

令和元年6月14日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00859

研究課題名(和文) レプチン抵抗性を改善する食品因子の探索とその抗肥満効果の検証

研究課題名(英文) Exploration for food factor improving leptin resistance and validation of its anti-obesity action

研究代表者

赤川 貢 (Akagawa, Mitsugu)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：70405356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、レプチン抵抗性を改善する食品因子を探索し、その抗肥満効果を実証することを目的とした。レプチンシグナルを活性化する食品素材のスクリーニングを実施した結果、アブラナ科野菜に含まれるphenethyl isothiocyanate (PEITC) が、PTP1Bのシステインチオール基を修飾することで、活性を阻害し、レプチンシグナルをリガンド非依存的に活性化することを見出した。さらに動物レベルでPEITCがレプチンシグナルを活性化して摂食抑制作用を示すことを明らかにした。本研究によって、PEITCの摂取がレプチンシグナルを活性化することで摂食を抑制し、抗肥満効果を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、アブラナ科野菜に含まれるphenethyl isothiocyanate (PEITC) が、PTP1B活性を阻害し、レプチンシグナルをリガンド非依存的に活性化することを見出した。さらに動物レベルでPEITCがレプチンシグナルを活性化して摂食抑制作用を示すことを明らかにした。本成果は、食品因子によるレプチンシグナルの制御という新たな食品の機能性を初めて実証したものである。本成果を応用することによって、肥満を発症基盤とする多くの生活習慣病の予防・改善にも貢献しうることから、国民生活への反映、および波及効果は、極めて大きいと考える。

研究成果の概要(英文)： Obesity is a growing and serious health problem worldwide. Leptin is a weight-reducing hormone, which decreases food intake via hypothalamic leptin receptors (Ob-Rb) and JAK2/STAT3 signaling. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) negatively regulates leptin signaling by dephosphorylating JAK2, and the increased activity of PTP1B is implicated in the pathogenesis of obesity. Hence, inhibition of PTP1B may help prevent and reduce obesity. We revealed that phenethyl isothiocyanate (PEITC), an isothiocyanate in certain cruciferous vegetables, potently inhibits PTP1B by binding to the reactive cysteinyl thiol. Moreover, we found that PEITC causes the ligand-independent phosphorylation of Ob-Rb, JAK2, and STAT3 by inhibiting cellular PTP1B in human SH-SY5Y neuronal cells. We demonstrated that oral administration of PEITC to mice significantly reduces food intake, and stimulates hypothalamic leptin signaling. Our results suggest that PEITC might help prevent and improve obesity.

研究分野：食品機能化学

キーワード：レプチン 肥満 イソチオシアネート レプチンシグナル 抗肥満

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満人口は全世界で増加の一途をたどっており、2013年には3人に1人が肥満または過体重との調査結果が報告された (Ng et al., Lancet, 384:766-781, 2014)。肥満は糖尿病、高脂血症、高血圧等の生活習慣病の発症基盤であり、世界的に深刻な社会問題となっている。その主発症原因は、食生活の乱れであり、食習慣の中で予防・改善することが望ましいとされている。しかし、未だ肥満対策に成功した国がないのが実状である。レプチンは、脂肪細胞から分泌されるホルモンであり、脳の視床下部に作用し、食欲の抑制とエネルギー消費の亢進により体重を減少させる。そのため、レプチン自身が抗肥満薬となると期待されたが、肥満患者にレプチンを投与しても効果が認められないことが判明し、現在ではレプチンの作用障害、すなわち「レプチン抵抗性」が肥満症の主因であると認識されている (Friedman et al., Science, 299, 856-858, 2003)。レプチン受容体にレプチンが結合すると JAK2 の Tyr 残基が自己リン酸化し活性化する。次いで、転写因子である STAT3 がリン酸化され、抗肥満遺伝子の転写が促進される。一方で protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) が負の制御因子として機能しており、JAK2 を脱リン酸化してレプチンシグナルを沈静化している。近年、PTP1B 活性の異常亢進がレプチン抵抗性の発症に密接に関与していることが明らかにされ (Cook et al., Nat. Med., 12: 917-924, 2006)、その阻害剤は抵抗性を改善し、肥満の予防・治療に有効であると期待されている (Combs, J. Med. Chem., 53: 2333-2344, 2010)。しかし、国内外において PTP1B 阻害剤の開発が行われているにもかかわらず、有効かつ安全な阻害剤の実用化には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、培養神経細胞を用いてレプチン抵抗性改善作用を示す食品由来の PTP1B 阻害剤の探索・同定を試み、同定した食品因子を摂食させ、その抗肥満効果を検証することを目的とした。また、レプチン抵抗性を改善する食品因子を解明し、肥満の予防・改善に資する高機能性食品を創製することを最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) PTP1B 活性の測定

リコンビナント PTP1B と食品素材抽出物または食品由来成分を 30 分間インキュベートし、*p*-nitrophenylphosphate を基質として酵素活性を測定した。細胞内 PTP1B の測定は、食品因子を処理した SH-SY5Y 細胞の細胞溶解液とリン酸化ペプチドをインキュベートし、マラカイトグリーン法によって遊離リン酸量を定量することで行った。

(2) レプチンシグナルの解析

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞にレチノイン酸を処理することでレプチン応答細胞へ分化させて使用した。食品因子を分化させた SH-SY5Y 神経様細胞に処理し、レプチンシグナル応答 (Ob-Rb および JAK2、STAT3 のリン酸化) をウェスタンブロット法によって解析した。また、免疫蛍光細胞染色法によってレプチンシグナルの下流の転写因子である STAT3 の核内移行を評価した。さらに STAT3 の活性化に反応して発現が制御される摂食抑制性ペプチドである POMC、および摂食促進性神経ペプチドである NPY と AgRP の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法によって解析した。

(3) 食品因子の摂食抑制作用の検証

同定した食品因子を C57BL/6J 雄性マウスに経口投与し、摂食量、体重、および血中レプチンを測定した。また、視床下部を摘出して、レプチンシグナル因子 (Ob-Rb、JAK2、および STAT3) の活性化をウェスタンブロット法によって解析した。

4. 研究成果

(1) 食品由来の PTP1B 阻害剤の探索

PTP1B と食品素材抽出物または食品由来成分を 30 分間インキュベートし、酵素活性を測定した結果、PEITC が顕著に PTP1B を阻害することが判明した。また、PTP1B の反応性チオール基を biotin iodoacetamide で標識し、アビジンブロッティングによって検出したところ、PEITC 濃度依存的な反応性チオール基の減少が観察された。この結果から PEITC が PTP1B の活性中心に存在する反応性システイン残基を修飾し、酵素活性を阻害する分子機構が推定された。

(2) モデル神経細胞の確立

レプチンシグナルの解析を行うにあたり、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞にレチノイン酸を処理し、レプチン応答細胞への分化条件を検討した。その結果、100 nM の RA を 5 日または 6 日間処理した細胞において、Ob-Rb、JAK2、STAT3 および PTP1B の発現上昇が観察され、神経様細胞への分化が確認された。次に、SH-SY5Y 神経様細胞にレプチンを処理し、レプチン作動性を評価した。ウェスタンブロッティングによる解析の結果、レプチン処理によって Ob-Rb、JAK2 および STAT3 の顕著なリン酸化が認められた。また、定量逆転写 PCR (qRT-PCR) により、摂食抑制性ペプチドである POMC の mRNA レベルの有意な増加と、摂食促進性神経ペプチド

である NPY と AgRP の有意な低下が確認された。

(3) PEITC によるレプチンシグナル活性化作用の解析

PEITC が細胞内において PTP1B を阻害するかどうかを検証するため、細胞毒性の認められなかった 0~5 μM の PEITC をヒト由来 SH-SY5Y 神経様細胞に 30 分間処理し、PTP1B 活性を測定した。その結果、PEITC が濃度依存的に細胞内 PTP1B を阻害することが判明した。そこで、レプチン非存在下において PEITC を細胞に 30 分間処理し、レプチンシグナルの活性化を検証したところ、0.1 μM 以上の処理によって Ob-Rb、JAK2 および STAT3 のリン酸化が認められた。また、1 μM の PEITC の処理によって、30 分後にシグナルの活性化が観察され、180 分後には沈静化することが明らかになった。STAT3 は活性化すると、2 量体を形成して核内へと移行し、摂食関連遺伝子の発現を調節する転写因子として機能する。そこで、PEITC 処理した SH-SY5Y 神経様細胞における STAT3 の局在を蛍光免疫染色法および細胞分画法によって解析した結果、PEITC 濃度依存的なリン酸化 STAT3 の核内への集積が観察された。さらに、STAT3 に転写を制御されている神経ペプチドの mRNA レベルを qRT-PCR 解析によって評価した。その結果、PEITC 処理によって POMC の mRNA レベルの有意な増加および NPY と AgRP の有意な低下が認められた。以上の結果から、PEITC が PTP1B の活性を阻害することでリガンド非依存的にレプチンシグナルを活性化することが明らかになった。

(4) 動物実験による PEITC の食欲抑制効果の検証

PEITC の摂食が動物個体レベルで食欲を抑制するかどうかをマウスを用いて検証した。6 時間絶食させた C57BL/6J マウスを 2 群に分配し、vehicle 群にはコーン油を、PEITC 群には 2.5 mg/mL PEITC を含むコーン油 (25 mg/kg body weight) を、ゾンデを用いて経口投与した。その 1 時間後に給餌して、給餌開始 1~24 時間後の摂食量および体重を測定した。その結果、vehicle 群と比較して PEITC 群で給餌後 0~14 時間と 0~24 時間の摂食量に有意な減少が認められた。また、この食欲抑制効果は PEITC の経口投与後 2~5 時間に発現し、15 時間以降に消失することが明らかになった。一方で、それぞれの測定時間内における両群間の体重増加量に有意な差は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yagi, M., Nakatsuji, Y., Maeda, A., Ota, H., Kamikubo, R., Miyoshi, R., Nakamura, Y., Akagawa, M., Phenethyl isothiocyanate activates leptin signaling and decreases food intake PLoS One. 2018, 13(11): e0206748. doi: 10.1371/journal.pone.0206748. 査読有り

〔学会発表〕(計 5 件)

佐々木 知里、太田 裕基、石井 剛志、向井 克之、松山 彰収、赤川 貢、(-)-Epigallocatechin-3-O-gallate の胃粘膜細胞に対するレプチン分泌刺激作用の機構解析、日本農芸化学会 2019 年度大会 2019 年

赤川 貢 緑茶カテキンの胃粘膜細胞に対するレプチン分泌刺激作用、第 23 回 JSoFF & 第 15 回日本カテキン学会 & 第 12 回日本ポリフェノール学会 合同学術集会、シンポジウム 2018 年

太田 裕基、石井 剛志、向井 克之、松山 彰収、赤川 貢 (-)-Epigallocatechin-3-gallate の胃粘膜細胞に対するレプチン分泌刺激作用の発見 第 14 回カテキン学会年次学術大会 2017 年 11 月 16 日、

太田 裕基、石井 剛志、向井 克之、松山 彰収、赤川 貢 (-)-Epigallocatechin-3-gallate の胃粘膜細胞に対するレプチン分泌刺激作用の発見 日本農芸化学会 2017 年度大会 2017 年

八木 美穂、仲辻 友紀子、前田 歩海、三好 規之、中村 宜督、赤川 貢 Phenethyl isothiocyanate による protein tyrosine phosphatase 1B の阻害を介したレプチンシグナル活性化作用の解析 第 31 回日本香辛料研究会学術講演会 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。