

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：31102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01835

研究課題名(和文) タンパク質のニトロ化修飾を指標とした2型糖尿病予防薬・治療薬の開発

研究課題名(英文) Search for anti-diabetic agents based on protein nitration

研究代表者

飯泉 恭一 (IIZUMI, Kyoichi)

東北女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：30439351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肥満は、脂肪細胞における慢性的な炎症を誘導し、2型糖尿病のリスクを高める。したがって、安全に肥満を抑制する薬剤の開発が求められている。そこで本研究では、培養脂肪細胞を用いて、その分化・成熟を抑制する可能性のある薬剤の探索を行った。その結果、2つの候補物質を見いだすことができた。本研究により得られた知見は、今後さらなる増加が予想される2型糖尿病に対する予防薬・治療薬の開発に貢献できるものと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は、2型糖尿病を含め、様々な疾患と関連している。したがって、脂肪細胞が過度に脂肪を蓄積することは好ましくない。本研究では、培養脂肪細胞を用い、その成熟(脂肪の蓄積)を抑制する物質を探索した。その結果、2つの候補物質を明らかにした。本研究により得られた知見は、2型糖尿病に対する予防薬・治療薬の開発に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Obesity induces chronic inflammation in adipocytes and increases the risk of type 2 diabetes. Therefore, there is a required for the development of agents that can suppress obesity safely. In this study, we attempted to search for agents that could suppress maturation using cultured adipocytes. As a result, we found two candidates. These findings obtained from this study may contribute to the development of anti-diabetic agents.

研究分野：生化学

キーワード：酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

<背景 1: 2 型糖尿病と酸化ストレス>

肥満は 2 型糖尿病のリスクを高めることが知られている (Tsugane et al. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002)。我が国における肥満者の割合は多く、BMI (Body Mass Index) が 25 以上の成人男性の割合は 28.6%、成人女性の割合は 20.3% に達する (厚生労働省 平成 25 年度 国民健康・栄養調査)。このため、2 型糖尿病を予防するための効果的な対策が求められている。

肥満は、脂肪組織における慢性的な炎症を介して、2 型糖尿病を引き起こす (Donath et al. *Nat Rev Immunol.* 2011)。肥満者の脂肪組織ではマクロファージなどの免疫系細胞が浸潤しており慢性的な炎症状態を生み出している。この慢性炎症となった脂肪組織からは TNF- α や IL-1 β といった炎症性サイトカインが分泌されており、これらが骨格筋や肝臓におけるインスリンシグナル伝達経路を阻害する (インスリン抵抗性) (Hotamisligil et al. *Science.* 1993)。このように生じたインスリン抵抗性が原因となり 2 型糖尿病が発症すると考えられている。

近年、炎症性サイトカインの作用に加え、炎症による酸化ストレスがインスリンのシグナル伝達の阻害に関与していることが明らかとなってきた (Pilon et al. *PLoS One.* 2010)。炎症部位では、マクロファージや好中球などにより、活性酸素 (O_2^-) や一酸化窒素 (NO) が産生される。これらの分子から活性窒素種が生じタンパク質を酸化あるいはニトロ化修飾し、様々なシグナル伝達経路を阻害する (図 2) [Yamakura, Ikeda. *Nitric Oxide.* 2006]。実際に、培養脂肪細胞の系で活性窒素種の一つペルオキシ亜硝酸の産生を誘導すると、インスリン受容体基質 1 (IRS1:インスリンシグナル伝達経路の重要分子) のチロシン残基がニトロ化修飾を受け、インスリンのシグナルの伝達が阻害されることが報告されている (Nomiyama et al. *BBRC.* 2004)。

一般に、翻訳後修飾されたタンパク質の検出や定量には抗体が多用される。2 型糖尿病との関連が指摘されるニトロ化修飾はタンパク質中のトリプトファン残基とチロシン残基がターゲットとなるが、これまでに実用化されたのはニトロチロシンに対する抗体のみであった。本研究分担者の山倉らは世界で初めてニトロトリプトファンを検出できる抗体 (抗 6-ニトロトリプトファン抗体) の作製に成功しており [Ikeda Yamakura. *Nitric Oxide.* 2007]、我々の研究グループはこれらを用いて全てのニトロ化修飾 (6-ニトロトリプトファン、3-ニトロチロシン) を検出できる系を確立している。

このように、2 型糖尿病の発症には酸化・ニトロ化ストレスが重要な役割を果たしている。しかし、酸化・ニトロ化ストレスの低減を考慮した予防薬/治療薬の研究はほとんど為されていない。その最大の要因は、これらのストレスによるタンパク質の障害 (翻訳後修飾) を検出する手法が限定されていることにある。これは様々な検出法 (リアルタイム PCR、ウエスタンブロット法、ELISA 等) が確立している炎症性サイトカインとの大きな違いである。

<背景 2: 粘菌由来の糖代謝促進物質 DIF>

細胞性粘菌は土壌微生物の一種で、発生生物学研究のモデル生物として世界中で利用されてきた。しかし近年、細胞性粘菌類は「未利用創薬資源」と注目されており、粘菌由来の各種生物活性物質が単離/同定されている (論文多数)。中でも DIF-1 (DIF-1: Differentiation-inducing factor-1) という化合物の生物活性は特筆に値する。

DIF-1 は、細胞性粘菌の一種である *Dictyostelium discoideum* の生理活性物質 (分化誘導因子) として英国のグループにより発見/報告された化合物である (Morris et al. *Nature.* 1987)。興味深い事に、DIF-1 とその誘導体は、哺乳類細胞においても多彩な作用を示す。近年、久保原 (本研究分担者) らはいくつかの DIF 誘導体が各種哺乳類細胞の糖取り込みと糖代謝を促進することを発見した。また久保原らは、腹腔内投与した DIF-1 が 2 型糖尿病モデルマウス (KK-Ay) の食後の血糖値を有意に下降させることを報告している [Kubohara et al. *Life Sci.* 2008]。これらの成果は、DIF 誘導体が 2 型糖尿病予防薬/治療薬として臨床応用できる可能性、並びに、我々が開発したニトロ化検出系を利用して、より有効/有用な DIF 誘導体を開発できる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、DIF 誘導体やその他の化学物質を用いて、培養脂肪細胞の分化を抑制する物質を探索することにした。そして効果の見られた物質に関しては、ニトロ化の抑制効果を確認することにした。

3. 研究の方法

培養脂肪細胞として利用したのは 3T3-L1 細胞 (国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより分譲) および 3T3-F442A 細胞 (ECACC, European Collection of Authenticated Cell Cultures より分譲) である。これらの細胞を 6 ウェルの培養プレートに播種し、コンフルエンになるまで培養した。その後、インスリン (10 μ g/ml) による分化誘導と同時に DIF 誘導体および各種化学物質を加え、10 日間培養することで、分化・成熟の抑制効果 (脂肪滴蓄積の抑制効果) を検証した。脂肪滴はオイルレッド O 染色により確認した。写真撮影後、イソプロパノールにより色素 (オイルレッド O) を抽出し、その吸光度を測定することで脂

脂肪滴の量を推定した。その後、細胞を回収してタンパク質の抽出を行った。そして、ニトロ化の変化を明らかにするため、ウエスタンブロット法による分析を行った。

4. 研究成果

DIF誘導体の1つにおいて、脂肪滴を10%減少させる物質が存在した。さらに、ニトロ化に関わる一酸化窒素(NO)の合成を抑制する物質において、脂肪滴を60%減少させるものが存在した(図)。現在これらの効果を再確認しており、できるだけ早く論文として発表する予定である。なお、ウエスタンブロット法において、ニトロ化の程度が有意に異なるタンパク質の同定には至らなかった。この原因として、所属機関の移動にともない、検出方法を変更したことが一因として考えられた。今後より高感度の検出法を用いて再確認する予定である。現時点では、脂肪細胞の分化・成熟抑制におけるDIF誘導体およびNOの役割は不明であるが、今後タンパク質のニトロ化以外の影響

についても分析を行い、その機序を解明したいと考えている。本研究によりこれまでに得られた知見は、今後さらなる増加が予想される2型糖尿病に対する予防薬・治療薬の開発に貢献できるものと考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iizumi Kyoichi, Kawasaki Hiroaki, Shigenaga Ayako, Tominaga Mitsutoshi, Otsu Ayaka, Kamo Atsuko, Kamata Yayoi, Takamori Kenji, Yamakura Fumiyuki	4. 巻 63
2. 論文標題 Tryptophan nitration of immunoglobulin light chain as a new possible biomarker for atopic dermatitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 197 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.18-53	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazuki Fujita, Susumu Tanaka, Kyoichi Iizumi, Shuri Akiyama, Kaoru Uchida, Makoto Ogata, Daichi Aoki, Osamu Hosomi, Yuzuru Kubohara	4. 巻 19
2. 論文標題 Melibiosamine, a novel oligosaccharide, suppresses mitogen-induced IL-2 production via inactivation of NFAT and NF- κ B in Jurkat cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and biophysics reports	6. 最初と最後の頁 100658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2019.100658	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kyoko Totsuka, Yuka Makioka, Kyoichi Iizumi, Katsunori Takahashi, Yoshiteru Oshima, Haruhisa Kikuchi, Yuzuru Kubohara	4. 巻 9
2. 論文標題 Halogen-Substituted Derivatives of Dictyostelium Differentiation-Inducing Factor-1 Suppress Serum-Induced Cell Migration of Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells in Vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom9070256	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kyoichi Iizumi, Hiroaki Kawasaki, Ayako Shigenaga, Mitsutoshi Tominaga, Ayaka Otsu, Atsuko Kamo, Yayoi Kamata, Yuzuru Kubohara, Kenji Takamori, Fumiyuki Yamakura
2. 発表標題 6-NITROTRYPTOPHAN IN IMMUNOGLOBULIN LIGHT CHAIN AS A NEW POSSIBLE BIOMARKER FOR ATOPIC DERMATITIS
3. 学会等名 15th International Society for Tryptophan Research (ISTRY) Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Kawasaki, Mitsutoshi Tominaga, Ayako Shigenaga, Kyoich Iizumi, Takeshi Baba, Ayaka Otsu, Fumiya Kusube, Keiichi Ikeda, Kenji Takamori, Fumiyuki Yamakura
2. 発表標題 Key role of 6-nitrotryptophan formation in carbonic anhydrase for the onset of atopic dermatitis
3. 学会等名 15th International Society for Tryptophan Research (ISTRY) Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久保原 禪 (Kubohara Yuzuru) (00221937)	順天堂大学・スポーツ健康科学研究科・教授 (32620)	
研究分担者	山倉 文幸 (Yamakura Fumiyuki) (20053358)	順天堂大学・保健医療学部・客員教授 (32620)	