

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：22702

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590598

研究課題名（和文）2型糖尿病克服の鍵分子であるアディポネクチンの発現促進物質の探索

研究課題名（英文）The search for a stimulator of adiponectin expression, a key molecule that has the potential to overcome type 2 diabetes

研究代表者

及川 勉（OIKAWA TSUTOMU）

神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：40120141

研究成果の概要（和文）：本研究は2型糖尿病克服の鍵分子であるアディポネクチンの発現促進物質の探索を目的として行い、ノビレチン、ノルリケキサントンなどいくつかの物質がアディポネクチンの mRNA 発現と細胞外への分泌を促進することを見出した。これらの化合物は抗糖尿病剤チアゾリジン化合物とは異なる作用機序によりアディポネクチンの発現促進作用を発揮することが示唆された。これらの知見は、我々が本研究で見出したアディポネクチン発現促進物質が2型糖尿病を治療し、あるいは予防する可能性を持っていることを示すものを考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study we have searched for stimulator of adiponectin, a key molecule that has the potential to overcome type 2 diabetes. As a result, we have found that several substances, including nobiletin and norlichexantone, stimulate mRNA expression and extracellular secretion of adiponectin. Their actions of mechanism might differ from those of antidiabetic thiazolidinediones. These findings suggest the possibility that our adiponectin stimulators have the potential to treat and/or prevent type 2 diabetes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：アディポネクチン、2型糖尿病治療薬、前駆脂肪細胞、細胞分化、チアゾリジン化合物、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 γ

1. 研究開始当初の背景

糖尿病、特に2型糖尿病対策は医学的にも社会的にも最重要課題の一つである。ところがこれまでの2型糖尿病治療薬の開発研究

は簡便かつ一度に大量のサンプルを処理できる薬理的なスクリーニング系がなく、その確立が切望されていた。そうした状況下、偶然が幸いして抗糖尿病治療薬として開発

されたピオグリタゾン、核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性転写制御因子で、また脂肪細胞で強く発現している脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 γ (PPAR γ) の合成アゴニストであることが明らかにされた。そしてピオグリタゾンの抗糖尿病作用は PPAR γ の活性化を介して誘導されるアディポネクチンに大きく依存することが示された。ところが最近、アメリカ米国食品医薬品局 (FDA) 諮問委員会がチアゾリジン化合物による心不全リスクを徹底的に評価する必要があると答申するなど、その副作用が問題となり、チアゾリジン化合物とは作用機序が異なるインスリン抵抗性改善作用を示す 2 型糖尿病治療薬の創製が望まれつつある。他方我々は (1) チアゾリジン化合物が ST-13 前駆脂肪細胞の最強の分化誘導剤である、(2) 茯苓から単離したトリテルペンであるデヒドロトラメテノール酸が ST-13 細胞の分化を誘導して PPAR γ を活性化する、(3) このトリテルペンを糖尿病モデルマウスに経口投与すると、血糖値を下げ、さらに高インスリン血症改善作用と耐糖能異常の改善作用を示し、PPAR γ の活性化と血糖降下作用、脂肪細胞の分化誘導能は相関することを明らかにしてきた。これらの知見は ST-13 前駆脂肪細胞分化誘導活性を指標にして新規の 2 型糖尿病治療薬をスクリーニングできることを示すものと考え、本アッセイ系を用いて 2 型糖尿病治療薬シーズの探索研究に着手した。その結果、柑橘特有のポリメトキシフラボノイドであるノビレチンが ST-13 前駆脂肪細胞の分化を誘導すること、またチアゾリジン化合物とは異なり PPAR γ アゴニスト作用を示さないにもかかわらず、抗糖尿病作用を有するアディポネクチンの分泌を著明に促進することを示唆する結果を見出しつつあった。さらに理研が提供している化合物ライブラリーをスクリーニングしたところ、驚くべきことに調べた化合物の約 10% が ST-13 細胞の分化を誘導することもつかんでいた。そして分化誘導活性を示した化合物は、調べた限りすべてのものがアディポネクチン分泌促進作用を示すことを確認していた。これらの成果は、血中アディポネクチン濃度が約 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と他のホルモンに比べて約 1,000 倍も高いのはなぜかという謎を解く鍵となるかもしれないと考えた。従って、本スクリーニング系を用いて研究を推進すれば、糖尿病治療研究をさらに推進する上で画期的かつ意義ある成果が得られるものと期待した。

2. 研究の目的

糖尿病は網膜症、動脈硬化症などの合併症を引き起こし、失明、心筋梗塞などのリスク

を高める。そして患者の多くはインスリン抵抗性を示す 2 型糖尿病である。我々は ST-13 細胞の分化誘導活性を指標にすることによって、インスリン抵抗性克服の鍵分子であるアディポネクチンの発現・分泌を促進する活性物質を検索できる新しいスクリーニング系を確立した。

本研究では、(1) この新しいスクリーニング系を駆使してアディポネクチン発現促進物質を見出す、(2) その作用機序を解析するとともに、2 型糖尿病治療薬として開発するための研究基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 前脂肪細胞株 (ST-13) を用いた細胞分化誘導活性測定法: day 0 に培養液を含む 24 穴培養プレートに ST-13 細胞 (1×10^4 cells/well) を播種し、day 1 に種々の検体を含む新鮮培養液に交換した。2、3 日おきに検体を含む新鮮培養液に交代し、day 11 に位相差顕微鏡下で観察した。分化誘導した ST-13 細胞は脂肪滴を示すので簡単に判定できた。

(2) 約 1,500 種類の微生物ブロス、生薬エキス、合成化合物、海洋無脊椎動物粗抽出物を用いて、前脂肪細胞株 (ST-13) に対する細胞分化誘導活性を調べた。この実験で柑橘由来のポリメトキシフラボノイドであるノビレチンが強い活性を示したので、そのアディポネクチン発現促進作用を詳細に検討した。

(3) ペニシリンやスタチンのような化合物を発見したいと考えて、96 種類の糸状菌の培養液の脂肪細胞分化誘導活性を調べた。その中で、糸状菌 P16 が強い活性を示したので、大量培養して活性本体の単離・精製を各種クロマトグラフィー、また構造決定を NMR と MS を用いて行った。

(4) 糸状菌 P16 から単離・精製した脂肪細胞分化誘導物質のアディポネクチン発現促進作用を western blot 法、リアルタイム PCR、ルシフェラーゼ - レポーター法などを用いて解析した。

(5) 理研から入手した化合物ライブラリー (1056 種類の天然・合成化合物が含まれる) から ST-13 分化誘導物質を検索した。その中で最も ST-13 細胞分化誘導活性を示した化合物の一つであるプロピオン酸誘導体 (846) のアディポネクチン発現促進作用をウェスタン・ブロット法、リアルタイム RT-PCR 法、ルシフェラーゼレポーターシステムなどを用いて解析した。

(6) アディポネクチンは血管新生抑制作用を示すことが報告されているので、我々が見出したアディポネクチン発現誘導物質であるノビレチンが血管新生に影響を与えるかを、活性化した培養血管内皮細胞を用いる

種々の in vitro 実験系と in vivo モデル系を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 約 1,500 種類の微生物プロス、生薬エキス、合成化合物、海洋無脊椎動物粗抽出物を用いて、前脂肪細胞株 (ST-13) に対する細胞分化誘導活性を調べたところ、柑橘特有のポリメトキシフラボノイドであるノビレチンが ST-13 前駆脂肪細胞の分化を誘導すること、また脂肪細胞の分化マーカーである aP2 と PPAR γ の遺伝子発現も促進した。ノビレチンはチアゾリジン化合物とは異なり PPAR γ アゴニスト作用を示さないにもかかわらず、抗糖尿病作用を有するアディポネクチンの分泌を著明に促進することを明らかにした。さらにノビレチンとその類縁体を用いて、ノビレチンによるアディポネクチン発現促進作用に関与する分子中の官能基の同定を試み、C-6 と C-3' のメトキシ基が重要であることを明らかにした。

(2) ペニシリンやスタチンのような化合物を発見したいと考えて 96 種類の糸状菌の培養液の脂肪細胞分化誘導活性を検討し、その中の一株、糸状菌 P16 が強い活性を示すことを掴んだ。そこで糸状菌 P16 を大量培養し、脂肪細胞分化誘導活性を指標にしてシリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODS カラムクロマトグラフィーを駆使して 3 種類の化合物を単離・精製した。NMR と MS を用いて構造決定したところ、活性本体の一つとしてノルリケキサントンを同定した。本化合物はアディポネクチンの mRNA 発現と細胞外への分泌を促進した。またノルリケキサントンで処理した ST-13 細胞のアディポネクチン mRNA 発現量を検討した結果、分泌促進作用と同様に、濃度に依存してその mRNA 発現量の増加が観察された。そしてノルリケキサントンによるこの発現量の増加には、本化合物による転写促進作用が関与していることがアクチノマイシン D を用いた実験結果より示唆された。さらにルシフェラーゼレポーターアッセイにより、ノルリケキサントンはチアゾリジン化合物とは異なり、PPAR γ アゴニスト活性をもたないことが判明した。つまり、ノルリケキサントンはチアゾリジン化合物とは異なる作用機序によりアディポネクチン発現促進作用を発揮することが強く示唆された。

(3) 糸状菌以外の各種微生物が産生する低分子化合物の脂肪細胞分化誘導活性とアディポネクチン発現促進作用を検討し、prajinamide が脂肪細胞分化誘導活性を示すことを明らかにした。今後本化合物のアディポネクチン発現促進活性を検討する予定である。さらに別の種類の放線菌の培養液からアディポネクチン発現促進作用を示すも

のとして、2 種類の化合物を再発見あるいは発見した。さらにこれらの両化合物は、糖の細胞内への取り込みの鍵分子である GLUT4 の mRNA 発現を促進することを明らかにした。

(4) 理化学研究所天然化合物バンクが提供している 1,056 種類の化合物を含む標準化合物ライブラリーをスクリーニングし、調べた化合物の約 10% が ST-13 細胞の分化を誘導することを突き止めた。そして分化誘導活性を示した化合物は、調べた限りすべてのものがアディポネクチン分泌促進作用を示すことが判明した。フェニルプロピオン酸誘導体 (846) は、同ライブラリーから見出したアディポネクチン発現促進活性が最も強い化合物の一つであるが、その親化合物であるフェニルプロピオン酸自体は、アディポネクチンの発現を全く促進しないことを見出した。

(5) アディポネクチンは血管新生に影響を及ぼすことが報告されている。また細胞分化はアディポネクチン発現誘導と血管新生において重要な役割を演じている。そこでアディポネクチン発現促進物質として我々が再発見したノビレチンが血管新生抑制作用を示すかを検討した。その結果、ノビレチンは内皮細胞増殖因子で活性化した培養血管内皮細胞を用いた in vitro 血管新生モデル系で血管新生に連結しているいろいろな血管内皮細胞機能 (増殖、遊走、マトリゲル上での管腔形成能、プロマトリックスメタロプロテイナーゼ-2 の発現、膜結合プラスミノゲンアクチベーターなど) を抑制した。さらに本化合物は、in vivo 血管新生モデルである鶏胚漿尿膜血管新生を阻害することも明らかにした。これらの結果より、ノビレチンは新規血管新生阻害物質であることを明らかにすることに成功した。

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 6 件)

- ① Igarashi, Y., Tanaka, Y., Ikeda, M., Oikawa, T., Kitani, S., Nihira, T., Mongkol, P., Janhom, M., Panbangred, W. (2012) Prajinamide, a new modified peptide from a soil-derived *Streptomyces*. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 65: 157-159 (査読有). DOI: 10.1038/ja.2011.132.
- ② Ikeda, M., Kurotobi, Y., Namikawa, A., Kuranuki, S., Matsuura, N., Sato, M., Igarashi, Y., Nakamura, T., Oikawa, T. (2011) Norlichexanthone isolated from fungus P16 promotes the secretion and expression of adiponectin in cultured ST-13 adipocytes. *Med. Chem.*, 7:

250-256 (査読有) .

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=med%20chem%20oikawa%20t>

- ③ Kunimasa, K., Ikekita, M., Sato, M., Ohta, T., Yamori, Y., Ikeda, M., Kuranuki, S., Oikawa, T. (2010) Nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid, suppresses multiple angiogenesis-related endothelial cell functions and angiogenesis in vivo. *Cancer Res.*, 101: 2462-2469 (査読有) . DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01668.x.
- ④ Kunimasa, K., Kuranuki, S., Matsuura, N., Iwasaki, N., Ikeda, M., Ito, A., Sashida, Y., Mimaki, Y., Yano, M., Sato, M., Igarashi, Y., Oikawa, T. (2009) Identification of nobiletin, a polymethoxyflavonoid, as an enhancer of adiponectin secretion. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19: 2062-2064 (査読有) . <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=bioorg%20med%20chem%20lett%20oikawa%20t>
- ⑤ Yamashita, T., Nakao, Y., Matsunaga, S., Oikawa, T., Imahara, Y., Fusetani, N. (2009) A new antiangiogenic C24 oxylipin from the soft coral *Sinularia numerosa*. *Bioorg. Med. Chem.*, 17: 2181-2184 (査読有) . <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=bioorg%20med%20chem%20oikawa%20t>

[学会発表] (計 12 件)

- ① 池田 恵, 元島 敦子, 倉貫 早智, 佐藤 眞友美, 国政 和宏, 松浦 信康, 小倉 弘, 五十嵐 康弘, 及川 勉. 放線菌由来 nocardipyron E によるアディポネクチン分泌促進. 第 132 回日本薬学会年会. 札幌. 2012. 3. 30.
- ② 及川 勉, 中村丁次, 倉貫早智, 池田 恵, 佐藤眞友美, 国政和宏. 2 型糖尿病克服のための新しい起爆剤の開発 - アディポネクチン発現促進物質の探索とその分子基盤の確立 -. 花王健康科学研究会 第 8 回研究助成成果報告会. 東京. 2011. 11. 5.
- ③ 池田 恵, 及川 勉. カフェイン酸誘導体によるアディポネクチン発現促進作用. 第 33 回日本臨床栄養学会総会. 東京. 2011. 10. 28
- ④ Tsutomu Oikawa, Megumi Ikeda, Nobuyasu Matsuura, Mayumi Sato, Yasuhiro Igarashi, Teiji Nakamura. Norlichexanthone, A Fungal Metabolite

Promotes the Secretion and Expression of Adiponectin in Cultured ST-13 Adipocytes. The 23rd International Congress on Heterocyclic Chemistry. Glasgow. 2011. 8. 2.

- ⑤ 池田 恵, 植村美子, 元島敦子, 倉貫早智, 佐藤眞友美, 松浦信康, 五十嵐康弘, 中村丁次, 及川 勉. 放線菌由来 nocardipyron B によるアディポネクチン分泌促進. 第 131 回日本薬学会年会. 静岡. 2011. 3. 31.
- ⑥ 田中 裕貴, 奥 直也, Watanalai Panbangred, 仁平 卓也, 池田 恵, 及川 勉, 五十嵐 康弘. タイ土壤由来 *Streptomyces* 属放線菌の生産する新規化合物 prajinamide の構造決定. 日本農芸化学会 2011 年度大会. 京都. 2011. 3. 27.
- ⑦ 国政和宏, 太田敏郎, 家森幸男, 池田 恵, 倉貫早智, 及川 勉. ポリメトキシフラボノイドであるノビレチンの細胞分化調節作用を介したアディポネクチン産生促進および血管新生抑制効果. 第 15 回日本フードファクター学会. 仙台. 2010. 10. 4.
- ⑧ 小倉 弘, 嶋崎良子, 林 健太郎, 今田千秋, Watanalai Panbangred, 仁平 卓, 及川 勉, 森 美穂, 塩見和朗, 奥 直也, 五十嵐康弘. 2 種類の Nocardiosis 属が生産する新規 pyrone 類の構造と生物活性. 第 25 回日本放線菌学会大会. 東京. 2010. 9. 2.
- ⑨ Tsutomu Oikawa, Kazuhiro Kunimasa, Megumi Ikeda, Sachi Kuranuki, Nobuyasu Matsuura, Minoru Ishikura, Satoshi Hibino. NOBILETIN, A POLYMETHOXYFLAVONOID, ENHANCES SECRETION OF ADIPONECTIN. XXIVth European Colloquium on Heterocyclic Chemistry. Vienna. 2010. 8. 24.
- ⑩ 池田恵, 井上元幹, 上野友利江, 倉貫早智, 佐藤眞友美, 松浦信康, 中田 忠, 斎藤臣雄, 長田裕之, 及川 勉. プロピオン酸誘導体によるアディポネクチン発現促進作用. 第 130 回日本薬学会年会. 岡山. 2010. 3. 29.
- ⑪ 池田 恵, 黒飛佳子, 浪川愛子, 倉貫早智, 佐藤眞友美, 松浦信康, 五十嵐康弘, 及川 勉. 糸状菌が産生する norlichexanthone によるアディポネクチン発現促進作用. 第 130 回日本薬学会年会. 岡山. 2010. 3. 29.
- ⑫ 于 林凱, Watanalai Panbangred, Idsada Lengvehasatit, 池田 恵, 及川 勉, 木谷 茂, 仁平 卓也, 五十嵐 康弘. 熱帯域放線菌からの新規生理活性物質探索 (1). 第 24 回日本放線菌学会大会. 秋

田. 2009. 7. 16.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

及川 勉 (OIKAWA TSUTOMU)

神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・
教授

研究者番号：40120141

(2) 研究分担者

佐藤 眞友美 (SATO MAYUMI)

(財) 東京都医学研究機構・東京都臨床医
学総合研究所・研究員

研究者番号：50124459

(3) 連携研究者

五十嵐 康弘 (IGARASHI YASUHIRO)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：20285059