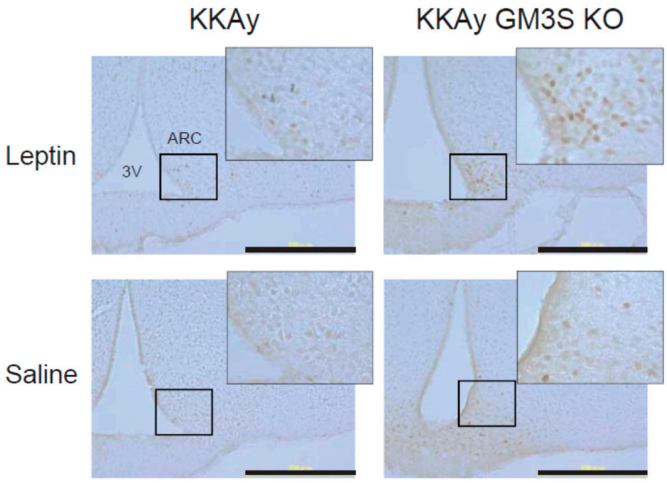
22　視床下部炎症と摂食制御に関わる糖脂質分子の機能解析	稲森　啓一郎

【目的】過食・高脂肪食摂取などのストレスは、視床下部の炎症を介して肥満およびレプチン抵抗性を引き起こすが、その詳細な分子機序には不明な点が多い。糖脂質ガングリオシドは、肥満による脂肪組織の炎症や2型糖尿病・高脂血症患者の血液中で増加し、インスリン受容体シグナルに深く関与している。本研究では、過食・肥満モデルにおけるガングリオシド欠損（GM3S KO）マウスの解析により摂食・代謝に関わる受容体の機能および視床下部炎症におけるガングリオシドの役割について検討を行った。

【方法】GM3S KO マウス（C57BL/6）を過食・肥満モデルである KKAy マウスと 8 世代戻し交配を行い、KKAy GM3S KO マウスを得た。レプチン応答性については、レプチンの腹腔内投与後の視床下部弓状核における神経細胞活性化を免疫組織化学的染色にて評価した。また、視床下部由来神経細胞株 N41 における GM3S KO 細胞を作成し、レプチン受容体シグナルについて野生型細胞との比較を行った。

【結果】KKAy GM3S KO マウスは、体重，摂餌量ともに KKAy マウスよりも大きく減少していた。KKAy マウスは比較的早期にレプチン抵抗性を生じるが、KO マウスではレプチン応答性が有意に保たれており、体重・摂餌量の減少を裏付ける結果であった。N41 GM3S KO 細胞では、野生型細胞に比べてレプチン添加後の STAT3 リン酸化はやや減弱が見られたのに対し ERK のリン酸化が亢進していた。N41 細胞を低濃度の炎症性サイトカインで処理した際にガングリオシドの発現増加がみられることから、視床下部炎症と摂食制御機能の異常発症との間にガングリオシドの発現変化とその関与が示唆される。

レプチン腹腔内投与後の視床下部弓状核における応答性



22. 視床下部炎症と摂食制御に関わる糖脂質分子の機能解析

稲森　啓一郎

東北医科薬科大学 薬学部 機能病態分子学教室

Key words：ガングリオシド，視床下部，摂食制御，レプチン抵抗性

緒　言

生体膜マイクロドメインは、ガングリオシド（シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質）に富む膜領域で、細胞のシグナル伝達などに深く関わっている。なかでもガングリオシド生合成の出発物質である GM3（シアリルラクトシルセラミド）は、肥満，ストレス，炎症などにおいて増加し、また、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認められる［1, 2］。さらに、脂肪細胞においては、炎症性サイトカイン tumor necrosis factor-α（TNF-α）による GM3 の発現増加が、インスリン抵抗性を誘導することが示されている［3］。GM3 の増加による脂肪細胞のインスリン抵抗性発症機序として、細胞膜マイクロドメインの構成および機能異常が生じ、インスリン受容体をカベオラから解離することでそのシグナルを抑制するといった機構が提唱されている［4］。一方で、GM3 合成酵素（GM3S）欠損マウスにおいては、インスリン受容体の代謝性シグナルが亢進している［5］。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、近年、食欲や糖・脂質代謝を司る視床下部における炎症が、インスリンおよびレプチン抵抗性と肥満に深く関わることが明らかにされてきている［6, 7］。しかしながら、その詳細なメカニズムには不明な点が多い。

我々は、視床下部における糖脂質ガングリオシドの病態生理的意義、特に摂食と代謝の制御における役割を明らかにすることを目標としている。そこで、過食・肥満モデルである KKAy マウスにおいて GM3S を欠損させた KKAy GM3S KO マウスの作製、および、視床下部由来神経細胞株における GM3S KO 細胞の作製を通じて、過食・高脂肪食摂取などのストレスによって生じうる視床下部炎症に伴うガングリオシドの発現変化の可能性、そして摂食・代謝に重要なレプチン受容体の機能におけるガングリオシドの役割について検討を行った。

方法および結果

KKAy マウスは、軽度の糖尿病モデル KK マウスに Ay 遺伝子変異が導入された重度の糖尿病モデルマウスで、全身性にメラノコルチン受容体のアンタゴニストである Agouti タンパクを発現し、メラノコルチンシグナルに異常をきたしている。これにより、食欲抑制に関わる視床下部のメラノコルチン受容体 4（MC4R）の活性化を抑制し、過食・肥満と早期かつ重度の糖尿病およびレプチン抵抗性を発症する。一方、毛包メラノサイトにおいては、MC1R を抑制することでメラニン合成に影響を与え、特徴的な黄色の毛色をもつ。興味深いことに、KKAy GM3S KO マウスでは、KKAy マウスが呈する過食，過体重，耐糖能異常がコントロールである KK マウスのレベルにまで改善していた。そこで、摂食、エネルギー代謝に重要なレプチン応答性について、視床下部弓状核における神経細胞活性化マーカーc-fos の発現を指標に検討を行った。一晩絶食させた KKAy および KKAy GM3S KO マウス（オス、10 週齢）の腹腔内にレプチン（4 μg/ml）を投与し、2 時間後、4%パラホルムアルデヒドーリン酸緩衝生理食塩水で還流固定したのち脳を採取した。クリオスタットで厚さ 40 μm の連続凍結切片を作成し、浮遊法にて抗 c-fos 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行い、視床下部弓状核における c-fos 陽性細胞数を計測した。KKAy マウスでは、レプチン投与後の弓状核における c-fos 発現がかなり減弱していたが、一方で KKAy GM3S KO マウスでは十分発現がみられており、レプチンに対する応答性が保たれていることが示された（図 1）。

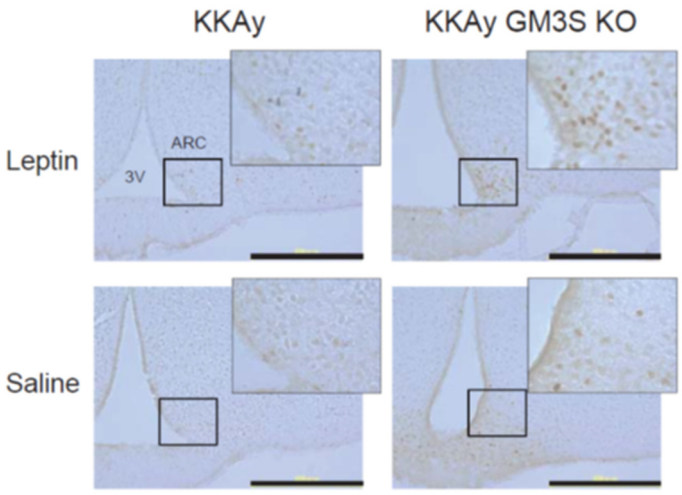


図 1. KKAy GM3S KO マウスの視床下部弓状核（ARC）におけるレプチン応答性の改善
絶食させた KKAy および KKAy GM3S KO マウスにレプチンまたは生理食塩水（Saline）を腹腔内投与後、脳の凍結切片を作製し、c-fos 抗体を用いた染色にて神経細胞の活性化を指標としてレプチンに対する応答性を検討した。スケールバー：300 μm。

次に、視床下部由来神経細胞株である N41 において、CRISPR/Cas9 法を用いた GM3S KO 細胞の作製を行った。得られた細胞株の糖脂質発現について薄層クロマトグラフィーにて解析を行ったところ、GM3 を含むガングリオシドの発現消失とラクトシルセラミド（GM3S の基質）の蓄積が確認できた。レプチンを培地に添加し、0、5、10、15、30、60、90 分後の STAT3 および ERK のリン酸化について、N41 親株と GM3S KO 細胞株との比較を Western blotting 法により検討したところ、GM3S KO 細胞において STAT3 のリン酸化が減弱していたが、一方で ERK のリン酸化が亢進していた（図 2）。

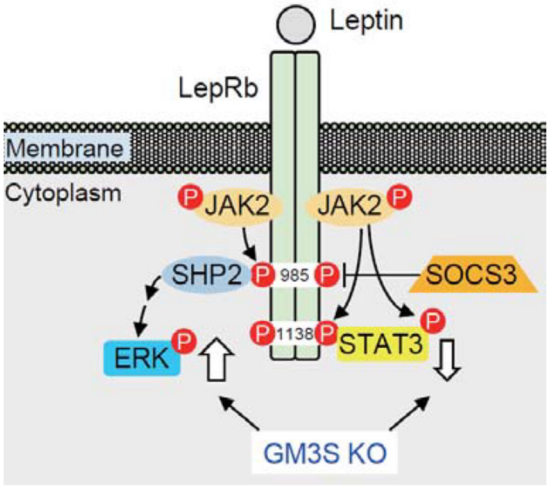


図 2. N41 神経細胞株における GM3S KO によって、レプチン誘導による ERK リン酸化が亢進した
レプチン受容体シグナル経路。GM3S KO 細胞では、レプチン刺激による STAT3 リン酸化が減弱していたが、ERK のリン酸化は亢進していた。

さらに、N41 細胞を低濃度の炎症性サイトカイン（TNF-α、IL-1β、IL-6）で数日間処理したところ、各ガングリオシド分子種の発現増加がみられた。

考　察

KKAy マウスでみられるレプチン抵抗性が KKAy GM3S KO マウスでは有意に改善されており、摂食・体重が減少した結果を裏付けるものであった。視床下部由来神経細胞株 N41 を用いたレプチン応答性の検討においては、GM3S KO 細胞で ERK リン酸化の亢進がみられた。レプチン受容体の活性化に伴いリン酸化された Tyr^{985} にリクルートされた SHP2 は、JAK2 によってリン酸化を受け、アダプターの Grb2 に結合することで ERK 活性化を促進する。この SHP2/ERK 経路は、マウスにおけるレプチンの抗肥満効果に関与していることが報告されている［8, 9］。GM3S KO によって消失したガングリオシドがどのようにレプチン受容体シグナルを調節しているのかについて、今後詳細な解析が必要である。N41 細胞を低濃度の炎症性サイトカインで処理することでガングリオシドの発現増加がみられたことから、高脂肪食摂取などにより誘導される視床下部での低度の慢性的な炎症において、ガングリオシド分子種の発現変化の可能性が示唆された。

以上の結果から、過食や高脂肪食摂取等による過剰の飽和脂肪酸などによるストレスが視床下部において炎症を惹起し、それに伴いガングリオシドの増加とさらなる炎症を引き起こすといった増悪ループが存在する可能性、そして、増加したガングリオシドが各受容体シグナルに異常をもたらすことで、肥満・レプチン抵抗性へと導くのではないかという仮説をもとに、現在検討を進めている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学大学院医学系研究科糖尿病代謝内科学分野の片桐秀樹先生，山田哲也先生，突田壮平先生である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Veillon L, Go S, Matsuyama W, Suzuki A, Nagasaki M, Yatomi Y, Inokuchi J. Identification of Ganglioside GM3 Molecular Species in Human Serum Associated with Risk Factors of Metabolic Syndrome. PLoS One. 2015 Jun 23;10(6):e0129645. PMID: 26102277.
2) Nagafuku M, Sato T, Sato S, Shimizu K, Taira T, Inokuchi J. Control of homeostatic and pathogenic balance in adipose tissue by ganglioside GM3. Glycobiology. 2015 Mar;25(3):303-18. PMID: 25303960.
3) Tagami S, Inokuchi J, Kabayama K, Yoshimura H, Kitamura F, Uemura S, Ogawa C, Ishii A, Saito M, Ohtsuka Y, Sakaue S, Igarashi Y. Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. J Biol Chem. 2002 Feb 1;277(5):3085-92. PMID: 11707432.
4) Kabayama K, Sato T, Saito K, Loberto N, Prinetti A, Sonnino S, Kinjo M, Igarashi Y, Inokuchi J. Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. Proc Natl Acad Sci USA. 2007 Aug 21;104(34):13678-83. PMID: 17699617.
5) Yamashita T, Hashiramoto A, Haluzik M, Mizukami H, Beck S, Norton A, Kono M, Tsuji S, Daniotti JL, Werth N, Sandhoff R, Sandhoff K, Proia RL. Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Mar 18;100(6):3445-9. PMID: 12629211.
6) Kälin S, Heppner FL, Bechmann I, Prinz M, Tschöp MH, Yi CX. Hypothalamic innate immune reaction in obesity. Nat Rev Endocrinol. 2015 Jun;11(6):339-51. PMID: 25824676.
7) Jais A, Brüning JC. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. J Clin Invest. 2017 Jan 3;127(1):24-32. PMID: 28045396.
8) Rahmouni K, Sigmund CD, Haynes WG, Mark AL. Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. Diabetes. 2009 Mar;58(3):536-42. PMID: 19066310.

9) You J, Yu Y, Jiang L, Li W, Yu X, Gonzalez L, Yang G, Ke Z, Li W, Li C, Liu Y. Signaling through Tyr985 of leptin receptor as an age/diet-dependent switch in the regulation of energy balance. Mol Cell Biol. 2010 Apr;30(7):1650-9. PMID: 20086094.