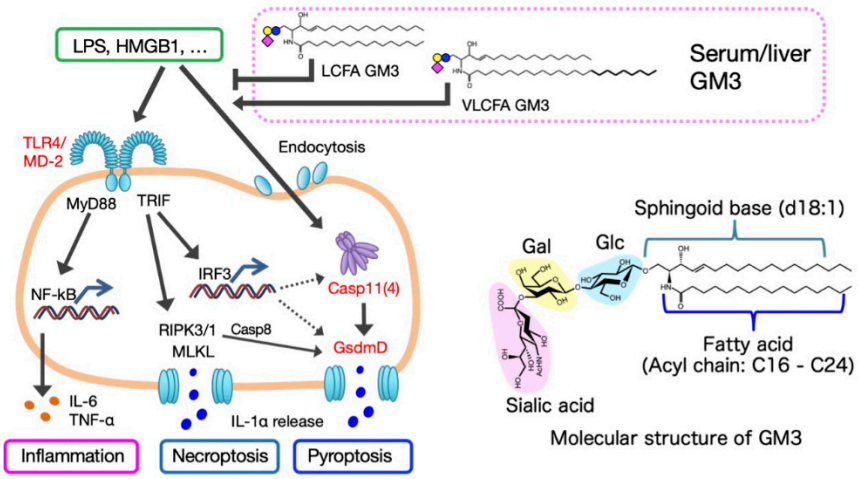
137　ガングリオシドGM3による自然免疫制御/慢性炎症の解明	狩野　裕考

【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-1α）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-1α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-1α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-1αの放出は、Casp1/4/11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-1α放出に関与する因子を探索した結果、GM3の糖鎖構造を認識しうる一部のGalectinファミリータンパク質が、IL-1α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）



137. ガングリオシドGM3による自然免疫制御/慢性炎症の解明

狩野　裕考

東北医科薬科大学 薬学部／分子生体膜研究所 機能病態分子学教室

Key words：Ganglioside，Toll-like receptor，Caspase，Innate Immunity，Inflammation

緒　言

自然免疫応答は、病原体に対する生体防御において重要な役割を担う一方で、その制御破綻や慢性持続化（慢性炎症）を生じた場合には、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。近年では、その制御破綻メカニズムの一つとして、生体内で産生される「内因性リガンド」による自然免疫応答の活性化や制御異常が示唆されている。私たちの研究グループでは、ヒト血清や脂肪組織に含まれるスフィンゴ糖脂質：ガングリオシドGM3やグロボ系糖脂質Gb3が、グラム陰性菌の外膜に由来する糖脂質：リポ多糖（LPS）の受容体であるToll-like receptor（TLR）4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、血中や脂肪組織、腎臓における発現変化によって慢性炎症の発症に関与することをこれまでに見出している［1，2］。

一方、近年の研究から、細胞膜上のTLR4に加えて、細胞質にもLPS受容体が存在することが報告されている。Caspase（Casp）4／5（ヒト）およびCasp11（マウス）は、細胞質に漏洩または取り込まれたLPSを認識する受容体として働き、これらの活性化によって、細胞膜ポア形成タンパク質であるGasdermin D（GsdmD）が活性化されることで、種々の内因性リガンド（HMGB1）やIL-1ファミリーの炎症性サイトカイン（IL-1α）が細胞外へと放出される。これらの現象は、ポア形成による細胞死を介して炎症性因子を放出することから、炎症性細胞死（パイロトーシス）と呼ばれ、炎症性腸疾患、がん、敗血症など、より重篤な疾患の発症に大きく寄与している［3，4］。

本課題では、ガングリオシドGM3が、TLR4の活性化制御に加えて、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。その結果、Casp11およびGsdmDを介したIL-1α放出・細胞死誘導においても、ガングリオシドGM3が制御因子として作用することがわかった。さらに、GM3を介した炎症・細胞死応答を解析することに適したマウスモデルについても新たに見出した。

方　法

1. ガングリオシド分子種およびLPSによる自然免疫系細胞の刺激、炎症・細胞死応答の解析

マウス単球-マクロファージ細胞株RAW264.7細胞、骨髄由来樹状細胞（BMDC）、骨髄由来マクロファージ細胞（BMDM）に対し、LPS（大腸菌O111:B4由来）およびガングリオシドGM3分子種（d18:1-12:0、d18:1-16:0、d18:1-18:0、d18:1-22:0、d18:1-24:0）、あるいは、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を介した細胞死によって産生される炎症性サイトカイン（TNF-α、IL-1α）をそれぞれ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。同一の刺激条件において、種々の阻害剤および遺伝子欠損の影響を評価した。

2. マウス肝臓・血清ガングリオシド分子種解析、糖転移酵素発現プロファイル解析、ゲノム構造解析

大規模マイクロアレイデータベースBioGPSに収載されたマウス系統および組織別の遺伝子発現データをメタ解析することにより、血清ガングリオシドの産生組織である肝臓における各種糖転移酵素の発現プロファイルを比較した。実際にマウス血清および肝臓にて発現する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法および液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS/MS）を用いて分析し、ヒトと同様にGM3が血中を循環す

る近交系マウス系統を探索した。マウス系統別の各種糖転移酵素および周辺のゲノム構造・配列を、マウスゲノムデータベース（Mouse Genome Informatics、Jackson Laboratory）を用いて推定し、PCR 法を用いて解析した。

結果および考察

1. GM3 ガングリオシド分子種による TLR4／Casp11 を介した炎症応答・炎症性細胞死の制御

マウスマクロファージ系細胞・樹状細胞を 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-1α放出量が著しく増大することがわかった（図 1A、B）。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-1α の放出が大幅に抑制されることがわかった（図 1B）。LPS／GM3 共刺激に伴う応答のうち、TNF-α の産生は 24hr 以内に完了するが、IL-1α の放出は 24hr 以内では起こりにくく、次の 24hr で急激に生じた（図 1A、B）。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 ガングリオシドではほとんど生じなかった（図 1C）。各種の阻害剤を用いた結果、上記の IL-1α の放出は、Casp1／4／11 阻害剤である Belnacasan（VX-765）や、マウス GsdmD 阻害剤である Necrosulfonamide（NSA）によって阻害された。RAW 細胞は Casp1 活性化に必要な因子（ASC）を欠損していることから、VX-765 の阻害作用は、主に Casp11 に対するものと考えられた。同様に、RAW-ASC 細胞（ASC-rescued cell-line）と比較して、Casp11-KO RAW-ASC 細胞において部分的に、GsdmD-KO RAW-ASC 細胞においては大幅に、IL-1α の放出が抑制された。RAW-ASC 細胞においては Casp1 を介する経路が補完されており、また、TLR4 を介した直接的な GsdmD 活性化経路も存在することから［4］、GsdmD に至る経路にて冗長性が働いたものと考えられた。

加えて、LPS／GM3 共刺激による IL-1α 放出に関与するタンパク質性因子を探索した結果、GM3 の糖鎖構造を認識しうる Galectin ファミリータンパク質（Galectin-3）の添加によって、IL-1α 産生が選択的に増大した。最近、Galectin-3 は細胞内において Casp11 と LPS の相互作用を仲介すると報告されており［5］、GM3 についても Casp11 への提示作用を持つのか、今後の解明が期待される。以上の結果から、ガングリオシド 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の誘導に関与することが示唆された。今後は、ヒト細胞における機能的保存性や、GM3 と各受容体・認識分子との相互作用が明らかになることが期待される。

2. 肝臓・血清ガングリオシド分子種ヒト型マウス系統の同定とゲノム構造解析

マイクロアレイデータベースに収載された、近交系マウス系統および組織別の遺伝子発現データをメタ解析し、血清ガングリオシドの産生組織である肝臓における各種糖転移酵素の発現プロファイルを比較した。その結果、FVB/N 系統および NOD/shi 系統において、肝臓における GM2 合成酵素（*B4galnt1*）の発現が著しく低いことが分かった。実際に、FVB/N 系統および NOD/shi 系統の血清・肝臓で発現する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法で分析した結果、一般的なマウス系統（C57BL/6 など）が発現する GM2 は存在せず、ヒト血清と同様に GM3 が発現していることがわかった（図 2A、B）。一方、肝臓以外の組織（脳など）では、ヒトと同様に GM2 以降のガングリオシドが発現しており、組織選択的な影響であることが分かった。

マウス系統別の各種糖転移酵素遺伝子および周辺のゲノム構造・配列を、マウスゲノムデータベース（Mouse Genome Informatics、Jackson Laboratory）により解析したところ、NOD/shi 系統および FVB/N 系統の *B4galnt1* 上流において、約 10 kbp の大きな領域欠損が存在すると推定された（図 2C）。実際に、PCR 法およびサンガーシーケンス法による解析を行った結果、C57BL/6 系統における約 10 kbp の配列は、FVB/N 系統では 0.6 kbp の挿入配列となっており（図 2D）、配列検索から内在性レトロウイルスの部分配列である可能性が示唆された。一方、本来の約 10 kbp の上流配列は、ラットには相同領域が存在したが、ヒトの *B4GALNT1* 上流では、現時点までの解析では確認できていない。よって、この領域が、肝臓・血清中のガングリオシド発現における生物種差に関与している可能性が考えられる。

NOD/shi 系統は、代表的な I 型糖尿病自然発症マウスであり、近年の報告では、その発症に TLR 下流シグナルが関与することが示唆されている［6］。FVB/N 系統は、多産かつ体格に恵まれた系統であり、ガングリオシドヒト型マウ

スとしての利用に適すると想定できる。一方で、LPS 誘導性の疾患モデルにおける組織炎症が他系統と比べて重篤など［7］、興味深い特徴が報告されている。質量分析法による解析の結果、FVB/N 血清中には、主に極長鎖 GM3 分子種（d18:1-22:0、-23:0、-24:0）が含まれることがわかった（図 2E、F）。今後、FVB/N 系統および領域欠損を模倣したゲノム編集マウス（C57BL/6 系統）を用いることで、極長鎖 GM3 による TLR4／Casp11 活性化を介した炎症・細胞死応答を個体レベルで解明すること、ヒトに外挿可能なグライコスフィンゴリピドミクスを展開することが期待される。

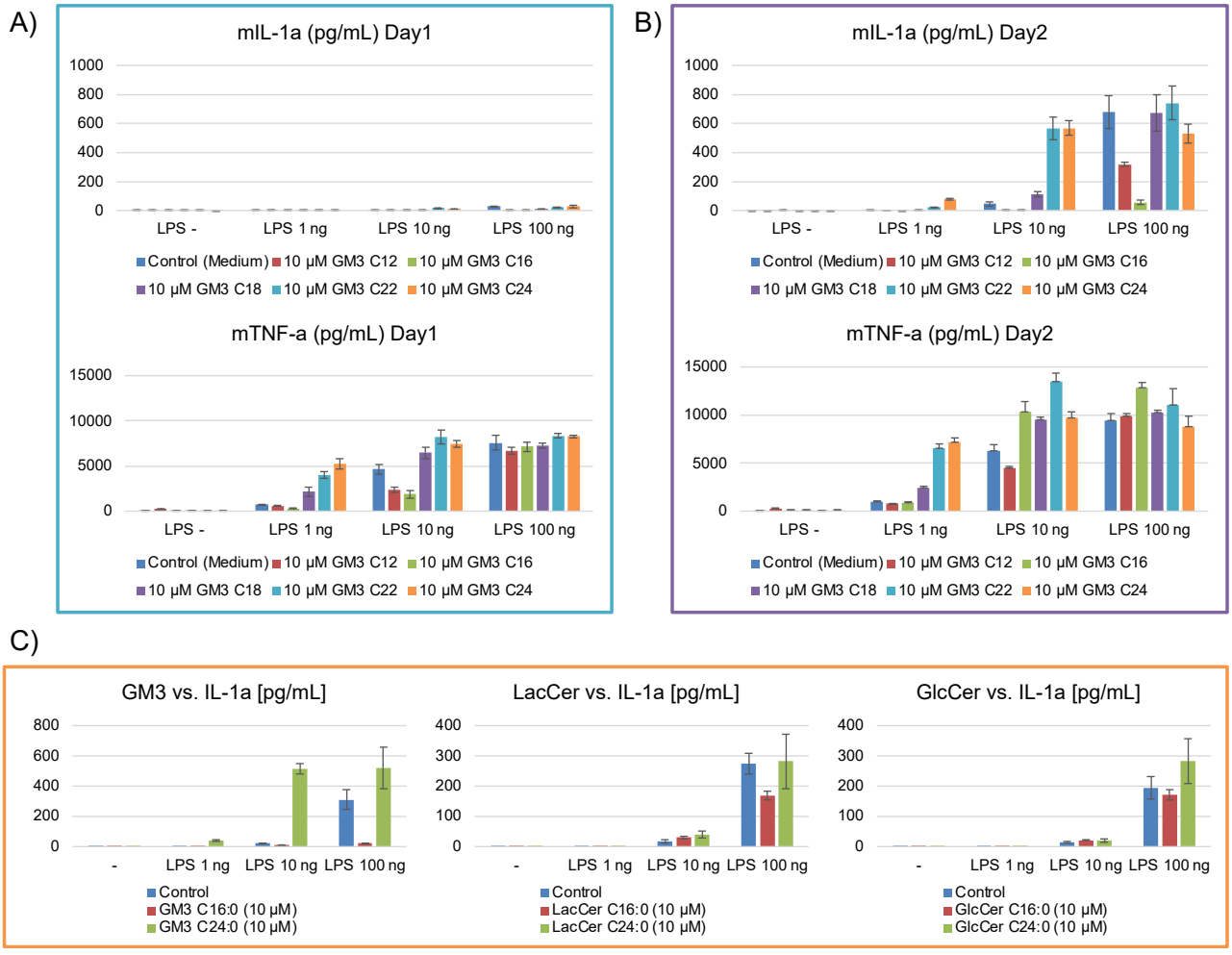


図 1. GM3 分子種による TLR4／Casp11 を介した炎症応答・炎症性細胞死の制御

A) RAW 細胞における GM3 分子種/LPS 共刺激による TNF-α／IL-1α産生量（1 日）。

B) GM3 分子種／LPS 共刺激による TNF-α／IL-1α産生量（2 日間）。

C) IL-1α産生における GM3 および生合成前駆体の生理活性の比較。

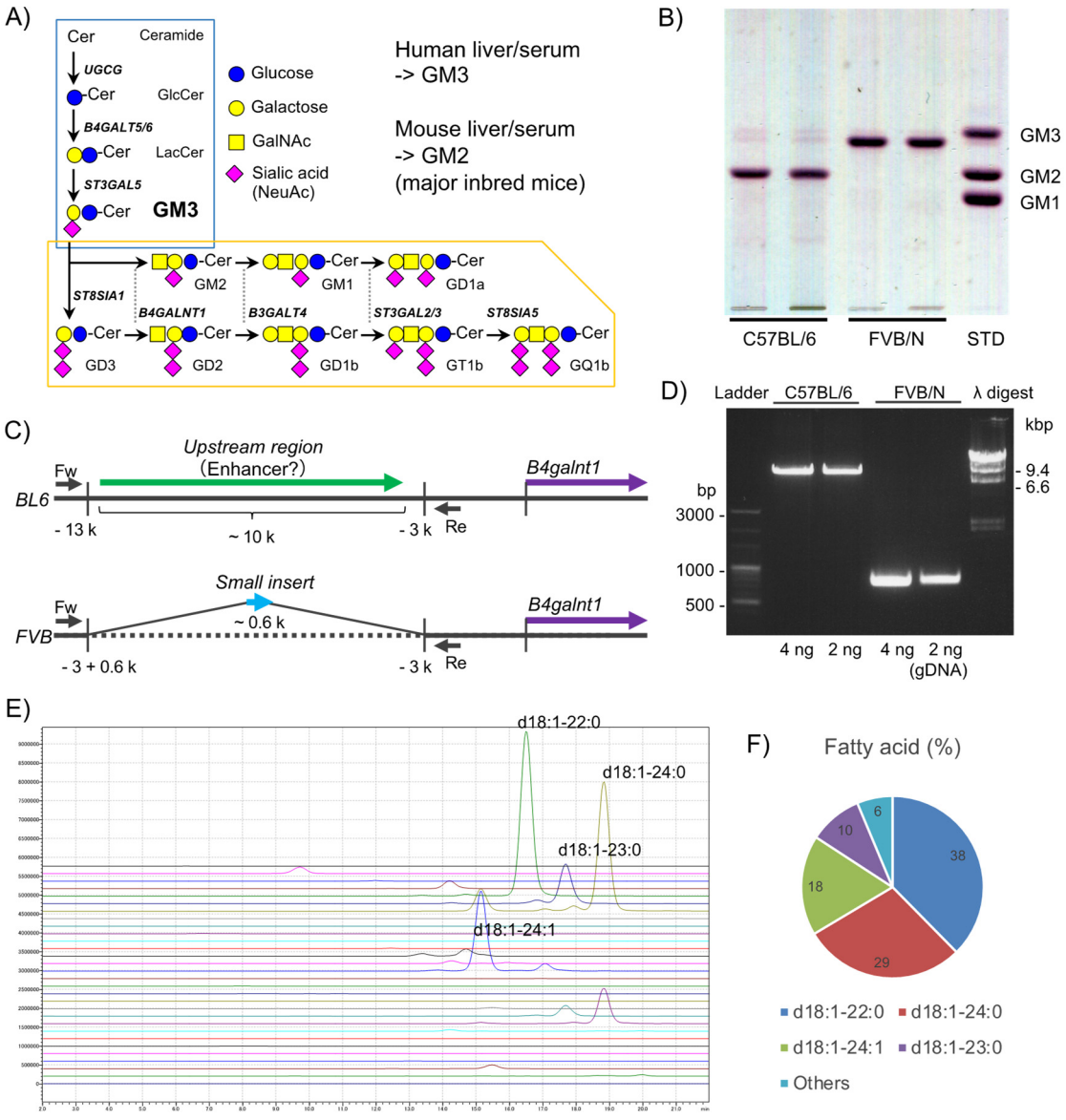


図 2. ガングリオシドヒト型マウス系統の同定と血清 GM3 質量分析

A) ガングリオシド分子種の生合成経路および糖転移酵素。

B) 肝臓ガングリオシド画分の薄層クロマトグラフィー（TLC）解析。

C) C57BL/6 および FVB/N の *B4galnt1* 上流領域の比較。

D) ゲノム PCR 法による *B4galnt1* 上流領域の増幅と配列長の比較。

E) FVB/N 系統の血清 GM3 分子種の LC-MS/MS 解析（クロマトグラム）。

F) LC-MS/MS 解析によって算出した GM3 アシル鎖（脂肪酸）構成比率。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北医科薬科大学薬学部機能病態分子学教室の新田昂大博士研究員である。本研究に御支援を賜りました上原記念生命科学財団に心より御礼申し上げます。

文　献

1) Homeostatic and pathogenic roles of GM3 ganglioside molecular species in TLR4 signaling in obesity. Kanoh H, Nitta T, Go S, Inamori KI, Veillon L, Nihei W, Fujii M, Kabayama K, Shimoyama A, Fukase K, Ohto U, Shimizu T, Watanabe T, Shindo H, Aoki S, Sato K, Nagasaki M, Yatomi Y, Komura N, Ando H, Ishida H, Kiso M, Natori Y, Yoshimura Y, Zonca A, Cattaneo A, Letizia M, Ciampa M, Mauri L, Prinetti A, Sonnino S, Suzuki A, Inokuchi JI. EMBO J. 2020 Jun 17;39(12):e101732. Epub 2020 May 7. PMID: 32378734 doi: 10.15252/embj.2019101732.

2) Globo-series glycosphingolipids enhance Toll-like receptor 4-mediated inflammation and play a pathophysiological role in diabetic nephropathy. Nitta T, Kanoh H, Inamori KI, Suzuki A, Takahashi T, Inokuchi JI. Glycobiology. 2019 Mar 1;29(3):260-268. PMID: 30476082 doi: 10.1093/glycob/cwy105.

3) Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F. Nature. 2015 Oct 29;526(7575):660-5. Epub 2015 Sep 16. PMID: 26375003 doi: 10.1038/nature15514.

4) The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. Broz P, Pelegrín P, Shao F. Nat Rev Immunol. 2020 Mar;20(3):143-157. Epub 2019 Nov 5. PMID: 31690840 doi: 10.1038/s41577-019-0228-2.

5) Galectin-3 promotes noncanonical inflammasome activation through intracellular binding to lipopolysaccharide glycans. Lo TH, Chen HL, Yao CI, Weng IC, Li CS, Huang CC, Chen NJ, Lin CH, Liu FT. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Jul 27;118(30):e2026246118. PMID: 34301890 doi: 10.1073/pnas.2026246118.

6) Burrows MP, Volchkov P, Kobayashi KS, Chervonsky AV. Microbiota regulates type 1 diabetes through Toll-like receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Aug 11;112(32):9973-7. Epub 2015 Jul 27. PMID: 26216961 doi: 10.1073/pnas.1508740112.

7) Rocha-Ferreira E, Phillips E, Francesch-Domenech E, Thei L, Peebles DM, Raivich G, Hristova M. The role of different strain backgrounds in bacterial endotoxin-mediated sensitization to neonatal hypoxic-ischemic brain damage. Neuroscience. 2015 Dec 17;311:292-307. Epub 2015 Oct 26. PMID: 26515746 doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.10.035.