

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：31305

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23806

研究課題名（和文）レプチンによるスフィンゴ糖脂質発現を介した炎症病態メカニズムの解明

研究課題名（英文）The elucidation of the role of leptin-induced glycosphingolipids in the inflammatory disease

研究代表者

新田 昂大（Nitta, Takahiro）

東北医科薬科大学・薬学部・ポスト・ドクター

研究者番号：30847976

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：申請者は、レプチンによる腎臓のスフィンゴ糖脂質発現変化を介した糖尿病性腎症の病態形成・増悪メカニズムの解明を目的に本研究を遂行した。レプチンは、少なくとも腎臓のレプチン受容体に直接作用することでスフィンゴ糖脂質の発現を変化させるのではなく、脳のスフィンゴ糖脂質受容体を介した間接的な制御により腎臓の糖脂質発現を変化させていることが強く示唆された。メタボリックシンドロームなどの肥満が基礎状態にある疾患においては、高レプチン血症が誘導されており、それに伴う過剰なレプチンシグナリングが腎臓の糖脂質発現を変化させ、浸潤マクロファージに作用することで炎症が増悪し、糖尿病性腎症の病態形成に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症は、根本的な治療法がないため治療においては、進行遅らせる対症療法しかほぼ選択肢がないのが現状である。さらに、病態悪化に伴う腎機能不全に陥るとQOL低下に大きくかかわる透析の導入が余儀なくされてしまう。申請者は、腎臓の炎症増悪に関与するスフィンゴ糖脂質が、抗肥満ホルモンであるレプチンによって発現変化することを見出した。レプチンは、脳のスフィンゴ糖脂質受容体を介して腎臓に間接的に作用しており、肥満型の糖尿病性腎症などの病態形成に関与していることが示唆された。本研究をきっかけに、これまで知られていなかった新たな治療標的の同定が可能性になると予想される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the research is the elucidation of the role of leptin-induced glycosphingolipids in the inflammatory disease. It's indicated that leptin induced the change of renal glycosphingolipids balance indirectly via leptin receptor expressed in the brain in this study. We're considered that altered-glycosphingolipids result from excess leptin signaling accompanied with hyperleptinemia enhance the activation of infiltrated-macrophage in kidney, and lead to develop and exacerbate the diabetic nephropathy.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖尿病性腎症 スフィンゴ糖脂質 炎症 免疫細胞

1. 研究開始当初の背景

レプチンは、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインであり、視床下部などのレプチン受容体に作用することで、摂食抑制やエネルギー代謝亢進を発現する。血中レプチン濃度は、体脂肪量に比例しており、脂肪の蓄積(肥満)によって血中レベルは上昇することが分かっている。肥満における慢性的な高レプチン血症では、レプチンの中枢作用が低下するレプチン抵抗性の惹起や末梢組織における過剰なレプチン受容体の活性化が誘起されている。レプチンは糖尿病(合併症である腎症も含む)や高血圧、脂質異常症など、多くの生活習慣病において病態生理学的な関与が示されてきた (*Diabetes*, 59: 1626-1634, 2010; *J Hypertens*, 24: 789-801, 2006; *J. Transl. Med.*, 14: 276, 2016)。しかし、レプチンの作用が、生体の恒常性維持から病態形成へとシフトする分子メカニズムに関して、その全貌は解明されていない。そこで、本研究では、その一端を明らかにするために、炎症病態におけるレプチンの腎 Gb3 発現誘導メカニズムに着目し研究を実施した。

これまでに申請者は、肥満・糖尿病モデルである KK マウスの腎臓で、スフィンゴ糖脂質：Gb3 の発現が増加すること、Gb3 がマクロファージの Toll-like receptor 4 (TLR4) に作用することで、炎症を著しく促進させることを見出しており、これらの結果は、糖尿病性腎症の病態形成に腎 Gb3 の関与を示唆していた (*Glycobiology*, 29, 260-268, 2019)。腎臓における Gb3 の発現誘導メカニズムは不明であったが、Gb3 発現がレプチンによって誘導されることを新たに見出しことに加え、以下の予備知見を得ていた。

- (1) 高レプチン血症を呈する高脂肪食誘導性の肥満・糖尿病マウス(KK)の腎臓では、Gb3 の発現が顕著に増加する。(Gb3 合成酵素：A4galt の発現増加も確認)
- (2) 上記のマウスでは、腎臓の炎症性サイトカイン発現が増加している。
- (3) レプチンあるいはレプチン受容体が欠損しているマウス(*ob/ob*, *db/db*)の腎臓では、Gb3 の発現量が著しく低い。
- (4) レプチン欠損 *ob/ob* マウスへのレプチン投与によって、腎臓の Gb3 発現が回復する。

これらの予備知見から、レプチンが、末梢組織における Gb3 発現誘導を介して慢性炎症病態の形成を促進していると予想された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「糖尿病性腎症の病態形成に関与する Gb3 のレプチンによる発現誘導メカニズム」を解明し、レプチンシグナルが仲介する分子病態像を新たに提示することであった。レプチンには、食欲抑制以外にもいくつかの作用が知られているが、これまで炎症促進作用を持つ Gb3 の発現を誘導する活性に関する報告はない。本研究仮説を支持するデータが得られた場合は、レプチンが関与する炎症病態において、スフィンゴ糖脂質：Gb3 がエフェクター分子であることを示唆する初めての知見となる。興味深いことに、血管内皮や副腎、膵臓などの組織においても、腎臓以外の臓器においてもレプチン受容体と Gb3 が発現することが分かっている。したがって、レプチンによる Gb3 発現誘導を介した糖尿病性腎症の発症・増悪メカニズムは、糖尿病や動脈硬化、高血圧などを含む生活習慣病の発症過程においても、共通の分子基盤を内包している可能性が高い。本研究の結果、「炎症促進活性を持つ Gb3 のレプチンによる発現誘導メカニズム」が明らかとなり、「糖尿病性腎症の直接的な治療標的の同定」や「多様な炎症病態に対する治療法の開発」につながると考えられた。

3. 研究の方法

本研究では、糖尿病性腎症の発症・増悪因子である Gb3 のレプチンによる発現誘導メカニズムを解明するために、以下の方法で実験を実施した。

(1) 腎臓あるいは全脳特異的レプチン欠損マウスの作成

レプチンには、腎臓のレプチン受容体に直接作用する経路と視床下部を経由する間接な経路が知られている。レプチンによる腎 Gb3 発現誘導に関しても、直接・間接作用のどちらを介しているのかを明らかにするため、組織特異的なレプチン受容体ノックアウト(KO)マウスを Cre/loxP システム(腎: *Lepr-flox/Pax8-cre*, 脳: *Lepr-flox/Nestin-cre*)を用いて作成し、腎臓の Gb3 発現について解析を行った。Nestin-Cre については、すでに保有してマウスを使用し、*Lepr-flox* と *Pax8-cre* マウスは、JACKSON LABORATORY から購入した。

Genotyping により、目的の組織特異的欠損マウスであることを確認した。Primer は、以下のものを使用した。(Pax8Cre: Fw-GTGGAGGGACCACTGAAAGA / Rv-CAGGTTCTTGCGAACCTCAT; *Lepr-flox*:

Fw-GTCACCTAGGTTAATGTATTC / Rv-TCTAGCCCTCCAGCACTGGAC; NesCre-GTTGCGTGTGCACTGAACG / TGCTGTCACCTGGTCGTGGC)。

脂質解析については、クロロホルム/メタノールで総脂質を抽出、陰イオン交換クロマトグラフィーにより酸性と中性糖脂質を分画、さらに解析対象外のグリセロリン脂質をアルカリ条件下、加メタノール分解を行い、脱塩後、薄層クロマトグラフィーにより各糖脂質を分離、オルシノール硫酸を用いて糖脂質を検出した。

腎臓におけるレプチン受容体の遺伝子発現は、2種類のPrimerを、housekeeping geneとして*B2m*を使用し、定量的RT-PCRを行った。

(*Lepr_Ex2-3*: Fw-TTGTACTACTAATTTCTTTATGTGATAGCTGC / Rv: TGAGAGAAAGGAGTCATCGGTTGTG; *Lepr_Ex9-10*: Fw-TCACCCAGCACAAATCCAAT / Rv-GCTCAGACGTAGGATGAATAGATG; *B2m*: Fw-TGGTCTTTCTGGTGCTTGTC / Rv-GGGTGAAGCTGTGTTACGTAG)

(2) Gb3 発現が誘導される腎臓の組織・機能単位・細胞を明らかにする

高レプチン血症を誘導するために肥満モデル KK マウスに高脂肪食負荷を行い、腎臓組織について Gb3 などを認識する緑膿菌由来 Hylite-555 標識レクチン (PA-1L) を用いて組織染色を行った。

4. 研究成果

レプチンが腎臓の糖脂質発現に関与することは、レプチン欠損マウスと全身性のレプチン受容体欠損マウスである *ob/ob*, *db/db* マウスの解析ですでに確認していた。しかし、レプチンシグナルによってどのように腎臓の糖脂質発現が制御されているかに関しては分かっていなかった。そこで、腎臓特異的レプチン受容体欠損マウスを作成し、腎臓におけるレプチンシグナリングが直接的に糖脂質発現に影響を与えているかどうかをまず調べた。まず、レプチン受容体の flox マウス (*lepr-flox*) と腎臓特異的欠損のための Cre マウス (*Pax8-Cre*) をかけ合わせて *Lepr (flox/flox)-Pax8Cre (Tg)* マウスを作成した (Fig. 1A)。

Fig.1A

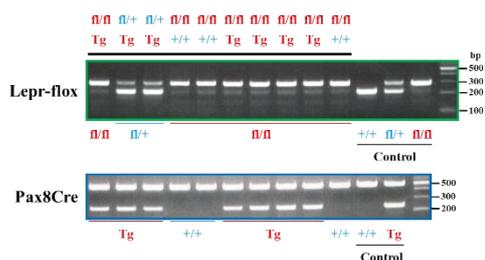


Fig. 1A PCR genotyping results. The 227- and 275-bp bands indicate the wild-type and mutant alleles, respectively in upper panel. The mouse with Pax8-Cre allele is observed the band at the 225-bp in lower panel.

この組織特異的欠損マウスについて、腎臓全体のレプチン受容体発現を定量的 RT-PCR により調べた結果、野生型と比較して大きな変化は見られなかった (Fig. 1B)。腎臓の糖脂質発現に関しては、脂質解析により調べたが、野生型と同じで変化は観察されなかった (Fig. 1C)。また、高脂肪食負荷と通常食飼育マウスの腎臓組織染色を行った結果、過去の報告と同様に糸球体には発現が観察されず、尿細管において豊富に発現していた。さらに、高脂肪食負荷マウスの方が、通常食飼育よりも尿細管における Gb3 発現が増加していた (Fig. 1D)。

Fig.1B

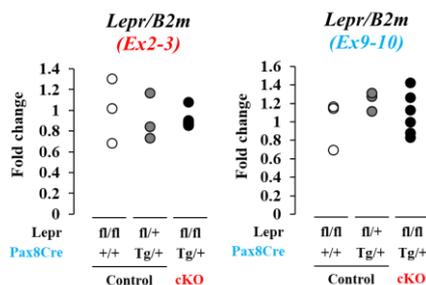


Fig. 1B The comparison of *lepr* gene expressions in kidney. The gene expression of all *Lepr* variants (Ex2-3) and long form variant (Ex9-10) is shown in left and right panel, respectively. No significant changes are observed between the control and conditional KO mice.

Fig.1C

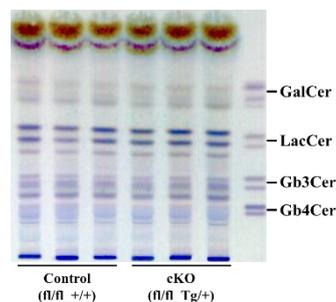


Fig. 1C The comparison of renal glycosphingolipids (GSLs) expressions between control vs. cKO. The result of thin-layer chromatography shown that it's same levels of GSLs in control and cKO mice.

Fig.1D

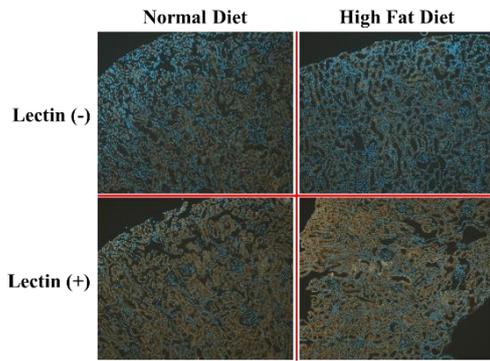


Fig. 1D HFD-feeding upregulates the Gb3 levels in renal tubules. Hylite-555 conjugated PA-1L lectin binds to Gb3(Gal α 1-4Gal epitope), is detected in renal tubules but not glomerulus. Fluorescence signal is higher in HFD-feeding mouse, indicated the increase of Gb3 expression in kidney.

これらの結果は、腎尿細管にレプチン受容体がほとんど発現していないか低発現であることを示唆しており、レプチンシグナルによる直接的な腎臓における糖脂質発現制御は行われている可能性は低いことが分かった。

本研究計画立案の段階で、すでにレプチンは脳・視床下部を介して間接的に筋肉や肝臓など臓器の代謝などを制御することが知られていた。そこで、間接的に腎臓の糖脂質発現が制御されている可能性も考慮し、脳神経特異的レプチン受容体欠損マウスを作成した。レプチン受容体の flox マウス (*lepr-flox*) は、腎臓の時と共通で、Cre マウスには *Nestin-Cre* を使用し、*Lepr (flox/flox)-NesCre (Tg)* マウスを作成した (Fig. 2A)。全身性のレプチン受容体欠損 (*db/db*) マウスと同様に、上記の脳神経特異的レプチン受容体欠損マウスにおいても、過食による肥満が誘導された (Fig. 2B)。こちらのマウスでは、腎臓における Gb3 の発現が若干ではあるが低下していた (Fig. 2C)。腎臓の遺伝子発現を定量的 RT-PCR で調べた結果は、これまで *ob/ob* や *db/db* マウスで観察されていた傾向と一致しており、Gb3 前駆体である LacCer の合成酵素 (*B4galt5*) の発現が減少していた (Fig. 2D)。また、腎臓のレプチン受容体の発現についても、野生型と比較し減少していた (Fig. 2E)。

Fig.2A

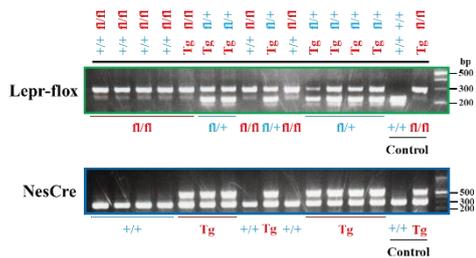


Fig. 2A PCR genotyping results. The 227- and 275-bp bands indicate the wild-type and mutant alleles, respectively in upper panel. The mouse with Nestin-Cre allele is observed the band at the 650-bp in lower panel.

Fig.2B

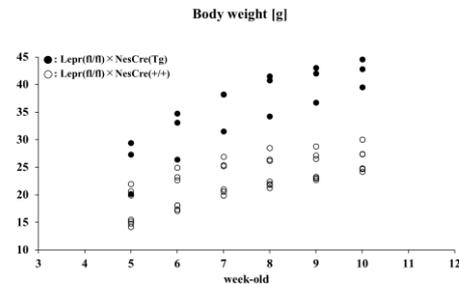


Fig. 2B The conditional Lepr KO mice exhibited obesity. Brain-specific Lepr deficient mice indicated over-eating compared with control mice: *Lepr(flox) x NesCre(+/+)*.

Fig.2C

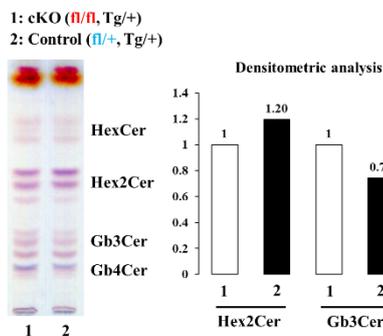


Fig. 2C Renal Gb3Cer is decrease in the brain-specific Lepr KO mice. TLC analysis show that renal GSLs balance is change compared with control (*fl/+*, *Tg/+*) mouse. The result of densitometric analysis indicated that Gb3Cer has decreased 0.74-fold in contrast to increased-Hex2Cer levels at 1.2-fold change.

Fig.2D

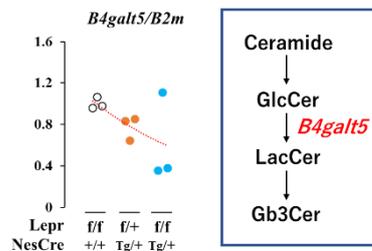


Fig. 2D Renal Gb3Cer is decrease in the brain-specific Lepr deficient mice. The TLC analysis shows that renal GSLs balance is change compared with control (*fl/+*, *Tg/+*) mouse. The result of densitometric analysis indicated that Gb3Cer has decreased 0.74-fold in contrast to increased-Hex2Cer levels at 1.2-fold change.

Fig.2E

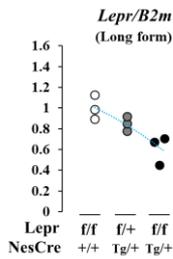


Fig. 2E The expression of *Lepr* mRNA is down-regulated in the cKO mice. RT-PCR results exhibited that the renal *Lepr* levels are lower in the cKO mice than in the control mice.

本研究により、腎臓のスフィンゴ糖脂質発現は、脳・視床下部のレプチン受容体を介した間接的なレプチンの作用により制御されている可能性が高いということが明らかとなった。中枢におけるレプチン抵抗性の惹起は、メタボリックシンドローム関連疾患発症において重要な分子メカニズムのひとつであり、レプチンによる食欲抑制作用が減弱するだけでなく、間接的な腎臓の恒常性維持作用の破綻を誘発することで糖尿病性腎症などの病態発症・増悪に関与することが強く示唆される (Fig. 2F)。

今後は、レプチンシグナリングを介した脳と腎臓の臓器連関について、詳細な分子メカニズムを明らかにしていく予定である。

Fig.2F

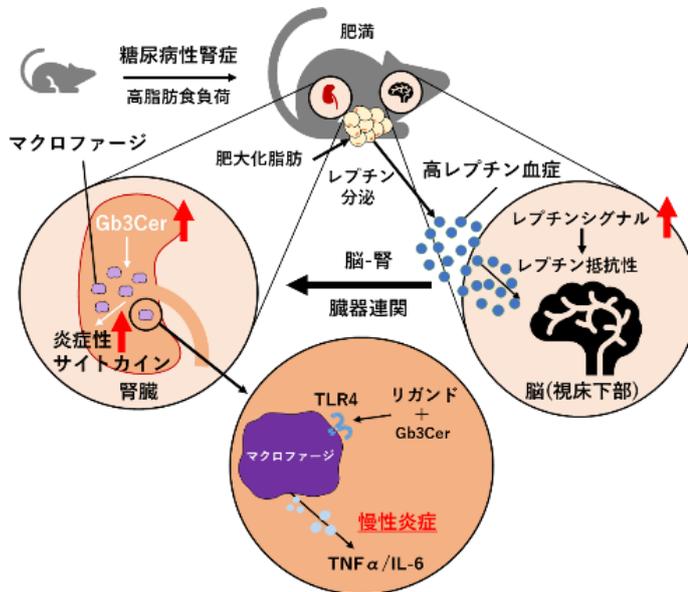


Fig. 2F Diagram of relationship between brain and kidney in the pathophysiology of diabetic nephropathy.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新田昂大, 狩野裕考, 稲森啓一郎, 鈴木明身, 井ノ口仁一
2. 発表標題 レプチンによる腎スフィンゴ糖脂質の発現誘導
3. 学会等名 第14回 東北東鎖研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新田昂大, 狩野裕考, 稲森啓一郎, 鈴木明身, 井ノ口仁一
2. 発表標題 1型糖尿病性腎症における糖脂質発現変化
3. 学会等名 第62回 脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新田昂大, 狩野裕考, 稲森啓一郎, 鈴木明身, 赤井裕輝, 森建文, 井ノ口仁一
2. 発表標題 レプチンによる腎スフィンゴ糖脂質の発現誘導
3. 学会等名 第62回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新田昂大, 狩野裕考, 稲森啓一郎, 鈴木明身, 井ノ口仁一
2. 発表標題 糖尿病性腎症におけるスフィンゴ糖脂質の発現変化解析
3. 学会等名 第14回 セラミド研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新田昂大、狩野裕考、稲森啓一郎、鈴木明身、井ノ口仁一
2. 発表標題 1型糖尿病性腎症における糖脂質発現変化
3. 学会等名 第63回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新田昂大、狩野裕考、稲森啓一郎、鈴木明身、井ノ口仁一
2. 発表標題 1型と2型糖尿病性腎症における腎スフィンゴ糖脂質発現変化の比較
3. 学会等名 第94回 日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 1型と2型糖尿病性腎症における腎スフィンゴ糖脂質発現変化と病態
2. 発表標題 新田昂大、狩野裕考、稲森啓一郎、鈴木明身、井ノ口仁一
3. 学会等名 第65回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------