

【目的】 Toll-like receptor (TLR) や Caspase (Casp) ファミリーを介した慢性炎症は、メタボリックシンドロームやがんをはじめとする多様な疾患の原因となりうる。当研究グループでは、ヒト血清や脂肪組織中のスフィンゴ糖脂質：ガングリオシドGM3が、TLR4の内因性リガンドとして働くこと、その生理活性は脂質（アシル鎖）構造によって制御されることをこれまでに見出している。本課題では、GM3が、TLR4に加えて、Casp4/11を介した炎症性細胞死の誘導や制御に関与する可能性を検討した。また、GM3の生理活性解析に適したマウスモデルを探索した。

【方法】 マウスマクロファージ系細胞 (RAW264.7細胞、BMDM等) に対し、LPS (大腸菌O111:B4) およびガングリオシドGM3分子種 (d18:1-12:0~24:0)、その他のガングリオシド・スフィンゴ糖脂質分子種 (GlcCer、LacCer、GM2) を用いて共刺激を行った。刺激後、TLR4活性化およびCasp4/11による細胞死によって産生される炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 α) をELISA法によって定量し、炎症応答および炎症性細胞死応答の誘導レベルを評価した。さらに、種々の阻害剤や遺伝子欠損の影響を評価した。また、マウス血清および肝臓のガングリオシド分子種 (GM2またはGM3) について、薄層クロマトグラフィーおよびLC-MS/MSを用いて分析し、ヒトと同様にGM3が循環する近交系マウス系統を探索した。同定した系統について、関与する糖転移酵素周辺のゲノム構造をPCR法によって解析した。

【結果】 マウスマクロファージ系細胞をLPSおよびGM3分子種で共刺激した結果、極長鎖アシル鎖構造をもつGM3分子種 (d18:1-22:0、d18:1-24:0) の存在下では、TNF- α 産生量およびIL-1 α 放出量が著しく増大することがわかった。一方、より短い長鎖アシル鎖構造をもつGM3分子種 (d18:1-12:0、d18:1-16:0) の存在下では、IL-1 α の放出が大幅に抑制されることがわかった。このような応答は、GM3前駆体のスフィンゴ糖脂質や、さらに糖鎖付加を受けたGM2 (d18:1-18:0) ではほとんど生じなかった。上記のIL-1 α の放出は、Casp11/4/11阻害剤やマウスGsdmD阻害剤によって阻害され、同様に、Casp11-KO細胞およびGsdmD-KO細胞においても抑制された。さらに、LPS/GM3共刺激によるIL-1 α 放出に関与する因子を探索した結果、GM3の糖鎖構造を認識する一部のGalectinファミリータンパク質が、IL-1 α の放出を増大させた。以上の結果から、GM3は、TLR4に加えて、Casp11による細胞死応答を介した炎症性サイトカイン産生を正と負に制御すること、その生理活性が脂質構造と糖鎖構造の双方によって規定されること、さらに一部の糖鎖認識分子群がその応答に関与することが示唆された。加えて、ヒトと同様にGM3が血中を循環する近交系マウス系統を新たに同定し、その原因がGM2合成酵素遺伝子 (*B4galnt1*) 上流領域の大幅な欠損である可能性と、その領域が齧歯類選択的に存在することを見出した。今後、GM3が循環するガングリオシドヒト型マウス系統を用いることで、GM3による自然免疫・炎症応答の制御メカニズムをマウス個体レベルで解析できるものと期待される。

ガングリオシドGM3によるTLR4およびCasp4/11を介した炎症・細胞死応答の制御機序 (模式図)

