

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17361

研究課題名（和文）理想的な抗肥満薬の開発に向けたショウガによる褐色脂肪細胞の活性化経路の解明

研究課題名（英文）Alpinia officinarum rhizome extracts activate brown adipocytes through adrenergic receptor-independent mechanisms

研究代表者

青木 明 (Aoki, Akira)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：80781963

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：褐色脂肪細胞（BA）は、脂肪を燃焼し熱産生を行う。そのためBAの活性化は肥満対策に繋がると期待されている。BAはアドレナリン受容体刺激薬により活性化することが知られているものの、副作用が問題となる。本研究では、アドレナリン受容体を介さないショウガ科生薬の活性化経路の探索とその活性成分の同定を目的として検討した。結果、良姜にはアドレナリン受容体を介さずにBAを活性化する成分が存在することが明らかとなった。さらにその活性化経路は、Akt/mTORシグナルを介することが示唆された。また、良姜に含まれるいくつかの活性画分を得ることができた。今後、BAを活性化する化合物の同定を試みる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は様々な生活習慣病を引き起こすことから、先進諸国では肥満対策が急務とされている。BAの活性化は理想的な抗肥満薬となることが期待されているものの、未だに上市に至っていない。アドレナリン受容体を介さないBAの活性化剤が候補化合物となるが、BAの活性化経路のメカニズムが不明な点が多い。本研究により、BAの活性化経路として新たにAkt/mTORシグナルが関与していることが考えられた。また、その候補化合物は良姜の成分の中にあるのではないかと考えられた。今後、より詳細な検討を行うことによって、BAの活性化を介した理想的な抗肥満薬が開発されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Brown adipocytes (BA) play a key role in the regulation of systemic energy homeostasis in mammals. BA are suggested as a therapeutic target to treat obesity. Although adrenergic receptor agonists are potent activators of BA, they can induce some side effects, e.g., heart rate elevation and high blood pressure. The present study investigated the effect of Alpinia officinarum rhizome (AOR) extract on BA thermogenesis. Therefore, AOR extract activates BA thermogenesis through adrenergic receptor-independent mechanisms. It is suggested that AOR extract stimulates BA via Akt/mTOR pathway.

研究分野：衛生化学

キーワード：褐色脂肪細胞 Uncoupling protein 1 ショウガ Akt/mTOR CRISPR/Cas9 良姜

1. 研究開始当初の背景

肥満とは、身体に脂肪が過剰に蓄積した状態であり、その脂肪のほとんどは白色脂肪細胞に存在する。一方、褐色脂肪細胞 (BA) は、脂肪を燃焼して熱を産生し、体温維持機能を有することが明らかとなってきた。近年、BA の機能を促進することで新たな肥満対策になるのではないかと仮説に基づいた研究が行われている。

BA を活性化する刺激のうち、最も強力なものは寒冷刺激である。寒冷刺激により交感神経が活性化し、血中のノルアドレナリン (NE) が増加する。NE は、BA に発現するアドレナリン β_3 受容体 (β_3AR) を活性化し、熱産生が促進される。そこで、抗肥満薬の開発に向けて、 β_3AR アゴニストの臨床試験が行われている。しかし、 β_3AR 作動薬であるミラベグロンは、BA の熱産生を亢進させる投与量では、心拍数の増加や血圧上昇の副作用を伴うため、抗肥満薬としての上市には至っていない。そのため、副作用が少ない理想的な抗肥満薬の開発が期待されている。

2. 研究の目的

BA による熱産生は、ミトコンドリア膜間のプロトン勾配によって生じるエネルギーを源として起こり、脱共役タンパク質サブタイプ 1 (UCP1) がその主要な役割を担う。予備検討として UCP1 タンパク質発現量を指標に食品・生薬成分中に含まれる BA を活性化する化合物のスクリーニングを行った。その結果、ショウガ科生薬である生姜には BA における UCP1 発現量の増加作用があり、その作用の一部は β_3AR を介している可能性が考えられた。そこで本研究では、BA におけるショウガ科生薬の UCP1 発現量の増加作用メカニズムを解明することによって、 β_3AR 刺激に依存しない BA の活性化機構をその化合物を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

ラット由来初代培養 BA を作製し、10% FBS 含有 DMEM 培地で培養した。分化誘導は、BA を 2.5 μ M Dexamethasone, 10 μ g/mL Insulin (Ins)、0.5 μ M 3-Isobutyl-1-methylxanthine 含有培地で 2 日間培養し、さらに 10 μ g/mL Ins 含有培地で 5 日間培養して実施した。BA を分化した後、抗 UCP1 抗体を用いた免疫蛍光染色法により定量した。各ショウガ科生薬の抽出物は、メタノールにて抽出し、HPLC により分析した。CRISPR/Cas9 システムを用いた UCP1 レポーターアッセイ系の作製は、3T3-L1 細胞の UCP1 遺伝子座の終始コドン直前に自己消化型ペプチドと Luciferase 遺伝子を挿入した細胞株を樹立した。Akt/mTOR シグナルに関連するリン酸化タンパク質をウエスタンブロット法にて測定した。

4 . 研究成果

ショウガ科生薬である生姜に加えて、乾姜と良姜についても BA の UCP1 発現に対する影響を評価した。各メタノール抽出物を BA に処理したところ、生姜と良姜抽出物処理によって著しい UCP1 発現量の増加作用が認められた。さらに、 β 3AR アンタゴニスト (SR59230A) を前処理したところ、生姜抽出物による UCP1 発現増加作用は一部残存した。本検討に使用した生姜抽出物には 6-gingerol、8-gingerol、10-gingerol と 6-shogaol が含まれていることを HPLC 分析により確認しており、それらの成分を BA に処理したところ、UCP1 発現量が増加し、その増加は β 3AR アンタゴニストによって消失した。このことから、生姜抽出物に含まれる 6-gingerol、8-gingerol、10-gingerol と 6-shogaol は β 3AR を介して UCP1 発現量の増加作用があることが明らかとなった。一方、良姜抽出物処理による UCP1 発現量の増加作用は、 β 3AR アンタゴニスト前処理時にも残存した。このことから、良姜には β 3AR 刺激に依存しない経路で UCP1 発現を促進する活性成分が存在することが考えられた。

また、活性成分のより詳細な探索には、UCP1 発現量を指標としたスクリーニングアッセイを構築することでより迅速かつ幅広く化合物の評価ができると考え、アッセイ系の構築を試みた。CRISPR/Cas9 システムを用いて、内因性 UCP1 プロモーター制御化で UCP1 遺伝子と同時に Luciferase を発現するノックイン細胞株を作製した。UCP1 発現量の増加作用が知られている化合物を作製したノックイン細胞株に処理した結果、アデニル酸シクラーゼ活性化剤 (Forskolin) とホスホジエステラーゼ阻害剤 (IBMX) による Luciferase 活性の増加が認められた。しかし、AR アゴニスト (Isoproterenol) を含む他の化合物処理による Luciferase 活性の増加は見られなかった。このことから、作製したノックイン細胞株は限定的な UCP1 発現の制御を評価できるアッセイ系であった。そこで、UCP1 発現のスクリーニングアッセイには、抗 UCP1 抗体を用いた免疫蛍光染色法のみで行うこととした。

良姜抽出物による UCP1 発現の増加作用メカニズムの絞り込みを行うために、 β 3AR アンタゴニストに加えて、いくつかの阻害剤処理による影響を評価した。その結果、 β 3AR、G タンパク質共役受容体、cAMP 応答エレメント結合タンパク質の各阻害剤前処理は、良姜抽出物による UCP1 発現増加作用に影響を及ぼさなかった。一方、mTOR 阻害剤である Rapamycin 前処理により、良姜抽出物処理による UCP1 発現量の増加は有意に抑制された。さらに、mTOR に関連する細胞内シグナルタンパク質のリン酸化をウエスタンブロット法により評価した。その結果、良姜抽出物処理により、Akt タンパク質のリン酸化 (Thr308) と 4E-BP1 タンパク質のリン酸化 (Thr37/46) の顕著な抑制が認められた。

さらに、良姜に含まれる活性成分の同定を行った。HPLC を用いて分取により得られた各画分について UCP1 発現を指標に評価した結果、いくつかの画分に活性成分が存在することが明らかとなった。また、良姜の成分として既知である化合物を処理した結果、1,8-シネオールや Transient receptor potential チャネルの活性化能を有するとされる桂皮酸類によって UCP1 発現の増加が認められた。しかしながら、どの活性成分についても良姜抽出物ほどの UCP1 発現増加作用は認められなかったことから、単独での作用ではなく複数の化合物によ

る影響である可能性も考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akira Aoki, Ryoya Kawai, Yoshinori Okamoto, Koji Ueda, Takashi Isobe, Susumu Ohkawara, Nobumitsu Hanioka, Toshiko Tanaka-Kagawa, Hideto Jinno
2. 発表標題 Establishment of a GFP reporter THP-1 cell line under the control of endogenous interleukin-8 promoter
3. 学会等名 15th International Congress of Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木 明、森 葉子、岡本誉士典、神野透人
2. 発表標題 良姜抽出物による β 3アドレナリン受容体非依存的な褐色脂肪細胞の活性化機構の解析
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 青木 明、茨木康太、城山晴佳、岡本誉士典、植田康次、神野透人
2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムを利用したUCP1レポーター細胞株の作製と解析
3. 学会等名 第64回日本薬学会東海支部 総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 茨木康太、青木 明、岡本誉士典、植田康次、神野透人
2. 発表標題 内在性プロモーターを利用した脱共役タンパクUCP1レポーターアッセイ系の開発
3. 学会等名 フォーラム2018：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 城山晴佳、青木 明、岡本誉士典、植田康次、神野透人
2. 発表標題 褐色脂肪細胞の活性化機構に対するショウガ科由来成分の影響
3. 学会等名 フォーラム2018：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青木 明、岡本誉士典、植田康次、神野透人
2. 発表標題 3T3-L1細胞を用いたUCP1レポーターアッセイ系の構築とUCP1発現制御機構の解析
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 青木 明、森 葉子、岡本誉士典、神野透人
2. 発表標題 良姜抽出物によるAkt/mTORシグナル伝達経路を介したUCP1発現増加作用
3. 学会等名 フォーラム2020：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森帆乃花、青木 明、森 葉子、岡本誉士典、神野透人
2. 発表標題 糖尿病モデルマウスを用いた生姜抽出物による血糖降下作用の検討
3. 学会等名 フォーラム2020：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------