

## 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31日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591144

研究課題名（和文） cPLA<sub>2</sub>制御による PPAR $\gamma$  活性化機序の解明と糖尿病大血管症抑制効果の証明研究課題名（英文） Effect of cPLA<sub>2</sub> inhibition on the prevention of diabetic macrovascular complication

研究代表者

松村 剛（MATSUMURA TAKESHI）

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20398192

研究成果の概要（和文）：

本研究は、cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)の制御による PPAR $\gamma$  活性化の機序を解明し、その効果を介した糖尿病大血管症抑制効果の有無を探索することを目的とし検討を行った。その結果、cPLA<sub>2</sub>の阻害がマクロファージにおいて COX-2 産生増加を介して PPAR $\gamma$  の活性化を誘導すること、マクロファージにおける動脈硬化促進因子の発現を抑制すること、さらに apoE 欠損マウスの動脈硬化進展を抑制することを見出した。これらの成果は、cPLA<sub>2</sub>が動脈硬化治療の標的分子であると共に、cPLA<sub>2</sub>阻害剤が糖尿病大血管症治療に有益である可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we investigated the mechanism(s) of PPAR $\gamma$  activation by inhibiting cPLA<sub>2</sub> on macrophages, and the anti-atherosclerotic effect of cPLA<sub>2</sub> inhibition in macrophages and apoE-deficient mice. We revealed that cPLA<sub>2</sub> inhibition induced cyclooxygenase-2 expression and subsequent 15d-PGJ<sub>2</sub> production, resulting PPAR $\gamma$  activation in macrophages. Inhibition of cPLA<sub>2</sub> suppressed LPS-induced TNF- $\alpha$  and MCP-1 expression, and induced ABCA1/G1 expression. Moreover, administration of cPLA<sub>2</sub> inhibitor, AACOCF3 suppressed the progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice. These results suggest that cPLA<sub>2</sub> inhibition has anti-atherosclerotic effects, and cPLA<sub>2</sub> may be one of the therapeutic targets for diabetic macrovascular complications.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖代謝異常、糖尿病大血管合併症

## 1. 研究開始当初の背景

わが国において、糖尿病患者数の増加は深刻な社会問題であり、その発症・進展の阻止に繋がる新規治療法の開発は、医療財政や患

者の QOL の改善に繋がる重要な命題である。phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)は長鎖脂肪酸生成に関与する酵素であるが、その PLA<sub>2</sub>ファミリーの一つである cytosolic PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)は、

細胞内のアラキドン酸生成に關与する重要な分子である。一方、核内レセプターの1つである peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )は、脂肪細胞分化に必須の転写因子であり、組織のインスリン感受性を亢進させることから糖尿病治療のターゲット分子の一つとなっている。さらに最近、この PPAR $\gamma$  は抗動脈硬化作用を持つことが *in vitro*、*in vivo* の系で証明されている。申請者は最近、cPLA<sub>2</sub> の阻害が脂肪細胞に対し PPAR $\gamma$  活性化を介して分化誘導を促進すること、さらに cPLA<sub>2</sub> の阻害剤投与は、高脂肪食付加マウスの耐糖能を改善することを見出した。一方、PPAR $\gamma$  活性化は抗動脈硬化作用をも持ちうることから、この cPLA<sub>2</sub> の負の制御が糖尿病大血管合併症に対し抑制効果を示す可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、マクロファージにおける cPLA<sub>2</sub> 阻害による PPAR $\gamma$  活性化機序の解明と、その PPAR $\gamma$  活性化を介した動脈硬化抑制作用の有無を検討するとともに、その機序を基にした糖尿病大血管合併症の新規治療法を確立することを主目的とする。

## 3. 研究の方法

細胞はマウスマクロファージ由来腫瘍細胞株である RAW264.7 細胞及びマウス腹腔マクロファージ(rM $\phi$ )を使用した。また cPLA<sub>2</sub> の特異的阻害は、阻害剤である AACOCF<sub>3</sub>、cPLA<sub>2</sub>i の投与もしくは cPLA<sub>2</sub> siRNA を遺伝子導入し行った。

- (1) PPAR $\gamma$  活性は PPAR $\gamma$  のリガンド結合部位の C 端側に Ga14 蛋白を結合させた変異蛋白発現ベクター (pMX-PPAR $\gamma$ ) と Ga14 の DNA 結合領域をその上流に持つ luciferase reporter plasmid (p4xUASg-tk-luc) を RAW、(rM $\phi$ ) に遺伝子導入し各種刺激の後に luciferase 活性の測定を行い検討した。
- (2) 細胞内長鎖脂肪酸含有量はガスクロマトグラフィーにて検討した。
- (3) cyclooxygenase-2 (COX-2) の産生は、Western blot 法にて検討した。
- (4) 細胞内 15d-PGJ<sub>2</sub> 量の測定は、Enzyme Immunoassay 法にて検討した。
- (5) TNF- $\alpha$ 、MCP-1 産生は real-time RT-PCR 法による mRNA 発現量にて検討した。
- (6) 動脈硬化モデルマウスとして Apolipoprotein E 欠損 (apoE-KO) マウスを用い、8 週齢のこのマウスに AACOCF<sub>3</sub> 投与を行い、その 8 週後のマウスの上下

行大動脈を採取、Oil-Red-O 染色での粥状動脈硬化巣の進展度を評価した。さらに、マウス大動脈洞部を採取し、同組織での粥状動脈硬化巣の進展度を Oil-Red-O 染色で観察した。加えて、採取した大動脈組織に対し、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、ABCA1/G1 発現量を Real-time RT-PCR 法にて解析した。また、同組織での PPAR $\gamma$  活性をコマーシャルベースの ELISA キットにて測定した。

## 4. 研究成果

<平成21年度に実施した研究の成果>

cPLA<sub>2</sub> 制御による PPAR $\gamma$  活性化機序を明らかにする目的で以下の結果を得た。

- (1) RAW264.7 細胞への AACOCF<sub>3</sub>、cPLA<sub>2</sub>i の添加により、その濃度依存的に PPAR $\gamma$  の活性化が認められた (図 1, 2)。また、cPLA<sub>2</sub> siRNA により cPLA<sub>2</sub> 発現を阻害させた RAW264.7 細胞でも、同様に PPAR $\gamma$  の活性化が認められた (図 3)。

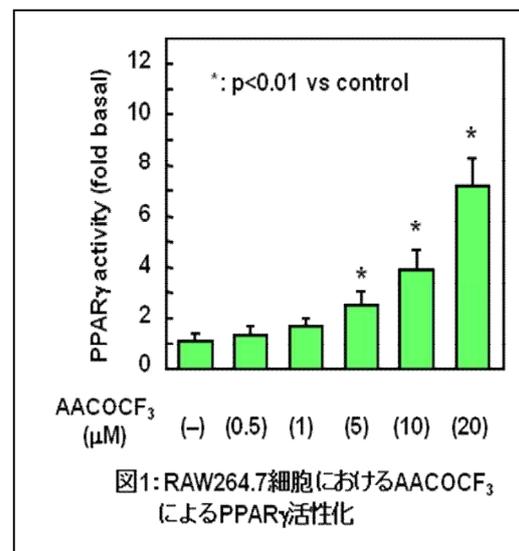


図1: RAW264.7細胞におけるAACOCF<sub>3</sub>によるPPAR $\gamma$ 活性化

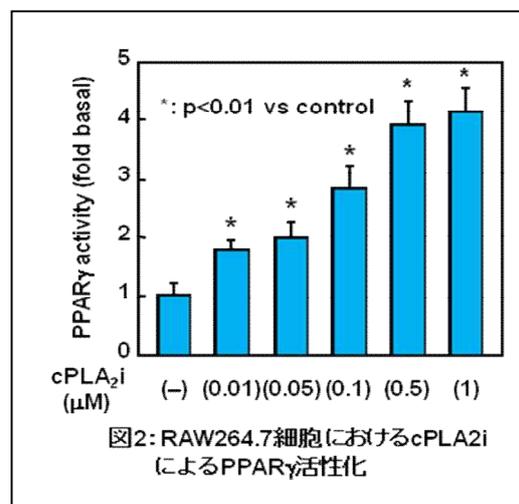


図2: RAW264.7細胞におけるcPLA<sub>2</sub>iによるPPAR $\gamma$ 活性化

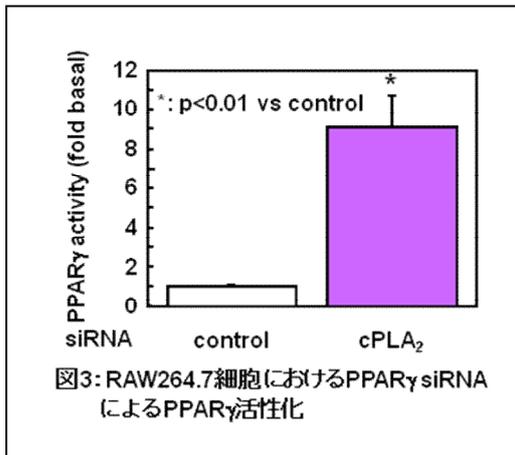


図3: RAW264.7細胞におけるPPAR $\gamma$  siRNAによるPPAR $\gamma$ 活性化

- (2) RAW264.7細胞への AACOCF $_3$ 、cPLA $_2$ i 添加により長鎖脂肪酸（アラキドン酸等）の産生低下及び 15d-PGJ $_2$  の産生上昇を認めた。
- (3) RAW264.7細胞への AACOCF $_3$  添加により cyclooxygenase-2 (COX-2) の産生増加を認めた。
- (4) また COX-2 siRNA の遺伝子導入 RAW264.7 細胞では AACOCF $_3$  添加による PPAR $\gamma$  活性化の抑制効果を認めた。

以上の結果から、マクロファージにおいて cPLA $_2$  の阻害が PPAR $\gamma$  の活性化を誘導すること、その機序として COX-2 の産生増加を介した 15d-PGJ $_2$  の産生上昇が関与することが示唆された。

<平成22年度に実施した研究の成果>

平成22年度は、cPLA $_2$ 制御によるマクロファージにおける動脈硬化進展抑制効果について、以下の結果を得た。

- (1) 20  $\mu$ M の AACOCF $_3$  で1時間前処置した rM $\phi$  では、1  $\mu$ g/ml の LPS 刺激による TNF- $\alpha$ 、MCP-1 の mRNA の産生は、コントロールと比較して有意に抑制を受けた。さらにこの cPLA $_2$  阻害剤による発現抑制効果は、PPAR $\gamma$  siRNA の遺伝子導入による PPAR $\gamma$  の産生抑制により有意に減弱した。
- (2) また、cPLA $_2$  siRNA の遺伝子導入により cPLA $_2$  の発現を阻害させた rM $\phi$  では、コントロール siRNA を遺伝子導入した rM $\phi$  と比較して、LPS による TNF- $\alpha$ 、MCP-1 産生が有意に減弱していた。
- (3) さらに rM $\phi$  への AACOCF $_3$  の添加、もしくは cPLA $_2$  siRNA の遺伝子導入した rM $\phi$  では、ABCA1、ABCG1 の産生誘導が mRNA レベルで認められた。またこの効果は PPAR $\gamma$  siRNA の遺伝子導入により減弱した。

以上の結果から、マクロファージにおいて cPLA $_2$  の阻害は、PPAR $\gamma$  の活性化を介して動脈硬化惹起因子の産生抑制や脱泡沫化作用を誘導し、その結果、抗動脈硬化作用を發揮する可能性が示唆された。

<平成23年度に実施した研究の成果>

平成23年度は、cPLA $_2$ 制御による動脈硬化進展抑制効果について apoE KO マウスを用い、以下の結果を得た。

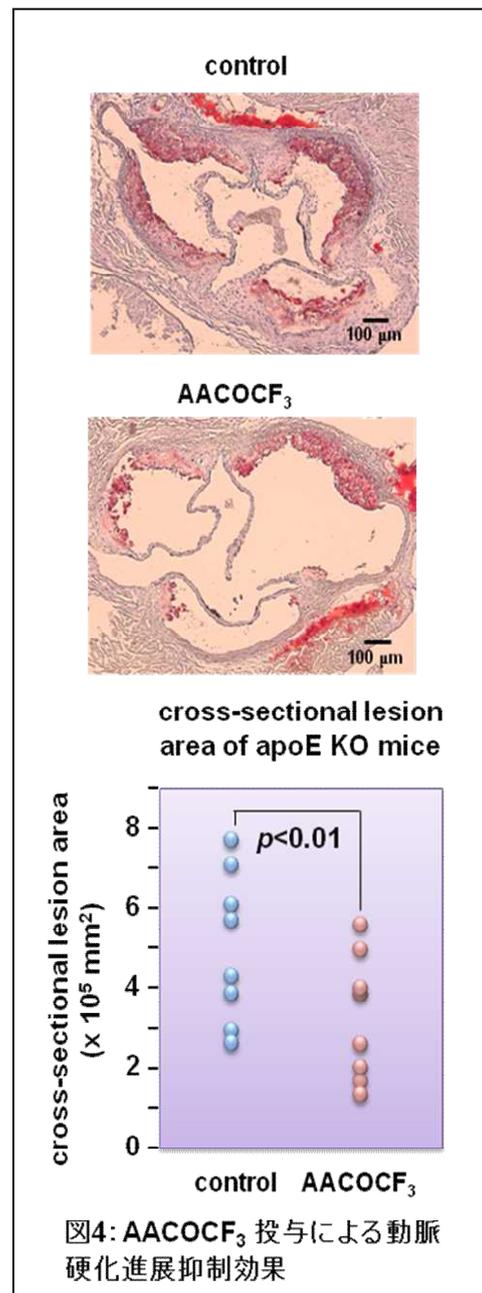
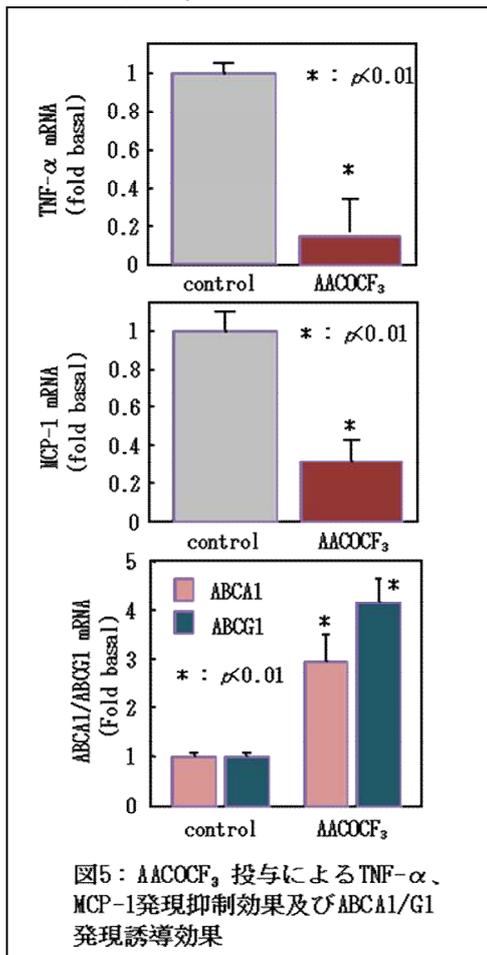


図4: AACOCF $_3$  投与による動脈硬化進展抑制効果

- (1) 動脈硬化モデルマウスとして6週齢の apoE KO マウスに対し、高コレステロール食付加と同時に AACOCF $_3$  を 5 mg/kg/日の投与量にて経口投与する群、AACOCF $_3$  を投与しない高コレステロール食付加のみの群

の2群に分け、経口投与開始8週後のこれらのマウスの大動脈洞部の組織を採取。この組織にOil-Red-O染色を行ったところ、AACOCF<sub>3</sub>投与群では粥状動脈硬化巣の進展の有意な抑制が認められた(図4)。

- (2) 採取した大動脈組織に対し、PPAR $\gamma$ 活性を測定したところ、AACOCF<sub>3</sub>投与群ではPPAR $\gamma$ 活性の有意な上昇を認めた。さらにTNF- $\alpha$ 、MCP-1、ABCA1発現量をmRNAレベルで比較検討したところ、AACOCF<sub>3</sub>投与群ではTNF- $\alpha$ 、MCP-1 mRNA発現の有意な低下が、ABCA1 mRNA発現の有意な上昇を認めた(図5)。



以上の結果から、AACOCF<sub>3</sub>投与によるcPLA<sub>2</sub>の阻害は、PPAR $\gamma$ の活性化を介して動脈硬化惹起因子産生抑制や脱泡沫化作用を誘導し、その結果、抗動脈硬化作用を発揮する可能性が示唆された。

これら平成21年度、平成22年度、平成23年度で得られた研究の成果は、cPLA<sub>2</sub>が糖尿病大血管症としての動脈硬化治療の標的分子であると共に、cPLA<sub>2</sub>阻害剤がこの糖尿病大血管症治療に有益である可能性を示唆している。

## 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 35 件)

1. Matsumura T, Taketa K, Shimoda S, Araki E. Thiazolidinedione-independent activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  is a potential target for diabetic macrovascular complications. *J Diabetes Invest.* 3;11-23, 2012. 査読有
2. Kondo T, Sasaki K, Matsuyama R, Morino-Koga S, Adachi H, Suico MA, Kawashima J, Motoshima H, Furukawa N, Kai H, Araki E. Hyperthermia With Mild Electrical Stimulation Protects Pancreatic  $\beta$ -Cells From Cell Stresses and Apoptosis. *Diabetes.* 61:837-847, 2012. 査読有
3. Tsutsumi A, Motoshima H, Kondo T, Kawasaki S, Matsumura T, Hanatani S, Igata M, Ishii N, Kinoshita H, Kawashima J, Taketa K, Furukawa N, Tsuruzoe K, Nishikawa T, Araki E. Caloric restriction decreases ER stress in liver and adipose tissue in ob/ob mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 404:339-344, 2011. 査読有
4. Matsumura T, Kinoshita H, Ishii N, Fukuda K, Motoshima H, Senokuchi T, Taketa K, Kawasaki S, Nishimaki-Mogami T, Kawada T, Nishikawa T, Araki E. Telmisartan exerts anti-atherosclerotic effects by activating PPAR $\gamma$  in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31:1268-1275, 2011. 査読有
5. Adachi H, Kondo T, Koh GY, Nagy A, Oike Y, Araki E. Angptl4 deficiency decreases serum triglyceride levels in low-density lipoprotein receptor knockout mice and streptozotocin-induced diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 409:177-180, 2011. 査読有
6. Sopsakis VR, Liu P, Suzuki R, Kondo T, Winnay J, Tran TT, Asano T, Smyth G, Sajan MP, Farese RV, Kahn CR, Zhao JJ. Unique Roles of the p110 $\alpha$  Isoform of Phosphoinositide 3-kinase in

- Hepatic Insulin Signaling and Metabolic Regulation. *Cell Metab.* 11:220-230, 2010. 査読有
7. Ishii N, Matsumura T, Kinoshita H, Fukuda K, Motoshima H, Senokuchi T, Nakao S, Tsutsumi A, Kim-Mitsuyama S, Kawada T, Takeya M, Miyamura N, Nishikawa T, Araki E. Nifedipine induces peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation in macrophages and suppresses the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30:1598-1605, 2010. 査読有
  8. Adachi H, Kondo T, Ogawa R, Sasaki K, Morino-Koga S, Sakakida M, Kawashima J, Motoshima H, Furukawa N, Tsuruzoe K, Miyamura N, Kai H, Araki E. An Acyclic Polyisoprenoid Derivative, Geranylgeranylacetone Protects Against Visceral Adiposity and Insulin Resistance in High Fat Fed Mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299:E764-E771, 2010. 査読有
  9. Yamashiro T, Nishikawa T, Isami S, Wei CN, Fukumoto K, Matsuo H, Yoshinaga T, Kukidome D, Motoshima H, Matsumura T, Ueda A, Araki E. The effect of group-based lifestyle interventions on risk factors and insulin resistance in subjects at risk for metabolic syndrome: the Tabaruzaka Study 1. *Diabetes Obes Metab.* 12:790-797, 2010. 査読有
  10. Fujisawa K, Nishikawa T, Kukidome D, Imoto K, Yamashiro T, Motoshima H, Matsumura T, Araki E. TZDs reduce mitochondrial ROS production and enhance mitochondrial biogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 379:43-48, 2009. 査読有
  11. Adachi H, Fujiwara Y, Kondo T, Nishikawa T, Ogawa R, Matsumura T, Ishii N, Nagai R, Miyata K, Tabata M, Motoshima H, Furukawa N, Tsuruzoe K, Kawashima J, Takeya M, Yamashita S, Koh GY, Nagy A, Suda T, Oike Y, Araki E Angptl 4 deficiency improves lipid metabolism, suppresses foam cell formation and protects against atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 379:806-811, 2009. 査読有
  12. Ishii N, Matsumura T, Kinoshita H, Motoshima H, Kojima K, Tsutsumi A, Kawasaki S, Yano M, Senokuchi T, Asano T, Nishikawa T, Araki E. Activation of AMP-activated protein kinase suppresses oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage proliferation. *J Biol Chem.* 284:34561-34569, 2009. 査読有
  13. Kai H, Suico MA, Morino S, Kondo T, Oba M, Noguchi M, Shuto T, Araki E A novel combination of mild electrical stimulation and hyperthermia: general concepts and applications. *Int J Hyperthermia.* 25:655-660, 2009. 査読有
  14. Takaishi K, Miyoshi J, Matsumura T, Honda R, Ohba T, Katabuchi H. Hypertriglyceridemic acute pancreatitis during pregnancy: prevention with diet therapy and omega-3 fatty acids in the following pregnancy. *Nutrition.* 25:1094-1097, 2009. 査読有
- [学会発表] (計 33 件)
1. 松村剛: 血管構成細胞における新規 PPAR $\gamma$  活性化機序と動脈硬化進展抑制効果. 第 26 回日本糖尿病合併症学会, 2011/10/14-2011/10/15, 大宮ソニックシティ, さいたま, シンポジウム
  2. Matsumura T, Ishii N, Kinoshita H, Fukuda K, Senokuchi T, Nishikawa T, Araki E: Association of circulating monocyte count with carotid intima-medial thickness in Japanese subjects with type 2 diabetes. 第 43 回日本動脈硬化学会総会, 2011/7/15-2011/7/16, ロイトン札幌, 札幌
  3. 松村剛, 竹田佳代, 本島寛之, 石井規夫, 嶋田さやか, 木下博之, 福田一起, 西川武志, 荒木栄一: 2 型糖尿病における大血管合併症進展の指標としての血中単球数の有用性. 第 54 回日本糖尿病学会総会, 2011/5/19-2011/5/21, さっぽろ芸術文化の館・その他, 札幌
  4. 本島寛之, 湯浅智之, 堤厚之, 井形元維, 近藤龍也, 河島淳司, 松村剛, 福永麻希子, 前田貴子, 川崎修二, 花谷聡子, 石井規夫, 下田誠也, 古川昇, 水流添覚, 西川武志, 蛭名洋介, 荒木

- 栄一：血糖指標としての血中可溶性インスリン受容体  $\alpha$ -ステロイドによる糖代謝悪化を検出できるのか？-。第54回日本糖尿病学会総会，2011/5/19-2011/5/21，さっぽろ芸術文化の館・その他，札幌
5. 松村剛，荒木栄一：マクロファージにおける新規 PPAR $\gamma$  活性化機序の同定と糖尿病大血管合併症抑制への応用。第54回日本糖尿病学会総会，2011/5/19-2011/5/21，さっぽろ芸術文化の館・その他，札幌，シンポジウム
  6. 松村剛，本島寛之，竹田佳代，石井規夫，木下博之，福田一起，西川武志，荒木栄一：2型糖尿病における末梢血単球数とIMT肥厚度との関連。第48回日本糖尿病学会九州地方会，2010/10/29-2010/10/30，別府ビーコンプラザ，大分
  7. 本島寛之，湯浅智之，西川武志，下田誠也，近藤龍也，河島淳司，松村剛，後藤理英子，大久保美那，前田貴子，竹田佳代，山城武司，川崎修二，堤厚之，石井規夫，久木留大介，古川昇，水流添覚，宮村信博，蛭名洋介，荒木栄一：短期血糖コントロール指標としての血中可溶性インスリン受容体  $\alpha$  サブユニットの有用性。第53回日本糖尿病学会総会，2010/5/27-2010/5/29，ホテルグランヴィア岡山・岡山コンベンションセンター・その他，岡山
  8. Matsumura T，Ishii N，Kinoshita H，Motoshima H，Murata Y，Tsuruzoe K，Nishikawa T，Araki E：HMG-CoA reductase inhibitors ameliorate insulin resistance through PPAR $\gamma$  activation. 14th International Congress of Endocrinology，2010/3/26-2010/3/30，Kyoto International conference center，Kyoto，Japan，Poster
  9. 松村剛：新規 PPAR $\gamma$  活性化機序の同定と糖尿病大血管合併症発症・進展抑制効果の解明。第47回日本糖尿病学会九州地方会，2009/10/23-2009/10/24，リーガロイヤルホテル小倉，北九州，九州ノボ賞受賞講演
  10. 本島寛之，西川武志，湯浅智之，河島淳司，後藤理英子，小野薫，花谷聡子，木下博之，川崎修二，堤厚之，児島協，松村剛，近藤龍也，宮村信博，蛭名洋介，荒木栄一：血中インスリン受容体  $\alpha$  サブユニット量は血糖コントロール

指標となりえるか？ 第52回日本糖尿病学会総会，2009/5/22-2009/5/23，大阪国際会議場，大阪

〔図書〕(計2件)

1. 松村剛：脂質管理による合併症予防のエビデンス。Visual 糖尿病臨床のすべて 糖尿病合併症 鑑別ポイントとベスト管理法(荒木栄一編集主幹 西川武志 専門編集) p251-256，中山書店，東京，2011
2. 本島寛之，松村剛，荒木栄一：AMP キナーゼと動脈硬化。内分泌・糖尿病・代謝内科。33(2)：123-132，科学評論社，東京，2011

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松村 剛 (MATSUMURA TAKESHI)  
熊本大学・医学部付属病院・助教  
研究者番号：20398192

##### (2) 研究分担者

荒木 栄一 (ARAKI EIICHI)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：10253733

近藤 龍也 (KONDO TATSUYA)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号：70398204

本島 寛之 (MOTOSHIMA HIROYUKI)  
熊本大学・医学部付属病院・助教  
研究者番号：40398201

##### (3) 連携研究者

無し