

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10700

研究課題名(和文) 脂肪細胞のエストロゲン依存性レドックス制御に対するmiRNA-222の機能解析

研究課題名(英文) Redox regulation of estrogen and miRNA-222 in adipocytes

研究代表者

高橋 一広 (Takahashi, Kazuhiro)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20292427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：閉経前後の女性の内臓脂肪を比較したところ、閉経後女性の内臓脂肪サイズは大きくなり、かつ酸化ストレスが亢進している状態であることが明らかになった。培養脂肪細胞を用いた研究で、エストロゲンは酸化ストレスを消去する抗酸化酵素遺伝子群の発現を増加させることが明らかになった。閉経後にメタボリック症候群が増加する要因として内臓脂肪の増加が考えられているが、閉経というエストロゲンの減少が脂肪増加と酸化ストレス亢進に関与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The size of visceral adipocytes in postmenopausal women was significantly larger than that in premenopausal women ($P < 0.05$). The lipid peroxidation levels of visceral fat in postmenopausal women were also significantly higher than that in premenopausal women ($P < 0.05$). We found that oxidative stress in visceral fat is higher in postmenopausal women. Estradiol (E2) significantly reduced the intracellular ROS levels that were induced by H₂O₂ in 3T3-L1 adipocytes ($P < 0.01$). We determined that E2 significantly increased the expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2)-dependent antioxidant genes, heme oxygenase-1 (HO-1), NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO-1), and the glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCL) genes in 3T3-L1 adipocytes ($P < 0.01$). Hence, estrogen may act as an antioxidant in the adipose tissues of premenopausal women.

研究分野：医歯薬学

キーワード：エストロゲン 閉経 内臓脂肪 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 酸化ストレスは、生体にとって有害である活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) 産生とそれを消去する生体反応のバランスが崩れた状態である。酸化ストレスは動脈硬化症や肥満と関連するメタボリックシンドロームの発症に大きく関わっており、全身の酸化ストレスレベルは BMI に相関している。蓄積された脂肪組織中の酸化ストレス亢進はアディポサイトカインの分泌異常を引き起こし、脂肪組織中に局限していた酸化ストレス亢進は全身の酸化ストレス亢進へとつながっていく¹⁾。

エストロゲンは、中枢神経系や心血管系疾患の領域において抗酸化作用を有するとされている²⁾。雌マウスの脂肪細胞の肥大化と脂肪組織中の酸化ストレス亢進をエストロゲンが抑制すると報告されている³⁾。また末梢血単球において、卵巣摘出術後の急激なエストロゲン低下は酸化ストレスを亢進させ、superoxide dismutase (SOD) や glutathione peroxidase (GPx) などの抗酸化酵素の発現を低下させたという報告もある⁴⁾。しかしながら、ヒト脂肪細胞においてエストロゲンが抗酸化作用に寄与するか否かは解明されていない。

(2) ヒトゲノムのノンコーディング領域から転写され形成されるマイクロ RNA (miRNA) は、転写後の mRNA の分解、翻訳停止、または発現抑制することでターゲット遺伝子の機能を抑制している。近年脂肪細胞の分化や酸化ストレスに関与する miRNA の存在が報告されているが、エストロゲン依存性にレドックス制御に関わる miRNA は明らかにされていない。妊娠糖尿病妊婦の内臓脂肪における miR-222 は、エストロゲンにより発現誘導され、かつ miR-222 はエストロゲン受容体 α (ER α) の発現を制御することが報告された。また、miR-222 は肥満者において発現が亢進している。このように女性の内臓脂肪蓄積にエストロゲンが関与することから、抗酸化作用を有するエストロゲンの欠乏はレドックス制御の破綻をきたし、またこの制御機構に miR-222 が関与するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) 脂肪細胞中の酸化ストレスが閉経によって影響を受けるか否かを明らかにする。またエストロゲンがどのように抗酸化作用を示しているか 3T3-L1 脂肪細胞において検討する。

(2) さらに 3T3-L1 細胞において、miR-222 が ER α の発現制御を介してレドックスに関与するか否かを検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト内臓脂肪における解析

山形大学医学部附属病院産婦人科で手術を受けた患者のうち、38 人を対象とした。対象患者は閉経前群 (n = 17)、閉経後群 (n = 21)

の 2 群に分けられ、それぞれの疾患内訳は閉経前群で卵巣癌 (14 例)、子宮体癌 (3 例) であり、閉経後群で卵巣癌 (9 例)、子宮体癌 (12 例) であった。

酸化ストレスに対する肥満の影響を最小限にするために、BMI が正常症例を抽出し、また糖尿病と脂質異常症合併症例は除外した。対象患者の月経状態に関しては、質問票への回答と血清 FSH 値と血清エストロジオール (E2) 値の測定をし、確認した。閉経しているか否かについては、少なくとも 12 か月間月経がないことを確認し、FSH 値が 30 mIU/mL 以上かつ E2 値も 20 mIU/mL 未満であることを手術前に確認した。

(2) 脂肪細胞サイズ測定

脂肪組織標本病理切片画像を拡大視し、Olympus BX50 microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) を用いて無作為に画像を抽出した。脂肪細胞数とそれぞれの面積を ImageJ version 1.47 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を使用して測定した。

(3) 脂肪組織中の酸化ストレス測定

Thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) 法による malondialdehyde (MDA) を測定する方法を用いて、脂肪組織中の酸化ストレスレベルを評価した。脂肪組織を RIPA バッファーでホモジナイズ後、上清の吸光度 530-540 nm 値をマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) で測定した。

(4) 3T3-L1 脂肪細胞における mRNA 測定

マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 細胞株を JCRB 細胞バンク (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank) (Osaka, Japan) より購入し、3T3-L1 細胞を脂肪細胞へ分化させて実験を行った。3T3-L1 脂肪細胞を E210⁻⁵ M で処理を行った後、mRNA を RNeasy lipid tissue mini kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) を用いて抽出した。ABI Fast 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) を使用してリアルタイム PCR を施行した。Heme oxygenase-1 (HO-1)、copper-zinc superoxide dismutase (Cu/Zn SOD)、manganese SOD (Mn SOD)、GPx、NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) および glutamate-cysteine ligase modifier (GCL) subunit の遺伝子発現の解析を行った。

(5) 統計学的分析

脂肪細胞サイズ測定と脂肪組織中過酸化脂質レベル測定には、Mann-Whitney U 検定を用いた。3T3-L1 細胞実験での統計分析は、one-way ANOVA と Student t-test で行った。P < 0.05 を統計学的有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 閉経後群における脂肪細胞の肥大化
腹部皮下・内臓脂肪組織を採取し、脂肪細胞

サイズの測定を行った患者の詳細を表1に示した。閉経前と閉経後群間で、体重とBMIに差は認めなかった。血清 E2 値は、閉経前群と比較して閉経後群では有意に低値であった。皮下脂肪細胞のサイズは、閉経前後群で有意な差は認めなかった。しかし内臓脂肪細胞では、閉経前群 [1,234.8 (460.0-1,888.4) μm^2] と比較して、閉経後群 [1,793.4 (880.2-2,938.7) μm^2] であり、有意に閉経後群で脂肪細胞サイズが高値であった ($P < 0.05$) (図 1)。

表1. 患者背景

	閉経前群 (n = 17)	閉経後群 (n = 21)	P
年齢, y	40.8 (8.4)	57.6 (7.3)	<0.001
身長, cm	160.0 (5.2)	155.4 (6.3)	<0.05
体重, kg	55.3 (4.6)	53.7 (5.9)	NS
BMI, kg/m ²	21.5 (1.4)	22.4 (1.8)	NS
sBP, mmHg	107.7 (7.4)	124.8 (9.9)	<0.001
dBp, mmHg	63.3 (8.7)	75.1 (6.3)	<0.001
T-Chol, mg/dL	184.6 (20.4)	190.1 (31.8)	NS
TG, mg/dL	89.7 (31.2)	139.1 (68.5)	<0.05
HDL, mg/dL	59.4 (13.7)	60.7 (22.9)	NS
BS, mg/dL	90.0 (7.2)	97.1 (16.2)	NS
FSH, mIU/mL	8.9 (11.9)	66.7 (24.0)	<0.001
E ₂ , pg/mL	167.5 (150.5)	8.0 (3.8)	<0.001

平均値 (標準偏差)
not significant (NS), body mass index (BMI), systolic blood pressure (sBP), diastolic blood pressure (dBp), total cholesterol (T-Chol), triglycerides (TG), high-density lipoprotein (HDL), blood sugar (BS), follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol (E2)

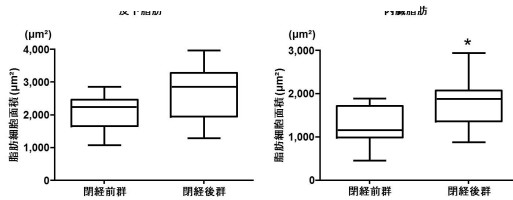


図1. 脂肪細胞サイズ比較

(2) 閉経後群の内臓脂肪組織中の酸化ストレスレベルの亢進

閉経後群の内臓脂肪組織中のMDAレベルは [99.6 (74.0-180.3) nmol/mg protein] であり、閉経前群 [中央値 46.7 (4.0-89.2) nmol/mg protein] と比較して有意に高値であった ($P < 0.05$)。皮下脂肪組織においては両者のMDAレベルに有意差は認められなかった (図 2)。

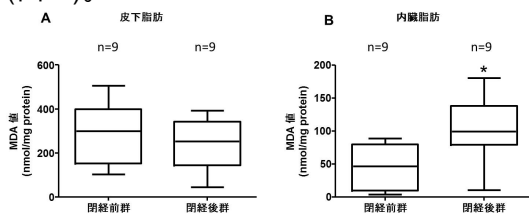


図2. 脂肪組織中MDA比較

(3) E2 は 3T3-L1 脂肪細胞において抗酸化作用を示した

脂肪組織中のMDAレベルの測定結果を裏付けるために、3T3-L1 脂肪細胞を用いて E2 の抗酸化作用の有無を確認した。ROS 量の測定には NBT アッセイを用いた。24 時間の E2 添加を行った細胞では、コントロールと比較して有意に ROS 量が低値であった ($P < 0.01$)。過酸化水素による酸化ストレス刺激に対して、E2 は濃度依存性にその抗酸化作用を示した (図 3A)。その E2 の抗酸化作用は、エストロゲン受容体拮抗薬である ICI 182,780 で抑

制することはできなかった (図 3B)。

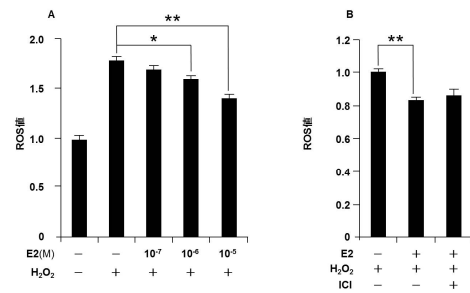


図3. E2のROS産生に及ぼす影響

(4) E2 は 3T3-L1 脂肪細胞において抗酸化酵素 mRNA 発現を増加させた

E2 が抗酸化作用を有するという NBT アッセイでの結果を受けて、抗酸化酵素と ROS 産生酵素の mRNA 発現量をリアルタイム PCR を用いて測定した。24 時間の E2 添加をした細胞において、NOX4、Cu/Zn SOD、Mn SOD、GPx の発現量は変化しなかったが、抗酸化酵素である HO-1、NQO1、GCL の mRNA 発現量は増加した ($P < 0.01$) (図 4)。

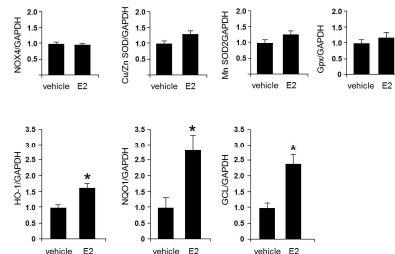


図4. E2の抗酸化酵素遺伝子発現に及ぼす影響

今回の研究結果から、閉経後女性の内臓脂肪細胞は閉経前女性と比較して、体格が同程度であるにもかかわらず、肥大していること、つまり脂肪滴の蓄積が多いことが示された (図 1)。

近年酸化ストレスと内臓脂肪蓄積の相関性が注目され、脂肪組織中の酸化ストレスの蓄積は、肥満と関連するメタボリックシンドロームへ発展することが明らかになっている¹⁾。また、エストロゲンはそれ自体抗酸化作用を有することが知られている。エストロゲンはラットの血管平滑筋細胞においてアンジオテンシンにより産生されるフリーラジカル産生を抑制し、また卵巣摘出マウスにおいて減少する Mn SOD と細胞外 SOD mRNA 発現量を再び上昇させることも報告されている²⁾。Stubbins らは、エストロゲンは卵巣摘出後マウスに見られる脂肪細胞の肥大と脂肪組織中の酸化ストレスと炎症を抑制すると報告した³⁾。さらにメタボリックシンドロームモデルのラットにおいて、卵巣摘出によるエストロゲンの欠落は腹部脂肪組織中の過酸化脂質を増加させ、Cu/Zn SOD や Mn SOD、GPx といった抗酸化酵素の活性を低下させるという結果も報告された⁵⁾。今回の研究結果では、閉経前女性と比較して閉経後女性の内臓脂肪組織中の酸化ストレスレベルが高値であった (図 2)。我々が調べる限り、今回の研

究は非肥満症例の閉経後女性においての内臓脂肪組織中の酸化ストレス亢進を直接捉えた初の報告である。内臓脂肪組織中の酸化ストレス亢進はメタボリックシンドロームの病因と考えられており、閉経後に増加するメタボリックシンドロームの発症背景としての一端が明らかになったと考えられる。脂肪組織でのエストロゲンの抗酸化作用について3T3-L1脂肪細胞を用いて研究の結果、過酸化水素刺激による細胞内ROS産生をエストロゲンが抑制することを明らかにし、その作用がエストロゲン受容体拮抗薬ICI 182,780では抑制できないことを明らかにした(図3)。この研究結果は、過去の神経細胞においての結果と同様であり、その研究者もエストロゲンの持つ過酸化水素刺激への神経細胞保護作用をICI 182,780では抑制できなかったと報告している。ICI 182,780は、GPR30と呼ばれていたG蛋白質共役受容体(GPER)の作動薬でもある。3T3-L1脂肪細胞はGPERも発現しているため、今回の研究ではICI 182,780がGPERを介して抗酸化作用を示していた可能性が考えられる。エストロゲンはROS産生系酵素遺伝子であるNOX4のmRNA発現量に影響を及ぼさず、抗酸化酵素遺伝子であるHO-1やNQO1、GCLのmRNA発現量を増加させることを明らかにした(図4)。これらの抗酸化酵素の遺伝子はプロモーター領域に存在する抗酸化応答配列(antioxidant response element)として知られており、この配列は転写因子nuclear factor E2-related factor 2(Nrf2)によって制御を受けている。Gorriniらは、エストロゲンがPI3K/AKT系を介してNrf2関連抗酸化酵素遺伝子の発現を上昇させたと多種のエストロゲン感受性をもつ細胞を用いた実験で報告している6)。抗酸化酵素の遺伝子発現がエストロゲンによってどのように制御されているかのメカニズムにmiR-222がどのように関与するか、今回の研究では行うことができなかったため、更なる研究が求められる。

今回の研究により、エストロゲンは抗酸化酵素HO-1、NQO1、GCLの遺伝子発現を増加させることから、エストロゲンは女性の脂肪組織においてROS産生を抑制していることが示唆された。

<引用文献>

1. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114:1752-1761, 2004
2. Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohé C, Laufs K, Böhm M, Nickenig G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res* 93:170-177, 2003
3. Stubbins RE, Holcomb VB, Hong J, Núñez

NP. Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance. *Eur J Nutr* 51:861-870, 2012

4. Bellanti F, Matteo M, Rollo T, De Rosario F, Greco P, Vendemiale G, Serviddio G. Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. *Redox Biol* 1:340-346, 2013

5. Guerra RC, Zuñiga-Muñoz A, Guarner Lans V, Díaz-Díaz E, Tena Betancourt CA, Pérez-Torres I. Modulation of the activities of catalase, cu-zn, mn superoxide dismutase, and glutathione peroxidase in adipocyte from ovariectomised female rats with metabolic syndrome. *Int J Endocrinol* 2014:175080, 2014

6. Gorrini C, Gang BP, Bassi C, Wakeham A, Baniasadi SP, Hao Z, Li WY, Cescon DW, Li YT, Molyneux S, Penrod N, Lupien M, Schmidt EE, Stambolic V, Gauthier ML, Mak TW. Estrogen controls the survival of BRCA1-deficient cells via a PI3K-NRF2-regulated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:4472-4477, 2014

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 1件)

Narumi M, Takahashi K, Yamatani H, Seino M, Yamanouchi K, Ohta T, Takahashi T, Kurachi H, Nagase S. Oxidative Stress in the Visceral Fat Is Elevated in Postmenopausal Women with Gynecologic Cancer. *J Womens Health (Larchmt)*. 査読あり 2018;27(1):99-106. doi: 10.1089/jwh.2016.6301.

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 一広 (TAKAHASHI, Kazuhiro)
山形大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 20292427

(2)研究分担者

山谷 日鶴 (YAMATANI, hizuru)
山形大学・医学部・助教
研究者番号: 40550637