

---

新たに見出した脂肪細胞の新機能と生活習慣病態  
との連関の解明ならびに制御剤の開発

---

(課題番号 16590054)

平成 16 年度～平成 18 年度 科学研究費補助金  
基盤研究 (C) (2) 研究成果報告書

平成 19 年 5 月

研究代表者 國安 明彦

熊本大学大学院医学薬学研究部 助教授

## はしがき

本研究報告書は、平成 16 年度（2004 年度）から平成 18 年度（2006 年度）にかけて文部科学省科学研究費補助金、基盤研究（C）（2）（課題番号 16590054、「新たに見出した脂肪細胞の新機能と生活習慣病態との連関の解明ならびに制御剤の開発」）を使用して行なわれた研究成果をまとめたものである。

脂肪細胞から産生されるアディポサイトカイン類は、肥満状態が亢進するにしたがい分泌異常を呈することが明らかとなっており、粥状動脈硬化症や糖尿病などの生活習慣病態の発症と密接に関与している。我々は、先に脂肪細胞において長鎖脂肪酸トランスポーターとして糖脂質代謝の一端を担っている CD36 が、マクロファージと同様、スカベンジャー受容体として機能し、変性リポタンパク質（酸化 LDL）や糖化後期生成物（AGE）修飾 BSA のクリアランスに関わることを見出した。これを諸端とし、本申請研究では、酸化 LDL（OxLDL）や AGE-BSA が脂肪細胞に過剰に取り込まれた際の細胞応答をアディポサイトカイン産生に着目して調べた。3T3-L1 脂肪細胞を用いた検討により、抗肥満因子レプチンの発現減少、血栓形成促進因子プラスミノゲンアクチベーター阻害剤 1（PAI-1）やインスリン抵抗性惹起因子レジスチンの顕著な発現増大を観察した。さらに、その分子機序と酸化変性分子について、その一部を明らかにすることができた。

これらの成果は、酸化変性脂質がアディポサイトカイン産生に影響することを示した初めての例であり、メタボリックシンドロームの発症・進展の分子メカニズムの新たな可能性を提案するものである。

本研究に貢献した熊本大学大学院医学薬学研究部細胞機能分子解析学分野、ならびに同病態生化学分野の多くの研究協力者に深謝する。

## 研究組織

研究代表者：國安 明彦（熊本大学大学院医学薬学研究部助教授）  
研究分担者：中山 仁（熊本大学大学院医学薬学研究部教授）  
研究分担者：川原 浩一（熊本大学大学院医学薬学研究部助手）  
（研究協力者：永井 竜児、熊本大学大学院医学薬学研究部助手）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	2,400,000	0	2,400,000
平成 17 年度	700,000	0	700,000
平成 18 年度	500,000	0	500,000
総計	3,600,000	0	3,600,000

## 研究発表

### (1) 学会誌等

- 1) Y. Unno, M. Sakai, Y. Sakamoto, A. Kuniyasu, H. Nakayama, R. Nagai, and S. Horiuchi: Advanced glycation end products-modified proteins and oxidized LDL mediate down-regulation of leptin in mouse adipocytes via CD36, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325, 151-156 (2004).
- 2) V. T. Chuang, M. Hijioka, M. Katsuki, K. Nishi, T. Hara, K. I. Kaneko, M. Ueno, A. Kuniyasu, H. Nakayama, and M. Otagiri: Characterization of benzodiazepine binding site on human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein using flunitrazepam as a photolabeling agent, *Biochim. Biophys. Acta*, 1725, 385-393 (2005).
- 3) H. Tanaka, J. Miake, T. Notsu, K. Sonyama, N. Sasaki, K. Iitsuka, M. Kato, S. Taniguchi, O. Igawa, A. Yoshida, C. Shigemasa, Y. Hoshikawa, Y. Kurata, A. Kuniyasu, H. Nakayama, N. Inagaki, E. Nanba, G. Shiota, T. Morisaki, H. Ninomiya, M. Kitakaze, I. Hisatome, Proteasomal degradation of Kir6.2 channel protein and its inhibition by a  $\text{Na}^+$  channel blocker aprindine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1001-1006 (2005).
- 4) Y. Unno, M. Sakai, Y. Sakamoto, A. Kuniyasu, R. Nagai, H. Nakayama, and S. Horiuchi: Glycolaldehyde-modified bovine serum albumin downregulates leptin expression in mouse adipocytes via a CD36-mediated pathway, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1043, 696-701 (2005).

### (2) 口頭発表

- 1) 國安明彦, 山本 崇, 川原千絵美, 徳永真理子, 小濱景子, 古川浩一郎, 中山 仁: 酸化 LDL による 3T3-L1 脂肪細胞からのレジスチンおよび PAI-1 の分泌促進, 第 77 回日本生化学会大会, 2004 年 10 月 13-16 日 (横浜)
- 2) 西村真平, 村田和義, 國安明彦, 中山 仁: 電子顕微鏡による電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの単粒子構造解析, 第 77 回日本生化学会大会, 2004 年 10 月 13-16 日 (横浜)

- 3) 徳永真理子, 國安明彦, 大森晶子, 中山 仁: リゾフォスファチジルコリンは脂肪細胞での酸化 LDL による PAI-1 産生に關与する, 第 78 回日本生化学会大会, 2005 年 10 月 19~22 日 (神戸)
- 4) 國安 明彦: アポトーシス促進性ペプチドリガンドを用いた白血病細胞の分子ターゲティング, 第 64 回日本癌学会学術総会, 2005 年 9 月 14~16 日 (札幌)
- 5) 國安明彦, 徳永真理子, 山本 崇, 小濱景子, 中山 仁: 酸化 LDL 刺激によるアディポサイトカイン産生異常, 産学官連携を指向した九州バイオサイエンスシンポジウム・疾患プロテオミクス最前線, 2005 年 9 月 2~3 日 (熊本)
- 6) 西村真平, 村田和義, 國安明彦, 中山 仁: 電子顕微鏡による L 型 Ca チャネルの立体構造解析, 産学官連携を指向した九州バイオサイエンスシンポジウム・疾患プロテオミクス最前線, 2005 年 9 月 2~3 日 (熊本)
- 7) 川原千絵美, 堤 博志, 川原浩一, 國安明彦, 中山 仁: ミクログリアサブタイプに選択的結合能を持つペプチドリガンドの探索, 第 22 回日本薬学会九州支部大会, 2005 年 12 月 10~11 日 (福岡)
- 8) 池田 剛, 雷 振環, 國安明彦, 中山 仁, 野原稔弘: *Erysimum cheiranthoides* の Cardiac glycoside の生理・薬理活性, 日本薬学会第 126 年会, 2006 年 3 月 26~29 日 (仙台)
- 9) 國安明彦, Mikhail G. Kolonin, Wadih Arap, Renata Pasqualini, 中山 仁: ペプチドライブラリーによるヒト腫瘍細胞表面に発現するリガンド受容体の解析, 日本薬学会第 126 年会, 2006 年 3 月 26~29 日 (仙台)
- 10) Akihiko Kuniyasu, Hiroshi Tsutsumi, Chiemi Kawahara, Hitoshi Nakayama: Identification of the selective ligands that discriminate two subpopulations of rat microglial cells, 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006 年 6 月 18~23 日 (京都)

- 11) Shinpei Nishimura, Akihiko Kuniyasu, Hitoshi Nakayama, Kazuyoshi Murata: A structural study of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel by single particle analysis, 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006年6月18～23日（京都）
- 12) Mariko Tokunaga, Akihiko Kuniyasu, Tsuyoshi Shuto, Hirofumi Kai, Hitoshi Nakayama: Oxidized LDL increases the expression of resistin in 3T3-L1 adipocytes at the translational level, 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006年6月18～23日（京都）
- 13) Yusaku Furukawa, Akihiko Kuniyasu, Hitoshi Nakayama: Immunochemical identification of human breast cancer resistance protein-associated molecules, 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006年6月18～23日（京都）
- 14) 徳永真理子, 國安明彦, 首藤 剛, 甲斐広文, 中山 仁: 酸化ストレス産物が引き起こすアディポサイトカイン分泌異常とその分子機序の解明, 日本薬学会九州支部大会, 2006年12月9～10日（熊本）
- 15) 國安明彦, 徳永真理子, 首藤 剛, 甲斐広文, 中山 仁: 酸化 LDL によるアディポサイトカイン産生異常とその分子機序の解明, 日本薬学会第 127 年, 2007年3月28～30日（富山）

(3) 出版物

なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

## 研究成果

### 1. はじめに

本研究では、マウス 3T3-L1 脂肪細胞において酸化ストレス産物である OxLDL および糖化後期生成物 (AGE) が脂肪酸トランスポーター CD36 を介して取り込み・分解されることを見出したことを発端に、これらリガンドのアディポサイトカイン産生における効果を 3T3-L1 脂肪細胞系を用いて調べた。その結果、リガンドによって多少の違いはあるものの、肥満抑制因子レプチンの発現抑制や悪玉アディポサイトカインと捉えられている動脈硬化促進因子 Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) ならびにインスリン抵抗性惹起因子レジスチンの分泌が著明に増大することを見出した。さらに、これらの産生促進機序を遺伝子転写およびタンパク質翻訳レベルから解析し、病態生理学的に興味深い知見を得ることができたので、以下に要約する。

### 2. 酸化 LDL および糖化後期生成物 (AGE) 修飾 BSA のレプチン産生への影響

レプチンは、代表的なアディポサイトカインであり、脂肪蓄積の亢進に伴い脂肪細胞自身から分泌される。本分子は視床下部にある摂食中枢に作用し、摂食制御に関与しており、エネルギー代謝において肥満抑制因子として重要である。本研究では、OxLDL および AGE リガンドとして Glycolaldehyde (GA) 修飾 BSA を用いて、これらリガンドのレプチン産生への影響をマウス 3T3-L1 脂肪細胞系で調べた。

両リガンドを成熟した脂肪細胞へ添加した後、レプチン産生量を mRNA と分泌タンパク質を半定量的 RT-PCR 法と ELISA 法により定量した。その結果、顕著な mRNA 量と分泌量の著明な低下を観察した。これらの発現抑制は、CD36 機能阻害抗体と活性酸素種 (ROS) 消去剤 N-acetyl cysteine (NAC) を前投与することで回復した。このことより、OxLDL と GA-BSA は、CD36 により認識されて取り込まれること、これにより発生する細胞内 ROS の作用によりレプチン発現が転写レベルで抑制されることを明らかにした。なお、両リガンドは速やかに細胞内へ取り込まれ、分解されることを確認している。さらに、3T3-L1 細胞だけでなく、マウス初代培養細胞系でも同様の結果を得たことより、株化細胞のみに見られる特異な現象ではないことが示された。

以上の結果より、脂肪細胞 CD36 による OxLDL や AGE リガンドに認識は、レ

プチン産生を減少させることで摂食抑制の制御不全を引き起こし、肥満を増長させることが示唆された（文献1,3）。

### 3. 酸化 LDL の PAI-1 産生への影響

Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) は、病態生理学的に見た場合、血栓促進因子として粥状動脈硬化症の発症と進展に寄与していることが知られている。肥満モデルマウスにおいて、血中 PAI-1 量の増大が見られるが、これは脂肪細胞からの PAI-1 分泌を反映していると報告されている。培養脂肪細胞系においても脂肪蓄積に対応した PAI-1 発現の増大が観察されており、これらの知見から脂肪細胞から分泌される PAI-1 は、肥満におけるリスクファクターとして悪玉アディポサイトカインの一つと捉えられている。したがって、その制御剤の開発は生活習慣病の予防戦略を考える上で重要である。

本研究において、OxLDL 添加によるマウス 3T3-L1 脂肪細胞での PAI-1 分泌量の変化をレプチンと同様に調べた。その結果、PAI-1 の分泌量は OxLDL の用量依存的かつ時間依存的に著明に増大することがわかった。OxLDL 添加後、mRNA は 1 時間後に顕著な増大がみられ、それに引き続きタンパク質分泌が OxLDL 添加後 6 時間以降に増大した。この PAI-1 分泌は、転写阻害剤 Actinomycin D と ROS 消去剤 NAC によって完全に抑制された。これより、OxLDL は ROS 産生を介して PAI-1 遺伝子転写活性化を引き起こしていることが分かった。

また、PAI-1 誘導を引き起こす OxLDL 中の成分を探索したところ、LDL の酸化変性で生成するリゾリン脂質 Lysophosphatidylcholine (LPC) が主要な誘導因子であることを突き止めた。合成 LPC でも濃度依存的に PAI-1 産生が亢進した。

### 4. 酸化 LDL のレジスチン発現への影響

レジスチンは、インスリン抵抗性惹起因子として 3T3-L1 脂肪細胞から見出されたアディポサイトカインである。本分子の生理活性作用については、その受容体が未だ不明な点を含め明らかとなっていない部分が多いが、レジスチン過剰発現マウスではインスリン抵抗性を呈したと報告されている。

本研究において、3T3-L1 脂肪細胞に OxLDL を添加すると、用量および時間依存的にレジスチン分泌量が増大することを見出した。この分泌増大は劇的であり、かつ分泌開始時間は PAI-1 と比べ速く、添加後 1 時間でプラトー域近くまで達した。また、PAI-1 と異なり mRNA 量は全く変化せず、転写活性化を介する機構で



はないことが示唆された。そこで、翻訳阻害剤 Cycloheximide による阻害実験やポリゾーム分析を行い検討したところ、翻訳レベルで活性化がおきていることが確認できた。さらに、ルシフェラーゼアッセイにより、レジスチン mRNA の 3' 側非翻訳領域が翻訳抑制に重要であることが示唆された。

一方、レジスチン発現を増大させる成分検索の結果、OxLDL 脂質抽出物中にその活性本体が存在することが示された。HPLC による分画を現在試みている。

## 5. その他のアディポサイトカインの発現への影響

メタボリックシンドロームと深く関わりのあるアディポサイトカイン群（アディポネクチン、Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)、IL-6) についても、3T3-L1 脂肪細胞を用いて OxLDL と LPC の効果を mRNA 発現レベルで調べた。その結果、今回用いた実験条件では、OxLDL では顕著な影響は見られなかったが、LPC は生理的濃度範囲（～20 μM）において、アディポネクチンの発現抑制、MCP-1 と IL-6 の発現増大を引き起こした。よって、LPC などのリゾリン脂質の産生は、脂肪細胞においてアディポサイトカイン産生に対して強く影響を及ぼすことが予想される。特に、MCP-1 は炎症反応の中心的となるマクロファージを脂肪組織へリクルートさせる。LPC による MCP-1 産生増大は、酸化ストレスの増悪をもたらす可能性が考えられる。

今後、LPC によるアディポサイトカイン産生への影響について、タンパク質レベルでの検討も加え、本病態時における酸化変性脂質の役割について更に詳しく追求していきたい。

## 6. 制御剤としての抗酸化物質

レプチンと PAI-1 において、酸化 LDL および AGE-BSA は、活性酸素種 ROS の産生を介して、それぞれの遺伝子転写活性を変化させることが判明した。ROS を消去する NAC のような抗酸化物質は、これらの産生変化を改善した。このことは、抗酸化物質が酸化変性タンパク質リガンドによるアディポサイトカイン産生異常の一部を是正できることを示唆している。

これと対照的に OxLDL で惹起されるレジスチンの産生増大は、ROS 消去剤によって全く影響を受けなかった。また、脂肪細胞におけるレジスチン発現を低下させると報告のあるインスリン抵抗性改善薬 PPAR $\gamma$  アゴニストでも抑制される

ことはなかった。したがって、この制御抑制を可能にする化合物が見出せれば、全く新しいタイプのメタボリックシンドローム改善薬となることが期待される。

## 6. まとめ

本研究では、3T3-L1 脂肪細胞系において、OxLDL と AGE リガンドが成熟脂肪細胞に取り込まれると、ROS 産生を介してレプチンの産生量が減少することを初めて見出した。加えて OxLDL が、異なる酸化変性脂質を介し、かつ異なる分子機序により、悪玉アディポサイトカインである PAI-1 とレジスチンの発現増大を誘導することを見出した。すなわち、これら酸化ストレス産物 (OxLDL, AGE-BSA) は、肥満と類似のアディポサイトカイン類の産生異常を誘発することを見出した。

近年、アディポサイトカイン分泌異常に脂肪組織の酸化ストレス・炎症反応が関与しているとの報告が相次いでいる。本研究の成果により、酸化ストレスとアディポサイトカイン産生異常を関連づける上でのメディエーター候補として OxLDL や AGE 産物が浮上してきた。今後、*in vivo* において、これらの産生が起こっているかの検証を待たねばならないが、脂肪細胞のアディポサイトカイン産生に対する酸化変性脂質、および AGE リガンドの影響は、顕著である。よって、これらのリガンドのアディポサイトカイン産生誘導の分子機構解明は、メタボリックシンドロームの予防・治療のための創薬標的として有望である。

以上の研究成果を含む投稿論文を以下に掲載する。