

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440061

研究課題名(和文) 摂食・代謝制御におけるガングリオシドの機能解明

研究課題名(英文) Analysis of the physiological roles of gangliosides in the control of feeding and metabolism

研究代表者

稲森 啓一郎 (INAMORI, Kei-ichiro)

東北医科薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70710375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：食餌性肥満における視床下部の炎症と摂食・代謝調節機構の破たんの分子機序については不明な部分が多い。本研究では、高脂肪食誘導性肥満マウスの視床下部において糖脂質ガングリオシド合成に関わる遺伝子の発現増加を見出した。また、過食・肥満によりレプチン抵抗性を発症するモデルマウスにおいて、ガングリオシド合成に関わるGM3合成酵素遺伝子の欠損は、視床下部におけるレプチン応答性を改善し、過食・過体重および耐糖能・インスリン感受性を著明に改善することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：There is a growing body of evidence that hypothalamic inflammation precedes development of diet-induced obesity and disrupted hypothalamic control of feeding, but the detailed molecular mechanism of the response remains incompletely understood. Here we found enhanced expressions of several genes responsible for ganglioside synthesis in the hypothalamus of high-fat diet-fed mice. We also found that deficiency of ganglioside GM3 synthase gene improved responsiveness to leptin in the hypothalamus of obese mouse model which develops leptin resistance, resulting in improvements in the body weight and food intake as well as the glucose and insulin tolerance.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：ガングリオシド 視床下部 レプチン抵抗性メラノコルチン受容体

1. 研究開始当初の背景

ganglioside (シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質) は、細胞膜の微小領域を構成する成分の一つとしてシグナル伝達などに深く関わっており、中枢神経系に豊富に存在している。また、炎症などのストレスで発現が増加し、2型糖尿病および高脂血症の患者においても、その血中濃度の上昇が報告されている。脂肪細胞においては、炎症性サイトカイン TNF- α が ganglioside GM3 の増加を介してインスリン受容体シグナルに異常をきたし、一方で、GM3 合成酵素欠損 (GM3SK0) マウスではインスリンシグナルが亢進していることが報告されている。炎症は、肥満とインスリン抵抗性との間をつなぐ重要なメカニズムであるが、高脂肪食負荷により視床下部で炎症が起こり、結果として視床下部のエネルギーバランス調節機能が損なわれることが示されている。申請者は、高脂肪食中の飽和脂肪酸により脳の免疫担当細胞ミクログリアが活性化し、視床下部の炎症を介して神経細胞の ganglioside を増加させ、レプチン受容体およびメラノコルチン受容体等のシグナル異常をもたらすという作業仮説を提唱する。本研究では、視床下部 ganglioside の炎症性変化が、摂食・代謝を制御する受容体の機能異常をもたらす可能性について検討を行う。申請者は、視床下部由来神経細胞株を低濃度の TNF- α で処理すると、ganglioside 分子種が増加する結果を得ている。さらに、過食・肥満モデルマウス KKAY において、ganglioside GM3 の欠失が、過体重、過食や耐糖能異常を改善する結果を得ており (図1, 図2)、視床下部の摂食・代謝調節機能における ganglioside の生理的役割が示唆される。

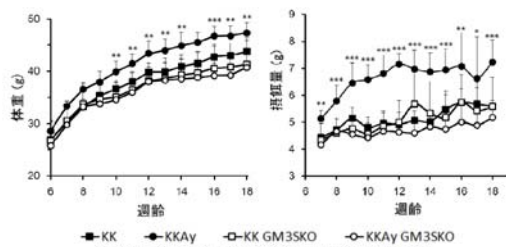


図1. KKAY/GM3SK0 (○) では、KKAY (●) でみられる体重増加と摂食量がコントロール(KK)と同じレベルにまで抑制されている。

2. 研究の目的

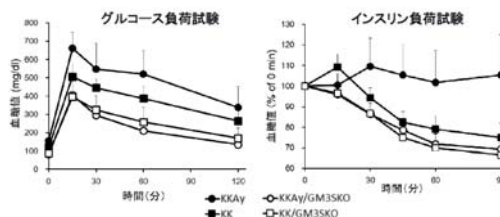


図2. KKAY/GM3SK0 (○) では、KKAY (●) における糖尿病の発症がほぼ完全に抑えられている。

高脂肪食摂取などのストレスは、視床下部での炎症とそれに伴うレプチン抵抗性を惹

起し、摂食・代謝調節機能に異常をきたすことで肥満・インスリン抵抗性などの病態へと導く。本研究では、視床下部のエネルギー恒常性維持機能における糖脂質 ganglioside の生理的役割を明らかにする。上述の目的のため申請者は、次の2項目について検証を行う。

【1】視床下部における ganglioside 分子種の炎症性メディエーターとしての役割の検証：ganglioside は糖鎖部分の多様性、さらには脂質部分の違い (鎖長, 不飽和度) により膨大な数の分子種が存在し、ラフトの構造多様性と機能に影響を与える。前述のように、申請者は培養細胞系において、TNF- α 処理により ganglioside 分子種の増加を確認している。そこで、肥満モデルマウスの視床下部での ganglioside の量的・質的变化について詳細に解析することで、ganglioside と炎症や摂食・代謝を制御する受容体の機能異常との関わりについて、特に炎症性メディエーターとしての役割について検証する。

【2】炎症および摂食・代謝性の受容体シグナルにおける ganglioside の生理的機能の解析：炎症性および摂食・代謝性シグナルにおける ganglioside の機能を詳細に解析するため、視床下部由来神経細胞株を用いて、各受容体シグナルの解析を行う。その際、阻害剤処理により ganglioside を枯渇、または、ganglioside 生合成に関わる糖転移酵素遺伝子を部位特異的遺伝子改変によって欠損、または過剰発現させることで、個々の受容体シグナルにおける ganglioside の機能を詳細に解析する。脳の炎症時、ミクログリアは Toll-like receptor 4 (TLR4) の活性化を介して大量の炎症性メディエーターを放出する。TNF- α 等の炎症性サイトカインは、視床下部の神経細胞にレプチン抵抗性およびインスリン抵抗性を惹起し、摂食・代謝性シグナルの異常をもたらす。KKAY/GM3SK0 マウスにおいて過食と肥満病態が改善されたことから、ganglioside が炎症性作用を媒介している可能性が考えられる。視床下部におけるミクログリアの活性化、神経細胞のレプチン受容体やメラノコルチン受容体等の活性化、摂食関連ペプチドの発現について検討を行い、視床下部 ganglioside の炎症性および摂食・代謝性シグナルにおける生理的役割を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、過食・肥満モデルマウスや視床下部由来細胞株等を用いて、視床下部 ganglioside 分子種の半定量的解析および摂食・代謝性受容体シグナルにおける ganglioside の機能に関して以下の検討を行った。

(1) 過食・肥満モデルマウスの視床下部での ganglioside 分子種の発現解析：

過食・肥満モデルマウス KKAY (通常食にて7~8週齢で重度の肥満を呈する) の視床下

部におけるガングリオシド分子種の発現解析を行った。KK マウスをコントロールとして用い、液体クロマト質量分析(LC-MS/MS)にて主要なガングリオシド分子種の発現量の比較を行った。サンプル調製は、メタノール・クロロホルムによる脂質抽出およびアルカリメタノリシスの後、C18 カートリッジを用いた脱塩により得た。GM3, GM1 等の化学合成標品を用いて、多重反応モニタリング(MRM)により各ガングリオシド分子種の量比についてサンプル間での比較を行った。また、高脂肪食を与えた C57BL/6 マウス(通常食をコントロール)の視床下部については、ガングリオシド合成に関わる複数の糖転移酵素遺伝子の発現解析をリアルタイム PCR にて行った。視床下部の炎症は、他の抹消組織よりも早期に起こるとされているので、高脂肪食負荷開始より早い時期から経時的にサイトカイン発現等を炎症の指標とし、解析を行った。

(2) KKAY/GM3SKO マウスのレプチン応答性の検討および視床下部由来細胞株の各受容体シグナルにおけるガングリオシドの機能解析:

KKAY/GM3SKO マウスにおける過食・肥満病態の改善が、レプチン応答性の変化によるものかどうか検討するため、レプチン投与後の視床下部弓状核における神経細胞の活性化を c-fos 発現を指標に解析した。一晚絶食したマウスにレプチンを腹腔内投与し、その後、還流固定し脳を採取、凍結切片を作製し、c-fos 抗体を用いて染色したのち、c-fos 陽性細胞数をカウントした。また、各受容体シグナルにおけるガングリオシドの機能について検討するため、視床下部由来神経細胞株およびヒト胎児腎由来 HEK293 細胞株を用いて、CRISPR/Cas9 システムにより GM3S 欠損細胞の作製を行った。GM3 および関連ガングリオシドの欠失は、糖脂質サンプルを薄層クロマトグラフィー(TLC)および LC-MS/MS による解析にて確認した。得られた細胞を用いて、摂食・代謝シグナルに重要なレプチン受容体および MC4R シグナルにおけるガングリオシドの機能について解析を行った。レプチンシグナルについては、レプチン添加後、下流の STAT3 や ERK のリン酸化を指標に検討した。MC4R シグナルについては、cAMP 産生を ELISA にて測定、あるいは、受容体(GPCR)活性化を TGF- α shedding assay にて検討した。用いた細胞株においてシグナルの検出が困難な場合、各受容体遺伝子を安定的または一過性に導入したものを使用した。

4. 研究成果

(1) 過食・肥満モデル KKAY マウスとそのコントロールである KK マウスとの間で、視床下部のガングリオシド分子種の発現パターンにはっきりした差は見られなかった。マイナーな分子種には多少差が見られるものもあったが、再現性および生理的意義につい

ては、今後の検討が必要と思われる。C57BL/6 マウスに高脂肪食を負荷した際には、視床下部において GM3S を含む複数のガングリオシド合成に関わる遺伝子の発現増加がみられた。実際の糖脂質発現に関しては、GM3 由来のガングリオシドに変化が見られた。しかし、今回のサンプル調製法が疎水性相互作用を基礎にしたものであったことから、糖含量の異なる分子種間で回収の効率および再現性に問題があった可能性があり、今後、異なる抽出法を用いての再検討・再現性の確認を行う。また、視床下部の炎症状態については、いくつかの既に報告されている論文を参考に高脂肪食負荷を行ったが、炎症性サイトカイン遺伝子(TNF- α , IL-1 β , IL-6)の発現は個体間のばらつきがあり、通常食負荷との間で有意差の出るほどの発現の差が見られなかった。今後、結果の再現性および高脂肪食負荷の期間・条件の詳細な検討を行う必要がある。

(2) 腹腔内へのレプチン投与において、KKAY マウスの視床下部ではほとんど応答が見られず、レプチン抵抗性を発症していることが確認できた。一方、KKAY/GM3SKO マウスにおいては十分な c-fos 発現が確認できた(図3)。GM3S の欠損によってレプチン応答

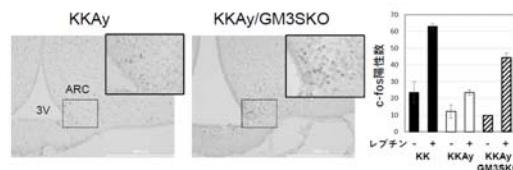


図3. レプチン腹腔内投与後の視床下部弓状核(ARC)における応答性(c-fos染色) KKAYマウスでは応答性不全がみられるが、GM3SKOマウスでは応答性が十分保たれている。

性が有意に保たれていることが、KKAY の過食・肥満が抑制される結果につながっていることが示された。

受容体シグナルの検討において、視床下部由来神経細胞株および HEK293 細胞株にて GM3S 欠損細胞を作製した。TLC にて GM3 および GM3 由来ガングリオシドの消失と、GM3 の前駆体であるラクトシルセラミドの蓄積を確認した。また、LC-MS/MS により GM3S に依存しない o-series ガングリオシドの GM1b の顕著な発現が検出された。MC4R シグナルについては、アゴニストの α -メラノサイト刺激ホルモン(α -MSH) およびアンタゴニストの agouti-related protein (AgRP) を用いて解析を行ったが、野生型と GM3SKO との間に明確な差は見いだせなかった。現在、異なるアッセイ法による検討を行っており、ガングリオシドによる MC4R シグナルの制御が起こりうるか否かを明らかにしたい。一方、レプチン受容体シグナルにおいては、下流のタンパク質のリン酸化の程度が欠損細胞では異なっており、興味深い結果が得られた。KKAY/GM3SKO マウスでみられたレプチン応答性の改善については、ガングリオシドの欠失が直接レプチン受容体機能に影響を与えた

ことによるのかどうかを明らかにするため、引き続き検討を行っている。

KKAy マウスは、KK マウスに肥満遺伝子 Ay が導入されたことで全身性に Agouti タンパク質を発現し、 α -MSH に拮抗することでメラノコルチンシグナルに異常をきたしている。脳においては MC4R などのシグナルが抑制されることで肥満を発症し、毛包メラノサイトにおいては MC1R シグナルを抑制し、特徴的な黄色の毛色を呈する。興味深いことに、KKAy/GM3SKO マウスは過食、肥満が改善されることに加え、灰色様の毛色を呈し、MC1R シグナルにおいてもガングリオシドの関与が示唆される。

レプチン抵抗性は肥満病因の主要なリスクファクターであると考えられており、また近年、高脂肪食摂取により誘導される視床下部炎症とレプチン抵抗性に関する報告が多数なされている。高脂肪食に多く含まれる飽和脂肪酸が TLR4 の活性化を介して視床下部の炎症を惹起することが示され (Milanski et al., J Neurosci 2009)、また、ミクログリアが飽和脂肪酸による視床下部炎症を引き起こすことが報告された (Valdearcos et al., Cell Rep 2014)。しかしながら、摂食・代謝調節機能異常に至る過程の詳細なメカニズムにはまだ不明な点が多い。一方、肥満病態発症における特定のガングリオシドの病態生理的役割についても不明な部分が多く残されており、今後、個々の受容体機能や炎症における役割を明らかにしていきたい。

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1件)

松山和佳奈, 郷慎司, Lucas Veillon, 稲森啓一郎, 井ノ口仁一, 高脂肪食餌誘発性肥満モデルマウスにおけるスフィンゴ糖脂質の発現および構造の変化, 東北薬科大学研究誌, 査読有, 62, 49-60 (2015).

[学会発表] (計10件)

- ① 二瓶渉, 永福正和, 田村有美, 稲森啓一郎, 新井健太, 樺山一哉, 深瀬浩一, 井ノ口仁一. GM3 合成酵素ノックアウトマウスは腸管からのコレステロール吸収抑制を介して高コレステロール血症に抵抗性を示す. 日本薬学会 第137年会, 2017年3月27日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
- ② Kei-ichiro Inamori, Investigation of the roles of gangliosides in leptin and melanocortin signaling. The 8th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology Annual Conference, 2016年10月15日, 無錫 (中国)
- ③ 稲森啓一郎, 伊藤英樹, 田村有美, 楊燕華, 二瓶渉, 突田壮平, 山田哲也, 片桐秀樹, 井ノ口仁一, レプチンおよびメラノコルチン

ン受容体機能におけるガングリオシドの役割の検討. 第89回日本生化学会大会, 2016年9月25日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

- ④ 伊藤英樹, 稲森啓一郎, 楊燕華, 二瓶渉, 突田壮平, 山田哲也, 片桐秀樹, 井ノ口仁一. ガングリオシド欠損による過食・肥満モデルマウスの肥満病態の改善. 第89回日本生化学会大会, 2016年9月25日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
 - ⑤ 田村有美, 稲森啓一郎, 伊藤英樹, 千葉ひかる, 井ノ口仁一. マウス視床下部由来神経細胞株を用いた受容体シグナルにおけるガングリオシドの機能解析. 第89回日本生化学会大会, 2016年9月25日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)
 - ⑥ 稲森啓一郎, 伊藤英樹, 田村有美, 楊燕華, 二瓶渉, 突田壮平, 山田哲也, 片桐秀樹, 井ノ口仁一. レプチンおよびメラノコルチン受容体の機能におけるガングリオシドの役割の検討. 第35回日本糖質学会年会, 2016年9月2日, 高知市文化プラザ かるぼーと (高知県・高知市)
 - ⑦ 稲森啓一郎, 伊藤英樹, 楊燕華, 二瓶渉, 突田壮平, 山田哲也, 片桐秀樹, 井ノ口仁一. レプチンおよびメラノコルチンシグナルにおけるガングリオシドの役割の検討. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会, 2015年12月1日, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
 - ⑧ Kei-ichiro Inamori, Hideki Ito, Xiaohua Yang, Wataru Nihei, Sohei Tsukitaa, Tetsuya Yamadaa, Hideki Katagiria, Jin-ichi Inokuchi, Ablation of the GM3 synthase gene in KK-Ay mice improved the obese phenotype: implication for its role in leptin and melanocortin signaling. 7th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology Conference, 2015年11月14日, ホテル松島大観荘 (宮城県・松島町)
 - ⑨ 松山和佳奈, 郷慎司, Lucas Veillon, 稲森啓一郎, 井ノ口仁一. 高脂肪食餌誘発性肥満モデルマウスのインスリン感受性組織におけるスフィンゴ糖脂質発現. 第9回東北糖鎖研究会 第9回分子生体膜研究所合同シンポジウム, 2015年9月5日, 東北薬科大学 (宮城県・仙台市)
 - ⑩ 伊藤英樹, 稲森啓一郎, 楊燕華, 二瓶渉, 突田壮平, 山田哲也, 片桐秀樹, 井ノ口仁一. レプチン及びメラノコルチンシグナルにおけるガングリオシドの役割の検討. 第9回東北糖鎖研究会 第9回分子生体膜研究所合同シンポジウム, 2015年9月5日, 東北薬科大学 (宮城県・仙台市)
- ## 6. 研究組織
- (1) 研究代表者
稲森 啓一郎 (INAMORI, Kei-ichiro)

東北医科薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：70710375

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()