

## ガングリオシド GM3 と 2 型糖尿病

井ノ口仁一

### Ganglioside GM3 and Type 2 Diabetes

Jin-ichi INOKUCHI

(Received November 21, 2006)

#### I 要旨

細胞膜マイクロドメイン (lipid raft) は、多様なインスリンシグナル伝達の適正な仕分けに重要な役割を果たしており、特に2型糖尿病とインスリン抵抗性の病態における役割が注目されている。炎症性サイトカイン  $\text{TNF}\alpha$  はインスリン抵抗性を誘導するが、その発現機構は十分には解明されていない。5年前に我々は、 $\text{TNF}\alpha$  で刺激した脂肪細胞や典型的な肥満糖尿病モデル動物の脂肪組織では、ガングリオシド GM3 およびその合成酵素遺伝子の発現が著しく増加している事を見出した。その後の様々な検討の中で、インスリン代謝性シグナルの欠損は GM3 の過剰蓄積によるインスリン受容体のマイクロドメインからの解離によるものであることが判りつつある。我々の発

見は、2型糖尿病などの生活習慣病の新たな病態像の解明に繋がるものと期待している。

#### II はじめに

世界の糖尿病患者数は1985年3000万人、1995年1億7700万人、2025年には3億人になると予測され増加の一途をたどっている。国内でも今日、糖尿病が強く疑われる人は700万人を超えており、緊急の対策が必要である。特に、2型糖尿病は糖尿病全人口の90~95%を占めている。

インスリン抵抗性は、「インスリン感受性の細胞または臓器が生理的レベルのインスリンに対する反応性が低下している状態」と定義され、2型糖尿病の病態生理の最も上流に位置する<sup>1)</sup> (Fig. 1)。

近年の脂肪細胞に関する研究の進歩は著しい。

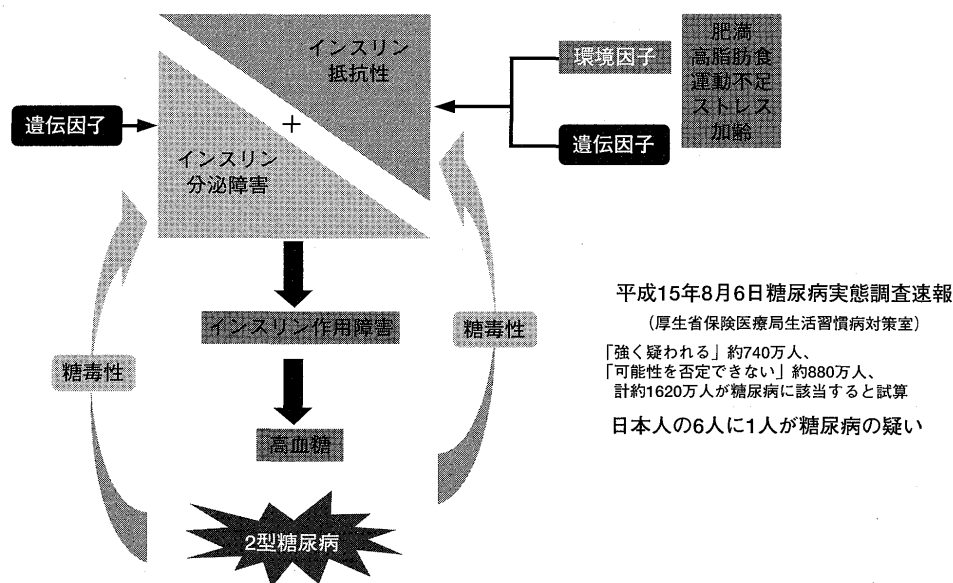


Fig. 1. 21世紀はインスリン抵抗性との戦い

これまで、単なるエネルギー貯蔵臓器としてしか捉えられてこなかった脂肪組織は、実はアディポサイトカインと総称される多彩な生理活性物質を産生する生体最大の内分泌臓器であることが知られるようになった。特に、肥満における内蔵脂肪の過剰蓄積に伴う脂肪細胞の機能異常、すなわちアディポサイトカインの分泌異常（例えば、炎症性サイトカインTNF $\alpha$ の過剰分泌やアディポネクチンの分泌低下など）が、インスリン抵抗性を惹起し2型糖尿病や動脈硬化性疾患の多彩な病態の成因として重要な役割を果たしていることが明らかにされている。最近、白色脂肪組織においてマクロファージがリクルートされ脂肪組織中に侵入し炎症性サイトカインを分泌し、その結果インスリン抵抗性を惹起することが見いだされ、脂肪組織に潜在する骨髄系細胞の病態生理が注目されている（Fig.2）。

培養脂肪細胞や動物モデルを用いた多くの研究によりTNF $\alpha$ のインスリン抵抗性状態への関与が示されている<sup>2,3,4</sup>。遺伝的な肥満モデルである*db/db*マウス、*ob/ob*マウス、およびZuckerラットや肥満2型糖尿病患者の脂肪組織では、TNF $\alpha$  mRNA発現レベルの有意な上昇が認められている<sup>2,3</sup>。例えば、可溶性のTNF $\alpha$ 受容体-IgG キメラ蛋白をZuckerラットに投与してTNF $\alpha$ を中和すると、インスリン抵抗性状態が軽減したり、TNF $\alpha$ 遺伝子ノックアウトマウスはインスリン抵抗性が起こらない<sup>4</sup>。これらの知見より、中性脂肪を過剰

に蓄積して肥大化した脂肪組織がTNF $\alpha$ を過剰に産生することがインスリン抵抗性の原因として中心的な位置を占める。

ガングリオシドGM3は、ラット、マウス、ヒトの種を超えて脂肪組織の主要なガングリオシドである<sup>5</sup>。外因性に添加したGM3はEGF受容体<sup>6</sup>やインスリン受容体<sup>7</sup>のリガンド依存性の自己リン酸化を抑制することが示されていた。また、ガングリオシド（スフィンゴ糖脂質）、スフィンゴミエリン、コレステロールなどの相転移温度が高い脂質群が集積して形成される細胞膜カベオラマイクロドメインにインスリン受容体が存在していることから<sup>8</sup>、細胞膜におけるインスリンシグナル伝達においてもGM3が影響を与えている可能性がある。本稿では、TNF $\alpha$ 刺激によるGM3合成亢進がマイクロドメインの機能異常を引き起こし、インスリンの代謝性シグナルを選択的に抑制している可能性について、我々の最近の結果を中心に紹介する。

### III ガングリオシドGM3はインスリン抵抗性を惹起する

インスリンは多様な生物活性を発揮するが、大別すると代謝性活性と増殖性活性に区別される（Glycoword GD-B03参照）。インスリン受容体（IR）にインスリンが結合するとIRのチロシン自己リン酸化、それに続いてアダプター蛋白であるinsulin receptor substrate（IRS）のチロシンリン酸化が起こる。リン酸化されたIRSは、PI3キナー

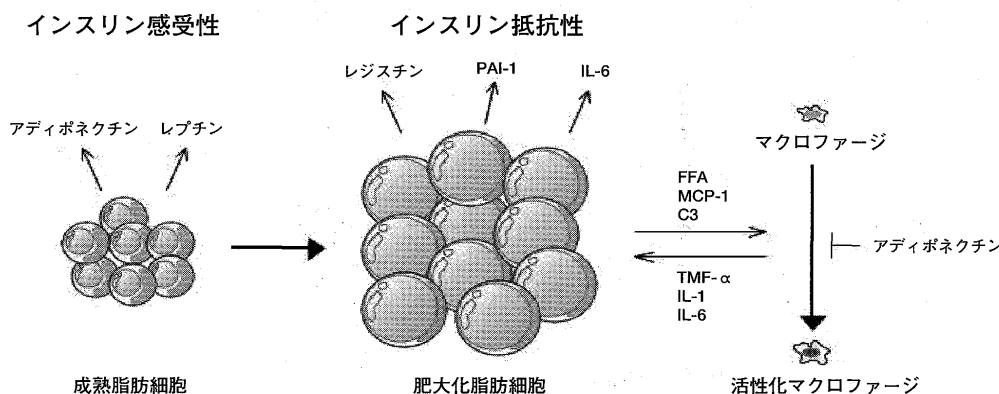


Fig. 2.

ゼを活性化し, glucose transporter 4 (GLUT-4) の細胞膜へ移行させる結果, 糖の取り込みを促進する. この IR-IRS-PI3 キナーゼ経路は, インスリンの代謝経路の中心的位置を占める. 一方, インスリン増殖性シグナルは活性化した IR による Shc のリン酸化に始まり, Ras-MAPK 経路の活性化に繋がる.

我々は, マウスの 3T3-L1 脂肪細胞を IRS-1 および GLUT4 の発現が抑制されない 100pM の TNF $\alpha$  で 4 日間培養すると, インスリン刺激による IR のチロシン自己リン酸化の中等度の抑制と IRS-1 のチロシンリン酸化の著しい抑制が起こることを確認した<sup>9)</sup>. この濃度レベルの TNF $\alpha$  で脂肪細胞にインスリン抵抗性状態を誘導するには 3 日間以上の慢性的な刺激が必要なことから, TNF $\alpha$  によってインスリンシグナルの未知の阻害物質の発現が増加する可能性が推定された. そこで, TNF $\alpha$  刺激による 3T3-L1 脂肪細胞の GM3 の発現を経時的に検討したところ, TNF $\alpha$  処理時間に依存した GM3 含量の増加が認められ, この GM3 の発現増加は SAT-1 遺伝子の発現および SAT-1 の GM3 合成酵素活性の上昇とよく相関し, 転写レベルでの活性化が起こっていた<sup>9)</sup>.

TNF $\alpha$  刺激 3T3-L1 脂肪細胞のインスリン抵抗性の獲得に伴って増加した GM3 のインスリンシグナルへの影響を明らかにする為に, グルコシルセラミド合成酵素の特異的阻害剤 D-PDMP<sup>10,11)</sup> を用いた検討を行った. D-PDMP により TNF $\alpha$  刺激で増加した GM3 の発現が抑制されるとともに, IRS-1 のチロシンリン酸化の抑制がほぼ解除された. この結果から, GM3 の増加は IR-IRS-1 シグナルを脱共役していることが示された. これらの我々の知見は, GM3 合成酵素ノックアウトマウスではインスリンシグナルが亢進していることから支持される<sup>12)</sup>.

Hotamisligil 等は, 脂肪細胞の TNF $\alpha$  処理は IRS-1 のセリン残基のリン酸化を促進する事を報告し, このセリンリン酸化 IRS は IR のチロシンキナーゼ活性を直接阻害する重要な反応であることを明らかにした<sup>13)</sup>. 我々は, D-PDMP によって TNF $\alpha$  刺激で誘導される GM3 の発現増加を阻止すること, IRS-1 のセリンリン酸化も抑制されることを見い

だしことから, GM3 の増加は IRS-1 のセリンリン酸化を促進する可能性が示唆された<sup>9)</sup>. TNF $\alpha$  で誘導される IRS-1 のセリンリン酸化酵素としては protein kinase C, c-Jun NH2-terminal kinase, p44/42 kinase, そして PI 3-kinase などの種々のキナーゼがあることから, 内在性 GM3 の増加によってどのキナーゼが活性化されるかを同定することは今後の重要な課題である.

肥満糖尿病モデルである *db/db*, *ob/ob*, KK-A<sup>y</sup> マウスや Zucker *fa/fa* ラットの脂肪組織では, それらのコントロール動物 (lean) と比較すると TNF $\alpha$  の著しい産生上昇が認められる<sup>3)</sup>. 興味あることに, これらの肥満糖尿病モデル動物では TNF $\beta$ , IL-1 または IFN $\gamma$  の産生に変化は無い<sup>3,14)</sup>. そこで我々は, Zucker *fa/fa* ラットと *ob/ob* マウスの副睪丸脂肪組織の GM3 合成酵素遺伝子発現を解析したところ, これらの典型的インスリン抵抗性モデルの脂肪組織では GM3 synthase mRNA および GM3 レベルの著しい上昇が認められた (Fig. 3)<sup>9)</sup>. 現在, ヒトの 2 型糖尿病の脂肪組織および血中 GM3 レベルを他のモデル動物とともに分析中である.

#### IV カベオラマイクロドメインとインスリンシグナル

細胞膜には, コレステロールとスフィンゴ糖脂質 (GSLs) に富み, リン脂質を欠いた, 界面活性剤に不溶性である detergent resistant microdomains (DRMs) と呼ばれるサブドメインがある<sup>15,16)</sup>. 現在までの 10 年間に多くの研究室から, この脂質マイクロドメインが多様なインスリンシグナルの正常な仕分けに重要な機能を持っている可能性が特に脂肪細胞を用いて報告されてきた<sup>17,18)</sup>. 脂肪細胞には, カベオラと呼ばれるマイクロドメインが豊富に存在し, インスリン代謝性シグナル伝達には必須であることが報告された<sup>19,20)</sup>.  $\beta$ -cyclodextrin によるコレステロールの枯渇によりマイクロドメインを破壊すると, IRS-1 のチロシンリン酸化と糖取り込み活性の低下が起こるが, IR の自己リン酸化と MAP キナーゼ活性化は変化しない<sup>20)</sup>. この選択的なインスリン代謝性シグナルの抑制は, 実際に糖尿病患者でも認められることから<sup>1)</sup>,

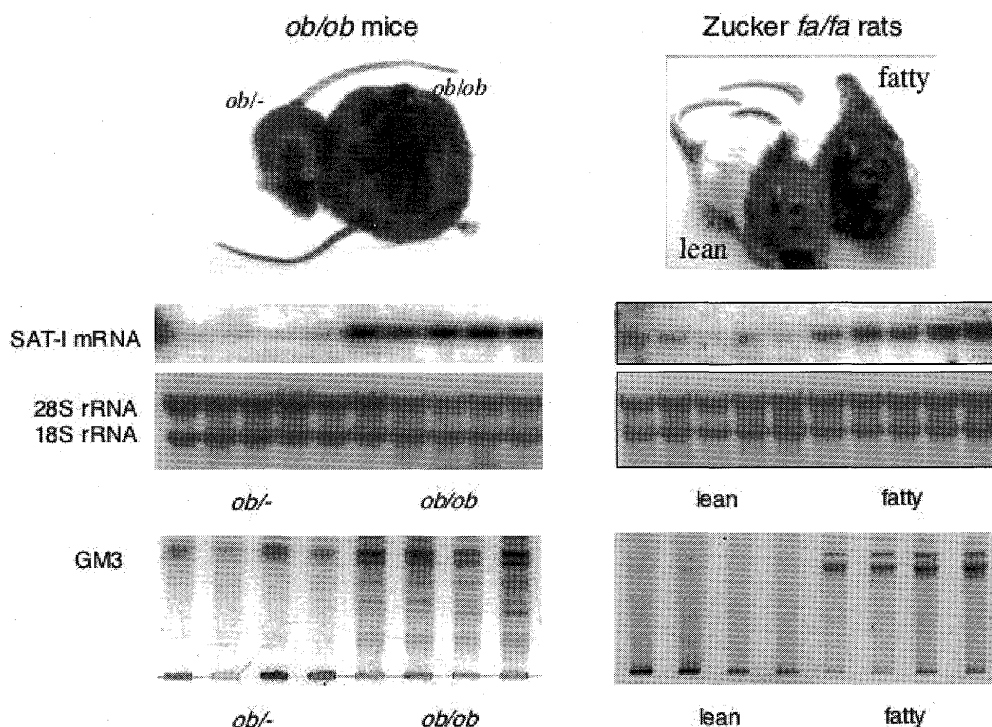


Fig. 3. 肥満モデル動物の脂肪組織ではGM3の発見が亢進する

マイクロドメインの機能異常が糖尿病病態に深く関わっている可能性が示唆される。

Couet等は、IRの $\beta$ サブユニットにはカベオリン結合モチーフ( $\phi$ XXXX $\phi$ XX $\phi$ )が存在し、カベオリンのスキヤフォールドドメインと結合していることを示した<sup>21)</sup>。さらに、IRのこのモチーフの変異によりインスリンシグナルが抑制されることが判った<sup>22)</sup>。事実、IR $\beta$ サブユニットの変異が糖尿病患者で見つかった<sup>23)</sup>。最近、Lisanti教授の研究室は、カベオリン-1 KOマウスでは高脂肪食下でインスリン抵抗性を発症することを報告した<sup>24)</sup>。興味あることにこのKOマウスでは、脂肪細胞選択的にIR自己リン酸化とその下流のインスリンシグナルが抑制されていたが筋肉と肝臓では正常であった。カベオリン-1 KOマウス脂肪細胞ではIRのmRNA発現レベルは正常であったが蛋白レベルでの発現が90%低下していることから、カベオリン-1がIR蛋白を安定に保っていることが示された<sup>18,24)</sup>。これらの研究は、脂肪細胞においてインスリンシグナルが正常に行われるためにはカベオリン-1とIRの相互作用が必須であることを明らかにしている。

上記のようにカベオリン-1とIRの相互作用が示されたにもかかわらず、IRのDRMs/カベオラに存在に関しては相反する多くの報告がなされた<sup>25-29)</sup>。Saltielと共同研究者達は、3T3-L1脂肪細胞のインスリン刺激はカベオリン-1のチロシンリン酸化を併発することを見いだした<sup>30)</sup>。しかしながら、1% Triton X-100を用いてDRMを調製したところ痕跡レベルのIRしか存在していなかったことから、IRとカベオリンの間を結ぶ分子の存在を予想した<sup>28)</sup>。Gustavsson等も0.3%と0.1% Triton X-100で調製したカベオリンを含むDRMからIRは解離していることを観察している<sup>26)</sup>。DRMの調製には種々の界面活性剤が用いられ蛋白および脂質組成が大きく異なってくることが報告されている。中でもTriton X-100は、グリセロリン脂質よりスフィンゴ脂質とコレステロールを多く集積させることができ、DRMに特異的な蛋白を集積させることができる最も信頼性のある界面活性剤である<sup>31)</sup>。そこで我々は、マイクロドメインに弱く会合している蛋白を検出するために非常に広いTriton X-100の濃度を使用してDRMを調製することにした。我々は、0.08%以下の低濃度のTriton X-100で

Table 1. Localization of Insulin Receptor in Caveolae Microdomains is Essential for Insulin's Metabolic Signaling

1) Direct Biding of IR and Caveolin-1

- IR has caveolin binding domain
- Coimmunoprecipitation of IR and caveolin

Couet J et al. J Biol Chem. 272, 6525 (1997)  
Nystrom FH et al. Mol Endocrinol. 13, 2013 (1999)

2) Colocalization of IR and Caveolin-1

- IR and caveolin in light-density fractions  
by sucrose density flotation assay
- Fluorescence Microscope
- Electron Microscope

Yamamoto M et al. J Biol Chem. 273, 26962 (1998)  
Kabayama K et al. Glycobiology 15, 21 (2005)  
Gustavsson J et al. FASEB J. 1961 (1999)  
Karlsson M., et al Eur. J. Biochem 271, 2471 (2004)

3) Signaling

- Stimulation of caveolin-1 tyrosine  
-phosphorylation by insulin
- Caveolin deficient mice show insulin resistance  
due to accelerated degradation of IR in adipose tissue
- Cholesterol depletion desrupts caveolae and  
metabolic signaling of insulin
- Increased GM3 eliminates IR from DRMs  
And inhibits IR-IRS-1 signaling

Mastick CC et al. J Cell Biol. 129, 1523 (1995)  
Kimura A et al. J Biol Chem 277, 40167 (2002)  
Cohen AW et al. Am J Physiol Cell Physiol. 285, C22 (2003)  
Capozza F et al. Am J Physiol Cell Physiol. 2005 in press  
Parpal S et al. J Biol Chem 276, 9670 (2001)  
Gustavsson J et al. Mol Med. 3, 367 (1996)  
Tagami et al. J Biol. Chem. 277, 3085 (2002)  
Kabayama K et al. Glycobiology 15, 21 (2005)

DRM を調製することではじめて正常脂肪細胞の DRM に IR の存在を証明した<sup>32)</sup>。Table 1 に IR がカベオリンマイクロドメインに存在することが、インスリンの代謝性シグナルに必須であることを示した現在までの研究をまとめている。

ベオリン-1 の相互作用が弱まったことが予想される。未発表ではあるが、抗 GM3 抗体による免疫沈降では IR は共沈降するが、カベオリン-1 はしないことから、IR-GM3 および IR-caveolin-1 の独立した複合体の存在が予想される。現在、マイクロドメインにおける GM3, IR およびカベオリン-1 相互作用機構について新知見が得られつつある。

## V マイクロドメイン病としてのインスリン抵抗性

TNF $\alpha$  で刺激した脂肪細胞のインスリン抵抗性状態の誘導には、GM3 合成酵素遺伝子の発現亢進による GM3 合成量の増加が関与し、さらに増加した GM3 はインスリンシグナルの阻害剤として機能する可能性を示した<sup>9)</sup>。GM3 は脂肪細胞の DRMs/カベオリンの重要な構成要素であることから、TNF $\alpha$  刺激した脂肪細胞における GM3 の増加がマイクロドメインの構造と機能への影響を検討した。その結果、GM3 の増加はラフトマーカであるカベオリンやフローチリンの DRM への集積には影響を与えず、IR を DRM から解離することを見いだした<sup>32)</sup>。IR の DRM への集積にはカベオリン-1 との会合が重要であることをすでに述べたが、過剰の GM3 の DRM への集積により IR とカ

## VI 展望

インスリン抵抗性状態におけるマイクロドメインの構造と機能の変化を Fig. 4 に描いてみた。

我々は「2 型糖尿病などの生活習慣病の病態は、スフィンゴ糖脂質の発現異常によってマイクロドメインの構成・構造および機能が変化し、シグナル伝達が異常になったマイクロドメイン病である」という新しい病態概念を提唱している。今後、この作業仮説の証明に向けてさらなる努力を傾注することにより、マイクロドメイン矯正療法ともいべき、新たな治療戦略を開発したい。

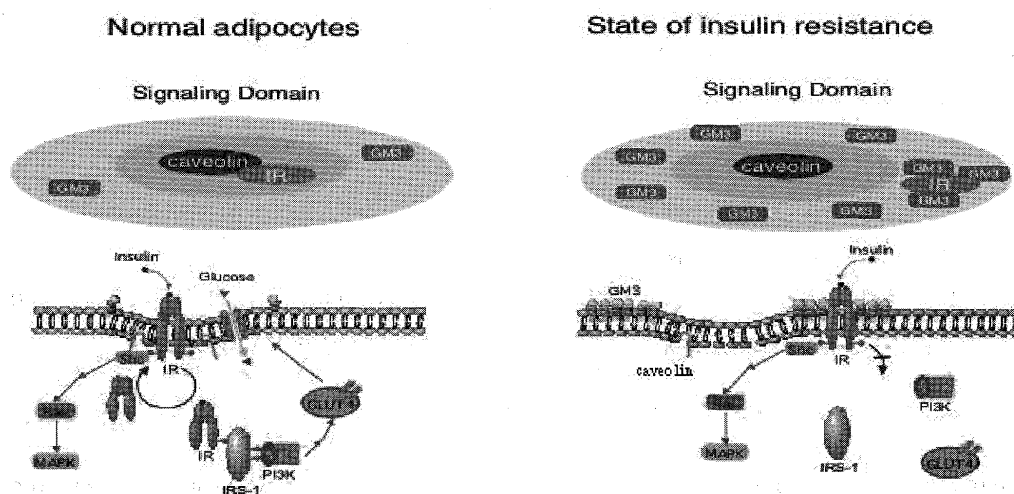


Fig. 4. マイクロドメイン病としてのインスリン抵抗性

## REFERENCES

- 1) Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR., *J. Clin. Invest.*, **103**, 931-943 (1999)
- 2) Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM., *J. Clin. Invest.*, **95**, 2409-2415 (1995)
- 3) Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM., *Science*, **259**, 87-91 (1993)
- 4) Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS., *Nature*, **389**, 610-614 (1997)
- 5) Ohashi M., *Lipids*, **14**, 52-57 (1979)
- 6) Bremer EG, Schlessinger J, Hakomori S., *J. Biol. Chem.*, **261**, 2434-2440 (1986)
- 7) Nojiri H, Stroud M, Hakomori S., *J. Biol. Chem.*, **266**, 4531-4537 (1991)
- 8) Gustavsson J, Parpal S, Karlsson M, Ramsing C, Thorn H, Borg M, Lindroth M, Peterson KH, Magnusson KE, Stralfors P., *FASEB J.*, **13**, 1961-1971 (1999)
- 9) Tagami S, Inokuchi J, Kabayama K, Yoshimura H, Kitamura F, Uemura S, Ogawa C, Ishii A, Saito M, Ohtsuka Y, Sakaue S, Igarashi Y., *J. Biol. Chem.*, **277**, 3085-3092 (2002)
- 10) Inokuchi J, Momosaki K, Shimeno H, Nagamatsu A., Radin NS., *J. Cell Physiol.*, **141**, 573-583 (1989)
- 11) Inokuchi J, Radin NS., *J. Lipid Res.*, **28**, 565-71 (1987)
- 12) 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., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 3445-3449 (2003)
- 13) Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM., *Science*, **271**, 665-668 (1996)
- 14) Hotamisligil GS, Spiegelman BM., *Diabetes*, **43**, 1271-1278 (1994b)
- 15) Hakomori SI., *Glycoconj J.*, **17**, 143-151 (2000)
- 16) Simons K, Toomre D., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 31-39 (2000)
- 17) Bickel, P.E., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **282**, E1-E10 (2002)
- 18) Cohen AW, Combs TP, Scherer PE, Lisanti MP., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **285**, E1151-1160 (2003b)
- 19) Fan JY, Carpentier JL, van Obberghen E, Grunfeld C, Gorden P, Orci L., *J. Cell. Sci.*, **61**, 219-230 (1983)
- 20) Parpal S, Karlsson M, Thorn H, Stralfors P., *J. Biol. Chem.*, **276**, 9670-9678 (2001)
- 21) Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP., *J.*

- Biol. Chem.*, **272**, 6525-6533 (1997)
- 22) Nystrom FH, Chen H, Cong LN, Li Y, Quon MJ, *Mol. Endocrinol.*, **13**, 2013-2024 (1999)
- 23) Imamura T, Takata Y, Sasaoka T, Takada Y, Morioka H, Haruta T, Sawa T, Iwanishi M, Hu YG, Suzuki Y, et al., *J. Biol. Chem.*, **269**, 31019-27 (1994)
- 24) Cohen AW, Razani B, Wang XB, Combs TP, Williams TM, Scherer PE, Lisanti MP., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **285**, C222-235 (2003a)
- 25) Iwanishi M, Haruta T, Takata Y, Ishibashi O, Sasaoka T, Egawa K, Imamura T, Naitou K, Itazu T, Kobayashi M., *Diabetologia*, **36**, 414-422 (1993)
- 26) Gustavsson J, Parpal S, Karlsson M, Ramsing C, Thorn H, Borg M, Lindroth M, Peterson KH, Magnusson KE, Stralfors P., *Faseb. J.*, **13**, 1961-1971 (1999)
- 27) Kimura A, Mora S, Shigematsu S, Pessin JE, Saltiel AR., *J. Biol. Chem.*, **277**, 30153-30158 (2002)
- 28) Mastick CC, Saltiel AR., *J. Biol. Chem.*, **272**, 20706-20714 (1997)
- 29) Muller G, Jung C, Wied S, Welte S, Jordan H, Frick W., *Mol. Cell Biol.*, **21**, 4553-4567 (2001)
- 30) Mastick CC, Brady MJ, Saltiel AR., *J. Cell Biol.*, **129**, 1523-1531, 1995
- 31) Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A, Simons K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5795-5800 (2003)
- 32) Kabayama K, Sato T, Kitamura F, Uemura S, Kang, BW, Igarashi Y. Inokuchi J. *Glycobiology*, **15**, 21-29 (2005)