

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590146
 研究課題名（和文）酸化ストレス防御酵素とアディポサイトカインとの協調的動脈硬化抑制作用発現調節機構

研究課題名（英文）Regulation of anti-arteriosclerotic activity between anti-oxidative enzyme and adipocytokines

研究代表者

足立 哲夫（ADACHI TETSUO）
 岐阜薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号 40137063

研究成果の概要：3T3-L1 培養細胞系を用い肥満に起因する脂肪組織炎症性病態の発症・進展と酸化ストレスとの関係について検討した。3T3-L1 細胞の分化に伴う EC-SOD や APN の発現変動は PPAR- γ や C/EBP- α の制御を受けていることが示唆された。3T3-L1 細胞とマクロファージとの共培養実験から、脂肪組織へのマクロファージの浸潤に伴う TNF- α 発現の増大が脂肪組織の炎症性病態の進展を引き起こし、それに対する脂肪細胞での EC-SOD 発現上昇は脂肪組織を炎症性病態に起因する酸化ストレスから防御するための反応であると推察された。

（語句の説明）EC-SOD：酸化ストレス防御酵素、APN：抗炎症性アディポサイトカイン、PPAR- γ と C/EBP- α ：転写因子、TNF- α ：向炎症性サイトカイン。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：スーパーオキシドジスムターゼ、アディポネクチン、腫瘍壊死因子、脂肪細胞、酸化ストレス、糖尿病、メタボリックシンドローム、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

（1）生活習慣と社会環境の変化にともなって、インスリン抵抗性・糖尿病患者が急速に増加している。糖尿病はひとたび発症すると治癒することは難しく、腎症、網膜症、神経障害などの細小血管障害、動脈硬化性疾患などの大血管障害などの合併症の発症・進展を促進するため、患者の QOL を著しく低下させるのみではなく、医療経済学的にも社会に

大きな負担を強いることになる。厚生労働審議会においても糖尿病の発症の低減が 5 年後に向けての目標の一つとして提示された。（2）細胞外型スーパーオキシドジスムターゼ（EC-SOD：SOD3）は、1982 年にスウェーデンの Dr. Marklund により、細胞外に分泌されるスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）アイソザイムとして発見された。当初は細胞内に局在する銅・亜鉛スーパーオキ

シドジスムターゼ (Cu,Zn-SOD : SOD1) やマンガンスーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD : SOD2) に比べマイナーなアイソザイムという認識であったが、最近では血管系に広汎に分布し、内皮細胞やそれに接着した白血球から細胞外に放出される活性酸素 (ROS) を効率よく消去する唯一の酸化ストレス防御酵素として注目を集めている。申請者は、Dr. Marklund に師事し EC-SOD に関する研究を開始し、高血糖状態や循環器疾患リスクファクター存在下での EC-SOD 機能の変動、EC-SOD 発現調節メカニズム、EC-SOD 遺伝子導入実験動物を用いた病態改善などの研究を続けてきた。近年、種々の酸化ストレス防御酵素の内でも EC-SOD の生理的役割に注目し考察している報告が増えてきているが、EC-SOD を遺伝子発現、タンパク・酵素活性レベルから医学・生化学的、臨床化学的に研究しているグループは非常に少ない。

2. 研究の目的

(1) 脂肪組織由来の生理活性物質 (アディポサイトカイン) の一種であるアディポネクチン (APN) は抗動脈硬化作用を有する。一方、ROS が動脈硬化の発症に深く関わっていることはよく知られているが、最近、ROS が APN の発現を低下させていることが報告された。申請者らは ROS の消去に関わる酵素の一種であり、血管系に広範に分布している EC-SOD に注目し、本酵素が動脈硬化の抑制に働いていることを報告してきた。また、平成 15 ~ 16 年度基盤研究において、血中の EC-SOD レベルが APN レベルと同調的に変動することを発見した。この結果より、生体においては、抗動脈硬化作用を最大限に発現するために EC-SOD と APN が協調的に発現調節されている可能性が考えられるため、本申請課題において、その調節分子機構の解明を目指した。

(2) 糖尿病病態時の EC-SOD の発現の変動について考察するために、脂肪細胞のみならず、血管平滑筋細胞 (大血管症モデル実験) や腎尿管細胞 (糖尿病性腎症モデル実験) における EC-SOD の発現調節機構についても解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養 : 3T3-L1 マウス前駆脂肪細胞は 4 mM L-グルタミン、100 unit/mL ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシン、10% 仔ウシ血清 (CS) を含む DMEM を用いて、37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。脂肪細胞への分化誘導は、細胞がコンフルエントになった後、培地を 4 mM L-グルタミン、100 unit/mL ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシン、10% ウシ胎児血清 (FCS) を含

む DMEM 培地に置換し、1 日後に 5 µg/mL インスリン、0.25 µM デキサメタゾン (DEX)、0.5 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX)、10% FCS を含む DMEM 培地に交換して 2 日間培養し、次いで 5 µg/mL インスリン、10% FCS を含む DMEM 培地にて 2 日間培養することで行なった。その後は 10% FCS を含む DMEM 培地を 1 日おきに交換した。マウスマクロファージ由来 J774 細胞、アフリカミドリザル腎尿管細胞 COS7、ヒト血管平滑筋細胞 SMC は 4 mM L-グルタミン、100 unit/mL ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシン、10% FCS を含む DMEM を用いて、37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。

(2) 脂肪細胞とマクロファージとの共培養 : 3T3-L1 細胞を 6 well plate に播種した後、上記のように分化誘導し、8 日後にポアサイズ 0.4 µm のトランスウェルを置き、その内部にあらかじめ 10% FCS を含む DMEM で培養したマウスマクロファージ由来 J774 細胞 (1.0×10⁴ 個) を加え、24 時間培養した。

(3) 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化の程度は Oil Red O 染色により確認した。

(4) SOD アイソザイム、アディポカイン類、転写因子の mRNA 発現量は RT-PCR 法により測定した。

(5) EC-SOD タンパク量は ELISA にて測定した。

4. 研究成果

(1) 3T3-L1 マウス前駆脂肪細胞において、分化誘導後 8 日目から Oil red O 試薬による油滴の染色が認められ、それ以降、細胞内の油滴は経時的に大きくなり、脂肪細胞の肥大化が確認できた。EC-SOD や APN の発現は、アディポサイトカイン発現調節転写因子である PPAR-γ や C/EBP-α の発現と同様に、12 日まで細胞の分化に伴って増加したものの、その後の肥大化の過程では逆に減少した (図 1)。一方、向動脈硬化因子である腫瘍壊死因子 (TNF-α) やマクロファージ遊走因子 (MCP-1) の発現は 12 日以降の脂肪細胞の肥大化に伴って急激に上昇した。

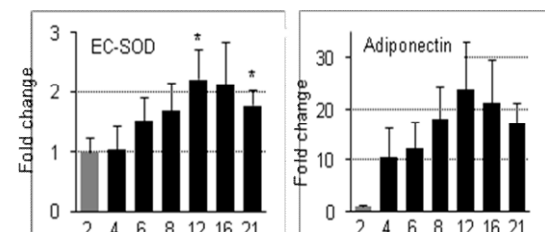


図 1 EC-SOD と ADP 発現の経日変化

細胞内に油滴が観察され、分化が確認された分化誘導後 8 日目の脂肪細胞培養系に TNF-α (10 ng/mL) を添加した結果、EC-SOD、

APN、PPAR- γ 、C/EBP- α の発現は有意に低下した。一方で、TNF- α や MCP-1 の発現は顕著に増加した。さらに、TNF- α 添加による上記因子の mRNA 発現量の変化は抗 TNF- α モノクローナル抗体製剤であるインフリキシマブ (10 μ g/mL) の添加により有意に抑制された (図 2)。

これら結果から、脂肪細胞での EC-SOD 発現は APN などの抗炎症性アディポサイトカインと共通の転写発現制御を受けている可能性が示唆された。

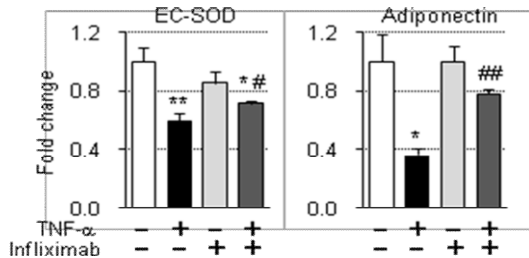


図 2 EC-SOD、APN 発現に対する TNF- α の影響
*P<0.05, **P<0.01 vs コントロール
#P<0.05, ##P<0.01 vs TNF- α 処理群

(2) 3T3-L1 から分化させた脂肪細胞とトリポリサッカライド (LPS) にて刺激したマクロファージ J774 細胞の共培養を行ったところ、脂肪細胞における APN の発現は低下し、TNF- α の発現は上昇した。この結果から、脂肪組織に浸潤し活性化されたマクロファージからの多量の ROS の放出や脂肪細胞での TNF- α の発現の増大が脂肪組織の炎症性病態の悪化につながっていることが明らかになった。一方、マクロファージとの共培養により脂肪細胞での EC-SOD 発現は上昇したが、これは脂肪組織を酸化ストレスから防御するための反応であると推察された (図 3)。

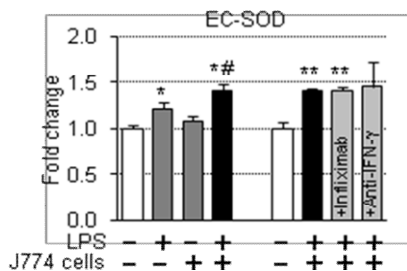


図 3 3T3-L1 細胞と J-774 細胞との共培養系での EC-SOD 発現
*P<0.05, **P<0.01 vs コントロール
#P<0.05, ##P<0.01 vs LPS 処理群

(3) 3T3-L1 細胞で確認された TNF- α の影響についてヒト血管平滑筋細胞 (SMC) を用いて確認した。SMC 培養系にヒト TNF- α を添加した場合、EC-SOD の mRNA レベル、

タンパクレベルの発現は 3T3-L1 細胞と同様に有意に抑制された。またこの影響はインフリキシマブの同時添加により完全に抑制された。さらに TNF- α による EC-SOD 発現低下は細胞内の p38 MAP kinase の調節を受けていることが明らかとなった (図 4)。

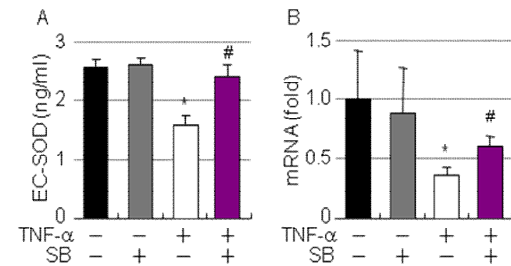


図 4 TNF- α による EC-SOD 発現低下に対する p38 MAP kinase 阻害剤の影響
A: 培地中の EC-SOD タンパク量, B: mRNA 量, SB: p38 MAP kinase 阻害剤 SB203580. *P<0.05 vs コントロール, #P<0.05 vs TNF- α 処理群

(4) 糖尿病性腎症などにおける腎尿細管病変が進行する過程においては組織は慢性的虚血状態に曝されている。アフリカミドリザル腎尿細管細胞 COS-7 細胞培養系に低酸素状態誘導試薬である CoCl₂ を添加した結果、細胞内の ROS の産生量は増大し、EC-SOD の発現は低下した。また、これらの変化は抗酸化剤である trolox の前処理により有意に抑制された (図 5)。さらに CoCl₂ による EC-SOD 発現の変動は、細胞内の p38 MAP kinase 系の調節を受けていることが明らかとなった。

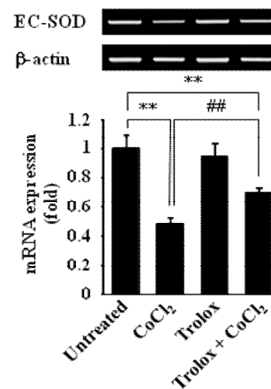


図 5 EC-SOD 発現に対する CoCl₂ の影響
**P<0.01 vs コントロール
##P<0.01 vs CoCl₂ のみ処理群

以上の結果から、血管系の重要な酸化ストレス防御酵素である EC-SOD の脂肪細胞、腎尿細管細胞及び血管平滑筋細胞での発現の低下が糖尿病並びにその合併症である腎症や大血管症の発症や悪化の一因になっていることが判明した。脂肪組織の分化・肥大化の過程において、TNF- α や MCP-1 などの

向炎症性アディポサイトカインの発現増大により誘引され組織に浸潤したマクロファージによる ROS やサイトカイン類の放出により局所の炎症状態が促進され、それがさらにマクロファージを誘引・活性化する「悪循環」に陥ることが判明した。また、抗酸化剤の適応は、その進展を抑制できる可能性があることが明らかになった。

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 10 件)

Adachi T, Toishi T, Wu H, Kamiya T, Hara H: Expression of extracellular superoxide dismutase during adipose differentiation in 3T3-L1 cells. *Redox Rep.*, **14**, 34-40, 2009(査読有)

Kamezaki F, Tasaki H, Yamashita K, Tsutsui M, Koide S, Nakata S, Tanimoto A, Okazaki M, Sasaguri Y, Adachi T, Otsuji Y: Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **177**, 219-226 2008 (査読有)

Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, Hosoda H, Fukui M, Nakamura N, Kitawaki J, Imai S, Nakano K, Ohta M, Adachi T, Obayashi H, Yoshikawa T: Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutrition Res.*, **28**, 137-143, 2008 (査読有)

Kamezaki F, Yamashita K, Tasaki H, Kume N, Mitsuoka H, Kita T, Adachi T, Otsuji Y: Serum soluble lectin-like low-density lipoprotein receptor-1 correlates with oxidative stress markers in stable coronary artery disease. *Int. J. Cardiol.*, 2008 Mar 24 Epub (査読有)

Kamiya T, Hara H, Yamada H, Imai H, Inagaki N, Adachi T: Cobalt chloride decreases EC-SOD expression through intracellular ROS generation and p38-MAPK pathways in COS7 cells. *Free Rad. Res.*, **42**, 949-956, 2008 (査読有)

Yamashita K, Kubara T, Kamezaki F, Adachi T, Tasaki H: Decreased extracellular superoxide dismutase level in patients with vasospastic angina. *Atherosclerosis*, **191**, 147-152, 2007 (査読有)

Kamezaki F, Tasaki H, Yamashita K, Shibata K, Hirakawa N, Tsutsui M, Kouzuma R, Nagatomo T, Adachi T, Otsuji Y: Angiotensin receptor blocker improves coronary flow velocity reserve in hypertensive patients :

Comparison with calcium channel blocker. *Hypertens. Res.*, **30**, 699-706, 2007 (査読有)
Tasaki H, Yamashita K, Tsutsui M, Kamezaki F, Kubara T, Tanaka S, Sasaguri Y, Adachi T, Nakashima Y: Heparin-released extracellular superoxide dismutase is reduced in patients with coronary artery atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **187**, 131-138, 2006(査読有)
Park H, Hasegawa G, Obayashi H, Fujinami A, Ohta M, Hara H, Adachi T, Tamaki S, Nakajima Y, Kimura F, Ogata M, Fukui M, Yoshikawa T, Nakamura N: Relationship between insulin resistance and inflammatory markers and anti-inflammatory effect of losartan in patients with type 2 diabetes and hypertension. *Clin. Chim. Acta*, **374**, 129-134, 2006 (査読有)

⑩ Adachi T, Toishi T, Takashima E, Hara H: Infliximab neutralizes the suppressive effect of TNF- α on expression of extracellular-superoxide dismutase *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 2095-2098, 2006 (査読有)

[学会発表](計 18 件)

神谷哲朗 原 宏和 山田晴生 今井裕一, 稲垣直樹, 足立哲夫: 低酸素状態下の COS7 細胞における extracellular-superoxide dismutase 発現調節. 日本薬学会第 129 年会, 京都 (2009, 3/26-28)

神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: 低酸素状態下における extracellular-superoxide dismutase 発現変動. 第 3 回「育薬・創薬研究」セミナー, 岐阜 (2008, 10/17)

神谷哲朗 原 宏和 山田晴生 今井裕一, 足立哲夫: *in vitro* 低酸素誘導時の COS7 細胞における EC-SOD の発現. 第 61 回日本酸化ストレス学会学術集会, 京都 (2008, 6/19-20)

足立哲夫 登石泰介 吳 昊姝, 神谷哲朗, 原 宏和: 3T3-L1 前駆脂肪細胞分化過程における EC-SOD の発現. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会, 東京 (2008, 5/22-24)

Kamezaki F, Tasaki H, Yamashita K, Adachi T, Okazaki M, Otsuji Y, Association of extracellular superoxide dismutase and adiponectin in patients with metabolic syndrome. 第 72 回日本循環器学会学術集会, 福岡 (2008, 3/28-30)

神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: 低酸素状態下における EC-SOD 発現調節. 日本薬学会第 128 年会, 横浜 (2008, 3/26-28)

Kamiya T, Hara H, Adachi T: The expression of extracellular-superoxide dismutase in COS7 cells during hypoxia induced by CoCl₂. 第 20 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会合同学会, 横浜 (2007, 12/11-15)

登石泰介, 吳 昊姝, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: 3T3-L1 細胞分化過程における adiponectin および EC-SOD の発現. 日本薬学会東海支部例会 (2007, 12/8)

Yamada H, Adachi T, Yamada Y, Kimura Y, Miyamoto K, Aoyama R, Kashima Y, Takezawa Y, Maeda K, Mizuno N, Yoshino M, Wakamatsu R, Mori Y, Yamaguchi S, Suga N, Watanabe H, Kitagawa W, Miura N, Nishikawa K, Futem A, Imai H: Extracellular superoxide dismutase production from dialysis fluid in peritoneal dialysis and culture fibroblast under tochoferol exposure. The 3rd Asian Chapter Meeting of International Society for Peritoneal Dialysis. Hiroshima (2007, 11/22-24)

- ⑩ Adachi T, Yamada H, Kamiya T, Toishi T, Hara H, Imai H: The expression of extracellular superoxide dismutase in COS7 cells during hypoxia. 14th Annual meeting of Society for Free Radical Biology and Medicine, Washington DC, USA (2007, 11/14-18)

山田晴生, 足立哲夫, 山田裕一, 宮本敢右, 木村行宏, 鹿島悠佳理, 竹澤有美子, 前田邦博, 水野奈津子, 森 由貴, 青山龍平, 吉野雅人, 若松 亮, 山口 諭, 菅 憲広, 渡辺一司, 北川 渡, 三浦直人, 西川和裕, 普天間新生, 今井裕一: 培養平滑筋細胞・メサンギウム細胞の Extracellular-superoxide dismutase 産生. 第 19 回腎とフリーラジカル研究会, 浜松 (2007, 9/29)

足立哲夫, 山田晴生, 原 宏和, 今井裕一: 低酸素状態下での COS-7 細胞における superoxide dismutase の発現の変動. 日本薬学会第 127 年会, 富山 (2007, 3/28-30)

登石泰介, 原 宏和, 足立哲夫: 3T3-L1 細胞分化過程における adiponectin および EC-SOD 発現量の変化に対する TNF- α の影響. 日本薬学会第 127 年会, 富山 (2007, 3/28-30)

Kamezaki F, Tasaki H, Yamashita K, Adachi T, Otsuji Y: Relation between adiponectin and markers of oxidative stress in high-risk patients for coronary artery disease. American College Cardiology. 07, New Orleans (2007, 3/24-27)

Kamezaki F, Tasaki H, Yamashita K, Koide S, Adachi T, Otsuji Y: Gene transfer of human extracellular superoxide dismutase ameliorates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. American College Cardiology. 07, New Orleans (2007, 3/24-27)

足立哲夫, 山田晴生, 登石泰介, 甲田明英, 原 宏和, 今井裕一: 低酸素状態下での

COS-7 細胞における extracellular-superoxide dismutase の発現. 第 18 回腎とフリーラジカル研究会, 筑波 (2006, 9/23)

山田晴生, 足立哲夫, 山田裕一, 尾関教生, 山口 諭, 菅 憲広, 鈴木啓介, 渡辺一司, 北川 渡, 三浦直人, 佐久間正人, 西川和裕, 普天間新生, 今井裕一: 腹腔内 extracellular-superoxide dismutase 産生の誘導. 第 18 回腎とフリーラジカル研究会, 筑波 (2006, 9/23)

足立哲夫, 原 宏和, 高島英滋, 甲田明英: EC-SOD 発現に及ぼす TNF- α の影響. 第 28 回日本フリーラジカル学会学術集会, 津 (2006, 5/13,14)

[図書](計 6 件)

足立哲夫, 山田晴生, 神谷哲朗, 登石泰介, 原 宏和, 今井裕一: 低酸素状態下での COS-7 細胞における extracellular-superoxide dismutase の発現. 腎とフリーラジカル 第 9 集, 東京医学社, 64-66, 2008

山田晴生, 山田裕一, 足立哲夫, 宮本敢右, 木村行宏, 鹿島悠佳理, 竹澤有美子, 前田邦博, 水野奈津子, 青山龍平, 森 由貴, 若松 亮, 山口 諭, 菅 憲弘, 渡辺一司, 北川 渡, 三浦直人, 西川和裕, 普天間新生, 今井裕一: 培養平滑筋細胞の extracellular-superoxide dismutase 産生. 腎とフリーラジカル 第 9 集, 東京医学社, 67-71, 2008

山田晴生, 足立哲夫, 山田裕一, 宮本敢右, 木村行宏, 鹿島悠佳理, 竹澤有美子, 前田邦博, 水野奈津子, 青山龍平, 森 由貴, 若松 亮, 山口 諭, 菅 憲弘, 渡辺一司, 北川 渡, 三浦直人, 西川和裕, 普天間新生, 今井裕一: 腹腔内 extracellular-superoxide dismutase 産生誘導. 腎とフリーラジカル 第 9 集, 東京医学社, 72-76, 2008

山田晴生, 山田裕一, 足立哲夫, 吉野雅文, 渡邊一司, 北川 渡, 西川和裕, 普天間新生, 今井裕一: CAPD 療法での腹腔内 extracellular superoxide dismutase 産生. 腎とフリーラジカル 第 8 集, 東京医学社, 125-129, 2006

山田晴生, 足立哲夫, 山田裕一, 森 由貴, 青山龍平, 三浦直人, 佐久間正人, 西川和裕, 普天間新生, 今井裕一: 血液透析患者の血清抗 malondialdehyde-modified LDL (MDA-LDL) 抗体とその意義. 腎とフリーラジカル 第 8 集, 東京医学社, 136-139, 2006

山田晴生, 足立哲夫, 山田裕一, 今井裕一: 細胞外型 Cu,Zn-SOD と慢性腎不全. 別冊・医学のあゆみ 酸化ストレス ver.2 —フリーラジカル医学生物学の最前線—, 医歯薬出版, 326-329, 2006

〔その他〕

ホームページ等

http://www.gifu-pu.ac.jp/research/research_rinkyaku.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

足立 哲夫 (ADACHI TETSUO)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40137063

(2)研究分担者

原 宏和 (HARA HIROKAZU)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30305495

神谷 哲朗 (KAMIYA TETSURO)

岐阜薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：60453057

(3)連携研究者

山田 晴生 (YAMADA HARUTAKA)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70230472