

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06549

研究課題名(和文) 小胞体ストレスによる肥満形成のエピジェネティックによる制御機構解明と創薬

研究課題名(英文) ER stress-induced leptin resistance and epigenetic mechanisms in regulating obesity

研究代表者

小澤 孝一郎 (Ozawa, Koichiro)

広島大学・医系科学研究科(薬)・教授

研究者番号：10211822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肥満は環境因子と遺伝的因子が関わる疾患であり、そのメカニズムについては不明な点が多く残されている。近年抗肥満因子であるレプチンが効きにくくなること、即ちレプチン抵抗性が肥満の主要な原因として問題視されている。ホモシステインは活性化メチル化サイクルによってアデノシンと共に生じ、DNAのエピジェネティックな制御に関わる。そこで本研究では、ホモシステインやアデノシンによるレプチン抵抗性の形成機構を検討した。検討の結果、本研究ではこれらの因子の神経細胞におけるレプチンシグナル下流に対する作用機構が明らかとなり、レプチン抵抗性の発症機構の一端を明らかにすることができたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は糖尿病などの生活習慣病発症の主な原因となっている。最近では肥満はCOVID19感染症による重症化のリスクを上昇させることが報告され問題視されている。したがって肥満発症機構・創薬標的を明らかにすることは、様々な肥満に付随する疾患の予防的観点からも重要と考えられる。本研究により、肥満に関わるレプチン抵抗性のメカニズムの一端が明らかになったことより、生活習慣病等の疾患の予防・治療薬創製に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Obesity is a disease involved in environmental and genetic factors, which mechanisms remain unknown. Recent years, the ineffectiveness of leptin, an anti-obesity factor, known as "leptin resistance" has been regarded as a major cause of obesity. Homocysteine is produced with adenosine by methylation cycle and is involved in the epigenetic regulation of DNA. Therefore, in this study, we investigated the mechanism of the formation of leptin resistance by homocysteine and adenosine. As a result of this study, we evaluated the mechanism of action of these factors on the downstream of leptin signals in neurons.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：レプチン

1. 研究開始当初の背景

肥満は環境因子と遺伝的因子が関わる疾患であり、そのメカニズムについては不明な点が多く残されている。近年抗肥満因子であるレプチンが効きにくくなること、即ちレプチン抵抗性が肥満の主要な要因として問題視されている。ホモシステインは活性化メチル化サイクルによってアデノシンと共に生じ、小胞体ストレスを誘導すると同時に DNA のエピジェネティックな制御にも関わる。そこで、本研究では、ホモシステイン・アデノシンが環境・遺伝的因子による肥満発症に関わる因子であることを検証し、その分子標的を解明することで生活習慣病治療薬開発に繋げることを目指す。

2. 研究の目的

肥満は糖尿病、高脂血症、高血圧、動脈硬化症といった生活習慣病の主要な危険因子である。ライフスタイルの欧米化に伴い、わが国の肥満者数は増加の一途をたどっており、肥満の発症・進展機構の解明と有力な治療法の開発は臨床医学の見地からもきわめて重要かつ急務の課題である。肥満遺伝子産物であるレプチンは、脂肪細胞から分泌されるホルモンであり、主に脳に作用し、強力な食欲の抑制とエネルギー消費の増大により体重を減少させる。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（レプチンが効かない→抗肥満作用が惹起されない→肥満）が肥満の原因として考えられるようになり、問題視されている（Nature Neuroscience 2005, 8:566-70）。レプチン抵抗性改善薬は、肥満及びそれに伴う生活習慣病の治療に有効であると考えられ、現在世界的に研究が行われている。現在、一部レプチン抵抗性のメカニズムが明らかにされているものの、未だレプチン抵抗性の原因の全容については不明な点が多く残されている。また、有効なレプチン抵抗性改善薬は見いだせていないのが現状である。そこで本研究では、レプチン抵抗性の生理的な発症メカニズムを究明し、レプチン抵抗性を標的とした有効な治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

細胞内の活性化メチル化サイクルにおいて、S-アデノシルホモシステインが酵素的に加水分解されるとホモシステインとアデノシンが生成される。そこで、神経細胞に、ホモシステインとアデノシンを加え、レプチンの存在下、STAT3 のリン酸化抗体を用いた Western blotting 解析を行った。また、ホモシステイン類縁物質であるメチオニンとシステインのレプチンシグナルに及ぼす影響についても検討した。神経細胞のモデルとしては、ヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞にレプチン受容体である Ob-Rb 遺伝子を恒常的に発現させた細胞を用いた。また、アデノシンと結合するタンパク質に関してアデノシン結合磁気性ビーズを用いて同定し、レプチン抵抗性に関わる新規標的タンパク質の解明を試みた。アデノシン結合磁気性ビーズと細胞抽出液をインキュベート後、SDS-PAGE・銀染色により標的タンパク質を探索し、候補タンパク質に関しては nanoLC-MS/MS 解析により同定した。さらに同定した遺伝子を、RNAi 法によりノックダウンした時のレプチンシグナルに及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

- (1) SH-SY5Y-0b-Rb 神経細胞へのアデノシン処置により、レプチンによる STAT3 のリン酸化が抑制され、アデノシンはレプチン抵抗性の形成に関わる可能性が確認された。そこでアデノシンによるレプチン抵抗性形成の分子機構を明らかにする目的で神経細胞においてアデノシンと結合する分子の同定を試みた。実験ではアデノシンと磁気性ビーズを結合させたアデノシンビーズを作成し、本ビーズに結合する因子の同定を試みた。結合候補因子を抽出し、銀染色で解析した結果、いくつかの陽性バンドが認められ、結合候補因子の存在が明らかになった。そこで本因子を nano LC-Ms/Ms 解析することで同定を試み、さらに本因子特異的な抗体による解析を試みた。その結果、nano LC-Ms/Ms 解析で同定された候補因子の特異的な抗体を用いた解析においても再現性が取れることが明らかになった。いくつかの結合候補因子の中で、アデノシンとの競合阻害実験でポジティブな結果が得られ、アデノシンとの結合特異性があると思われる因子を 1-2 個絞り込むことができた。さらにこれらの因子をノックダウンした細胞におけるレプチンシグナルについても検討したところ、ノックダウンによってレプチンシグナルに変化が認められ、これらの因子がアデノシンによるレプチン抵抗性に関わる因子である可能性が示唆された。本解析により、アデノシンによるレプチン抵抗性形成機構の分子機序の一端が解明できたと考えられる。
- (2) ホモシステインは活性化メチル化サイクルによって生じ、DNA のエピジェネティックな制御に関わる。そこで本研究では、ホモシステインとその代謝アミノ酸が神経細胞におけるレプチン抵抗性の形成に関わる可能性を検討した。検討の結果、ホモシステインは神経細胞において、レプチンの下流のシグナルである STAT3 のリン酸化を抑制することが明らかになった。一方で、ホモシステイン代謝によって生じるメチオニン処理によってはレプチンによる STAT3 のリン酸化の抑制はほとんど起きなかった。ホモシステイン代謝によって生じるシステイン処理によってはレプチンによる STAT3 のリン酸化の抑制は若干見られたが、ホモシステイン処理による抑制に比べて弱いものであった。従って、ホモシステインは他のアミノ酸とは異なり、特異的に、恐らく DNA メチル化にも影響し、脳の神経細胞におけるレプチン抵抗性の形成に関わる可能性が示唆された。

まとめ

今回、活性化メチル化サイクルにおいて生成され、エピジェネティックな制御にも関わるホモシステインやアデノシンの肥満への関わりについて検討した。本検討では、抗肥満因子として知られているレプチンに着目し、肥満で形成されるレプチン抵抗性へのホモシステインやアデノシンの関与について検討した。その結果、これらの因子が神経細胞においてレプチン抵抗性の形成に関わることとその分子機序の一端が明らかになったと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Bastawy EM, Ahmed RR, Abd El-Hafeez AA, Abd El-Hady FK, Hosoi T, Ozawa K, El-Ganzuri MA.	4. 巻 71
2. 論文標題 Grapefruit juice exerts anti-osteoporotic activities in a prednisolone-induced osteoporosis rat femoral fracture model, possibly via the RANKL/OPG axis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 769-783
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10616-019-00321-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hosoi T., Kuwamura A., Thon M., Tsuchio K., Abd El-Hafeez A.A., & Ozawa K.	4. 巻 316
2. 論文標題 Possible involvement of 4-hydroxy-2-nonenal in the pathogenesis of leptin resistance in obesity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology- Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C641-C648
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00080.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Abd El-Hafeez A.A., Khalifa H.O., Mahdy E.A.M., Sharma V., Hosoi T., Ghosh P., Ozawa K., Montano M.M., Fujimura T., Ibrahim A.R.N., Abdelhamid M.A.A., Pack S.P., Shouman S.A., and Kawamoto S.	4. 巻 71
2. 論文標題 Anticancer effect of nor-wogonin (5, 7, 8-trihydroxyflavone) on human triple-negative breast cancer cells via downregulation of TAK1, NF- B, and STAT3.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharmacological Reports	6. 最初と最後の頁 289-298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pharep.2019.01.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hosoi T., Kimura H., Yamawaki Y., Mori K., and Ozawa K.	4. 巻 508
2. 論文標題 Immobilization stress induces XBP1 splicing in the mouse brain.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 516-520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.11.167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hosoi T., Nakashima M., and Ozawa K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Incorporation of the Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Spliced Form of XBP1 mRNA in the Exosomes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2018.01357	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Arini Isnani Preninka, Toru Hosoi, Michiko Yoshii, Koichiro Ozawa
2. 発表標題 Possible involvement of homocysteine on neuronal leptin resistance in obesity
3. 学会等名 第136回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田 萌々恵, 松浦 武典, 細井 徹, 松崎 周, 杉山 礼隆, 児玉 尚士, 小澤 光一郎
2. 発表標題 ストレス負荷によるグリア細胞からのadenosine遊離と神経細胞におけるレプチン抵抗性形成機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松村 奈美, 細井 徹, 長谷川 由貴, 小澤 孝一郎
2. 発表標題 正常ならびに肥満病態時のグリア細胞の神経細胞におけるレプチンシグナルへの役割
3. 学会等名 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
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松浦 武典, 細井 徹, 松崎 周, 親泊 政一, 小澤 孝一郎
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城田 真輝, 細井 徹, 森 光平, 小澤 孝一郎
2. 発表標題 フルルビプロフェンのALDH2タンパク質に対する作用の解明
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細井 徹, 森 光平, 城田 真輝, 小澤 孝一郎
2. 発表標題 フルルビプロフェンによるALDH2活性制御機構の解明
3. 学会等名 第71回日本酸化ストレス学会・第18回日本N0学会 合同学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 城田 真輝, 細井 徹, 森 光平, 小澤 孝一郎
2. 発表標題 FlurbiprofenのALDH2タンパク質活性に対する影響の検討
3. 学会等名 第133回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	細井 徹 (Hosoi Toru) (40379889)	山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・教授 (25503)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------