBA マウスを用いて、以

下の検討を行う。

- a) 6週齢の SMS1-KO/DBA マウスの Homo、Wild 各々 10 匹以上において下記の検討を行う。
- b) 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する。
- c) アジュバンド免疫は 21 日目に行う（100mg CII+250mg *M. tuberculosis*）。
- d) 3 肢の腫脹関節点数、関節腫脹径を連日測定する。
- e) ピーク時における関節の病理標本を作成し、滑膜増殖、軟骨破壊などの程度を評価する。
- f) 関節組織における IL-2、IL-4、IL-6、TNF- α 、IL-1 α , β 、IFN- γ 、IL-12、IL-18 などのサイトカイン産生を RT-PCR 法で測定する。
- g) コラーゲン注入後、1 週、2 週、3 週、4 週で眼窩血管よりヘマトクリット管を用いて採血し、血清中の IL-2、IL-4、IL-6、TNF- α 、IL-1 α , β 、IFN- γ 、IL-12、IL-18 などのサイトカイン産生を RT-PCR にて測定する。

上記の結果を、SMS-KO マウスにおいて検討することにより、関節リウマチ発症における T 細胞機能の関与、特に細胞膜スフィンゴミエリンの関与を明らかにしうる。関節リウマチの治療においても、リピッドラフトをターゲットとした創薬の可能性が検討出来る。

3) SMS1 ノックアウトマウスにおけるハプテン誘導 SLE モデルの解析

全身性自己免疫性疾患の代表である SLE 患者末梢リンパ球は、刺激早期に過剰な活性反応が見られる。Tsokos らは、TCR ζ 鎖が Fc γ R の γ サブユニットに変換され、対応するチロシンキナーゼが ZAP70 から Syk に変わる為との仮説を提唱している。しかし、我々は SLE 患者末梢血 CD4 陽性メモリー T 細胞におけるリピッドラフトの発現が疾患活動性と共に増強していることを明らかにしており、ラフト強発現メモリー T 細胞が自己免疫発症に関与しているものと推測している。それを SMS1-KO マウスで確認する。ハプテン投与後、自己抗体や抗 DNA 抗体の出現頻度、補体値の変動、尿タンパク量などを測定し糸球体腎炎の発症様式、発症頻度、重症度などを解析する。

D) スフィンゴミエリン欠失細胞株の抗がん剤感受性の検討

- 1) Jurkat 細胞および JurkatSM/kd 細胞、WR-SM(+)細胞および WR/Fas-SM(-)細胞を各種抗癌剤（シクロフォスファミド、シスプラチン、トポテシン、ベルケードなど）で共培養しアポトーシスの差異を sub G1 法で FACS で解析し検討する。
- 2) 上記の感受性試験に加え、抗 Fas 抗体の共刺激による協調効果を検討する。
- 3) 上記細胞を各種抗癌剤で共培養し、Fas の発現を FACS で解析する。
- 4) 上記細胞を各種抗癌剤で共培養し、Fas の凝集を confocal microscopy で解析する。
- 5) 上記細胞を各種抗癌剤で共培養し、Fas によるアポトーシス経路のシグナル解析を行う。
（即ち、DISC 形成能、カスパーゼ活性、ミトコンドリア膜電位の測定を行う。）
- 6) アポトーシス関連のシグナル以外の経路として、FLIP のタンパク量の変化。p53 のリン酸化、MAP キナーゼカスケードの解析を行う。

III 研究成果

1) 細胞死（アポトーシス）における細胞膜スフィンゴミエリンの機能の解析（文献）：

SM 欠失細胞株 WR19L-SM(-)細胞に我々が同定した SMS1 遺伝子 c-DNA を遺伝子導入し、Geneticin

存在下で選択を行い、SM 合成回復株 WR19L-SMS1 細胞を樹立した。この細胞株を用いて以下の事柄を明らかにした。

- a) WR19L-SM(-)細胞および WR19L-SMS1 細胞を、抗 Fas 抗体 (CH11) で刺激しアポトーシスの相違を sub G1 法で FACS で解析した。WR19L-SM(-)細胞ではアポトーシスが著明に抑制されていたが、遺伝子回復させた WR19L-SMS1 細胞ではアポトーシスが有意に回復した。
- b) 両細胞における Fas 抗体刺激による Caspase 活性を測定したところ、WR19L-SM(-)細胞では Caspase-3, Caspase-8 とともに著明に低下していた。一方、WR19L-SMS1 細胞では著明な活性化が認められた。
- c) 両細胞における Fas 抗体刺激による DISC 形成を検討したところ、WR19L-SM(-)細胞では Fas に会合する FADD, Caspase-8 量とともに著明に低下していた。一方、WR19L-SMS1 細胞では著明な活性化が認められた。
- d) 両細胞における Fas 抗体刺激による Fas の凝集能、多量体形成能を検討したところ、WR19L-SM(-)細胞では Fas の凝集、多量体形成とともに著明に低下していた。一方、WR19L-SMS1 細胞では著明な活性化が認められた。
- e) 細胞膜リピッドラフトの局在と Fas の局在を confocal microscopy により検討した。MBP 結合 lysenin と PE 標識抗 MBP 抗体を用いて、Fas の Cluster 形成を FITC-, PE-標識 Fas 抗体で検出した。WR19L-SM(-)細胞ではリピッドラフトの凝集と Fas の凝集がともに著明に低下していた。一方、WR19L-SMS1 細胞では著明な活性化が認められた。
- f) ショ糖密度勾配法でラフト分画を回収し、両細胞のリピッドラフト分画における Fas および DISC 量を定量化した。WR19L-SM(-)細胞では Fas 刺激による Fas および DISC の移行が著明に低下していた。一方、WR19L-SMS1 細胞では著明な増加が認められた。
- g) 両細胞のラフト分画におけるセラミド産生量を検討したところ、WR19L-SM(-)細胞では Fas 刺激によるセラミド産生が著明に低下していた。一方、WR19L-SMS1 細胞では著明な増加が認められた。

以上より、細胞膜スフィンゴリエリンはラフト形成に関与し、Fas を初めアポトーシスに重要な分子のラフト移行に重要な機能を有している。その結果、効率よい Fas の凝集、DISC の形成、カスパーゼの活性化が起こりアポトーシスが誘導されていることを明らかにした (文献)。

2) スフィンゴリエリン (SM) 欠失 T 細胞株細胞株 (Jurkat/SM-細胞) の樹立と T 細胞機能の解析:

- a) Jurkat 細胞に SMS1-siRNA を遺伝子導入し、Geneticin 存在下で選択を行い、SM 合成ノックダウン細胞株を樹立した (Jurkat/SM-細胞)。
- b) Jurkat/SM-細胞は、細胞表面の T 細胞レセプターをはじめ、CD 3、CD 2、CD95 などの発現量に変化は無かった。また、細胞膜 gangliosideGM1 およびコレステロールの量に変化はなかったが、細胞膜スフィンゴリエリンは欠質していた。
- c) 両細胞を抗 CD3/CD4 抗体で架橋刺激を加え細胞活性を測定したところ、Jurkat/SM-細胞では、細胞増殖能、細胞接着能、サイトカイン産生能が著明に低下していた。
- d) 両細胞を抗 CD3/CD4 抗体で架橋刺激を加え活性シグナルを検討したところ、Jurkat/SM-細胞では、細胞内蛋白、LAT、TCR のチロシンリン酸化が著明に低下していた。さらに、LAT と ZAP70 との会合も有為に低下していた。

e) ラフト分画を回収し、両細胞のリピッドラフト分画における TCR および各種シグナル伝達物質を定量化した。 Jurkat/SM-細胞では TCR 刺激による TCR および ZAP70, PKC などのシグナル伝達物質のラフト内移行が著明に低下していた。

以上より、細胞膜スフィンゴリエリンはラフトを介して、T 細胞レセプターの活性化刺激に深く関与していることを明らかにした (文献)。

3) 自己免疫疾患におけるリピッドラフトの関与 :

全身性エリテマトーデス (SLE) は全身性自己免疫疾患の代表で、多彩な免疫異常を呈する原因不明の疾患である。

a) 末梢血からリンパ球を分離し、刺激培養によるメモリーT細胞のマーカーである CD45RO の発現とリピッドラフトの発現量を検討したところ、刺激時間に応じて、CD45RO およびリピッドラフトの発現量が増加した。

b) 患者末梢血よりリンパ球を分離し、CD4/CD45 陽性のヘルパーメモリーT細胞上のラフト発現を検討したところ、SLE の疾患活動性に比例して増強していた。

c) さらに、上記の異常は、SLE 患者で報告されている IL-10 の産生異常と関連していた。

以上の結果より、SLE で認められる免疫異常は、活性化自己反応性 T 細胞のよって引き起こされると推察されるが、今回我々が認めたメモリーTリンパ球上のラフト発現が、その活性化に深く関わっている可能性を明らかにした (文献)。

4) 抗癌剤シスプラチンによるアポトーシスと細胞膜スフィンゴリエリンとの関連 :

a) シスプラチン単独ではアポトーシス誘導能は軽微であるが、Fas 架橋刺激との協調により著明なアポトーシスが誘導された。

b) 同様に、シスプラチンと Fas 架橋刺激との協調により著明なカスパーゼ 8、カスパーゼ 3 の活性増強が誘導された。

c) さらに、シスプラチンと Fas 架橋刺激との協調により Fas-FADD-Caspae8 複合体である DISC の形成が著明に誘導された。

d) 上記の作用は、細胞膜スフィンゴリエリン欠質細胞 (WR19L-SM(-)細胞) では有意に弱く、スフィンゴリエリン合成回復株において顕著であった。

以上の結果は、シスプラチンの抗がん作用の発現には、リピッドラフトの構成脂質であるスフィンゴリエリンの存在が重要であること。その作用の一部分は、リピッドラフトに依存した Fas の凝集を介したアポトーシスであることを明らかにした (文献)。

5) トポイソメラーゼ阻害剤 (SN38) 誘導アポトーシスの解析 :

トポイソメラーゼ阻害剤であるイリノテカン (CPT11) は、近年、臨床導入された新たな抗がん剤である。CPT11 の活性体である SN38 について、以下の事柄を明らかにした。

a) SN38 は、Fas 誘導アポトーシスを協調的に増強した。

b) SN38 は、細胞周期制御キナーゼである Chk1 のリン酸化を誘導した。

c) SN38 は、がん抑制遺伝子である p53 のリン酸化を誘導した。

d) SN38 は、Fas と協調にて ATM-Chk1-p53 経路を増強した。

e) SN38 は、単独では p21 のリン酸化を増強したが、Fas との協調ではむしろ p21 のリン酸化を抑制した。(文献)

6) SMS1 ノックアウトマウスでの解析

国立長寿医療センター研究所 渡辺研博士らにより SMS-1 ノックアウトマウス(SMS1-KO マウス)が樹立されている(未発表)。我々は、渡辺研博士との共同研究で以下の研究を進行中である。

がん宿主の癌拒絶には T 細胞, NK 細胞が深く関わっている。これらエフェクター細胞の抗腫瘍細胞殺傷能とその過程にスフィンゴミエリン/リピッドラフトの関与が示唆される。現在、ノックアウトマウスの繁殖、発現系の解析(特に血液細胞の分画、T 細胞機能の解析)を解析中である。SMS1-KO マウスの解析の結果より、

- a) 末梢血、脾臓内、胸腺内のリンパ球数およびリンパ球分画は、正常マウスとの間に有意差を認めなかった。
- b) SMS1-KO マウスリンパ球上には、ライセニンで同定されるスフィンゴミエリンが欠失しており、ライセニンによる細胞傷害に抵抗性を示した。
- c) 分離精製した CD4 陽性 T 細胞の機能解析の結果、CD3+CD4 架橋刺激による細胞増殖および IL-2 産生が SMS1-KO マウスでは著明に低下していた。
- d) 同様に、CD3+CD4 架橋刺激による LAT のチロシンリン酸化、およびチロシンリン酸化 LAT と ZAP70 との会合も、SMS1-KO マウスで著明に低下していた。
- e) SMS1-KO マウスの免疫能を評価するために、ConcanabalinA 誘導肝炎モデルを実施した。SMS1-KO マウスでは、ConcanabalinA による急性肝障害が有意に抑制されていた。

(論文投稿中)

IV 考察

我々は、細胞の活性化およびアポトーシスについて、脂質メッセンジャー、細胞膜リピッドラフトという新たな観点から解析を行った。その結果、上述の通り、細胞活性化および細胞死のいずれの場合にも、中心脂質であるスフィンゴミエリンが重要な役割を担っていることを明らかにした。さらに、スフィンゴミエリンは T 細胞の活性化を介して自己免疫疾患の発症に、また、アポトーシスを介して腫瘍細胞の抗がん剤耐性に関与していた。実際に、自己免疫疾患の発症モデルを用いて、スフィンゴミエリンノックアウトマウスを解析したところ、明らかに自己免疫性肝炎、コラーゲン誘導関節炎の発症が抑制されていた。これらの結果は、細胞脂質をターゲットとした新たな免疫抑制剤や抗がん剤の開発に光明をあてるものと考えられる。今後、さらに、スフィンゴ脂質の機能や疾患発症における役割について解析を続けていく予定である。

このような研究を可能にさせていただいた車両競技公益資金記念財団に深くお礼申し上げます。

V 研究成果の発表

1. **Shakkor, A. B. A., Taniguchi, M., Kitatani, K., Asano, S., Hashimoto, M., Sakaki, E., Bielawski, J., Bielawska, A., Watanabe, K., Igarashi, Y., Umehara, H. and Okazaki, T.** "Sphingomyelin generated by sphingomyelin synthase 1 (SMS1) regulates transferrin itinerary through clathrin pathway in the proliferation of lymphoma cells." submitted
2. **Kawanami, T., Sawaki, T., Sakai, T., Miki, M., Iwao, H., Nakajima, A., Jin, Z.-X., Dong, L., Huang, C.-R., Tong, X.-P., Sun, Y., Nakajima, H., Fujita, Y., Tanaka, M., Masaki, Y., Fukushima, T., Hirose, Y., Okazaki, T. and Umehara, H.** "Cytokine Production by Cultured Salivary Gland Epithelial Cells Obtained from Patients with Sjögren's Syndrome " submitted
3. **Jin, Z. X., Tong, X. P., Sawaki, T., Fujita, Y., Sakai, T., Kawanami, T., Masaki, Y., Tanaka, M., Fukushima, T., Okazaki, T. and Umehara, H.** "Degradation of AKT, PDK1 and Bcl-xL by cycloheximide induces ATM-Chk2 activation and Caspase-3-dependent apoptosis in Jurkat-SM/kd cells." submitted
4. **Jiang, Y.-S., Jin, Z.-X., Umehara, H. and Ota, T.** "Lipid raft mediated effects of ginsenoside Rh2 in cultured melanoma and lymphoid cells." submitted
5. **Dong, L., Watanabe, K., Itoh, M., Huang, C. R., Jin, Z. X., Tong, X. P., Sun, Y., Sakai, T., Kawanami, T., Sawaki, T., Masaki, Y., Fukushima, T., Tanaka, M., Nakajima, H., Okazaki, T. and Umehara, H.** "Impaired CD4+ T cell functions and amelioration of concanavalin A-induced hepatitis in sphingomyelin synthase 1 (SMS1)-knockout mice." submitted
6. **Nakajima, H., Ishigaki, Y., Xia, Q.-s., Yonekura, H., Yoshitake, Y., Ikeda, T., Tanaka, T., Umehara, H., Tomosugi, N., Takada, T., Shimasaki, T., Nakaya, N., Sato, I., Koizumi, K., Kawakami, K., Minamoto, T. and Motoo, Y.** "Induction of HITS, a newly identified TU3A/DDR1 family of protein (FAM107B), in cancer cells by heat shock stimulation." *Int. J. Oncology* 37: 583-593, 2010
7. **Masaki, Y., Sugai, S. and Umehara, H.** "IgG4 related disorders including so-called Mikulicz's disease and sclerosing pancreatitis: advancing diagnostic insights." *J. Rheum.* 37: doi:10.3899/jrheum091153, 2010
8. **Matoba, M., Oota, K., Tonami, H., Masaki, Y., Sakai, T. and Umehara, H.** "Palliative radiotherapy with 1 x 8 Gy using conformal radiotherapy for chemotherapy-refractory, recurrent, aggressive lymphomas." *Jpn. J. Radiol.* 28: 220-223, 2010
9. **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." *Int. J. Clin. Oncology* in press: 2010
10. **Dong, L., Hu, S., Chen, F., Lei, X., Tu, W., Yu, Y., Yang, L., Sun, W., Yamaguchi, T. Y., Masaki, Y. and Umehara, H.** "Increased expression of Gangliosides 1 in peripheral CD4+ T cells correlates soluble form of CD30 in systemic lupus erythematosus patients." *J. Biomed. Biotech.* 2010: doi:10.1155/2010/569053, 2010
11. **Sugai, S., Takahashi, H., Ohta, S., Nishinarita, M., Takei, M., Sawada, S., Yamaji, K., Oka, H., Umehara, H., Koni, I., Sugiyama, E., Nishiyama, S. and Kawakami, A.** "Efficacy and safety of rebamipide for the treatment of dry mouth symptoms in patients with Sjögren's syndrome: a double-blind placebo-controlled multicenter trial." *Mod Rheumatol* 19: 114-124, 2009
12. **Masaki, Y., Dong, L., Nakajima, A., Iwao, H., Miki, M., Kurose, N., Kinoshita, E., Nojima, T., Sawaki, T., Kawanami, T., Tanaka, M., Shimoyama, K., Kim, C., Fukutoku, M., Kawabata, H., Fukushima, T., Hirose, Y., Takiguchi, T., Konda, S., Sugai, S. and Umehara, H.** "Intravascular large B cell lymphoma: proposed of the strategy for early diagnosis and treatment of patients with rapid deteriorating condition." *Int J Hematol.* 89: 600-610, 2009
13. **Masaki, Y., Dong, L., Kurose, N., Kitagawa, K., Morikawa, Y., Yamamoto, M., Takahashi, H., Shinomura, Y., Imai, K., Saeiki, T., Azumi, A., Nakada, S., Sugiyama, E., Matsui, S., Origuchi, T., Nishiyama, S., Nishimori, I., Nojima, T., Yamada, K., Kawano, M., Zen, Y., Kaneko, M., Miyazaki, K., Tsubota, K., Eguchi, K., Tomoda, K., Sawaki, T., Kawanami, T., Tanaka, M., Fukushima, T., Sugai, S. and Umehara, H.** "Proposal for a new clinical entity, IgG4-positive multi-organ lymphoproliferative syndrome: Analysis of 64 cases of IgG4-related disorders." *Ann. Rheum. Dis.* 63: 1310-1315, 2009
14. **Lafont, E., Milhas, D., Carpentier, S., Garcia, V, Jin, Z-X, Umehara, H, Okazaki, T, Schulze-Osthoff, K., Levade, T, Benoist, H. and Ségu, B.** "Caspase-mediated inhibition of sphingomyelin synthesis is involved in FasL-triggered cell death." *Cell Death and Differentiation* 17: 642-654, 2009

15. Fukushima, T., Iwao, H., Nakajima, A., Miki, M., Sakai, T., Sawaki, T., Tanaka, M., Masaki, Y., Hirose, Y. and Umehara, H. "MRSA-pyomyositis in a patient with acute myelogenous leukemia after intensive chemotherapy." *Anticancer Res* 29: 3361-3364, 2009
16. Fujii, T., Okada, M., Fujita, Y., Sato, T., Tanaka, M., Usui, T., Umehara, H. and Mimori, T. "Vaccination with autoreactive CD4(+)Th1 clones in lupus-prone MRL/Mp-Fas(lpr/lpr) mice." *J Autoimmun* 33: 125-134, 2009
17. Daniels, T. S., Criswell, L. A., Shiboski, C., Shiboski, S., Lanfranchi, H., Yi, D., Schiødt, M., Umehara, H., Sugai, S., Challancombe, S., Greenspan, J. S. and centers, additional SICCA collaborators at six centers. "An early view of the International Sjogren's Syndrome Registry." *Arthritis Rheum* 61: 711-714, 2009
18. Jin, Z.-X., Goda, S., Huang, C.-R., Dong, L., Kawanami, T., Sawaki, T., Sakai, T., Tong, X.-P., Masaki, Y., Fukushima, T., Tanaka, M., Hirose, Y., Mimori, T., Bloom, E. T., Okazaki, T. and Umehara, H. "A crucial role of membrane sphingomyelin in T cell functions : Lipid rafts are still important for TCR signaling." *Int. Immunol.* 20: 1427-1437, 2008
19. Nakayamada, S., Saito, K., Umehara, H., Ogawa, N., Sumida, T., Ito, S., Minota, S., Nara, H., Kondo, H., Okada, J., Mimori, T., Yoshifuji, H., Sano, H., Hashimoto, N. N., Sugai, S. and Tanaka, Y. "Efficacy and Safety of Mizoribine for the Treatment of Sjögren's Syndrome Å| A Multicenter Open-label Clinical Trial." *Mod. Rheum.* 17: 464-469, 2007
20. Dong, L., Masaki, Y., Tanaka, M., Fukushima, T., Okazaki, T. and Umehara, H. "Sjögren's syndrome and lymphoma development." *Curr. Immunol.Rev.* 3: 289-296, 2007
21. Dong, L., Masaki, Y., Takegami, T., Kawanami, T., Kunihiko, I., Jin, Z.-X., Huang, C.-R., Tong, X.-P., Fukushima, T., Tanaka, M., Sawaki, T., Sakai, T., Sugai, S., Okazaki, T., Hirose, Y. and Umehara, H. "Cloning and expression of two human recombinant monoclonal Fab fragments specific for EBV viral capsid antigen." *Int. Immunol.* 19: 331-336, 2007
22. Dong, L., Masaki, Y., Takegami, T., Jin, Z.-X., Huang, C.-R., Fukushima, T., Sawaki, T., Kawanami, T., Saeki, T., Kitagawa, K., Sugai, S., Okazaki, T., Hirose, Y. and Umehara, H. "Clonality analysis of lymphoproliferative disorders in lymphocytes infiltration from patients with Sjögren's syndrome (SS) " *Clin.Exp. Immunol.* 150: 279-284, 2007
23. Yoshifuji H, Fujii T, Kobayashi S, Imura Y, Fujita Y, Kawabata D, Usui T, Tanaka M, Nagai S, Umehara H and Mimori T. "Anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies in clinical course prediction of interstitial lung disease complicated with idiopathic inflammatory myopathies." *Autoimmunity* 39: 233-241, 2006
24. Umehara H, Tanaka M, Sawaki T, Jin ZX, Huang CR, Dong L, Kawanami T, Karasawa H, Masaki Y, Fukushima T, Hirose Y and Toshiro, O. "Fractalkine in rheumatoid arthritis and allied conditions." *Mod. Rheumatol.* 16: 124-130, 2006
25. Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, Higuchi M, Yamaya H, Umehara H and Ishikawa, I. "Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System." *Blood* 108: 1381-1387, 2006
26. Shimoyama K, Ogawa N, Sawaki T, Karasawa H, Masaki Y, Kawabata H, Fukushima T, Wano Y, Hirose Y and Umehara H. "A case of Mikulicz's disease complicated with interstitial nephritis successfully treated by high-dose corticosteroid." *Mod. Rheumatol.* 16: 176-182, 2006
27. Masaki Y, Itoh K, Sawaki T, Karasawa H, Kawanami T, Fukushima T, Kawabata H, Wano Y, Hirose Y, Suzuki T, Sugai S and Umehara H. "Urinary pseudouridine in patients with lymphoma: comparison with other clinical parameters." *Clin. Chim. Acta.* 371: 148-151, 2006
28. Hirose Y, Masaki Y, Sawaki T, Shimoyama K, Karasawa H, Kawabata H, Fukushima T, Ogawa N, Wano Y and Umehara H. "Association of Epstein-Barr virus with human immunodeficiency virus-negative peripheral T-cell lymphomas in Japan." *Eur. J. Haematol.* 76: 109-118, 2006
29. Goda S, Inoue H, Umehara H, Miyaji M, Nagano Y, Harakawa N, Imai H, Lee P, Macarthy JB, Ikeo T, Domae N, Shimizu Y and Iida J. "Matrix metalloproteinase-1 produced by human CXCL12-stimulated natural killer cells." *Am.J.Pathol.* 169: 445-458, 2006