

令和元年6月21日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04767

研究課題名(和文) ガングリオシドによる新たな「炎症増悪ループ」の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a novel inflammation amplification loop by ganglioside molecular species

研究代表者

井ノ口 仁一 (INOKUCHI, Jin-ichi)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70131810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームにおけるガングリオシドの病態生理学的意義について検討するために、高コレステロール血症示すApoE変異マウスおよび視床下部でのレプチン抵抗性による過食を示すKKAyマウスに対してガングリオシドGM3合成酵素(GM3S)KOマウスを交配し、ApoE変異/GM3S KOおよびKKAy/GM3S KOマウスを作成した。ApoE変異/GM3S KOマウスでは、腸管のコレステロールトランスポーターであるNPC1L1機能が阻害されており、高コレステロール血症が改善した。一方、KKAy/GM3S KOマウスでKKAyマウスの過食が制限され、レプチン抵抗性が改善していることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質異常症におけるガングリオシドの役割を調べることを目的として、自然発症apoE欠損(apoE^{-/-})マウスのGM3合成酵素を欠損したところ、apoE^{-/-}マウスが示す血漿コレステロール値が劇的に改善すること、GM3S欠損(GM3S^{-/-})マウスが食餌誘導性の高コレステロール血症に対して抵抗性を示すことを見出した。また、KKAyマウスにおけるGM3S KOでは、KKAyマウスの過食と肥満、耐糖能異常およびインスリン抵抗性の著明な改善がみられた。これらの結果から、GM3および関連ガングリオシドは、メタボリックシンドロームの治療標的になり得ることを示唆することができた。

研究成果の概要(英文)：The roles of gangliosides, such as GM3 and its synthesizing enzyme GM3 synthase (GM3S), in NPC1L1-dependent cholesterol uptake have not been examined previously. Here, we examined NPC1L1-dependent cholesterol uptake in a cell model as well as in wild-type and apoE-deficient mice. We showed that NPC1L1-dependent cholesterol uptake was impaired in GM3S-deficient cells and that GM3S deficiency promoted resistance to hypercholesterolemia. We also found that KKAy GM3S KO generated by KO of the GM3S gene in the yellow obese strain, KKAy, displayed significant amelioration of obese phenotype. Whereas KKAy mice were hyperphagic and developed severe obesity, KKAy GM3S KO mice had significantly lower body weight and food intake, and greater glucose and insulin tolerance. Our findings suggest that GM3 and related gangliosides are essential for NPC1L1-mediated intestinal cholesterol absorption and play an important role in leptin-melanocortin signaling.

研究分野：糖鎖生物学。特に、メタボリックシンドロームおよび慢性炎症におけるスフィンゴ糖脂質の機能解明。

キーワード：スフィンゴ糖脂質 ガングリオシド 生活習慣病

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜マイクロドメインはコレステロール、スフィンゴ糖脂質、スフィンゴミエリンに富む膜上の微小領域であり、種々の情報伝達分子が秩序だった超分子複合体を形成し、細胞の内外をつなぐさまざまな生命現象を制御していると考えられている。シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドは、糖鎖構造とセラミド構造の多様性に基いて多くの分子種が存在している。これらの多様なガングリオシド分子種は、各組織や細胞種選択的に発現し、マイクロドメイン構成分子としてシグナル伝達や細胞間コミュニケーションを介する生体恒常性の維持に関与していることが示されている。しかし、その分子メカニズムと病態生理は未解明の重要課題として残されている。

メタボリックシンドロームの病態生理において、脂肪組織は上流に位置しており、肥満に伴う脂肪組織機能の異常は、細胞間そして臓器間ネットワークを介して全身に波及すると考えられる。我々は、肥満による肥大化脂肪細胞の慢性炎症に伴うインスリン抵抗性の発症機序として、活性化マクロファージから放出される TNF α などの炎症性サイトカインによる GM3 ガングリオシドの増加がカベオラマイクロドメインからインスリン受容体を解離させ、インスリンの代謝性シグナルを抑制することから、「2型糖尿病などの生活習慣病の病態は、ガングリオシド GM3 の異常発現によって細胞膜マイクロドメインの構成・構造および機能が変化し、シグナル伝達が異常になったマイクロドメイン病である」という新たな分子病態像を提唱している (図1)。

腸間膜脂肪組織の常在性マクロファージを除去した前駆脂肪細胞では、分化速度とインスリンシグナルが亢進すると同時に、GM3 を含むスフィンゴ糖脂質の発現が生合成酵素の遺伝子レベルからほぼ完全に抑制されていた[1]。つまり、定常状態においても脂肪細胞のスフィンゴ糖脂質の発現レベルは、常在性マクロファージからの液性因子により支配されているのである。加えて、GM3 合成酵素 (GM3S) KO マウス胎児から得た線維芽細胞は、インスリンシグナルが亢進すると同時に脂肪細胞への分化速度が亢進していた。これらの結果から、GM3 は脂肪組織の恒常性維持および慢性炎症状態の両局面において、インスリンシグナルを制御する生理活性脂質として機能していることが判明した (図2)。

高脂肪食負荷した GM3S KO マウスは野生型同様に肥満になるにもかかわらず、内臓脂肪組織は慢性炎症状態から解放されており、野生型マウスと比べて TNF α の発現が低下し、アディポネクチンや抗炎症性サイトカイン IL-10 の上昇が見られた (図3) [1]。

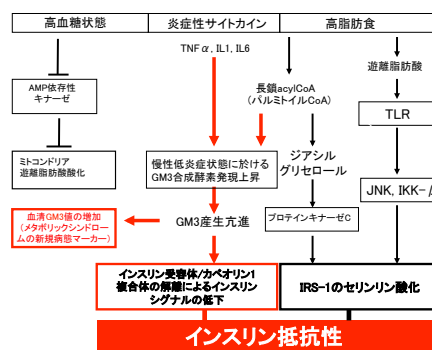


図1 マイクロドメイン病としてのインスリン抵抗性。赤矢印が我々が提唱している経路。黒矢印は従来から知られているインスリン抵抗性発症機序。

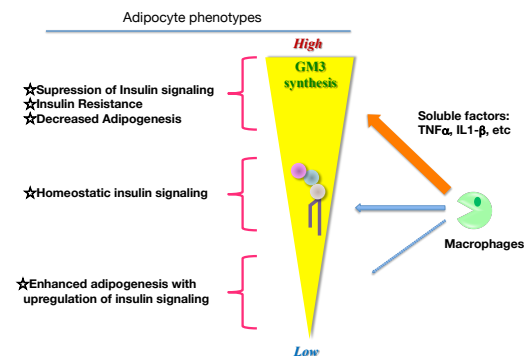


図2 GM3によるインスリンシグナル制御と脂肪組織の恒常性維持機構 (マクロファージは脂肪細胞の糖脂質発現を支配している)

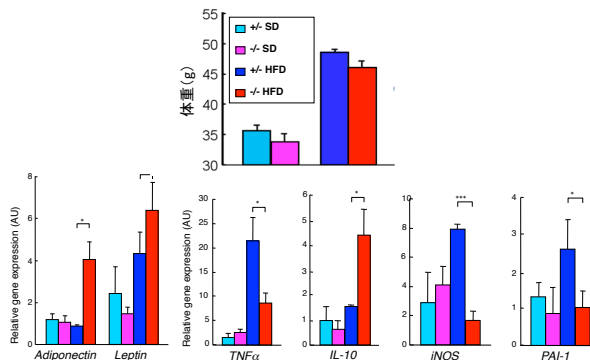


図3 高脂肪食負荷GM3KOマウスでは、内臓脂肪組織の慢性炎症が抑えられている

2. 研究の目的

申請者らは、**ガングリオシドGM3合成酵素(GM3S)ノックアウトマウス**は、野生型マウスと同様に高脂肪食負荷で肥満になるが、**インスリン抵抗性および脂肪組織における慢性炎症状態が改善される**ことを報告している[1]。そこで、**メタボリックシンドロームにおけるGM3および関連ガングリオシドの病態生理学的意義**について広く検討するために、**高コレステロール血症および摂食異常(視床下部のレプチン抵抗性)**におけるGM3および関連ガングリオシドの病態生理学的意義の解明に挑戦した。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、**高コレステロール血症示す ApoE 変異マウス**および**視床下部でのレプチン抵抗性による過食を示す KKAy マウス**に対する**CRISPER—Cas9 システム**により作成した**GM3SKO マウス**を交配して、**ApoE 変異 GM3S KO マウス**および**KKAy GM3S KO マウス**を作成し、これらの**メタボリックシンドローム病態へのガングリオシド病態生理学的意義**を検討した。

4. 研究成果

(1) メラノコルチンシグナルにおけるガングリオシドの関与

黄色肥満マウス KKAy における GM3 合成酵素(GM3S)のノックアウト(GM3S KO)では、KKAy マウスの過食と肥満、耐糖能異常およびインスリン抵抗性の著明な改善がみられた。KKAy マウスではレプチン腹腔内投与に対する視床下部弓状核ニューロンの応答性が大幅に減弱していたが、KKAy GM3S KO マウスではレプチンに対する応答性が十分保たれていた。また、マウス視床下部由来神経細胞株における GM3S 欠損細胞では、レプチン依存の ERK リン酸化が亢進していた。さらに、KKAy/GM3S KO マウスは毛色の変化(黄色→灰色)を呈しており、GM3 関連ガングリオシドはレプチンとメラノコルチンシグナルにおいて重要な役割をもつことが示唆された。

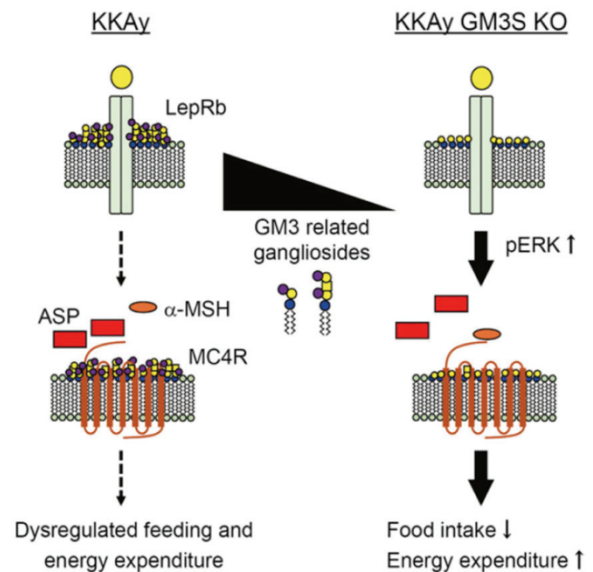


図4 視床下部におけるレプチン—メラノコルチンシグナルにおけるガングリオシド役割

(2) 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役割

今回我々は、GM3 合成酵素(GM3S)をノックアウト(KO)したガングリオシドが産生されない細胞(GM3S KO 細胞)を作成し、NPC1L1 を介した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について解析した。外から与えたコレステロールは、細胞膜上にある NPC1L1 に結合すると、コレステロール依存的に NPC1L1・コレステロール複合体の細胞内移行(エンドサイトーシス)が起こり、体内にコレステロールが取り込まれる。ところが、GM3S KO 細胞ではコレステロール依存的な NPC1L1 のエンドサイトーシスが抑制され、細胞内コレステロール含量の増加も有為に抑制されていた。続いて、マウスにおいても、細胞レベルでの実験結果と一致するよ

うに、GM3S KO マウスはコレステロール負荷により引き起こされる血中のコレステロール値の上昇が著しく抑制されていた。さらに、高コレステロール血症モデルとして用いられる ApoE 変異マウスにおいて、ApoE 変異 GM3SKO マウスを作製したところ、ApoE 変異マウスが示す高コレステロール血症は ApoE 変異 GM3SKO マウスでは顕著に改善され、腸管からのコレステロール吸収率および小腸絨毛における NPC1L1 のエンドサイトーシスも抑制された。今回の研究から GM3 をはじめとする ganglioside の発現を抑制することで、NPC1L1 の機能低下を引き起こし、高コレステロール血症の発症が抑制される可能性が見出された。ganglioside の発現制御が高コレステロール血症に対する新規治療標的として創薬につながることを期待される。

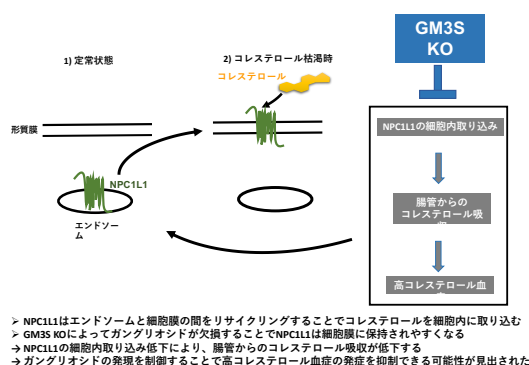


図5 腸管における NPC1L1 によるコレステロールの取り込みはgangliosideが必要である

<引用文献>

- ① Nagafuku M, Sato T, Sato S, Shimizu K, Taira T, and Inokuchi J. (2015) Control of homeostatic and pathogenic balance in adipose tissue by ganglioside GM3. *Glycobiology* 25:303-318.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwu112>

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件 ; 全て査読あり)

- ① Inamori K, Ito H, Tamura Y, Nitta T, Yang X, Nihei W, Shishido F, Imazu S, Tsukita S, Yamada T, Katagiri H, Inokuchi J. (2018) Deficient ganglioside synthesis restores responsiveness to leptin and melanocortin signaling in obese KK^{AY} mice. *J Lipid Res.* **59**, 1472-1481, 2018. DOI <https://doi.org/10.1194/jlr.M085753>
- ② Nihei W, Nagafuku M, Hayamizu H, Odagiri Y, Tamura Y, Kikuchi Y, Veillon L, Kanoh H, Inamori K, Arai K, Kabayama K, Fukase K, Inokuchi J. NPC1L1-dependent intestinal cholesterol absorption requires ganglioside GM3 in membrane microdomains *J Lipid Res.* **59**, 2181-2187, 2018. DOI <https://doi.org/10.1194/jlr.M089201>

[学会発表] (計 45 件)

国際学会 (招待講演 10 件)

- ① Jin-ichi Inokuchi, Homeostatic and Pathogenic Roles of Ganglioside GM3 Molecular Species in Chronic Inflammation. FEBS Special Meeting 2019, Sphingolipid Biology: Sphingolipids in Physiology and Pathology. May 6-10 Cascais, Portugal

[図書] (計 3 件)

- ① Inokuchi J, Inamori K, Kabayama K, Nagafuku M, Uemura S, Go S, Suzuki A, Ohno I, Kanoh H, Shishido F. **Biology of GM3 ganglioside** (Book Chapter in Gangliosides in Health and Diseases). *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Schnaar RL., Lopez PHH., eds, Elsevier) page152-195 ISBN978-0-12-81234-6

(<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.10.004>) (2018).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

研究室ホームページ: <http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/kinoubyoutai/TOP.html>

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 郷 慎司

ローマ字氏名: (GO, shinji)

研究協力者氏名: ベイロン ルーカス

ローマ字氏名: (VEILLON, lucas)

研究協力者氏名: 狩野 裕考

ローマ字氏名: (KANO, hirotaka)

研究協力者氏名: 郷 慎司

ローマ字氏名: (GO, shinji)

研究協力者氏名: 永福 正和

ローマ字氏名: (NAGAFUKU, masakazu)

研究協力者氏名: 鈴木 明身

ローマ字氏名: (SUZUKI, akemi)

研究協力者氏名: 上村 聡志

ローマ字氏名: (UEMURA, satoshi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。