

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460101

研究課題名(和文)小胞体機能制御による生活習慣病治療戦略

研究課題名(英文)Elucidation of the treatment against metabolic syndrome by regulating endoplasmic reticulum function

研究代表者

細井 徹 (Hosoi, Toru)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・准教授

研究者番号：40379889

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)：肥満は、高血圧、糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病発症の主要な危険因子である。本研究では主に、肥満の発症に関わるレプチン抵抗性に着目し、レプチン抵抗性のメカニズム並びにレプチン抵抗性改善薬を明らかにすることを目的として検討を行った。検討の結果、神経細胞におけるレプチンシグナルの活性化にグリア細胞が重要な役割を担っている可能性が示された。さらに小胞体ストレス等によるレプチン抵抗性形成機構の一端を解明することができ、生活習慣病に対する創薬開発の治療戦略の解明に寄与できる結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Obesity is associated with metabolic syndrome such as hypertension, diabetes, and hyperlipidemia. In the present study, we analyzed the mechanisms and pharmacological treatment against obesity focusing on leptin resistance, which is known to be involved in the pathophysiology of obesity. We found that glial cells may be involved in the leptin signaling in neuronal cells. Furthermore, we found novel mechanisms of leptin resistance caused by ER stress and other factors. These results would be useful information for elucidating strategy for the treatment of metabolic syndrome.

研究分野：薬理学

キーワード：レプチン

1. 研究開始当初の背景

肥満は、高血圧、糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病発症の主要な危険因子である。従って肥満発症のメカニズム解明は、これらの疾患発症予防・治療薬開発において重要な課題であると考えられる。しかしながら、肥満発症機構に関しては、未だ不明な点が多く残されている。

レプチンは、脂肪組織より循環血液中に分泌され、抗肥満効果を発揮するタンパク質である。近年、多くの肥満者は、レプチンが効きにくくなる状態、即ちレプチン抵抗性の状態であることが示され、レプチン抵抗性が肥満発症の原因の一つである可能性が示唆され問題視されている。私たちは、今までの研究の結果、レプチン抵抗性は小胞体ストレスによって惹起される可能性を見出している (Mol Pharmacol. 2008, 74: 1610-9.)。小胞体ストレスは、細胞内外のストレス負荷により、小胞体内に折り畳み異常タンパク質が蓄積することで惹起される。近年、肥満モデルマウスにおいて、小胞体ストレスが亢進していることも報告されている (Science 2004, 306:457-61.)。そこで、本研究では主に、抗肥満因子であるレプチンと小胞体ストレスに着目して検討を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、主にレプチン抵抗性に着目し、レプチン抵抗性のメカニズム並びにレプチン抵抗性改善薬を明らかにすることを目的とした。

レプチンは主に神経細胞に作用して抗肥満効果を発揮することが知られている。一方、近年、グリア細胞の神経機能に対する役割の重要性を示唆する報告がなされている。そこで今回、神経細胞に加えてグリア細胞にも着目し、レプチン抵抗性のメカニズム解明を試みた。また、レプチン抵抗性形成因子の探索、小胞体ストレス応答機構の解明、さらには小胞体ストレス軽減によるレプチン抵抗性改善薬の検討も試みた。

3. 研究の方法

使用細胞

細胞は Ob-Rb レプチン受容体を恒常的に発現させたヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y-Ob-Rb 細胞、並びに、HEK293-Ob-Rb 細胞を用いた。グリア細胞は、マウス初代培

養グリア細胞、並びに、U251 ヒューマンアストロサイトームを用いた。

レプチンシグナルの解析

レプチンシグナルの解析においては、レプチンシグナルの下流で惹起される STAT3 のリン酸化状態をウエスタンブロッティング解析により検出した。

使用マウスモデル

マウスモデルにおける解析においては、高脂肪食負荷による肥満・糖尿病モデルマウスを用いた。

4. 研究成果

グリア細胞のレプチンシグナルに及ぼす影響

神経細胞とグリア細胞が相互作用することで神経系におけるレプチンシグナル伝達が制御されている可能性を検討した。実験においてはグリア細胞の培養上清を神経細胞に処理し、レプチンシグナルを解析した。その結果、グリア細胞由来の因子がレプチンシグナルに影響を及ぼしている可能性を示唆するデータを得た。従って、レプチンシグナルの活性化には、グリア細胞が関与している可能性が示唆された。

レプチン抵抗性のメカニズム解明

レプチン抵抗性を誘発させる因子の同定を試みた。検討の結果、15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 を SH-SY5Y-Ob-Rb 細胞に処理すると、レプチンによる STAT3 のリン酸化が抑制されることが明らかとなり、15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 は、レプチン抵抗性を誘発させる一つの因子である可能性が示された。

レプチン抵抗性のメカニズム解明において、小胞体ストレスがどのようなメカニズムで細胞応答を惹起するかについて検討を試みた。その結果、プロテインキナーゼ C(PKC) が小胞体ストレス関連タンパク質の誘導を惹起し、小胞体ストレス応答と関連している可能性を示唆するデータを得た。

レプチン抵抗性改善薬の検討

小胞体ストレス軽減効果を有するフルルビプロフェンの薬理作用の解明を試みた。検討の結果、フルルビプロフェンはアルデヒドデヒドロゲナーゼに結合し、マウスモデルで

抗肥満・抗糖尿病効果を示す可能性を示唆するデータを得た。

総括

本研究の結果、レプチン抵抗性の形成機構の一端が明らかになった。グリア細胞のレプチンシグナルに対する影響も明らかになったことから、今後は、グリア細胞が病態時及び正常時にどのようなメカニズムでレプチンシグナル伝達に関わっているか明らかにされることが期待される。また、小胞体ストレスによるレプチン抵抗性形成機構、小胞体ストレス軽減によるレプチン抵抗性改善薬に関しても、本研究によりそのメカニズムの一端が解明できたと考えている。今後、より詳細な検討を積み重ねることで、肥満さらには生活習慣病の病態解明及び創薬開発に貢献できれば幸いと考えている。

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)

Hosoi T, Matsuzaki S, Miyahara T, Shimizu K, Hasegawa Y, and Ozawa K. (2015) Possible involvement of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 in the development of leptin resistance. *Journal of Neurochemistry* 133: 343-351(査読有り) doi: 10.1111/jnc.13057.

Thon M, Hosoi T, Yoshii M, and Ozawa K. (2014) Leptin induced GRP78 expression through the PI3K-mTOR pathway in neuronal cells. *Scientific Reports* 4:7096. (査読有り) doi: 10.1038/srep07096.

Hosoi T, Baba S., and Ozawa K. (2014) Therapeutic potential of flurbiprofen against obesity in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 449: 132-134. (査読有り) doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.159.

Hosoi T, Toyoda K., Nakatsu K., and Ozawa K. (2014) Caffeine attenuated ER stress-induced leptin resistance in neurons. *Neuroscience Letters* 569: 23-26. (査読有り) doi: 10.1016/j.neulet.2014.03.053.

Hosoi T, Noguchi J., Takakuwa M., Honda M., Okuma Y., Nomura Y., and Ozawa K. (2014) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and interleukin-1 β expression by tunicamycin in cultured glial cells exposed to lipopolysaccharide. *Brain Research* 1558: 11-17. (査読有り) doi: 10.1016/j.brainres.2014.02.035.

Hosoi T, Yamaguchi R., Noji K., Matsuo S., Baba S., Toyoda K., Suezawa T., Kayano T., Tanaka S., and Ozawa K. (2014) Flurbiprofen ameliorated obesity by attenuating leptin resistance induced by endoplasmic reticulum stress. *EMBO Molecular Medicine* 6: 335-346. (査読有り) doi: 10.1002/emmm.201303227.

Hosoi T, Honda M., Oba T., and Ozawa K. (2013) ER stress-mediated regulation of immune function under glucose-deprived condition in glial cells: up- and down-regulation of PGE $_2$ + IFN γ -induced IL-6 and iNOS expressions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 441: 525-528. (査読有り) doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.109.

Hosoi T, Honda M., Oba T., and Ozawa K. (2013) ER stress upregulated PGE $_2$ /IFN γ -induced IL-6 expression and down-regulated iNOS expression in glial cells. *Scientific Reports* 3: 3388. (査読有り) doi: 10.1038/srep03388.

[学会発表](計17件)

細井 徹, 小澤 光一郎: 小胞体ストレスによるレプチン抵抗性形成機構の解明 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会, 2015年12月1-4日, 神戸市

細井 徹, 小澤 光一郎: 小胞体ストレスによる生活習慣病発症機構解明と創薬 日本薬学会第135年会, 2015年3月25-28日, 神戸市

森 光平, 細井 徹, 山口 理恵, 小澤 光一郎: フルルビプロフェンの標的タンパク質同定と小胞体ストレス軽減機構の解明, 日本薬学会第135年会, 2015年3月25-28日, 神戸市

松崎 周, 細井 徹, 宮原 強, 清水 薫, 長谷川 由貴, 小澤 光一郎: 15-deoxy-^{12,14}-prostaglandin J₂ のレプチン抵抗性に対する影響, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 25-28 日, 神戸市

林宏樹, 野口亜樹, 細井 徹, 横山匠太, 小澤光一郎: 免疫応答分子 MyD88 の肥満形成への関与の可能性, 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 18-20 日, 名古屋市

トン ミナ, 細井 徹, 吉井 美智子, 小澤 光一郎: レプチンによる GRP78 誘導と小胞体ストレスによる細胞死保護効果, 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 18-20 日, 名古屋市

長谷川 由紀, 細井 徹, 小澤 光一郎: 神経細胞レプチンシグナルへのグリア細胞の役割, 第 54 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2015 年 10 月 31-11 月 1 日, 高知市

細井 徹, 森 光平, 末澤 隆浩, 馬場 幸子, 豊田 圭亮, 小澤 光一郎: 小胞体ストレスによるレプチン抵抗性・肥満形成機構とその制御薬の探索, 第 37 回日本分子生物学会, 2014 年 11 月 25-27 日, 横浜市

末澤 隆浩, 細井 徹, 大庭 達哉, 樫木 修, 樫木 薫, 小澤 光一郎: PKC による小胞体ストレス応答制御機構の解明, 第 53 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2014 年 11 月 8-9 日, 広島市

野口亜樹, 細井 徹, 横山匠太, 小澤光一郎: MyD88 を介した免疫応答と肥満形成との関連性の解明, 第 53 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2014 年 11 月 8-9 日, 広島市

小澤 光一郎, 細井 徹, 森 光平, 末澤 隆浩, 馬場 幸子, 豊田 圭亮: Flurbiprofen のレプチン抵抗性改善作用による肥満治療効果, 第 126 回日本薬理学会近畿部会, 2014 年 10 月 24 日, 和歌山市

細井 徹: 小胞体ストレスを標的とした

生活習慣病の新規治療薬開発戦略, 平成 26 年度広島医療情報研究会学術講演会, 2014 年 9 月 6 日, 広島市

細井 徹, 森 光平, 末澤 隆浩, 馬場 幸子, 豊田 圭亮, 小澤 光一郎: Flurbiprofen の小胞体ストレス軽減によるレプチン抵抗性・肥満改善効果, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2014, 2014 年 8 月 31 日, 大阪市

細井 徹, 山口 理恵, 馬場 幸子, 森 光平, 豊田 圭亮, 茅野 貴秋, 小澤 光一郎: 小胞体ストレスによるレプチン抵抗性の flurbiprofen による改善効果, 第 9 回小胞体ストレス研究会, 2014 年 7 月 4-5 日, 徳島市

細井 徹, 山口 理恵, 野地 紀久子, 茅野 貴秋, 森 光平, 小澤 光一郎: フルルビプロフェンによる小胞体ストレス改善作用機構の解明, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 27- 30 日, 熊本市

細井 徹, 山口 理恵, 野地 紀久子, 茅野 貴秋, 森 光平, 小澤 光一郎: フルルビプロフェンのアルデヒドデヒドロゲナーゼを介する小胞体ストレス軽減効果, 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 19-21 日, 仙台市

茅野貴秋, 細井 徹, 山口理恵, 野地紀久子, 小澤光一郎: Flurbiprofen のレプチン抵抗性改善作用の解析, 第 124 回日本薬理学会近畿部会, 2013 年 11 月 1 日, 京都市

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

細井 徹 (Toru Hosoi)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号: 40379889