ガングリオシド GM3による脂肪細胞の機能制御

学位論文内容の要旨

ガングリオシドはシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質の総称であり、様々な生物学的プロセス、例えば、細胞間相互作用、接着、細胞分化、増殖抑制など様々な場面で重要な役割を果たしている。またガングリオシドはコレステロールやスフィンゴミエリンと共に相転移温度が高い細胞膜マイクロドメインを形成している。マイクロドメインは特定の膜部分の輸送や種々のシグナル伝達の間として機能していることが明らかにされつつあり、多くの分野からの注目が高まってきている。また一方で、ガングリオシドは多くの病態に関与することが知られている。これまで当研究室において、3T3-L1 脂肪細胞において TNF- α 刺激によるガングリオシド GM3 の増加がインスリンシグナルを抑制することを見出している。さらに 3T3-L1 脂肪細胞に同条件の TNF- α 刺激を与えると、GM3 がマイクロドメインにおいて増加すること、そして通常マイクロドメインに局在しているインスリンレセプター(IR)がマイクロドメイン外に分散することが明らかとなり、インスリン抵抗性にマイクロドメインの機能異常が関与している可能性が示唆された。

本研究では、GM3 とインスリンレセプターとの相互作用の検討を行った。また内臓脂肪細胞の培養系を確立し、内臓脂肪細胞におけるスフィンゴ糖脂質発現量制御について検討した。さらに生活習慣病と血清 GM3 含有量との関係について検討した。

(1) ガングリオシド GM3 とインスリンレセプターとの相互作用

これまでに、GM3 の発現増加がインスリンシグナルを抑制することが見出されていたが、その機構については不明であった。また、IR は、細胞膜上で caveolin と結合することで、その発現が安定化されることが知られている。そこで IR, caveolin, GM3 の相互作用を検討するために 3T3-L1 脂肪細胞において免疫沈降法を行った。その結果、インスリンレセプターは caveolin-1 と、そして GM3 と相互作用し、一方で caveolin-1 と GM3 の相互作用はしないことが判明した。

従って、IR には GM3 と caveolin-1 に対して、独立の結合部位の存在が示唆された。次に我々は、GM3 の放射標識光反応性誘導体([11- 3 H(Neu5Ac)]GM3-N₃)を用いた検討により、IR と GM3 の直接的な結合を確認した。IR と caveolin-1 は細胞質側で直接的に結合するため、IR は GM3 と細胞膜上で結合していることとなる。さらに、FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)を用いた解析からインスリンレセプターと GM3 の相互作用にはインスリンレセプターの膜貫通ドメイン直上に存在するリジン残基が関与することが判った。

(2) 腸間膜脂肪の分化誘導法の確立

近年、内臓脂肪組織の一つである腸間膜脂肪の過剰蓄積は、生活習慣病を引き起こすことが検証さ

れてきている。これまでに、(株)プライマリーセルはラット腸間膜脂肪組織から調製した前駆脂肪細胞(mesenteric-stromal vascular cells: mSVC)を成熟脂肪細胞(mesenteric-visceral adipocytes: mVAC)にまで分化誘導する新規な培養法を確立していた。

しかしながら、本分化系におけるインスリン濃度に関しては、従来の初代培養細胞の分化系と同様に非生理的な高濃度である 10,000 ng/ml に設定していたため、今回 mVAC への分化誘導に対するインスリン濃度について検討した。その結果、生理的濃度のインスリンおよび IGF-1 で mVAC を得ることに成功した。さらにインスリンと IGF-1 の各々が内臓脂肪細胞の分化・成熟過程にどのように関与しているかを網羅的 real-timePCR により検討した。その発現がインスリン/IGF-1 シグナルに依存し、且つインスリンシグナルと IGF-1 シグナルが相乗的に作用しているものであるものが存在することが判明した。従って、生理的濃度のインスリンと IGF-1 の両者は協調的に内臓脂肪細胞の分化・成熟を達成していることを初めて示すことができた。このように生理的な腸間膜脂肪細胞の分化誘導系の確立に成功したことは、生活習慣病の病態生理解明への必須なツールとして、また肥満や 2 型糖尿病などの生活習慣病の治療に有効な薬剤スクリーニングや診断薬の開発への貢献が期待される。

(3) マクロファージによるスフィンゴ糖脂質発現制御機構の解明

我々はこれまで肥満糖尿病モデルの脂肪組織において、GM3 発現量の著しい上昇が認められることを報告している。しかしながら、どのような機構により肥満または糖尿病により脂肪組織においてガングリオシドが増加する機構は不明である。そこで、内臓脂肪細胞の糖脂質発現量に対するマクロファージの影響について検討した。上記のように我々は、ラット腸間膜内臓脂肪組織から調整した前駆脂肪細胞を成熟脂肪細胞へ分化誘導できる培養法を確立しているおり、この前駆脂肪細胞の約 3 割がマクロファージ特異的マーカーを発現していることを確認している。最初にマクロファージを特異的に死滅させるクロドロネートを添加したところ、グルコシルセラミド、ラクトシルセラミド、および GM3 の発現量が減少し、それぞれの合成酵素の mRNA 発現量も減少していることが確認された。さらにマイクロアレイを用いた解析から、グルコシルセラミド合成酵素の阻害剤を作用させると、生活習慣病の増悪に関与する遺伝子の発現上昇が抑制された。以上より、GM3 は炎症性サイトカインにより発現が上昇し、インスリン抵抗性を誘導するばかりでなく、GM3 の発現抑制は、マクロファージの活性化を制御し、積極的に生活習慣病の病態を改善する可能性が示されたことになる。

(4) 生活習慣病における血清 GM3 の測定意義

血中のガングリオシドは、リポタンパクと結合して運搬され、高脂血症患者の血液中の総ガングリオシド量が高い傾向にあることが報告されている。また糖尿病に関しては、総ガングリオシド量と相関が無いという報告があるが、血清 GM3 と糖尿病との関係については、検討がなされていなかった。また、最近注目されている内臓肥満との関係については、報告が無い。そこで、本研究では GM3 と生活習慣病との関連性を調べるために、糖尿病患者および高脂血症患者の血清 GM3 濃度を検討した。加えて内臓脂肪面積と血清 GM3 濃度を検討した。その結果、2 型糖尿病が進行した患者および高脂血症患者において血清 GM3 濃度が上昇する傾向にあることが判った。またに高度な内臓脂肪型肥満を呈する 2 型糖尿病患者において血清 GM3 濃度が上昇し、一方で GM3 の基質であるラクトシルセラミドの血清中濃度は内臓脂肪型肥満により減少することが判った。

今後は、クランプ法によりインスリン抵抗性を評価した患者の血清 GM3 の測定を行う予定である。インスリン抵抗性を正確の評価することが可能なクランプ法は病院側、患者側共に対しての負担が大

きく、将来的にインスリン抵抗性について血清中のガングリオシド GM3 を用いて評価することが可能であれば、大変有益であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	五十嵐 靖之
副査	准教授	松本 健一
副査	准教授	木原 章雄
副査	教授	井ノ口 仁一

学位論文題名

ガングリオシド GM3による脂肪細胞の機能制御

ガングリオシドはシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質の総称であり、細胞間相互作用、接着、細胞分化、増殖抑制などで重要な役割を果たしている。またガングリオシドはコレステロールやスフィンゴミエリンと共に細胞膜マイクロドメインを形成し、タンパク質輸送や種々のシグナル伝達の間として機能し、多くの病態に関与することが知られている。これまで申請者の研究室では、3T3-L1 脂肪細胞において TNF- α 刺激によるガングリオシド GM3 の増加がインスリンシグナルを抑制することを見出している。また 3T3-L1 脂肪細胞に同条件の TNF- α 刺激を与えると、GM3 がマイクロドメインにおいて増加すること、そして通常マイクロドメインに局在しているインスリンレセプター(IR)がマイクロドメイン外に分散することを明らかとし、インスリン抵抗性にマイクロドメインの機能異常が関与している可能性を示唆した。

上記のように、GM3 の発現増加がインスリンレセプターの膜上での局在変化を引き起こすことを見出されたが、その機構については不明であった。そこで申請者はまず、GM3、IR そして caveolin-1 間の相互作用について検討した。申請者は、IR は caveolin-1 および GM3 と直接的に結合するが、IR と caveolin-1 の結合が観察されないことから IR は caveolin-1 および GM3 とそれぞれ独立した複合体を形成することを明らかにした。さらに、TNF- α 処理および未処理の 3T3-L1 脂肪細胞を用いて、GM3 発現増加はインスリンレセプターと caveolin-1 の複合体を解離させ、インスリン抵抗性を誘導することを明らかにした。

株化された脂肪細胞を用いた検証で GM3 とインスリンシグナルとの関係について一定の見解が得られてきたが、最近生活習慣病の引き金として着目されている内臓脂肪細胞との関係については、未だ検証されていなかった。そこで申請者は、次に腸間膜内臓脂肪細胞の生理的分化誘導法の確立を試みた。その結果、生理的濃度のインスリンおよび IGF-1 で腸間膜内臓脂肪細胞

胞を得ることに成功し、生理的濃度のインスリンと IGF-1 の両者は協調的に内臓脂肪細胞の分化・成熟を達成していることを示した。このように生理的な腸間膜脂肪細胞の分化誘導系の確立に成功したことは、生活習慣病の病態生理解明への必須なツールとして、また肥満や2型糖尿病などの生活習慣病の治療に有効な薬剤スクリーニングや診断薬の開発への貢献が期待される。

次に、申請者は内臓脂肪細胞の糖脂質発現量に対するマクロファージの影響について検討した。申請者の研究室では、肥満糖尿病モデルの脂肪組織において、GM3 発現量の著しい上昇が認められることを見出しているが、どのような機構で肥満または糖尿病により脂肪組織において gangliosid が増加する機構は不明であった。そこで、申請者は、本研究で確立した腸間膜内臓脂肪細胞を用いた検討を行い、前駆脂肪細胞中に含まれているマクロファージが液性因子を介して、腸間膜内臓脂肪細胞のスフィンゴ糖脂質の発現量を支配していることを明らかにした。また、腸間膜内臓脂肪細胞に対して複数の炎症性サイトカインを作用させると、gangliosid 合成経路の上流に位置するグルコシルセラミドおよびラクトシルセラミドの合成酵素の遺伝子発現には変化が認められず、GM3 合成酵素の遺伝子発現のみが上昇することを示した。

最後に申請者は、血中 GM3 と生活習慣病との関連性を調べるために、糖尿病患者および高脂血症患者の血清 GM3 濃度を検討した。加えて内臓脂肪面積と血清 GM3 濃度を検討した。その結果、2型糖尿病が進行した患者および高脂血症患者において血清 GM3 濃度が上昇する傾向にあることを明らかにした。また高度な内臓脂肪型肥満を呈する2型糖尿病患者において血清 GM3 濃度が上昇した。さらに、内臓型肥満により血中ラクトシルセラミド濃度は減少し、このため内臓脂肪肥満の進行により GM3 濃度/ラクトシルセラミド濃度は顕著に上昇することを見出した。内臓脂肪面積とインスリン感受性には、相関関係があることが知られており、将来的にインスリン抵抗性について血清中の gangliosid GM3/ラクトシルセラミド比を用いて評価することが可能であれば、大変有益であると考えられる。

以上、本論文は生活習慣病が gangliosid GM3 の発現量増加を引き起こす要因となるという現象から、脂肪組織中でのマクロファージによるスフィンゴ糖脂質の発現制御機構、そして、GM3 の発現増加がインスリン抵抗性を引き起こす分子メカニズムまで、よく考察している。よって、申請者は博士（薬学）の学位を受領するのに十分な資質を有するものであることを認めた。