

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560050

研究課題名(和文)食成分によるAKTシグナル伝達系分子の機能調節解析

研究課題名(英文)Diets may contribute to the improved cellular function via the modulation of AKT signaling

研究代表者

松田 覚 (MATSUDA, Satoru)

奈良女子大学・研究院生活環境科学系・教授

研究者番号：50242110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：種々の食成分によってPI3K/AKTやp38MAPKの活性化がどのように変化するかを、ラットの骨髄初代培養系や培養細胞系において検討し、RANKLやTNFなどのサイトカイン産生との関わりを明らかにした。また、アルツハイマー病や生活習慣病関連するPTEN遺伝子の発現解析結果を踏まえて効果的な食事のデザインを考案した。さらに食成分による遺伝子発現調節結果を踏まえて、疾患などの予防に食事のデザインを、例えば生活習慣病関連遺伝子の発現解析結果や本研究成果を踏まえて検討し、種々の疾患の治療や予防へと結びつける示唆と考察を総説論文として発表した。

研究成果の概要(英文)：Reactive oxygen species (ROS) play an important role in the inflammation processes as well as in transduction of signals from receptors for several cytokines such as tumor necrosis factor (TNF). ROS activate nuclear factor kB (NF-kB) via IkB kinase (IKK) through PI3K/AKT/PTEN pathway. Regulation of the PI3K/AKT pathways may also constitute an important signaling center in the subcellular integration of the synaptic neurotransmission. The pathways modulate cell proliferation, migration, and plasticity. The PI3K/AKT/PTEN pathway has been shown to play a pivotal role in several disease protections. Although PTEN has been discovered as a tumor suppressor, PTEN is also involved in several other diseases, including diabetes and Alzheimer's disease. Dietary fish oil rich in polyunsaturated fatty acids may induce the PTEN expression by activation of peroxisome proliferator-activated receptor.

研究分野：食品機能分子生物学

キーワード：細胞内シグナル伝達 遺伝子発現 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

食要因で調節することが可能な免疫系の働きが注目されている。たとえば一部の食成分は腸内細菌叢（腸内フローラ）を介してホストの免疫状態に影響する。この腸内細菌叢は体内に発生する変異物質や老廃物を排除しながら免疫系を調節しているが、腸管のリンパ球系細胞も密接に関わっている。古来いろいろな薬草の適度の摂取が安全な健康増進効果をもたらしてきた。一方、最近のバイオ研究では、細胞の生存やアポトーシスの制御に AKT や p38MAPK の活性化などの細胞内シグナル伝達系が免疫異常を含む種々の疾患で重要な役割を担っている。本研究では一般的な香辛料・ハーブを使用して、各種標的細胞で AKT/p38MAPK の活性化状態を解析すると共に、どのような遺伝子の誘導を引き起こすのか mRNA の発現を調べる。さらにリンパ球におけるサイトカインや関連する miRNA の誘導を解析して、健康増進にどのように働くのかを分子生物学的に探究することを目的とする。香辛料に含まれるクルクミンやテルピノレンがリンパ系細胞やがん細胞で遺伝子発現やタンパク質分解に働き細胞内シグナル伝達系を変化させることを、申請者は既に示してきた。そして漢方薬やハーブによる効能についても国内外で多くの論文が発表されている。AKT/p38MAPK の活性化はアレルギーや糖尿病などの関連性が強く指摘されているが、食成分と病態との具体的な関わりについては未知の部分が多い。

2. 研究の目的

種々の食成分刺激によって AKT/p38MAPK シグナルがどのように変化するのか、培養細胞系およびラットもしくはマウス組織において検討し、さらに誘導される mRNA や miRNA を解析して、食成分がもたらす細胞内動態の変化をエピジェネティックな視点からアプローチする。遺伝子発現調節には食成分が細胞内受容体を介して機能していることが判明しているので、本研究ではリンパ球におけるサイトカイン産生に関連する mRNA や miRNA の発現を重点的に調べる。また AKT/p38MAPK の調節の引き金となる要因を解明する。さらに、誘導されたサイトカインや miRNA の誘導を解析して、細胞の健康増進（花粉症抑制や糖尿病予防）にどのように働くのかを分子生物学的に明らかにする。リン酸化などによるシグナル伝達系の調節は遺伝子変化と異なり可逆的であるため、キナーゼの活性化や不活化がもたらした病的な状態は回復できる可能性がある。このため、AKT/p38MAPK が関与するアレルギーや糖尿病のリスクを低減するための有効かつ効果的な方法が浮上してくる。例えば脱メチル化剤は既に抗がん剤として成功している。世界中で薬味や調味料として用いられてきた香辛料やハーブの大部分は極めて安全な食品であり、副作用などを

それほど考慮することなく、また早期に食生活への応用が可能な実用性を有する研究といえる。新たな食品の機能性も明らかになる。本研究の意義は、香辛料の健康増進効果を科学的に検証し、花粉症や神経疾患や糖尿病などの場合に適切で安全な食事療法を提案することにある。

3. 研究の方法

AKT シグナル伝達系分子群の遺伝子を準備し、ヒト培養細胞の cDNA ライブラリーから AKT・PTEN・GSK3 などの遺伝子をクローニングした後、GST や His タグなどとの融合蛋白質を作製・精製した。これら分子の細胞内シグナル伝達系にかかわると考えられるアダプター蛋白質を同定して、リンパ球や上皮細胞においてその機能を探求した。次に、種々の食成分によって、AKT や p38MAPK の活性化がどのように変化するかを、培養細胞系およびラットもしくはマウス組織において検討し、同様にして、食成分によって誘導される miRNA を解析し、サイトカイン産生との関わりを解析した。香辛料の適度の摂取が安全な食欲増進効果をもたらす健康への良好な結果を得てきたことが知られているが、刺激要因の同定と AKT や p38MAPK の下流で誘導される mRNA や miRNA の発現調節に関する研究を行った。また、食成分によって誘導される miRNA を解析し、サイトカイン産生との関わりを解析した。解析手法として、ウエスタンブロットティングや蛍光組織染色そして in situ ハイブリダイズを行い、疾患動物と正常動物とを比較した。それぞれの細胞内分子のリン酸化動態を解析する。さらに血中のサイトカイン量の解析やリンパ球サブセットの変化と経時推移を詳しく検討するための用いる細胞としては Jurkat 細胞や HEK293 細胞の他、U937 や MKN7 など各種サイトカインの発現が検出可能な細胞で予備実験を行い、ラットもしくはマウスを用いて in vivo での組織発現についても検討した。液体クロマトを用いて発現変化に影響する食成分を同定するため、食物のどの成分が誘導を担うのかについても予備実験を行い、種々の候補物質を選定した。誘導されるマイクロ RNA をウエスタンブロットティングや蛍光組織染色そして in situ ハイブリダイズを用いて解析し摂食システムとの関わりを追及した。またシグナル伝達を担うアダプター蛋白質を同定して、神経細胞やリンパ球においてその機能を探求し、新規アダプター分子の中で NESCA や NESH については特異抗体を作製し、摂食ホルモン発現に至るシグナル伝達系を解析した。ポリフェノールやビタミン D などの転写因子リガンド刺激もしくは抑制によって核内で起動する遺伝子調節系を利用した解析も行った。リン酸化や蛋白質発現が脂溶性ビタミンやイソフラボンなど食成分刺激によって変化しうることを示した。さらに分子間相互作用

測定装置で関連する分子の結合状況を調べ、この転写調節系がどのようなメカニズムによるものなのかを解析した。特に PPAR の関与について阻害剤などを用い、食物中のポリフェノールからアプローチし、PTEN・AKT・p38MAPK などの遺伝子発現においても同様に解析を進めた。食成分による遺伝子発現調節結果を踏まえて、株化細胞を用いて実際にそれらの細胞内発現を制御できることを *in vitro* の実験系を用いて検証した。疾患動物と正常動物とを比較検討しながら、それぞれの分子の発現やリン酸化動態を解析した。疾患動物で特異的に誘導されている miRNA との相関関係の点からも検討する。転写因子のリガンド刺激（抑制）によって核内で起動する遺伝子調節系を利用した解析も行った。これによって効果的な食要因の構築を試みた。実験動物などで食餌性に摂取させることで、標的遺伝子発現が可能であることを確認した。

4. 研究成果

摂食ホルモン発現に關与する食成分と遺伝子発現系にこれら分子を介した影響を与えうる食成分があることを明らかにした。また、がん遺伝子発現の増減にも影響していることを見出した。それらの成果として、生活習慣病関連遺伝子の発現解析結果や本研究成果を踏まえて効果的な食事のデザインを考案した。種々の疾患の治療や予防へと結びつける示唆と考察を総説論文として発表した。種々の食成分によって AKT や p38MAPK の活性化がどのように変化するかを、ラットの骨髓初代培養系や培養細胞系において検討し、RANKL や TNF などのサイトカイン産生との関わりを明らかにした。この場合でも、食成分による遺伝子発現調節結果を踏まえて、疾患などの予防に食事のデザインを、例えば生活習慣病関連遺伝子の発現解析結果や本研究成果を踏まえて検討し、また、種々のスパイスやハーブ、そして植物ポリフェノール類の刺激やカプサイシンなどによって AKT を含む細胞内シグナル伝達系がどのように変化するかを明らかにした。そして、誘導される遺伝子産物をウエスタンブロッティングや蛍光組織染色そして *in situ* ハイブリダイズを用いて解析し、生活習慣病との関わりをまとめた。そして遺伝子発現系にこれら分子を介した影響を与えうる食成分があることを明らかにした。また、がん遺伝子やがん抑制遺伝子発現の増減にも影響していることを見出した。本研究成果を踏まえて関連する疾患の効果的な食事のデザインを考案した。そして、種々の疾患の治療や予防へと結びつける示唆と考察を総説論文として発表した。また、Dアミノ酸や植物ポリフェノール類の刺激などによって AKT/PTEN を含む細胞内シグナル伝達系がどのように変化するかを検討し、誘導される遺伝子産物についてウエスタンブロッティングを

用いて解析した結果を生活習慣病との関わりで議論した。本研究成果を踏まえて関連する疾患の効果的な食事のデザインを考案し、骨疾患や肝臓疾患など種々の疾患の治療や予防へと結びつける考察を総説論文として発表している。

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 9 件)

2015

1. Ichimura M, Minami A, Nakano N, Kitagishi Y, Murai T, Matsuda S. Cigarette smoke may be an exacerbation factor in nonalcoholic fatty liver disease via the modulation for PI3K/AKT pathway. *AIMS Mol Sci*, 2:427-439, 2015.

DOI: 10.3934/molsci.2015.4.427

2. Minami A, Murai T, Nakanishi A, Kitagishi Y, Matsuda S. Roles of PTEN/PI3K/AKT/GSK3 β Pathway in Neuron Signaling involved in Autism. *Brain Disorders & Therapy* 4:3 1000165, 2015.

Doi:10.4172/2168-975X.1000165

3. Nakanishi A, Minami A, Kitagishi Y, Ogura Y, Matsuda S. BRCA1 and p53 tumor suppressor molecules in Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*. 16:2879-2892, 2015.

Doi: 10.3390/ijms16022879.

2014

4. Nakanishi A, Kitagishi Y, Ogura Y, Matsuda S. *Int J Oncol*. 2014 Jun;44(6):1813-9. The tumor suppressor PTEN interacts with p53 in hereditary cancer.

Doi: 10.3892/ijo.2014.2377.

5. Nakanishi A, Wada Y, Kitagishi Y, Matsuda S. Link between PI3K/AKT/PTEN Pathway and NOX Protein in Diseases. *Aging Dis*. 2014 Jun 1;5(3):203-11.

Doi: 10.14336/AD.2014.0500203.

6. Tokuhira N, Kitagishi Y, Suzuki M, Minami A, Nakanishi A, Ono Y, Kobayashi K, Matsuda S, Ogura Y. PI3K/AKT/PTEN

pathway as a target for Crohn's disease therapy.

Int J Mol Med. 2015 Jan;35(1):10-6.

Doi: 10.3892/ijmm.2014.1981.

2013

7. Matsuda S, Nakanishi A, Wada Y, Kitagishi Y. Roles of PI3K/AKT/PTEN Pathway as a Target for Pharmaceutical Therapy. Open Med Chem J. 2013 Oct 31;7:23-9.

Doi: 10.2174/1874104501307010023.

8. Kitagishi Y, **Matsuda S**. Diets involved in PPAR and PI3K/AKT/PTEN pathway may contribute to neuroprotection in a traumatic brain injury. Alzheimers Res Ther. 2013 Sep 26;5(5):42.

Doi: 10.1186/alzrt208.

9. Kitagishi Y, **Matsuda S**. Redox regulation of tumor suppressor PTEN in cancer and aging. Int J Mol Med. 2013 Mar;31(3):511-5.

Doi: 10.3892/ijmm.2013.1235.

〔学会発表〕(計 3件)

1. 第88回日本生化学会大会
(神戸ポートアイランド・兵庫)
ブルーベリー成分およびその代謝産物が破骨細胞形成に与える影響
南 明里、中野 紀子、**松田 覚** (奈良女大・院人間文化・食物栄養) 2015年12月1日
2. 第88回日本生化学会大会
(神戸ポートアイランド・兵庫)
炎症・酸化ストレスの骨代謝への影響
中西 温子、**松田 覚** (奈良女院・共生自然科学) 2015年12月1日
3. 第65回日本家政学会
(昭和女子大・東京)
食品成分刺激による細胞内リン酸化蛋白質の変化 北岸 靖子, **松田 覚** (奈良女大・院人間文化) 2013年07月23日

〔図書〕(計 0件)

〔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
松田 覚 (MATSUDA, Satoru)
奈良女子大学・研究院生活環境科学系・教授
研究者番号：50242110

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：