

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450128

研究課題名(和文)異なるライフステージでの脂肪細胞のアラキドン酸カスケード反応経路の発現調節と役割

研究課題名(英文) Regulation and role of the arachidonate cascade reaction at different life stages of adipocytes

研究代表者

横田 一成 (Yokota, Kazushige)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：90158361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：培養系で脂肪細胞へ分化する能力を有する前駆脂肪細胞株のマウス3T3-L1細胞を用いて、生育期、分化誘導期、さらに成熟期におけるプロスタサイクリン、すなわちPGI₂の生合成調節機構や各ステージでのPGI₂やそのアゴニストやアンタゴニストの特異的な作用機構を明らかにすることを試みた。その結果、分化誘導期と成熟期において、PGI₂の生成を介した脂肪細胞の分化誘導や成熟過程の促進効果が確認された。

研究成果の概要(英文)： This study was undertaken to study the regulatory mechanisms of biosynthesis of prostaglandin (PG) I₂ called prostacyclin and specific action of its agonists and antagonists in cultured adipocytes at different life stages of adipogenesis including growth, differentiation, and maturation phases. These results revealed the stimulatory effects of endogenous and exogenous PGI₂ and the agonists for the IP receptor on cultured preadipogenic cells as well as the suppression by the IP antagonists at differentiation and maturation phases. The findings provided the evidence for the specific and unique roles of prostacyclin in the control of adipogenesis in cultured adipocytes.

研究分野：応用生物化学

キーワード： prostaglandin prostacyclin adipocyte adipogenesis IP receptor life stage PGI₂ preadipogenic cells

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞とその前駆脂肪細胞は、アラキドン酸シクロオキシゲナーゼ経路により、複数のプロスタグランジン (PG)類を生合成する能力をもつ。これまでの研究で、一般的に、PGD₂ やその脱水化した関連物質の PGJ₂ 誘導体、さらに PGI₂ は、脂肪細胞形成に促進的であると報告されている。一方、PGE₂ や PGF_{2α} は、脂肪細胞の形成に阻害的であるといわれている。しかし、脂肪細胞の分化誘導や成熟過程に至るライフステージの違いや培養条件により、PG 類の生合成や作用は複雑である。

2. 研究の目的

今回の研究では、培養系で脂肪細胞へ分化する能力を有する前駆脂肪細胞株のマウス 3T3-L1 細胞を用いて、生育期、分化誘導期、さらに成熟期におけるプロスタサイクリン、すなわち PGI₂ の生合成調節機構や各ステージでの PGI₂ やそのアゴニストやアンタゴニストの特異的な作用機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験系として、培養細胞の前駆脂肪細胞株のマウス 3T3-L1 細胞を用いて、各ライフステージで生合成される PGI₂ の生成量を反映するものとして、直接の加水分解産物である 6-ケト-PGF_{1α} の生成量を測定した。そのため、6-ケト-PGF_{1α} に特異的なマウスの抗血清を調製して酵素免疫測定法を開発した。また、PGI₂ の生合成酵素である PGI 合成酵素や特異的な IP 受容体の遺伝子発現レベルを逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法で測定した。脂肪細胞形成の評価では、細胞内に蓄積しているトリアシルグリセロール量を定量した。さらに、内因性及外因性の PGI₂ の作用を評価する

ために、培養細胞の培地に外因性アラキドン酸の添加や PGI₂ の特異的なアゴニストやアンタゴニストの脂肪細胞形成に対する作用や細胞内のシグナル伝達機構を評価した。

4. 研究成果

今回の研究は、培養脂肪細胞の異なるステージでの脂肪細胞形成に対する、別名、プロスタグランジン(PG)I₂ と呼ばれるプロスタサイクリンの特異的な作用を、2つの観点から解明することを試みた。最初に、cAMP 濃度を増加させる因子のない条件下で、分化誘導期の培養前駆脂肪細胞をアラキドン酸で前処理したときの成熟期の脂肪細胞形成に対する効果を研究した。そして、次の研究は、培養脂肪細胞の成熟期における脂肪蓄積に対するプロスタサイクリンやプロスタノイド IP 受容体の選択的アゴニストが脂肪細胞の成熟期の脂肪蓄積に及ぼす影響を解明するために行ったものである。アラキドン酸(AA)とその関連物質のプロスタノイド類は、培養条件やライフステージより複雑な作用を及ぼす。ここでは、3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX)を含まない条件での分化誘導期における培養 3T3-L1 前駆脂肪細胞を外因性の AA で前処理したときの成熟期の脂肪蓄積に対する効果を検討した。このアラキドン酸による前処理は、脂肪細胞形成の遺伝子マーカーの発現の亢進で明らかのように、成熟期の脂肪細胞形成を有意に促進した。この AA での前処理の促進効果は、シクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害剤を共存させることにより抑制された。外因性のプロスタノイドやその関連物質のなかで、PGI₂ の IP 受容体に選択的なアゴニストである MRE-269 は、脂肪細胞での脂肪蓄積を著しく促進した。アラキドン酸 COX 経路の遺伝子発現の解析により、誘導性 COX-2、膜結合性 PGE 合成酵素-1、および

PGF 合成酵素は、AA で処理した培養前駆脂肪細胞でより大きく減少した。対照的に、COX-1、細胞質可溶性の PGE 合成酵素、および PGI 合成酵素は、常在性で一定のままであった。AA で培養前駆脂肪細胞を処理すると、分化誘導期において脂肪細胞形成に促進的な PGI₂ の生合成は促進されたが、脂肪細胞形成に抑制的な PG 類として作用する PGE₂ と PGF_{2α} の生成が減少するに至った。さらに、PGE₂ と PGF_{2α} のプロスタノイド受容体のそれぞれに対応する EP4 と FP の遺伝子発現レベルは、AA の添加により徐々に抑制されたが、対照的に PGI₂ の IP 受容体は比較的に一定であった。従って、これらの結果より、IBMX のない条件で分化誘導期に培養前駆脂肪細胞を AA で前処理したときの成熟期後の脂肪細胞形成に対する促進効果において、内因性 PGI₂ の主要な役割を暗示している。

私の研究室では、以前に、培養脂肪細胞が PGI 合成酵素とプロスタノイド IP 受容体の遺伝子発現する他、プロスタサイクリンとも呼ばれる PGI₂ を生合成する能力を持つことを示している。いかにプロスタサイクリンが脂肪細胞形成を制御しているかを解明するために、私は、培養脂肪細胞の成熟期の脂肪蓄積に対するプロスタサイクリンと IP 受容体の特異的アゴニストもしくはアンタゴニストの効果を探した。外因性の PGI₂ と、MRE-269 やトレプロスチニルのような IP 受容体に対する選択的なアゴニスト類は、COX 阻害剤のアスピリンによる脂肪蓄積の阻害を回復した。一方、CAY10441 や CAY10449 のような IP 受容体に対する選択的なアンタゴニストは、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR)_γ に特異的なアンタゴニストの GW9662 のように脂肪蓄積を抑制するのに効果的であった。従って、プロスタサイクリンの脂肪細胞形成の促進作用は、脂肪細胞の成

熟期に発現される IP 受容体を介する作用により説明できる。培養脂肪細胞を PPAR_γ の活性剤であるトログリタゾンとともに、PGI₂ と MRE-269 のいずれかと共培養すると、それぞれの化合物そのものよりも脂肪蓄積を付加的に促進することが示された。その MRE-269 とトログリタゾンの相加的な効果は、CAY10441 ではなくて GW9662 とともに培養することで、ほとんど抑制された。MRE-269 は GW9662 により抑制された脂肪細胞形成を回復することができなかったが、トログリタゾンの濃度を増加させると、CAY10441 の阻害効果を濃度依存的に回復することが見出された。このことは、IP 受容体を介する脂肪細胞形成の促進のための下流因子としての PPAR_γ の重要な役割を示している。培養脂肪細胞を細胞透過性の安定な cAMP 類縁体あるいは cAMP レベルを高める試薬としてのフォルスコリンで処理すると、アスピリンによる阻害効果が部分的に解除された。しかし、フォルスコリンにより増加した過剰の cAMP レベルは脂肪細胞形成を低下した。プロテインキナーゼ A (PKA) の細胞透過性阻害剤の H-89 の添加は、脂肪蓄積に対する PGI₂ もしくは MRE-269 の促進効果に影響を与えなかった。これにより、IP 受容体により仲介される脂肪細胞形成の促進には PKA の活性化が必要でないことが示唆される。脂肪細胞形成におけるプロスタサイクリンの作用機構やシグナル伝達機構に関しては、さらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Khan, F., Syeda, P. K., Nartey, M. N. N., Rahman, M. S., Islam, M. S., Nishimura, K., Jisaka, M., Shono, F., and Yokota, K.

Stimulation of fat storage by prostacyclin and selective agonists of prostanoid IP receptor during the maturation phase of cultured adipocytes. *Cytotechnology* 68, 2417-2429 (2016)、査読有、DOI: 10.1007/s10616-016-9960-7
Khan, F., Syeda, P. K., Nartey, M. N. N., Rahman, M. S., Islam, M. S., Nishimura, K., Jisaka, M., Shono, F., and Yokota, K.
Pretreatment of cultured preadipocytes with arachidonic acid during the differentiation phase without a cAMP-elevating agent enhances fat storage after the maturation phase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 123, 16-27 (2016)、査読有、DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2016.02.003
Rahman, M. S., Khan, F., Syeda, P. K., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Shono, F., and Yokota, K. Endogenous synthesis of prostacyclin was positively regulated during the maturation phase of cultured adipocytes. *Cytotechnology* 66, 635-646 (2014)、査読有、DOI: 10.1007/s10616-013-9616-9
Rahman, M. S., Syeda, P. K., Khan, F., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Shono, F., and Yokota, K.
Cultured preadipocytes undergoing stable transfection with cyclooxygenase-1 in the antisense direction accelerate adipogenesis during the maturation phase of adipocytes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171, 1228-144 (2013)、査読有、DOI: 10.1007/s12010-013-0347-3

Comparison of pro-adipogenic effects between prostaglandin (PG) D₂ and its stable isometric analogue, 11-deoxy-11-methylene-PGD₂. Syeda, P. K., Rahman, M. S., Chowdhury, M. M. I., Nishimura, K., Shimizu, H., Jisaka, M., Shono, F., and Yokota, K. 47th Annual Meeting of Chu-Shikoku Division in the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, Shimane University (Matsue), 28 Jan 2017.
Exogenous arachidonic acid up-regulates adipogenesis program of cultured preadipocytes during the differentiation phase without a cAMP-elevating agent. Nartey, M. N. N., Syeda, P. K., Rahman, M. S., Chowdhury, M. M. I., Nishimura, K., Shimizu, H., Jisaka, M., Shono, F., and Yokota, K. 47th Annual Meeting of Chu-Shikoku Division in the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, Shimane University (Matsue), 28 Jan 2017.
Stimulation of adipogenesis after the maturation phase by pretreatment of cultured preadipocytes with arachidonic acid during the differentiation phase without a cAMP-elevating agent. Ferdous Khan, F., Nartey, M. N. N., Syeda, P. K., Rahman, M. S., Nishimura, K., Jisaka, M., Shimizu, H., Shono, F., and Yokota, K. The 89th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Sendai International Center (Sendai), 26 Sep 2016.
11-Deoxy-11-methylene-prostaglandin (PG) D₂ exerts pro-adipogenic effect on cultured adipocytes during the maturation phase through cellular mechanism different from

that of natural PGD₂. Fatema, P. K. S. K., Islam, M. S., Khan, F., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Shono, F., and Yokota, K. 40th Annual Meeting of Chu-Shikoku Division in the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, Tokushima University (Tokushima), 27 Sep 2014.

Biosynthesis of prostacyclin and its action is up-regulated during the maturation phase of adipocytes. Khan, F., Rahman, M. S., Fatema, P. K. S. K., Islam, M. S., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Shono, F., and Yokota, K. 40th Annual Meeting of Chu-Shikoku Division in the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, Tokushima University (Tokushima), 27 Sep 2014.

Up-regulation of prostacyclin biosynthesis and its response after the maturation phase of adipocytes. Rahman, M. S., Khan, F., Fatema, P. K. S. K., Islam, M. S., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Shono, F., and Yokota, K. The 87th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Tokushima University (Tokushima), 27 Sep 2014.

Biosynthesis of prostacyclin serving as a biomarker for enhanced adipogenesis program in cultured adipocytes. Rahman, M. S., Khan, F., Syeda, P. K., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Shono, F., and Yokota, K. 13th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases, Seattle (USA), 12 Oct 2013.

Stable transfection of cultured preadipocytes with cyclooxygenase-1 in the antisense direction up-regulates adipogenesis during

the maturation phase of adipocytes. Rahman, M. S., Syeda, P. K. Khan, F., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Shono, F., and Yokota, K. 13th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases, Seattle (USA), 12 Oct 2013.

Stimulation of adipogenesis with 11-deoxy-11-methylene-PGD₂, a stable, isosteric analogue of PGD₂, during the maturation phase of adipocytes. Fatema, P. K. S. K., Khan, F., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Shono, F., and Yokota, K. The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Yokohama Pacifico (Yokohama), 11 Sep 2013.

Biosynthesis of prostaglandin I₂ at different life stages of cultured adipocytes as determined by the immunological assay for its stable hydrolysis product. Khan, F., Rahman, M. S., Syeda, P. K., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Shono, F., and Yokota, K. 36th Annual Meeting of Chushikoku Region, Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, Shimane University (Matsue), 8 Jun 2013.

Pro-adipogenic effect of 11-deoxy-11-methylene-prostaglandin (PG) D₂, a stable, isosteric analogue of PGD₂, during the maturation phase of adipocytes. Fatema, P. K. S. K., Khan, F., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Shono, F., and Yokota, K. 36th Annual Meeting of Chushikoku Region, Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, Shimane University (Matsue), 8 Jun 2013.

[図書] (計 1 件)

Yokota, K., Kimura, H., Ogawa, S., Jisaka, M. Analysis of highly polymeric proanthocyanidins from seed shells of Japanese horse chestnut and their health benefits.
“ Procyanidins: Characterisation, Antioxidant Properties and Health Benefits, Series: Biochemistry Research Trends”, (Edited by Chedea, VS), ISBN: 978-1-53610-282-6, Nova Science Publishers, New York, pp. 69-89 (2016).

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

横田 一成 (YOKOTA, Kazushige)
島根大学・生物資源科学部・教授
研究者番号 : 90158361

(3) 連携研究者

地坂 光生 (JISAKA, Mitsuo)
島根大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号 : 60243424

西村 浩二 (NISHIMURA, Kohji)
島根大学・生物資源科学部・助教
研究者番号 : 30304257

(4) 研究協力者

庄野 文章 (SHONO, Fumiaki)