

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：25503
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））
研究期間：2019～2022
課題番号：18KK0463
研究課題名（和文）生体内因子・小胞体ストレスによる肥満・生活習慣病形成機構の分子機序解明と創薬

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanisms and treatment against physiological factor/ER stress-induced obesity/metabolic syndrome

研究代表者
細井 徹（Hosoi, Toru）

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：40379889
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,800,000円
渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：肥満の原因としてレプチンが効きにくくなること、すなわちレプチン抵抗性の形成が関わる。私たちは、今までにレプチン抵抗性の原因として小胞体ストレスが関与することを明らかにしてきた。本研究では、小胞体ストレスによるレプチン抵抗性形成機構について検討した。その結果、小胞体ストレスセンサータンパク質の一つであるIRE1^αがOB-Rレプチン受容体と相互作用し、レプチンシグナルに影響を与えることが明らかになった。また、小胞体ストレス/慢性炎症時にグリア細胞から遊離されるグリア由来因子が、OB-Rレプチン受容体活性に影響せずレプチンシグナルの下流の経路に作用してレプチン抵抗性を惹起することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は生活習慣病などの原因となることが知られており、肥満の発症機構を明らかにすることは、それらの疾患の予防や治療薬開発において重要である。本研究で明らかにした肥満のメカニズムに関する基礎的知見は、これらの疾患発症予防や治療に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：An obesity is related to the ineffectiveness of leptin, i.e; the formation of leptin resistance. We have revealed that endoplasmic reticulum stress is involved in the cause of leptin resistance. In this study, we investigated the mechanism of leptin resistance. As a result, IRE1^α, one of the endoplasmic reticulum stress sensor proteins, interacted with the OB-R leptin receptor and affected leptin signaling. On the other hand, glial derived factor, released during endoplasmic reticulum stress/chronic inflammation, induced leptin resistance by acting on the downstream pathway of leptin signaling without affecting OB-R leptin receptor activity.

研究分野：神経薬理学

キーワード：レプチン

1. 研究開始当初の背景

肥満は生活習慣病の主要な危険因子となることから、肥満発症機構の解明は予防医学の観点からも重要な課題となっている。肥満人口が世界的に増加している現状において、我が国においてもメタボ健診が実施されるなど近年、生活習慣病に対する意識が高まっており、肥満の予防・治療薬開発は急務の課題となっている。

レプチンは脂肪組織より循環血液中に分泌され、脳に作用して摂食抑制効果を惹起する抗肥満タンパク質である (Nature 1994, 372: 425-432.)。レプチン発見当時は、レプチンが抗肥満効果を有することから、レプチンが肥満の治療に有効となる可能性に注目が集まっていた。しかしながら、多くの肥満者はレプチン抵抗性の病態を示したことから、現在はレプチン自身は肥満の治療に有効ではなく、レプチン抵抗性を抑制することが肥満の治療に有効であると考えられている (Science 2000, 299: 856-8)。しかし、現在その詳細なレプチン抵抗性の形成機構は明らかにされていない。このような中、私たちは小胞体ストレス (細胞へのストレス負荷による折り畳み異常タンパク質の小胞体への蓄積) がレプチン抵抗性の原因となることを見出し、肥満発症の新概念を提唱した (Mol. Pharmacol., 2008, 74: 1610-9)。さらに小胞体ストレスの抑制により肥満抑制効果を発揮する抗肥満候補薬を明らかにした (EMBO Mol. Med., 2014, 6: 335-46)。

今までの研究の結果、神経細胞における小胞体ストレスがレプチン抵抗性の原因になることが明らかになった。一方、脳内には神経細胞に加えてグリア細胞が存在する。レプチンは神経細胞に作用して抗肥満作用を惹起することは知られているが、神経細胞の周りに存在するグリア細胞の役割は明らかにされていない。今までの検討の結果、肥満の脳で惹起される小胞体ストレスや炎症により、ストレスを受けたグリア細胞からは、レプチンシグナルを抑制させる因子が分泌される可能性が示された。以上より、肥満の病態ストレス時 (小胞体ストレス時) にはグリア細胞からレプチンシグナル抑制因子が分泌されるという可能性が示された。

さらに小胞体ストレスによるレプチン抵抗性形成機構について検討したところ、高脂肪食過剰摂取による細胞膜脂質の飽和化が小胞体ストレスによるレプチン抵抗性形成に関わる可能性も示している (Biol. Pharm. Bull. 2017;40:1161-1164.)。

2. 研究の目的

現在までの一連の研究を通して、以下の課題が浮き彫りになった。

グリア細胞から分泌されるレプチンシグナル抑制因子がどのような分子機構でレプチンシグナルを抑制するか。

小胞体ストレスによって活性化される小胞体膜タンパク質である小胞体ストレストランスデューサーによるレプチン受容体シグナルへの影響解析。

そこで本共同研究では、レプチン抵抗性/肥満の形成機構の分子機構をレプチン受容体レベルで明らかにし、上記課題解決を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

まず、レプチン受容体を stable に発現させた神経細胞にレプチンを処理したときに惹起される STAT3 のリン酸化レベルを Western blotting 解析により解析し、レプチン抵抗性が起きることを確認した。その後、タンパク質相互作用による発光を生細胞で検出することを可能にするシステム (Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)) 解析により細胞膜上でのレプチン受容体の二量体化/活性化に及ぼす影響を解析した。HEK293T 細胞に、レプチン受容体と蛍光タンパク質を融合させた遺伝子を細胞に発現させ、受容体の二量体化による BRET 蛍光シグナルを検出した。本発光システムを用いて、レプチン抵抗性関連因子処理時の影響を検討した。小胞体ストレスがどのようなメカニズムでレプチン抵抗性を惹起するかは明らかにされていない。

そこで小胞体ストレストランスデューサー阻害薬処理によるレプチン受容体活性の影響を検討した。小胞体ストレストランスデューサーとレプチン受容体が相互作用している可能性について、免疫沈降法で検討する。実験では、HEK293T 細胞に、各種のタグが付いたコンストラクト（レプチン受容体および小胞体ストレストランスデューサー）をトランスフェクトし、各種タグの抗体で免疫沈降後、Western blotting 解析により検出した。本結合が確認できた後、小胞体ストレストランスデューサーとレプチン受容体との BRET システムの構築を行い、相互作用の検出を試みた。

4. 研究成果

グリア細胞由来因子のレプチン受容体シグナルへの影響

私たちは、現在までの研究の結果、レプチン抵抗性のメカニズムの一部に小胞体ストレスが関わる可能性を示してきた。さらに、神経細胞におけるレプチンシグナルに対して、肥満状態の慢性炎症や小胞体ストレス時の脳グリア細胞由来因子も一部関わる可能性を示してきた。そこで、本研究では慢性炎症・小胞体ストレス時のグリア由来分泌因子によるレプチンシグナルの分子メカニズムを特に受容体レベルで検証した。アデノシンはレプチンによる STAT3 シグナルを抑制したことより、レプチン抵抗性に関わるグリア由来因子の候補分子である。そこでアデノシン処理後、BRET 技術を用いたレプチン受容体のコンフォーメーション的な変化を検討した。検討の結果、アデノシンはレプチン受容体の BRET 活性に影響を及ぼさないことが明らかになった。したがって、アデノシンはレプチン受容体以降の下流因子に作用してレプチン抵抗性を示す可能性が示された。

小胞体ストレストランスデューサーによるレプチン受容体シグナルへの影響解析

小胞体ストレスセンサータンパク質は主として小胞体に存在するが、小胞体ストレス条件下もしくは生理的条件下でレプチン受容体とどのようにクロストークするかについては不明である。また、レプチン受容体は膜タンパクであるが、細胞内にインターナリゼーションすることも知られている。そこで、レプチン受容体のコンフォーメーション的な変化に及ぼす小胞体ストレスセンサータンパク質の影響について検討した。BRET 技術を用いたレプチン受容体のコンフォーメーション的な変化を検討したところ、小胞体ストレスセンサータンパク質の阻害薬処理でコンフォーメーション的な変化が惹起される可能性が明らかになった。従って、小胞体ストレスセンサータンパク質とレプチン受容体は、何らかのクロストークがある可能性が考えられた。

小胞体ストレストランスデューサーとレプチン受容体の相互作用解析

上記、BRET 技術を用いたレプチン受容体のコンフォーメーション的な変化が小胞体ストレスセンサータンパク質の阻害薬処理で変化したことより、小胞体ストレスセンサータンパク質がレプチン受容体と相互作用している可能性が示唆された。そこで、その可能性を検証した。実験では、HEK293 細胞に各種のタグが付いたコンストラクト（レプチン受容体および小胞体ストレストランスデューサー）をトランスフェクトし、免疫沈降法で相互作用の検出を試みた。その結果、レプチン受容体と小胞体ストレストランスデューサーが結合しているとの結果が得られた。

BRET システムによる小胞体ストレストランスデューサーとレプチン受容体の相互作用解析

小胞体ストレストランスデューサーとレプチン受容体が直接相互作用して、コンフォーメーション的な変化を惹起している可能性を試みた。そこで、小胞体ストレストランスデューサーとレプチン受容体の BRET 用のコンストラクトの作成を行なった。その後、上記 2 種のコンスト

ラクトを HEK293T 細胞にトランスフェクトし、BRET シグナルの検出を試みた。その結果、弱いながら小胞体ストレストランスデューサーとレプチン受容体の BRET シグナルの検出が認められた。検出感度などをどのように上げていくかなどの課題も出てきた一方で、小胞体ストレストランスデューサーとレプチン受容体の直接の相互作用による BRET 検出ができたことより、直接の相互作用の可能性を示すことができたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wardelmann Kristina, Rath Michaela, Castro Jos? Pedro, Bl?mel Sabine, Schell Mareike, Hauffe Robert, Schumacher Fabian, Flore Tanina, Ritter Katrin, Wernitz Andreas, Hosoi Toru, Ozawa Koichiro, Kleuser Burkhard, Wei? J?rgen, Sch?rmann Annette, Kleinridders Andr?	4. 巻 10
2. 論文標題 Central Acting Hsp10 Regulates Mitochondrial Function, Fatty Acid Metabolism, and Insulin Sensitivity in the Hypothalamus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 711 ~ 711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10050711	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Horiuchi Keigo, Tsuchio Kyoji, Matsushima Goshi, Thon Mina, Hosoi Toru, Ozawa Koichiro	4. 巻 32
2. 論文標題 The possible role of biochanin A in ameliorating endoplasmic reticulum stress-induced leptin resistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NeuroReport	6. 最初と最後の頁 983 ~ 987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNR.0000000000001674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kakegawa Junya, Ohtsuka Satoshi, Yokoyama Masahiro, Hosoi Toru, Ozawa Koichiro, Hatanaka Takashi	4. 巻 100
2. 論文標題 Thermal Proteome Profiling Reveals Glutathione Peroxidase 4 as the Target of the Autophagy Inducer Conophylline	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 181 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/molpharm.121.000243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa Tadashi, Morohoshi Akane, Nagasawa Yuko, Nakagawa Makiko, Hosogane Masaki, Noda Yasuhiro, Hosoi Toru, Nakayama Keiko	4. 巻 38
2. 論文標題 SPT16 ubiquitylation by DCAF14-CRL4 regulates FACT binding to histones	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110541 ~ 110541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110541	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 Hosoi Toru, Yamawaki Yosuke, Kimura Hitomi, Honda Shoko, Ozawa Koichiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Possible Involvement of MyD88 in Regulating Stress Response in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 621446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.621446	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bastawy EM, Ahmed RR, Abd El-Hafeez AA, Abd El-Hady FK, Hosoi T, Ozawa K, El-Ganzuri MA.	4. 巻 71
2. 論文標題 Grapefruit juice exerts anti-osteoporotic activities in a prednisolone-induced osteoporosis rat femoral fracture model, possibly via the RANKL/OPG axis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 769-783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10616-019-00321-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamawaki Yosuke, Kimura Hitomi, Nagata Susumu, Ozawa Koichiro, Hosoi Toru	4. 巻 13
2. 論文標題 Peripheral Immune Activation in Mice Elicits Unfolded Protein Responses Independent on MyD88 Pathway in the Liver but not the Hypothalamus and Hippocampus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 854538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2022.854538	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Keigo, Kuramoto Kohei, Nakagawa Tadashi, Nomura Yasuyuki, Ozawa Koichiro, Hosoi Toru	4. 巻 323
2. 論文標題 COOH-terminal fragment of APP interacts with p62, forms an aggregate, and induces autophagic degradation in Alzheimer's cell model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C1633 ~ C1641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpcell.00003.2022	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Preninka Arini Isnani, Kuriya Karen, Yazawa Kyosuke, Yoshii Michiko, Yanase Yuhki, Jockers Ralf, Dam Julie, Hosoi Toru, Ozawa Koichiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Homocysteine causes neuronal leptin resistance and endoplasmic reticulum stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0278965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0278965	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hosoi Toru, Yazawa Kyosuke, Imada Michihiro, Tawara Akari, Tohda Chihiro, Nomura Yasuyuki, Ozawa Koichiro	4. 巻 103
2. 論文標題 Alkannin Attenuates Amyloid Aggregation and Alzheimer's Disease Pathology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 266 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/molpharm.121.000468	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 森本 理子, 栗屋 花蓮, 指山 祥子, 井上 夏奈, 中川 直, 野田 泰裕, 細井 徹
2. 発表標題 オランザピン誘発性肥満病態発現メカニズムの解明 レプチン抵抗性の関与
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松嶋 剛志, 梅田 渚, 垣本 真衣, 柳瀬 雄輝, 細井 徹, 小澤 光一郎
2. 発表標題 小胞体ストレスセンサタンパク阻害薬によるマスト細胞機能抑制機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野田 泰裕, 中川 直, 細井 徹
2. 発表標題 PERK阻害剤GSK2606414のパーキンソン病モデル細胞に対する小胞体ストレス非依存的保護作用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗屋 花蓮, Arini Isnani Preninka, 吉井 美智子, 柳瀬 雄輝, Ralf Jockers, Julie Dam, 小澤 光一郎, 細井 徹
2. 発表標題 ホモスチエインのレプチン抵抗性形成機構 レプチンを介したJAK2-STAT3シグナル抑制機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細井 徹, 松浦 武典, Anisia Silva, 和田 萌々恵, 松崎 周, 杉山 礼隆, 児玉 尚士, Julie Dam, Ralf Jockers, 小澤 光一郎
2. 発表標題 アデノシンによるレプチン抵抗性の受容体機能解析 BRET解析による検討
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細井 徹, 松浦 武典, シルバ アニジア, 和田 萌々恵, 松崎 周, 杉山 礼隆, 児玉 尚士, ジョーカーズ ラルフ, ダム ジュリエ, 小澤 光一郎
2. 発表標題 BRET 解析によるレプチン受容体シグナル制御へのアデノシンの役割の解明
3. 学会等名 第141回日本薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hosoi T., Silva A., Matsuura T., Sugiyama N., Shimizu K., Ozawa K., Jockers R., Dam J.
2. 発表標題 Inhibitory mechanisms of adenosine on the Ob-R receptor mediated leptin signaling.
3. 学会等名 CNRS GDR3545 GPCR international meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤颯斗, 細井 徹, 長谷川由貴, 松村奈美, 小澤光一郎
2. 発表標題 病態時におけるグリア-ニューロンインターアクションを介した肥満発症機構の解明 レプチン抵抗性のメカニズムの解明
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田 萌々恵, 松浦 武典, 細井 徹, 松崎 周, 杉山 礼隆, 児玉 尚士, 小澤 光一郎
2. 発表標題 ストレス負荷によるグリア細胞からのadenosine遊離と神経細胞におけるレプチン抵抗性形成機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野田泰裕, 渋谷優稀, 田中究, 松尾菜々子, 中川直, 細井 徹
2. 発表標題 Leptin受容体と小胞体ストレスセンサータンパク質IRE1 の相互作用
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	INSERM			