

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15450

研究課題名(和文) ガングリオシドのアシル鎖構造に基づく新たな炎症制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of inflammatory mechanisms regulated by acyl-chain structures of Ganglioside GM3

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)：慢性炎症は、メタボリックシンドロームの発症を決定づける強力な増悪因子となる。申請者は、血清中や脂肪組織中のスフィンゴ糖脂質：ガングリオシドGM3が、自然免疫系の受容体Toll-like receptor 4 (TLR4) を介して慢性炎症を引き起こすこと、その作用がGM3の脂質構造(脂肪酸の鎖長や不飽和度)の違いによって制御されることを見出している。本課題では、GM3によるTLR4制御メカニズムの一端を分子レベルで明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TLR4は、感染防御において中核的な役割を果たす一方、慢性炎症の要因としても大きな位置を占めており、正と負の側面を併せ持っている。その制御メカニズムの全体像を明らかにすることは、慢性炎症に対する根本的な制御法・治療法の確立につながる。本課題の成果は、体内に存在するGM3の分子構造の違いによって、TLR4が正と負に制御されるメカニズムを示しており、スフィンゴ糖脂質研究の今後の発展に加え、免疫機能や炎症の調節を標的とした医薬開発や臨床診断法への応用が期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation plays a critical role in pathogenesis of metabolic disorders. Ganglioside GM3, a major molecular species in adipose tissue and human serum, can enhance/inhibit inflammatory processes via an innate immune receptor Toll-like receptor 4 (TLR4) in a acyl-chain structure dependent manner. This project revealed the molecular mechanism by which GM3 species differing in its acyl-chain structures modulate TLR4 activation.

研究分野：免疫学、糖鎖生物学、脂質生物学

キーワード：スフィンゴ糖脂質 ガングリオシド TLR4 慢性炎症 メタボリックシンドローム 内因性リガンド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自然免疫系は、感染応答の最前線で病原体を捉え、迅速に排除する生体防御機構である。近年、この自然免疫系の制御破綻が、慢性炎症、がん、メタボリックシンドロームなどの疾患を誘発する重大な要因であることが示唆されつつある<sup>[1]</sup>。とくに、生体内で生じる内因性リガンドを介した Toll-like receptor 4 (TLR4) 活性化による慢性炎症は、メタボリックシンドロームの発症を決定づける強力な増悪因子となる<sup>[2-4]</sup>。申請者は最近、肥満時に増加するスフィンゴ糖脂質：ガングリオシド GM3 が、TLR4 の内因性リガンドとして慢性炎症を惹起すること、その生理活性がガングリオシド GM3 のアシル鎖構造（鎖長や不飽和度）の違いによって制御されることを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、「GM3 のアシル鎖構造に依存した新たな TLR4 活性化制御メカニズム」を解明すること、具体的には、GM3 のアシル鎖構造を制御するメカニズム、GM3 が TLR4 リガンドとして機能する分子基盤、生体内で炎症を誘発するメカニズムを解明することである。

### 3. 研究の方法

本課題では、TLR4 発現細胞（ヒト単球、マウスマクロファージ細胞、HEK293 細胞過剰発現系）を用いたシグナル伝達解析手法、イメージング手法、相互作用解析手法や、GM3 の発現亢進を示す肥満・糖尿病モデルマウス（ob/ob マウス、高脂肪食負荷マウスなど）を用いることで、GM3 の産生メカニズムと TLR4 への作用メカニズムの解析を試みた。

### 4. 研究成果

初年度は、以下の研究成果を得た。(1) HEK293 細胞を用いた TLR4 経路再構築系と NF- $\kappa$ B ルシフェラーゼアッセイを用いた各種実験の結果、TLR4 と相互作用する糖脂質リガンド結合性アクセサリータンパク質（MD-2、CD14 など）がガングリオシドを介した TLR4 活性化制御に必要であること、また、アクセサリータンパク質の種類によってアシル鎖構造に対する選択性が異なることが明らかになった。とくに、予備知見においてヒト単球で観察された、長鎖 GM3 による抑制効果と極長鎖 GM3 による活性化促進効果は、TLR4/MD-2 複合体を発現する HEK293 細胞に可溶性 CD14 を添加した条件で良好に再現された。また、血清中における GM3 分子種バランスの意義を明らかにするため、長鎖 GM3 と極長鎖 GM3 の混合系で TLR4 発現細胞を LPS 刺激した結果、GM3 分子種の個々の生理活性とその混合比率に対応して、TLR4 活性化が亢進・減弱した。このことから、血清中の GM3 分子種発現パターンが TLR4 活性化パターンを制御している可能性が示唆された。(2) マウス TLR4/MD-2 発現細胞を用いて(1)と同様の実験を行い、ガングリオシドの作用についてヒトとマウスにおける種差を比較した。その結果、アシル鎖構造に対する選択性が、アクセサリータンパク質の生物種によって異なることが分かった。極長鎖 GM3 はマウス TLR4/MD-2 に対しても活性化促進効果を示した。一方、長鎖 GM3 は、ヒト TLR4/MD-2 に対して抑制効果を示すが、マウス TLR4/MD-2 に対しては弱い活性化促進効果を示した。マウス TLR4 とヒト MD-2 によるキメラ複合体に対しては、長鎖 GM3 は抑制効果を示した。このことから、MD-2 が GM3 の脂質（セラミド）構造を認識していることが示唆された。また、部位特異的アミノ酸置換による変異体解析によって、極長鎖 GM3 の作用発現に関わる TLR4 細胞外ドメイン側のアミノ酸を探索した。その結果、LPS の酸性糖鎖構造の認識に関与することが示唆されていた塩基性アミノ酸のいくつかは、GM3 の作用発現に寄与していることがわかった。GM3 糖鎖構造にも酸性のシアル酸が存在していることから、TLR4 によって GM3 の糖鎖構造が認識される可能性が考えられた。以上の結果から、ガングリオシド GM3 が TLR4 細胞外ドメインとアクセサリータンパク質 MD-2 からなる複合体に対して直接的に作用する可能性が得られた。(3) 生細胞内における発光イメージング手法を用いて、ガングリオシドによる TLR4 複合体の会合状態の変化を検出した。その結果、異なるアシル鎖構造のガングリオシドの作用によって、TLR4 の会合状態が遷移している可能性が得られた。

次年度は、次の成果を得た。(1) これまでの結果をまとめ、論文の作成および投稿を行った。とくに、昨年度までに得られた GM3 ガングリオシドのアシル鎖構造に応じた TLR4 活性化の分子メカニズムについて、論文化を行った。(2) また、肥満・糖尿病の疾患モデルマウスや、野生型および GM3 合成酵素ノックアウトマウスを用いて、生体内や組織中における GM3 ガングリオシドの生理機能解析や、異なるアシル鎖の GM3 ガングリオシドが産生されるメカニズムの解析についても着手した。(3) 加えて、疾患モデルマウスを作成する過程において、GM3 ガングリオシド以外にも、メタボリックシンドロームに関連した慢性炎症（糖尿病性腎症）の発症に関与するスフィンゴ糖脂質分子種としてグロボ系スフィンゴ糖脂質 Gb3 を見出し、これが TLR4/MD-2 複合体を標的としていることを見出した。この内容についても、論文の作成、投稿を行った。

最終年度では、投稿した論文について、査読上で必要とされた追加実験を中心にして本課題を遂行し、以下の成果を得た。(1) GM3 によって TLR4 が活性化を受けた場合のシグナル伝達様式を解析するため、TLR4 下流における種々の転写因子（NF- $\kappa$ B、AP-1、IRF3）に対応したルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。活性化レベルの比較を行い、それぞれのシグナル伝達経路がどの程度の活性化制御を受けているのかを明らかにすることができた。極長鎖 GM3 に

よって、すべての経路の活性化が亢進していたが、NF- $\kappa$ B および AP-1 が比較的大きな影響を受けていた。(2) GM3 分子種と TLR4/MD-2 複合体の結合様式を予測するため、大まかな計算シミュレーション (rigid-rigid docking) を行った。その結果、GM3 分子種のアシル鎖構造の違い (長鎖、極長鎖) に応じた異なる結合様式が示唆された。極長鎖 GM3 については、ヒト・マウス TLR4/MD-2 に共通のアゴニストである LPS および Lipid-A に類似した結合様式が予測され、一方で、長鎖 GM3 については、ヒト TLR4/MD-2 のアンタゴニストである Lipid-IVa に類似した結合様式が予測された。これらの結果から、異なるアシル鎖構造をもつ極長鎖 GM3 と長鎖 GM3 が、それぞれ TLR4 活性化を促進または抑制する分子構造学的要因が示唆された。

以上を総括すると、本課題の遂行によって、血清中や脂肪組織中のガングリオシド GM3 による自然免疫応答・慢性炎症の制御メカニズムの一端を明らかにすることができたと考えられる。研究立案時には想定していなかった知見や作業仮説を新たに得ることもでき、それらを課題遂行に反映することができた。上記の研究成果については、国内外における学会発表や、学術論文として発表を行うことができた。

今後の展開として、より高度なイメージング手法や相互作用解析法の検討を継続することにより、GM3 による TLR4 制御状態がより詳細に明らかになると考えられる。また、引き続き疾患モデルマウスを用いた GM3 発現メカニズム解析や GM3 投与による疾患制御法の検討を進めることによって、本課題の成果を医薬開発へとつなげるための成果が得られると考えられる。

#### 引用文献：

1. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S (2011) NF- $\kappa$ B, Inflammation, and Metabolic Disease. *Cell Metab.* 13: 11-22
2. Lumeng CN, Saltiel AR (2011) Inflammatory Links Between Obesity and Metabolic Disease. *J Clin Invest.* 121: 2111-2117
3. Shi H, Kokojeva MV, Inouye K, Tzamelis I, Yin H, Flier JS (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 116: 3015-3025
4. Pal D, Dasgupta S, Kundu R, Maitra S, Das G, Mukhopadhyay S, Ray S, Majumdar SS, Bhattacharya S (2012) Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med.* 18: 1279-1285

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nitta Takahiro, Kanoh Hirotaka, Inamori Kei-ichiro, Suzuki Akemi, Takahashi Tomoko, Inokuchi Jin-ichi	4. 巻 29
2. 論文標題 Globo-series glycosphingolipids enhance Toll-like receptor 4-mediated inflammation and play a pathophysiological role in diabetic nephropathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 260 ~ 268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwy105	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 Kanoh Hirotaka, Kato Hiroyuki, Suda Yamato, Hori Aki, Kurata Shoichiro, Kuraishi Takayuki	4. 巻 508
2. 論文標題 Dual comprehensive approach to decipher the Drosophila Toll pathway, ex?vivo RNAi screenings and immunoprecipitation-mass spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 332 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.007	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 -
1. 著者名 Nihei Wataru, Nagafuku Masakazu, Hayamizu Hirotaka, Odagiri Yuta, Tamura Yumi, Kikuchi Yui, Veillon Lucas, Kanoh Hirotaka, Inamori Kei-ichiro, Arai Kenta, Kabayama Kazuya, Fukase Koichi, Inokuchi Jin-ichi	4. 巻 59
2. 論文標題 NPC1L1-dependent intestinal cholesterol absorption requires ganglioside GM3 in membrane microdomains	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 2181 ~ 2187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.M089201	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 Inokuchi Jin-ichi, Inamori Kei-ichiro, Kabayama Kazuya, Nagafuku Masakazu, Uemura Satoshi, Go Shinji, Suzuki Akemi, Ohno Isao, Kanoh Hirotaka, Shishido Fumi	4. 巻 156
2. 論文標題 Biology of GM3 Ganglioside	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Progress in Molecular Biology and Translational Science (Schnaar RL., Lopez PHH., eds, Elsevier)	6. 最初と最後の頁 151 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.pmbts.2017.10.004	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 Hirohiko, Nitta Takahiro, Go Shinji, Inamori Kei ichiro, Veillon Lucas, Nihei Wataru, Fujii Mayu, Kabayama Kazuya, Shimoyama Atsushi, Fukase Koichi, 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 Nishikawa Masako, Kurano Makoto, Nitta Takahiro, Kano Hirohiko, Inokuchi Jin-ichi, Yatomi Yutaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Serum GM3(d18:1-16:0) and GM3(d18:1-24:1) levels may be associated with lymphoma: An exploratory study with haematological diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1038/s41598-019-42817-3">https://doi.org/10.1038/s41598-019-42817-3</a>	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 -

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) <a href="https://doi.org/10.24753/jeiis.22.0_1">https://doi.org/10.24753/jeiis.22.0_1</a>	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 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Hirohiko KANO, Takahiro NITTA, Akemi SUZUKI, and Jin-ichi INOKUCHI
2. 発表標題 Homeostatic and pathogenic roles of GM3 ganglioside molecular species in TLR4 signaling in obesity
3. 学会等名 Keystone Symposia Conference M1: Innate Immune Receptors: Roles in Immunology and Beyond, Taipei (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 狩野 裕考, 新田 昂大, 郷 慎司, 藤居 真優, 樺山 一哉, 下山 敦史, 深瀬 浩一, 安藤 弘宗, 石田 秀治, 鈴木 明身, 井ノ口 仁一
2. 発表標題 極長鎖GM3ガングリオシドを介したTLR4活性化がメタボリックシンドロームを発症させる
3. 学会等名 第37回 日本糖質学会年会(仙台)
4. 発表年 2018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 GM3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
3. 学会等名 第91回 日本生化学会年会(京都)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 狩野 裕考, 新田 昂大, 藤居 真優, 樺山 一哉, 下山 敦史, 深瀬 浩一, 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Toll-like receptor 4 活性化制御メカニズム
3. 学会等名 第24回日本エンドトキシン・自然免疫研究会(横浜)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新田 昂大, 宮原 一樹, 狩野 裕考, 稲森 啓一郎, 森 建文, 廣瀬 卓男, 中村 保宏, 鈴木 明身, 井ノ口 仁一
2. 発表標題 肥満マウスにおける腎臓でのスフィンゴ糖脂質の発現変化
3. 学会等名 第60回 日本脂質生化学会(東京)
4. 発表年 2018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クロボ系糖脂質の機能的役割
3. 学会等名 第11回 セラミド研究会 学術集会（東京）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inokuchi J., Kanoh H.
2. 発表標題 New Paradigm for Chronic Inflammation Mediated by Ganglioside Molecular Species.
3. 学会等名 24th International Symposium on Glycoconjugates. Jeju, Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Inokuchi J., Kanoh H.
2. 発表標題 New Paradigm for Chronic Inflammation Mediated by Ganglioside Molecular Species.
3. 学会等名 9th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology Conference, Hong Kong (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 狩野 裕考, 郷 慎司, 新田 昂大, Lucas Veillon, 藤居 真優, 樺山 一哉, 下山 敦史, 深瀬 浩一, 安藤 弘宗, 石田 秀治, 名取 良浩, 吉村 祐一, 鈴木 明身, 井ノ口 仁一
2. 発表標題 ガングリオシドGM3のアシル鎖構造に基づく新たな自然免疫応答と慢性炎症
3. 学会等名 第59回日本脂質生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井ノ口仁一, 狩野 裕考
2. 発表標題 ガングリオシド分子種による慢性炎症応答の新機軸
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 狩野 裕考, 郷 慎司, 新田 昂大, Lucas Veillon, 藤居 真優, 樺山 一哉, 下山 敦史, 深瀬 浩一, 安藤 弘宗, 石田 秀治, 名取 良浩, 吉村 祐一, 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が制御する新たな慢性炎症メカニズム
3. 学会等名 第11回東北糖鎖研究会・東京糖鎖研究会 合同シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kano H., Inokuchi J.
2. 発表標題 Identification of pro- and anti-inflammatory Ganglioside GM3 molecular species involved in the progression of metabolic disorders
3. 学会等名 International Symposium "Systems Glycobiology and Beyond" -Toward a bridge between fundamental research and applied science-, RIKEN, Wako (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 狩野 裕考
2. 発表標題 ガングリオシドの糖鎖・アシル鎖構造が制御する新たな慢性炎症メカニズム
3. 学会等名 ConBio2017 (生命科学系合同年次大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Inokuchi J., Kanoh H.
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 (招待講演) (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 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, 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 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
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1件

1. 著者名 狩野裕考、井ノ口仁一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 食品化学新聞社、セラミド研究会	5. 総ページ数 6
3. 書名 セラミド研究の新展開 基礎から応用へ、16章 スフィンゴ糖脂質の脂肪酸鎖を介した自然免疫応答の制御機構、p145-150	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----