

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14405

研究課題名（和文）アディポカインを介した脂肪細胞-脳神経細胞間コミュニケーション仮説の検証と応用

研究課題名（英文）Investigation of adipocyte-brain nerve cell communication through adipokine

研究代表者

三谷 壘一（Mitani, Takakazu）

信州大学・学術研究院農学系・助教

研究者番号：40773304

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脂肪組織由来の分泌タンパク質であるNAMPTに注目し、その脂肪細胞内での効果と他組織への影響について検討した。

- ・NAMPTは脂肪細胞の正常分化に必要であることが判明した。さらに脂肪細胞においてNAMPTの発現を増加する食品成分をin vitroでスクリーニングしたところ、大豆イソフラボンであるゲニステインが候補として見いだされた。
- ・ゲニステインを投与したマウスの内蔵脂肪組織において、NAMPTの発現量が顕著に増加した。脂肪組織から分泌されたNAMPTは、脳機能を向上するとの報告があるので、脳におけるNAMPT量を解析したが、対照群とゲニステイン投与群で有意な差は生じなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪組織から分泌されるNAMPTタンパク質は、脳視床下部でのNAD+合成量を増加することで、身体機能の活性化を促す。脂肪組織におけるNAMPTは加齢とともに減少することから、食品因子によってNAMPT量を増加、回復することは、加齢による身体機能や脳機能の低下を緩和できると考えられる。本研究では、NAMPTの分泌量を増加する食品成分として大豆イソフラボンであるゲニステインを見出した。この成果は、高齢社会である我が国において、加齢による身体機能、認知機能低下を脂肪組織を活用することで改善するといった新たな方策になると言える。

研究成果の概要（英文）：We examine the effect of NAMPT, which is a secretory protein derived from adipose tissue, on adipocyte differentiation and brain function.

- 1) We found that NAMPT is required for adipocyte differentiation and lipid storage. Furthermore, our screening assay indicated that soy isoflavone genistein might be food component that increased NAMPT expression and secretion levels from adipocytes.
- 2) Genistein administration remarkably increased NAMPT protein in the visceral adipose tissue of mice. Since NAMPT secreted from adipose tissue was reported to improve brain function, we analyzed the amount of NAMPT in the cerebrum. Genistein had no influence on NAMPT expression in the cerebrum.

研究分野：分子栄養学

キーワード：脂肪細胞 アディポカイン 肥満 NAMPT NAD 大豆イソフラボン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食の欧米化による肥満者の増加は、2型糖尿病などの生活習慣病だけでなく、認知機能の低下や認知症のリスクを高めることが近年明らかとなってきた。認知症を含めた肥満関連疾患が誘発される作用機序として、脂肪組織由来のアディポカインが鍵となる。アディポカインは、脂肪細胞から分泌される生理活性物質であり、血流を介して他の組織の代謝機能を左右する。アディポカインには、他の組織の炎症反応を誘導する因子(IL-6 や PAI-1 など)と代謝改善効果を持つ因子(Adiponectin など)に分類される。つまり、食事などの外部環境因子やホルモンなどの内部環境因子によってアディポカインの分泌バランスが崩れることが肥満関連疾患へと繋がり、それらのバランスを正常に戻すことで肥満関連疾患を予防できると考えられる。実際に、申請者はこれまでの研究で、高脂肪食とグルココルチコイド高値による IL-6 の分泌量の増加を食品成分で抑制することで高血糖状態を緩和できることを明らかにしている<sup>1)</sup>。

近年、NAD<sup>+</sup>合成経路の律速酵素として働く Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)が、アディポカインとして脂肪組織から分泌されること、そして脂肪組織特異的に NAMPT をノックアウトしたマウスでは視床下部での NAD<sup>+</sup>量が低下し、脳機能が低下することが明らかにされた<sup>2)</sup>。逆に、精製した NAMPT を老齢マウスの血中に投与することで、老化現象が緩和されて、寿命が伸びる結果も示された<sup>3)</sup>。つまり、脂肪組織からの NAMPT の分泌量を増加することは、老化による脳機能の低下を緩和できると推測される。そこで、申請者は、脂肪組織における NAMPT の発現と分泌を食品因子によって制御することで、脂肪組織を介した老化制御といった新たな予防の切り口が見いだせるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

食品成分による脂肪細胞からの NAMPT の分泌促進が、肥満由来の認知機能の低下を予防できるのかという基礎的知見を得ることが目的である。申請者は食品由来のポリフェノールを用いた予備的なスクリーニング結果から、大豆イソフラボンの一種であるゲニステイン(4',5,7-トリヒドロキシイソフラボン)が脂肪細胞からの NAMPT 分泌量を増加することを見出した。しかし、ゲニステインによる NAMPT の発現増加と分泌増加の分子機構は未だ不明である。本研究ではゲニステインによる NAMPT の分泌促進のメカニズムを解明するとともに、生体におけるゲニステイン摂取が NAMPT を介して認知機能に影響を及ぼすのかについて検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) in vitro 試験

ゲニステインによる NAMPT の分泌促進メカニズムを明らかにするために、ゲニステインによる NAMPT の翻訳後修飾の解析。NAMPT の分泌亢進に関与する標的分子の同定。NAMPT 発現・分泌増加に関わるゲニステインの活性部位の決定の3項目の解析を実施した。試験には、脂肪細胞のモデル細胞として広く普及されている 3T3-L1 細胞とマウスの皮下脂肪から単離培養した初代脂肪前駆細胞(iADS)を使用した。標的分子の同定は、ゲニステインに親和性磁気ビーズを結合させた Gen-bead を作製し、プルダウンアッセイにて探索した。

#### (2) in vivo 試験

ゲニステインを摂取したマウス個体の脂肪組織で NAMPT の発現と分泌量が増加するのか、そして分泌された NAMPT によって脳機能の低下が緩和されるのかを検証した。

### 4. 研究成果

#### ゲニステインによる NAMPT の翻訳後修飾を解析

3T3-L1 細胞にゲニステインを添加することで 1 μM 以上では NAMPT の分泌量が増加し、5 μM 以上では遺伝子発現量も増加した。これらの結果からゲニステインは発現と分泌を別の作用機構で制御していることが示唆された。NAMPT の細胞外分泌メカニズムの1つとして 53 番目の Lys の脱アセチル化が関与する。そこで、53 番目の Lys を疑似アセチル化アミノ酸である Gln に置換した NAMPT を 3T3-L1 細胞に発現させた結果、野生型と比較して変異型 NAMPT では、ゲニステインによる細胞外分泌の増加は示されなかった。従って、ゲニステインは 53 番目の Lys の脱アセチル化を誘導することで、NAMPT の細胞外分泌を促進していることが明らかとなった。

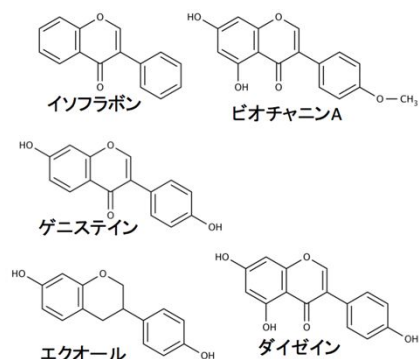
#### NAMPT の分泌亢進に関与する標的分子の同定

NAMPT の分泌亢進に関わるゲニステインの標的分子を Gen-bead で探索し、MS 解析で同定を試みた。その結果、細胞膜タンパク質である Prohibitin 1 (PHB1)を見出した。PHB1 のノックダウンした 3T3-L1 細胞および iADS 細胞では、ゲニステインによる NAMPT の分泌亢進だけでなく、発現量の増加も抑制された。さらに PHB1 による NAMPT の発現制御機構を解析した結果、PHB1 は脂肪細胞の MAP キナーゼシグナル伝達経路を介して転写因子である C/EBP のタンパク質安定性を向上することを発見した。さらに C/EBP は Nampt 遺伝子のプロモーター領域に結合することで NAMPT の発現を制御することも明らかにした。以上の結果から、ゲニステインは細胞膜の PHB1 に結合することで転写因子 C/EBP の安定性を向上し、その結

果 NAMPT の発現量が増加するという作用経路を持つことが示された。

NAMPT 発現・分泌増加に関わるゲニステインの活性部位の決定

イソフラボン骨格を持つ低分子化合物(右図)で NAMPT の発現・分泌に及ぼす影響を比較検討した。その結果、ゲニステインだけでなく、ダイゼインでも NAMPT の発現増加と分泌増加が示された。一方でbiochanin A ではそれらの効果は示されなかった。さらに、biochanin A では PHB1 との結合も示されなかった。以上の結果から、ゲニステインによる NAMPT の発現・分泌増加には、イソフラボン骨格の 4' の OH 基が重要であることが示された。



高脂肪食を摂取させているマウスにゲニステインを 2 週間経口投与し、NAMPT の発現量の変化を解析した。対照群と比較してゲニステイン投与群で、生殖器周辺脂肪組織の NAMPT のタンパク質レベルが有意に増加した。一方、鼠径部皮下脂肪組織、褐色脂肪組織、骨格筋、視床下部では NAMPT の増加は示されなかった。また、認知機能を解析した結果においてもゲニステイン投与による影響は示されなかった。ゲニステイン投与で生殖器周辺脂肪組織の NAMPT は増加していたので、ゲニステインは個体レベルで NAMPT の発現を制御できる食品成分であることが示された。しかし、認知機能にまでは影響を示さなかったため、今後はより長期間の投与と高齢マウスでの認知機能の解析を行う必要がある。

#### <引用文献>

- 1) Mitani T., et al., Theophylline suppresses interleukin-6 expression by inhibiting glucocorticoid receptor signaling in pre-adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 646, 98-106, 2018.
- 2) Yoon MJ., et al., SIRT1-mediated eNAMPT secretion from adipose tissue regulates hypothalamic NAD<sup>+</sup> and function in mice. *Cell Metabolism* 21, 706-717, 2015.
- 3) Yoshida M., et al., Extracellular vesicle-contained eNAMPT delays aging and extends lifespan in mice. *Cell Metabolism* 30, 1-14, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mitani Takakazu, Takaya Tomohide, Harada Naoki, Katayama Shigeru, Yamaji Ryoichi, Nakamura Soichiro, Ashida Hitoshi	4. 巻 646
2. 論文標題 Theophylline suppresses interleukin-6 expression by inhibiting glucocorticoid receptor signaling in pre-adipocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 98 ~ 106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2018.04.001	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 -

1. 著者名 Mitani Takakazu, Watanabe Shun, Wada Kenjiro, Fujii Hiroshi, Nakamura Soichiro, Katayama Shigeru	4. 巻 522
2. 論文標題 Intracellular cAMP contents regulate NAMPT expression via induction of C/EBP in adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 770 ~ 775
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.11.165	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 2件）

1. 発表者名 渡邊 駿、三谷壘一、片山 茂、中村宗一郎
2. 発表標題 ゲニステインはNAMPTの発現を増加することでアディポネクチンの分泌を増加する
3. 学会等名 第72回日本栄養食糧学会大会（岡山）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takakazu Mitani, Shun Watanabe, Shigeru Katayama, Soichiro Nakamura
2. 発表標題 Genistein induces adiponectin expression by increases in nicotinamide synthesis in adipocytes
3. 学会等名 The International Society for Nutraceuticals and Functional Foods 2018 (Canada)（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊 駿、三谷 壘一、片山 茂、中村宗一郎
2. 発表標題 ゲニステインはプロヒピチンを介してNAMPTの発現量とNAD+合成量を増加する
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会（東京）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Takakazu Mitani, Shun Watanabe, Shigeru Katayama, Soichiro Nakamura
2. 発表標題 Genistein increases NAD biosynthesis through the induction of NAMPT expression in adipocytes
3. 学会等名 ICoFF2019 (Kobe) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三谷 壘一、渡邊駿、片山茂、中村宗一郎
2. 発表標題 ゲニステインによる脂肪細胞でのNAMPTの発現調節メカニズムについて
3. 学会等名 第73回 日本栄養・食糧学会大会（静岡）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 駿、三谷 壘一、片山 茂、中村 宗一郎
2. 発表標題 ゲニステインによるNAD+合成関連酵素NAMPTの発現制御メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（福岡）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 三谷 壘一、渡邊 駿、和田 憲次郎
2. 発表標題 細胞内cAMPはNAD+合成系酵素NAMPTの発現を介して脂肪細胞分化を制御する
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（福岡）
4. 発表年 2019年～2020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