

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860770

研究課題名(和文) 脂肪組織におけるグルココルチコイドとスフィンゴ脂質分子群とのクロストークの解明

研究課題名(英文) Mifepristone improved Diet-induced insulin resistance by increasing blood level of adiponectin.

研究代表者

橋本 剛 (Hashimoto, Takeshi)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80380153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：グルココルチコイド受容体遮断薬(Mifepristone)を高脂肪食負荷肥満マウスに与えるとメタボリック症候群の改善が認められた。これは、Mifepristoneが脂肪細胞に対してアディポネクチンの遺伝子およびタンパク質の発現誘導に起因していることが示唆された。またMifepristoneは、脂肪細胞のマスター転写因子PPAR $\gamma$ のアゴニスト作用が報告されている。そこで、PPAR $\gamma$ に対する選択的阻害剤の投与実験を行ったところ、Mifepristoneによる脂肪細胞からのアディポネクチン分泌作用を抑制した。今後、脂肪細胞におけるMifepristoneの薬理学的作用メカニズムを詳細に検討する。

研究成果の概要(英文)：Mifepristone is known as a steroid receptor antagonist and is clinically used as an anti-cancer agent. This study aimed to determine whether mifepristone influences insulin sensitivity and adiponectin secretion both in in vivo and in vitro. First, we explored the effects of mifepristone, on metabolic functions in obese mice. When these mice were fed mifepristone, they exhibited a marked improvement in insulin sensitivity, and attenuated hepatic injury, compared with mice that received only the high-fat diet. Intriguingly, mifepristone-treated mice showed significantly elevated plasma adiponectin levels. Second, we tested the effects of mifepristone on differentiated adipocytes in vitro. When adipocytes were treated with mifepristone, adiponectin was upregulated at both mRNA and protein levels. These results uncover a possibility that long term administration of mifepristone leads to non-obese non-alcoholic fatty liver disease, associated with overeating or dyslipidemia.

研究分野：生理学

キーワード：前駆脂肪細胞 成熟脂肪細胞 グルココルチコイド デキサメタゾン 脂肪細胞分化 スフィンゴ脂質  
S1P スフィンゴシンキナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は動脈硬化症の強いリスクファクターであり、これを軽減するために様々な取り組みが行われてきたがその効果は未だ十分ではない。また、脂質に溶解し易いグルココルチコイドは細胞膜を自由に透過して細胞内に入り、グルココルチコイド受容体 (GR) を介して核へと移行し、生命維持にとって重要な多くの遺伝子発現を調整している。

一方、脂肪細胞から分泌される生理活性物質はアディポサイトカインと総称され、TNF-alphaやIL-6などのような炎症を惹起しメタボリック症候群の病態に促進的に働くものと、アディポネクチンなどのように抗炎症効果を発揮してメタボリック症候群の病態に防御的に働くものがある。また、アディポネクチンはインスリン感受性増強作用を介して2型糖尿病や脂質代謝異常に防御機能を有するだけでなく、心筋梗塞、心肥大、高血圧、腎障害、血管内皮障害に対する直接的な保護作用の存在も数多く報告されている。

しかしながら、内因性グルココルチコイドおよび各種疾病治療に用いられる外因性グルココルチコイドによる糖代謝・脂質代謝の分子メカニズム、とくに脂肪細胞/脂肪組織におけるアディポネクチン分泌機構の詳細は不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

グルココルチコイド受容体 (GR) 遮断薬として知られるミフェプリストンは、本邦以外の地域において世界規模で臨床使用されているポピュラーな経口妊娠中絶薬であり (Annu Rev Med. 1997; 48: 129-156) 従前の脂肪細胞の研究分野において、脂肪細胞の分化過程の初期段階において短期投与すると脂肪細胞への分化を抑制するとの報告がある (J Lipid Res. 2008; 49(7): 1519-1528)。さらに、褐色脂肪細胞に対しては、ミトコンドリア脱共役タンパク質の発現増加を引き起こすとする報告もある (Pflugers Arch. 2004; 449(2): 170-174)。しかしながら、ミフェプリストンを長期投与した場合の影響ならびに白色脂肪細胞に関する詳細な報告はない。

近年、血管内皮細胞におけるインスリンシグナルの障害を起因とする血中から骨格筋間質へのインスリン移行の低下は、骨格筋におけるインスリン抵抗性を引き起こすとの報告がある (Cell Metab. 2008; 8(1): 49-64.) (Cell Metab. 2011; 13(3): 294-307.)。さらに、アディポネクチンは、血管内皮細胞に対しては接着分子発現の誘導抑制、マクロファージに対しては血管内皮

細胞への接着抑制とTNF-alphaの発現と分泌を抑制することでメタボリック症候群を改善するとの報告がある (Circulation 1999; 100(25): 2473-2476.)。

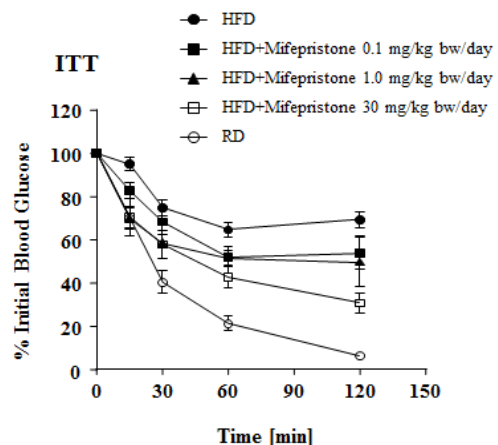
そこで、抗がん剤として期待され治験が行われているミフェプリストンに、アディポネクチンの分泌促進機構を介した直接的または間接的にメタボリック症候群を改善する新たな治療法の開発および創薬へと発展する可能性を秘めている。そこで本研究課題は、ミフェプリストン/アディポネクチン分泌促進/脂肪滴の小型化/インスリン抵抗性改善の存在仮説を立て、脂肪細胞に対するミフェプリストンの新規薬理作用を解明することを目的とする。

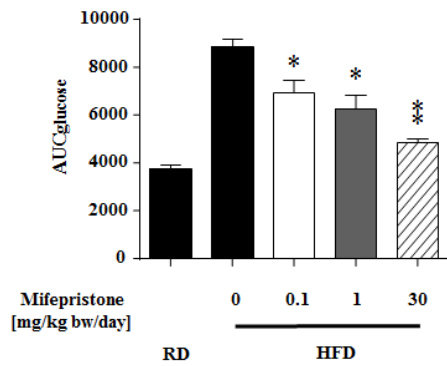
## 3. 研究の方法

- (1) 各種 mRNA の発現量の変化は、リアルタイム PCR 法にて検討する。
- (2) 各種蛋白質の発現量の変化は、Western Blot 法にて検討する。
- (3) 高脂肪食負荷肥満マウスに GR 阻害剤であるミフェプリストンを食べさせたときの体重、血糖値、インスリン抵抗性および肝機能への影響を検討する。
- (4) 成熟脂肪細胞におけるインスリン取込能は $[^3\text{H}]$ -Deoxy-D-glucose を用いて検討する。

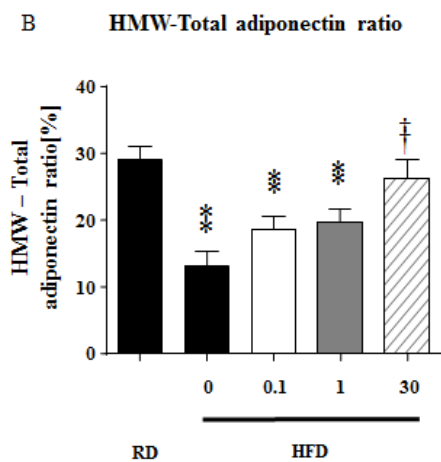
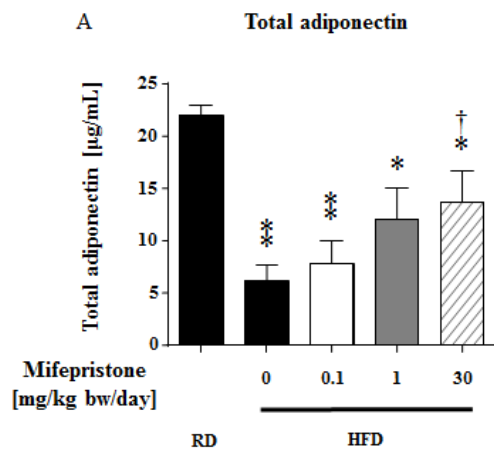
## 4. 研究成果

- (1) 高脂肪食負荷肥満マウスに Mifepristone を摂取させると、インスリン抵抗性が改善された。

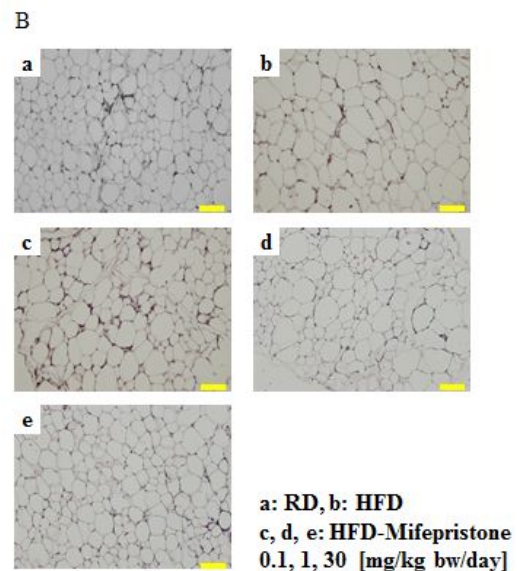
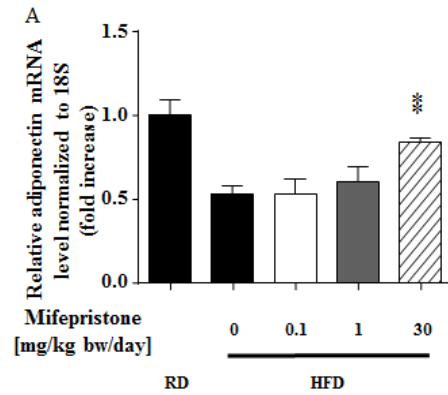




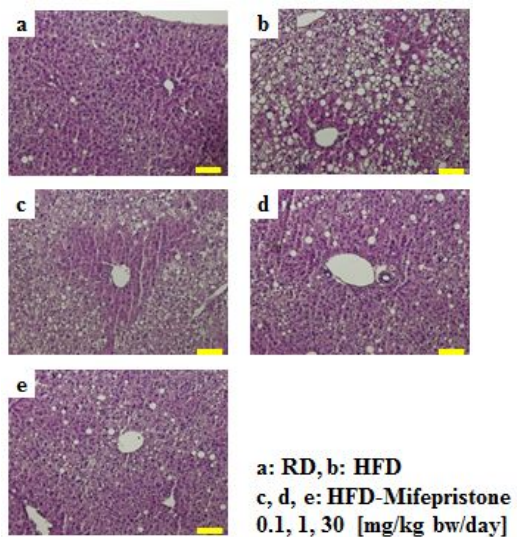
(2) 高脂肪食負荷肥満マウスに Mifepristone を摂取させると、肥満により低下したアディポネクチンを増加させるとともに、高分子アディポネクチンの割合が増大した。

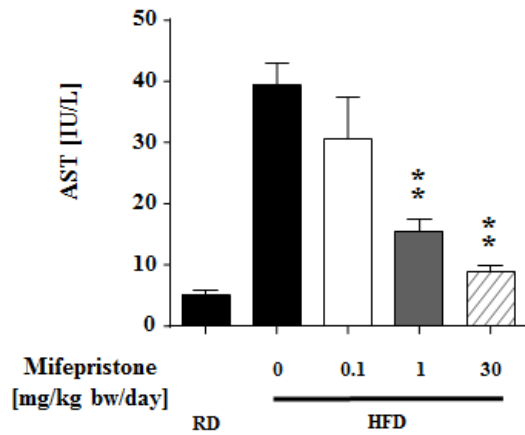


(3) Mifepristone は、高脂肪食負荷肥満マウスの腎臓周囲脂肪組織におけるアディポネクチン mRNA の発現レベルを有意に上昇させるとともに、個別の脂肪細胞の大きさも縮小させた。

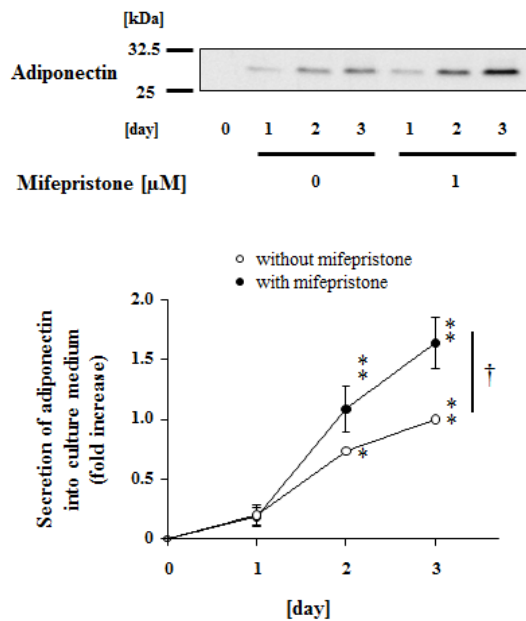


(4) 高脂肪食負荷肥満マウスは脂肪肝を呈するが、Mifepristone は用量依存的に脂肪肝を改善した。

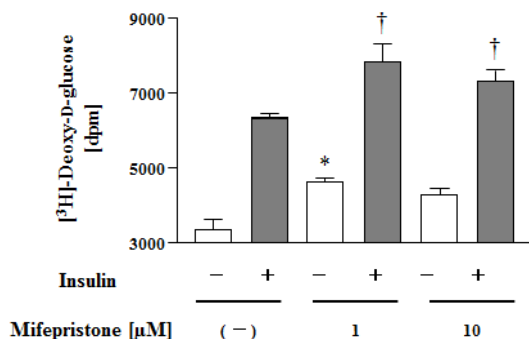




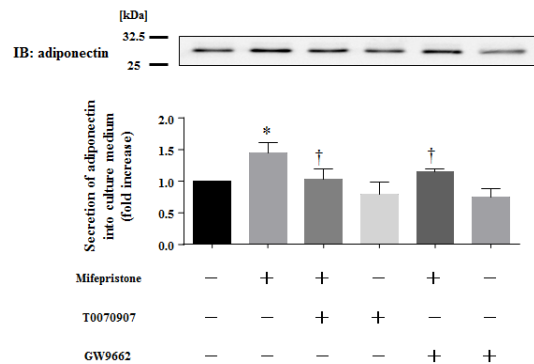
(5) 成熟脂肪細胞へのMifepristone 刺激は、培養上清注へのアディポネクチン分泌量を増大させた。



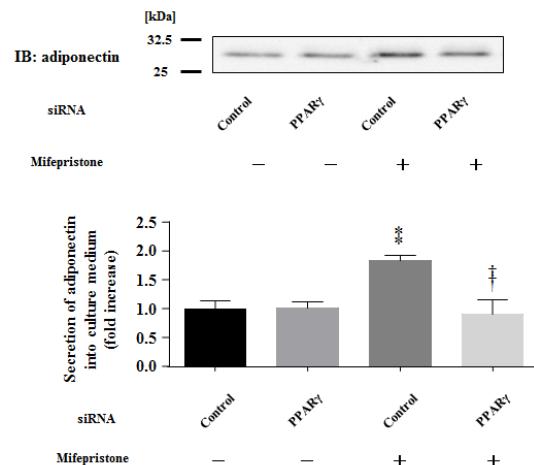
(6) 成熟脂肪細胞へのMifepristone 刺激は、インスリンによる糖取込能を増大させた。



(7) Mifepristone 刺激によるアディポネクチン分泌量の増大は、PPARγ 阻害剤 T0070907 により抑制された。



(8) Mifepristone 刺激によるアディポネクチン分泌量の増大は、PPARγ に対する RNAi 添加により有意に抑制された。



## 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 6 件)

(1) Arif U H; Ohmori K; Konishi K; Igarashi J; Hashimoto T; その他 8 名, Eicosapentaenoic acid upregulates VEGF-A through both GPR120 and PPAR<math>\gamma</math> mediated pathways in 3T3-L1 adipocytes. Mol Cell Endocrinol. 査読有, 406:10-18. 2015

- (2) Igarashi J, Hashimoto T, その他 16 名, Involvement of S1P1 receptor pathway in angiogenic effects of a novel adenosine-like nucleic acid analogue COA-CI in cultured human vascular endothelial cells. Pharmacology Research & Perspectives. 査読有, 2(5):e00068. 2014
- (3) Arif U H, Ohmori K, Hashimoto T その他 7 名, Valsartan ameliorates the constitutive adipokine expression pattern in mature adipocytes: a role for inverse agonism of the angiotensin II type 1 receptor in obesity., Hypertens Res. 査読有, 37(7):621-628. 2014
- (4) Hashimoto T その他 7 名, Mifepristone Promotes Adiponectin Production and Improves Insulin Sensitivity in a Mouse Model of Diet-Induced-Obesity, PLoS One. 査読有, 8(11):e79724. 2013
- (5) Igarashi J; Hashimoto T その他 6 名, Dexamethasone induces caveolin-1 in vascular endothelial cells: implications for attenuated responses to VEGF. Am J Physiol Cell Physiol. 査読有, 304(8):C790-80, 2013
- (6) Moriue T; Igarashi J; Yoneda K; Hashimoto T その他 3 名, Sphingosine 1-phosphate attenuates H2O2-induced apoptosis 1 in HaCaT cells cultured in vitro. Clinical and Experimental Dermatology. 査読有, 38(6):638-645, 2013
- [学会発表](計 13 件)
- (1) Takeshi Hashimoto、Junsuke Igarashi、Ikuko Tsukamoto, Tetsuo Yamashita, Katsuya Hirano  
第 92 回日本生理学会、兵庫県神戸国際会議場、兵庫県  
2015.3.21 - 3.23
- (2) COA-CI-induced adipogenesis is associated with an increased cell cycle progression and down-regulation of p27Kip1 in mouse pre-adipocyte 3T3-L1 cells
- (2) Ryuji Okamoto, Junsuke Igarashi, Tetsuo Yamashita, Takeshi Hashimoto, Katsuya Hirano, Maki Takada, Ryoji Konishi, Ikuko Tsukamoto, Kazuyo Shoji, Yasuo Kubota  
第 92 回日本生理学会、兵庫県神戸国際会議場、兵庫県  
2015.3.21 - 3.23  
A novel angiogenic agent COA-CI induced PGC-1-mediated VEGF production in cultured human fibroblasts.
- (3) 塚本郁子、五十嵐淳介、橋本剛、山下哲生、榊原紀和、丸山徳見、高田麻紀、窪田泰夫、平野勝也、小西良士  
第 66 回日本皮膚科学会西部支部学術大会、サンポート高松、香川県  
2014.11.8 - 11.9  
新規アデノシンアナログ COA-CI の血管新生作用
- (4) 岡本隆司, 五十嵐淳介, 山下哲生, 橋本剛, 平野勝也, 高田麻紀, 小西良士, 塚本郁子, 小路和代, 窪田泰夫  
第 66 回日本生理学会中国四国地方会、サンポート高松、香川県  
2014.11.1 - 11.2  
血管新生化合物 COA-CI の VEGF 分泌作用機序の検討
- (5) Takeshi Hashimoto、Junsuke Igarashi、Tetsuo Yamashita、Katsuya Hirano  
第 35 回日本肥満学会、宮崎県シーガイアコンベンションセンター、宮崎県

2014.10.24 - 10.25  
3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化に及ぼす  
ミフェプリストンの促進作用

- (6) 塚本郁子、五十嵐淳介、橋本剛、山下哲生、小路和代、榊原紀和、丸山徳見、高田麻紀、窪田泰夫、平野勝也、小西良士

第 87 回日本生化学会大会、京都国際会議場、京都府

2014.10.15 - 10.18

HUVEC における COA-CI の血管新生作用に対する S1P レセプターの関与

- (7) Takeshi Hashimoto、Junsuke Igarashi、Tetsuo Yamashita、Hiroaki Kosaka

第 87 回日本薬理学会、宮城県東北大学百周年記念会館川内萩ホール、仙台国際ホール、宮城県

2014.3.19 - 3.21

Mifepristone induces non-obese non-alcoholic fatty liver disease

- (8) Takeshi Hashimoto、Junsuke Igarashi、Tetsuo Yamashita、Kosaka Hiroaki

第 91 回日本生理学会、鹿児島大学群元キャンパス、鹿児島県

2014.3.16 - 3.18

Mifepristone upregulated adiponectin secretion during 3T3-L1 adipogenesis

- (9) Junsuke Igarashi、Takeshi Hashimoto、Tetsuo Yamashita、Hiroaki Kosaka

第 91 回日本生理学会、鹿児島大学群元キャンパス、鹿児島県

2014.3.16 - 3.18

S1P1 receptors are necessary, but not sufficient, for the angiogenic responses induced by a novel nucleic acid analogue COA-CI

- (10) Tetsuo Yamashita、Takeshi Hashimoto、Junsuke Igarashi、Hiroaki Kosaka

第 91 回日本生理学会、鹿児島大学群元キャンパス、鹿児島県

2014.3.16 - 3.18

Analysis of the binding mode of AIF to the membrane

- (11) Takeshi Hashimoto、Junsuke Igarashi、Tetsuo Yamashita、Hiroaki Kosaka

第 34 回日本肥満学会、東京国際フォーラム、東京都

2013.10.11 - 10.12

普通食で飼育したマウスの腹腔内脂肪組織に対する Mifepristone の影響

- (12) Takeshi Hashimoto、Junsuke Igarashi、Tetsuo Yamashita、Hiroaki Kosaka

第 90 回日本生理学会、タワーホール船堀、東京都

2013.3.27 - 3.29

Mifepristone increases anti-inflammatory M2 macrophages in obese adipose tissues

- (13) Tetsuo Yamashita、Takeshi Hashimoto、Junsuke Igarashi、Hiroaki Kosaka

第 90 回日本生理学会、タワーホール船堀、東京都

2013.3.27 - 3.29

Thr239 suppresses ROS production in yeast mitochondrial NADH dehydrogenase (NDH-2).

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 剛(HASHIMOTO TAKESHI)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80380153