

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370064

研究課題名(和文) ガングリオシドGM3の新たな病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Emerging pathophysiological roles of ganglioside GM3

研究代表者

井ノ口 仁一 (INOKUCHI, Jin-ichi)

東北薬科大学・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) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヘルパーT細胞とキラーT細胞はTCR依存性の機能発現において異なるガングリオシド分子種の発現を必要とすることを見いだした。特に、ガングリオシドGM3合成酵素 KO マウスでは、ヘルパーT細胞の選択的活性化抑制により、喘息気道炎症が抑制されることを証明した。従って、GM3の発現抑制は選択的ヘルパーT細胞の機能制御法へと発展し、ヘルパーT細胞特異的免疫機能制御によるアレルギー疾患や自己免疫疾患や糖尿病などのメタボリックシンドロームの治療法開発の突破口となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have found that CD8T cells express very high levels of o-series gangliosides, but on the other hand, CD4T cells preferably express a-series gangliosides. In the TCR dependent activation, CD4T cells selectively require a-series gangliosides, but CD8T cells do require only o-series gangliosides but not a-series gangliosides. Ganglioside GM3 synthase-deficient mice lacking a-series gangliosides neither exhibited the TCR-dependent activation of CD4T nor developed ovalbumin-induced allergic airway inflammation. These findings imply that the distinct expression pattern of ganglioside species in CD4T and CD8T cells define the immune function of each T cell subset.

We also propose a working hypothesis =metabolic disorders, such as type2 diabetes, are membrane microdomains in disorders caused by aberrant expression of gangliosides=.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・糖鎖生物学

キーワード：スフィンゴ等脂質 ガングリオシド 免疫シナプス ラフト CD4+ T細胞 CD8+ T細胞 アレルギー治療 喘息治療

1. 研究開始当初の背景

我々は、肥満による肥大化脂肪組織の慢性炎症状態における脂肪細胞インスリン抵抗性の発症機序として、炎症性サイトカイン TNF α による GM3 の増加がカベオラからインスリン受容体を乖離させ、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、スフィンゴ糖脂質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（代表文献 Tagami S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2002; Kabayama K. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci. USA* 2007）。

また、我々は、ガングリオシド系列の生合成における二つの鍵酵素である GM3 合成酵素 (GM3S) および GM2/GD2 合成酵素 (GM2/GD2S) の各遺伝子改変マウス (KO) を用いて T 細胞受容体を介した活性化を検討したところ、非常に印象的な現象が判明した。即ち、GM3S KO では CD4T 細胞の機能が重度に障害していたが CD8T 細胞は正常であった。対照的に、GM2/GD2S KO では CD4T 細胞は正常であったが CD8T 細胞は重度に障害していた。この結果は、T 細胞サブセットごとにその機能発現に必要なガングリオシド分子種が異なることを示している。従って本研究においては、胸腺における T 細胞分化過程（レパトア選択）は、T 細胞サブセットごとの糖脂質発現の選択過程でもあり、この糖脂質選択は機能的 T 細胞への成熟に不可欠な現象であること、即ち、**”Glycolipid Selection is indispensable for Repertoire Selection”** という作業仮説を検証する。

2. 研究の目的

GM3 は一連のガングリオシド分子群の生合成の最初の物質であり、末梢組織の主要なガングリオシドである。申請者らは、

GM3 合成酵素 (GM3S) 遺伝子の発現は、肥満、ストレス、炎症などの環境において大きく変化し、生体膜マイクロドメインの機能を変化させることを証明してきた。マイクロドメインはコレステロールとガングリオシドなどのスフィンゴ糖脂質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。その機能異常は、様々な疾患の発症原因になり得ることが示されつつある。本申請では、**我々が独自に見いだした GM3 および関連ガングリオシドの発現異常にもとづくメタボリックシンドロームおよび免疫機能における膜マイクロドメインを介した病態発症機構を重点的に解析する。**

3. 研究の方法

我々は、炎症刺激や肥満による肥大化脂肪細胞では細胞膜のガングリオシド GM3 レベルの持続的な上昇に基づくラフト構造のリモデリングによって脂肪細胞のインスリン抵抗性にもとづく慢性炎症状態が惹起される可能性を見いだしている。また、GM3 合成酵素 (GM3S) の欠損マウスでは、CD4T 細胞の機能が選択的に抑制され、アレルギー性気道炎症が顕著に軽減した。これらの発見により、GM3S はメタボリックシンドロームやアレルギー性疾患治療の新たな標的分子であることが判明しつつある。本研究では、

- (1) GM3 の発現制御によるメタボリックシンドローム関連病態
- (2) ガングリオシド分子種特異的 T 細胞サブセット機能制御機構について検討した。

4. 研究成果

- (1) GM3 の発現制御によるメタボリックシンドローム関連病態。

特記すべき未発表知見として、HFD 負荷 GM3S KO マウスの内臓脂肪組織は抗炎症的になっていることが挙げられる。野生型マウスと比して TNF α の遺伝子発現が低下し、アディポネクチンや抗炎症性サイトカイン IL-10 が上昇していた。加えて、iNOS や PAI-1 といった他のメタボリックシンドローム関連病態に関与する因子の遺伝子発現も HFD 負荷 GM3S KO マウスでは有意に低下していた。この結果は、持続的低炎症状態の脂肪組織では TNF α 発現上昇により GM3 が増加してインスリン抵抗性を惹起することに加えて、GM3 は TNF α 発現を上流で制御していることを示唆している(投稿中)。

一方我々は、GM3S KO を apoE KO と交配させることにより DKO マウスを樹立して解析したところ、血中のコレステロール値は ApoEKO マウスの半分に、トリグリセリド値は正常レベルにまで低下していた(未発表)。これまで、ガングリオシドとコレステロールおよび中性脂肪の代謝の関連性については、全く未知であった。ガングリオシド合成を抑制することで、高脂血症を抑制できることを初めて証明し、GM3S は高脂血症の新たな治療標的であることを見だし、特許を取得した。

最近、視床下部摂食中枢の機能にガングリオシドの関与を示す興味深い結果が得られた。2年をかけて、KKAy および KK の遺伝背景を有する GM3SKO マウスを作成した。これらのマウス(KKAy/GM3SKO および KK/GM3SKO)の糖尿病関連の表現型を24週令で検討したところ、糖尿病の発症が両マウスでほぼ完全に抑えられ、さらに、KK マウスに Ay (Agouti) 遺伝子を導入した KKAy マウスは過食による体重増加を示したが、KKAy/GM3SKO マウスでは摂食量と体重増加が KK マウスと同じレベルにまで抑制されていた(未発表)。また、糖尿病性皮膚潰瘍の皮膚では GM3 の

発現が亢進することにより IGF-1 受容体の機能が抑制されており、GM3S KO マウスでは、ケラチノサイトの IGF-1 シグナルが活性化し、糖尿病性皮膚潰瘍の病態が著しく改善することが示されている。糖尿病腎症の糸球体でも GM3 の発現が亢進し、その発現低下は病態改善に繋がる可能性が示れつつある。従って、GM3S は糖尿病およびその合併症の治療に対する共通の創薬ターゲットとして期待される。

(2) ガングリオシド分子種特異的 T 細胞サブセット機能制御機構

興味あることに、近年に至るまで T 細胞の分化・成熟過程におけるスフィンゴ脂質分子種の発現とその意義について未だ十分な解明がなされていなかった。最近我々は、CD4T 細胞と CD8T 細胞は TCR 依存性の機能発現において異なるガングリオシド分子種の発現を必要とすることを見いだした[Nagafuku et al., PNAS 2012]。特に、GM3S KO マウスでは、CD4T 細胞の選択的活性化抑制により、喘息気道炎症が抑制されることを証明した。一方、CD8T 細胞の機能が選択的に欠損している GM2/GD2S KO マウスでは、アレルギー性気道炎症反応に変化はみられなかった。従って、GM3 の発現抑制は選択的ヘルパー T 細胞の機能制御法へと発展し、ヘルパー T 細胞特異的免疫機能制御によるアレルギー疾患や自己免疫疾患などの慢性炎症性疾患の治療法開発の突破口となることが期待される[Inokuchi et al., Cell Mol Life Sci 2013]。

T 細胞分化過程におけるミクロドメインの膜構成成分であるガングリオシドの胸腺での生理的意義をさらに詳細に検討した。に、胸腺での T 細胞分化過程の概略を示した。ガングリオ系ガングリオシドが全て欠損している GM3S と GM2/GD2S

のDKOマウスの胸腺T細胞を調べた。DKOマウスでは、個体発生は起こるが胸腺細胞数が野生型マウスに比して200分の1程度まで激減していた。このガングリオシド欠損マウスにおけるT細胞分化の抑制は、SCIDマウスなどの免疫不全マウスやT細胞分化・機能関連シグナル分子Lck/Fyn DKOマウスに相当するものである。DKOマウスの分化はDN3ステージで顕著に抑制されることが判明した。コレラ毒素(CTxB)を用いてガングリオシドの発現を解析したところ、DN3の段階でガングリオシド発現が急上昇することから、 β セレクションのプロセスにおいてガングリオシドの発現が重要な役割を果たすことがはじめて示された。以上の結果より、T細胞分化過程における多様なラフト構成は、T細胞の分化および機能発現における必要不可欠なイベントであることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計14件)

- [1] Inokuchi J. (2011) "Physiopathological function of hematoside (GM3 ganglioside)" *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* **87**, 179-198 (2011)
- [2] Nagafuku M, Okuyama K., Onimaru Y., Suzuki A., Odagiri Y., Yamashita T., Iwasaki K., Fujiwara M., Takayanagi M., Ohno I. and *Inokuchi J. (2012) CD4 and CD8 T cells require different membrane gangliosides for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**. E336-E342
- [3] Sekimoto J., Kabayama K., Gohara K., and *Inokuchi J. (2012) Dissociation of the insulin receptor from caveolae during TNF α -induced insulin resistance and its recovery by D-PDMP. *FEBS Lett.* **586**: 191-195
- [4] *Inokuchi J, Nagafuku M, Ohno I. and Suzuki A. (2013) Heterogeneity of gangliosides among T cell subsets. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3067-75.
- [5] Uemura S, Go S, Shishido F, Inokuchi J (2013) Expression machinery of GM4: the excess amounts of GM3/GM4S synthase (ST3GAL5) are necessary for GM4 synthesis in mammalian cells. *Glycoconj. J.* DOI 10.1007/s10719-013-9499-1

[6] Inokuchi J. (2014) GM3 and Diabetes *Glycoconj. J.* **31**:193-197

[7] Uemura S., Shisido F., Tani M., Mochizuki T., Abe T. and Inokuchi J. (2014) Loss of hydroxyl groups from the ceramide moiety can modify the lateral diffusion of membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Lipid Res.* May 29. pii: jlr.M048637. [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計25件)

[1] Inokuchi J. CD4 and CD8T cells require different gangliosides for activation. The 14th International Membrane Research Forum. Kyoto. March 15-17th, 2013.

[2] Inokuchi J. Ganglioside-dependent membrane microdomain: Involvement of insulin resistance, hearing function and T cell immunity. GlycoMedicine Seminar. Academia Sinica Taipei. Dec. 8th. 2013

[3] Inokuchi J. CD4 and CD8T cells require different gangliosides for activation. The 52nd International Conference on Bioscience of Lipids, Bari, Italy, Sept. 17-22, 2014

[4] Inokuchi J. GM3 and Diabetes. Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid, Ventura, CA, USA Jan. 12-17, 2014

〔図書〕(計1件)

Inokuchi J. (2011) Inhibition of ganglioside biosynthesis as a novel therapeutic approach in insulin resistance. Handbook of Experimental Pharmacology **203**,165-78 (Springer)

〔産業財産権〕

○取得状況(計2件)

名称: 高脂血症治療剤のスクリーニング方法
発明者: 井ノ口仁一、永福正和、速水博孝
権利者: JST
種類: 特許
番号: 特許第5077901号
出願年月日: 特願2011-543277
国内外の別: 国際

名称: ヘルパーT細胞の選択的機能制御法
発明者: 井ノ口仁一、永福正和、大野勲、奥山香織
権利者: JST
種類: 特許
番号: 特許第5232241号

取得年月日：特許第 5232241 号
国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/homepages/kinoubyoutai/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井ノ口 仁一(INOKUCHI, Jin-ichi)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70131810

(3) 連携研究者

上村 聡志 (UEMURA, Satoshi)

青山学院大学・理工学部・助教

研究者番号：10399975

永福正和 (NAGAFUKU, Masakazu)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20399976

郷慎司 (Go, Shinji)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10458218