

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591057

研究課題名(和文)

メタボリックシンドロームの新規治療標的としての脂肪細胞S1P受容体の研究

研究課題名(英文)

Investigations of S1P receptors as novel therapeutic targets for metabolic syndrome

研究代表者

濱田 洋司 (HAMADA YOJI)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：20293706

研究成果の概要(和文)：炎症性アディポサイトカインの分泌亢進はメタボリックシンドロームの病態に重要な役割を果たしている。本研究では、スフィンゴシン1リン酸(S1P)は成熟脂肪細胞においてIL-6, MCP-1など炎症性アディポサイトカイン分泌を刺激すること、この作用は5種類のS1P受容体のうち、S1P3受容体を介しており、その特異的拮抗薬は炎症性アディポサイトカインの抑制に有効であることを明らかにした。この結果はS1P3受容体特異的拮抗薬がメタボリックシンドロームの病態を改善する可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Increased secretion of inflammatory adipocytokines has been related to the pathogenesis of metabolic syndrome. Present study revealed that sphingosine 1-phosphate (S1P) stimulated inflammatory adipocytokine secretion such as IL-6 and MCP-1 from mature adipocytes, mediated by a receptor S1P3 among five subtype receptors for S1P. The specific inhibitor for S1P3 was effective to suppress these inflammatory adipocytokines, which suggest that the S1P3 specific inhibitor may ameliorate the pathophysiology of metabolic syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：メタボリック・シンドローム、脂肪細胞、S1P受容体、アディポサイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム(MetS)は心血管障害を高率に発症する病態として注目されており、その高い罹患率と相まって、我が国においても重大な社会問題として認識されている。また近年では、従来報告されてきた大血管障害に加え、糖尿病性細小血管障害の増悪因子であることも判明している。

近年、肥満、MetSあるいは糖尿病個体で

亢進しているセラミドが、インスリン抵抗性およびMetSの基礎病態に関与している可能性が提唱されている(Diabetes 53:1215-21, 2004, Diabetes 54:591-602, 2005)。細胞内のセラミド増加は、インスリン抵抗性を惹起することが強く示唆されている。その機序として、脂肪細胞や筋細胞におけるGLUT4のトランスロケーション・発現の抑制、Akt/PKBなどインスリンシグナリングの阻

害、アミノ酸トランスポーターの抑制などが報告されており (J Biol Chem 280:35361-71, 2005)、TNF $\alpha$  やグルココルチコイドによるインスリン抵抗性もセラミド増加を介していると考えられる (Biochemical J 382:619-29, 2004)。

一方、セラミドの代謝産物であるスフィンゴシン1リン酸 (S1P) が、多様な生理活性を有することが注目されている。S1P は少なくとも5種類のG蛋白結合受容体 (S1P/EDG family) を介して、NF $\kappa$ B, ERK, COX2 の活性化あるいは BAX の抑制、細胞内 Ca 濃度上昇などの反応を惹起し、細胞の成長や維持、アポトーシスの抑制、炎症反応の抑制などに関与していることが知られている (Nat Rev Mol Cell Biol 4:397-407, 2003)。その作用により、S1P は血管新生やリンパ球の走化、腫瘍の成長などに重要な役割を担っていると考えられている。近年、S1P の受容体のアゴニストあるいはアンタゴニストを治療薬として用いる試みが、幾つかの疾患で検討されている。例えば S1P 受容体アゴニストである FTY720 は臓器移植後の免疫抑制薬として臨床試験段階にあり (Nat Rev Cancer 4:604-16, 2004)、またリンパ腫や乳癌、前立腺癌に対する抗腫瘍作用も示唆されている (Science 296:346-9, 2002)。さらに動脈硬化に対する予防効果も報告されている (Eur J Clin Invest 37:171-9, 2007)。

このように S1P は多くの疾患に関わっているが、MetS と S1P との関連性については、未だ検討されていない。我々は、S1P および S1P 受容体アゴニストである FTY720 が、脂肪細胞におけるインターロイキン6 (IL-6) の分泌を亢進させることを発見した。この効果は TLR4 を介していないことも確認している。脂肪細胞からの IL-6 など炎症性サイトカインの分泌亢進は、慢性炎症性疾患としての肥満および MetS の病態として重要であると考えられている。S1P は免疫抑制作用を有するという過去の論文からは予想外の結果であり、S1P は IL-6 を介して MetS に関与している可能性が考えられる。また血管内皮では S1P が MCP-1, IL-8 の発現にも関与している (BBRC 355:895-901, 2007) ことから、IL-6 以外のアディポサイトカインの分泌にも影響を与えていることも予想される。

## 2. 研究の目的

上述の背景に基づき、我々は脂肪細胞における S1P とその受容体のアディポサイトカイン分泌への関与を明かにし、さらに MetS の新たな治療標的としての S1P 受容体の可能性を探ることを目的に、本研究を計画した。

具体的な目的は、以下の通りである。1) S1P とそのアゴニストあるいはアンタゴニ

ストが、脂肪細胞からの IL-6 および他の炎症性アディポサイトカイン (MCP-1, TNF-, PAI-1 など) の発現および分泌に及ぼす影響を検討する。2) S1P 受容体作動薬・拮抗薬および siRNA を用い、S1P 1-S1P 5 受容体のいずれが各炎症性サイトカイン分泌に関与するかを明らかにする。3) S1P 受容体アンタゴニストの MetS 治療薬としての応用の可能性の検討。4) セラミド・S1P を介した、不飽和脂肪酸負荷のアディポサイトカイン分泌への影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 脂肪細胞の分化

3T3-L1 細胞を 10% FBS 含有 DMEM 培地で培養し、コンフルエント到達後 2 日経過した段階で IBMX, Dexamethazone, Insulin を添加、72 時間培養し分化誘導し、分化 20 日後に実験に供した。

### (2) S1P 受容体発現

脂肪細胞より mRNA を抽出し、RT-PCR, real-time PCR により、S1PR1-5 の各発現量および分化に伴う変化を検討した。

### (3) S1P および S1P 受容体作動薬・拮抗薬のアディポサイトカイン分泌に対する効果

S1P 前駆物質であるパルミチン酸とセラミド、S1P 受容体作動薬 FTY720、S1P1 特異的作動薬 SEW2871、S1P1/3 拮抗薬 VPC23019、S1P2 特異的拮抗薬 JTE013、S1P1 特異的拮抗薬 W146、S1P3 受容体特異的拮抗薬 BML-241、各物質のアディポサイトカイン (主に炎症性サイトカイン) 分泌に対する効果を検討した。また S1P3 受容体の下流シグナル分子とされる Rho kinase の阻害薬 Y-27632 の効果も合わせて検討した。

細胞培養液に各物質を必要な濃度で適宜組み合わせ添加し、必要時間培養後、培養液を採取、同時に細胞を回収し、アディポサイトカインの蛋白量および mRNA 発現測定に供した。

### (4) S1P 受容体に対する siRNA の導入とアディポサイトカイン分泌に及ぼす影響

SiRNA を用いて、S1P 受容体をノックダウンし、各サイトカイン分泌に及ぼす影響を観察した。

S1P 受容体 1, 3 に対する siRNA をトランスフェクション試薬に溶解し、分化 3T3-L1 細胞に添加した (80 nM)。72 時間の培養後、S1P 受容体の mRNA 発現およびタンパク発現を確認した。その後、細胞を上記薬物実験に供した。

### (5) TLR4 のノックダウン

パルミチン酸負荷時には、Toll-like receptor (TLR) 4 を介したサイトカイン分泌刺激を除外するため、TLR4 に対する siRNA を用い、S1P 受容体と同様の方法で TLR4 のノッ

クダウンも行った。

#### (6) サイトカイン分泌量・発現の評価

各条件における培養液中の IL-6、MCP-1、TNF- $\alpha$ 、PAI-1 などの濃度をサンドイッチ ELISA により測定した。

mRNA 発現は、各条件で培養後の細胞より抽出した RNA を用い、RT-PCR 法、定量 PCR 法により各サイトカインの mRNA 量を測定した。

## 4. 研究成果

### <研究結果>

#### (1) 脂肪細胞における S1P 受容体の発現

成熟 3T3-L1 脂肪細胞においては、S1P 受容体のうち S1P3 が主に発現しており、S1P1、S1P2 もわずかに発現が見られたが、S1P4、S1P5 はほとんど発現を認めなかった (図 1)。S1P3 受容体は分化後 3W でその発現増加が見られた。

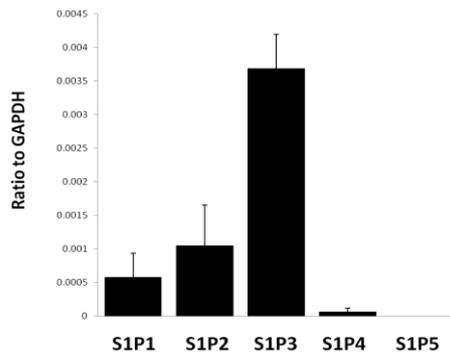


図 1. 3T3L1 脂肪細胞における S1P 受容体の発現

#### (2) S1P のアディポサイトカイン分泌に及ぼす効果

成熟脂肪細胞において、S1P は用量依存性に IL-6、MCP-1 の発現・分泌を有意に亢進させた。一方、adiponectin、leptin には影響を与えなかった。

#### (3) S1P 受容体作動薬・拮抗薬のアディポサイトカイン分泌に対する作用

汎 S1P 受容体作動薬 FTY720 は S1P 同様に、IL-6、MCP-1 の発現・分泌を亢進させた。一方、S1P1 特異的作動薬 SEW2871 は、IL-6、MCP-1 の分泌亢進作用を示さなかった。

S1P の IL-6、MCP-1 分泌刺激作用は、S1P3 受容体特異的拮抗薬 BML-241 および S1P1/3 拮抗薬 VPC23019 により有意に抑制され、特に BML-241 は容量依存性に明らかな抑制作用を示した。また Rho kinase 阻害薬 Y-27632 も S1P による炎症性サイトカインの分泌増加を著明に抑制した (図 2)。

一方、S1P1 特異的拮抗薬 W146 あるいは S1P2 受容体特異的拮抗薬 JTE013 は、S1P に

よるこれらサイトカインの分泌亢進に対して阻害効果を示さなかった。

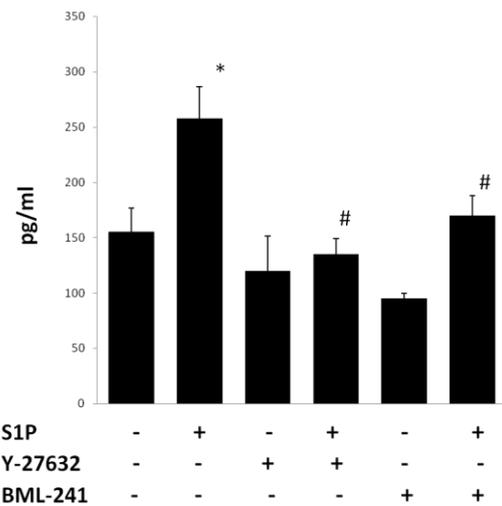


図 2. S1P による脂肪細胞からの IL-6 分泌刺激に対する S1P3 特異的拮抗薬 BML-241 および Rho-kinase 阻害薬 Y-27632 の効果。  
\* $p < 0.001$  vs control, # $p < 0.01$  vs S1P(+).

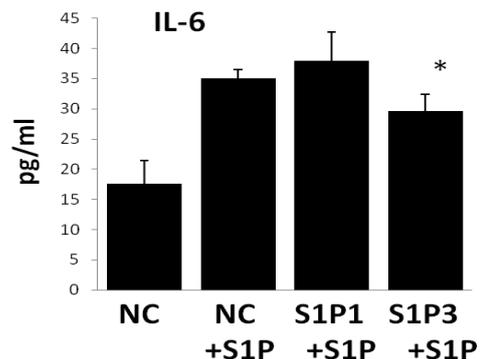


図 3. S1P による脂肪細胞からの IL-6 分泌刺激に対する S1P1 受容体あるいは S1P3 受容体のノックダウンの影響。  
\* $p < 0.01$  vs NC+S1P. NC, negative control siRNA.

#### (4) S1P 受容体ノックダウンのアディポサイトカイン分泌に及ぼす影響

新規方法の確立により、困難とされた成熟脂肪細胞に対する siRNA の導入で 80-40% のノックダウンが可能となった。S1P3 受容体のノックダウンにより、S1P の IL-6、MCP-1 分泌亢進作用は有意に抑制された (図 3)。一方 S1P1 受容体のノックダウンでもこれらのサイトカイン分泌はわずかに抑制されたが有意ではなかった。

Pal による IL-6、MCP-1 分泌亢進は、TLR4

あるいは SPTLC1 のノックダウンで抑制されたが、S1P3 受容体のノックダウンでは抑制されなかった。

#### <研究結果の解釈と意義>

本研究結果により、S1P が脂肪細胞からの IL-6, MCP-1 分泌を促進することが明らかとなった。これら炎症性アディポサイトカインは、MetS の病態に重要な役割を果たしており、その増悪に S1P が関与している可能性が示唆された。

S1P 受容体は少なくとも 5 種類の存在が知られており、これまで血管内皮細胞などにおいて研究が進められていたが、脂肪細胞における役割は未知であった。本研究結果は、成熟脂肪細胞では S1P3 受容体が優位であり、S1P による炎症性アディポサイトカイン分泌促進も S1P3 受容体を主に介していることが明らかとなった。同時に、S1P3 受容体特異的拮抗薬が、炎症性アディポサイトカイン分泌を抑制することも証明された。

現在、MetS に奏功する可能性がある薬剤としては、チアゾリジン誘導体のほか GLP-1・DPP-IV 阻害薬、カンナビノイド拮抗薬などが挙げられるが、十分な成果はあがっていない。本研究は、S1P3 受容体拮抗薬が、炎症性アディポサイトカイン分泌抑制を介して、MetS の病態を改善する可能性があることを示唆している。

S1P は広範な細胞機能を調節しており、その受容体全般に作用する拮抗薬の使用は副作用の危険性が高いと予想される。当初計画でメタボリックシンドロームモデル動物に投与予定であった VPC23019 は、S1P1 優位の阻害作用を示し、S1P3 受容体に対する拮抗作用は弱いと報告されている。したがって、上記結果からこの薬剤では十分な効果は期待できないと予想され、薬剤の変更が必要と判断した。本研究により S1P3 特異的拮抗薬 BML-241 が炎症性アディポサイトカイン分泌抑制に有効であることが証明できたため、動物実験における S1P3 特異的拮抗薬の効果の確認に着手している。

#### 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 10 件)

① Nagasaki H, Suzuki T, Hashimoto H, Shang QL, Yoshimura T, Kondo T, Ozaki T, Maruyama S, Johmori T, Oiso Y, Hamada Y. Low serum culture system improves adipogenic ability of visceral adipose tissue derived stromal cell. *Cell Biology International* (査読あり), In press.

② Suzuki J, Akahane K, Nakamura J, Naruse

K, Kamiya H, Himeno T, Nakamura N, Shibata T, Kondo M, Nagasaki H, Fujiya A, Oiso Y, Hamada Y. Palmitate induces apoptosis in Schwann cells via both ceramide-dependent and independent pathways. *Neuroscience* (査読あり) 176:188-98, 2011

③ Nakamura N, Naruse K, Matsuki T, Hamada Y, Nakashima E, Kamiya H, Matsubara T, Enomoto A, Takahashi M, Oiso Y, Nakamura J, Adiponectin promotes migration activities of endothelial progenitor cells via Cdc42/Rac1. *FEBS Lett* (査読あり) 583 : 2457-63, 2009

④ Tsukahara T, Nakashima E, Watarai A, Hamada Y, Naruse K, Kamiya H, Nakamura N, Kato N, Hamajima N, Sekido Y, Niwa T, Tomita M, Oiso Y, Nakamura J, Polymorphism in resistin promoter region at -420 determines the serum resistin levels and may be a risk marker of stroke in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* (査読あり) 84:179-86, 2009

⑤ Shibata T, Naruse K, Kamiya H, Kozakae M, Kondo M, Yasuda Y, Nakamura N, Ota K, Tosaki T, Matsuki T, Nakashima E, Hamada Y, Oiso Y, Nakamura J, Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves diabetic polyneuropathy in rats. *Diabetes* (査読あり) 57: 3099-107, 2008

⑥ Akiyama N, Naruse K, Kobayashi Y, Nakamura N, Hamada Y, Nakashima E, Matsubara T, Oiso Y, Nakamura J, High glucose-induced upregulation of Rho/Rho-kinase via platelet-derived growth factor receptor-beta increases migration of aortic smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* (査読あり) 46:326-32, 2008

⑦ Tosaki T, Kamiya H, Yasuda Y, Naruse K, Kato K, Kozakae M, Nakamura N, Shibata T, Hamada Y, Nakashima E, Oiso Y, Nakamura J, Reduced NGF secretion by Schwann cells under the high glucose condition decreases neurite outgrowth of DRG neurons. *Exp Neurol* (査読あり), 213:381-7, 2008

⑧ Okajima Y, Nagasaki H, Suzuki C, Suga H, Ozaki N, Arima H, Hamada Y, Civelli O, Oiso Y, Biochemical roles of the oligosaccharide chains in thyrostimulin, a heterodimeric hormone of glycoprotein hormone subunits alpha 2 (GPA2) and beta 5 (GPB5). *Regul Pept* (査読あり) 148:62-7, 2008

[学会発表] (計 10 件)

① 濱田洋司、河村孝彦、長崎弘、鈴木淳也、

大磯ユタカ、メタボリックシンドロームにおける血清遊離脂肪酸およびセラミド濃度の検討—病態および脂質摂取との関連について 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 平成22年5月28日 岡山市

② 濱田洋司、長崎弘、渕上昌弘、大磯ユタカ、胆汁酸代謝とインスリン抵抗性に対する $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬ミグリトールの作用 第31回日本肥満学会年次学術集会 平成22年10月2日前橋市

③ 鈴木淳也、太田貴美子、神谷英紀、中村二郎、長崎弘、大磯ユタカ、濱田洋司 パルミチン酸によるSchwann細胞のアポトーシス誘導機序の検討 第52回日本糖尿病学会年次学術集会 平成21年5月22日 大阪

④ 濱田洋司、長崎弘、鈴木淳也、大磯ユタカ、3T3-L1脂肪細胞からのInterleukin-6分泌に対するセラミド代謝の影響 第51回日本糖尿病学会総会 平成20年5月24日 東京

〔図書〕(計2件)

① 濱田洋司(分担執筆) 日本臨床 新時代の糖尿病学(4) 2008, 712

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

濱田 洋司 (HAMADA YOJI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座 准教授

研究者番号：20293706

### (2) 研究分担者

長崎 弘 (NAGASAKI HIROSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座 講師

研究者番号：30420384

### (3) 連携研究者

なし

研究者番号：