

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790248
 研究課題名（和文）ニカラベンによるメタボリックシンドローム改善作用の網羅的メカニズム解析
 研究課題名（英文）Transcriptome analysis of anti-metabolic syndrome effects of Nicaraven

研究代表者
 島田 康人（YASUHITO SHIMADA）
 三重大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：40378427

研究成果の概要（和文）：ニカラベン（NIC）は、抗酸化作用と HMOX1 遺伝子発現促進など複数の機能を持つプロドラッグである。HMOX1 は抗酸化酵素の 1 つであり肥満ラットのインスリン抵抗性を改善することが報告されている。本研究は、NIC の抗メタボリックシンドローム作用を、食餌性肥満ゼブラフィッシュを用いて in vivo で証明し、その網羅的遺伝子発現解析により NIC-HMOX1 の作用メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Nicaraven (NIC) is a multifunctional prodrug including antioxidant activity with HMOX1 induction. It has been reported that HMOX1 could improve insulin resistance of obesity model of rat. In this study, we demonstrated that NIC ameliorated metabolic syndrome of diet-induced obesity model of zebrafish. The transcriptome analysis revealed the therapeutic mechanism of NIC-HMOX1 axis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：内臓脂肪・肥満・ゼブラフィッシュ・ヘムオキシゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳卒中に代表される致死性の血管イベントの発症基盤として、肥満を中心に種々の代謝病が重積するメタボリックシンドロームの重要性が注目されている。米国 National Cholesterol Education Program の Adult Treatment Panel (ATP) III が提唱しているメタボリックシンドロームのガイ

ドラインによると、内臓肥満、高中性脂肪血症、低 HDL-コレステロール血症、高血圧、高血糖の 5 項目のうち、3 項目以上を併せ持つものをもってメタボリックシンドロームとしている。再診の大規模臨床疫学研究によると、このような基準で選ばれたメタボリックシンドローム患者では、心筋梗塞はもとより、糖尿病の発症リスクも著しく高まる

ことが明らかとなっている。

近年、メタボリックシンドロームを「脂肪細胞機能異常症」としてとらえるアプローチの中から、脂肪細胞、特に脂肪前駆細胞の機能異常とインスリン抵抗性の密接な関係が重要視され、その機能異常を改善する、脂肪組織の機能的なリモデリングを促進する薬剤の開発が注目されている。

研究代表者は、この脂肪組織の機能的リモデリングを促進する候補化合物の1つとしてニカラベン (NIC) を提唱している。NIC は 1980 年代にくも膜下出血後の脳血管攣縮治療薬として開発された医薬品シーズの1つである。主要な薬理機序としては、ヒドロキシルラジカルを対象としたフリーラジカルスカベンジャー作用による血管保護作用 (Asano, Johshita et al. 1984) が考えられてきていたが、2000 年に入り、脳浮腫の抑制 (Imperatore, Germano et al. 2000)、抗炎症・抗ショック作用 (Zingarelli, Scott et al. 2000)、肝臓手術後の再環流時の障害の抑制 (Yokota, Fukai et al. 2000) など、幅広い臨床への応用研究が報告されている。その分子薬理的メカニズムについても、前述のフリーラジカルスカベンジャー機能のみならず、poly ADP-ribose synthetase の直接阻害作用 (Watanabe, Akiyama et al. 2006) や NO 関連パスウェイへの関与が報告されており、マルチプルな薬理作用を持つ化合物として考えられている。申請者は 2009 年に、NIC が強力なヘムオキシゲナーゼ 1 (HMOX1) インデュースャーであり、それ故に脳血管攣縮病態の改善を促進していることを解明し、報告した (Shimada, Tsunoda et al. 2009)。この HMOX1 の発現誘導は、病態時にのみ認められ、正常時にはほとんど誘導されなかった。HMOX1 は抗酸化酵素の1つであり、その発現を誘導するコバルトプロトポルフィリンが肥満誘導糖尿病モデルラットにおけるインスリン抵抗性を改善することが報告されている (Nicolai, Li et al. 2009)。申請者は、食餌性肥満モデルゼブラフィッシュを用いた予備実験の結果、同様の結果を得ることに成功した。

21 世紀に入り、医学・創薬研究における世界的な傾向として、小型魚類ゼブラフィッシュのヒト疾患モデル動物としての利用が増加している。ゼブラフィッシュは体長約 3 cm の小型脊椎魚類であり、1970 年代より、動物個体発生におけるモデル動物として研究されてきた。ゼブラフィッシュは哺乳類動物が持つ臓器のほとんどを保有し、その組織学的類似性も非常に高い (Goldsmith 2004)。また、ゲノム構造の類似性を評価するシンテニーはヒト・ゼブラフィッシュ間で約 80% であり、生命活動に重要な、細胞内シグナル伝達・細胞増殖・がん化に関与する遺伝子・タ

ンパク質は特に高度に保存されている。これらの研究報告を受け、2003 年以降、医学研究分野において、ゼブラフィッシュは、マウス・ラットに続く第 3 のモデル動物としての地位を固めつつある。研究代表者が構築した食餌性肥満モデルゼブラフィッシュは、血中脂質の増加 (中性脂肪および LDL コレステロール)、耐糖能の低下に加え、内臓脂肪の著名な蓄積および脂肪肝を呈する。このモデルに対し、既存の治療薬であるピオグリタゾンやロスバスタチンが有効であることはすでに証明済みである。

2. 研究の目的

脳血管攣縮抑制薬として開発された NIC は、抗酸化作用と HMOX1 発現促進など複数の機能を持つプロドラッグ化合物である。HMOX1 は抗酸化酵素の1つであり、その発現を誘導が肥満誘導糖尿病モデルラットにおけるインスリン抵抗性を改善することが報告されている。本研究は、NIC の抗メタボリックシンドローム作用を、食餌性肥満モデルゼブラフィッシュを用いて *in vivo* で証明し、その作用メカニズムを網羅的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 食餌性肥満モデルゼブラフィッシュへの NIC 投与実験
高脂肪食で誘導された肥満モデルゼブラフィッシュに対し、以下の条件にて NIC の投与を行った。

Pattern	体重あたりNIC投与量 (mg/kgBW)
1	0
2	40
3	200
4	1000
5	2500

投与方法は経口投与とした。その詳細な方法については成果論文①に記載した。

1 回目は濃度条件検討および身長体重、血中脂質 (TG L-type kit, 和光純薬社)・グルコース (グルテスト Neo, 三和化学研究所)、CT (R_mCR, リガク社) による内臓脂肪の画像データを、2 回目は 1 回目の再現性確認および内臓脂肪組織の回収を行った。なお内臓脂肪組織の回収には Nile red を用いた方法 (Zang, Morikane et al. 2011) (成果論文④) を使用した。

さらに回収した脂肪組織から total RNA を抽出 (RNeasy mini kit, QIAGEN 社)、cDNA を合成し (SuperScript III, Invitrogen 社)、qPCR (SYBR Green Master Mix, Invitrogen 社) にて *hmox1* 遺伝子の発現量を解析した。

(2) DNA マイクロアレイによる内臓脂肪組織の大規模遺伝子発現解析

回収した内臓脂肪組織から total RNA を抽出・精製し、DNA マイクロアレイ実験を行った。Total RNA は Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent Technologies 社) を用いて Cy3 ラベルし、Agilent Zebrafish Whole Genome Oligo Microarrays (G2518A) にハイブリダイゼーションした。その後 Agilent G2565BA Scanner を用いて各スポットの蛍光イメージを取得し、Feature Extraction software (Agilent Technologies 社) を用いて数値化した。NIC を投与した群と control を比較したとき、One-way ANOVA で $P < 0.01$ のスポットを有意な発現変動を認めたとした。

(3) in silico におけるネットワーク解析発現変化が確認できた遺伝子群について、個々の遺伝子産物の機能の詳細を文献で調べていくのは膨大な時間がかかり、現実的とはいえない。自動 blast 法 (Batch blast) により一括してゼブラフィッシュ遺伝子をヒト先祖遺伝子 (オルソログ) に変換し、文献マイニングをベースとしたネットワーク解析ソフトウェアによる解析を行った。このネットワーク解析は PathwayExpert (World Fusion 社) を使用した。この方法は成果論文②③にて発表した (Tainaka, Shimada et al. 2011)。

(4) 遺伝子操作により脂肪組織リモデリングに影響を及ぼす遺伝子群の同定

(4) -1. 1年目で抽出された遺伝子のモルフオリノアンチセンス (MO) を合成し、肥満モデルゼブラフィッシュ腹腔内へ導入し、遺伝子発現抑制実験を行った。MO は 100mg/kgBW で Lipofection (Lipofectamine2000, Invitrogen 社) を用いて腹腔内投与した。対象とした遺伝子を下記に記す。毎週身長・体重を測定し、変化を認められた群に対しては血中脂質、CT による内臓脂肪の画像を解析した。

Gene symbol	Gene name
hmox1	heme oxygenase 1
hnf4a	hepatocyte nuclear factor 4, alpha
ucp4	uncoupling protein 4
igfbp1a	insulin-like growth factor binding protein 1
hsd3b7	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta-and steroid delta-isomerase
ahsg	alpha-2-hs-glycoprotein
gpx4a	glutathione peroxidase 4a
zgc:85725	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene
tgfb1	transforming growth factor, beta-induced
mxd3	max dimerization protein 3

(4) -2. 動物実験では標的遺伝子の作用メカニズムまで明らかにするのは困難がある。そこでマウス脂肪前駆細胞を用いた in vitro 系でのアディポジェネシス実験を行った。細

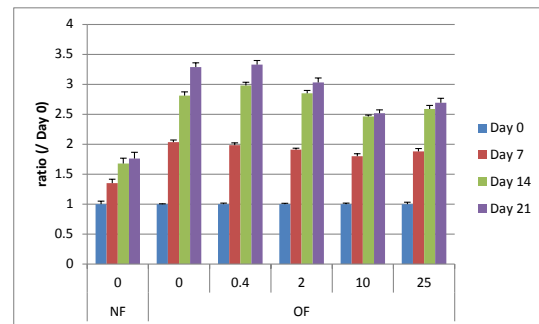
胞は 3T3-L1 細胞を使用し、脂肪前駆細胞培養用培地 (F-PM-1-L1 培地、DS PHARMA BIOMEDICAL 社) を用いて前培養した。その後、脂肪前駆細胞分化培地 (F-DM-2-L1 培地、DS PHARMA BIOMEDICAL 社) を用いて 2 日間分化誘導し、その後、脂肪細胞培養用培地

(F-AM-1-L1 培地、DS PHARMA BIOMEDICAL 社) にて分解した脂肪細胞の継続培養を行った。分化誘導後 6 日目に oil red o 染色を行い、脂肪細胞に含まれる脂肪滴の量を定量化した。(4) -1. の遺伝子についてはそれぞれに対する shRNA 発現ベクター (OpenBiosystems 社) を lipofection 法を用いて 3T3-L1 細胞に導入し、脂肪細胞分化への影響を解析した。

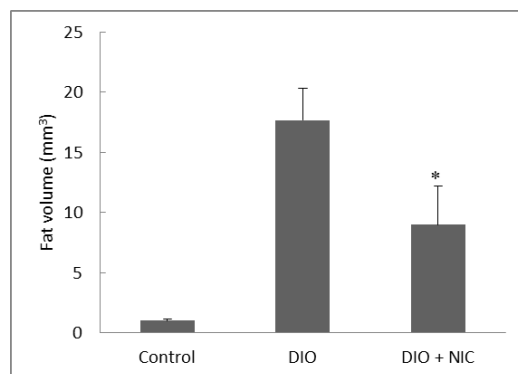
4. 研究成果

(1) 食餌性肥満モデルゼブラフィッシュへのニカラベン投与実験

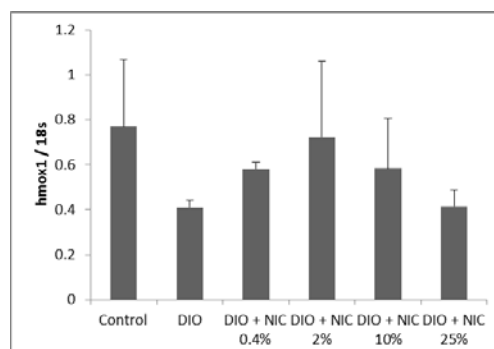
下図に示すように、NIC 1000mg/kgBW の経口投与が肥満誘導時の体重増加を抑制することが明らかとなった。



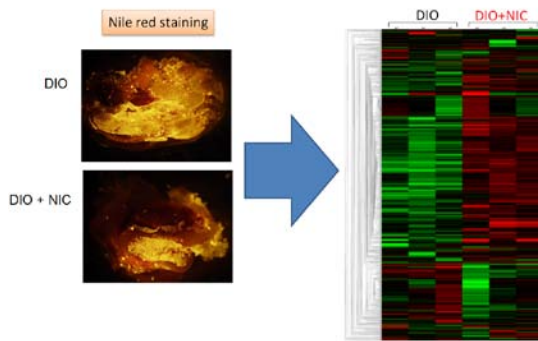
血中中性脂肪および内臓脂肪量も同投与量では有意に減少しており、NIC は肥満に有効なことが証明された。なお皮下脂肪量に対しては影響を認めなかった。



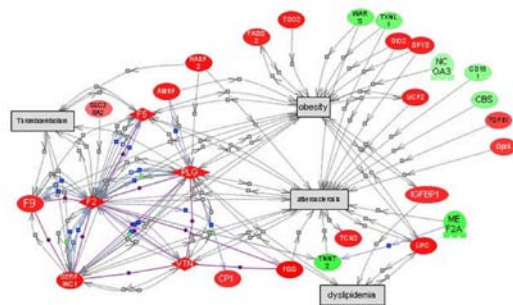
また内臓脂肪における hmox1 の発現量も NIC にて増加することを確認した。



(2) DNA マイクロアレイによる内臓脂肪組織の大規模遺伝子発現解析
DNA マイクロアレイ実験の結果、約 100 個のプローブの発現変化を認めた (下図)。

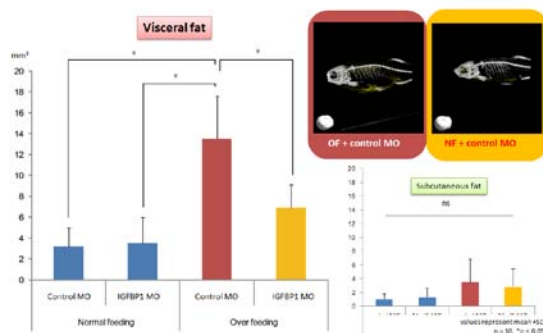
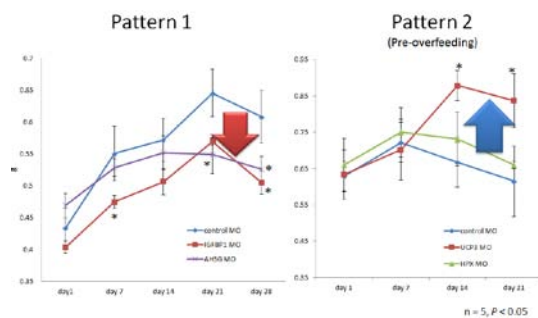


(3) in silico におけるネットワーク解析
実際のネットワーク解析の図を次に示す。赤字になっている部分が NIC の作用により改善する遺伝子発現であった。なおこのリストは 3. 研究方法の (4) のテーブルとほぼ同じである。

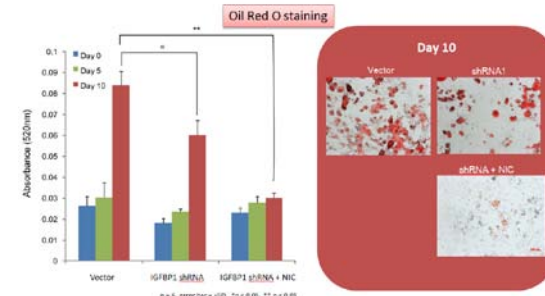


(4) 遺伝子操作により脂肪組織リモデリングに影響を及ぼす遺伝子群の同定

(3) で抽出された遺伝子群について MO を DIO-zebrafish に投与したところ、下図に示すように UCP3 や IGFBP1, GPX4 などの遺伝子では体重増加を抑制することができた。また同時に血漿中性脂肪・内臓脂肪量の減少も確認できた。



次に脂肪前駆細胞 3T3-L1 を用いた系で NIC と IGFBP1 の関係を調べた。IGFBP1 の shRNA 発現ベクターを導入した細胞では、成熟脂肪細胞への分化が阻害されており、その阻害作用は NIC の投与でエンハンスされることが判明した (次図)。



以上の結果より、NIC は HMOX1 を介して抗メタボリック作用を発現する際、IGFBP1 を介していることが証明された。IGFBP1 の発現上昇はインスリン感受性への関与が報告されており (Rajwani, Ezzat et al. 2012)、NIC-HMOX1 は内臓脂肪内の IGFBP1 を誘導することにより、インスリン抵抗性の改善を促進し、内臓脂肪の蓄積を抑制している可能性が示唆された。

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 4 件)

① Zang L, Morikane D, Shimada Y, Tanaka T, Nishimura N. A novel protocol for the oral administration of test chemicals to adult zebrafish. Zebrafish, 査読有, Vol.8, 2011, pp.203-220

② Tainaka T, Shimada Y, Kuroyanagi J, Zang L, Oka T, Nishimura Y, Nishimura N, Tanaka T. Transcriptome analysis of anti-fatty liver action by Campari tomato using a zebrafish diet-induced obesity model. Nutrition & Metabolism, 査読有, Vol.8, 2011, issue 88 (published online)

③ 田中利男、西村有平、島田康人、オミックス創薬科学とターゲットバリデーション、臨床薬理、査読無、42 巻、2011、169-170

④ Oka T, Nishimura Y, Zang L, Hirano M, Shimada Y, Wang Z, Umemoto N, Kuroyanagi J, Nishimura N, Tanaka T. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. BMC physiology, 査読有, Vol.10, 2010, issue 21 (published

online)

〔学会発表〕(計4件)

- ① 島田康人、田井中俊行、黒柳淳哉、臧黎清、西村有平、西村訓弘、田中利男、食餌性肥満ゼブラフィッシュによる機能性食品の薬理ゲノミクス研究、第120回日本薬理学会近畿部会、2011年11月11日
- ② 田中利男、西村有平、島田康人、梅本紀子、黒柳淳哉、ゼブラフィッシュによるオミックス医学スクリーニングシステム(招待講演)、第12回モレキュラーデバイステクニカルセミナー、2011年6月21日
- ③ 田中利男、西村有平、島田康人、オミックス創薬科学とターゲットバリデーション、第31回日本臨床薬理学会、2010年12月3日
- ④ 田中利男、島田康人、西村有平、オミックス創薬・創食を実現するゼブラフィッシュモデルシステム開発、第9回国際バイオEXPO、2010年6月30日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 康人 (YASUHITO SHIMADA)
三重大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40378427