

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

分担課題：漢方薬によって活性化される PPARs の転写非依存性経路の研究

研究分担者 伊藤 隆史 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・特任講師

研究要旨

メタボリック症候群の病態基盤として、自然炎症が関与していることが明らかになりつつある。高尿酸、高血糖、高コレステロール、高中性脂肪などのメタボリックストレス環境下では、これに適応しようとした細胞が少量の炎症性サイトカインを分泌し、これが関節、膵臓、脂肪組織、血管などに自然炎症を引き起こす。我々は平成 23 年度から 25 年度にかけての研究において、高脂肪食の摂取もしくは飽和脂肪酸の負荷により、マクロファージの細胞内で活性酸素種が増加し、これによって核内タンパク質ヒストンが細胞外に放出されうることを明らかにした。細胞外に放出されたヒストンは、damage-associated molecular patterns (DAMPs) として作用し、血管内皮細胞などの周囲の細胞を活性化して、炎症性変化や血栓形成を助長しうる。これがメタボリックストレス下での自然炎症や血栓症の病態基盤となっている可能性が示唆された。また、自然炎症、それに伴う耐糖能異常、血栓症を改善しうる食品、生薬を探索するなかで、涼寒性食品に分類される食品の中に、このような作用を有するものを同定した。糖尿病肥満モデルラットに、この涼寒性食品成分を摂取させると、耐糖能異常の改善傾向を認め、また、糖尿病性腎症の一つである尿中へのアルブミンの漏出についても、軽減傾向を認めた。これらの抗糖尿病作用の一部は、抗糖尿病薬ピオグリタゾンと同様に、核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) を介した作用である可能性が示唆された。このように、本研究を通じて、メタボリック症候群の病態基盤として、DAMPs が関与している可能性が示され、また、食品由来成分を摂取することにより、メタボリック症候群の病態を軽減できる可能性が示された。

A．研究目的

メタボリックストレス下での自然炎症や血栓症の分子細胞メカニズムを明らかにする。また、このような病態に対して、東洋医学的アプローチでの病態改善が望めるかどうか検討する。

B．研究方法

マクロファージ系 cell line の RAW 264.7 細胞を飽和脂肪酸パルミチン酸で刺激した際に細胞外に分泌される分子を解析した。また、その結果パルミチン酸の濃度依存性に細胞外に放出されていたヒストン H3 の免疫細胞化学的検討を行った。また、ヒストン H3 の細胞外放出に関わる細胞内シグナル伝達の解析を行

った。さらには、細胞外に放出されたヒストンが血管内皮細胞に及ぼす遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR 法により解析した。過食により肥満・糖尿病を自然発症するラット ZDF/CrIcrlj-leprfa/Leprfa を用い、6 週齢より涼寒性食品成分を約 3 g/kgBW/day 摂取させた。耐糖能異常を調べるため、糖尿病初期と考えられる 9 週齢において、1.5 g/kg のブドウ糖腹腔内負荷試験を行った。また、糖尿病性腎症の合併を調べるため、糖尿病が進行した 16 週齢において、24 時間蓄尿検体における尿中アルブミン定量検査を行った。また、6, 9, 12, 15, 18 週齢において、クエン酸で抗凝固した全血サンプルを採取し、血流下血栓形成能診断システム (T-TAS) を用いて、血栓傾

向の解析を行った。

(倫理面への配慮)

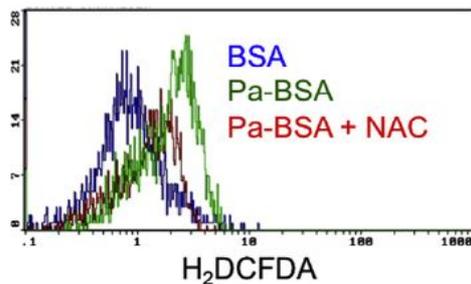
動物実験は、鹿児島大学の動物実験委員会の承認を得たうえでを行った。

C. 研究結果

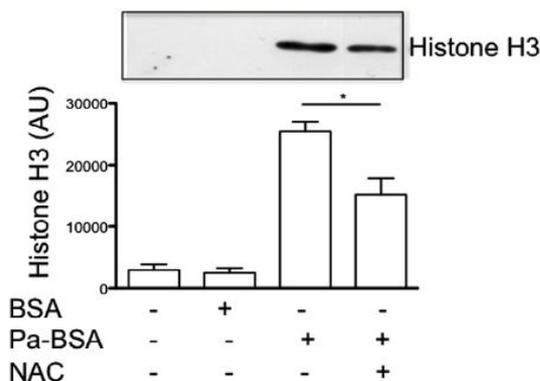
マクロファージ系 cell line の RAW 264.7 細胞をパルミチン酸 (Pa-BSA) で刺激すると、パルミチン酸の濃度依存性に核内タンパク質ヒストン H3 が細胞外へと放出された(下図)。



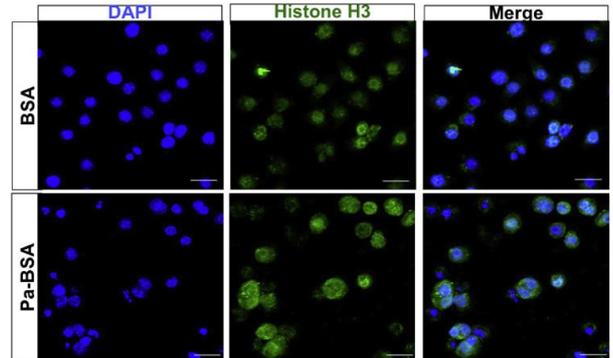
このパルミチン酸刺激に伴い、RAW 264.7 細胞内では H₂DCFDA 蛍光が増強し、細胞内で活性酸素種が増加していると考えられた(下図)。



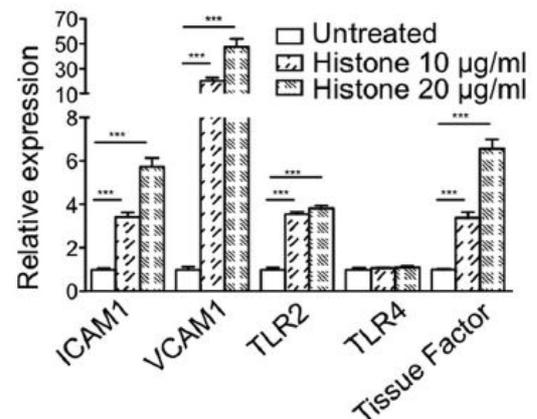
さらに、抗酸化剤の一種である N-アセチルシステイン (NAC) を用いて活性酸素種の作用を抑制すると、ヒストン H3 の細胞外への放出が減少したことから、パルミチン酸刺激に伴うヒストン H3 の細胞外への放出のメカニズムとして、活性酸素種が関わっていることが示唆された(下図)。



次に、免疫細胞化学的検討を行ったところ、パルミチン酸刺激に伴い、ヒストン H3 が核内から細胞質へと移行している像が確認された(下図)。この細胞質へと移行したヒストン H3 が、その後、細胞外へと放出されているのではないかと考えられる。

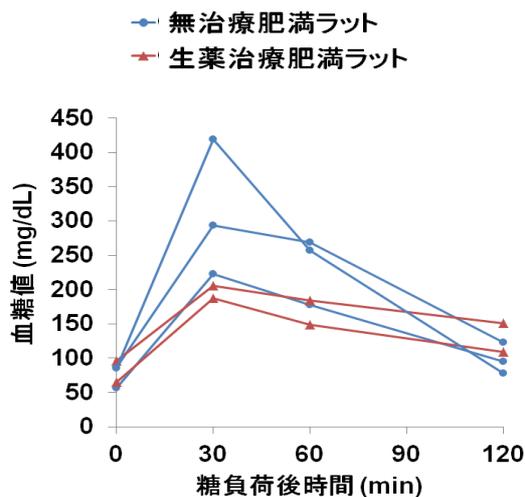


マクロファージ系の細胞から放出されたヒストンは、血管内皮細胞などの周囲の細胞に働きかけると、炎症性的変化や易血栓性的変化を引き起こす。ヒト臍帯静脈内皮細胞をヒストンで刺激すると、下図のように、接着因子 ICAM-1 や VCAM-1 の発現が数倍から数十倍にまで増加し、また、凝固反応の引き金となる tissue factor の発現も数倍に増加する。



我々は、平成 24 年度までの研究において、涼寒性食品の成分が、血小板凝集を抑制すること、抗糖尿病薬ピオグリタゾンと同様に核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) を活性化することを明らかにしてきた。本年度はその効果を *in vivo* で検討するため、過食により肥満・糖尿病を自然発症するラット ZDF/CrI CrIj-*leprfa/Leprfa* に、6 週齢より涼寒性食品成分を約 3 g/kgBW/day 摂取させた。涼寒性食品成分を摂

取させたラットでは、糖尿病初期と考えられる9週齢でのブドウ糖腹腔内負荷試験において、下図のように、ブドウ糖負荷30分後の血糖のピークが抑制される傾向にあった。しかしながら、涼寒性食品成分が有効な個体とそうでない個体があり、全体としては有意な改善効果を示すには至らなかった。



また、糖尿病性腎症の合併を調べるため、糖尿病が進行した16週齢において、24時間蓄尿検体での尿中アルブミン定量検査を行ったところ、ブドウ糖負荷試験において涼寒性食品成分が有効で、血糖のピークを抑制できたラットについては、尿中へのアルブミンの漏出も少なく、糖尿病性腎症の進行を抑制していると考えられた。一方、血糖のピークを抑制できていないラットについては、尿中へのアルブミンの漏出も改善することができなかった。

T-TASを用いた血栓形成能の解析では、今回用いた肥満・糖尿病ラットは痩せ型コントロールラットと比較して血栓形成能の亢進状態を確認することができなかったため、涼寒性食品成分を摂取することによる改善効果を評価することはできなかった。しかしながら、少なくとも、涼寒性食品成分を摂取しても、血栓形成能が大きく低下したり亢進したりすることはなかった。

D. 考察

平成25年度の研究では、メタボリック症候群における自然炎症や血栓症の分子細胞メカニズムを明らかにすべく、*in vitro*ならびに*in vivo*の検討を行った。その結果、高脂肪食の摂取もしくは飽和脂肪酸の負荷により、マク

ロファージ系の細胞から核内タンパク質ヒストンが細胞外へと放出され、これが damage-associated molecular patterns (DAMPs) として作用し、血管内皮細胞などの周囲の細胞を活性化して、炎症性変化や血栓形成を助長し、メタボリックストレス下での自然炎症や血栓症の病態基盤となっている可能性が示唆された。涼寒性食品成分を摂取させることによって、メタボリック症候群ラットの病態は改善する傾向にあったが、この涼寒性食品成分の効果が、ヒストンの細胞外への放出を抑制することによるのかどうかは現在検討中である。

E. 結論

メタボリックストレスを受けた細胞からは、核内タンパク質ヒストンが細胞外へと放出され、これが自然炎症や血栓症の誘因となり、メタボリック症候群の病態を形成している可能性が示唆された。また、涼寒性食品成分はこの病態を軽減する可能性が示唆された。涼寒性食品成分の作用メカニズムについては、今後も解析を続けていく予定である。

F. 健康危険情報

当該研究に関わる人員に、健康被害は認められなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Saturated fatty acid palmitate induces extracellular release of histone H3: A possible mechanistic basis for high-fat diet-induced inflammation and thrombosis. Shrestha C, Ito T, Kawahara KI, Shrestha B, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Maruyama I. *Biochem Biophys Res Commun.* 437: 573-578 (2013).
- Preventive effects of Morus alba L. anthocyanins on diabetes in Zucker diabetic fatty rats. Sarikaphuti A, Nararatwanchai T, Hashiguchi T, Ito T, Thaworanunta S, Kikuchi K, Oyama Y, Maruyama I, Tancharoen S. *Exp Ther Med.* 6: 689-695 (2013).

- 伊藤 隆史「PAMPs /DAMPs のセンサー細胞としてのマクロファージ・樹状細胞」別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患、丸山 征郎 編集、北隆館、84-89 頁、2013 年
- 伊藤 隆史「メタボリックストレスと自然炎症」Thrombosis Medicine、第 4 巻、第 2 号、52-55 頁、2014 年

2. 学会発表

日本血栓止血学会学術集会にて発表予定

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし