

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790927

研究課題名(和文)PSGL-1を標的としたメタボリックシンドロームの新規治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of novel PSGL-1 targeted agents for metabolic syndrome

研究代表者

堀口 千景(佐藤千景)(Horiguchi, Chikage)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：40535192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：抗PSGL-1抗体は2型糖尿病モデルマウスにおいて、内臓脂肪細胞の肥大化と内臓脂肪組織局所での炎症を抑制し、さらにインスリン抵抗性を改善することを確認した。ムチン型硫酸化多糖化合物であるフコイタンを分子量により大中小分子に分離精製を行い、In vitroにおいて血管内皮細胞と単球細胞に対する細胞接着阻害効果について検討を行っている。今後は最も細胞接着阻害効果の高い化合物を2型糖尿病モデルマウスに経口投与し、インスリン抵抗性など検討を行っていく。

研究成果の概要(英文)：Anti-PSGL-1 antibodies inhibited adipocyte hypertrophy and inflammation in white adipose tissue, and then ameliorated insulin resistance in type 2 diabetic mice. We separated and purified Fucoidan as a type of sulfated polysaccharides according to molecular weight. We are studying inhibition effects of each purified substances by using of monocytes-to-endothelial cells adhesion assay in vitro. We are going to determine the most effective substances for inhibiting cell adhesion, and then administer them to type 2 diabetic mice and study insulin resistance.

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 PSGL-1 接着分子 内臓脂肪 インスリン抵抗性

### 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは、肥満者の内臓脂肪にマクロファージが浸潤して炎症を起こすことにより発症する。我々は内臓脂肪へのマクロファージの浸潤を誘導する分子のひとつが PSGL-1 であることを特定し、さらにノックアウトマウスを用いて PSGL-1 を阻害することにより、肥満におけるインスリン抵抗性が改善することを確認した。

### 2. 研究の目的

本研究では、PSGL-1 をターゲットとした新たな作用機序に基づくメタボリックシンドロームや2型糖尿病の予防または治療薬の開発を目指す。ムチン型硫酸化多糖類に PSGL-1 阻害活性が認められることを確認し、注射または経口投与により生態内でも活性化を有する低分子構造の硫酸化多糖化合物の最適化を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 2 型糖尿病モデルマウスまたは高脂肪食負荷マウスに、抗 PSGL-1 モノクローナル抗体またはセレクチンの阻害物質である 3 種類のムチン型硫酸化多糖化合物を投与し、インスリン抵抗性改善効果などについて検討を行う。

(2) 有効性の高いムチン型硫酸化多糖化合物を分離精製し、難分解性・高吸収性を持ち経口投与(または皮下注射)が可能な低分子硫酸化多糖化合物を合成する。

(3) 合成した化合物を *in vitro* において、細胞接着試験により PSGL-1 阻害効果を確認検討する。*in vivo* において、2 型糖尿病モデルマウスに投与し、インスリン抵抗性や組織学的検討を行う。

### 4. 研究成果

(1) 2 型糖尿病モデルマウスに対する抗 PSGL-1 モノクローナル抗体の投与と実験を実施した結果、抗 PSGL-1 抗体投与群では対照群と比較し、体重、内臓脂肪重量、脂質代謝データに有意差を認めなかったが、空腹時血糖値の有意な低下を認めた。また、腹腔内ブドウ糖負荷試験において、抗 PSGL-1 抗体投与群では対照群に比べて血糖値、IRI とともに有意な低下を認め、腹腔内インスリン負荷試験の結果でも、抗 PSGL-1 抗体投与群では対照群に比べて血糖値の有意な低下を認めた。以上より体重が変わらないにも関わらず、抗 PSGL-1 抗体投与による有意なインスリン抵抗性の改善を認めた。

さらに、精巣周囲白色脂肪組織における mRNA 発現の検討では、マクロファージマーカーである CD68 や炎症に関連する MCP-1、接着分子である PSGL-1、P-selectin の mRNA 発現の有意な低下を認めた。精巣周囲白色脂肪細胞の面積の検討では、抗 PSGL-1 抗体投与群において脂肪細胞のサイズが有意に小さいことが分かった。

以上の結果から、抗 PSGL-1 抗体投与により、内臓脂肪細胞の肥大化が抑制され、内臓脂肪組織局所での炎症が改善した結果、インスリン抵抗性が改善したと考えられた。

(2) 2 型糖尿病モデルマウスに対するムチン型硫酸化多糖の投与と実験については、フコイダンを用いてマウスに皮下注射投与し実験を繰り返し行ったが、一定の結果が得られなかった。フコイダンの皮下投与では吸収にはばらつきがあるためと考えられた。

したがって当初の予定を変更し、先にフコイダンを神戸天然物化学(株)に委託し分子量により大中小分子に分離精製を行った。*In vitro* において、血管内皮細胞と単球細胞に分離精製した各分子量のフコイダンを投与し細胞接着阻害効果について検討を行っており、今後は最も細胞接着阻害効果の高い分子量のムチン型硫酸化多糖化合物を 2 型糖尿病モデルマウスに経口投与し、インスリン抵抗性や脂肪・肝臓の組織学的変化など検討を行っていく予定である。

近年、インスリン抵抗性が内臓脂肪での炎症に起因していることが明らかとなり、我々は炎症の起点がマクロファージの浸潤であると考え接着分子の阻害に着目した。我々の高脂肪食負荷 PSGL-1 ノックアウトマウスでは、体重に差がないが血糖、脂質の改善効果を認めている。ムチン型硫酸化多糖化合物は PSGL-1 阻害活性を有しており、安全性およびコスト面でも創薬として実現の可能性が高いと考えている。

### 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)

Nuclear hormone receptor expression in mouse kidney and renal cell lines.

Ogawa D, Eguchi J, Wada J, Terami N, Hatanaka T, Tachibana H, Nakatsuka A, Horiguchi CS, Nishii N, Makino H.

PLoS One. 2014 Jan 22;9(1):e85594. doi: 10.1371/journal.pone.0085594.、査読有

Metallothionein deficiency exacerbates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice.

Tachibana H, Ogawa D, Sogawa N, Asanuma M, Miyazaki I, Terami N, Hatanaka T, Horiguchi CS, Nakatsuka A, Eguchi J, Wada J, Yamada H, Takei K, Makino H.

Am J Physiol Renal Physiol. 2014 Jan 1;306(1):F105-15. doi: 10.1152/ajprenal.00034.、査読有

The effects of telmisartan treatment on the abdominal fat depot in patients with metabolic syndrome and essential hypertension: Abdominal fat Depot Intervention Program of Okayama (ADIPO).

Murakami K, Wada J, Ogawa D, Horiguchi CS,

Miyoshi T, Sasaki M, Uchida HA, Nakamura Y, Makino H.

Diab Vasc Dis Res. 2013 Jan;10(1):93-6. doi: 10.1177/1479164112444640. 査読有

Telmisartan attenuates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress in db/db mice.

Sato-Horiguchi C, Ogawa D, Wada J, Tachibana H, Kodera R, Eguchi J, Nakatsuka A, Terami N, Shikata K, Makino H.

Nephron Exp Nephrol. 2012 ;121(3-4):e97-e108. doi: 10.1159/000343102. 査読有

Case of emphysematous cholecystitis in a patient with type 2 diabetes mellitus associated with schizophrenia.

Ogawa A, Shikata K, Uchida HA, Shinoura S, Yokomichi N, Ogawa D, Sato-Horiguchi C, Yagi T, Wada J, Makino H.

J Diabetes Invest. 2012 Dec;3(6):534-535. 査読有

Activation of liver X receptor inhibits osteopontin and ameliorates diabetic nephropathy.

Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Bruemmer D, Wada J, Teshigawara S, Eguchi J, Sato-Horiguchi C, Uchida HA, Shikata K, Makino H.

J Am Soc Nephrol. 2012 Nov;23(11):1835-46. doi: 10.1681/ASN.2012010022. 査読有

Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex.

Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Horiguchi CS, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H.

Diabetes. 2012 Nov;61(11):2823-32. doi: 10.2337/db12-0232. 査読有

Cholecystokinin plays a novel protective role in diabetic kidney through anti-inflammatory actions on macrophage: anti-inflammatory effect of cholecystokinin.

Miyamoto S, Shikata K, Miyasaka K, Okada S, Sasaki M, Kodera R, Hirota D, Kajitani N, Takatsuka T, Kataoka HU, Nishishita S, Sato C, Funakoshi A, Nishimori H, Uchida HA, Ogawa D, Makino H.

Diabetes. 2012 Apr;61(4):897-907. doi: 10.2337/db11-0402. 査読有

〔学会発表〕(計 10件)

寺見直人、小川大輔、堀口千景他、糖尿病マウス腎および高糖濃度刺激下での培養腎細胞における核内受容体の発現解析、第56回日本糖尿病学会年次学術集会、2013年5月17日、熊本(熊本市現代美術館)

小野哲一郎、四方賢一、堀口千景他、2型糖尿病における腎症の寛解および改善に関する因子の解析、第56回日本糖尿病学会年次学術集会、2013年5月16日、熊本(熊本公徳会武道場)

Ogawa D, Tachibana H, Sato-Horiguchi C, et al. Liver X receptor agonist ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting high glucose-induced osteopontin expression in proximal tubular epithelial cells.

AHA Scientific Sessions 2012, San Diego, California, USA, 2012.11.3-11.7

堀口千景他、早期糖尿病性腎症におけるTelmisartanの抗酸化作用の検討、第27回日本糖尿病合併症学会、2012年11月2日~3日、福岡(アクロス福岡)

Ogawa D, Tachibana H, Sato-Horiguchi C, et al. Liver X receptor agonist ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting high glucose-induced osteopontin expression in proximal tubular epithelial cells.

ASN kidney Week 2012, 2012.10.30-11.4, San Diego, USA

Daisho Hirota, Chikage Sato, et al. Inhibition of PSGL-1 ameliorates obesity-related insulin resistance by prevention of inflammation in adipose tissue and liver in db/db mice. EASD 48th Annual Meeting, 2012.10.1-5, Berlin, Germany

佐藤千景他、早期糖尿病性腎症におけるTelmisartanの抗酸化作用の検討、第55回日本糖尿病学会年次学術集会、2012年5月17日~19日、横浜(パシフィコ横浜)

廣田大昌、佐藤千景他、PSGL-1を阻害することにより、肥満マウスにおける内臓脂肪と肝臓の炎症とインスリン抵抗性が抑制される、第55回日本糖尿病学会年次学術集会、2012年5月17日~19日、横浜(パシフィコ横浜)

橘洋美、佐藤千景他、糖尿病性腎症モデルラットにおけるメタロチオネイン(metallothionein)の発現の検討、第55回日本糖尿病学会年次学術集会、2012年5月17日~19日、横浜(パシフィコ横浜)

〔図書〕(計 1件)

堀口千景、南山堂、糖尿病×CKD診療ガイドQ&A、2012年、61-63、総ページ数179頁

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

堀口 千景（佐藤千景）

(HORIGUCHI, Chikage)

岡山大学 医学部 客員研究員

研究者番号： 4 0 5 3 5 1 9 2

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：