

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750048

研究課題名(和文) 新たな指標の導入を目指した革新的な抗肥満活性評価システムの構築

研究課題名(英文) Creation of a new method for assessing anti-obesity activity using 3T3-L1 adipocytes

研究代表者

海野 雄加 (Unno, Yuka)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：30433212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肥満は国民の健康において深刻な問題だが、エネルギー収支を基準とした個人の生活習慣の改善に委ねられており、抗肥満活性の統一的基準は十分に確立されていない。そこで申請者は、新規抗肥満活性評価・解析システムの構築を目指している。これまでに、脂肪蓄積量に代わり評価可能な生体因子の探索と、新規抗肥満活性阻害剤の探索を行い、免疫プロテアソーム阻害剤の中から抗肥満活性を有する新規化合物を見出している。免疫プロテアソームは炎症性サイトカイン刺激により増加するため、今後は、脂肪細胞での免疫プロテアソームの機能を明らかにすることで、単なる肥満ではなく炎症状態という悪性度の高い肥満を評価出来るシステムに改良したい。

研究成果の概要(英文)：Being obese raises the risk of developing type 2 diabetes and other associated health problems. For treatment of obesity, a large reduction in caloric intake, along with increased physical activity, can produce a loss body weight over. But control caloric intake is not easy for us. In this study, I challenged to find new biomarker for 'evaluation of anti-obesity activity' using adipocyte. I found that several proteasome inhibitors have suppression effect of adipogenic differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. Furthermore, one of proteasome inhibitors is selectivity towards immunoproteasome. These findings suggest that understanding roles of immunoproteasome in chronic local inflammation in adipose tissue is important for our study.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：肥満 炎症 脂肪細胞 プロテアソーム ヘテロクロマチン 分化

1. 研究開始当初の背景

肥満人口は増加の一途を辿っている。肥満からより深刻な動脈硬化症や糖尿病などの疾患に繋がることが多く、肥満人口の減少は医療費増加を抑制する重要な国家的課題として認識されるようになってきた。また、肥満は自分を律することのできない怠惰な生活の証と見なされるため、健康面だけでなく精神面でも「痩せること」が望まれるが、個人の努力では往々にして解消されない。そこで、肥満を改善するのに効果的な機能性食品や抗肥満薬の創出が期待されている。近年の分子細胞生物学の発展により、脂肪組織の理解が進んできている。脂肪細胞は余剰エネルギーを貯蔵するだけの細胞という理解から、様々な生理活性物質を分泌し、脂肪組織外の組織とも連携して生体の恒常性に貢献することがわかった。肥満モデルマウスの肥満の原因が脂肪細胞由来タンパク質の異常であるというエポックメイキングな研究報告(1994年)の後、肥満研究を行う研究者人口が一段と増加した。しかしながら、現状の抗肥満薬としては薬効が脂肪組織・脂肪細胞の脂肪蓄積に直接関わっていない食欲抑制や消化吸収抑制などで、分子細胞生物学的手法を用いた肥満研究が抗肥満薬の創出を通じて肥満人口の減少に貢献しているとは言い難い。その原因として、個体における肥満という現象と分子細胞生物学研究で使用される培養細胞レベルでの隔たりがあり、機能性食品創出や創薬の現場で抗肥満成分の探索手法が確立されていないことが挙げられる。そこで本研究では、細胞イメージング技術により抗肥満活性評価・解析システムを構築し、個体レベルでの肥満解消を予測可能なシステムへと磨き上げることを目指す。

2. 研究の目的

本研究では主に、1) 脂肪蓄積量解析と置き換えが可能な生体因子の探索、2) 新規抗肥満活性阻害剤の探索、を研究の両輪として進めていく。脂肪細胞の終末分化の指標である脂肪滴蓄積を数値化する抗肥満活性評価システムだけでなく、細胞が脂肪を蓄積するまでの過程を、分化決定・分化進展・終末分化の3段階に分割し、阻害化合物がどの段階の進行を阻害するかを解析できるシステムを構築する。これまでの科学研究費補助金(スタートアップ)による研究活動で、北海道大学の周東智教授との構成型プロテアソーム阻害化合物開発研究から得られた低分子化合物 OB-1 が試験管内において脂肪細胞の分化を有意に抑制することを発見した。そこで、分化の各段階で誘導される細胞内シグナルに対しての化合物 OB-1 の作用を解析し、発現タンパク質の量や局在情報の変化から新たな分化の指標を探索し、解析システムの構築に応用できないかを検討する。構築した抗肥満活性評価・解析システムの有用性を確

認するために、既に報告されている食品成分や抗肥満化合物群を検討することで、化合物 OB-1 と異なる作用機序で脂肪蓄積を阻害する化合物の獲得を試みる。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞への分化誘導

繊維芽細胞であるマウス胎児由来 3T3-L1 前駆脂肪細胞は、トリプシン処理により剥離し、35 mm 細胞培養ディッシュに 50,000 個で播種した。コンフルエントの状態から培養培地にて 2 日間、さらに分化誘導培地にて 2 日間、分化進展培地にて 2 日間培養することで、細胞内に中性脂肪を貯めた成熟脂肪細胞へと分化させた。細胞は分化誘導培地に置換後 3 日目で、細胞質中に中性脂肪を貯蔵するための脂肪滴が多数観察できた。その後、脂肪滴各々が大きく膨らんだ成熟脂肪細胞へと分化した。

(2) Oil-Red O 染色

脂肪細胞の終末分化の指標である脂肪滴蓄積は、Oil-Red O 染色法により評価した。

(3) リアルタイム PCR 解析

培養脂肪細胞から RNeasy (Qiagen) を用いて total RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により遺伝子発現変化を解析した。

(4) 核の形態学変化と経時的変化

3T3-L1 前駆脂肪細胞に GFP 融合 Histon H2B タンパク質をレンチウイルスにより導入した。その後通常通りに脂肪細胞へと分化誘導した。分化に伴う核の経時的変化は、蛍光顕微鏡を用いて 1 時間おきに観察を行い評価した。

(5) フィルトレート ELISA 法

免疫プロテアソームと化合物 OB-1 との結合性はフィルトレート ELISA 法により数値化した。免疫プロテアソームは化合物 OB-1 と反応させた後に、免疫プロテアソームの活性部位に結合するコントロール化合物と競合反応させた。コントロール化合物は予めビオチンを標識しており、アビジンビーズを用いてフィルタープレートでトラップした。抗 LMP7 抗体を用いた ELISA 法により、コントロール化合物と結合した免疫プロテアソームの量を数値化した。

4. 研究成果

本研究では主に、1) 脂肪蓄積量の解析に置き換わることが可能な生体因子の探索、2) 新規抗肥満活性阻害剤の探索、を行ってきた。1) に関しては、分化誘導培地に置換後、脂肪滴が観察される以前に核の形態が変化することを明らかにした(図 1)。蛍光顕微鏡下において、核の変化を経時的に観察すると、核が徐々に小さくなること、核全体の蛍光強度が強くなること、ヘテロクロマチンと予想出来る蛍光強度の強い箇所の数が増加することが明確となった。つまり、核に着目

した細胞イメージング技術が新たな分化指標と成り得る可能性が示された。また、分化に伴う 8 - ニトログアノシン発現の増強が明らかとなった。2) に関しては、これまでの共同研究から、新規抗がん剤の創製を目指したプロテアソーム阻害剤の合成展開に携わり、構成型プロテアソーム阻害剤の中から抗肥満活性を有する新規化合物 OB-I を見出していた。しかしながら、既存の構成型プロテアソーム阻害剤とは明らかに異なる阻害様式を示していたため、フィルトレータ ELISA 法などの試験管内の評価法を立ち上げることで、化合物 OB-I が免疫プロテアソームに選択的な阻害剤であることを明らかにした。この新規化合物は、培養脂肪細胞に毒性を示さない濃度域で分化抑制効果(約 3 μ M で完全に脂肪蓄積を抑制し、その効果は可逆的である)を発揮し、他の既存の構成型プロテアソーム阻害剤とは阻害様式が明らかに異なっていた。この理由として、脂肪細胞の終末分化に伴い構成型プロテアソームは免疫プロテアソームへと置き換わると予想されるため、終末分化した脂肪細胞では、免疫プロテアソームを中心とした炎症型の生理機能調節機構が存在すると考えた。化合物 OB-I で処理した培養脂肪細胞では、PPAR γ を代表とする分化誘導因子の発現阻害がメッセンジャーRNA レベルにて確認出来た。また、化合物 OB-I で処理をした細胞の培養上清より、アディポカインなどの分泌タンパク質発現変化を網羅的に解析しており、この結果は今後、阻害化合物の標的の同定に役立てたい。

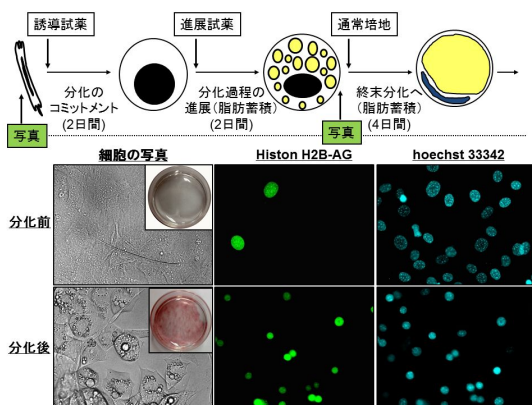


図 1：核の形態学変化と経時的変化

本研究の続きである「新たな指標の導入を目指した抗肥満活性評価・解析システムの実現」では、脂肪細胞中の免疫プロテアソームの存在を明らかにして、免疫プロテアソームにより発現制御を受ける新たな肥満のマーカーを見出したい。これにより、新たな抗肥満活性評価・解析システムの構築を目指す予定である。新規化合物群の発見により、肥満における学術研究の新たな切り口による進展だけでなく、学術研究の枠を超えた新機能性食品創製へと発展できると期待したい。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計6件)

Kawamura S, Unno Y, Asai A, Arisawa M, Shuto S : Development of a new class of proteasome inhibitors with an epoxyketone warhead: Rational hybridization of non-peptidic belactosin derivatives and peptide epoxyketones.

Bioorg. Med. Chem.(2014) 22. 3091-3095

査読有り

DOI: 10.1016/j.bmc.2014.04.032.

Kawamura S*, Unno Y*, Asai A, Arisawa M, Shuto S. : Structurally novel highly potent proteasome inhibitors created by the structure-based hybridization of nonpeptidic belactosin derivatives and peptide boronates. *equally contributed,

J. Med. Chem., 57, 2726-2735 (2014)

査読有り

DOI: 10.1021/jm500045x.

Kawamura S, Unno Y, Hirokawa T, Asai A, Arisawa M, Shuto S. : Rational hopping of a peptidic scaffold into non-peptidic scaffolds: structurally novel potent proteasome inhibitors derived from a natural product, belactosin A

Chem. Commun. (Camb)., 50, 2445-2447 (2014)

査読有り

DOI: 10.1039/c3cc48818g.

Kawamura S, Unno Y, Asai A, Arisawa M, Shuto S. : Design and synthesis of the stabilized analogs of belactosin A with the unnatural cis-cyclopropane structure.

Org. Biomol. Chem., 11, 6615-6622 (2013)

査読有り

DOI: 10.1039/c3ob41338a.

Kawamura S, Unno Y, Tanaka M, Sasaki T, Yamano A, Hirokawa T, Kameda T, Asai A, Arisawa M, Shuto S. : Investigation of the Non-Covalent Binding Mode of Covalent Proteasome Inhibitors around the Transition State by Combined Use of Cyclopropyllic Strain-Based Conformational Restriction and Computational Modeling.

J. Med. Chem., 56, 5829-5842 (2013)

査読有り

DOI: 10.1021/jm400542h.

Kawamura S*, Unno Y*, List A, Mizuno A, Tanaka M, Sasaki T, Arisawa M, Asai A, Groll M, Shuto S. : Potent Proteasome Inhibitors Derived from the Unnatural cis-Cyclopropane Isomer of Belactosin A: Synthesis, Biological Activity, and Mode of Action. *equally contributed,

J. Med. Chem., May 9 ; 56 : 3689-3700

(2013)

査読有り

DOI: 10.1021/jm4002296.

〔学会発表〕(計4件)

海野雄加、川村周平、周東智、浅井章良、
プロテアソーム阻害剤としての新規ベラ
クトシン A 誘導体の創製

第 37 回日本分子生物学会年会

海野雄加、周東智、浅井章良、
ベラクトシン A 誘導体の作用機序解析
第 18 回 日本がん分子標的治療学会
学術集会

海野雄加、川村周平、有澤光弘、周東智、
浅井章良、
新規ベラクトシン A 誘導体によるプロテア
ソーム阻害作用

第 31 回メディシナルケミストリーシンポ
ジウム

海野雄加、川村周平、有澤光弘、周東智、
浅井章良、
新規ベラクトシン A 誘導体によるプロテア
ソーム阻害作用

日本ケミカルバイオロジー学会 第 8 回年
会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海野 雄加 (UNNO, YUKA)

静岡県立大学・薬学研究院・助教

研究者番号：30433212