

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16356

研究課題名(和文) ガングリオシドのアシル鎖構造によるToll様受容体制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of TLR activation mechanisms mediated by gangliosides and its acyl-chain structures

研究代表者

狩野 裕考 (Kano, Hirotaka)

東北医科薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40774279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームの発症およびその進行は、Toll様受容体(Toll-like receptor: TLR)などの自然免疫受容体を介した慢性炎症によって生じる。本研究課題では、1) 血清中や脂肪組織に存在するスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドGM3が、TLR4の生体内リガンド・モジュレーターとして作用すること、2) その結果としてメタボリックシンドロームにおける慢性炎症が生じる可能性、3) その生理活性がアシル鎖構造によって制御されていること、について、その分子メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性炎症は、メタボリックシンドロームに加え、がんや自己免疫疾患、神経炎症性疾患など、現代医療の重要な課題としてあげられる疾患において、普遍的な発症・増悪因子として働く。本来は生体を病原体から防御するための免疫機構がどのようにして慢性炎症を生じるに至るのか、そのメカニズムを明らかにする上で、本研究で得られた成果は重要な発見の一つになる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The onset and the progression of metabolic syndromes are caused by chronic inflammation mediated by innate immune receptors such as Toll-like receptors. This research project elucidated the molecular mechanisms regarding 1) ganglioside GM3, a glycosphingolipid expressed in serum and adipose tissue, acts as an endogenous TLR4 ligands/modulators, 2) GM3 could induce chronic inflammation in metabolic syndromes, and 3) the biological activity is regulated by its acyl-chain structures.

研究分野：免疫学、糖鎖生物学、脂質生物学

キーワード：ganglioside TLR4 inflammation

#### 1. 研究開始当初の背景

自然免疫応答は、病原体に対する生体防御において重要な役割を担っている。一方で、その制御破綻や慢性持続化(慢性炎症)を生じた場合には、メタボリックシンドロームやがんをはじめとする多様な疾患の原因となりうる。本来は恒常性の維持機構として働く自然免疫応答が、どのようにして疾患の発症原因へと変化するのか、その分子メカニズムの全容解明が大きく期待されている。申請者は、ヒト血清や脂肪組織に含まれているスフィンゴ糖脂質であるガングリオシド GM3 が、自然免疫系受容体 Toll-like receptor (TLR) 4 の内因性リガンドとして働き、メタボリックシンドロームにおける慢性炎症の発症に関与することを見出した。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ガングリオシド GM3 がアシル鎖構造に応じて TLR4 の活性化を制御する分子メカニズム、異なる GM3 分子種が疾患によって産生される発現メカニズム、生体内における GM3 を介した炎症制御可能性を明らかにすることである。

#### 3. 研究の方法

本研究課題では、TLR4/MD-2 発現細胞(マウスマクロファージ細胞、TLR4/MD-2 過剰発現 HEK293T 細胞)を用いたシグナル伝達解析、イメージング・相互作用解析、炎症モデルマウスを用いた *in vivo* 生理活性評価などによって、GM3 による TLR4 制御メカニズム、炎症性疾患における GM3 分子種の関与を明らかにすることを試みた。

#### 4. 研究成果

初年度では、以下の研究成果を得ることができた。(1) TLR4/MD-2 イメージング手法の新規開発: ガングリオシド GM3 による TLR4 活性化を解析するため、生細胞分子イメージング手法の確立を行った。新規に、Halo-tag リガンドを用いた TLR4/MD-2 複合体イメージングに適用可能な融合タンパク質発現ベクターを構築することで、細胞膜上および内在化した TLR4/MD-2 複合体を、同時に区別してイメージングすることが可能になった。これによる本来のシグナル伝達への影響はほとんどないことを、NF- $\kappa$ B ルシフェラーゼアッセイを用いて確認することができた。(2) TLR4/MD-2 フローサイトメトリー法によるガングリオシド作用の解析: 当初の計画に加えて、マウスマクロファージ細胞における TLR4/MD-2 フローサイトメトリー法を導入することで、ガングリオシド GM3 による TLR4 活性化状態(二量体化、内在化)を解析することが可能になった。本手法は先行研究によって TLR4 アゴニストである LPS による刺激に対して確立されていたが、直接的には、本課題におけるガングリオシドを介した活性化メカニズムの解析には適用できないことも明らかとなった。ラベル条件の改変と最適化を行うことによって、GM3 による TLR4 の会合状態・内在化への影響を検出することが可能になった。

次年度では、以下の研究成果を得ることができた。(1) マウス個体を用いた GM3 炎症制御作用の評価/検討: GM3 をマウス個体に投与することで、実際に個体レベルで炎症状態への影響が現れるかどうかの評価を試みた。実験手法としては、C57BL/6 マウスに LPS を投与することで作成した急性・慢性炎症モデルマウスに対して、長鎖 GM3 または極長鎖 GM3 を投与することで、個体内で GM3 による炎症制御が生じる状況を人為的に誘導することを試みた。解剖後、マウス血清中へ放出されている炎症性サイトカイン濃度を ELISA 法によって定量することによって、炎症状態を評価した。LPS の投与量および GM3 の投与量、刺激時間、溶解条件等を検討した結果、マウス血清中の炎症性サイトカイン産生量が極長鎖 GM3 の投与によって増大する条件を見出した。マウス個体を用いた GM3 炎症制御作用の評価系が作成できたと考えられた。今後は、より幅広い GM3 分子種の作用の評価につながるものと考えられる。(2) これまでの結果にもとづく研究論文の作成・発表: 本課題の基盤となった予備知見とこれまでに得られた結果にもとづいて論文を発表することができた(EMBO J. 39(12):e101732 2020)。発表した論文では、ヒト血清中に存在する GM3 分子種について、メタボリックシンドロームの病態に対応した変動を明らかにした点、ヒト単球やマウスマクロファージにおいて、異なるアシル鎖構造の GM3 分子種が TLR4 の活性化を正と負に制御する点、その分子認識メカニズムの解析について、主に報告した。

最終年度では、以下の研究成果を得ることができた。(1) 炎症抑制性 GM3 投与に適したマウス系統の同定: マウスなどの齧歯類では血清ガングリオシドの産生・分泌組織である肝臓において、GM2 合成酵素(B4galnt1)が発現しているため、ヒトの場合の GM3 とは異なり、マウスでは GM2 が血清中を循環している。GM2 は炎症抑制性が GM3 よりも強い分子種であるため、炎症抑制性 GM3 の投与とその評価には、ヒトにより近い GM3 循環型のマウスモデルが必要となる。マイクロアレイデータベースを用いたメタ解析により、種々の近交系マウス系統における組織ごとの糖転移酵素発現パターンを分析し、ヒト型のマウス系統を探索した。その結果、FVB/N 系統および NOD/shi 系統では、肝臓における GM2 合成酵素 B4galnt1 の発現量が、そのほかの系統と比べて著しく低いことがわかった。実際に、薄層クロマトグラフィー法や LC-MS/MS によって肝臓および血清のガングリオシド分子種を比較すると、FVB/N および NOD/shi では GM2 の発現は完全に

消失しており、ヒトと同様に GM3 が発現していた。ゲノム配列データベースを用いた解析および、実際の DNA シーケンサーによる配列解析により、FVB/N および NOD/shi では他の系統と比べて、B4galnt1 上流における 10kbp におよぶ領域欠損と、0.6kbp の配列挿入が確認された。また、配列相同性を調べると、ラットにおいては相同性を示す領域が保存されていたが、ヒトにおいては現在までの解析では存在が確認できていない。よって、この領域が、生物種間における血清・肝臓選択的なガングリオシド発現パターンの差異に大きく関与していることが示唆された。(2) 炎症抑制性 GM3 投与に適したマウスモデルの作成：FVB/N 系統における上記の欠損領域を、C57BL/6 系統において Crispr/Cas9 法を用いて二重切断した非遺伝子領域欠損マウスを作出した。今後、肝臓選択的なエンハンサー領域・転写因子を介した血清ガングリオシド発現制御の解析や炎症抑制性 GM3 の投与による解析に有用と考えられた。

今後の展開として、本研究課題の実施によって確立できた解析手法（イメージング、フローサイトメトリーなど）を用いることで、ガングリオシド GM3 による TLR4 活性化制御機構が詳細に明らかとなることが期待される。加えて、ヒト型のガングリオシド発現を示す新規マウスモデルを用いることで、GM3 の *in vivo* 生理活性評価が可能となり、創薬応用につながる成果が得られることが期待される。また、各種のヒト疾患における血清 GM3 分子種の発現メカニズムについても、今回得られた GM3 型のマウスモデルを用いることで、詳細に解析可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kano H, Nitta T, Go S, Inamori K, Veillon L, Nihei W, Fujii M, Kabayama K, Shimoyama A, Fukase K, et al.	4. 巻 39
2. 論文標題 Homeostatic and pathogenic roles of GM3 ganglioside molecular species in TLR4 signaling in obesity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e101732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2019101732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 狩野 裕考、新田 昂大、藤居 真優、樺山 一哉、下山 敦史、深瀬 浩一、Sandro Sonnino、鈴木 明身、井ノ口 仁一	4. 巻 22
2. 論文標題 ガングリオシドのアシル鎖構造によるToll-like receptor 4活性化制御メカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 エンドトキシン・自然免疫研究	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24753/jeiis.22.0_1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Inokuchi Jin ichi, Kano Hiroataka, Inamori Kei ichiro, Nagafuku Masakazu, Nitta Takahiro, Fukase Koichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Homeostatic and pathogenic roles of the GM3 ganglioside	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kano Hiroataka	4. 巻 142
2. 論文標題 Homeostatic and Pathophysiological Regulation of Toll-like Receptor 4 Signaling by GM3 Ganglioside Molecular Species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 195 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.21-00193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 狩野 裕考
2. 発表標題 ガングリオシドのアシル鎖構造によるTLR4制御メカニズム
3. 学会等名 第13回東北糖鎖研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 狩野 裕考
2. 発表標題 ガングリオシドによるTLR4シグナルの恒常性維持と破綻のメカニズムの解明
3. 学会等名 第42回東北薬学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jin-ichi Inokuchi, Hirotaka Kanoh
2. 発表標題 Homeostatic and Pathogenic Roles of GM3 Ganglioside Molecular Species in TLR4 Signaling in Metabolic Disorders
3. 学会等名 Glyco25 (25th International symposium on Glycoconjugates), Milan, Italy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 狩野裕考, 新田昂大, 鈴木明身, 井ノ口仁一
2. 発表標題 ガングリオシドのアシル鎖構造に基づいた自然免疫応答の調節機構
3. 学会等名 第38回 日本糖質学会年会, 名古屋
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井ノ口仁一、 狩野裕考
2. 発表標題 糖鎖による生活習慣病・慢性炎症性疾患等の新規診断・治療法の開発
3. 学会等名 第51回 日本臨床検査医学会/東北支部総会, 仙台 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 狩野裕考, 新田昂大, 鈴木明身, 井ノ口仁一
2. 発表標題 ガングリオシドのアシル鎖構造によるTLR4制御メカニズム
3. 学会等名 第13回 東北糖鎖研究会, 新潟
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirotaka Kanoh, Takahiro Nitta, Akemi Suzuki, Jin-ichi Inokuchi
2. 発表標題 Homeostatic and pathogenic roles of GM3 ganglioside molecular species in TLR4 signaling in metabolic disorders
3. 学会等名 11th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology (ACGG) Conference, Busan, Korea (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 狩野裕考
2. 発表標題 糖尿病と糖鎖
3. 学会等名 第17回 糖質科学コンソーシアム (JCGG) シンポジウム、京都
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------