

原 著

高脂肪食餌誘発性肥満モデルマウスにおける
スフィンゴ糖脂質の発現および構造の変化

松山和佳奈, 郷 慎司, Lucas Veillon, 稲森啓一郎, 井ノ口仁一*

The expression and structural alteration of glycosphingolipids
in High Fat Diet-induced obesity mice

Wakana MATSUYAMA, Shinji GO, Lucas VEILLON, Kei-ichiro INAMORI, and Jin-ichi INOKUCHI*

(Received November 20, 2015)

Glycosphingolipids (GSLs) are located exclusively on the outer leaflet of the cellular plasma membrane and are believed to regulate many biological events including development, cellular trafficking, signaling and cellular interactions.

GSLs are based on ceramide and glycan moiety, and have structural diversity in both ceramide (in its sphingosine and acyl chain structure) and glycan portion. Each molecular species should have distinct biological functions. Gangliosides are a group of glycosphingolipids with one or more sialic acids in their glycan portion. Our group has previously shown that ganglioside GM3 level was increased in cultured adipocytes in a state of tumor necrosis factor α -induced insulin resistance, and the depletion of GSLs by the inhibition of glucosylceramide synthase, results in nearly complete recovery from the resistance of insulin receptor signaling.

In this study, we have systematically examined the effect of high fat diet (HFD)-induced obesity focusing on the structural alterations of GSLs in insulin-target organs (liver, skeletal muscle and adipose tissues), and serum and pancreas. We found the distinct structural alterations of the ceramide portion of GSLs in the HFD-induced obese mice, which include 1) the increase of long acyl chains, 2) introduction of OH moiety at C2 (*a*) position, 3) the introduction of double bond.

Key words — Ganglioside, GM3, Glycosphingolipids, High Fat Diet (HFD), insulin-target organ

緒 論

肥満は、様々な生活習慣病の要因となっている。なかでも2型糖尿病は代表的な生活習慣病の1つであり、インスリン抵抗性、インスリン分泌障害により細胞に糖を正常に取り込めず、慢性的な高血糖に陥る疾患である。

スフィンゴ糖脂質は、スフィンゴシンと脂肪酸からなるセラミドが糖や硫酸基の段階的付加を受けた分子で、主に細胞膜外層に発現しており、糖鎖部分の構造の多様性(糖の種類・数・結合様式)によって様々な構造が存在する(Fig. 1)。なかでも、シアル酸を糖鎖部分に持つスフィンゴ糖脂質を総称して、ガングリオシドと呼ぶ。当研究室では、TNF- α 刺激によってインスリン抵抗性を誘導した3T3-L1脂肪細胞において、ガングリオシドの1つであるGM3が増加することを見いだしてい

る。¹⁾我々は、このような肥満に伴う慢性炎症状態を模倣した脂肪細胞において、増加したGM3とインスリン受容体間で静電的相互作用によってカベオラからインスリン受容体が解離し、インスリン受容体下流のシグナル伝達が阻害されるという、新しいインスリン抵抗性発症機構の存在を示した(Fig. 2)。^{1,2)}加えて、肥満および糖尿病モデルマウスの脂肪組織でGM3が著しく増加することや、³⁾GM3合成酵素遺伝子ノックアウトマウスは高脂肪食負荷で誘導されるインスリン抵抗性に耐性を示すことから、⁴⁾動物個体レベルでもインスリン抵抗性にスフィンゴ糖脂質変化が関与していることが示唆されている。その他のインスリン感受性組織である肝臓や筋肉は、脂肪組織と異なるスフィンゴ糖脂質組成であるが、インスリン抵抗性にスフィンゴ糖脂質が関与していることを示唆する研究がいくつか報告されている。^{1,2,3)}しかしながら各

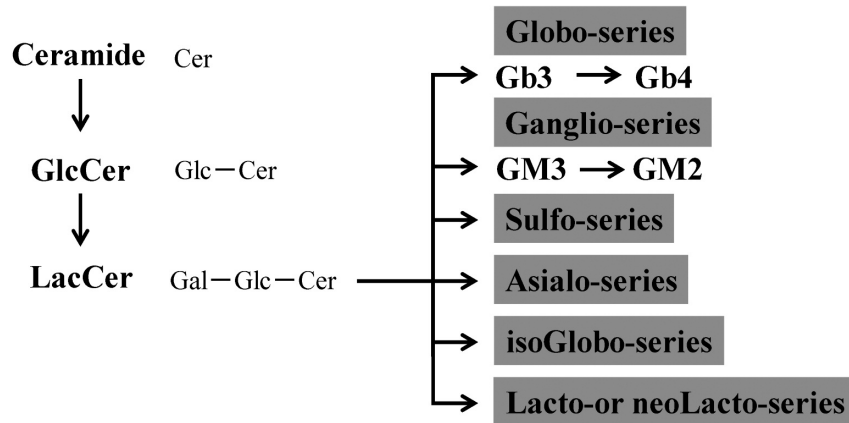


Fig. 1. Biosynthetic pathway of Glycosphingolipids (GSLs).

GSLs are based on ceramide (Cer) and glycan moiety, and have structural diversity in both ceramide (in its sphingosine and acyl chain structure) and glycan portion. Major classification have traditionally been based on the glycan. Gangliosides are a group of glycosphingolipids with one or more sialic acids in their glycan portion.

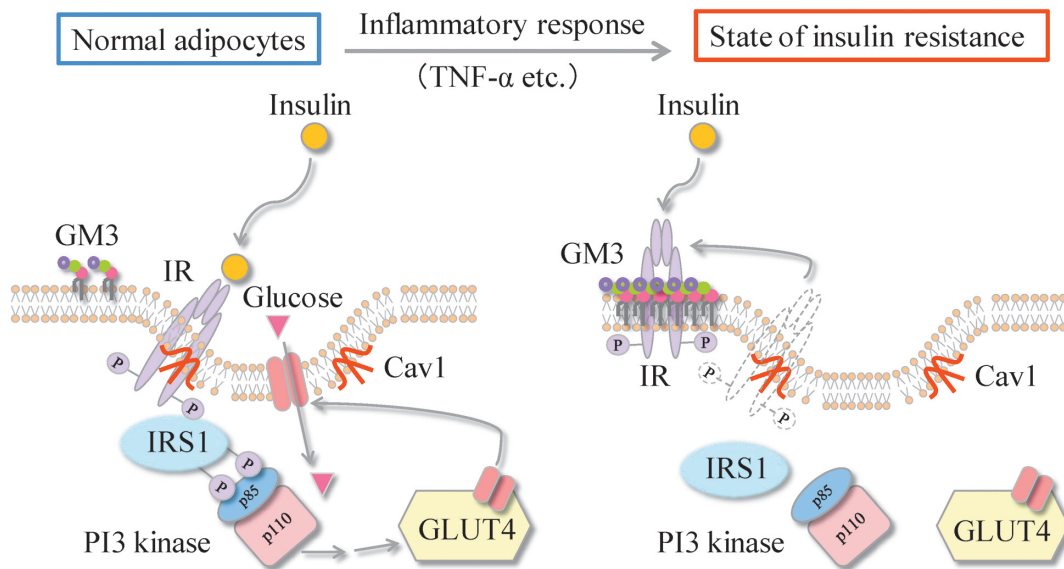


Fig. 2. Proposed mechanism behind the shift of insulin receptor (IR) from caveolae to GSLs enriched microdomains in adipocytes during a state of insulin resistance.

報告で、用いる動物の違い、肥満・インスリン抵抗性惹起法の違い、スフィンゴ糖脂質解析法、スフィンゴ糖脂質分子種解析対象の違いがあり、肥満時・インスリン抵抗性発症時における各組織でのスフィンゴ糖脂質発現変化の全体像は不明な点が多い。

本研究では、高脂肪食餌誘発性肥満モデルに焦点を絞り、肥満発症初期におけるインスリン標的臓器および血清中のスフィンゴ糖脂質の構造および発現が、どのように変化するかを検討した。

実験動物

本実験には、C57BL/6系雄性マウス（日本エスエルシー株式会社）を用いた。室温 22 ± 2 °C、湿度 $55 \pm 10\%$ 。明暗サイクル 12 時間の一定条件下で飼育した。

8 週齢から、コントロール飼料として CE-2（日本エスエルシー株式会社）、高脂肪食飼料として D12492（RESEARCH DIET）60%（kcal%）fat をそれぞれ与えた。

10 週間後、断頭によって安楽死させた後、血液、

肝臓, 下肢の骨格筋 (以下, 筋肉と記す), 精巣上体脂肪組織 (以下, 脂肪組織と記す), 脾臓を採取した. 血液は室温に1時間置いた後, 4°Cで一晩静置した. その後, 遠心分離 (1500×g, 4°C, 20分) によって血清を得た.

今回の動物実験は, 東北薬科大学動物センターの「東北薬科大学動物実験規定」に従って行ったものである.

実験方法

1. 空腹時血糖値の測定

10週間, コントロール飼料および高脂肪食飼料それぞれの餌を与えたマウスの空腹時血糖値を, ACCU-CHECK® Avivaを用いて測定した. 測定を行う前は, 16時間以上絶食させた.

2. 非絶食時血糖値の測定

10週間, コントロール飼料または高脂肪食飼料それぞれの餌を与えたマウスの非絶食時血糖値を, ACCU-CHECK® Avivaを用いて測定した.

3. グルコース (ブドウ糖) 負荷試験 (Intraperitoneal Glucose Tolerance Test: IPGTT)

10週間, コントロール飼料または高脂肪食飼料それぞれの餌を与えたマウスを12時間絶食させた. グルコース (2 g/kg) を腹腔内投与し, 投与後各時間の血糖値を, ACCU-CHECK® Avivaを用いて測定した.

4. インスリン負荷試験 (Intraperitoneal Insulin Tolerance Test: IPITT)

10週間, コントロール飼料または高脂肪食飼料それぞれの餌を与えたマウスを2時間絶食させた. インスリン (0.6 U/kg) の腹腔内投与を行い, 投与後の血糖値を, ACCU-CHECK® Avivaを用いて測定した.

5. 総脂質抽出

細刻した各臓器, 血清は凍結乾燥し, 乾燥後ミクロスパーテルを用いて粉碎した. 粉碎したサンプルに対し, クロロホルム/メタノール=1:1を加え, 水浴超音波装置でソニケーションし, 沈殿物を攪拌後, 40°Cで1時間加温した. 加温後, 358×gで15分間遠心分離し上清みを回収後, 残りの沈殿物にクロロホルム/メタノール=1:2を加え, 水浴超音波装置でソニケーションし, 同条件で加温後, 遠心分離を行った. この上清を, 上述に記載した1回目の上清と全て合わせ, エバポ

レーターを用いて溶媒を蒸発乾固させ, 総脂質抽出物とした.

6. 陰イオン交換クロマトグラフィーによる脂質の分画

総脂質抽出物を酸性脂質および中性脂質に分離するため, DEAE-Sephadex A-25を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った. 総脂質抽出物をクロロホルム/メタノール/水=30:60:8溶液に溶解し, カラムに加え溶出した. その後, カラムの5倍量のクロロホルム/メタノール/水=30:60:8溶液で中性脂質を溶出し回収した. カラムにクロロホルム/メタノール/1M酢酸ナトリウム水溶液=30:60:8溶液を樹脂の5倍量加え, 酸性脂質を溶出した. それぞれの画分の溶液を窒素乾固した.

7. アルカリメタノリシス

グリセロ脂質分解のため, 窒素乾固した各脂質画分に0.1N水酸化ナトリウムメタノール溶液を加え, 水浴超音波装置でソニケーションし, 40°Cで2時間加温した. その際, 30分ごとに水浴超音波装置を用いて攪拌を行った. その後, 1N塩酸メタノール溶液で中和した.

8. 脱塩

アルカリメタノリシス後, 中和したサンプルに等量の50mM塩化ナトリウム水溶液を加え2倍希釈し, SEP-Pak C-18に流した. その後, 精製水を流し脱塩した. メタノール, クロロホルム/メタノール=1:1をそれぞれ用いて, 脂質を溶出し, 溶出液を合わせてエバポレーターを用いて蒸発乾固した. 乾固させたサンプルを少量のクロロホルム/メタノール=1:1で再溶解し, マイクロチューブに完全に移し窒素乾固して, TLC用のサンプルとした.

9. タンパク質の定量

総脂質抽出後の沈殿物を窒素乾固し, 完全に有機溶媒を除いた後, 1N水酸化ナトリウム水溶液を加え, 沈殿物が完全に溶解するまで40°Cで加温した. その後, BCA (Bicinchoninic Acid) 法でサンプルのタンパク質濃度の測定を行った. タンパク質量は, サンプルを溶かした1N水酸化ナトリウム水溶液の体積と, 測定したサンプルのタンパク質濃度を用いて計算した. このタンパク質量を基準にTLCを行った.

10. TLCによるスフィンゴ糖脂質解析

クロロホルム/メタノール=1:1に溶解させた

酸性および中性の脂質を TLC 用シリカゲルプレートにスポットし, デシケーターで約 30 分間乾燥させた後に展開した. 酸性脂質はクロロホルム/メタノール/0.2%塩化カルシウム水溶液 = 55 : 45 : 10, 中性脂質はクロロホルム/メタノール/水 = 60 : 25 : 4 の溶媒でそれぞれ展開した. 展開後, オルシノール硫酸液を TLC 用シリカゲルプレート全体に噴霧し, 約 120°C で加熱してスフィンゴ糖脂質を検出した.

11. LC-MS/MS (Liquid Chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometry) 分析用スフィンゴ糖脂質の調整

各臓器から上述の総脂質抽出を行い, 乾燥させた後, アルカリメタノリシスを行った. 中和後, 2 倍量の 50 mM 塩化ナトリウム溶液を加えた. そこに, Bond Elute C18 Powder を加え, 30 分間振とうした. 振とう後のサンプル溶液を, ガラスウールを詰めたパストゥールピペットに流しミニカラムを作製した. その後, Milli Q 水, 50 %メタノールで塩を除去し, メタノール, クロロホルム/メタノール = 1 : 1 で脂質を溶出した. 溶出したガラス遠心管に回収し, 窒素乾固して LC-MS/MS 解析用のサンプルとした.

12. 液体クロマトグラフィーエレクトロスプレー タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法によるグルコシルセラミドの分子種解析

グルコシルセラミドの分子種解析は, Thermo scientific 社の Triple Stage Quadrupole (TSQ) Vantage システムを用いた LC-MS/MS 法で行った.

条件は参考論文 5) に従い, MRM (Multiple Reaction Monitoring) ポジティブイオンモードでグルコシルセラミド各分子種を検出・定量した.

13. HepG2 細胞の培養方法

10% FBS (Fetal Bovine Serum) 含有 DMEM (Low Glucose, ペニシリン <100 unit/ml> /ストレプトマイシン <100 µg/ml>) を用いて, HepG2 (ヒト肝ガン) 細胞をコンフルエントになるまで培養した. コンフルエントに達した細胞を, BSA (Bovine Serum Albumin) 結合型パルミチン酸 (0.5 mM) で 4 日間処理した. コントロールとして, BSA を処理した. 4 日間処理後, スクレーパーを用いて細胞をガラスチューブに回収し, 358 × g で 15 分間遠心分離し上清みを回収後, 脂質解析用のサンプルとした.

実験結果

1. C57BL/6 マウスに 10 週間高脂肪食を与えた影響

高脂肪食を 10 週間与えた C57BL/6 マウスの体重変動, 空腹時血糖値, 非絶食時血糖値を測定した. また, 腹腔内投与グルコース負荷試験およびインスリン負荷試験を行った. その結果を以下に示す.

● 体重

C57BL/6 系雄性マウスに, コントロール飼料または高脂肪食飼料をそれぞれ 10 週間摂取させ, 各群の体重測定を毎週行った (Fig. 3-a). その結果, コントロール飼料を与えたマウスに比べて, 高脂肪食を与えたマウスの体重は高脂肪食開始 1 週目から増加傾向を示した. 各食摂取開始後 10 週目の平均体重は, コントロール飼料を与えたマウス, 高脂肪食を与えたマウスそれぞれ 30.3 ± 0.3 g, 38.7 ± 3.2 g となり, 高脂肪食を与えたマウスの体重は約 40 g に至ったため, 肥満とみなしスフィンゴ脂質の解析を行った.

● 空腹時血糖値

10 週間, コントロール飼料または高脂肪食飼料を摂取させた C57BL/6 系雄性マウスを 16 時間以上絶食させ, 各群の空腹時血糖値の測定を行った (Fig. 3-b). その結果, 各食摂取開始後 10 週目の平均空腹時血糖値はコントロール飼料を与えたマウス, 高脂肪食を与えたマウスでそれぞれ 85.3 ± 13 mg/dL, 95.3 ± 18 mg/dL となり, 大きな差は見られなかった. これは, 高脂肪食を与えたマウスが前糖尿病状態であったため, コントロール飼料を与えたマウスと測定値に大きな変化がなかったと考えられる.

● 非絶食時血糖値

コントロール飼料または高脂肪食飼料を 10 週間摂取させた後, 各群の非絶食時血糖値の測定を行った (Fig. 3-c). その結果, 各食摂取開始後 10 週目の平均非絶食時血糖値は, コントロール飼料を与えたマウス, 高脂肪食を与えたマウスそれぞれ 158 ± 25 mg/dL, 171 ± 31 mg/dL となり, 大きな差は見られなかった. これは, 高脂肪食を与えたマウスが前糖尿病状態であったため, コントロール飼料を与えたマウスと測定値に大きな変化がなかったと考えられる.

● グルコース負荷試験 (Intraperitoneal Glucose Tolerance Test : IPGTT)

C57BL/6 系雄性マウスに, 10 週間, コントロー

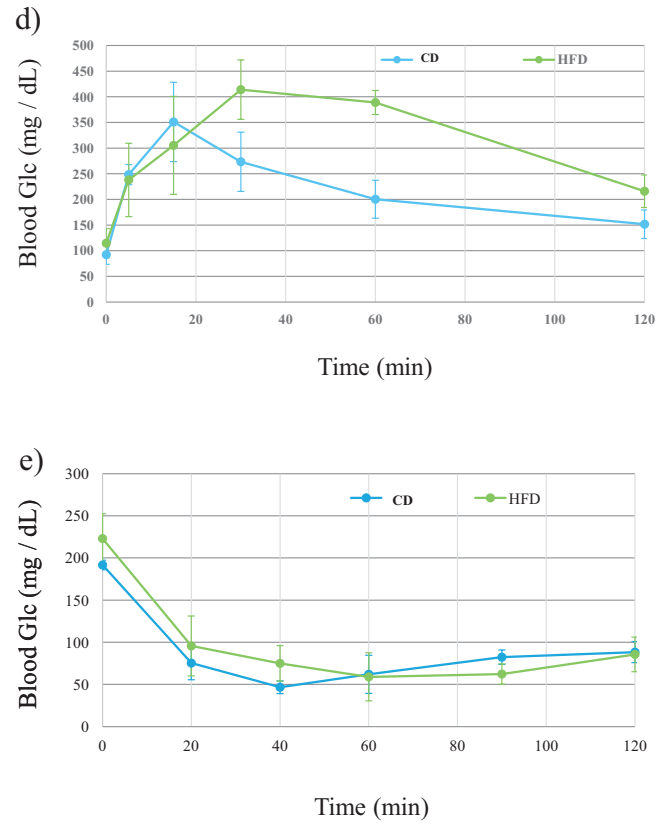
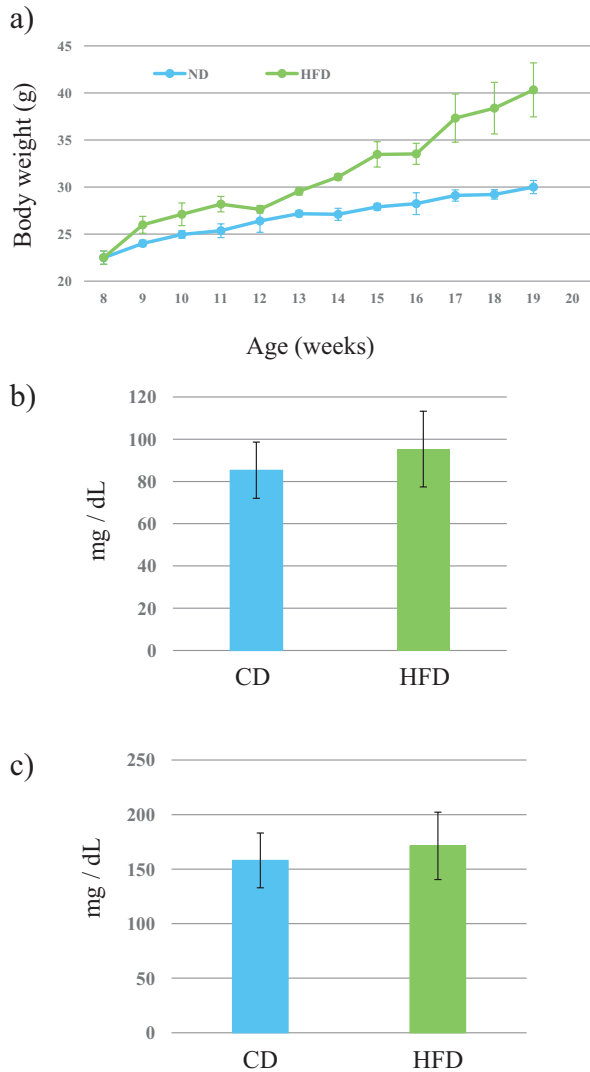


Fig. 3. Phenotype of HFD induced obesity mice.

- a) Body weight
- b) Fasted blood Glucose
- c) Fed blood Glucose
- d) Intrapерitoneal Glucose Tolerance Test (IPGTT)
- e) Intrapерitoneal Insulin Tolerance Test (IPITT)
- control diet (CD), high fat diet (HFD)

ル飼料または高脂肪食飼料をそれぞれ摂取させたマウス群にグルコースの腹腔内注射を行い、グルコース負荷試験を行った (Fig. 3-d). その結果、コントロール飼料を与えたマウスの血糖値はグルコース投与から約 15 分後に 351 ± 77 mg/dL に上昇し、その後、時間経過と共に低下し、グルコース投与から約 120 分後に正常値に戻った。高脂肪食を与えたマウスは約 30 分後に、 414 ± 58 mg/dL にまで上昇し、グルコース投与から約 60 分後でも、 389 ± 23 mg/dL と高い値を維持していた。その後、低下した。しかし、グルコース投与から約 120 分後においても、高脂肪食を与えたマウスはコントロール飼料を与えたマウスより高い血糖値を示した。従って、高脂肪食を 10 週間摂取させたマウスの耐糖能は低下していることが示された。

- インスリン負荷試験 (Intrapерitoneal Insulin Tolerance Test : IPITT)
C57BL/6 系雄性マウスに、10 週間、コントロー

ル飼料または高脂肪食飼料をそれぞれ摂取させた後、各群にインスリンの腹腔内注射を行い、インスリン負荷試験を行った (Fig. 3-e). その結果、インスリン腹腔内投与後の血糖値の降下率は両群でほぼ同等であり、高脂肪食負荷によってインスリンの感受性に大きな影響は出ていなかった。これらの結果は、今回の 10 週間高脂肪食を与えたマウスは前糖尿病段階であると示唆される。

2. 高脂肪食負荷によるインスリン感受性組織のスフィンゴ糖脂質変化 (TLC による解析)

10 週間、高脂肪食を与えた C57BL/6 系雄性マウスの、各インスリン感受性組織のスフィンゴ脂質の TLC 解析を行った。その結果を以下に示す。

●肝臓

肝臓において、発現がみられた酸性スフィンゴ糖脂質は GM3, GM2 (Fig. 4-a), 中性スフィンゴ糖脂質はグルコシルセラミドであった (Fig. 4-b). 高脂肪食を与えたマウスの GM3, GM2, グルコシ

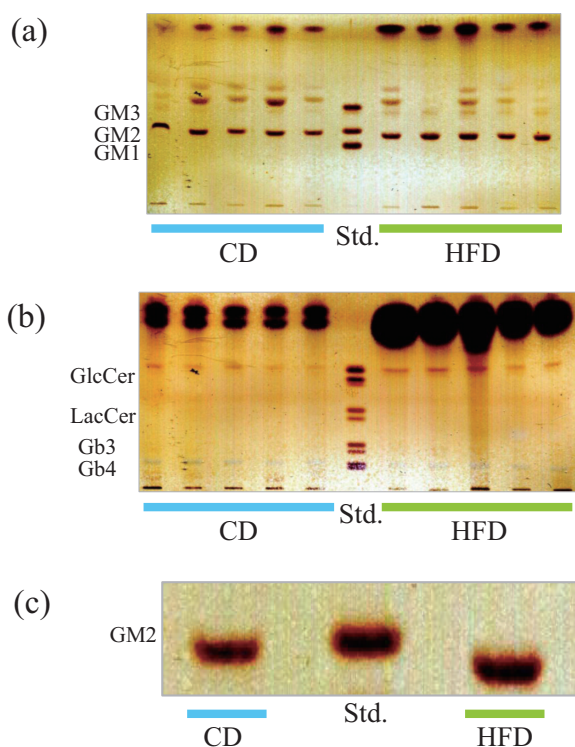


Fig. 4. Glycosphingolipid expression patterns in the livers of HFD-fed mice (C57BL/6).

The acidic (a) and neutral (b) lipids were separated on HPTLC plates and visualized with orcinol-sulfuric reagents. (c) is the enlarged view of the GM2 bands.

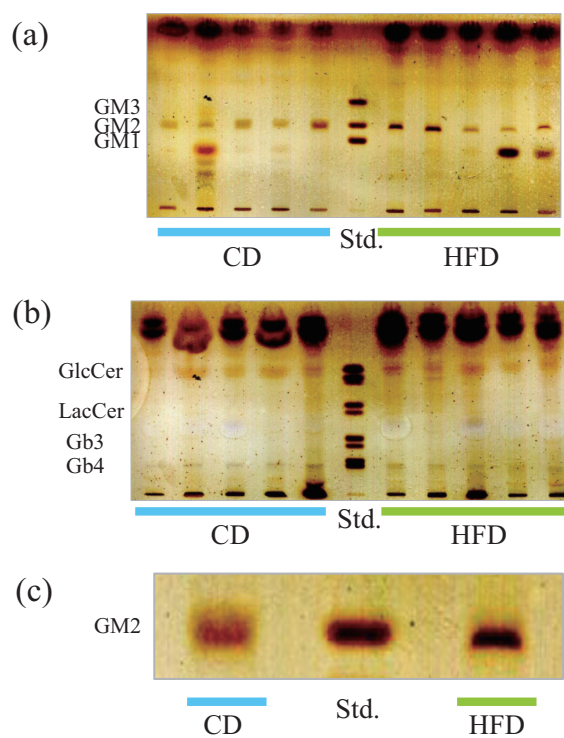


Fig. 5. Glycosphingolipid expression patterns in the serums of HFD-fed mice (C57BL/6).

The acidic (a) and neutral (b) lipids were separated on HPTLC plates and visualized with orcinol-sulfuric reagents. (c) is the enlarged view of the GM2 bands.

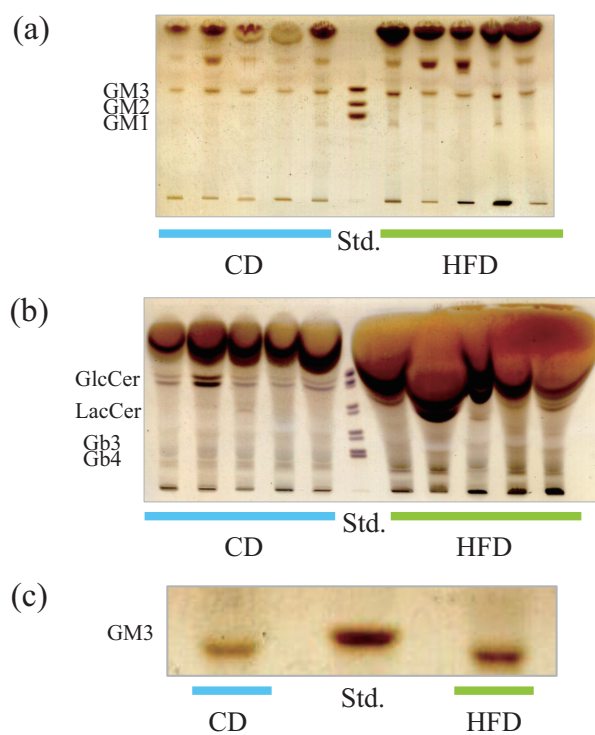


Fig. 6. Glycosphingolipid expression patterns in the skeletal muscles of HFD-fed mice (C57BL/6).

The acidic (a) and neutral (b) lipids were separated on HPTLC plates and visualized with orcinol-sulfuric reagents. (c) is the enlarged view of the GM3 bands position in (a).

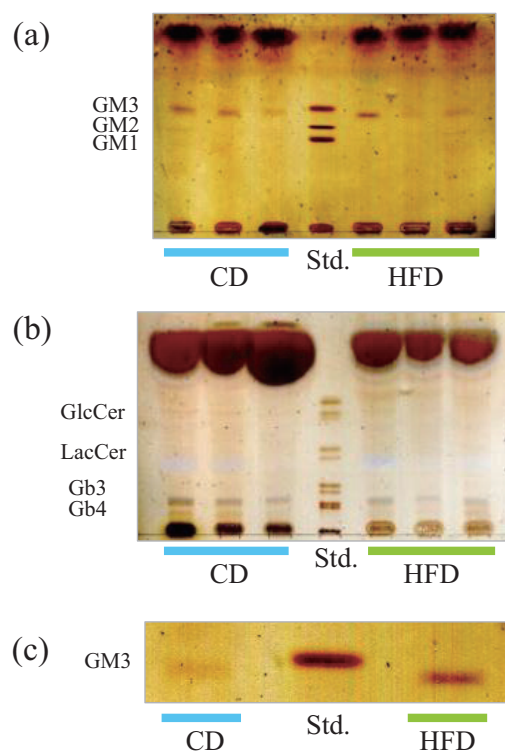


Fig. 7. Glycosphingolipid expression patterns in the adipose tissues of HFD-fed mice (C57BL/6).

The acidic (a) and neutral (b) lipids were separated on HPTLC plates and visualized with orcinol-sulfuric reagents. (c) is the enlarged view of the GM3 bands.

ルセラミドの発現量は、コントロール飼料を与えたマウスに比べて多い傾向にあった。また、コントロール飼料を与えたマウスに比べて、高脂肪食を与えたマウスのGM2のTLC上での移動度は明らかに低い傾向にあった (Fig. 4-c)。

●血 清

血清中において、発現がみられた酸性スフィンゴ糖脂質はGM2 (Fig. 5-a), 中性スフィンゴ糖脂質はグルコシルセラミド, Gb4であった (Fig. 5-b)。高脂肪食与えたマウスのGM2, グルコシルセラミドの発現量は、コントロール飼料を与えたマウスに比べて多い傾向にあり、一方でGb4の発現量に大きな差はなかった。また、コントロール飼料を与えたマウスに比べ、高脂肪食を与えたマウスのGM2のTLC上での移動度は低い傾向にあった (Fig. 5-c)。

●筋 肉

筋肉において、発現がみられた酸性スフィンゴ糖脂質はGM3 (Fig. 6-a), 中性スフィンゴ糖脂質はグルコシルセラミド, Gb3, Gb4であった (Fig. 6-b)。また、コントロール飼料を与えたマウスに比べて、高脂肪食を与えたマウスに発現したGM3の

TLC上での移動度は低い傾向にあった (Fig. 6-c)。

●脂肪組織

脂肪組織において、発現がみられた主な酸性スフィンゴ糖脂質はGM3 (Fig. 7-a), 中性スフィンゴ糖脂質はGb4であった (Fig. 7-b)。また、コントロール飼料を与えたマウスに比べて、高脂肪食を与えたマウスに発現したGM3のTLC上での移動度は低い傾向にあった (Fig. 7-c)。

●膵 臓

膵臓においては膵体頭部 (Fig. 8) と膵体尾部 (Fig. 9) に分けて解析を行った。

膵体頭部において、発現がみられた酸性スフィンゴ糖脂質はGM1, 中性スフィンゴ糖脂質はグルコシルセラミド, スフィンゴ脂質のスフィンゴミエリンであった (Fig. 8-a, b)。また、コントロール飼料を与えたマウスに比べて、高脂肪食を与えたマウスに発現したGM1のTLC上での移動度は低い傾向にあった (Fig. 8-c)。

膵体尾部において、発現がみられた酸性スフィンゴ糖脂質はGM1 (Fig. 9-a), スフィンゴ脂質はスフィンゴミエリンであった (Fig. 9-b)。コントロール飼料を与えたマウスに比べて、高脂肪食を

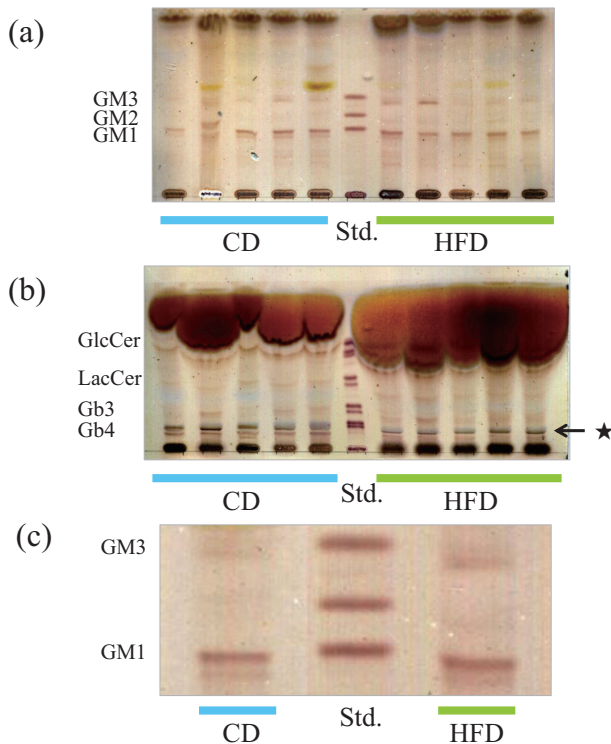


Fig. 8. Glycosphingolipid expression patterns in the head of pancreases of HFD-fed mice (C57BL/6).

The acidic (a) and neutral (b) lipids were separated on HPTLC plates and visualized with orcinol-sulfuric reagents. (c) is the enlarged view of the GM1 bands.

★indicate sphingomyelin

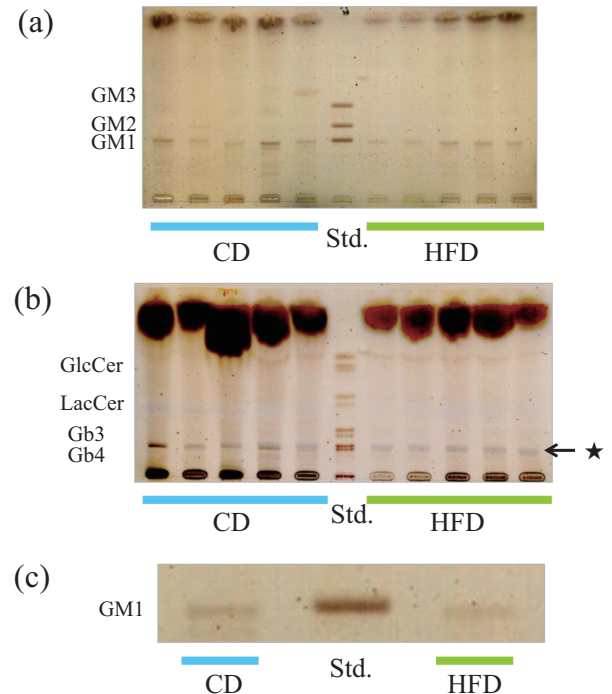


Fig. 9. Glycosphingolipid expression patterns in the tail of pancreases of HFD-fed mice (C57BL/6).

The acidic (a) and neutral (b) lipids were separated on HPTLC plates and visualized with orcinol-sulfuric reagents. (c) is the enlarged view of the GM1 bands.

★indicate sphingomyelin

与えたマウスのスフィンゴミエリンの発現量は少ない傾向にあった。

膵臓の膵体頭部および膵体尾部ではGM1が発現し、その発現量に、両者の間で大きな差はなかった (Fig. 8-a, Fig. 9-a)。

3. LC-MS/MSによるスフィンゴ糖脂質のアシル鎖の構造解析

高脂肪食負荷によって、インスリン感受性組織のスフィンゴ糖脂質のTLC上での移動度に変化が生じたことから、高脂肪食負荷によるスフィンゴ糖脂質のセラミド部分の構造変化が予想された (Fig. 10)。これまでに、当研究室では進行した肥満・糖尿病患者の血清を対象に、LC-MS/MSを用

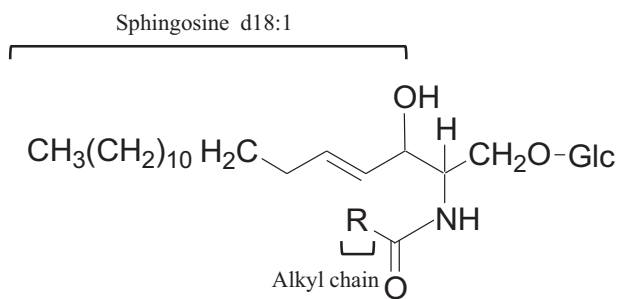


Fig. 10. Structure of GlcCer.
R = Alkyl chain

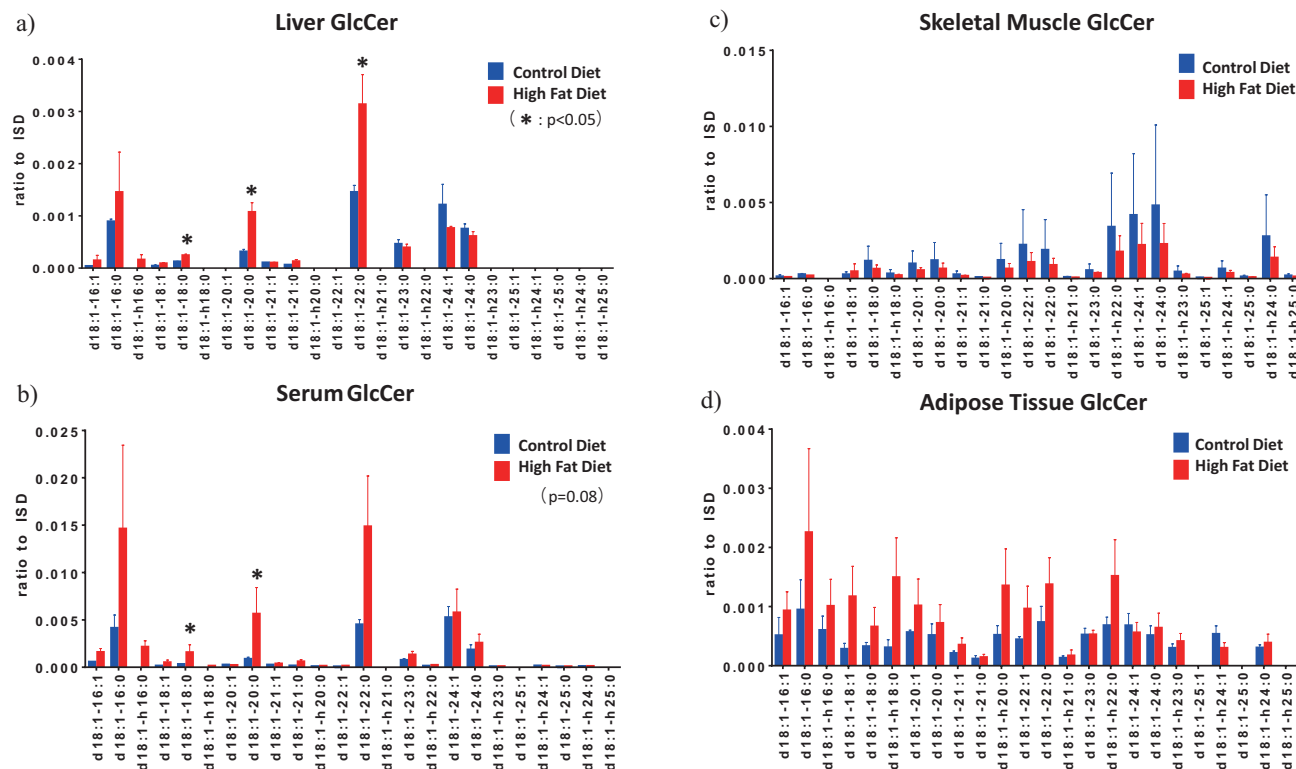


Fig. 11. Effect of HFD on the structures of GlcCer molecular species in the adipose tissue, serum, liver, skeletal muscle. Analysis of GlcCer by LC-MS/MS was performed as described in materials and methods.

いたスフィンゴ糖脂質の構造解析が行われている。その結果によると、GM3のセラミド構造中のアシル鎖について、進行した肥満・糖尿病時には、C18よりも長い極長鎖アシル鎖の2位が水酸化修飾された分子種が増加することが分かっている。⁵⁾そこで、より肥満かつ前糖尿病状態において、スフィンゴ糖脂質のアシル鎖にどのような構造変化が現れるのかを、高脂肪食を10週間負荷させたマウスを用いて解析を試みた。LC-MS/MSを用いて、肝臓、血清、筋肉、脂肪組織の各組織において、TLC上で移動度が低下した酸性スフィンゴ糖脂質の共通の前駆体にあたるグルコシルセラミドのセラミド部分の構造変化の解析を行った (Fig. 10)。d18:1のスフィンゴシンを持つグルコシルセラミド中のアシル鎖長 (16:0~24:0)、アシル鎖の2位の水酸化修飾 (h18:0, h24:0 など) と、二重結合の導入 (18:1, 24:1 など) について構造解析を行った。その臓器ごとの解析結果を以下に示す。

●肝臓

LC-MS/MSを用いて肝臓のグルコシルセラミド中のアシル鎖の構造解析を行った結果、高脂肪食を与えたマウスで増加が見られた分子種は、16:0, 16:1, 18:0, 20:0, 22:0であった (Fig. 11-a)。この、肥満かつ前糖尿病状態のマウス肝臓で、特に見ら

れた極長鎖脂肪酸 22:0 の分子種が増加する結果は、進行した肥満・糖尿病患者の血清で見られたセラミド構造の変化とよく類似する。⁵⁾

●血清

LC-MS/MS を用いて血清のグルコシルセラミド中のアシル鎖の構造解析を行った結果、高脂肪食を与えたマウスで増加が見られた分子種は、16:0, 16:1, 18:0, 20:0, 22:0, 23:0, 24:0, 24:1 であった (Fig. 11-b). これまで、肥満・糖尿病患者の血清には GM3 の発現が報告されている。⁵⁾ 今回、高脂肪食を負荷させたマウスに発現したグルコシルセラミドと、肥満・糖尿病患者の血清に発現した GM3 のアシル鎖の構造解析の結果を比較した結果、共通して存在が確認された分子種は、16:0, 16:1, h16:1, 18:1, h18:0, 20:0, 20:1, h20:0, 21:0, 21:1, h21:0, 22:0, 22:1, h22:0, 23:0, h23:0, 24:0, h24:0, 24:1, h24:1 であった (Fig. 11-b).⁵⁾ また、マウスの血清で得られた構造変化や分子種の分布パターン (Fig. 11-b) は、肝臓で見られたパターン (Fig. 11-a) とほぼ一致した。

今回用いた、前糖尿病段階のマウスの血清 (Fig. 11-b) と、糖尿病ヒト血清⁵⁾ で、共通して増加傾向が見られた分子種は 20:0, 22:0, 24:0, 24:1 であった。

●筋肉

LC-MS/MS を用いて筋肉のグルコシルセラミド中のアシル鎖の構造解析を行った結果、16:1~25:0 の長さのアシル鎖を持った分子種が検出された (Fig. 11-c). 全体的にほとんどの分子種が高脂肪食を与えたマウスで減少する傾向にあり、水酸化した分子種、二重結合を持つ分子種も共に減少していた。

●脂肪組織

LC-MS/MS を用いて脂肪組織のグルコシルセラミド中のアシル鎖の構造解析を行った結果、全体的に見て検出されたほとんどの分子種が高脂肪食を与えたマウスで増加する傾向にあった (Fig. 11-d). 水酸化した分子種については 16:0, 18:0, 20:0, 21:0, 22:0 の長さのアシル鎖に水酸化修飾された分子種が検出され、高脂肪食を与えたマウスで増加傾向を示した。また、二重結合を持つ分子種についても 16:1, 18:1, 20:1, 21:1, 22:1 の分子種が、高脂肪食を与えたマウスで増加傾向を示した。

4. LC-MS/MS によるグルコシルセラミド総量の相対定量

TLC によるスフィンゴ糖脂質の発現量の解析では、定量的な解析ができなかったため、LC-MS/MS を用いて発現量の相対定量を行った。その結果、肝

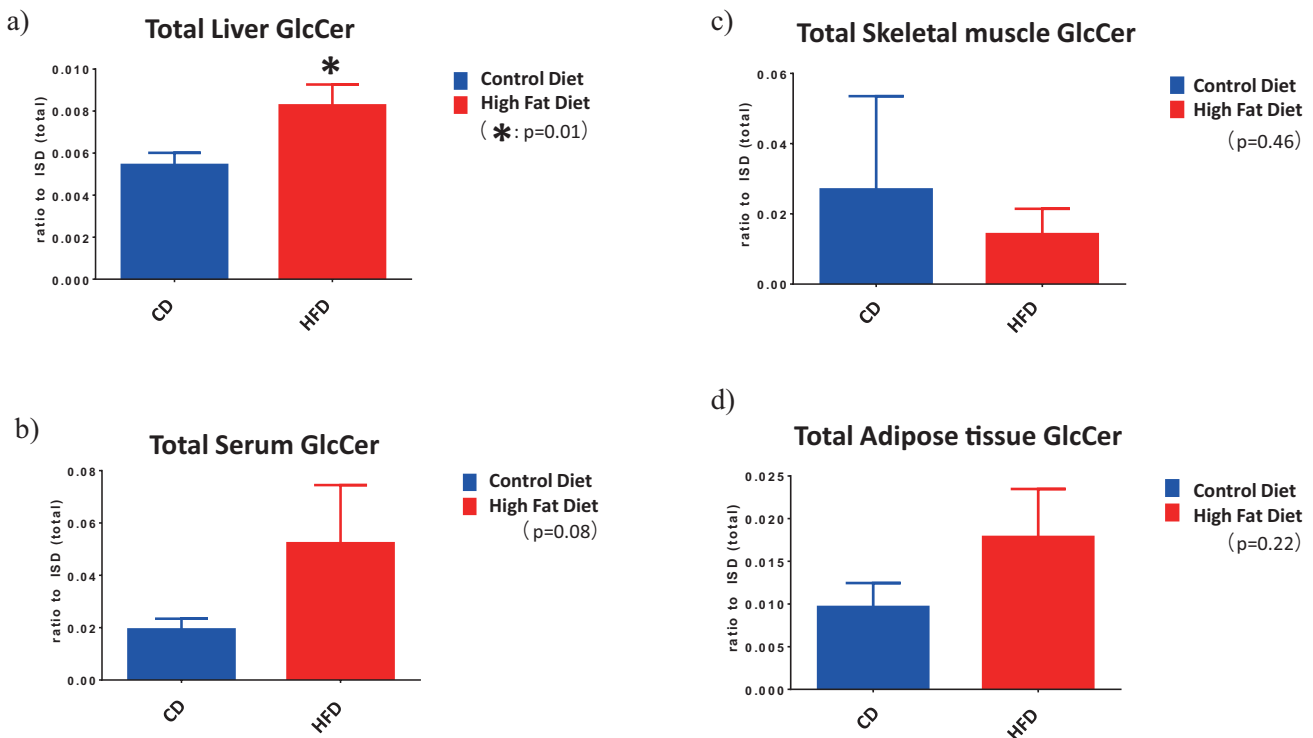


Fig. 12. Quantitative analysis of GlcCer in insulin target organ of HFD-induced obesity mice. Total GlcCer level was increased in the a) liver, b) serum, d) adipose tissue of HFD-fed mice.

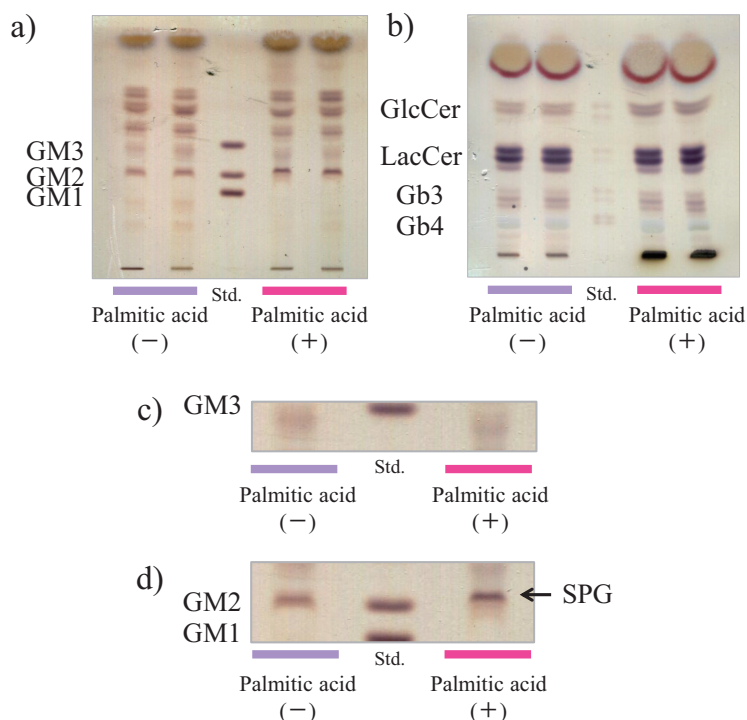


Fig. 13. Glycosphingolipid expression patterns in the HepG2 cell. Glycosphingolipids were obtained from the HepG2 cell of control and palmitate treated cell.

The acidic (a) and neutral (b) lipids were separated on HPTLC plates and visualized with orcinol-sulfuric reagents. (c) is the enlarged view of the GM3 bands. (d) is the enlarged view of Sialyl Palagloboside (SPG).

臓 (Fig. 12-a), 血清 (Fig. 12-b), 脂肪組織 (Fig. 12-d) のグルコシルセラミドの発現量は, コントロール飼料を与えたマウスに比べて, 高脂肪食を与えたマウスの方が多量傾向にあった. 一方で, 筋肉のグルコシルセラミドの発現量は, コントロール飼料を与えたマウスに比べて, 高脂肪食を与えたマウスの方が少ない傾向にあった (Fig. 12-c).

5. パルミチン酸処理による HepG2 細胞のスフィンゴ糖脂質変化

パルミチン酸は, 細胞レベルでインスリン抵抗性を起こす代表的な飽和脂肪酸である. 今回, パルミチン酸を用いて, 高脂肪食を模倣した条件下で培養した HepG2 細胞において, *in vitro* でも高脂肪食を与えたマウスの肝臓組織と同様に, TLC 上のスフィンゴ糖脂質の移動度が低下するかどうか確認した. 「実験方法」に記したように, パルミチン酸処理条件下で培養した HepG2 細胞のスフィンゴ糖脂質解析を行った. HepG2 細胞で発現が見られた酸性スフィンゴ糖脂質は, シアリルパラグロボシド (SPG: Sialyl Paragloboside) (Fig. 13-a, d), 中性スフィンゴ糖脂質はグルコシルセラミド, ラクトシルセラミド, Gb3, スフィンゴ脂質のスフィンゴミエリンであった (Fig. 13-b). 移動度の変化を

比較した結果, TLC 上で確認された GM3 の移動度はやや低い傾向にあり (Fig. 13-c), 高脂肪食を与えたマウス肝臓と同様の傾向が得られた. また, パルミチン酸処理でグルコシルセラミドの増加傾向が見られた.

考 察

今回, 肥満初期に伴うスフィンゴ糖脂質の変化を明らかにする目的で, 高脂肪食を与えたマウスのインスリン感受性組織のスフィンゴ糖脂質について TLC 解析および LC-MS/MS を行い, 発現量の増減および分子種変化を調べた. 高脂肪食負荷マウスは, 高脂肪食摂取開始 10 週目に体重が約 40 g に達したこと (Fig. 3-a), グルコース負荷試験時, コントロール飼料を与えたマウスに比べて, 高脂肪食を与えたマウスの血糖値の最大値が高いこと, 下がり幅が緩やかで耐糖能が低下していること (Fig. 3-d) から, 前糖尿病状態であることが考えられる. そのとき, LC-MS/MS を用いた解析によって, 高脂肪食を与えたマウスの筋肉以外のインスリン感受性組織に発現する, 中性スフィンゴ糖脂質グルコシルセラミド量は増加する傾向が見られた (Fig. 12). 肥

満に伴って肝臓、脂肪組織では、グルコシルセラミドの発現量が増加した一方、筋肉にはその傾向が見られなかったことから、肥満時（前糖尿病時）のスフィンゴ糖脂質の量は、それぞれの臓器に特徴的な変動を示すことが分かった。

TLCによるHepG2細胞のスフィンゴ糖脂質の解析においては、パルミチン酸処理によってHepG2細胞のグルコシルセラミドが増加傾向を示した（Fig. 11-b）。また、HepG2細胞では炎症性サイトカインによるスフィンゴ糖脂質の発現量変化は見られなかった（data not shown）。これらのことから、高脂肪食負荷による肝臓でのスフィンゴ糖脂質グルコシルセラミドの増加の原因が、飽和脂肪酸であるパルミチン酸の過剰な供給であることが考えられる。

当研究室では、肥満糖尿病モデル動物（ob/obマウス、Zucker fa/faラット）の脂肪組織では、顕著にGM3の発現が上昇するという結果を得ており、インスリン抵抗性にGM3の発現上昇が関与している（Fig. 2）可能性を示している。¹²⁾今回用いた前糖尿病マウスの脂肪組織（Fig. 7-a, b）では、これまでの報告¹²⁾と異なり、脂肪組織のGM3の増加が確認できなかったが、スフィンゴ糖脂質のアシル鎖の変化が確認された。今回、高脂肪食を与えたマウスの脂肪組織でGM3の発現量増加が確認できなかったのは、前糖尿病段階であったためと考える。肥満から糖尿病発症の過程で、まず初めにスフィンゴ糖脂質のセラミド部分のアシル鎖構造変化が起き、その後、中性・酸性スフィンゴ糖脂質の増加が起こる可能性が考えられる。

高脂肪食を与えたマウスの肝臓（Fig. 4-c）、血清（Fig. 5-c）ではGM2、筋肉（Fig. 6-c）、脂肪組織（Fig. 7-c）ではGM3、臍体頭部（Fig. 8-c）ではGM1のTLC上での移動度が低い傾向にあった。このTLC上での酸性スフィンゴ糖脂質の移動度低下の原因は、LC-MS/MSによるグルコシルセラミドの解析の結果（Fig. 11）から短いアシル鎖、水酸化したアシル鎖、不飽和アシル鎖を持った分子種の増加であると考えられる。スフィンゴ糖脂質は、セラミドに糖の段階的な酵素付加によって多様な分子が生合成される。グルコシルセラミド、ラクトシルセラミドを経て、各シリーズへと生合成される（Fig. 1）。今回、高脂肪食によってTLC上での移動度が変化した酸性スフィンゴ糖脂質はガングリオシドシリーズに属しており、LC-

MS/MSによるスフィンゴ糖脂質のアシル鎖の解析を行ったグルコシルセラミドを前駆体として生合成される。今回、LC-MS/MSによるスフィンゴ糖脂質の解析で、高脂肪食負荷によって、短鎖、水酸化もしくは二重結合を有するアシル鎖を含んだグルコシルセラミド分子種の増加が確認されたが、酸性スフィンゴ糖脂質はグルコシルセラミドから合成されるため、同様のアシル鎖変化が起こっていると考えられる。これがTLC上での移動度変化の原因であると考えられるが、今後、各酸性スフィンゴ糖脂質のLC-MS/MSによる詳細な構造解析・定量が必要である。水酸基や二重結合を持つスフィンゴ糖脂質分子種の生合成機構および機能は不明な点が多い。しかし、水酸基に関してはいくつもの示唆的報告がある。酵母においてスフィンゴ糖脂質のセラミドの水酸化の変化は、膜流動性、膜タンパク質のターンオーバーに影響することが報告されている。⁶⁾また、水酸化セラミドの合成に関わる酵素のひとつ、脂肪酸 α 位水酸化酵素FA2Hのノックアウトマウスでは、加齢とともにミエリン鞘の変性が見られる。⁷⁾これらのことから、今回見いだした水酸化されたセラミドを持つスフィンゴ糖脂質分子種の増加は、細胞膜の性質、膜タンパク質の機能に大きな影響を与え、インスリンシグナルを含む様々な細胞機能変化を引き起こすことが推測される。一方、糖尿病ヒト血清で見られた、酸性スフィンゴ糖脂質で検出されたスフィンゴ糖脂質のアシル鎖にも、今回見いだした高脂肪食負荷マウス同様の変化が検出されている。⁵⁾以上のことから、肥満に伴うスフィンゴ糖脂質のアシル鎖の水酸基や二重結合の導入は、糖尿病の増悪因子となる可能性がある。

今回、脂肪組織、血清、肝臓で見いだした肥満に伴うもうひとつの変化は、グルコシルセラミド16:0の分子種の発現量の増加であった（Fig. 11-a, b, d）。高脂肪食負荷によって、16:0セラミドの合成酵素であるセラミドシンターゼ6の発現量が選択的に増加することが報告されており、⁸⁾今回、各臓器で16:0グルコシルセラミドが増加した原因は、このセラミドシンターゼ6の発現増加と、セラミド合成酵素の基質であるパルミチン酸の供給が増加したためであると考えられる。セラミドシンターゼ6ノックアウトマウスは高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性を起こしにくいこと⁸⁾や、また、セラミドシンターゼ2のヘテロノックアウト

マウスは、長鎖アシル鎖の合成が減少し、代償的に 16:0 セラミドが増加し、重篤な肝障害を起こすという報告がある。⁹⁾ 以上のことより、16:0 のセラミドからつくられる各スフィンゴ糖脂質の分子種が、インスリン抵抗性の原因のひとつになっている可能性がある。

さらに今後は、今回見いだしたスフィンゴ糖脂質の構造変化により、インスリンシグナルにどのような影響が見られるかどうかを検討していき、スフィンゴ糖脂質とインスリンシグナルの関係性を明らかにする。

また、膵臓においても高脂肪食負荷によって変化が見られたことから、インスリン分泌能にもスフィンゴ糖脂質が関与している可能性が考えられる。上記各組織に加え、膵臓機能とスフィンゴ糖脂質変化の関係性を明らかにすることによって、糖尿病とスフィンゴ糖脂質の関係性の全体像が明らかになると考えられる。

また、今回の TLC 解析の結果から、スフィンゴ糖脂質の発現分子種・組成比、高脂肪食負荷時の変動は肝臓と血清でほぼ同じであった。肝特異的グルコシルセラミド合成酵素ノックアウトマウスの肝臓では、グルコシルセラミド以降のスフィンゴ糖脂質の発現がほとんど消失するが、附随して、血清のグルコシルセラミド以降のスフィンゴ糖脂質もほとんど消失することが報告されている。¹⁰⁾ この報告¹⁰⁾ は、今回見いだしたマウス肝臓と血清中のスフィンゴ糖脂質の発現分子種およびその発現変化は相関するという報告を支持する。このことから、血清のスフィンゴ糖脂質は肝臓から主として分泌されていると考えられる。したがって、血清のスフィンゴ糖脂質を測定することで、肝臓のスフィンゴ糖脂質変化を把握することができると考えられる。インスリン抵抗性に深く関与する分子種を同定することができれば、血清中のスフィンゴ糖脂質の測定は糖尿病の早期診断に応用できる可能性もある。

REFERENCES

- 1) Inokuchi, J., *Seikagaku*, **87**, 560–572 (2015).
- 2) Inokuchi, J., *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.*, **87**(5), 179–198 (2011).
- 3) Tagami, S., Inokuchi, J., Kabayama, K., Yoshimura, H., Kitamura, F., Uemura, S., Ogawa, C., Ishii, A., Saito, M., Ohtsuka, Y., Sakaue, S., and Igarashi, Y., *J. Biol. Chem.*, **277**, 3085–3092 (2002).
- 4) Yamashita, T., Hashiramoto, A., Haluzik, M., Beck, S., Norton, A., Kono, M., Tsuji, S., Daniotti, L. J., Werth, N., Sandhoff, R., Sandhoff, K., and Proia L. R., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 3445–3449 (2003).
- 5) Veillon, L., Go, S., Matsuyama, W., Suzuki, A., Nagasaki, M., Yatomi, Y., and Inokuchi, J., *PLOS ONE*, **10**, 1371 / journal.pone.0129645 (2015).
- 6) Uemura, S., Shishido, F., Tani, M., Mochizuki, T., Abe, F., and Inokuchi, J., *J. Lipid Res.*, **55**, 1343–1356 (2014).
- 7) Mizutani, Y., Kihara, A., Chiba, H., Tojo, H., and Igarashi, Y., *J. Lipid Res.*, **49**, 2356–2364 (2008).
- 8) Turpin, M. S., Nicholls, T. H., Willmes, M. D., Mourier, A., Brodesser, S., Wunderlich, M. C., Mauer, J., Xu, E., Hammerschmidt, P., Bronneke, S. H., Trifunovic, A., Losasso, G., Wunderlich, T. F., Kornfeld, W.-J., Bluher, M., Kronke, M., and Bruning, C. J., *Cell Metab.*, **20**, 678–686 (2014).
- 9) Raichur, S., Wang, T. S., Chan, W. P., Li, Y., Ching, J., Chaurasia, B., Dogra, S., Ohman, K. M., Takeda, K., Sugii, Shigeki, Pewzner-Jung, Y., Futerman, H. A. H., and Summers, A. S., *Cell Metab.*, **20**, 687–695 (2014).
- 10) Jennemann, R., Rothermel, U., Wang, S., Sandhoff, R., Kaden, S., Out, R., van Berkel, T.J., Aerts, J.M., Ghauharali, K., Sticht, C., and Grone, H.J., *Hepatopathy*, **51**(5), 1799–1809 (2010).