

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591056
 研究課題名（和文）cPLA₂制御による PPAR 活性化を応用した新規糖尿病治療法開発の試み
 研究課題名（英文）Effect of cPLA₂ inhibition on improvement of glucose tolerance through PPAR activation
 研究代表者
 松村 剛（MATSUMURA TAKESHI）
 熊本大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：20398192

研究成果の概要：

本研究は、cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂)の制御による PPAR 活性化の機序を解明し、その効果を介したインスリン抵抗性改善作用の有無を探求することを目的とし検討を行った。その結果、cPLA₂の阻害がマクロファージあるいは脂肪細胞において COX-2 産生増加を介して PPAR の活性化を誘導すること、脂肪細胞分化誘導を促進すること、さらに高脂肪食負荷マウスの耐糖能を改善することを見出した。これらの成果は、cPLA₂が2型糖尿病治療の標的分子であると共に、cPLA₂阻害剤が糖尿病治療に有益である可能性を示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：cPLA₂, 脂肪細胞, マクロファージ, インスリン抵抗性, 糖尿病, PPAR

1. 研究開始当初の背景

わが国において、糖尿病患者数の増加は深刻な社会問題であり、その発症・進展の阻止に繋がる新規治療法の開発は、医療財政や患者の QOL の改善に繋がる重要な命題である。

phospholipase A₂ (PLA₂)は長鎖脂肪酸生成に関与する酵素であるが、その PLA₂ファミリーの一つである cytosolic PLA₂ (cPLA₂)は、細胞内のアラキドン酸生成に関与する重要な分子である。一方、核内レセプターの1つである peroxisome proliferator-activated receptor- (PPAR) は、脂肪細胞分化に必

須の転写因子であり、組織のインスリン感受性を亢進させることから糖尿病治療のターゲット分子の一つとなっている。

申請者は最近、cPLA₂の特異的阻害剤が PPAR の活性化を誘導することを見出した。PPAR の活性上昇は、インスリン抵抗性改善効果を示す可能性が考えられることから、cPLA₂の負の制御が2型糖尿病治療に有益である可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、cPLA₂の制御による PPAR 活

性化機序の解明と、その PPAR 活性化を介したインスリン抵抗性改善作用の有無を検討するとともに、その機序を基にした糖尿病新規治療法確立を探求することを目的とする。

3. 研究の方法

細胞はマウスマクロファージ由来腫瘍細胞株である RAW264.7 細胞、マウス腹腔マクロファージ、及び前駆脂肪細胞である 3T3-L1 pre-adipocyte を分化誘導させた 3T3-L1 adipocyte を成熟脂肪細胞として用いた。また cPLA₂ の特異的阻害は、阻害剤である AACOCF₃ の投与もしくは cPLA₂ siRNA を遺伝子導入し行った。

- (1) PPAR 活性は PPAR のリガンド結合部位の C 端側に Gal4 蛋白を結合させた変異蛋白発現ベクター (pMX-PPAR) と Gal4 の DNA 結合領域をその上流に持つ luciferase reporter plasmid (p4xUASg-tk-luc) を RAW264.7 細胞、3T3-L1 adipocyte に遺伝子導入し各種刺激の後に luciferase 活性の測定を行い検討した。
- (2) 細胞内長鎖脂肪酸含有量はガスクロマトグラフィーにて検討した。
- (3) cyclooxygenase-2 (COX-2) の産生は、Western blot 法にて検討した。
- (4) 細胞内 15d-PGJ₂ 量の測定は、Enzyme Immunoassay 法にて検討した。
- (5) 脂肪細胞分化誘導促進の評価は、Oil Red-O 染色による脂質取り込み能、分化誘導マーカー (aP2、adiponectin、CD36) の real-time RT-PCR 法による mRNA 発現量にて検討した。
- (6) TNF- α 、MCP-1 産生は real-time RT-PCR 法による mRNA 発現量にて検討した。
- (7) C57Bl/6 マウスに高脂肪食負荷と同時に AACOCF₃ 投与を行い、その 4 週後のマウスに対し glucose tolerance test (GTT)、insulin tolerance test (ITT) を行った。またそれらマウスの腹腔内脂肪組織を採取し、同組織での脂肪細胞のサイズの計測を免疫染色法にて検討した。

4. 研究成果

<平成19年度に実施した研究の成果>

平成19年度は、cPLA₂の制御による PPAR 活性化の機序を解明し、その効果を介したインスリン抵抗性改善作用の有無を検討することを目的とし行った。

- (1) cPLA₂阻害剤 (AACOCF₃) 添加 (図1) あるいは cPLA₂ siRNA (図2) により、RAW264.7 細胞での PPAR 活性上昇が認められた。

- (2) 3T3-L1脂肪細胞にて AACOCF₃ 添加 (図3)、cPLA₂ siRNA (図4) により、PPAR 活性の上昇が認められた。

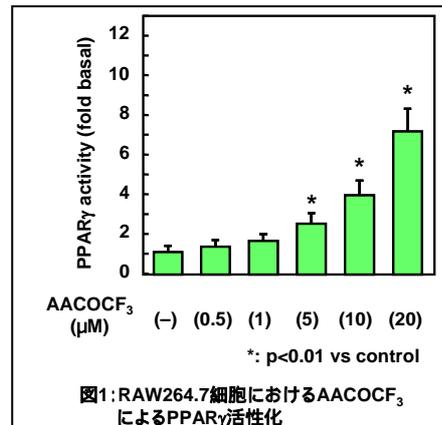


図1: RAW264.7細胞における AACOCF₃ による PPAR γ 活性化

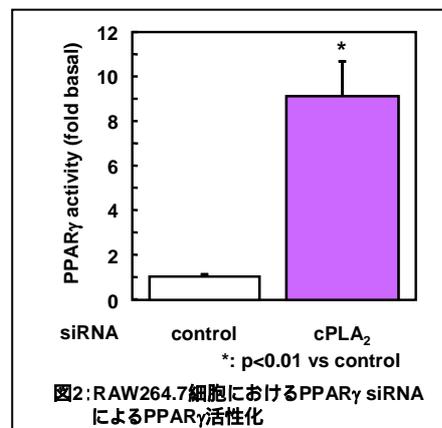


図2: RAW264.7細胞における PPAR γ siRNA による PPAR γ 活性化

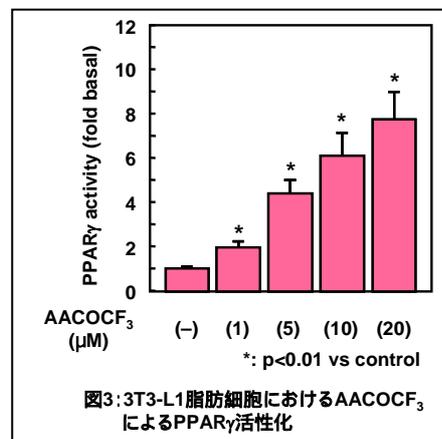


図3: 3T3-L1脂肪細胞における AACOCF₃ による PPAR γ 活性化

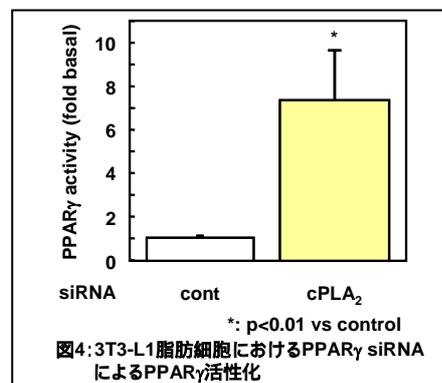


図4: 3T3-L1脂肪細胞における PPAR γ siRNA による PPAR γ 活性化

- (3) AACOCF₃添加、cPLA₂ siRNAにより、RAW264.7細胞での長鎖脂肪酸(アラキドン酸、オレイン酸、ドコサヘキサエン酸)の産生低下が認められた(表1)。

	control	AACOCF ₃ (20 μM)	PPAR _γ siRNA
Arachidonic acid (μg/ml)	2.41	1.23*	1.10*
Oleic acid (μg/ml)	16.1	11.3*	10.6*
Linoleic acid (μg/ml)	0.76	0.73	0.68
Eicosapentanoic acid (μg/ml)	0.24	0.27	0.22
Docosahexaenoic acid (μg/ml)	1.35	0.59*	0.44*

*, p<0.01, compared with control

表1: cPLA₂制御による細胞内長鎖脂肪酸量への影響

- (4) AACOCF₃添加、若しくはcPLA₂ siRNAにて、RAW264.7細胞でのCOX-2産生増加が認められ(図5) AACOCF₃によるPPAR 活性化はCOX-2 siRNA処理により有意に抑制された(図6)。

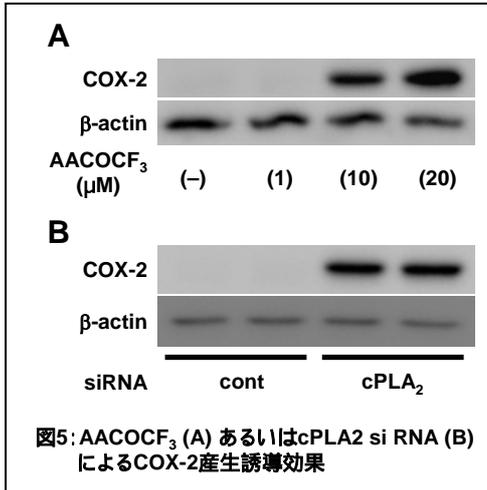


図5: AACOCF₃ (A) あるいはcPLA₂ siRNA (B) によるCOX-2産生誘導効果

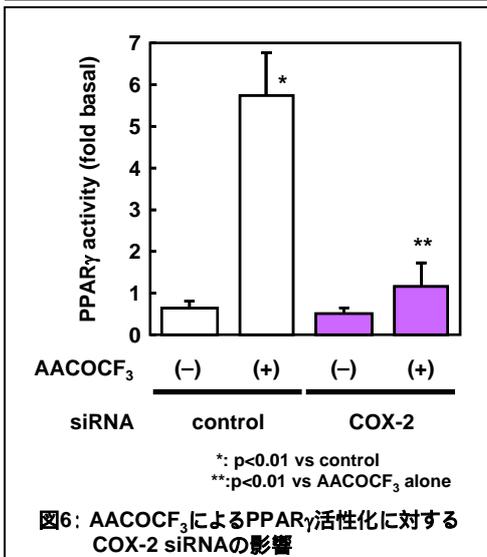


図6: AACOCF₃によるPPAR_γ活性化に対するCOX-2 siRNAの影響

- (5) AACOCF₃添加にて、RAW264.7細胞での15d-PGJ₂産生増加が認められた(図7)。

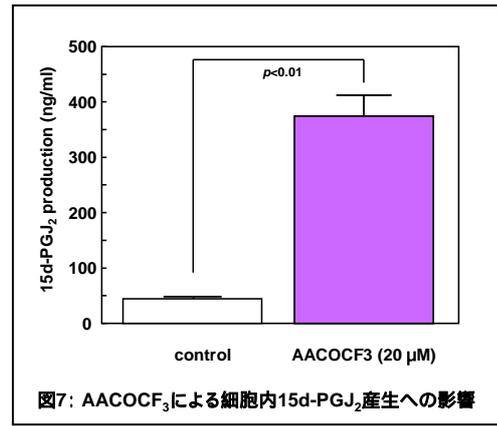


図7: AACOCF₃による細胞内15d-PGJ₂産生への影響

以上の結果から、cPLA₂の阻害は、マクロファージあるいは脂肪細胞において PPAR の活性化を誘導すること、またこの機序に COX-2 の産生増加が関与することが明らかとなった。

<平成20年度に実施した研究の成果>

平成20年度は、cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂)の制御によるPPAR 活性化がインスリン抵抗性改善作用を発揮するのかを検討することを目的とし行った。

- (1) AACOCF₃添加により、3T3-L1脂肪細胞の Oil Red-O染色による脂質取り込み能の増加を認めた(図8)。

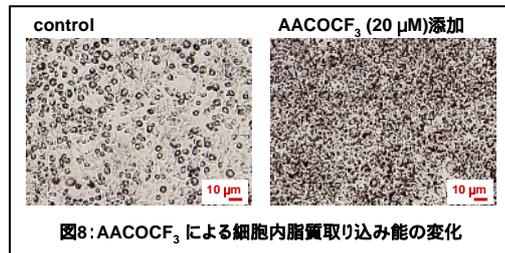


図8: AACOCF₃による細胞内脂質取り込み能の変化

さらに、AACOCF₃添加により、3T3-L1脂肪細胞のaP2、CD36、adiponectin mRNAの増加を認めた(図9, 10, 11)。

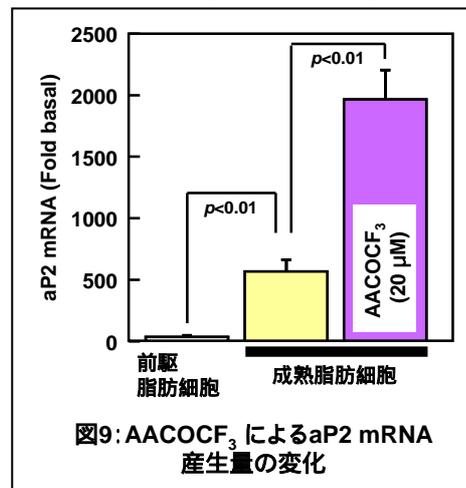


図9: AACOCF₃によるaP2 mRNA産生量の変化

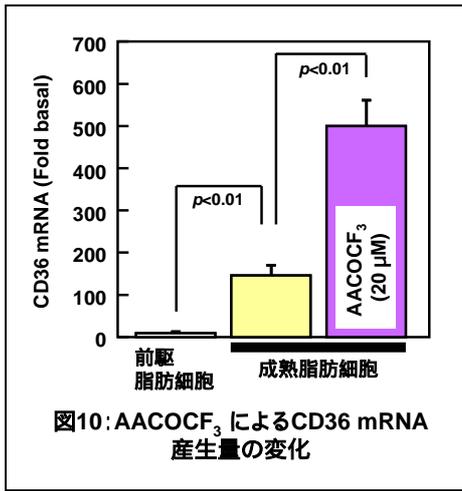


図10: AACOCF₃ によるCD36 mRNA 産生量の変化

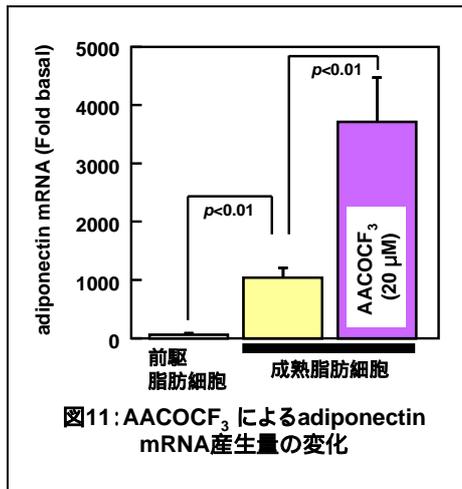


図11: AACOCF₃ によるadiponectin mRNA産生量の変化

- (2) (1)と同様にAACOCF₃を用いたcPLA₂阻害により、LPS刺激によるマクロファージからのTNF- α 、MCP-1産生が抑制された(図12)。またこの効果はPPAR γ siRNAにより解除された(図12)。

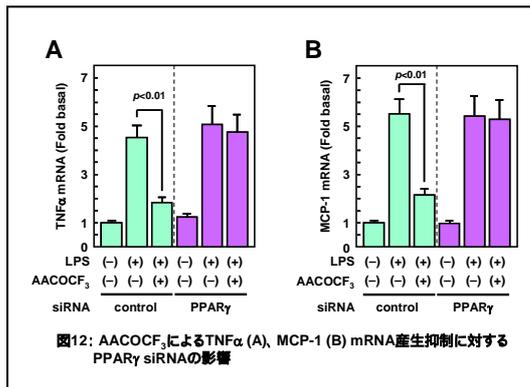


図12: AACOCF₃によるTNF α (A)、MCP-1 (B) mRNA産生抑制に対するPPAR γ siRNAの影響

- (3) インスリン抵抗性モデルマウスとして高脂肪食付加したC57Bl/6マウスを用い、AACOCF₃を経口にて投与、その4週間後のマウスに対しGTT (glucose: 2g/kg body weight) (図13A)、ITT (Insulin: 0.75 units/kg body weight) (図13B) を行っ

たところ、明らかな耐糖能、インスリン抵抗性の改善が認められた。

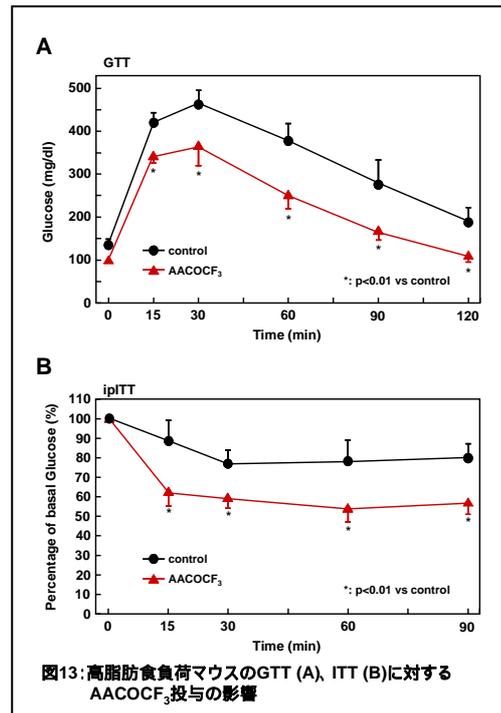


図13: 高脂肪食負荷マウスのGTT (A)、ITT (B)に対するAACOCF₃投与の影響

また、腹腔内の脂肪組織を採取し、脂肪細胞のサイズを測定したところ、AACOCF₃投与群において明らかな脂肪細胞の小型化が認められた(図14)。

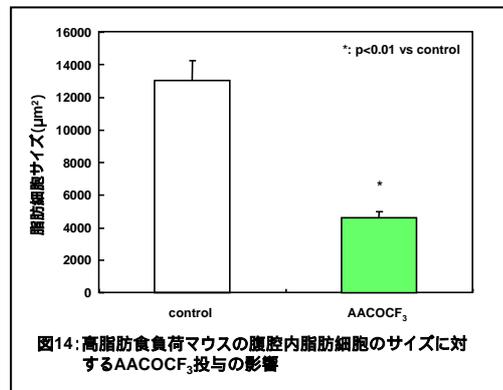


図14: 高脂肪食負荷マウスの腹腔内脂肪細胞のサイズに対するAACOCF₃投与の影響

以上の結果から、cPLA₂の阻害は、マクロファージあるいは脂肪細胞においてPPAR γ の活性化を介したインスリン抵抗性改善効果を誘導すること、またその結果、高脂肪食負荷マウスの耐糖能を改善する可能性が考えられた。

これら平成19年度、平成20年度で得られた研究の成果は、cPLA₂が2型糖尿病治療の標的分子であると共に、cPLA₂阻害剤が糖尿病治療に有益である可能性を示唆している。

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 8件)

1. Taketa K, Matsumura T, Yano M, Ishii N, Senokuchi T, Motoshima H, Murata Y, Kim-Mitsuyama S, Kawada T, Itabe H, Takeya M, Nishikawa T, Tsuruzoe K, Araki E. Ox-LDL activates PPAR and PPAR through MAPK-dependent COX-2 expression in macrophages. *J Biol Chem.* 283:9852-9862, 2008. 査読有
2. Goto H, Nishikawa T, Sonoda K, Kondo T, Kukidome D, Fujisawa K, Yamashiro T, Motoshima H, Matsumura T, Tsuruzoe K, Araki E. Endothelial MnSOD overexpression prevents retinal VEGF expression in diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 366:814-820, 2008. 査読有
3. Kojima K, Motoshima H, Tsutsumi A, Igata M, Matsumura T, Kondo T, Kawashima J, Ichinose K, Furukawa N, Inukai K, Katayama S, Goldstein BJ, Nishikawa T, Tsuruzoe K, Araki E. Rottlerin activates AMPK possibly through LKB1 in vascular cells and tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 376:434-438, 2008. 査読有
4. Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K, Motoshima H, Taguchi T, Sonoda K, Kukidome D, Takuya Y, Kawada T, Brownlee M, Nishikawa T, Araki E. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor- through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circ Res.* 100:1442-1451, 2007. 査読有
5. Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Motoshima H, Taguchi T, Matsuo T, Sonoda K, Kukidome D, Sakai M, Kawada T, Nishikawa N, Araki E. Troglitazone inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage proliferation: impact of the suppression of nuclear translocation of ERK1/2. *Atherosclerosis.* 191:22-32, 2007. 査読有
6. Yao D, Taguchi T, Matsumura T, Pestell R, Edelstein D, Giardino I, Suske G, Rabbani N, Thornalley PJ, Sarthy VP, Hammes HP, Brownlee M. High glucose increases angiopoietin-2 transcription in microvascular endothelial cells through methylglyoxal modification of mSin3A. *J Biol Chem.* 282:31038-31045, 2007. 査読有
7. Nishikawa T, Kukidome D, Sonoda K, Fujisawa K, Matsuhisa T, Motoshima H, Matsumura T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract.* 77 Suppl 1:S161-164, 2007. 査読有
8. Nishikawa T, Kukidome D, Sonoda K, Fujisawa K, Matsuhisa T, Motoshima H, Matsumura T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production on diabetic vascular complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 77 Suppl 1:S41-45, 2007. 査読有

[学会発表](計 4件)

1. 松村 剛, 矢野美由紀, 石井規夫, 荒木栄一: スタチン製剤による抗動脈硬化作用の新規機序解明 - PPAR , PPAR 活性誘導効果の関与 . 第 15 回日本血管生物医学学会 学術大会, 2007/11/29-2007/11/30, 福岡
2. 松村 剛, 矢野美由紀, 石井則夫, 竹田佳代, 村田雄介, 瀬ノ口隆文, 本島寛之, 西川武志, 荒木栄一: スタチンによる PPAR , PPAR を介した抗動脈硬化作用の解明 . 第 39 回日本動脈硬化学会総会, 2007/7/13- 2007/7/14, 東京
3. 松村 剛, 矢野美由紀, 石井則夫, 村田雄介, 竹田佳代, 瀬ノ口隆文, 本島寛之, 西川武志, 荒木栄一: スタチン製剤による抗動脈硬化作用の新規機序解明 - PPAR , PPAR 活性誘導効果の関与 . 第 50 回日本

糖尿病学会総会，2007/5/24- 2007/5/26，
仙台

4. 松村 剛，石井規夫，木下博之，中尾紗
綾，本島寛之，西川武志，荒木栄一：ニ
フェジピンによる PPAR 活性化を介した
抗動脈硬化作用機序の解明．第 31 回日本
高血圧学会総会，2008/10/9- 2008/10/10，
札幌

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松村 剛 (MATSUMURA TAKESHI)
熊本大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：20398192

(2)研究分担者

宮村 信博 (MIYAMURA NOBUHIRO)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40274716

本島 寛之 (MOTOSHIMA HIROYUKI)
熊本大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：40398201

(3)連携研究者

西川 武志 (NISHIKAWA TAKESHI)(平成
20 年度は研究分担者)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70336212