

茶葉含有テオフィリンによる脂肪細胞の抗炎症効果の検証と

分子機構の解明

【助成対象者】

信州大学 先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所

三谷 墓一

【共同研究者】

信州大学農学研究科

片山 茂

【研究の目的】

脂肪組織から分泌される炎症性の生理活性物質（炎症性アディポカイン）の一種である IL-6 は、2型糖尿病や動脈硬化症そして認知症といった疾病に関わる鍵因子である。そこで申請者は、脂肪細胞での IL-6 の発現・分泌を抑制すれば、2型糖尿病をはじめとした疾病を予防・改善できるのではないかと仮説を立てた。申請者は予備実験において、茶葉に含まれる苦み成分のテオフィリン（1,3-dimethylxanthine）が脂肪前駆細胞の IL-6 の発現を抑制することを見出しているが、その分子機構は未だ不明である。そこで、本研究では、茶葉由来のテオフィリンが IL-6 の発現を抑制する分子機構を解明し、テオフィリンによる IL-6 の発現抑制を介した生活習慣病の予防・改善を目的とする。

【研究の成果】

1：テオフィリンによる IL-6 分泌抑制の分子機構の解析

脂肪前駆細胞からの IL-6 の分泌・発現に関しては、脂肪細胞へと分化するマウス線維芽細胞(3T3-L1)を使用した。まず初めに IL-6 の分泌が脂肪細胞への分化段階によって変化するのかを経時に解析した。分化誘導剤（インスリン、デキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチン）を用いて 3T3-L1 細胞を 6 日間脂肪細胞へと分化誘導したところ、分化開始 24 時間で IL-6 の分泌がピークに達し、それ以降の分泌は低値を示した。そこで、分化誘導 24 時間での IL-6 の遺伝子発現量に及ぼすテオフィリンの影響を qPCR 法で解析した結果、分化誘導によって増加した IL-6 の遺伝子発現量をテオフィリンは 100 nM という低濃度で抑制した。3 つの分化誘導剤のうち何が IL-6 の発現に関与しているのかを検証する為に各分化誘導剤を個々に 3T3-L1 細胞に処理したところ、合成グルココルチコイドであるデキサメタゾンによって IL-6 の発現量は増加し、テオフィリンはデキサメタゾン誘導による IL-6 の発現増加を抑制した。テオフィリンが IL-6 の遺伝子発現量を抑制したことから、テオフィリンは IL-6 の発現に関与する転写因子に影響を及ぼしていることが示唆された。そこで IL-6 のプロモーター領域に結合する転写因子を MAPPER2 で解析した結果、CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBPs)を見出した。C/EBP ファミリーには α 、 β 、 δ 型が存在し、その内テオフィリンは C/EBP δ の遺伝子発現量を抑制した。デキサメタゾンは核内受容体の一種であるグルココルチコイド受容体 (GR) のリガンドとして機能し、C/EBP δ は GR の標的遺伝子であることが知られている。テオフィ

リンはGRのタンパク質発現量には影響を示さないものの、GRの転写活性を抑制した。つまりテオフィリンはGRの発現量とは別の経路でGRの活性を抑制していることが示唆されたので、テオフィリンによるGRの細胞内局在の変化を解析した。デキサメタゾンによってGRは核内に集積したが、テオフィリンを同時に処理することでGRの核内蓄積は減少した。以上のことから、テオフィリンはGRの核内移行を抑制することでGRの転写活性を低下させ、下流のC/EBPδの発現を抑制すると考えられる。その結果IL-6の発現・分泌を減少すると考えられる。

2 : IL-6 分泌抑制に及ぼす構造活性相関

IL-6の発現・分泌抑制に関するテオフィリンの構造活性相関を解析した。テオフィリンはキサンチン骨格の1、3、7位のうち1、3位がメチル基に置換したメチルキサンチン化合物である。他のメチルキサンチン化合物での効果を比較した結果、1位がメチル基置換されていること、そして7位にメチル基等の無極性官能基が置換されていないことがIL-6の分泌抑制に重要であることが示された。さらに、同様の結果がC/EBPδのタンパク質発現量とGRの転写活性の解析でも得られた。テオフィリンによるGRの転写活性の抑制が、テオフィリンとGRとの相互作用によって引き起こされているのかを検討した。テオフィリンにEAH Sepharoseを結合したテオフィリン結合担体を作製し、両者間の相互作用を解析した結果、テオフィリンはGRと相互作用することが示された。一方で、他のメチルキサンチ化合物である1,3,7-trimethylxanthine(カフェイン)ではGRとの相互作用は示されなかった。以上の結果から、テオフィリンは1位のメチル基および7位の極性官能基を介してGRと相互作用することでGRの転写活性を抑制していることが示唆された。

3 : テオフィリン摂取による高血糖状態の改善効果

テオフィリン摂取によって脂肪組織および血中IL-6レベルが低下するのかを個体レベルで検討した。過度な肥満者では血中のグルココルチコイドの高値が認められているため、コルチコステロン(CORT；マウスにグルココルチコイド)を投与した肥満モデルマウスを用いて解析した。6週齢の雄性ICRマウスにCORT含有水(100μg/mL)とテオフィリン混餌食(0.1%w/w)もしくは普通食を6週間自由摂取させた結果、CORTによって血中IL-6濃度および脂肪組織中のIL-6発現量は増加し、テオフィリンを摂取することでCORTによるこれらIL-6レベルの増加は低下することが示された。なお、群間で摂食量に差は無かった。さらに、各群間の空腹時血糖値を比較したところ、対照群(蒸留水、普通食摂取群)では空腹時血糖値が128.7±6.9(mg/dL)であったのに対して、CORT摂取群では188.0±29.3(mg/dL)まで上昇した。一方、CORTとテオフィリンを同時に摂取した群では102.5±16.3(mg/dL)まで改善した。以上の結果から、テオフィリンはグルココルチコイド高値によるIL-6の分泌を抑制することで空腹時の高血糖状態を改善することが示唆された。

【今後の課題】

1 : 組織間クロストークに及ぼすテオフィリンの影響の検討

これまでの実験で個体レベルにおいてテオフィリン摂取が高血糖状態を改善すること、そして血中IL-6濃度を低下することが示された。脂肪細胞由来のIL-6は肝細胞のインスリン抵抗性を惹起す

ることで血糖値の上昇を引き起こすことが知られているが、テオフィリンが脂肪細胞由来の IL-6 分泌を抑制することで肝細胞のインスリン抵抗性を改善しているのかといった組織間クロストークは未だ不明である。そこで、脂肪細胞（3T3-L1）とマウスの肝臓から単離した初代肝細胞を共培養することでテオフィリンが脂肪細胞を介して肝細胞のインスリン抵抗性を改善しているのかを解析する予定である。

2：食餌由来の糖尿病に対するテオフィリンの効果の検証

これまでの実験では、グルココルチコイドを投与した糖尿病モデルマウスを使用していたが、より生活習慣の変化に則した糖尿病の発症に対するテオフィリンの効果を検証する必要がある。そこで、食餌由来の糖尿病を発症しやすい TSOD マウスを用いてテオフィリンの長期摂取が血糖値、血中 IL-6 レベルに及ぼす効果を解析することを考えている。

3：脂質形成と脂質分解に及ぼすテオフィリンの影響の解析

マスウを用いたこれまでの実験において、テオフィリン摂取によって脂肪重量の増加が抑制されることが示された（他臓器の重量への影響は無かった）。この結果から、テオフィリンは脂肪細胞からの IL-6 の分泌抑制だけでなく、脂肪細胞における脂質形成の抑制、中性脂肪の分解・酸化の亢進に関与すると考えられる。そこでテオフィリンを添加した 3T3-L1 細胞を用いて脂質形成と脂質分解に関わる遺伝子の発現パターンが変化するのか、変化するならばその分子メカニズムの解析を進める考えている。

4：IL-6 誘導性の認知機能低下に対するテオフィリンの効果への展開

IL-6 は肝細胞のインスリン抵抗性の惹起に関与するだけでなく、他の疾患の発症にも関与する。特に超高齢社会である我が国では避けられない認知症の発症にも関与することが報告されている。そこで、老化促進モデルマウス（SAM）にテオフィリンを長期間摂取させることで、加齢に伴う認知機能の低下が抑制もしくは改善されるのかといった研究への展開を考えている。学習・記憶に対する検証方法は Y 迷路、バーンズ迷路、受動回避学習テストを行う考えている。

【本研究に関する主な発表論文、投稿等】

Mitani T, Takaya T, Harada N, Katayama S, Yamaji R, Nakamura S, Ashida H., Theophylline suppresses interleukin-6 expression by inhibiting glucocorticoid receptor signaling in pre-adipocytes. (2018) *Arch Biochem Biophys.* 646:98-106.