

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 27 日現在

機関番号：44522

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500863

研究課題名(和文)生活習慣病予防・治療を目指した膜型脂溶性リガンド受容体の新規機能解明

研究課題名(英文)New function of fat-soluble compounds for improvement of life style diseases

研究代表者

足達 哲也 (Adachi, Tetsuya)

湊川短期大学・その他部局等・教授

研究者番号：60345014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では循環器系および骨格筋における脂溶性リガンドGタンパク共役型受容体(GPCR)の発現、シグナル伝達系解析およびそのシグナル伝達系からの細胞応答性を解明し、臓器機能向上を目指した脂溶性リガンド受容体機能解析と新規リガンド探索からの創薬を目指すことを目的とした。心筋細胞および骨格筋細胞においていくつかの膜型脂溶性リガンドGPCRが発現することを見いだした。一例として膜型エストロゲン受容体GPR30は、初代培養心筋細胞および骨格筋細胞株において、エストロゲン刺激でシグナル伝達下流のERKのリン酸化が亢進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We examined the expression and function of G-protein coupled receptor (GPCR) for fat-soluble compounds in circulation and skeletal muscle system. We discovered the expression of some fat-soluble ligand receptors in heart and skeletal muscle. GPR30 is the GPCR for estrogen. Estrogen induced the phosphorylation of ERK signal cascade in primary-cultured cardiomyocyte and skeletal muscle cell line. Moreover, estrogen via GPR30 induced the proliferation and the highly-expression of several transcription factors of these cells. These results suggest that new function of G-protein coupled receptor (GPCR) for fat-soluble compounds improves for life style diseases and metabolic syndrome.

研究分野：病態生理学

キーワード：GPCR 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学およびゲノム科学の進歩により、生物活性を引き起こすさまざまな受容体が同定されてきている。活性分子の多くは受容体を介して生物活性を有することが示されている。脂溶性リガンドは核内の受容体と結合し、genomic作用から遺伝子発現を制御することによって細胞機能を調節するものとして、多数報告されてきているが、さらに近年では核内受容体に加えて、細胞膜に存在する受容体に結合し、non-genomic作用を有する脂溶性リガンドも明らかにされてきた。

細胞膜に存在する脂溶性リガンド受容体の多くはG-タンパク共役型受容体(GPCR)であり、脂肪酸をリガンドとするGPR40、GPR120、GPR41、GPR43に加えて、ステロイドホルモンであるエストロゲンの膜型受容体であるGPR30が、臓器特異的に発現するや、データベース検索により、いくつかの膜型脂溶性リガンド受容体が脂肪細胞、骨格筋細胞、心臓、肝臓などに発現が明らかになりつつある。しかしながら、膜型脂溶性リガンド受容体の機能解明は発展途上にあり、これらの受容体の機能を明らかにすることが、生活習慣病・メタボリックシンドロームの新しい予防、治療法の開発につながるものと期待できる。

2. 研究の目的

本事業において、膜型脂溶性リガンド受容体の新しい機能を開拓し、生活習慣病・メタボリックシンドロームの予防・治療法を開発するべく、創薬ターゲットの発掘を目指す。生活習慣病・メタボリックシンドロームの標的臓器は、栄養素の消化吸収に関わる消化管、代謝制御に関わる膵β細胞、肝臓、脂肪組織、骨格筋、循環器系に関わる心臓、排泄系に関わる腎臓など多岐にわたっているが、これら臓器における膜型脂溶性リガンド受容体の発現および機能については未知なものが多い。そこで、生活習慣病・メタボリックシンドロームの標的臓器における膜型脂溶性リガンド受容体の発現検索とリガンド刺激における標的臓器の機能性を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

膜型脂溶性リガンド受容体発現解析には、ラットおよびマウスから摘出した臓器を用いて遂行した。メタボリックシンドロームの標的臓器として、心臓と骨格筋に注目し、心臓は初代培養心筋細胞、心臓線維芽細胞を、骨格筋は細胞培養株のC2C12(ATCC)を用いた。これら細胞を、ダルベッコ改変イーグル培地(ニッスイ)、10%牛胎児血清(ハイクローン)を用いて培養を行った。骨格筋細胞のC2C12については、10%牛胎児血清を2%馬血清(ハイクローン)に置き換えて筋分化をさせた。

細胞増殖アッセイにはWST-1法(ナカライテスク)を用いた。ERKおよびリン酸化ERKの解析、低酸素誘導因子HIF-1aおよび転写因子MyoDのタンパク発現解析には、ウエスタンブロット法を用いて行った。ウエスタンブロット法用の抗体はCST社のものを用いた。

4. 研究成果

本事業では、メタボリックシンドロームに関連する臓器のうち、心臓循環器系および骨格筋に注目して、膜型脂溶性リガンド受容体の機能の機能解明を目指した。

脂溶性リガンド受容体のメタボリックシンドローム関連臓器における発現の有無についてまとめたのが表1である。GPR30は多くの組織に発現が認められ、リガンドであるエストロゲン様化合物がGPR30を介して多くの臓器に作用することが考えられる。

表1 メタボリックシンドローム関連臓器での脂溶性リガンド受容体の発現

	脂肪組織	骨格筋	肝臓	心臓
GPR120	+	ND	ND	ND
GPR40	ND	ND	ND	ND
GPR41	+	ND	ND	+
GPR43	+	ND	+	ND
GPR30	+	+	+	+

+: Positive, ND: not detected

循環器系、特に心臓においていくつかの膜型脂溶性リガンドGPCRが発現することを見いだした。一例として膜型エストロゲン受容体GPR30は、初代培養心筋細胞および心臓線維芽細胞において、分化過程において発現の上昇が認められ、特に心筋細胞では分化経過依存的に顕著な発現上昇

が認められた (図 1)。

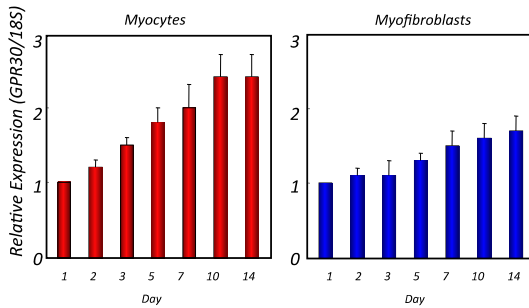


図 1 初代培養心筋細胞および心臓線維芽細胞の分化過程における GPR30 の発現変化

エストロゲン刺激でシグナル伝達下流の ERK のリン酸化が亢進することを明らかにした (図 2)。

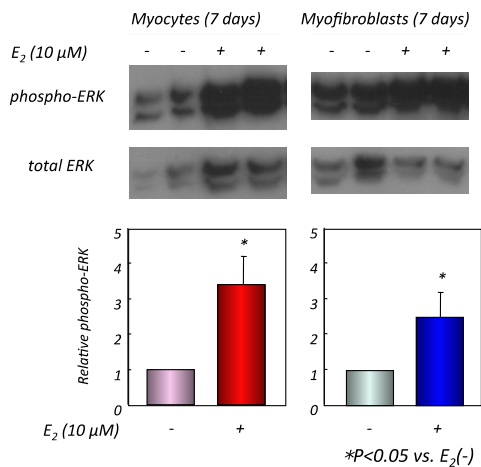


図 2 初代培養心筋細胞および心臓線維芽細胞の 17β-estradiol 刺激における ERK のリン酸化

また低酸素(0% O₂)環境下での培養において、エストロゲン刺激により、初代培養心筋細胞の細胞死の抑制が認められた (図 3)。

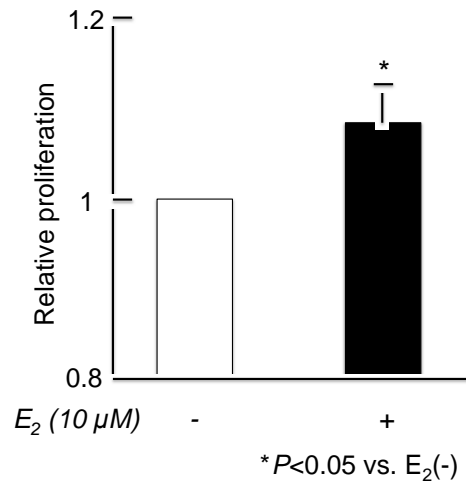


図 3 初代培養心筋細胞の低酸素(0% O₂)環境下での 17β-estradiol 刺激における細胞死抑制作用

この 17β-estradiol の細胞死の抑制効果について、低酸素誘導因子 (HIF-1α) の発現について検討した結果、17β-estradiol 刺激によって HIF-1α の発現が上昇することが明らかとなった (図 4)。

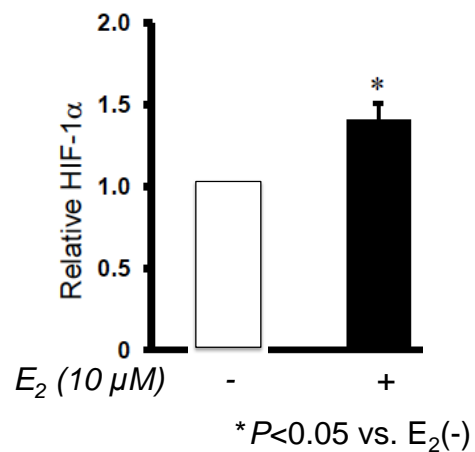


図 4 初代培養心筋細胞の低酸素(0% O₂)環境における 17β-estradiol 刺激での低酸素誘導因子 (HIF-1α) の発現上昇

これらの結果から、低酸素(0% O₂)環境下すなわち虚血性環境下において、17β-estradiol は HIF-1α の発現上昇を引き起こすことによって、細胞保護作用を示すことが明らかとなった。またその一部の機構として、17β-estradiol-GPR30 からのシグナル伝達系が関与することが明らかとなった。

次に、メタボリックシンドロームの標的器官で、血糖調節などに重要である骨格筋についても、心筋細胞と同様の検討を進めた。骨格筋においてもいくつかの膜型脂溶性リガンド GPCR が発現することを見いだした。

膜型エストロゲン受容体 GPR30 について、骨格筋培養細胞系の C2C12 において、17 β -estradiol 刺激でシグナル伝達下流の ERK のリン酸化が亢進することを明らかにした (図 5)。

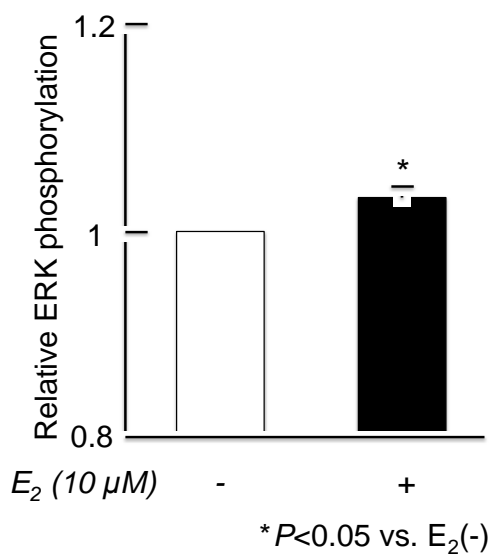


図 5 C2C12 細胞における 17 β -estradiol 刺激における ERK のリン酸化

また、17 β -エストラジオールの持続刺激により、分化前細胞の増殖が認められた (図 6)。

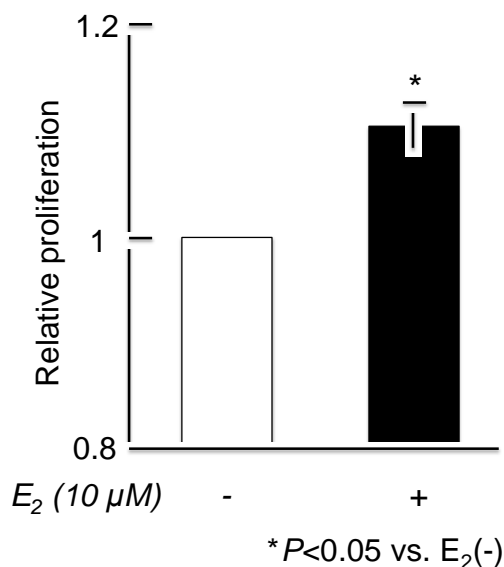


図 6 C2C12 の 17 β -estradiol 刺激における細胞死抑制作用

この細胞増殖効果について、GPR30 からのシグナル伝達系と分化について検討を進めたところ、MyoD などの骨格筋内転写因子の発現の上昇が認められた (図 7)。

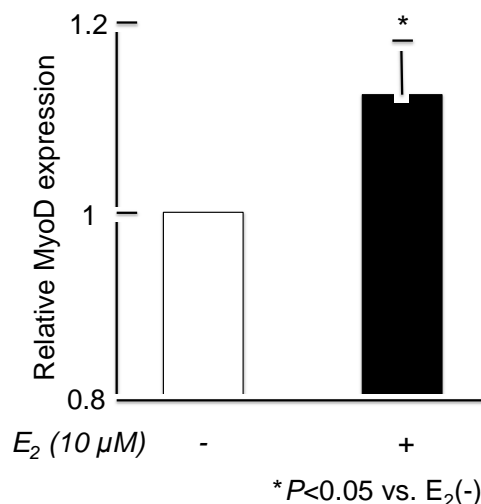


図 7 C2C12 の 17 β -estradiol 刺激での転写因子 MyoD の発現上昇

GPR30 - MyoD をつなぐシグナル伝達系の解明には至らなかったが、性ホルモンの骨格筋増強作用につながる新しい創薬ターゲットを見出す研究を進めている。

本事業では、膜型脂溶性リガンド受容体のうち膜型エストロゲン受容体 GPR30 について、メタボリックシンドローム標的臓器の心臓と骨格筋についての機能解析を行った。膜型脂溶性リガンド受容体にはまだまだ多く存在し、さらにその機能については未解明である。これらの受容体機能解明などの研究が発展すれば、メタボリックシンドローム予防・治療に結びつくこととなり、医療費削減を目指せるものと期待する。

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5件)

Matsunaga T, Shoji A, Gu N, Joo E, Li S, Adachi T, Yamazaki H, Yasuda K, Kondoh T, Tsuda K. -Tocotrienol attenuates TNF- α -induced changes in secretion and gene expression of MCP-1, IL-6 and adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Med Rep*.5: 905-909, 2012.

Matsunaga T, Li S, Adachi T, Joo E, Gu N, Yamazaki H, Yasuda K, Kondoh T, Tsuda K. Hyperoxia reverses glucotoxicity-induced inhibition of insulin secretion in rat INS-1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 78: 843-850, 2014

Horiuchi H, Harada N, Adachi T, Nakano Y, Inui H, Yamaji R. S-equol enantioselectively activates cAMP-protein kinase A signaling and reduces alloxan-induced cell death in INS-1 pancreatic β -cells. *J Nutr Sci Vitaminol*, 60: 291-296, 2014

Harada N, Katsuki T, Takahashi Y, Masuda T, Yoshinaga M, Adachi T, Izawa T, Kuwamura M, Nakano Y, Yamaji R, Inui H. *J Cell Biochem*, 116: 998-1006, 2015.

Adachi T. New physiological functions of fat-soluble compounds. *Proc Minatogawa*, 51: 55-60, 2015

[学会発表](計1件)

足達哲也 「脂溶性物質の新しい生理機能」
日本技術士会生物工学部会例会 (招聘講演) 東京都 2014年10月

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

足達哲也(湊川短期大学・教授)
研究者番号: 60345014

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

松永哲郎(鳴門教育大学・講師)
研究者番号: 10452286
奥野恭史(京都大学・教授)
研究者番号: 20283666