

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年2月20日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580137

研究課題名(和文) NADPH オキシダーゼを標的としたメタボリックシンドローム予防

研究課題名(英文) NADPH oxidase targeted metabolic syndrome prevention

## 研究代表者

西山 和夫 (NISHIYAMA KAZUO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：40164610

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームに NADPH オキシダーゼによって生成される活性酸素が関与していることが示唆されているので、NADPH オキシダーゼ阻害剤および抗酸化物質によるメタボリックシンドローム予防の可能性について検討した結果、NADPH オキシダーゼ阻害剤および抗酸化物質がメタボリックシンドローム関連タンパク質であるインテグリン  $\beta 1$  の発現を低下させることを示し、メタボリックシンドローム予防に有効であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have shown that reactive oxygen species generated by NADPH oxidase are causative agents of metabolic syndrome. In order to elucidate the effects of NADPH oxidase inhibitors and antioxidants on metabolic syndrome prevention, the effects of NADPH oxidase inhibitors and an antioxidant on the expression level of integrin  $\beta 1$ , a metabolic syndrome related protein, was investigated. Both NADPH oxidase inhibitors and an antioxidant decreased the expression level of integrin  $\beta 1$ , suggesting that NADPH oxidase inhibitors and antioxidants are promising candidates for metabolic syndrome prevention.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：NADPH オキシダーゼ、メタボリックシンドローム、インテグリン  $\beta 1$ 、がん

## 1. 研究開始当初の背景

内臓脂肪型肥満、高中性脂肪血症、高コレステロール血症、高血圧、高血糖などの症状を合併した状態、いわゆるメタボリックシンドロームの増加が問題となっている。メタボリックシンドロームでは、糖尿病、脳卒中、心筋梗塞などの発症リスクが相乗的に高ま

ることが知られているが、これらの疾病の発症に NADPH オキシダーゼによって生成される活性酸素(ROS)が関与していることが明らかになってきている。例えば、高血圧や血管障害に関しては、昇圧ペプチドであるアンジオテンシン II が血管平滑筋細胞の NADPH オキシダーゼを活性化し、スーパーオキシド

の産生を上昇させて血管弛緩因子である一酸化窒素(NO)を消去することによって血圧を上昇させることが明らかにされている (Zhao W et al, Hypertension, 48, 637, 2006)。また、高脂肪・高カロリー食が、NADPH オキシダーゼサブユニットの高発現とスーパーオキシド産生上昇により、動脈内皮の不全を誘導すること (Galili O, et al, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006)、高脂肪食によって誘導されたメタボリックシンドロームは NADPH オキシダーゼによる ROS 生成の増加と抗酸化酵素の発現低下を介して高血圧をもたらすこと (Roberts CK et al, Metabolism, 55, 928, 2006)、遊離脂肪酸が血管内皮細胞の NADPH オキシダーゼのサブユニットを高発現させることによって血管内皮細胞の機能異常を起し、この機能異常が NADPH オキシダーゼ阻害剤により抑制されること (Chinen I et al, Endocrinology, 2006)、脂肪細胞が産生した ROS が TNF- $\alpha$  による血栓溶解酵素阻害タンパク質 (PAI-1) 産生に関与していること (Sakamoto T et al, Am J Physiol, 276, C1391, 1999) などが報告されている。さらに動脈硬化発症因子として注目されているホモシステインの血中濃度が上昇すると収縮期血圧が高くなること (Tayama J et al, Hypertens Res, 29, 403, 2006)、ホモシステインは NADPH オキシダーゼによる ROS 生成を上昇させて NO の作用を抑制すること (Tyagi N, et al, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 289, H2649, 2005) が報告されている。また、ホモシステインは NADPH オキシダーゼの活性化を介して NF- $\kappa$ B を活性化し、炎症性ケモカインである MCP-1 の分泌を促進し、動脈硬化を発症させることも明らかにされている (Dai J et al, Free Radic Biol Med, 41, 1566, 2006)。

糖尿病に関しては、アンジオテンシン II で誘導された NADPH オキシダーゼの活性化が骨格筋のインシュリンシグナルを阻害し、このシグナル伝達阻害が NADPH オキシダーゼ阻害剤や NADPH オキシダーゼサブユニットである p47phox の siRNA で改善されることが報告されている (Wei Y et al, J Biol Chem, 281, 35137, 2006)。

がんに関しては、ROS による DNA 損傷の誘導やプロモーション作用について数多くの報告がなされており、胃がんの原因菌であるヘリコバクターピロリのリポ多糖が胃粘膜培養細胞の NADPH オキシダーゼの発現を上昇させることも明らかにされている (Teshima S et al, FEBS Lett, 452, 243, 1999)。また、がんや脂肪組織の血管新生に関与している転写因子である HIF-1 の誘導は NADPH オキシダーゼ阻害剤やカタラーゼで抑制された (Goyal P et al, Free Radic Biol Med, 36, 1279, 2004)。アルツハイマー病に関しても、アミロイド- $\beta$ -タンパク質による NADPH オキ

シダーゼ活性の上昇が、アルツハイマー病の発症に関与している可能性が示唆されており (Park L et al, J Neurosci, 25, 1769, 2005)、血管新生が関与する血管障害治療において NADPH オキシダーゼがターゲットとなりうることを提案されている (Ushio-Fukai M. Cardiovasc Res. 71, 226, 2006)。京都大学の村上らは、セスキテルペン、クマリン、ポリメトキシフラボノイドが、ROS 生成や発がんプロモーションを抑制することを報告している (Murakami A et al Int J Cancer, 110, 481, 2004, Murakami A et al, Carcinogenesis, 21, 1843, 2000, Murakami A et al, Cancer Res, 60, 5059, 2000)。

以上のように NADPH オキシダーゼによって生成される ROS がメタボリックシンドロームの発症に深く関連していることを示唆するデータが数多く報告されていることから、NADPH オキシダーゼ活性を抑制したり、生成した ROS を消去する食品成分を摂取することによって、メタボリックシンドローム発症のリスクを低減することができる可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は培養細胞を用いて NADPH オキシダーゼ阻害剤や NADPH オキシダーゼによって生成する ROS を消去する抗酸化物質が、細胞の ROS レベルや増殖、さらに細胞におけるメタボリックシンドローム関連タンパク質の発現量に及ぼす影響について検討し、NADPH オキシダーゼの活性制御あるいは ROS を消去する食品成分を摂取することによって、メタボリックシンドローム発症リスクを低減させる可能性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)メタボリックシンドロームの発症に脂肪組織に浸潤してくる単球、顆粒球、マクロファージなどの免疫担当細胞が重要な役割を果たしていることが明らかになってきており、これらの大部分は骨髄由来であると考えられている。前骨髄性白血病細胞株である HL-60 細胞は分化誘導因子により、主に単球、顆粒球あるいはマクロファージに分化誘導されることが知られている (Collins SJ, Blood, 70, 1233, 1987)。これまで未分化の HL-60 細胞は ROS を産生しないと考えられていたが、Muranaka らは免疫ブロッティング法により、NADPH オキシダーゼサブユニットである gp91(phox)、p22(phox)、p67(phox)、p47(phox)、Rac 2 を発現していることを示し、比較的容易に培養できる HL-60 細胞が NADPH オキシダーゼ研究のよいモデル細胞となることを報告した (Muranaka S. et al. Antioxid Redox Signal, 7, 1367, 2005)。リポ酸

は ROS の消去能をもち、酸化ストレスに起因する慢性疾患を抑制する効果を示すことが報告されている (Smith AR et al. *Curr Med Chem.* 11, 1135, 2004)。さらに O'Neaill らはリポ酸(LA)がジヒドロリポ酸(DHLA)に還元される時に細胞内の NADPH を枯渇させることによって NADPH オキシダーゼを阻害することを報告している。(O'Neaill HC et al. *Antioxid Redox Signal*, 10, 277, 2008)。細胞内 ROS 量の測定法と活性型 NADPH オキシダーゼを発現している細胞への抗酸化物質の影響を検討するために HL-60 細胞を LA および DHLA で処理後、トリパンプルー色素排除法にて細胞増殖および生存率への影響を調べた。細胞内 ROS 量は、LA と DHLA 処理した細胞を 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH) で処理後、フローサイトメーターで検出した。

(2) ヒトのガンの約 3 割に活性化変異が確認されているがん原遺伝子 *ras* は、NADPH oxidase を活性化することにより ROS の産生を導き、細胞増殖を促進することが報告されている (Irani K et al. *Biochem Pharmacol*, 55, 1339, 1998)。NADPH オキシダーゼ阻害剤や抗酸化物質の作用機構を明らかにするために細胞周期および細胞内 ROS 量への影響を調べた。さらに細胞の ROS 産生に関連する因子である培養酸素濃度が増殖に及ぼす影響について検討した。ラットの繊維芽細胞である 3Y1 細胞及び 3Y1 細胞を *v-H-ras* により形質転換した HR-3Y1-2 細胞を用いた。細胞周期は LA または NADPH オキシダーゼ阻害剤で処理後、細胞を固定して Propidium iodide で染色し、フローサイトメーターを用いて解析を行った。細胞内 ROS 量は、NADPH オキシダーゼ阻害剤または LA で処理した後、DCFH 処理後、フローサイトメーターで測定した。

(3) メタボリックシンドロームにともなって発症する動脈硬化症の第一ステップであるヒト単球様細胞の血管内皮への接着や血管内皮下への浸潤にインテグリン  $\beta 1$  が重要なはたらきをしていることが明らかにされている (Shih PT et al. *J Clin Invest.*, 103, 613, 1999, Srinivasan S et al. *Circ Res.* 92, 371, 2003, Kawakami A et al. *Circulation.* 113, 691, 2006)。また、インテグリン  $\beta 1$  の発現に NADPH オキシダーゼに由来する ROS が関与していることを示唆する報告がある (Cho SO et al. *Ann NY Acad Sci*, 1090, 298, 2006)。3Y1 細胞および HR-3Y1-2 細胞を LA または NADPH オキシダーゼ阻害剤で処理後、細胞表面に発現するインテグリン  $\beta 1$  を fluorescein isothiocyanate 標識抗体を用いてフローサイトメーターにより測定した。さらに LA および NADPH オキシダーゼ阻害剤が細胞外マトリックスの一種であるフィブロネクチンへの接着能に及ぼす影響を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) まず、LA と DHLA の HL-60 細胞に対する影響を検討した結果、LA と DHLA どちらも濃度依存的に細胞増殖を抑制した。DHLA は LA より低濃度で生細胞数を減少させ、HL-60 細胞に対して LA より強い致死活性を有することが示された。LA と DHLA 処理の細胞死における酸化ストレスの関与を検討するために細胞内 ROS 量を測定した結果、LA 処理では変化が認められなかったが、DHLA 処理ではわずかに減少することを明らかにした。今回使用した条件では、LA の NADPH オキシダーゼ活性への影響は認められなかったが、DHLA は細胞内 ROS 量を減少させることによって細胞増殖を抑制していることが示唆された。

(2) 次に 3Y1 細胞と HR-3Y1-2 細胞における細胞内 ROS 量を測定した結果、HR-3Y1-2 細胞の方が高く、NADPH オキシダーゼ阻害剤および LA が HR-3Y1-2 細胞選択的に細胞内 ROS 量を低下させることを明らかにした。さらに NADPH オキシダーゼ阻害剤および LA 処理により HR-3Y1-2 細胞の増殖が選択的に抑制されることを明らかにした。また、NADPH オキシダーゼ阻害剤および LA 処理後の細胞周期解析では 12、24 時間処理した HR-3Y1-2 細胞における G<sub>1</sub> 期から S 期への進行が阻害される傾向が認められた。

(3) 最後に NADPH オキシダーゼ阻害剤が、これらの細胞のフィブロネクチンに対する接着能と細胞接着因子であるインテグリン  $\beta 1$  の発現に対する影響を調べた。その結果、NADPH オキシダーゼ阻害剤および LA が HR-3Y1-2 細胞選択的にフィブロネクチンでコートしたディッシュへの細胞接着能とインテグリン  $\beta 1$  の発現量を低下させることを明らかにした。これらの結果は、NADPH オキシダーゼ活性を制御することによってがん細胞の接着や転移を抑制できることを示唆するものである。一方、インテグリン  $\beta 1$  は、慢性炎症の鍵因子として注目されているアンジオポエチン様因子 2 (ANGPTL2) の受容体であることが報告されている (Tabata M et al. *Cell Metab.* 10, 178, 2009)。ANGPTL2 は肥満時に発現量と分泌量が増え、脂肪細胞由来の ANGPTL2 は脂肪細胞の炎症を惹起し、結果として全身のインスリン抵抗性を引き起こすことが明らかにされている。NADPH オキシダーゼ阻害剤が ANGPTL2 の受容体であるインテグリンの発現量を低下させることを明らかにした今回の成果は、NADPH オキシダーゼ活性を制御することによってインスリン抵抗性などのメタボリックシンドロームを予防できる可能性を示唆するものである。さらに 3Y1 細胞を活性酸素の一種である過酸化水素で処理することにより細胞

表面のインテグリン  $\beta 1$  発現が増加することも明らかにした。過酸化水素は NADPH オキシダーゼによって産生されるスーパーオキシドから生成するため、この結果は NADPH オキシダーゼ阻害が細胞表面におけるインテグリン  $\beta 1$  の発現を抑制し、ANGPTL2 の作用を制御できる可能性を示唆するものである。

以上のことから、NADPH オキシダーゼ活性制御がメタボリックシンドローム発症に対して予防的に作用することが示唆され、NADPH オキシダーゼ阻害活性や抗酸化活性をもつ食品成分の摂取が、今後のメタボリックシンドローム発症予防に大きく寄与する可能性が示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Yasuda, S., Kuwata, H., Kawamoto, K., Shirakawa, J., Atobe, S., Hoshi, Y., Yamasaki, M., Nishiyama, K., Tachibana, H., Yamada, K., Kobayashi, H., Igoshi, K. Effect of Highly Lipolyzed Goat Cheese on HL-60 Human Leukemia Cells: Antiproliferative Activity and Induction of Apoptotic DNA Damage. J. Dairy Sci. in press 査読有
- ② Yamasaki M., Iwase M, Kawano K, Sakakibara Y, Suiko M, Nishiyama K. Alpha lipoic acid selectively inhibits proliferation and adhesion to fibronectin of v-H-ras-transformed 3Y1 cells. J. Clin. Biochem. Nutr. Published online: 13 December, 2011 査読有
- ③ 山森一人、吉原郁夫、江藤望、西山和夫 サンプル選別と拡張重み更新型 SOM を統合したたんぱく質発現量からの食品機能性推定法。情報処理学会論文誌数理モデル化と応用, Vol. 4, No. 4, 69-80, 2011, 査読有
- ④ Nagahama K, Eto N, Yamamori K, Nishiyama K., Sakakibara Y, Iwata T, Uchida A, Yoshihara I, Suiko M. An Efficient Approach for Simultaneous Estimation of the Multiple Health-Promoting Effects of Foods. J Agric Food Chem. 59(16), 8575-8588, 2011. 査読有
- ⑤ Hashiguchi T, Kurogi K, Sakakibara Y, Yamasaki M., Nishiyama K., Yasuda S, Liu MC, Suiko M. Enzymatic Sulfation of Tocopherols and Tocopherol Metabolites by Human Cytosolic Sulfotransferases. Biosci Biotechnol Biochem. 75(10), 1951-1956, 2011 査読有
- ⑥ Shirasugi I, Sakakibara Y, Yamasaki M., Nishiyama K., Matsui T, Liu MC, Suiko M. Novel screening method of potential skin-whitening compounds using luciferase reporter assay system. Biosci Biotechnol Biochem. 74(11), 2253-2258, 2010 査読有
- ⑦ Yamasaki M., Mukai A, Ohba M, Mine Y, Sakakibara Y, Suiko M, Morishita K, Nishiyama K. Genistein induces apoptotic cell death in adult T-cell leukemia cells through estrogen receptors. Biosci Biotechnol Biochem. 74(10), 2113-2115, 2010. 査読有
- ⑧ Hirashima Y, Seshimo S, Fujiki Y, Okabe M, Nishiyama K., Matsumoto M, Kanouchi H, Oka T. Homocysteine and copper induce SH-SY5Y cellular apoptosis via caspase activation and nuclear translocation of apoptosis-inducing factor. Neurosci Res. 67(4), 300-306. 2010 査読有
- ⑨ 山崎正夫、西山和夫：大豆イソフラボンの抗 ATL (成人 T 細胞性白血病) 作用：バイオサイエンスとインダストリー、68(5), 332-335, 2010.9 月 査読無
- ⑩ Yasuda S, Ohkura N, Suzuki K, Yamasaki M., Nishiyama K., Kobayashi H, Hoshi Y, Kadooka Y, Igoshi K. Effects of highly ripened cheeses on HL-60 human leukemia cells: antiproliferative activity and induction of apoptotic DNA damage. J Dairy Sci. 93(4), 1393-1400, 2010 査読有
- ⑪ Yamasaki M., Omi Y, Fujii N, Ozaki A, Nakama A, Sakakibara Y, Suiko M, Nishiyama K. Mustard oil in "Shibori Daikon" a variety of Japanese radish, selectively inhibits the proliferation of H-ras-transformed 3Y1 cells. Biosci Biotechnol Biochem. 73(10):2217-21. 2009 査読有
- ⑫ Yamasaki M., Kawabe A, Nishimoto K, Madhyastha H, Sakakibara Y, Suiko M, Okamoto T, Suda T, Uehira K, Nishiyama K. Dihydro-alpha-lipoic acid has more potent cytotoxicity than alpha-lipoic acid. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 45(5-6):275-280. 2009 査読有
- ⑬ Yamasaki M., Tachibana H, Yamada A, Ochi Y, Madhyastha H, Nishiyama K., Yamada K. Oleic acid prevents apoptotic cell death induced by trans10, cis12 isomer of conjugated linoleic acid via p38 MAP kinase dependent pathway. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 44(7):290-294. 2008 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① Y. Mine, M. Nishimura, Y. Sakakibara, M. Suiko, K. Morishita, M. Yamasaki, and K. Nishiyama, Genistein inhibits the growth of human T-cell leukemia virus type 1-infected cell line Hut102, 2011 International

Conference on Food Factors, Nov. 21,  
Taipei, Taiwan

- ②中村崇弘、梁井綾香、平原秀秋、中原徳昭、山崎正夫、西山和夫、ブルーベリー葉抽出物による脂肪細胞の機能制御と炎症予防、平成23年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会、2011年9月4日、佐賀市
- ③岩瀬将弘、河野和生、山崎正夫、水光正仁、榊原陽一、西山和夫、 $\alpha$ -リポ酸によるv-Ha-ras形質転換細胞の $\beta$ 1-integrinの発現抑制、2011年度生物機能研究会、2011年7月2日、福岡市
- ④久米田翔子、有菌裕規、西本健太郎、北岡翔太、川邊暁子、山崎正夫、榊原陽一、水光正仁、西山和夫、 $\alpha$ -リポ酸のアポトーシス誘導機構解明、第65回日本栄養・食糧学会大会、2011年5月14日、東京
- ⑤岩瀬将弘、河野和生、山崎正夫、水光正仁、榊原陽一、西山和夫、 $\alpha$ -リポ酸によるv-Ha-ras形質転換細胞の $\beta$ 1-integrinの発現抑制、日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月28日、京都
- ⑥岩瀬将弘、河野和生、水光正仁、榊原陽一、山崎正夫、西山和夫、 $\alpha$ -リポ酸による $\beta$ 1-integrinの発現抑制作用、第5回 $\alpha$ -リポ酸研究会、2010年10月1日、東京
- ⑦田川俊、宮田真子、長田さえ子、榊原陽一、水光正仁、山崎正夫、西山和夫、リポ酸による細胞増殖抑制効果におけるヒアルロン酸の関与、平成22年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会、2010年9月25日、宮崎市
- ⑧岩瀬将弘、山崎正夫、水光正仁、榊原陽一、西山和夫、リポ酸による $\beta$ 1-integrinの発現抑制作用、2010年度日本農芸化学会西日本支部大会、2010年9月18日、熊本市
- ⑨岩田喬子、小栗エリ、榊原陽一、西山和夫、水光正仁、プロテオーム解析を用いた食品の抗酸化作用の評価、日本農芸化学会2009年度大会、2009年3月28日、福岡市
- ⑩有菌裕規、西本健太郎、川邊暁子、山崎正夫、池田正浩、榊原陽一、水光正仁、西山和夫、リポ酸によるHL-60細胞のApoptosis誘導機構解明、日本農芸化学会、2009年度大会、2009年3月28日、福岡市
- ⑪河野和生、宮田真子、後田牧洋、山崎正夫、西山和夫、v-Ha-ras形質転換細胞におけるNADPH oxidase阻害の影響、日本農芸化学会2009年度大会、2009年3月28日、福岡市
- ⑫宮田真子、後田牧洋、尾美友介、山崎正夫、西山和夫、HR-3Y1細胞の増殖にお

ける活性酸素種の関与、平成20年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会、2008年11月2日、別府市

- ⑬川邊暁子、西本健太郎、山崎正夫、岡本威明、須田泰司、上平賢三、榊原陽一、水光正仁、西山和夫、リポ酸とジヒドロリポ酸の細胞死誘導機構、平成20年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会、2008年11月2日、別府市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：拡張重み更新型自己組織化マップを構築するためのプログラム、および構築した拡張重み更新型自己組織化マップを用いて特性値を推定するためのプログラム、ならびに拡張重み更新型自己組織化マップを用いる特性値の推定装置

発明者：山森一人、吉原郁夫、西山和夫、江藤望、榊原陽一、永濱清子

権利者：国立大学法人宮崎大学

種類：特許

番号：特願2011-245872

出願年月日：23年11月9日

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

西山 和夫 (NISHIYAMA KAZUO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：40164610

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

山崎 正夫 (YAMASAKI MASAO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：80381060