

令和元年6月25日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08271

研究課題名(和文) 生体内因子・細胞間相互作用を介した小胞体ストレスと生活習慣病形成機構解明と創薬

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms and pharmacological target for metabolic syndrome by analyzing endoplasmic reticulum stress, which is mediated through physiological factor and cell-to-cell communication

研究代表者

細井 徹 (Hosoi, Toru)

広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・准教授

研究者番号：40379889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肥満は糖尿病などの生活習慣病発症に密接に関わることから、肥満の発症機構を解明することは、予防医学の観点からも重要な研究課題と考えられる。本研究では小胞体ストレスによる肥満・生活習慣病発症機構と創薬の解明を試みた。検討の結果、神経細胞膜の脂肪酸が飽和化することでレプチンシグナルが抑制される可能性が示された。また、グリア細胞が神経細胞におけるレプチンシグナルに影響を及ぼす可能性が示された。さらにフルルビプロフェンが糖尿病軽減効果を有する可能性が示され、フルルビプロフェンによる小胞体ストレス軽減が生活習慣病の治療に有効である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レプチンは、脂肪細胞から分泌され、体重を減少させるタンパク質である。一方、最近ではレプチン抵抗性が肥満の原因として問題視されている。従って、レプチン抵抗性の原因を明らかにすることは、肥満の治療に重要であると考えられる。そこで本研究では、レプチン抵抗性の形成機構の解明を目指して研究を行なった。その結果、神経細胞膜の脂肪酸の飽和化がレプチン抵抗性形成に関わる可能性が明らかになった。さらに私たちはグリア細胞が神経細胞におけるレプチンシグナルを制御する可能性も見いだした。これらの結果は、新しいレプチン抵抗性の形成機序の一端を示すもので、レプチン抵抗性による肥満発症機構解明に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Obesity is one of the risk factors of the metabolic syndrome, such as diabetes. Therefore, elucidation of the mechanisms of the obesity may be an important subject with respect to preventive medicine. In the present study, we investigated mechanisms of the endoplasmic reticulum (ER) stress-induced obesity and metabolic syndrome, and tried to elucidate the therapeutic target for the disease. In the present study, we found that saturation of neuronal membrane fatty acid may cause leptin resistance. Also, we found glial cell may play an important role in neuronal leptin signal transduction. Furthermore, we found possibility that flurbiprofen may attenuate diabetes, suggesting that reducing ER stress by flurbiprofen may be able to ameliorate metabolic syndrome.

研究分野：神経薬理学

キーワード：レプチン 小胞体ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満は糖尿病、高血圧といった生活習慣病の主要な危険因子であり、根本的治療薬の開発が必要とされている。レプチンは、脂肪細胞から分泌されるホルモンであり、主に脳(視床下部)に作用し、食欲の抑制とエネルギー消費の亢進作用により体重を減少させる。従ってレプチン発見当時は、レプチン自身が抗肥満薬となる可能性に期待が寄せられていた。しかしその後の研究の結果、肥満患者にレプチンを投与しても効果が認められないことが明らかになり、最近ではレプチン抵抗性が肥満の原因として問題視されるようになった。従って、レプチン抵抗性の原因を明らかにすることは、肥満の治療に不可欠であると考えられる。しかしながら、レプチン抵抗性の形成機構については未だ不明な点が多い。

一般にタンパク質の多くは小胞体で合成され、正しい形に折り畳まれることで正常な機能を獲得する。しかし細胞がストレス環境にさらされると、小胞体の働きに破綻を来し、折り畳み不完全なタンパク質が生み出される。このような状態を小胞体ストレスと呼ぶ。私達は現在までに、小胞体ストレスが肥満(レプチン抵抗性)の発症に関わる可能性を明らかにし、その候補治療薬の探索を行ってきた。しかし、どのような因子が原因となって小胞体ストレスが惹起され、どのような応答機構でそのストレスから回避できるかについては未だ不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

小胞体ストレスが肥満や生活習慣病の発症に関わる可能性は示されているが、その詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多く残されている。そこで本研究では、生体内因子及び細胞間コミュニケーションが、小胞体ストレスとレプチン抵抗性の制御に関わる可能性を明らかにすることを旨とする。さらに本研究では、生活習慣病治療候補薬の解明を旨とし、生活習慣病発症機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 細胞膜の脂肪酸の飽和化のレプチンシグナルへの影響の解析

細胞膜の脂肪酸の飽和化が小胞体ストレスと関わる可能性が示されている。そこで膜の脂肪酸が飽和化することで神経細胞におけるレプチンシグナルが抑制される可能性を検討した。Steraroyl-CoA desaturase1 (SCD1) は飽和脂肪酸をモノ不飽和脂肪酸にする酵素である。そこで SCD1 に着目し、膜の脂肪酸の飽和化とレプチンシグナルの関係を検討した。実験では、SCD1 活性を抑制させた細胞におけるレプチンシグナル活性を評価した。SCD1 阻害薬(CAY10566)の神経細胞への処理によりレプチンシグナルが抑制される可能性を検証した。さらに、SCD1 を特異的にノックダウンする siRNA によって SCD1 をノックダウンした時のレプチンシグナルへの影響を調べた。使用した神経細胞としては、Ob-Rb レプチン受容体を恒常的に発現させた SH-SY5Y-Ob-Rb 神経芽細胞腫を用いた。神経細胞におけるレプチンシグナルの活性化は、レプチンシグナルの下流で活性化されることが知られている STAT3 のリン酸化を指標に検討した。STAT3 のリン酸化は、STAT3 のリン酸化を特異的に認識できる抗体を用いた Western blotting 解析により検討した。

2) グリア細胞の神経機能(レプチンシグナル)に及ぼす影響の解明

レプチンは脳内において、主に神経細胞に作用し、抗肥満効果を示すと考えられている。しかし、グリア細胞の神経細胞におけるレプチンシグナルに及ぼす影響については不明な点が多く存在する。近年、ニューロン・グリアインターラクションが脳機能制御に重要な役割を果たす可能性が示唆され注目されている。そこで、本研究では、グリア細胞と神経細胞における細胞間相互作用がレプチンシグナル伝達にどのような影響を受けるかについて検討を試みた。実験ではグリア細胞の培養上清を SH-SY5Y-Ob-Rb 神経芽細胞腫に処置した後、レプチンシグナルへの影響を解析した。レプチンシグナルは STAT3 のリン酸化を指標に Western blotting 解析に

より検討した。神経細胞におけるレプチンシグナルのグリア細胞由来増強因子の一つの候補因子としてインターフェロン（IFN- γ ）が関わる可能性を検証した。

3) フルルビプロフェンの抗糖尿病効果の検討

今までの研究の結果、非ステロイド性抗炎症薬として知られているフルルビプロフェンが小胞体ストレス軽減効果を有する可能性を見いだしている。そこで、今回、フルルビプロフェンが膵臓における小胞体ストレスを軽減し、糖尿病に効果がある可能性を検証した。膵臓のモデル細胞としてはMIN6細胞を用いた。また、糖尿病モデル動物としては、db/dbマウスを使用した。小胞体ストレス関連因子の遺伝子解析に関してはRT-PCR法により検討した。インスリン量の解析は、ELISAアッセイにより検証した。

4. 研究成果

本研究では生体内因子や細胞間相互作用が神経細胞におけるレプチンシグナル伝達にどのような影響を示すか明らかにすることで、レプチン抵抗性の形成機構、さらには肥満の発症機構の解明を目指して検討を試みた。さらに、生活習慣病の一つである糖尿病の発症に対して、小胞体ストレス軽減薬が有効である可能性の検証を行なった。

検討の結果、SCD1の機能を阻害することで神経細胞膜の脂肪酸の飽和化を促進すると、レプチンシグナル伝達が抑制される可能性が示された。従って、パルミチン酸などの飽和脂肪酸の過剰摂取による神経細胞膜の脂肪酸の飽和化はレプチン抵抗性の形成さらには肥満の発症に繋がる可能性が示唆された。

また、細胞間相互作用に関しては、グリア細胞が神経細胞におけるレプチンシグナルに対して影響を及ぼしている可能性に着目し、検討を行なった。検討の結果、グリア細胞の培養上清を神経細胞に処置すると、レプチンによるSTAT3のリン酸化が増強することが明らかとなり、神経細胞におけるレプチンシグナル伝達が増強される可能性が示された。従って、グリア細胞の培養上清には神経細胞におけるレプチンシグナル増強因子が含まれる可能性が示された。そこで、そのグリア細胞由来増強因子の一つの可能性としてIFN- γ が関わる可能性を検討した。検討の結果、IFN- γ を神経細胞に処置すると、レプチンによるSTAT3のリン酸化が増加することが明らかになった。一方、IFN- γ の下流シグナルであるSTAT1のリン酸化に関してはレプチンによる影響を受けなかった。従って、グリア細胞由来のレプチンシグナル増強因子の一つの可能性として、IFN- γ が関わる可能性が示唆された。しかし、IFN- γ 以外にもグリア細胞由来のレプチンシグナル増強因子は存在する可能性があると考えられ、これらの因子の同定は今後の検討課題であると考えられた。

最後に、小胞体ストレス軽減薬の抗糖尿病効果の検討を試みた。検討の結果、MIN6細胞において、小胞体ストレス軽減薬であるフルルビプロフェンは、小胞体ストレスによるCHOPやCHOPの上流因子であるATF4の誘導を抑制させることが示された。さらに、db/db糖尿病モデルマウスにおいて、フルルビプロフェンは血糖値低下効果を示すと同時に血液中のインスリン量を増加させることが明らかになった。さらに、フルルビプロフェン処理はdb/dbマウスの膵臓において低下したインスリン量を回復させることも明らかになった。従って、フルルビプロフェンは糖尿病改善効果を示す可能性が示唆された。

以上より、本研究により生体内因子や細胞間相互作用に着目することで、レプチン抵抗性の形成機構の一端が明らかになった。また、小胞体ストレス改善薬であるフルルビプロフェンが、糖尿病軽減作用を示す可能性が示唆された。今後は、本研究結果に基づき、レプチン抵抗性やレプチン抵抗性・肥満に伴う生活習慣病のさらなる発症機構を明らかにすると同時に、これらの疾患に対する薬物を解明する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Hosoi T., Kimura H., Yamawaki Y., Mori K., and Ozawa K. (2019) Immobilization stress induces XBP1 splicing in the mouse brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 508: 516-520. 査読有

細井 徹, 小澤 孝一郎 (2018) 小胞体ストレスの肥満発症への関わりと創薬への可能性, *細胞* 50: 446-447. 査読無

細井 徹, トン ミナ, 小澤 孝一郎 (2018) 膜脂質組成の変化による小胞体ストレスと肥満の病態形成, *細胞* 50: 154-156. 査読無

Hosoi T., Nakashima M., and Ozawa K. (2018) Incorporation of the Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Spliced Form of XBP1 mRNA in the Exosomes. *Frontiers in Physiology* 9:1357. 査読有

Abd El-Hafeez A.A., Hosoi T., Nakatsu K., Thon M., Shimamoto A., Tahara H., and Ozawa K. (2018) TERT enhances the survival rate of human fibroblasts under endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, and lysosomal stresses. *Biotechnology Letters* 40: 915-922. 査読有

Thon M., Hosoi T., Chanbora C., and Ozawa K. (2017) Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 activity induced leptin resistance in neuronal cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 40: 1161-1164. 査読有

Vauthier¹ V., Roujeau¹ C., Chen¹ P., Sarkis C., Migrenne S., Hosoi T., Ozawa K., Rouillé Y., Foretz¹ M., Mallet J., Launay J., Magnan C., Jockers¹ R. and Dam J. (2017) Endospanin 1 affects oppositely body weight regulation and glucose homeostasis by differentially regulating central leptin signaling. *Molecular Metabolism* 6: 159-172. 査読有

[学会発表](計4件)

松浦 武典, 細井 徹, 松崎 周, 親泊 政一, 小澤 光一郎 (2019) フルルビプロフェンの小胞体ストレス軽減効果による糖尿病抑制の可能性, 第92回日本薬理学会年会 大阪市 2019年3月14~16日

松村 奈美, 細井 徹, 長谷川 由貴, 小澤 光一郎 (2018) 正常ならびに肥満病態時のグリブ細胞の神経細胞におけるレプチンシグナルへの役割, 第57回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 米子市 2018年11月10~11日

荻野 陽平, 田中 智洋, 金子 賢太郎, 園山 拓洋, Guo Tingting, 雲財 知, 小山 博之, 青谷 大介, 今枝 憲郎, 細井 徹, 中尾 一和 (2017) 脂肪酸によるレプチン応答性変化の系統的解析, 第38回日本肥満学会, 2017年10月7-8日, 大阪市

細井 徹, 桑村 彩加, 小澤 光一郎 (2017) レプチン抵抗性形成への 4-hydroxy-2-nonenal の関わり, 第90回日本薬理学会年会, 2017年3月15-17日, 長崎市