

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450161

研究課題名(和文)食品イソチオシアネート化合物によるインスリン様活性の発現機序の解析

研究課題名(英文)Analysis of mechanism of insulin-like activity by isothiocyanate compounds

研究代表者

伊藤 芳明 (ITO, YOSHIAKI)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：50312517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、アブラナ科野菜等に含まれるイソチオシアネート化合物の抗糖尿病効果の作用機序の解明を目的として、第1にイソチオシアネート化合物の1つであるphenethyl isothiocyanate (PEITC)がAktやErkの活性化を介してインスリン様作用を発現していること、第2にPEITCによるEGF受容体family分子であるErbBの活性化が部分的にAktの活性誘導に関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate mechanism of the anti-diabetic effect of isothiocyanate compounds containing cruciferous vegetables, we examined which signaling pathways were induced by phenethyl isothiocyanate (PEITC) in rat H4IIE cells. PEITC induced the phosphorylation of Akt, ERK, and p38. When H4IIE cells were incubated in the presence of PEITC, the expression of G6Pase mRNA was suppressed. Suppressive effect of PEITC on G6Pase expression was abolished by inhibition of Akt or ERK. On the contrary, effect of PEITC on expression of G6Pase was enhanced by inhibition of p38. The changes in expression of G6Pase mRNA treated with inhibitors were consistent with activities of glucose release into medium from cells. These data demonstrate that PEITC has suppressive effect of gluconeogenesis through Akt and ERK pathway in H4IIE cells. Conversely, it is likely that activation of p38 by PEITC causes the opposite effect on regulation of gluconeogenesis by PEITC.

研究分野：栄養化学

キーワード：糖尿病 食品機能 イソチオシアネート インスリン 糖新生

1. 研究開始当初の背景

日常摂取する機会の多い野菜類であるアブラナ科植物の大根やブロッコリー、クレソンなどには、辛味成分としても知られるイソチオシアネート化合物が含まれている。この化合物は転写因子 Nrf2 の活性化を介して、解毒作用や抗酸化活性に関わる酵素の発現を誘導し、抗酸化、抗炎症効果、がん予防効果などの機能性を発揮することが報告されているが、私たちはこれまでに新たに抗生活習慣病効果として、糖尿病態緩和効果を明らかにしてきた。

もともとの研究の端緒は、地域農産物の機能性探索研究から沢わさび(岩手県はわさび生産3位)にアルツハイマー病や糖尿病と深い繋がりのある GSK-3 (glycogen synthase kinase-3) に対する阻害活性がある化合物として、6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (6MSITC)を見出したことにある。私たちは、これまでにその有効性を細胞や病態モデルで検証し、抗糖尿病効果(インスリン様作用)を明らかにしてきた。さらに、他のイソチオシアネート化合物でも検討を進め、類似の効果がブロッコリーに含まれることで知られる sulforaphane、クレソンや西洋わさびなどに含まれる phenethyl isothiocyanate (PEITC)にあることを明らかにしてきた。これらイソチオシアネート化合物のインスリン様作用は、GSK-3 を介した機序の可能性もあるが、それだけで十分であるか、また化合物間で同様と考えて良いかなど不明な点も残されている。

イソチオシアネート化合物のインスリン様作用のモデル化合物として、中心的に機能解析を行っている PEITC において、ラット肝臓由来細胞 H4IIE を刺激した際、インスリンシグナルの下流である Akt を活性化する可能性を予備的に見出している。また、上述の PEITC のシグナル解析の中で、インスリン受容体チロシンキナーゼ基質であるシグナル分子、IRS-1 や IRS-2 とは異なる 180kDa 付近のタンパク質のチロシンリン酸化応答が起こることも見出したが、その分子の特定はできていない。また、Akt や 180kDa 付近のタンパク質などの PEITC のインスリン様作用発現への関与についても明らかでない。

2. 研究の目的

本研究は、上記の予備知見などに基づいてイソチオシアネート化合物による抗糖尿病効果の作用機序の解明を目的として、大きく分けて次の2つ項目に取り組んだ。

すなわち、

(1) アブラナ科野菜等の食材に含まれるイソチオシアネート化合物の1つである phenethyl isothiocyanate (PEITC) で活性化される、糖代謝調節に関わる細胞内シグナル分子の抗糖尿病効果の作用発現における関与の解明

(2) PEITC で誘導される未同定のチロシン

リン酸化されるタンパク質の動態解析である。

以上を通じて、アブラナ科野菜に多く含まれるイソチオシアネート化合物の代謝改善に対する有効性の分子的な基盤を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

本研究では、上記の2つの項目について、下記のような試験方法で検討を行った。

(1) ラット肝臓由来細胞 H4IIE を用いた PEITC のインスリン様作用発現に関わる細胞内シグナル分子の解析

PEITC 刺激による細胞内シグナル応答分子の動態解析

細胞を 6 cm dish に播き、コンフルエントとした後、DMEM + 0.1% BSA 培地に換え培養した。24 時間後、新たな DMEM + 0.1% BSA 培地に交換し細胞を培地に馴化した。経時的変化の検討にあたっては、PEITC 30 μ M を添加し 30、60、90 分間処理した。また、濃度依存性の検討では、PEITC を 10、15、30 μ M 添加し、60 分間処理した後、細胞を細胞溶解液 (RIPA lysis バッファー) で溶解し、Western blot 分析用のサンプルを調製した。

また、各シグナル分子の阻害剤を用いた検討では、細胞を上記と同様に DMEM + 0.1% BSA 培地で 24 時間血清飢餓状態とした後に、Akt 阻害剤 (Akt 1/2 kinase inhibitor, Akti)、ERK 阻害剤 (PD98059, PD)、p38 MAPK 阻害剤 (SB203580, SB) を培地に添加し、30 分間処理を行った後、PEITC 30 μ M を添加し 60 分間処理した。

PEITC 刺激で誘導される細胞内シグナル分子の糖新生抑制作用における機能解析

上記の検討から明らかになった PEITC 刺激で誘導される細胞内シグナル分子のインスリン様活性における役割を明らかにするために、糖新生律速酵素である glucose-6-phosphatase (G6Pase) の遺伝子発現と培地への糖放出量の変化を指標に検討を行った。

遺伝子発現の検討については、上記培養と同様にコンフルエントとした H4IIE 細胞を DMEM + 0.1% BSA 培地で 24 時間血清飢餓状態とした後、dexamethasone、Bt₂cAMP でそれぞれ終濃度 500 nM、0.1 mM で処理した。その際、PEITC を終濃度 15 μ M となるように処理し、併せて Akt 阻害剤 (Akti)、ERK 阻害剤 (PD)、p38 MAPK 阻害剤 (SB) のいずれかを添加した。24 時間培養後、AGPC 法により total RNA を抽出して G6Pase の遺伝子発現への影響を Northern blot 分析にて調べた。

糖放出量の検討については、コンフルエントした細胞を 24 時間血清飢餓状態とした後、上記同様 dexamethasone と Bt₂cAMP、PEITC 及び各種阻害剤で処理した。24 時間培養後、PBS

(-) 3 mL で 2 回洗浄し、glucose assay 用培地に交換し、糖新生基質として lactate および pyruvate を加え、さらに 4 時間培養した。その後、培地を回収し、glucose assay kit によって培地中のグルコース量を測定した。培地へのグルコース放出量は各プレートのタンパク質量を lowry 法で測定し、内部標準として補正した。

(2) PEITC で誘導される 180kDa 付近のチロシンリン酸化タンパク質の解析

PEITC で誘導される 180kDa 付近のチロシンリン酸化タンパク質の同定

コンフルエントになった H4IIE 細胞を 24 時間血清飢餓状態とした後、PEITC 30 μ M を添加し 60 分間処理した。また、insulin を 100 nM 添加し、5 分間処理した。それぞれの処理を行った細胞を界面活性剤の有無の差を利用して、細胞質画分および残渣画分（膜画分）に分画して Western blot 分析用サンプルを調製した。また別に全 lysate も調製した。

PEITC による ErbB3 の活性化とその生理機能の解析

上記と同じようにコンフルエントとした H4IIE 細胞を 24 時間血清飢餓状態とした後、ErbB 阻害剤を添加し、30 分間処理を行った後、PEITC 30 μ M を添加し 60 分間処理した。処理後、細胞は細胞溶解液 (RIPA lysis バッファー) で溶解し、Western blot 分析用のサンプルを調製した。

また、PEITC による糖新生抑制効果に対する ErbB3 シグナルの関与について、次のように評価した。コンフルエントとした細胞を 24 時間血清飢餓状態とした後、dexamethasone、Bt₂cAMP、PEITC 及び ErbB 阻害剤で処理した。24 時間培養後、AGPC 法により total RNA を抽出して G6Pase 遺伝子発現への影響を調べた。

(3) データ処理と統計処理

データは平均値 (AVG) と標準誤差 (SEM) で表し、平均値間の有意差検定には Macintosh InStat 3.0 (Graphpad) を使用し、3 群間以上の評価については Tukey multiple comparison post test により判定した。また、2 群における有意差は unpaired t-test により検定した。有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

(1) ラット肝臓由来細胞 H4IIE を用いた PEITC のインスリン様作用発現に関わる細胞内シグナル分子の解析

PEITC 刺激による細胞内シグナル応答分子の動態解析

H4IIE 細胞を PEITC 30 μ M で刺激したとき

の各種細胞シグナル分子の動態を検討したところ、処理時間 90 分までに Akt, ERK および p38 MAPK の活性化を認めた (図 1 から図 3)。また、それらのシグナル分子は PEITC 刺激に対して濃度依存的な応答も示した。一方、PEITC の溶媒であるエタノールによる影響は認められなかった。

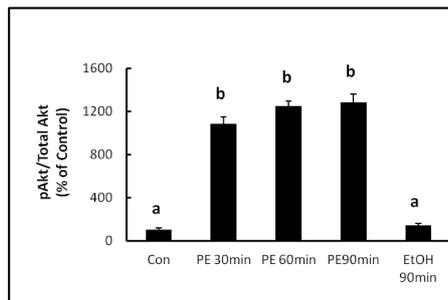


図 1 PEITC による Akt 活性の経時的な変化 PEITC を添加していない Control 群を 100% とした時の相対値を示す。値は Avg \pm SEM (n=4)、異なる記号間で有意差あり (p < 0.05)。

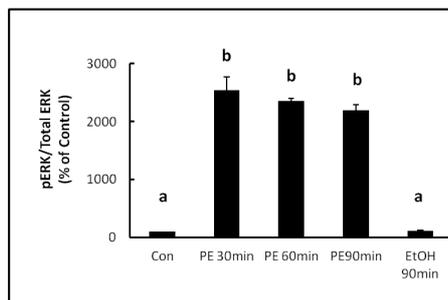


図 2 PEITC による ERK 活性の経時的な変化 PEITC を添加していない Control 群を 100% とした時の相対値を示す。値は Avg \pm SEM (n=4)、異なる記号間で有意差あり (p < 0.05)。

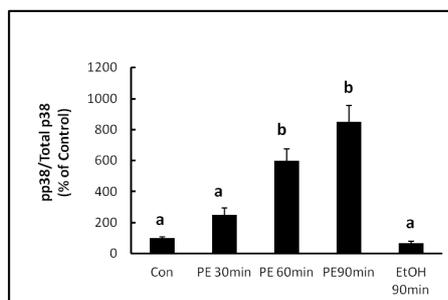


図 3 PEITC による p38MAPK 活性の経時変化 PEITC を添加していない Control 群を 100% とした時の相対値を示す。値は Avg \pm SEM (n=4)、異なる記号間で有意差あり (p < 0.05)。

また、上記のシグナル分子の特異的な阻害剤を用いて、その有効濃度を評価した。その有効濃度の結果に基づき、つぎの糖新生機能や培地への糖放出にどの分子が関与するのかを検討した。

PEITC 刺激で誘導される細胞内シグナル分子の糖新生抑制作用における機能解析

まず Akt と ERK の PEITC による糖新生抑制効果に対する役割について、それぞれの阻害剤を用いて検討した結果、両シグナルの阻害は PEITC の効果を阻害することが分かった (図4と図5)。この結果から、PEITC が活性化する Akt と ERK は PEITC の糖新生抑制作用を伝達するシグナル因子であると考えられた。一方、PEITC の作用機序における p38 MAPK の役割を検討したところ、PEITC と SB を同時に処理した群では G6Pase の遺伝子発現量が PEITC 単独で添加した群と比較すると有意に減少していた。この結果から、PEITC が活性化する p38 MAPK は、Akt や ERK とは異なり、PEITC の糖新生抑制効果にとって負の制御を担うシグナル因子であると考えられた。

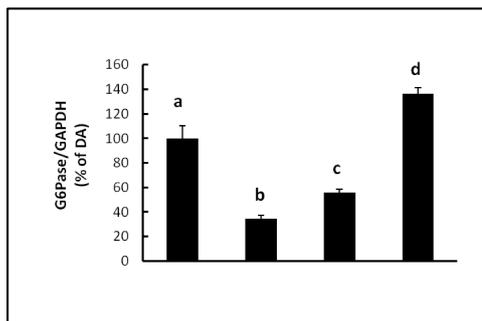


図4 PEITC による G6Pase 遺伝子発現抑制における Akt の関与
 グラフは左から Dex/Bt₂cAMP (DA)、DA+PEITC、DA+PEITC+Akti、DA+Akti 処理。DA を 100%とした時の相対値を示す。値は Avg ± SEM (DA、Akti 群は n=3、他 n=4)、異なる記号間で有意差あり (p < 0.05)。

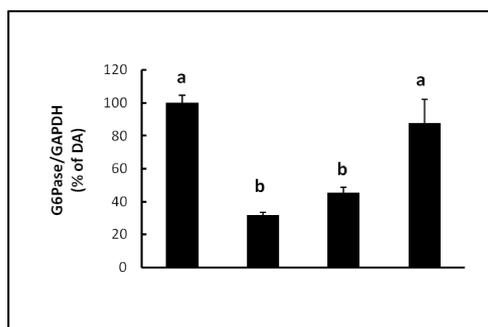


図5 PEITC による G6Pase 遺伝子発現抑制における ERK の関与
 グラフは左から Dex/Bt₂cAMP (DA)、DA+PEITC、DA+PEITC+PD、DA+PD 処理。DA を 100%とした時の相対値を示す。値は Avg ± SEM (DA、PD 群は n=3、他 n=4)、異なる記号間で有意差あり (p < 0.05)。また DA+PEITC と DA+PEITC+PD 群間には 2 群間で p=0.01 で有意な差が有る。

次に各阻害剤を用いたときの PEITC による G6Pase の遺伝子発現への影響が培地中の糖放出量に反映されているかどうか検討を行ったところ、培地への糖放出量は先述した G6Pase の発現量の変化と挙動がほぼ一致する結果となったことから生理的な応答を反

映していることが分かった (図6)。

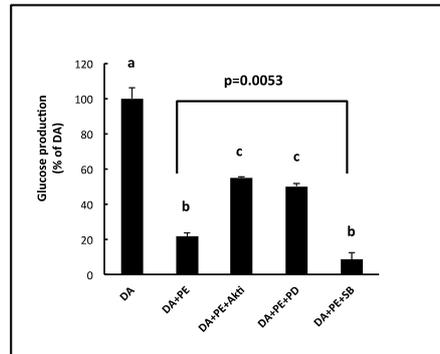


図6 各種阻害剤を添加した際の培地への糖放出量への影響

DA を 100%とした時の相対値を示す。Avg ± SEM (n=4)、異なる記号間で有意差あり (p < 0.05)。また、PEITC 単独処理群と PE+SB 群における 2 群間の差を unpaired t-test により検定した (p=0.0053)。

(2) PEITC で誘導される 180kDa 付近のチロシンリン酸化タンパク質の解析

PEITC で誘導される 180kDa 付近のチロシンリン酸化タンパク質の同定

全 lysate、細胞質画分、膜画分に分け、PEITC 刺激による 180kDa 付近のチロシンリン酸化タンパク質の動態を検討したところ、180kDa 付近のリン酸化タンパク質は膜画分にあることが分かった (図7)。インスリン受容体基質である IRS family タンパク質であれば、細胞質画分となるはずであるのでそれとは異なる分子であることが分かった。次に分子量から推定される分子の抗体を用いて、検出したところ、EGF 受容体 family である ErbB の 1 つであることが分かった (図8)。

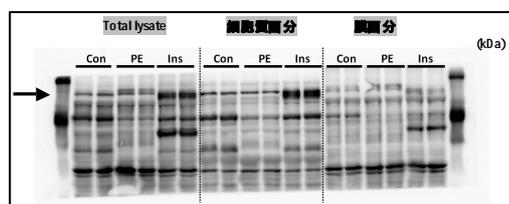


図7 PEITC および insulin 処理での全 lysate、細胞質画分、膜画分におけるチロシンリン酸化タンパク質の局在性

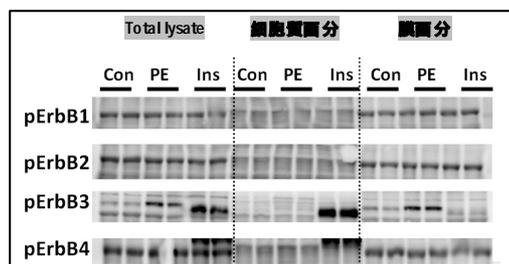


図8 total lysate、細胞質画分、膜画分における ErbB family のリン酸化応答

PEITC による ErbB3 の活性化とその生理機能の解析

PEITC で誘導される ErbB3 のリン酸化と、インスリン様活性に關与するシグナルとの關係を明らかにするため、ErbB3 阻害剤で処理したときの Akt や ERK の活性化と糖新生活性に対する影響を検討した。その結果、ErbB 阻害剤により PEITC 刺激に應答する Akt 活性は抑制されるものの ERK の活性は影響を受けないことが分かった。このことから ERK の活性は必ずしも ErbB の活性化に依存してないのに対して、Akt は ErbB を介して活性化が促されている可能性が示唆された。次に、G6Pase の発現抑制効果について評価したところ、ErbB 阻害剤の処理は G6Pase の抑制作用に影響を与えないことが分かった (図 9)。このことは、ErbB 阻害剤の影響を ERK が受けていないことに起因すると考えられた。

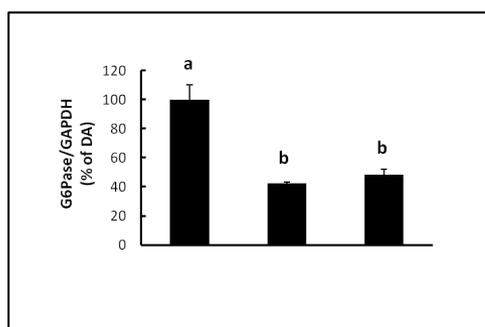


図 9 ErbB 阻害剤と PEITC 同時処理が G6Pase 遺伝子発現誘導に及ぼす影響
グラフは左から Dex/Bt₂cAMP (DA)、DA+PEITC、DA+PEITC+ErbB 阻害剤処理。DA を 100% とした時の相対値を示す。値は Avg ± SEM (n=3)、異なる記号間で有意差あり (p < 0.05)。

以上から、本研究によりアブラナ科野菜のように日常的に摂取される食材に含まれる成分であるイソチオシアネート化合物の健康機能に關わる作用機序の一部が明らかになった。今後は、ヒトなどでの試験を通じて高用量摂取した場合の安全性や実用的な効果について検証を行っていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Sato, T., Ito, Y., and Nagasawa, T. Attenuation of autophagic-proteolysis in C2C12 cells by saccharopine., *Mol. Cell Biochem.*, 査読有, 410 巻, 2015, 93-100

DOI:10. 1007/s11010-015-2541-9

Sato, T., Ito, Y., and Nagasawa, T. Lysine suppresses myofibrillar protein degradation by regulating the autophagic-lysosomal system through phosphorylation of Akt in C2C12 cells., *SpringerPlus*, 査読有, 3 巻, 2014, 584-595

DOI:10.1186/2193-1801-3-584

Yoshida, J., Seino, H., Ito, Y., Nakano, T., Satoh, T., Ogane, Y., Suwa, S., Koshino, H., and Kimura, K.-I. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by faltarindiol isolated from Japanese parsley (*Oenanthe javanica*)., *J. Agric. Food Chem.*, 査読有, 61 巻, 2013, 7515-7521

DOI:10.1021/jf401042m

〔学会発表〕(計 7 件)

鈴木安沙美、伊藤芳明、長澤孝志、フェネチルイソチオシアネートの糖新生抑制作用における ErbB3 の役割について、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 27-30 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

鈴木安沙美、伊藤芳明、長澤孝志、フェネチルイソチオシアネートのインスリン様活性における ErbB3 の關与について、日本栄養・食糧学会東北支部 (第 49 回大会)・日本栄養・食糧学会北海道支部 (第 45 回大会) 合同支部大会および公開シンポジウム、2015 年 10 月 24-25 日、東北大学農学部 (宮城県仙台市)

藤嶋拓巳、伊藤芳明、長澤孝志、正常マウス C57BL/6J における高脂肪食による肥満と摂取パターンに対するフェネチルイソチオシアネートの効果、日本栄養・食糧学会東北支部 (第 49 回大会)・日本栄養・食糧学会北海道支部 (第 45 回大会) 合同支部大会および公開シンポジウム、2015 年 10 月 24-25 日、東北大学農学部 (宮城県仙台市)

Asami Suzuki, Yoshiaki Ito, Takashi Nagasawa, Suppressive effect of phenethyl isothiocyanate on gluconeogenesis in rat hepatoma cell line H4IIE cells. ACN2015 12th Asian congress of nutrition, 2015 年 5 月 14-18 日、横浜国際平和会議場 (パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)

吉田潤、伊藤芳明、木村賢一、セリ科植物から得られた GSK-3 阻害物質 faltarindiol の肝細胞における糖新生抑制作用、2015 年度日本農芸化学大会、2015 年 3 月 26-29 日、岡山大学 (岡山県岡山市)

鈴木安沙美、伊藤芳明、長澤孝志、phenethyl isothiocyanate の糖尿病態緩和効果の解析、平成 26 年度公益法人日本農芸化学会北海道・東北合同支部大会、2014 年 9 月 22-23 日、北海道大学農学部 (北海道札幌市)

伊藤芳明、中鉢可奈子、涌井大輝、長澤孝志、わさび粉末混餌食摂取による薬剤誘導性肝障害からの保護効果、日本栄養・食糧学会第 67 回大会、2013 年 5 月 24-26 日、名古屋大学 (愛知県名古屋市)

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

伊藤 芳明 (ITO, Yoshiaki)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：50312517

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし