

機関番号：23701

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790153

研究課題名 (和文) 小胞体ストレス誘導脂肪組織恒常性破綻を抑制するメタボリック症候群改善薬の探索

研究課題名 (英文) Exploration of the drug for metabolic disorders which related to ER stress-induced rupture of adipocytes homeostasis

研究代表者

神谷 哲朗 (KAMIYA TETSURO)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60453057

研究成果の概要 (和文)：本研究では、小胞体ストレス誘導性脂肪組織恒常性破綻の分子機構を抗酸化酵素である SOD アイソザイムに着目し検討した結果、SOD アイソザイムの内で細胞外局在型の SOD アイソザイムである EC-SOD のみその発現量が減少することを明らかにした。また、EC-SOD 発現調節機構に小胞体ストレス応答因子である eIF2 α の関与が示唆された。以上の結果から、EC-SOD 発現量を制御することはメタボリック症候群の予防・改善に繋がると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we investigated the expression of EC-SOD in 3T3-L1 adipocytes during ER stress conditions to explore the drug for metabolic disorders. We confirmed the reduction of EC-SOD by ER stress, but not of other SOD isozymes. Moreover, we speculated that the expression of EC-SOD was regulated by eIF2 α signaling cascades. Overall, we suggested that the regulation of EC-SOD during ER stress conditions might lead to improve metabolic disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：EC-SOD、小胞体ストレス、アディポネクチン

1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群は、内臓脂肪型肥満を基盤とする症候群であり、我が国における対象者は約 940 万人とも言われ、死亡原因の第 2 位である心血管系疾患発症の重大なリスクファクターであることから、その予防・改善に向けて、平成 20 年 4 月の特定健診の開始など社会的に対策が進められている。近年、肥満様病態が小胞体ストレスを誘導し、それ

がインスリン抵抗性、2 型糖尿病を介するメタボリックドミノ連鎖反応の原因になっている可能性が報告され、小胞体ストレス制御をメタボリック症候群予防・改善の標的とした研究が世界的に進められている。小胞体ストレスの主たる誘因として、酸化ストレスや慢性炎症が挙げられ、肥満様病態下における炎症性及び抗炎症性因子、酸化ストレス産生系に関する多くの研究があるのに対して、酸化ストレス防御系、特に細胞外の酸化ストレ

ス防御系に関する研究はほとんどされていない。事実、肥満様病態並びに心血管系疾患時においては、細胞内のみならず細胞外へも多量の活性酸素種 (ROS) が産生され、病態増悪への関与が指摘されている。従って、細胞内と同様に細胞外レドックス状態の把握並びにそれを制御することは、メタボリック症候群の予防・改善に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規メタボリック症候群改善薬の探索である。そのためには、小胞体ストレス下における脂肪細胞機能制御因子の発現の変動とその機序の解明が必要であると考え、extracellular-superoxide dismutase (EC-SOD) などの酸化ストレス防御酵素並びにアディポネクチンなどのアディポカイン類の発現変動とその制御機構の詳細を検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

マウス前駆脂肪細胞 (3T3-L1 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 に置換し、2 日後に 5 µg/mL インスリン、1 µM デキサメタゾン (DEX)、1 M 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX)、10% FCS を含む DMEM 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 にて 2 日間培養することで行った。その後は、10% FCS を含む DMEM を 1 日おきに交換し、分化誘導 8 日目の細胞を実験に用いた。分化誘導後に、種々の濃度の小胞体ストレス誘導剤 (タプシガルギン、ツニカマイシン) にて 24 時間まで処理し、種々の実験を行った。細胞内カルシウムキレーターである BAPTA-AM は小胞体ストレス負荷の 30 分前、eukariotic initiating factor 2α (eIF2α) の脱リン酸化阻害剤である salubrinal は小胞体ストレス負荷 1 時間前に前処理を行った。

(2) mRNA 発現量の測定

小胞体ストレス負荷後の細胞から、トリゾール試薬を用いて総 RNA の抽出及び cDNA の合成を行った。調製した cDNA を用いて、SOD アイソザイム、アディポネクチン、各種転写因子及び炎症性サイトカイン、小胞体ストレ

スマーカーである glucose-regulated protein 78 kDa (GRP78) および X-box binding protein-1 (XBP-1) の mRNA 発現量を RT-PCR 法にて測定した。

(3) タンパク質発現量の測定

小胞体ストレス負荷後の細胞から、総タンパク質の抽出を行い、ウエスタンブロット法にて、CCAAT enhancer-binding protein homologous protein (CHOP)、activating transcriptional factor 6 (ATF6) およびリン酸化 eIF2α 発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 小胞体ストレス下の 3T3-L1 細胞における酸化ストレス防御酵素並びにアディポカイン類の mRNA 発現変動

タプシガルギン添加法にて 3T3-L1 細胞を処理したところ、小胞体ストレスマーカーである GRP78 mRNA および CHOP タンパク質発現量の増大が認められた (図 1)。また、タプシガルギンの濃度 (A) 及び処理時間依存的 (B) に EC-SOD mRNA 発現量は減少したが、他の SOD アイソザイム (Cu, Zn-SOD 及び Mn-SOD) の mRNA 発現量に変化は認められなかった (図 2)。また、アディポネクチン並びにアディポカイン類の発現量を調節する転写因子である peroxisome proliferator activated receptor-γ (PPAR-γ) 及び C/EBP-α の mRNA 発現量も EC-SOD 発現量と同様に減少した (図 3)。一方、炎症性のアディポカインである tumor necrosis factor-α (TNF-α) 及び monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) の mRNA 発現量は一過性ではあったが有意に増大した (図 4)。他の小胞体ストレス誘導剤 (ツニカマイシン) 添加によっても同様の結果が起こるか否かを検討したところ、ツニカマイシン処理した場合においては、EC-SOD mRNA 発現量に変化は認められなかった (図 5)。これらの結果から、タプシガルギン誘導性の小胞体ストレス下の 3T3-L1 細胞において、レドックス恒常性が破綻している可能性が示唆された。また、EC-SOD は小胞体ストレス下において普遍的に発現調節を受けないと考えられた。

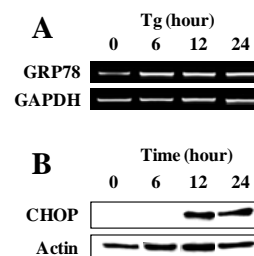


図 1 タプシガルギン添加による (A) GRP78 mRNA および (B) CHOP タンパク質発現変動

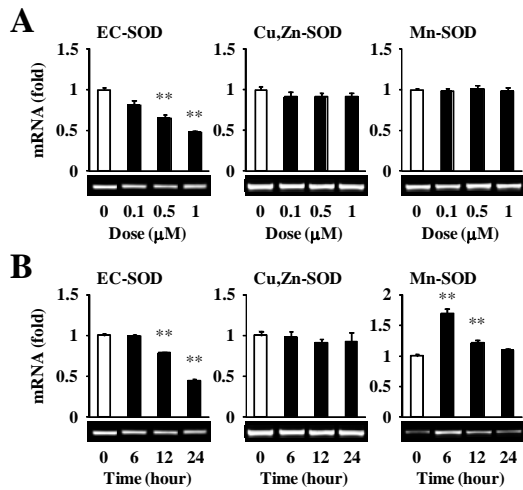


図2 タブシガルギン添加によるSODアイソザイム mRNA 発現変動 (A) タブシガルギンの濃度および (B) タブシガルギン処理時間の影響 (** $p < 0.01$ vs. タブシガルギン未処理細胞)

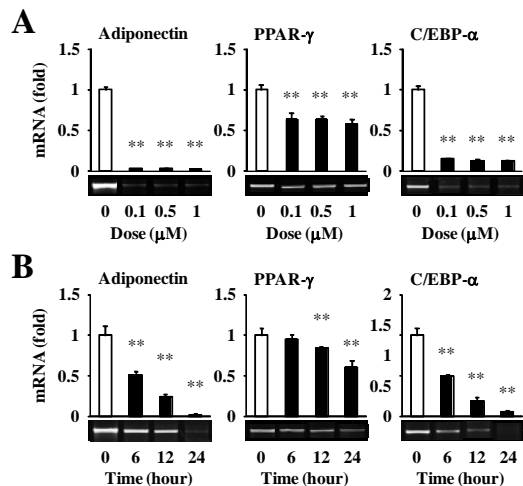


図3 タブシガルギン添加によるアディポカイン mRNA 発現変動 (A) タブシガルギンの濃度および (B) タブシガルギン処理時間の影響 (** $p < 0.01$ vs. タブシガルギン未処理細胞)

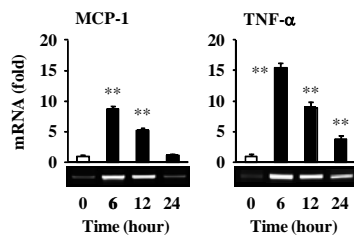


図4 タブシガルギン添加による炎症性因子の mRNA 発現変動 (** $p < 0.01$ vs. タブシガルギン未処理細胞)

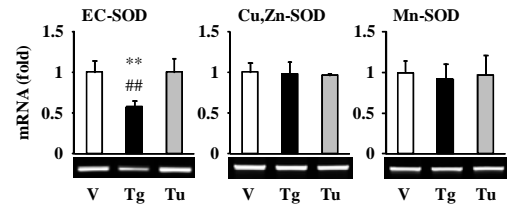


図5 タブシガルギン添加 (Tg) およびツニカマイシン添加 (Tu) による SOD アイソザイム mRNA 発現変動 (V; vehicle, ** $p < 0.01$ vs. vehicle, ## $p < 0.01$ vs. ツニカマイシン処理細胞)

(2) EC-SOD およびアディポネクチン発現調節に及ぼす細胞内カルシウムの関与

EC-SOD およびアディポネクチン発現調節に及ぼす細胞内カルシウムの関与を、カルシウムイオノフォアである A23187 を用いて検討したところ、GRP78 mRNA 発現量の増大とともにアディポネクチン発現量の減少が認められたが、EC-SOD mRNA 発現量に変化は認められなかった (図6)。

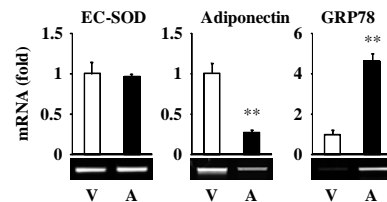


図6 カルシウムイオノフォア A23187 添加による EC-SOD、アディポネクチンおよび GRP78 mRNA 発現変動 (V; vehicle, A; A23187, ** $p < 0.01$ vs. vehicle)

また、細胞内カルシウムキレーターである BAPTA-AM を前処理した場合、タブシガルギン処理によるアディポネクチン mRNA 発現量の減少は有意に抑制されたが、EC-SOD mRNA 発現量にその影響は認められなかった (図7)。これらの結果から、タブシガルギン処理細胞において、アディポネクチン発現調節機構に細胞内カルシウムの関与が示唆されたが、EC-SOD 発現調節機構は細胞内カルシウムによる調節を受けていないと考えられた。

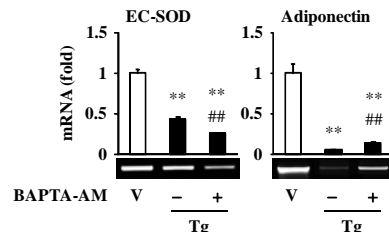


図7 EC-SOD およびアディポネクチン mRNA 発現に及ぼす細胞内カルシウムの関与 (** $p < 0.01$ vs. vehicle, ## $p < 0.01$ vs. タブシガルギン処理細胞)

(3) EC-SOD 発現調節に及ぼす小胞体ストレス応答因子の関与

小胞体ストレス応答因子に及ぼすタプシガルギンとツニカマイシンの影響の違いを検討したところ、小胞体ストレス応答因子である ATF6 及び CHOP 発現量に関してはいずれの処理においても発現量の増大が認められたが、活性化 XBP-1 mRNA 及びリン酸化 eIF2 α の発現量はタプシガルギン処理の場合のみ増大が認められた (図 6)。

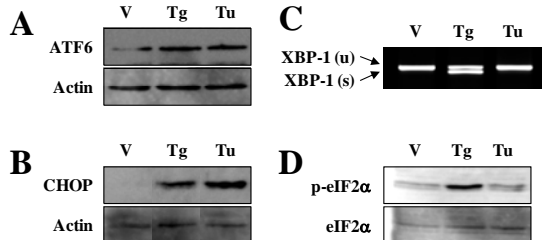


図 6 小胞体ストレス応答因子の発現変動 (A) ATF6、(B) CHOP、(C) XBP-1、(D) リン酸化 eIF2 α (V; vehicle, Tg; タプシガルギン, Tu; ツニカマイシン)

eIF2 α の阻害剤である salubrinal で細胞を前処理したところ、タプシガルギン処理による growth arrest- and DNA damage-inducible genes (MyD116) mRNA 発現量に変化は認められなかったが、EC-SOD mRNA 発現量の減少は増大した (図 7)。

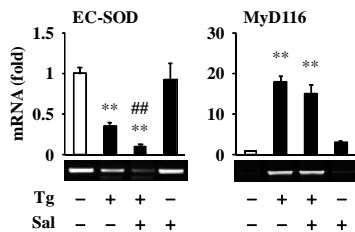


図 7 EC-SOD および MyD116 mRNA 発現に及ぼす Salubrinal (Sal) の影響 (Tg; タプシガルギン, ** $p < 0.01$ vs. vehicle, ## $p < 0.01$ vs. タプシガルギン処理細胞)

また、ツニカマイシン処理した細胞においても、salubrinal で前処理することにより、リン酸化 eIF2 α 発現量の増大並びに EC-SOD mRNA 発現量の減少が認められた (図 8)。次に、salubrinal とツニカマイシンの共処理による EC-SOD mRNA 発現減少に及ぼす XBP-1 の関与を検討したところ、salubrinal の前処理によっても活性化 XBP-1 発現量の増大は認められなかった (図 9)。これらの結果から、小胞体ストレス下の 3T3-L1 細胞において、EC-SOD は eIF2 α 由来シグナルにより調節されていると考えられた。

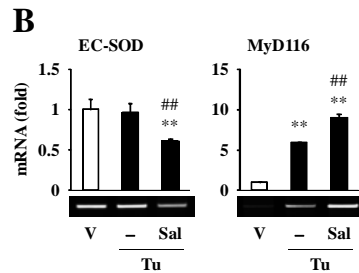
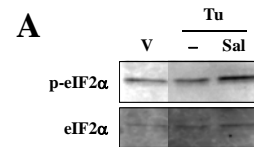


図 8 ツニカマイシン処理 (Tu) 細胞における salubrinal (Sal) の影響 (A) リン酸化 eIF2 α の発現変動、(B) EC-SOD および MyD116 mRNA 発現変動 (V; vehicle, ** $p < 0.01$ vs. vehicle, ## $p < 0.01$ vs. ツニカマイシン処理細胞)

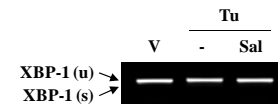


図 9 ツニカマイシン処理 (Tu) 細胞における XBP-1 mRNA 発現に及ぼす Salubrinal (Sal) の影響 (V; vehicle)

以上の結果から、小胞体ストレス下における脂肪細胞において、血管系の重要な酸化ストレス防御酵素である EC-SOD および抗炎症活性を有するアディポネクチン発現量が減少することがメタボリック症候群の発症や増悪の一因になっていることが明らかとなった。また、小胞体ストレス負荷の初期に認められた 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もその一因となる可能性が明らかとなった。小胞体ストレス応答因子の中で eIF2 α に由来するシグナル経路を阻害する化合物は、酸化ストレス防御酵素の発現量を制御することで、メタボリック症候群の予防ならびに改善に繋がる可能性が明らかとなった。

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 3 件)

- ① Tetsuro Kamiya, Aya Obara, Hirokazu Hara, Naoki Inagaki and Tetsuo Adachi, ER stress inducer, thapsigargin, decreases extracellular-superoxide dismutase through MEK/ERK signaling cascades in COS7 cells., Free Radic. Res., 45, 692-698, 2011, 査読有

- ② Tetsuro Kamiya, Junya Makino, Hirokazu Hara, Naoki Inagaki and Tetsuo Adachi, Extracellular-superoxide dismutase expression during monocytic differentiation of U937 cells, J. Cell. Biochem., 112, 244-255, 2011, 査読有
- ③ Tetsuro Kamiya, Hirokazu Hara, Naoki Inagaki and Tetsuo Adachi, The effect of hypoxia mimetic cobalt chloride on the expression of EC-SOD in 3T3-L1 adipocytes, Redox Rep., 15, 131-137, 2010, 査読有

〔学会発表〕（計 8 件）

- ① 神谷 哲朗、牧野 純也、原 宏和、足立 哲夫、THP-1 細胞のマクロファージへの分化過程におけるEC-SOD発現変動、日本薬学会第 131 年会、2011、03、29、静岡
- ② 神谷 哲朗、原 宏和、稲垣 直樹、足立 哲夫、小胞体ストレス下の 3T3-L1 細胞におけるEC-SOD発現変動、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同学会、2010、12、07、兵庫
- ③ Tetsuro Kamiya, Hirokazu Hara, Naoki Inagaki, Tetsuo Adachi, The expression of extracellular-superoxide dismutase in 3T3-L1 adipocytes during endoplasmic reticulum stress, SFRBM⁷ s 17th Annual Meeting, 2010, 11, 19, Florida, USA
- ④ 神谷 哲朗、牧野 純也、原 宏和、稲垣 直樹、足立 哲夫、単球系細胞分化過程におけるEC-SOD発現変動、第 63 回日本酸化ストレス学会、2010、06、24、神奈川
- ⑤ 神谷 哲朗、原 宏和、稲垣 直樹、足立 哲夫、日本薬学会第 130 年会、ERストレス下の 3T3-L1 細胞におけるextracellular-superoxide dismutase発現変動、2010、03、28、岡山
- ⑥ 神谷 哲朗、小原 彩、原 宏和、稲垣 直樹、足立 哲夫、小胞体ストレス下の COS7 細胞におけるEC-SOD発現変動、第 21 回腎とフリーラジカル研究会、2009、09、26、岡山
- ⑦ 神谷 哲朗、原 宏和、稲垣 直樹、足立 哲夫、*In vitro*虚血誘導時のCOS7 細胞におけるEC-SOD発現変動、第 3 回日本腎と薬剤研究会学術大会、2009、09、19、愛知
- ⑧ 神谷 哲朗、原 宏和、稲垣 直樹、足立 哲夫、ER stress誘導時のCOS7 細胞におけるEC-SOD発現変動、第 62 回日本酸化ストレス学会、2009、06、12、福岡

〔図書〕（計 1 件）

- ① 神谷 哲朗、小原 彩、原 宏和、足立 哲夫、東京医学社、腎とフリーラジカル、2010、56-58

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 哲朗 (KAMIYA TETSURO)
岐阜薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：60453057

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし