

平成23年5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590105

研究課題名(和文) アディポサイトカイン産生異常と酸化変性脂質の関与と創薬標的分子の同定

研究課題名(英文) Involvement of Oxidized Phospholipids in Aberrant Expression of Adipocytokines

研究代表者

國安 明彦 (KUNIYASU AKIHIKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：90241348

研究成果の概要(和文)：

肥満時のアディポサイトカイン産生異常において酸化ストレスの関与が指摘されている。3T3-L1 脂肪細胞において、酸化 LDL や酸化変性脂質の取込みは、プラスミノゲンアクチベーター阻害因子 1 およびレジスチンの産生増大を引き起こすことを見出した。この分子機序として活性酸素種産生と ERK 活性化が重要であることを明らかにした。よって、メタボリック症候群の予防・治療においては、抗酸化剤や ERK 阻害剤が有効と思われる。

研究成果の概要(英文)：

In obesity, oxidative stress is involved in aberrant production of adipocytokines. We found that oxidized LDL enhances the productions of plasminogen activator inhibitor-1 and resistin, and their molecular mechanism includes the production of reactive oxygen species followed by ERK signaling activation. Taken together, anti-oxidant reagents or ERK inhibitors may be useful for the prevention and treatment for metabolic syndromes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬分子機能学

1. 研究開始当初の背景

肥満では、脂肪組織からのアディポサイトカイン類の産生異常が観察されているが、脂肪組織中で発生する酸化ストレスや慢性的炎症の関与が指摘されている。しかしながら、酸化ストレスがどのようにして発生するの

か、酸化ストレスがアディポサイトカイン分泌異常をどのようにして引き起こすのかなど、不明な点が多い。

このような状況の下、マウス 3T3-L1 脂肪細胞を用いた検討の結果、酸化 LDL がアディポサイトカイン類の発現を変化させること

を見出した。例えば、インスリン抵抗性惹起因子レジスチン、血栓促進因子 PAI-1、マクロファージ遊走因子 MCP-1 の発現を増大させた。これらの産生変化が、メタボリックシンドロームの病態と非常に良く対応することをふまえ、申請者は「酸化 LDL は、酸化ストレスとアディポサイトカイン産生異常の主要因子である」との仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、酸化 LDL がアディポサイトカイン産生異常のメディエーターであるとの作業仮説に基づき、酸化変性脂質によるアディポサイトカイン産生変化とその分子機序解明を目的とし、リゾリン脂質による PAI-1 発現増大の分子機序解析、酸化 LDL 誘導性レジスチン発現機序の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞の培養

マウス 3T3-L1 細胞は、5% CO₂ 環境下、10% ウシ血清含有 DMEM 培地を用いて維持培養した。常法に従い、デキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチン、インスリンの混合液を用いて脂肪細胞へ分化させた。実験には、脂肪滴が十分蓄えられた、分化後 10 日目の細胞を用いた。

(2) 酸化変性および修飾 LDL の調製

ヒト血漿より遠心法により LDL を分画した。酸化 LDL は、10 μM Cu²⁺ 処理を 12 時間行い作製した。アセチル LDL (AcLDL) は、無水酢酸を滴下することにより調製した。得られた AcLDL をコブラ毒ホスホリパーゼ A₂ で処理することで、PLA₂-AcLDL を得た。それぞれの修飾 LDL は、アガロース電気泳動により移動度を測定することで、修飾が起こっていることを確認した。

(3) PAI-1 発現量の測定

脂肪細胞から分泌される PAI-1 の定量は、細胞培養上清を回収後、SDS-PAGE により分離し、ウサギ抗マウス PAI-1 抗体を用いたウェスタンブロット法で PAI-1 を検出し、得られたバンド濃度を画像定量ソフトで測定して行った。また、mRNA 量の定量は、特異的プライマーを用い、SYBR-Green 試薬によるリアルタイム PCR 法により行った。

(4) レジスチン発現量の測定

分泌タンパク質は、PAI-1 の場合同様、ウェスタンブロット解析により定量を行った。

(5) MAP キナーゼのリン酸化検出

各種処理を行った後、酸化 LDL もしくは LPC によって刺激後、一定時間後に 3T3-L1 脂肪細胞を 1% SDS の入ったサンプリング溶液で

溶解して反応を止めた。サンプルを SDS-PAGE にかけて後、抗リン酸化抗体を用いたウェスタンブロットを行い、リン酸化を検出した。

4. 研究成果

(1) 酸化 LDL およびリゾリン脂質による PAI-1 発現の亢進の分子機序解析

50 μg/mL の酸化 LDL (OxLDL) を、3T3-L1 脂肪細胞 (分化後 10 日) に負荷すると PAI-1 分泌が増大した。以前の研究において、この増大は、mRNA 増加に付随して起こること、未変性の LDL では起こらないことより、酸化 LDL 中の酸化変性脂質が脂肪細胞に取込まれ、PAI-1 遺伝子の転写活性化を促進していることを示した。本研究では、酸化変性脂質の同定、PAI-1 mRNA 発現を制御するシグナル経路の解析を行った。

まず、¹²⁵I-酸化 LDL の結合を指標に用いて、種々の変性修飾 LDL の 3T3-L1 脂肪細胞への結合量を調べた (図 1A)。その結果、アセチル化 LDL (AcLDL) やホスホリパーゼ A₂ 修飾アセチル LDL (PLA₂-AcLDL) が酸化 LDL 同様に脂肪細胞によく結合していることがわかった。また、添加処理後、24 時間後の PAI-1 発現量を比較してみると、酸化 LDL 同様、PLA₂-AcLDL で強い誘導が見られた (図 1B)。AcLDL では LDL と同じ程度であったことから、PLA₂ 処理で生じた変性脂質に PAI-1 発現誘導作用があることが推測された。

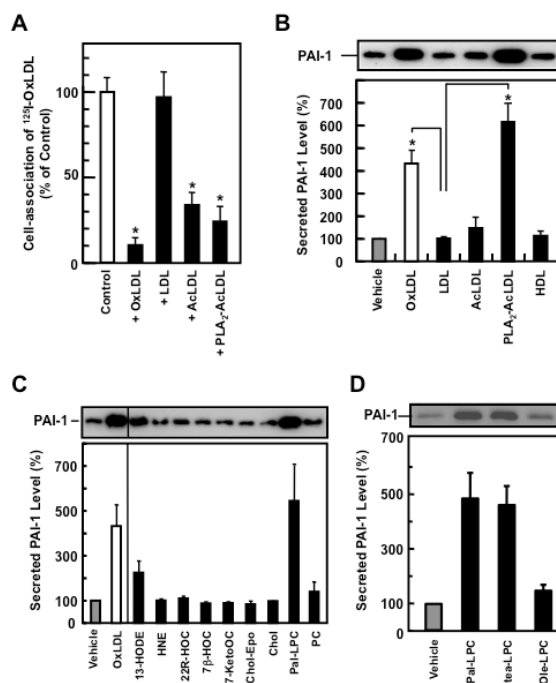


図 1 リゾリン脂質による PAI-1 発現増大

一般的に PLA₂ はホスファチジルコリン (PC) を脂肪酸とリゾ PC (LPC) に分解することか

ら、LPC がその本体ではないかと考えられた。そこで、PAI-1 産生への合成 LPC であるパルミトイル LPC (Pal-LPC) の影響を、酸化 LDL 中に含まれる変性脂質と比較評価した。図 1C に示すように、Pal-LPC に強力な PAI-1 産生作用があることが確認された。さらに、含有脂肪酸の比較をすると、パルミトイル酸とステアリン酸が付加した LPC が、PAI-1 発現誘導作用が強いことがわかった (図 1D)。以上の結果より、酸化 LDL による PAI-1 発現増大は、酸化変成により生成する LPC が PAI-1 誘導の主成分であることがわかった。

(2) リゾリン脂質による PAI-1 発現増大に関するシグナル経路の解析

酸化 LDL 中の LPC が PAI-1 発現を増大することを受けて、どのようなシグナル経路が活性化しているか調べた。我々は、既に酸化 LDL の処理により、3T3-L1 脂肪細胞において、活性酸素種 (ROS) とストレスシグナルの Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 群のリン酸化が起こることを観察している。そこで、LPC が ROS 産生と MAPK リン酸化を引き起すか、PAI-1 産生を指標にして調べた。

まず、ROS 消去剤 *N*-acetylcystein (NAC) を用いて PAI-1 産生への影響を調べた (図 2)。その結果、酸化 LDL で誘導される PAI-1 産生は NAC 前処理でほぼ完全に抑えられた。よって、PAI-1 産生増大には ROS 産生が不可欠であることがわかった。

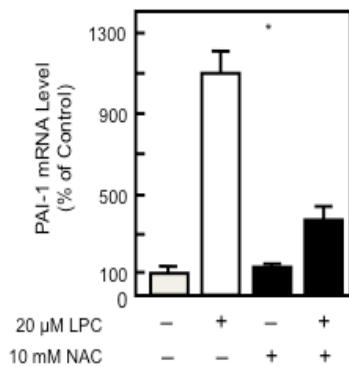


図 2 LPC で誘導される PAI-1 mRNA 産生に対する NAC の影響

次に、LPC により MAPK リン酸化が起こるかウェスタンブロット解析により調べた。図 3A に示すように、LPC 処理後速やかに 3 つの MAPK のリン酸化が観察された。これらのリン酸化は、NAC 前処置により ERK のみ減少した。よって、ERK は ROS 産生により活性化することがわかった。さらに、MAPK 阻害剤を用いた結果、ERK 阻害剤 U0126 のみに、LPC で増大する PAI-1 産生の抑制が見られた (図 3B)。

以上の結果をまとめると、LPC は、ROS 産生を引き起こし、ERK をリン酸化することで

遺伝子転写活性化し、PAI-1 発現増大を誘導すると考えられる。

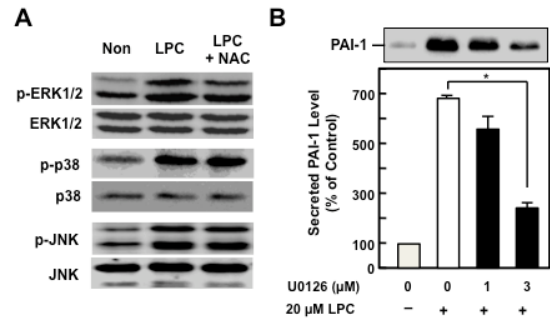


図 3 ERK リン酸化の LPC 誘導性 PAI-1 発現増大への影響

(3) 酸化 LDL 誘導性レジスチン翻訳制御機構の解析

マウスにおいて、レジスチンは肥満において発現量が増大すると報告されているが、変わらないという報告も数多くなされている。また、mRNA は変わらないが、分泌量は多くなっているとの報告もある。我々は、マウス 3T3-L1 脂肪細胞において、酸化 LDL が翻訳活性化を介してレジスチン分泌量を増大させることを見出した。

本研究では、まず、レジスチン翻訳制御の分子構造基盤を明らかにすることを目的とし、非翻訳領域の 5' -UTR、3' -UTR どちらに必須領域があるのか、ルシフェラーゼ活性を利用した OxLDL 応答性制御機構の解析を行った。まず、各々の UTR 領域をルシフェラーゼ配列の前後に挿入したプラスミドコンストラクトを調製した (図 4)。

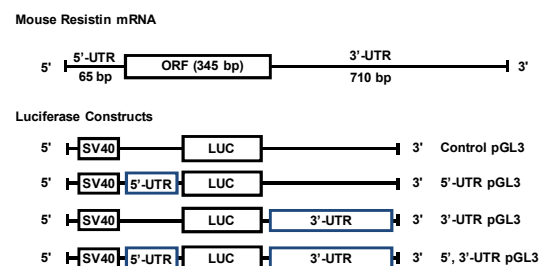


図 4 作製したレポータープラスミド

これを 3T3-L1 細胞に遺伝子導入試薬を使ってトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行って、翻訳されたタンパク質量を調べた。しかし、3T3-L1 細胞への遺伝子導入率が極端に低いこと、分化誘導後成熟するまでの間のプラスミドベクターの安定性等の問題から、十分な値のシグナルが得られず、比較・評価することはできなかった。

そこで、プラスミド導入効率が比較的高い

ことが知られるマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を用いて再検討した。本細胞は、3T3-L1 細胞と同じマウス由来であり、SRA などのスカベンジャー受容体を発現している。トランスフェクションの効率も 3T3-L1 細胞よりも格段によく 90%の細胞に導入され、十分な値のルシフェラーゼ活性が得られた。その結果、5' -UTR のみの場合、両 UTR (5', 3' -UTR) を欠損したコントロールに等しいルシフェラーゼ活性が得られた。一方、3' -UTR では、ルシフェラーゼ活性が大きく減少した (図 5)。両 UTR を含むコンストラクトも、3' -UTR コンストラクトと同程度に活性が低下した。この結果から、レジスチン mRNA の 3' -UTR 側に強く翻訳を抑制する作用が観察された。

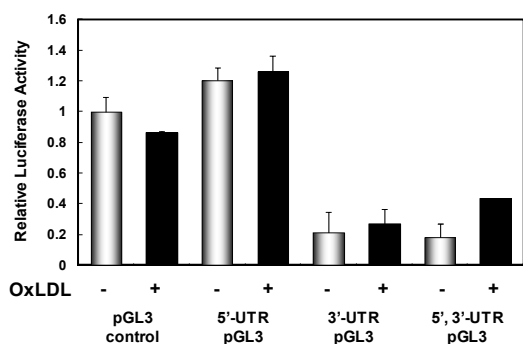


図 5 RAW264.7 細胞を用いたルシフェラーゼ活性の比較

しかし、これらの系に酸化 LDL を添加しても期待に反していずれの場合も変化はみられなかった。酸化 LDL が 3' -UTR に作用して翻訳抑制を解除できなかったと考えられる。この理由として、種は同じでも脂肪細胞とマクロファージでは、必要な翻訳活性化因子が異なっている可能性が考えられた。

(4) 酸化 LDL によるレジスチン発現増大における ROS および MAPK シグナルの関与

前述のように、3T3-L1 脂肪細胞では、OxLDL により、ROS 産生と 3つの MAPK 経路の活性化が観察される。そこで、PAI-1 発現同様に、酸化 LDL で誘導されるレジスチン発現にもこれら 2つの因子が関わっているか調べた。

最初に、ROS 消去剤 NAC の前処置により、レジスチン発現がどう変化するか、ウェスタンブロット法で調べた。10 mM NAC 処理により酸化 LDL で増大するレジスチン発現は顕著に抑えられた (45%)。また、抗酸化作用のある trion や resveratrol でも同様の抑制効果が見られた。これより、酸化 LDL による脂肪細胞でのレジスチン発現には ROS が関与していることが示唆された (図 6)。

次に MAPK 群の関与を、MAPK 阻害剤を使っ

て調べた結果、ERK 経路がレジスチン発現増大に大きく関わっていることがわかった。若干ではあるが p38 MAPK も影響している可能性が示された。したがって、酸化 LDL によるレジスチン発現は、LPC による PAI-1 発現増大と同じく、ROS 産生と ERK 活性化を介していると考えられる。

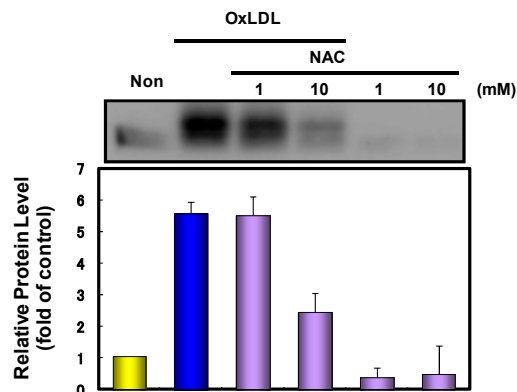


図 6 NAC 処理によるレジスチン発現の抑制

しかしながら、ERK シグナルを活性化するリズリン脂質 (LPC) 単独で処理しても、レジスチン発現は増大しなかった。この食い違いの説明として、レジスチン発現には、酸化 LDL 中の未知の脂質成分による制御と、活性酸素産生と ERK シグナル活性化の両方が必要であり、何れか一方では起こらない可能性が考えられる。それには、未知の脂質成分の同定が必要と思われる。

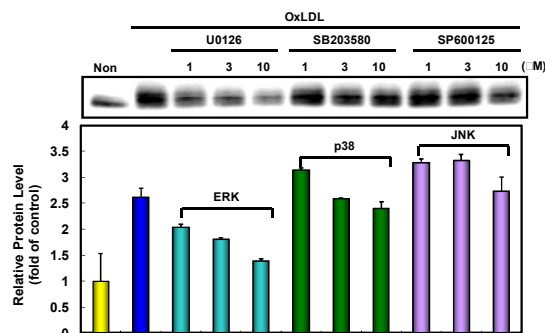


図 7 酸化 LDL によるレジスチン発現増大における MAPK の関与

(5) まとめ

インスリン抵抗性と関連する PAI-1 およびレジスチンの酸化 LDL による発現増大の分子機序を生化学的に解析した。その結果、PAI-1 発現増大では、酸化変成リン脂質 LPC がその活性本体であり、ROS 産生と ERK 活性化を介して、PAI-1 の遺伝子転写活性を亢進させることがわかった。一方、レジスチン発現でも、

ROS 産生と ERK 活性化が必須であることが示された。加えて、現在検討中であるが、炎症促因子 MCP-1 の発現も、LPC により PAI-1 と同様の分子機序で発現増大することを観察している。

これらの結果は、酸化 LDL が脂肪細胞に対して酸化ストレスを負荷し、PAI-1 やレジスチンの発現増大を誘発していることを推測させる。よって、脂肪組織内で酸化 LDL が産生する状況下では、アディポサイトカイン産生異常が起こる可能性が高いと考察される。

(6) 今後の課題

研究期間内では明らかにできなかったが、脂肪組織での酸化 LDL の存在証明をすると共に、リゾリン脂質の *in vivo* での影響などを調べることによって、酸化変性脂質が、肥満で起こるアディポサイトカイン産生異常のメディエーターの一つであるとの作業仮説を検証していく必要がある。

本研究により、酸化変性脂質、並びに ROS 産生および ERK シグナル経路は、メタボリック症候群の予防と治療を行う上での創薬標的として重要であることが示唆された。今後、脂肪組織に限定したこれらの制御を行うことができる化合物の開発が期待される。

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 13 件)

- ① Kuniyasu A., Tokunaga T., Yamamoto Y., Inoue S., Obama K., Kawahara K., Nakayama H.: Oxidized LDL and lysophosphatidylcholine stimulate plasminogen activator inhibitor-1 expression through reactive oxygen species generation and ERK1/2 activation in 3T3-L1 adipocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1811, 153-162 (2011) 査読有
- ② Karjalainen K., Jaalouk D.E., Bueso-Ramos C.E., Zurita A.J., Kuniyasu A., Lichtiger B., O'Brien S., Kantarjian H.M., Cortes J.E., Koivunen E., Arap W., Pasqualini R.: Targeting neuropilin-1 in human leukemia and lymphoma., *Blood*, 117, 920-927 (2011) 査読有
- ③ Jia, N., Semba, U., Nishiura, H., Kuniyasu, A., Nsiama, T.K., Nishino, N., Yamamoto, T.: Interconversion between pure chemotactic ligands and chemoattractant/secretagogue ligands of neutrophil C5a receptor by a single amino acid substitution., *J. Leukoc. Biol.*, 87, 965-975 (2010) 査読有
- ④ Murata K., Nishimura S., Kuniyasu A., Nakayama H.: Three-dimensional structure of $\alpha 1$ - β complex in skeletal muscle dihydropyridine receptor by single particle electron microscopy, *J. Electron Microsc.*, 59, 215-226 (2010) 査読有
- ⑤ Nambu T., Araki N., Nakagawa A., Kuniyasu A., Kawaguchi T., Hamada A., Saito H.: Contribution of BCR-ABL-independent activation of ERK1/2 to acquired imatinib resistance in K562 chronic myeloid leukemia cells, *Cancer Sci.*, 101, 137-142 (2010) 査読有
- ⑥ 國安 明彦: オートファジー誘導に基づく白血病治療薬の開発, 薬事日報「研究戦略・YAKU 学 - 研究現場から臨床へ -」, 11 月号 (2010) 査読無
- ⑦ Kawahara K., Nishi K., Suenobu M., Ohtsuka H., Maeda A., Nagatomo K., Kuniyasu A., Staufenbiel M., Nakagomi M., Shudo K., Nakayama H.: Oral administration of synthetic retinoid Am80 (Tamibarotene) decreases brain β -amyloid peptides in APP23 mice, *Biol. Pharm. Bull.*, 32, 1307-1309 (2009) 査読有
- ⑧ Kawahara K., Yoshida A., Koga K., Yokoo S., Kuniyasu A., Gotoh, T., Sawada M., Nakayama H.: Marked induction of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α in rat CD40⁺ microglia by comparison to CD40 microglia, *J. Neuroimmunol.*, 208, 70-79 (2009) 査読有
- ⑨ Makise M., Takehara M., Kuniyasu A., Matsui N., Nakayama H., Mizushima T.: Linkage between phosphorylation of the origin recognition complex and its ATP-binding activity in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 284, 3396-3407 (2009) 査読有
- ⑩ Yokote S., Setoguchi R., Shimizu E., Mishima N., Kawahara K., Kuniyasu A., Shirasaki S., Takahama K., Konno K., Kawai N., Yamaoka K., Kinoshita E., Nakayama H.: A synthetic approach to develop peptide inhibitors selective for brain-type sodium channels on the basis of pompilidotoxin structure, *Heterocycles*, 79, 925-933 (2009) 査読有
- ⑪ 國安 明彦: オートファジーを誘導するペプチド, ケミカルエンジニアリング, 54, 819-824 (2009) 査読無

- ⑫ Hirayama C., Watanabe H., Nakashima R., Nanbu T., Hamada A., Kuniyasu A., Nakayama H., Kawaguchi T., Saito H. : Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells, *Pharm. Res.*, 25, 827-835 (2008) 査読有
- ⑬ Nishimura S., Takahashi S., Kamikatahira H., Kuroki Y., Jaalouk DE., O'Brien S., Koivunen E., Arap W., Pasqualini R., Nakayama H., Kuniyasu A.: Combinatorial targeting of the macropinocytotic pathway in leukemia and lymphoma cells, *J. Biol. Chem.* 283, 11752-11762 (2008) 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 萱島 知子、山田 真梨子、國安 明彦、分泌性 Phospholipase A2 によるアディポサイトカイン産生制御, 第26回日本薬学会九州支部大会, 2009.12.12., 九州大学 (福岡県福岡市)
- ② 萱島 知子, 徳永 真理子, 國安 明彦, 杉本 幸彦, 中山 仁, 翻訳活性化を介した酸化 LDL によるレジスチン産生促進, フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキコロジー, 2009.11.6., 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)
- ③ 國安 明彦, 萱島 知子, 山田 真梨子, 杉本 幸彦, アディポサイトカイン発現におけるホスホリパーゼ A2 修飾 LDL の影響, フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキコロジー, 2009.11.5., 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)
- ④ 萱島 知子, 國安 明彦, 井上 祥子, アディポネクチン発現におけるリゾホスファチジルコリンの作用, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 2008.12.9., 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ⑤ 井上 祥子, 徳永真理子, 國安 明彦, 中山 仁, 脂肪細胞における酸化ストレス誘発性 PAI-1 分泌の分子機序, 第25回日本薬学会九州支部大会, 2008, 12, 7., 九州保健福祉大学 (宮崎県延岡市)
- ⑥ 井上 祥子, 國安 明彦, アディポカイン発現によるリゾホスファチジルコリンの影響, フォーラム 2008 衛生薬学・環境トキコロジー, 2008.10.17., 熊本市国際交流会館 (熊本県熊本市)

[その他]

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/yseika/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國安 明彦 (KUNIYASU AKIHIKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：90241348

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし