様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　5 年　6 月 14 日現在

機関番号：３１３０５
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ１６１５９

研究課題名（和文）グロボ系糖脂質の新たな発現誘導機構の解明と腎症への関与

研究課題名（英文）The association between globo-series glycosphingolipid and diabetic nephropathy

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）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病性腎症病態において、腎臓で特異的にガラビオシルセラミドという種類の糖脂質が増加する。腎臓における上記糖脂質の増加は、抗肥満ホルモンであるレプチンや、血糖値を下げるインスリンの異常によって引き起こされており、糖尿病に密接に関連していることが強く示唆された。また、増加したガラビオシルセラミドの役割についての解析を行い、免疫細胞であるマクロファージのToll様受容体(TLR4)を介した炎症反応や細胞死を促進していることを明らかにした。ガラビオシルセラミドが炎症反応や細胞死を促進することで糖尿病性腎症の病態の形成や増悪に関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
糖尿病性腎症の病態形成や増悪に、炎症や細胞死が関与することは知られているが、どのような物質がどのようなメカニズムでという部分には、多くの疑問が残されている。本研究では、これまであまりターゲットとされていない糖脂質に着目しその役割を解析し、炎症と細胞死に関与することを明らかにした。つまり、これまで知られていなかった新たなメカニズムと治療標的となりうるターゲットを発見したということであり、今後新たな治療法や治療薬開発につながっていくことが考えられ、QOLを著しく下げる末期腎不全への移行を遅らせられたり、治療が可能となる基礎的データになりうると期待される。

研究成果の概要（英文）：In diabetic nephropathy, a type of glycolipid called galabiosylceramide is specifically increased in the kidney. This increase in glycolipid in the kidney is caused by abnormalities in the anti-obesity hormone leptin and insulin, which lowers blood glucose levels, strongly suggesting that it is closely related to diabetes. In addition, analysis of the role of increased galabiosylceramide revealed that it promotes inflammatory responses and cell death via Toll-like receptors (TLR4) on macrophages, which are immune cells. It was hypothesized that galabiosylceramide may be involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy formation and exacerbation by promoting inflammatory responses and cell death.

研究分野：脂質生物学

キーワード：糖尿病性腎症　スフィンゴ糖脂質　炎症反応　マクロファージ　炎症性細胞死　ガラビオシルセラミド

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

レプチンは、肥満遺伝子[obese (ob) gene]に由来するアディポサイトカインであり、脂肪細胞から分泌され視床下部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作用を発現する。血中レプチン濃度は、体脂肪量に比例することから、脂肪が異常に減少した“やせ”では低値を、脂肪が蓄積した“肥満”では高値を示す。慢性的な高レプチン血症では、その中枢作用が低下するレプチン抵抗性を生じる一方で、末梢組織の過剰なレプチン受容体の活性化が惹起され、さまざまな病態を呈する。特に、糖尿病とその合併症である腎症、高血圧、脂質異常症など、多くの生活習慣病においてレプチンの病態生理学的な関与が示されている(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。

これまでに申請者は、肥満・糖尿病モデル(KK)マウスの腎臓で、スフィンゴ糖脂質 Gb3(セラミドと糖鎖からなる)が顕著に増加すること、Toll-like receptor 4 (TLR4) リガンドによるマクロファージ活性化を Gb3 が促進し、炎症増悪に寄与することを見出しており、糖尿病性腎症の病態形成に腎 Gb3 が関与することが示唆された。腎臓の Gb3 発現は、炎症性サイトカインによって増加することがすでに報告されているが、最近申請者は、腎 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た。

２．研究の目的

本研究の目的は、「糖尿病性腎症におけるレプチンのスフィンゴ糖脂質発現誘導を介した病態形成メカニズム」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る。

３．研究の方法

本研究課題では、Cre-loxp システムにより脳あるいは腎臓特異的なレプチン受容体欠損マウス作成し、腎臓の糖脂質発現について薄層クロマトグラフィーを用いて解析を行った。また、糖尿病性腎症モデルマウスを用いて、発現変化する糖脂質についても同様に解析を行った。スフィンゴ糖脂質の生理活性については、マウスマクロファージ細胞を用いて、刺激実験を行う ELISA 法により炎症性サイトカインの量を定量し評価した。

４．研究成果

レプチンシグナルの欠損した ob/ob, db/db マウスにおいては、腎臓の糖脂質発現に変化が観察されることから、レプチンシグナリングが糖脂質発現に関与することが示唆されていた。そこで、より詳細に解析を行うために、腎臓あるいは脳特異的レプチン受容体欠損マウスを作成し、レプチンシグナリングが糖脂質の発現に影響を与えているかどうかを調べた。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)マウスを作出した。このマウスについて、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ことに加え、腎臓の糖脂質発現においても野生型と同じで変化は観察されなかった。また、レクチンを用いたグロボ系スフィンゴ糖脂質の腎組織染色では、これまでの報告と同様に腎尿細管上皮細胞において豊富に発現しているのを確認した。　これらの結果から、腎尿細管に発現する糖脂質の発現は、腎臓に発現するレプチン受容体が制御している可能性は低いと考えられた。よって、間接的な腎臓の糖脂質発現が制御を調べるために、脳神経特異的レプチン受容体欠損マウス(Lepr(flox/flox)-NesCre(Tg))を作成した。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。この脳特異的欠損マウスでは、腎臓における Gb3 の発現が若干減少していたことに加え、腎臓の遺伝子発現を定量的 RT-PCR で調べた結果、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。驚いたことに、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。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。

上記の実験と並行して、薬剤誘導性糖尿病性腎症モデルマウス(STZ 誘導モデル)ならびに Akita マウスを用いて同様に腎糖脂質発現変化を解析した結果、興味深い結果が得られた。これらのマウスもレプチンシグナル欠損マウス同様に、グロボ系糖脂質の発現が著しく減少しており、対照的にガラビオシルセラミドの発現が増加していた。STZ 誘導モデルならびに Akita マウスに共通しているのは、インスリンシグナルが低下していることであり、インスリンが腎臓の糖脂質発現制御に関与していることが示唆された。レプチンとインスリンは代謝において重要なホルモンであることから、スフィンゴ糖脂質の合成を担う合成酵素や糖転移酵素の発現、糖・脂質代謝に影響を及ぼしている可能性が示唆される。

生理活性評価においては、炎症反応に対する糖脂質の作用について解析を行った。腎臓で増加したガラビオシルセラミドで免疫細胞を刺激し、炎症性サイトカインの分泌を ELISA で確認したところ炎症促進作用が観察された。ガラビオシルセラミドについては、その生理活性がほとんど分かっていなかったことから、この作用は新規の発見となった。また、近年スフィンゴ糖脂質がリガンドとして免疫細胞に作用するといった報告が増加しており、これまで細胞膜成分のひとつであることから膜上での相互作用ばかりに目が向けられてきたが、本研究での発見と近年の報告によってスフィンゴ糖脂質のリガンドとしての作用に着眼点シフトしていくと予想される。したがって、今後さらなる発展が期待される。

今後は、インスリン・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、スフィンゴ糖脂質発現変化を介した疾患発症ならびに増悪メカニズムの詳細について解析を行い、これまでほとんど知られていない脳と腎臓の連関を明らかにしていく予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計5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 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 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 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

〔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