

機関番号 : 10101
研究種目 : 基盤研究 (C)
研究期間 : 2008~2010
課題番号 : 20570122
研究課題名 (和文) 糖鎖変異マウスを利用したメタボリックシンドロームの病態解明
研究課題名 (英文) Analysis of the metabolic syndrome using a carbohydrate chain deficient mice.
研究代表者 山下 匡 (YAMASHITA TADASHI) 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・准教授 研究者番号 : 30220338

研究成果の概要 (和文) : GM3 合成酵素 (GM3S) 欠損マウスを用い、メタボリックシンドロームを誘発する高カロリー食を与えた結果、病理組織図において顕著な差が観察された。免疫系細胞の反応として、主に炎症に関わる IL-6 の発現の上昇が観察された。また、GM3 合成酵素 (GM3S) 欠損マウス由来胚性繊維芽細胞 (MEF) において、LPS 刺激下におけるサイトカインの発現量の増加が観察された。中枢神経に対する所見として、GM3 合成酵素欠損マウスにおける行動解析を行った結果、ある薬剤に対する感受性に差が観察された。さらに、糖脂質の欠損による糖タンパク質量の上昇が観察された。

研究成果の概要 (英文) : A remarkable difference was observed in the liver pathology as a result of giving the calorie-rich food that caused the metabolic syndrome by using GM3 synthesis enzyme (GM3S) deficient mouse. As for a reaction of an immunity system cell, the increase of IL-6 was observed. Moreover, an increase in the amount of the cytokine under the LPS stimulation was observed in mouse embryo fibroblast (MEF) derived from GM3 knockout mouse. As for central nerve system, GM3 knockout mice showed the loss of function by behavior test. An amount of glycoprotein increased in the GM3 knockout mice.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野 : 生物学

科研費の分科・細目 : 生物科学・機能生物化学

キーワード : 糖鎖、糖脂質、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景 | 肥満およびインスリン抵抗性は、糖代謝異常、

脂質代謝異常、高血圧などを重積し動脈硬化性疾患発症の基礎となるメタボリックシンドロームの最も上流に位置する病態である。糖鎖自体が機能を持っていることが明らかになりつつあり。それに伴い、疾患との関連もクローズアップされつつある。糖鎖が最もその発症原因として関わっていることが明らかになっている病気は CDG (congenital disorder of glycosylation、先天性糖鎖合成異常)であり、2004 年までに 350 を超える家系が世界で見いだされている。糖鎖がシグナル異常や生命維持に重要な働きをしていることが明らかになってきた。

## 2. 研究の目的

スフィンゴ糖脂質の変化とメタボリックシンドロームとの関係を明らかにする。

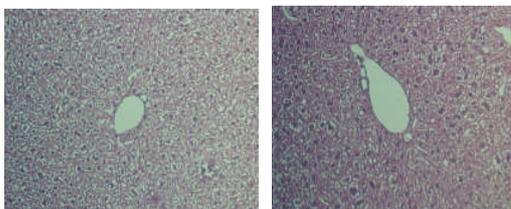
## 3. 研究の方法

代表研究者が米国 NIH で作製したノックアウトマウスを用い、さらに 2 型糖尿病モデルマウスの作製し、解析する。ブドウ糖付加実験、インスリン付加試験糖を実施し、糖鎖変化と感受性の変化を観察する。

## 4. 研究成果

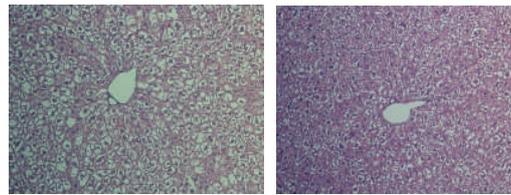
(1) GM3 合成酵素 (GM3S) 欠損マウスはインスリンレセプターの恒常的な高リン酸化の状態を示すことが既に示されている (Yamashita T et al. PNAS, 2003 100 (6): 3445-9.). 今回我々は、メタボリックシンドロームを誘発する高カロリー食を与えることで、摂食量、体重変化、血中グルコース量、グルコース感受性、インスリン感受性、病理組織像、血清値の変化、およびメタボリックシンドロームに関わる遺伝子群の発現変化を調べた。その結果、GM3 合成酵素欠損マウスでは、摂食量、体重変化、血中グルコース量、グルコース感受性、インスリン感受性、病理組織像において、変化が観察された。

通常食と高カロリー食を与えたあとの肝臓の組織所見



通常食投与  
野生型マウス

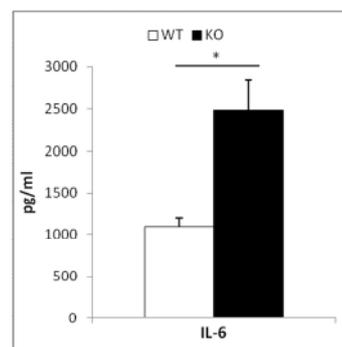
通常食投与  
ノックアウトマウス



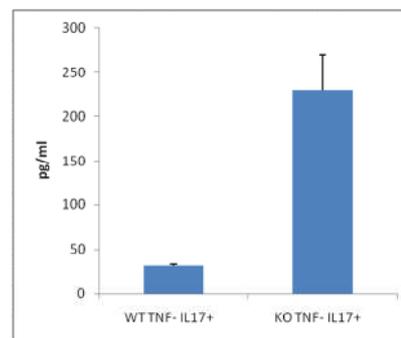
高カロリー食投与  
野生型マウス

高カロリー食投与  
ノックアウトマウス

(2) メタボリックシンドロームに関わる遺伝子群の観察では、主に炎症に関わる IL-6 の発現の上昇が観察された。この原因として T 細胞の関与が示唆されたため、T 細胞が主に分泌するサイトカインを調べた結果、IL-17、IFN-gamma の発現に差が観察された。脂肪産生およびグルコース代謝に関わる遺伝子群は解析中である。これらのことから、細胞膜の脂質成分の変化が免疫能に影響を及ぼしていることを示唆する結果である。



(3) ノックアウトマウスから樹立した胚性繊維芽細胞 (MEF) における細胞増殖能の亢進と脂肪細胞への分化実験の結果、脂肪の蓄積に有為な差が観察された。これら細胞を用いた実験において、LPS 刺激下におけるサイトカインの発現量の増加が観察された。



IL-6 の発現量の変化

(4) メタボリックシンドロームでは、中枢

神経によるレプチン等のホルモンコントロールの重要性が指摘されている。そこで、GM3合成酵素欠損マウスにおける行動解析を行った結果、ある薬剤に対する感受性に差が観察された。さらに、レセプターの種類により感受性が異なることが明らかになった。

(5) 脳の糖タンパク組成を調べた結果、糖脂質の欠損に呼応するように、ある種の糖タンパク質量の上昇と、本来発現が観察されない糖脂質が観察された。今後、糖脂質と脂肪細胞、神経系を中心に解析を行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Niimi K, Nishioka C, Miyamoto T, Takahashi E, Miyoshi I, Itakura C, Yamashita T. 'Impairment of neuropsychological behaviors in ganglioside GM3-knockout mice.' *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 *in press.* 査読有
- ② Nagahori N, Uchida M, Kinjo M, Yamashita T. 'Use of carbohydrate-conjugated nanoparticles for an integrated approach to functional imaging of glycans and understanding of their molecular mechanisms.' *Curr Pharmaceutical Biotech.* 2011 *in press.* 査読有
- ③ Yamashita T. 'Glycosphingolipids Modification: Structural diversity, functional and mechanistic integration of diabetes.' *Korean Diabetes J,* 2011 *in press.* 査読無
- ④ Yamashita T. 'Recent advances in glycosphingolipids.' *Curr Pharmaceutical Biotech,* 2011 *in press.* 査読有
- ⑤ Watanabe S, Endo S, Oshima E, Hoshi T, Higashi H, Yamada K, Tohyama K, Yamashita T, 'Hirabayashi Y. Glycosphingolipid synthesis in cerebellar Purkinje neurons: Roles in myelin formation and axonal homeostasis.' *Glia.* 2010;58:1197-1207. 査読有
- ⑥ Amano M, Yamaguchi M, Takegawa Y,

Yamashita T, Terashima M, Furukawa J, Miura Y, Shinohara Y, Iwasaki N, Minami A, Nishimura S. 'Threshold in stage-specific embryonic glycotypes uncovered by a full portrait of dynamic N-glycan expression during cell differentiation.' *Mol Cell Proteomics.* 2010;9:523-537. 査読有

[学会発表] (計16件)

- ① 佃幸憲、山下匡、岩崎倫政、浅野毅、清藤直樹、三浪明男、The Effects of ganglioside contributing to collagen-induced arthritis model in mice. 第33回日本分子生物学会、2010年12月7-10日、神戸ポートアイランド(神戸)
- ② 光武進、横田はつき、座間宏太、山下匡、岡崎俊朗、渡辺研、五十嵐靖之、スフィンゴミエリン合成酵素2は、食事誘導性脂肪肝形成に関与する。第33回日本分子生物学会、2010年12月7-10日、神戸ポートアイランド(神戸)
- ③ 山下匡、スフィンゴ糖脂質は、リウマチ性関節炎、変形性関節炎の発症に重要である。第8回バイオオプティクス研究会・理研FCS合同シンポジウム、2010年12月3-4日、東京農工大学(東京)
- ④ 渡辺俊、遠藤昌吾、大島恵理子、遠山稿二郎、山下匡、平林義雄、軸索の維持とミエリン形成における軸索スフィンゴ脂質合成の機能。第32回日本分子生物学会、2009年12月9日-12日、パシフィコ横浜(横浜)
- ⑤ 岡本瞳、山下匡、長堀紀子、西村紳一郎、Study of glycoform alteration and function in T cell specific GSLs KO mice. 第32回日本分子生物学会、2009年12月9日-12日、パシフィコ横浜(横浜)

⑥ 横山真理、天野麻穂、黒河内政樹、武川泰啓、長堀紀子、山下匡、西村紳一郎、卵巣における性周期特異的な発現を示す糖タンパク質の同定。第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 9 日-12 日、パシフィコ横浜 (横浜)

⑦ 瀧森祥太、島岡秀之、天野麻穂、山下匡、篠原康郎、Kacskovics Imre、西村紳一郎、授乳期のウシ乳中の N-グリコームおよび IgG 糖鎖の変動と FcRn との相互作用がおよぼす影響。第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 9 日-12 日、パシフィコ横浜 (横浜)

⑧ 和島未波、長堀紀子、山下匡、西村紳一郎、スフィンゴ糖脂質ノックアウトマウスを用いた糖脂質機能関連分子の探索、第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 9 日-12 日、パシフィコ横浜 (横浜)

⑨ YAMASHITA Tadashi, Biological Function of Glycosphingolipids -Interruption of ganglioside synthesis shows enhanced insulin receptor phosphorylation and produces central nervous system degeneration-. 2009 Annual Meeting of the Korean Association for Laboratory Animal Science, August 27-29, 2009, Cheonan Sangnok Resort, Korea.

⑩ 山下匡、スフィンゴ糖脂質欠損 T 細胞は、細胞死を誘発する。第 7 回バイオオプティクス研究会、2009 年 12 月 4 日-5 日、北海道大学 (札幌)

⑪ 山下匡、糖脂質欠損 T 細胞では何が起きているか。第 4 回 STC 研究会、2009 年 7 月

17 日-18 日、大山ロイヤルホテル (米子)

⑫ 座間宏太、林遥、光武進、角南寛、山下匡、渡辺研、岡崎俊朗、五十嵐靖之、細胞内スフィンゴミエリン量の細胞増殖及び糖脂質合成に与える影響。第 82 回日本生化学会、2009 年 10 月 21 日-24 日、神戸ポートアイランド (神戸)

⑬ Masakazu Nagafuku, Yuri Onimaru, Tadashi Yamashita, Jin-ichi Inokuchi1. Distinct ganglioside-species specific dependencies between CD4+ and CD8+ T cells in the TCR-mediated activation. Gordon Research Conference (U.S.A.), 2009, January, 18-23, Ventura, CA, USA.

⑭ 光武進、横田はづき、座間宏太、山下匡、岡崎俊朗、渡辺研、五十嵐靖之、中性脂質蓄積/代謝におけるスフィンゴミエリン合成酵素 2 の働き。第 82 回日本生化学会、2009 年 10 月 21 日-24 日、神戸ポートアイランド (神戸)

⑮ Masakazu, ONIMARU Yuri, YAMASHITA Tadashi, INOKUCHI Jin-ichi, Distinct ganglioside-species specific dependencies between CD4+ and CD8+ T cells in the TCR-mediated activation. 第 38 回日本免疫学会、2008 年 12 月 1 日-3 日、京都国際会議場 (京都)

⑯ 山下匡、ノックアウトマウスを用いた糖脂質の生理学的機能、第 6 回バイオオプティクス研究会、2008 年 12 月 19 日-20 日、舘山寺温泉 (浜松)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 匡 (YAMASHITA TADASHI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・  
准教授

研究者番号：30220338

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し