

機関番号：37116

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20611020

研究課題名 (和文) 新しい細胞膜エストロゲン受容体の基盤的研究とその受容体作動薬の探索

研究課題名 (英文) Basic study on a new membrane estrogen receptor and search for its selective agonist

研究代表者

柳原 延章 (YANAGIHARA NOBUYUKI)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：80140896

研究成果の概要 (和文)：植物性エストロゲンや植物由来化合物等によるカテコールアミン(CA)の動態に及ぼす影響について培養ウシ副腎髄質を用いて検討した。その結果、植物性エストロゲンである大豆のゲニステインやタバコの主要成分であるニコチンは、CA 再取り込みを促進した。また、蜜柑果皮成分のノビレチンはさらに、アセチルコリン誘導による CA 合成・分泌に抑制作用を示した。これらの結果から、今回の植物性エストロゲンや植物由来化合物は心臓血管系での保護作用の可能性を示唆した。

研究成果の概要 (英文)：In the present study, we examined the effects of phytoestrogens on catecholamine (CA) dynamics in cultured bovine adrenal medullary cells. Genistein, a soy phytoestrogen, and nicotine, a major component of tobacco, stimulated the function of norepinephrine transporter (NET). Nobiletin, a component of peel of citrus fruits, suppressed CA synthesis and secretion induced by acetylcholine. The present findings suggest that genistein, nicotine, and nobiletin have a pharmacological potential on cardiovascular protective effects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：細胞膜エストロゲン受容体、植物性エストロゲン、カテコールアミン

1. 研究開始当初の背景

気温の変化や精神的興奮、ストレスなどの外界からの刺激に対応して、体の状態を一定に保つために自律神経系が作動する。これを生体のホメオスターシス又は生体の恒常性と言い、この機能を維持するのが自律神経の役割である。

一方、エストロゲン作用を持つ植物性エストロゲンには、大豆のダイゼインやゲニ

ステイン等が知られている。この植物性エストロゲンの作用は、従来の女性ホルモン作用に加えて、物質代謝、骨代謝さらには心臓血管系や神経系への保護などの薬理作用や更年期障害（骨粗鬆症、ホットフラッシュ、うつ症状等）の予防等の効果が知られている。特に、更年期障害では自律神経系の異常が観察されるがそれら植物性エストロゲンの自律神経系への影響につ

いての報告はほとんどされてない。

2. 研究の目的

今回の研究では、植物性エストロゲンや植物由来化合物等による交感神経系の神経伝達物質であり副腎髄質での内分泌ホルモンであるカテコールアミン(CA)の動態に及ぼす影響について検討する。すなわち植物性エストロゲン等による CA 生合成や分泌、再取り込みへの影響について解析する。さらに、一酸化窒素(NO)神経系の機能を遺伝子的に欠失させた NO 合成酵素完全欠損マウスにおける影響についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 交感神経系のモデル実験である培養ウシ副腎髄質細胞を用いての検討

① 食肉センターより供与されたウシ副腎髄質から細胞を分離し、さらに Eagle's MEM 及び仔牛血清を用いて CO₂ インキュベーター内で培養する。

② ノルエピネフリントランスポーター (NET) 活性の検討

CA 再取り込みには、³H-NE の副腎髄質細胞内への取り込みを測定する。NET mRNA は RT-PCR 法を用いて定量する。

③ CA 生合成及び分泌の検討

CA 生合成やチロシン水酸化酵素活性の定量には ¹⁴C-tyrosine を用いて定量する。アセチルコリン受容体刺激による CA 生合成、分泌に対して植物由来化合物等の影響を検討する。

(2) トリプル NOS-KO マウスでの検討

野生型およびトリプル NOS-KO マウスを用いて検討する。尚、このトリプル NOS-KO マウスの作成については、それぞれ産業医科大学動物実験審査委員会及び遺伝子組換え実験安全委員会の承認(承認番号 AE07-027 及び組換え DNA 承認番号 017-054)を受けている。

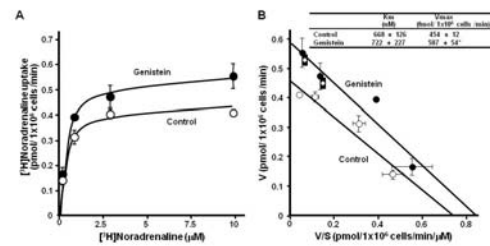
4. 研究成果

(1) 大豆成分のゲニステインのノルエピネフリントランスポーター活性に及ぼす影響

ゲニステインによる NET 活性に及ぼす影響について検討した。その結果、SK-N-SH (ヒト NE 神経芽細胞腫) 細胞において、ゲニステインは濃度および時間依存的に [³H]NE 取り込みを促進した。ゲニステインによる [³H]NE 取り込み促進は、V_{max} (最大反応) の増加によるもので、K_m (Michaelis 定数) の変化によるものではなかった(図 1)。ゲニステインは [³H]nisoxetine 結合において K_d (解離定数) を変化させず、B_{max} (最大結合) を増加させた。もう 1 つの大豆成分で植物性エストロゲンであるダイゼインは、チロシンキナーゼ活性の阻害作用を有していない。このダイゼイ

ンは NET 活性に影響を与えなかったことから、ゲニステインの作用は細胞膜エストロゲン受容体を介しているのではないと思われる。

図 1



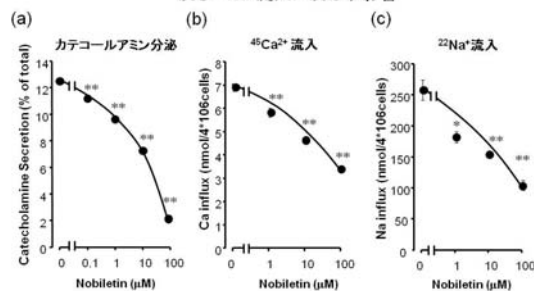
一方、ゲニステインは非選択的チロシンキナーゼ阻害剤であるが、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤 (Tyrophostin 25) は NET 活性を促進したが、細胞質 src チロシンキナーゼ阻害剤 (PP2) は影響がなかった。

以上の結果より、大豆成分であるゲニステインは、NET 活性を増加させることにより NET 機能を促進させるが、その機序として細胞膜受容体型チロシンキナーゼの阻害作用が関与している可能性が示唆された。(発表論文 2)

(2) 蜜柑果皮成分であるノビレチンによる CA 生合成・分泌に及ぼす影響

蜜柑の果皮成分であり植物フラボノイドの 1 種であるノビレチンを培養ウシ副腎髄質細胞と反応させると、濃度依存性に細胞からの CA 分泌と Ca²⁺流入が促進した。この促進作用は、細胞外 Ca²⁺除去により完全に抑制され、また L 型及び N 型電位依存性 Ca²⁺チャネル阻害剤 (nitrendipine 及び ω-conotoxin GIVA)、Na⁺/Ca²⁺交換輸送体阻害剤 (amiloride 又は SN-6) により抑制された。ノビレチンはアセチルコリン (ACh) (図 2) およびベラトリジン刺激による CA 分泌、²²Na⁺ および ⁴⁵Ca²⁺ 流入を濃度依存性に抑制した。さらにノビレチンは、高濃度 (56mM) K⁺ 溶液刺激による CA 分泌及び ⁴⁵Ca²⁺ 流入を濃度依存性に抑制した。ノビレチンは α3β4 nAChR を発現させたアフリカツ

図 2 アセチルコリン刺激によるカテコールアミン分泌、⁴⁵Ca²⁺ 及び ²²Na⁺ 流入に及ぼす影響



メガエル卵母細胞において、ACh 誘発電流を濃度依存性に抑制した。

以上の結果より、培養ウシ副腎髄質細胞においてノビレチンは、それ単独で CA 分泌及び $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入を促進した。その機序として電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (L 型と N 型) および $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体を介していることが示唆された。一方、ノビレチンは nAChR、電位依存性 Na^+ チャンネルおよび電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した細胞外からの Na^+ 及び Ca^{2+} 流入を抑制することにより CA 分泌を抑制すると考えられた。これらの結果から、ノビレチンは交感神経系の活動に対して二相性の作用、すなわちそれ単独では促進作用を、一方強いストレスなどの中枢神経興奮による反応には抑制作用を示すことが考えられ、特に後者はノビレチンの心血管疾患の予防やその改善作用の一端を説明するものである可能性が示唆された。(発表論文 4)

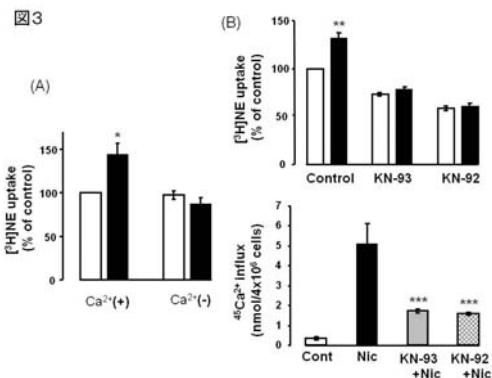
(3) タバコの葉の成分であるニコチンの長期処理によるノルエピネフリントランスポーター活性に及ぼす影響

タバコの葉の主要成分であるニコチンは、主に喫煙によって摂取され、注意力、学習・記憶力、ストレス対応能力など多くの神経機能を増強し、さらにニコチン依存や退薬症候を引き起こすことが知られている。一方、ノルエピネフリントランスポーター (NET) はシナプス間隙へ遊離されたノルエピネフリン (NE) の大部分を神経終末へ再び取り込み、その神経伝達を終了させる機能蛋白質である。ニコチン依存等の研究から、ドパミントランスポーターにおける研究は多数報告されているが、NET におけるニコチンの作用を検討した報告は、ほとんどない。そこで今回、ニコチン持続処理したウシ副腎髄質細胞での NET 機能に及ぼす影響について検討した。

その結果、ウシ副腎髄質細胞における ^3H NE 取り込みは、ニコチン処理により時間 (24~120hr) および濃度 (0.1~10 μM) 依存性に増加した。 ^3H NE 取り込みの Eadie-Hofstee 解析から、ニコチン処理 (10 μM , 48hr) は、 ^3H NE 取り込みのみかけ上の K_m (ミカエリス定数) 値を変化させずに V_{max} (最大反応速度) を増加させた。ニコチン処理による ^3H NE 取り込み増加は、転写阻害薬 (actinomycin D) では抑制されず、蛋白質合成阻害薬

(cycloheximide) により抑制された。さらに、ニコチンにより NET mRNA 発現量も変動しなかった。ニコチンによる NET 機能の増加は、 $\alpha 3 \beta 4$ nicotinic acetylcholine (nACh) 受容体阻害薬 (mecamylamine) によって抑制され、 $\alpha 7$ nACh 受容体阻害薬 (α -bungarotoxin) では抑制されなかった。このニコチンによる NET 機能の増加は、細胞内シグナル伝達系に関与する酵素系の阻害薬である protein

kinase A 阻害薬 (H-89)、MAPK kinase 阻害薬 (U0126)、protein kinase C 阻害薬 (calphostin C) や、プロテアソーム阻害剤 (MG132) では抑制されなかったが、Rho kinase 阻害薬 (fasudil) にて一部抑制された。



反応液から Ca^{2+} を除去すると、ニコチンの ^3H NE 取り込み増加作用は完全に抑制された。また、CaM kinase II 阻害薬 (KN-93) により、ニコチンによる ^3H NE 取り込みの増加作用が抑制されたが、その inactive analog である KN-92 でも取り込みの増加が抑制された。さらにニコチンによる細胞内への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入も、KN-93 および KN-92 により抑制された (図 3)。タバコ喫煙者の喫煙後のニコチンの血中濃度は、数 100 nM に到達すると言われることから、今回使用したニコチン濃度は、薬理的に意味があると考えられる。今回の研究により、ニコチンは $\alpha 3 \beta 4$ nACh 受容体を介して NET 機能を増加させ、その作用部位として NET 遺伝子の転写以降の経路が考えられた。さらにその促進機序には、細胞内への Ca^{2+} 流入が重要な役割を果たし、一部に Rho キナーゼの関与が示唆された。今回の結果を薬理的に考察すると、ニコチン投与により脳内 NE 神経系での NE の遊離が促進されるが、その代償的な反応として NET が促進したことが考えられた。(発表論文 3)

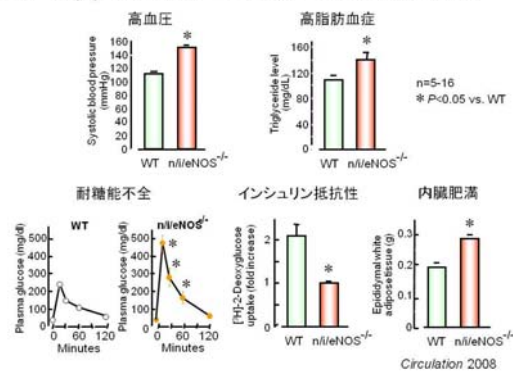
(4) トリプル一酸化窒素合成酵素完全欠損マウスにおける自然発症の心筋梗塞の検討

一酸化窒素合成酵素 (NOS) は、神経型 (nNOS)、誘導型 (iNOS)、内皮型 (eNOS) の 3 種類のアイソフォームが存在する。従来、生体内における NOS 系の役割を調べる目的で、NOS 阻害剤等を用いて薬理的に検討されたが、それらの非特異的な作用のために、真の役割を解明するには至っていなかった。この点を検討するために、私達の研究室では、最近 3 つの NOS をすべて欠損させた NOS 完全欠損マウスを作成することに世界で初めて成功した。興味深いことに、このマウスは生後半年を越えてくると死亡し始めて、8 ヶ月後

には生存率が約 25%~30%となった。

そこで今回の検討として、トリプル NOS 完全欠損マウスの死因の機序を探り、さらにこの動物の病態を精査した。その結果、このマウスは自然発症心筋梗塞を起こすこと、さらにはメタボリック症候群（高血圧、耐糖能異常、高脂血症、内臓肥満）の症状が観察された(図 4)。さらに、このマウスの血漿アンギオテンシン II レベルの増加や、心臓アンギオテンシン II 1 型 (AT1) 受容体の発現の亢進があった。そこで選択的 AT1 受容体阻害剤のオルメサルタンを投与すると、冠動脈硬化、心筋梗塞、メタボリック症候群などの症状を軽減した。(発表論文 9)

図 4 Triply n/eNOS^{-/-}マウスのメタボリック症候群



以上の結果より、NOS 系の破たんが現代病の多くの疾患を引き起こす可能性を示唆した。(発表論文 1, 8)

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 26 件)

- ① Kubota T., Kubota N., Kumagai H., Yamaguchi S., Kozono H., Takahashi T., Inoue M., Itoh S., Takamoto I., Sasako T., Kumagai K., Kawai T., Hashimoto S., Kobayashi T., Sato M., Tokuyama K., Nishimura S., Tsunoda M., Ide T., Murakami K., Yamazaki T., Ezaki O., Kawamura K., Masuda H., Moroi M., Sugi K., Oike Y., Shimokawa H., Yanagihara N., Tsutsui M., Terauchi Y., Tobe K., Nagai R., Kamata K., Inoue K., Kodama T., Ueki K., Kadowaki T. : Impaired Insulin Signaling in Endothelial Cells Reduces Insulin-Induced Glucose Uptake by Skeletal Muscle *Cell Metabolism*, 2011, in press (査読有)
- ② Toyohira Y., Ueno S., Tsutsui M., Itoh H., Sakai N., Saito N., Takahashi K., Yanagihara N. : Stimulatory effects of the soy phytoestrogen genistein on noradrenaline transporter and serotonin transporter activity. *Mol Nutr Food Res*. 54 (4): 516 - 524, 2010 (査読有)
- ③ Itoh H., Toyohira Y., Ueno S., Saeki S., Zhang H., Furuno Y., Takahashi K., Tsutsui M., Hachisuka K., Yanagihara N. : Upregulation of norepinephrine transporter function by prolonged exposure to nicotine in cultured bovine adrenal medullary cells *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 382: 235 - 243, 2010 (査読有)
- ④ Zhang H., Toyohira Y., Ueno S., Shinohara Y., Yamakuni T., Tsutsui M., Takahashi K., Yanagihara N. : Dual effects of nobiletin, a citrus polymethoxy flavone, on catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cells *J. Neurochem.* 114 (4): 1030 - 1038, 2010 (査読有)
- ⑤ Mao H, Zhang H, Wang H, Wang Y, Zhao F, Hu L, Yanagihara N., Gao X. : Dual effects of lipophilic extract of Salvia miltiorrhiza (Danshen) on catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. *J Ethnopharmacol.* 125(1): 59-67, 2009 (査読有)
- ⑥ Yanagihara N., Toyohira Y., Shinohara Y. : Insights into the pharmacological potential of estrogens and phytoestrogens on catecholamine signaling. *Annals of NY Academy Sciences* 1129: 96-104, 2008 (査読有)
- ⑦ Matsuda T, Toyohira Y, Ueno S, Tsutsui M, Yanagihara N. : Simvastatin inhibits catecholamine secretion and synthesis induced by acetylcholine via blocking Na⁺ and Ca²⁺ influx in bovine adrenal medullary cells. *J Pharmacol Exp Ther* 327:130-136, 2008 (査読有)
- ⑧ Takai A, Morikawa K, Tsutsui M, Murayama Y, Tekes E, Yamagishi H, Ohashi J, Yada T, Yanagihara N., Shimokawa H. : Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. *J Exp Med* 205: 20530-2063, 2008 (査読有)
- ⑨ Nakata S., Tsutsui M., Shimokawa H., Morishita T., Sabanai K., Nagasaki M., Tanimoto A., Suda O., Yatera Y., Shibata K., Tasaki H., Sasaguri Y., Nakashima Y., Otuji Y., Yanagihara N. : Spontaneous

myocardial infarction in mice lacking all three nitric oxide synthase.

Circulation 117: 2211-2223, 2008

(査読有)

- ⑩柳原延章、豊平由美子、上野晋、筒井正人、篠原優子、劉民慧：植物性エストロゲンのカテコールアミン生合成・分泌への影響

日本薬理学雑誌, 132: 150-154, 2008

(査読有)

[学会発表] (計 104 件)

- ①Zhang H., Toyohira Y., Ueno S., Tsutsui M., Itoh H., Takahashi K., Yanagihara N. : Dual effects of nobiletin, a citrus polymethoxy flavones, on catecholamine synthesis and secretion in cultured bovine adrenal medullary cells.
第 84 回日本薬理学会年会
(横浜, 2011. 3. 22)
- ②Yanagihara N., Zhang H., Toyohira Y., Ueno S., Tsutsui M., Takahashi K. : New insights into the pharmacological potential of plant flavonoids on catecholamine signaling.
第 84 回日本薬理学会年会
(横浜, 2011. 3. 23)
- ③Yanagihara N., Toyohira Y., Ueno S., Tsutsui M., Takahashi K. : Stimulation of Noradrenaline Transporter and Serotonin Transporter Activity by Soy Phytoestrogen Genistein.
16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology (Copenhagen, 2010. 7. 20)
- ④Zhang H., Toyohira Y., Ueno S., Tsutsui M., Yamakuni T., Takahashi K., Yanagihara N. : Dual effects of nobiletin, a citrus polymethoxy flavone, on catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cells
第 83 回日本薬理学会年会
(大阪, 2010. 3. 17)
- ⑤Yanagihara N., Zhang H., Toyohira Y., Ueno S. : Effects of nobiletin, one of citrus polymethoxy flavone, on catecholamine synthesis and secretion in cultured bovine adrenal medullary cells
40th Annual Meeting Society For Neuroscience (San Diego, 2010. 3. 18)

[図書] (計 1 件)

- ①柳原延章、文光堂、高齢者の栄養管理ガイドブック (下田妙子編集) : 気をつけておくべき薬剤と食品・栄養剤との相互作用、2010、135

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳原 延章 (YANAGIHARA NOBUYUKI)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：80140896