

令和元年6月18日現在

機関番号：31305

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19569

研究課題名(和文) ガングリオシド分子種選択的な新たな自然免疫制御機構の解明と炎症性疾患への関与

研究課題名(英文) New paradigm for innate immune regulatory mechanism and chronic inflammation mediated by ganglioside molecular species

研究代表者

井ノ口 仁一 (INOKUCHI, Jin-ichi)

東北医科薬科大学・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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト血清中ガングリオシドは、その90%以上がGM3であり、セラミド構造の多様性に基ついて約23の分子種が存在している。GM3分子種の自然免疫における生理活性をヒト単球を用いて検討したところ、極長鎖飽和アシル鎖を有するGM3分子種は、TNFなどの炎症性サイトカインの産生を著しく促進することが明らかになった。一方、セラミド部分が長鎖・不飽和のGM3分子種は、逆に抑制効果を示した。TLR4活性化を左右するGM3分子種の生理活性を理解することによって、生体内の脂質環境を反映した、きわめて精密なTLR4活性化機構と慢性炎症惹起機構が明らかになると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TLR4に作用する炎症促進性GM3分子種および炎症抑制性GM3分子種が存在し、メタボリックシンドロームの進行に沿って、発現バランスが炎症促進性へシフトすることを見出した。これらのGM3分子種の生理活性は、セラミド構造中のアシル鎖の鎖長や飽和度、水酸化修飾によって制御されており、炎症促進性GM3分子種は極長鎖飽和アシル鎖をもつ分子種であり、一方、炎症抑制性GM3分子種は、長鎖または不飽和アシル鎖をもつ分子種であった。これらの知見から、患者血清中のGM3分子種の定量解析による慢性炎症状態の診断・評価法の開発や、炎症抑制性GM3投与による新たな慢性炎症制御法の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is the elucidation of molecular mechanisms involved in the vicious cycle of chronic inflammation state induced by GM3 ganglioside-molecular species, and the examination of potential application of this evidence to the establishing of diagnosis and treatment for the vicious cycle.

90% of total gangliosides of human sera are GM3 molecular species. We have found a surprising evidence that very-long chain (VLCFA)-GM3 induce the secretion of inflammatory cytokines when monocytes or macrophages are stimulated by the TLR4 ligand, LPS or HMGB1, while long chain (LCFA)-GM3 suppress the secretion of inflammatory cytokines. Collectively, we propose a novel inflammation loop triggered by GM3 molecular species.

研究分野：糖鎖生物学。特に、メタボリックシンドロームおよび慢性炎症におけるスフィンゴ糖脂質の機能解明。

キーワード：GM3ガングリオシド 慢性炎症 TLR4

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜マイクロドメインはコレステロール、スフィンゴ糖脂質、スフィンゴミエリン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と考えられている。シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドは、糖鎖構造とセラミド構造の多様性に基づいて多くの分子種が存在している。これらの多様なガングリオシド分子種は、各組織や細胞種選択的に発現し、マイクロドメイン構成分子としてシグナル伝達や細胞間コミュニケーションを介する生体恒常性の維持に関与していることが示されている。しかし、その分子メカニズムと病態生理は未解明の重要課題として残されている。

高脂肪食負荷したガングリオシド GM3 合成酵素 (GM3S)KO マウスは野生型同様に肥満になるにもかかわらず、内臓脂肪組織は慢性炎症状態から解放されており、野生型マウスと比べて TNF α の発現が低下し、アディポネクチンや抗炎症性サイトカイン IL-10 の上昇が見られた (図 1)。この結果は、炎症状態の脂肪組織では、TNF α シグナリングによって増加した GM3 がインスリン抵抗性を惹起するだけでなく、GM3 自体が TNF α 発現を上流から正に制御していることを示唆している。

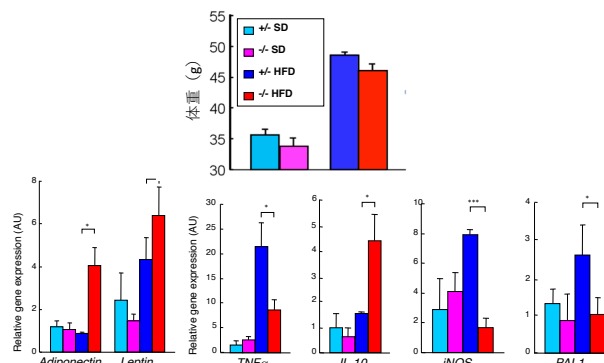


図1 高脂肪食負荷GM3KOマウスでは、内臓脂肪組織の慢性炎症が抑えられている

図 2A は、健康人の血清ガングリオシド組成である。この血清ガングリオシド分子種組成をミミックした溶液中では、LPS 刺激によるマクロファージの TNF α の産生が完全に抑制されていた (図 2B)。そこで、個々のガングリオシドの効果を検討したところ、GM3 のみが存在する場合、LPS 刺激によるマクロファージの活性化を著しく増強することを見出した (図 2C)。さらに、極長鎖脂肪酸を有する GM3 に強力な炎症増強効果を見いだした (図 2D)。この発見により、GM3 の発現上昇による「炎症増悪ループ」の形成という新たな機序が見え始めてきている (図 3)。本研究では、GM3 に対するマクロファージ側の受容体の同定を行った。

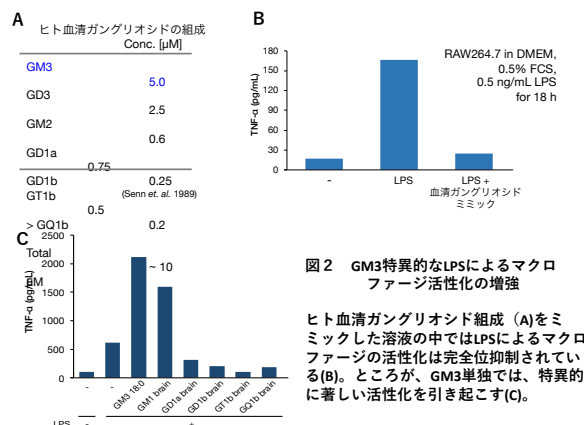


図2 GM3特異的なLPSによるマクロファージ活性化の増強

ヒト血清ガングリオシド組成 (A) をミミックした溶液の中ではLPSによるマクロファージの活性化は完全に抑制されている (B)。ところが、GM3単独では、特異的に著しい活性化を引き起こす (C)。

我々は、メタボリックシンドローム患者の血清中 GM3 値が上昇すること、さらに、GM3 分子種を LC-MS/MS で網羅的に調べたところ、GM3 のセラミド部分のアシル鎖 2 位 (α 位) の水酸基付加体 (d18:1-OH24:0 や d18:1-OH24:1 など) が選択的に増加し、インスリン抵抗性やメタボリックリスクファクターとの強い相関性を見出している [2]。

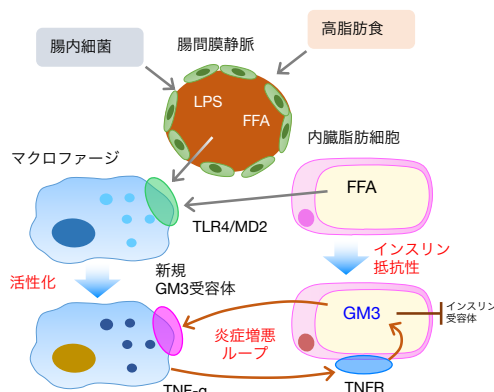


図3 肥大型脂肪組織における過剰なGM3産生がマクロファージを活性化を増強する「炎症増悪ループ」を形成し、インスリン抵抗性を助長する(作業仮説)

2. 研究の目的

申請者らは、ガングリオシドGM3合成酵素ノックアウトマウスは、野生型マウスと同様に高脂肪食負荷で肥満になるが、インスリン抵抗性および脂肪組織における慢性炎症状態が改善されており、GM3が脂肪細胞周囲のマクロファージの炎症を惹起している可能性を見出している[1]。本研究では、「生理的状态における循環血中のガングリオシドは、単球の非特異的活性化を抑制し生体恒常性の維持を司っているが、組織マクロファージに炎症が惹起されるとGM3そのものが自然免疫受容体の活性化を増幅し、炎症増悪ループを形成し慢性炎症状態が持続する」という我々の作業仮説の分子的基盤を確立する。さらに、GM3分子種の認識に関わるマクロファージ側の受容体の同定に挑戦し、糖脂質研究のブレークスルーを達成することを目的とする。

3. 研究の方法

我々は、ガングリオシド GM3 は LPS、HMGB1 や飽和脂肪酸（パルミチン酸）によるマクロファージ活性化を著しく増強することから、GM3 による「炎症増悪ループ」が存在する可能性を見出している（図3）。そこで、メタボリックシンドローム患者血清で増加する GM3 分子種による自然免疫活性化の検討および自然免疫活性化を増強するマクロファージ上の GM3 認識受容体の同定を行った。

4. 研究成果

(1) ガングリオシド分子種の脂肪酸構造を介した TLR4 活性化制御機構

脂肪組織や血清中に存在する GM3 には、同じ糖鎖を持ちながら、異なるセラミド構造を持つ多様な分子種が存在している。とくに、スフィンゴシンと脂肪酸からなるセラミド構造のうち、脂肪酸鎖の鎖長（長鎖脂肪酸 [16:0, 18:0, 20:0]、極長鎖脂肪酸 [22:0, 23:0, 24:0]）と構造修飾（ α -水酸化 [h24:0]、 ω -9 不飽和化 [24:1]）について、それらの組み合わせによる幅広い多様性が見られる（図4）。これらの GM3 分子種の血清中発現パターンが、メタボリックシンドロームの発症過程で変動することは分かってきたが[28]、各分子種の生理活性とその変動の意義は不明のままであった。

そこで、自然免疫応答を指標に、代表的な GM3 分子種（16:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:0, h24:0, 24:1）の生理活性が検討された結果、次のことが分かった[論文投稿中]。

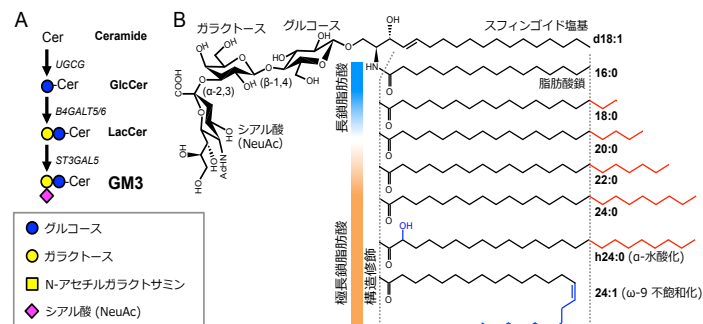


図4 ガングリオシドGM3合成経路 (A) と主な分子種の脂肪酸鎖長・構造修 (B)

ヒト TLR4/MD-2 複合体を介した炎症性サイトカイン産生に対して、1) 長鎖脂肪酸の GM3 分子種 (16:0, 18:0) は抑制的に作用し、一方、極長鎖脂肪酸の GM3 分子種 (22:0, 24:0, h24:0) は TLR4 活性化を強く促進した。2) 極長鎖脂肪酸でも、不飽和化を受けた GM3 分子種 (24:1) は、TLR4 に対して抑制的に作用した。3) これらの作用は、LPS や Lipid-A、HMGB1 などの TLR4 リガンドに対して選択的に生じた。また、GM3 単独では活性化作用を示さず、TLR4 リガンド存在下で初めて活性化制御を示した。これらを総括すると、GM3 分子種は、その脂肪酸構造に依存して炎症抑制性と炎症促進性を併せ持つ、TLR4 選択的な内因性モジュレーターであると考えられる (図 5)。

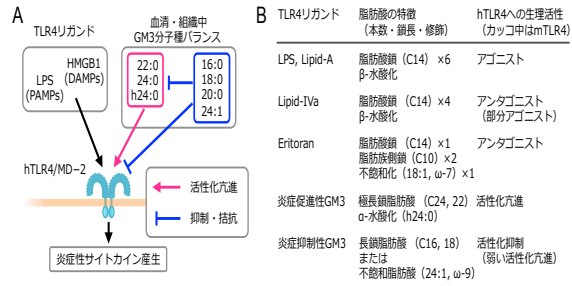


図5 GM3分子種によるTLR4活性化制御(A)とLPS/GM3の構造活性相関(B)

(2) 糖尿病性腎症におけるスフィンゴ糖脂質の役割

本研究では、高脂肪食を KK マウスに8週間負荷し糖尿病性腎症モデルを作成した。この高脂肪食負荷 KK マウスの腎臓では、グロボ系糖脂質 Gb3 の発現が著しく増加していた (図 6)。

その分子種解析を、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて行った結果、Gb3 のセラミド部分のアシル鎖に飽和の極長鎖 (C22, C23, C24) 有する分子種が特に増加していることを見出した。この結果より、グロボ系糖脂質の病態形成への関与が示唆されることから、糖尿病性腎症の病態形成に重要な炎症反応における、グロボ系糖脂質の炎症惹起活性の有無をヒト単球やマウス骨髄由来マクロファージを用いて評価した。その結果、極長鎖グロボ系糖脂質は、Toll-like receptor 4 (TLR4) リガンド (LPS, HMGB1) の存在下、TLR4 選択的なポジティブモジュレーターとして炎症促進活性を持つことが示唆された (図 6)。また、彼はレプチン受容体に変異した *db/db* マウスでは Gb3 の発現が低く、レプチンの腹腔内投与で、Gb3 の発現が回復することを見いだしている。高脂肪食負荷により肥大した脂肪組織から分泌促進されたレプチンが、腎臓のグロボ系糖脂質の発現を増加させ、増加したグロボ系糖脂質が、TLR4 に作用することで炎症反応を促進し、糖尿病性腎症の病態形成に関与している可能性が本研究より示唆された。これらの研究成果は、糖尿病性腎症の新たな診断法や治療薬開発につながる事が期待される。

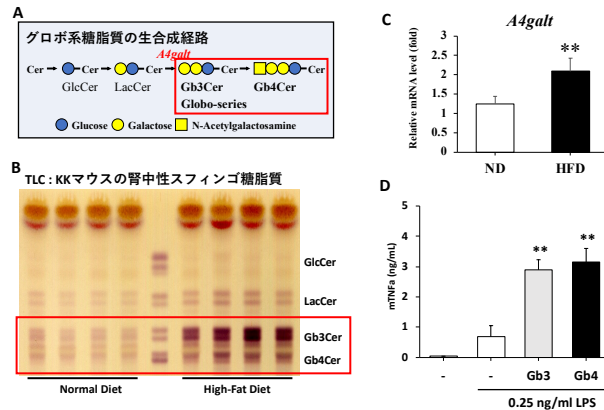


図6 肥満を伴う糖尿病性腎症ではグロボ系糖脂質が増加し(A,B,C)、マクロファージからのTNF産生(D)を促進する

<引用文献>

- ① Nagafuku M, Sato T, Sato S, Shimizu K, Taira T, and Inokuchi J. (2015) Control of homeostatic and

pathogenic balance in adipose tissue by ganglioside GM3. *Glycobiology* 25:303-318.

<https://doi:10.1093/glycob/cwu112>

- ② Veillon L, Go S, Matsuyama W, Suzuki A, Nagasaki M, Yatomi Y, and Inokuchi J. (2015)
Identification of Ganglioside GM3 Molecular Species in Human Serum Associated with Risk
Factors of Metabolic Syndrome. *PLOS ONE*
<https://doi:10.1371/journal.pone.0129645>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 8 件) (全て査読あり)

- ① Nitta T, Kanoh H, Inamori K, Suzuki A, Takahashi T, and Inokuchi J. (2019) Globo-series glycosphingolipids enhance lipopolysaccharide-induced inflammation and play a pathophysiological role in diabetic nephropathy *Glycobiology* 29, 260-268. doi: 10.1093/glycob/cwy105

〔学会発表〕 (計 45 件)

国際学会 (招待講演 10 件)

- ① Jin-ichi Inokuchi, Homeostatic and Pathogenic Roles of Ganglioside GM3 Molecular Species in Chronic Inflammation. FEBS Special Meeting 2019, Sphingolipid Biology: Sphingolipids in Physiology and Pathology. May 6-10 Cascais, Portugal

〔図書〕 (計 3 件)

- ① Inokuchi J, Inamori K, Kabayama K, Nagafuku M, Uemura S, Go S, Suzuki A, Ohno I, Kanoh H, Shishido F. **Biology of GM3 ganglioside** (Book Chapter in Gangliosides in Health and Diseases). *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Schnaar RL., Lopez PHH., eds, Elsevier) page152-195 ISBN978-0-12-81234-6 (<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.10.004>) (2018).

〔その他〕

ホームページ等

教室ホームページ: <http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/kinoubyoutai/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 狩野 裕考

ローマ字氏名: (KANOH,hirotaka)

所属研究機関名: 東北医科薬科大学

部局名: 薬学部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 40774279

研究分担者氏名: 鈴木 明身

ローマ字氏名: (SUZUKI,akemi)

所属研究機関名: 東北医科薬科大学

部局名: 薬学部

職名: 客員教授

研究者番号 (8 桁): 70134533

※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、研究者個人に帰属されます。