

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11389

研究課題名（和文）脂肪細胞分化および機能に対する加圧ストレスの効果の解明

研究課題名（英文）The effects of mild pressure stress on adipocyte differentiation and function.

研究代表者

宮本 理人（Miyamoto, Licht）

神奈川工科大学・健康医療科学部・准教授

研究者番号：60456887

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々は3T3-L1細胞において、極めて軽度の加圧ストレスが分化を抑制することを世界で初めて見出した。このとき、脂肪分化に関わる一部の因子においては発現量低下が認められたが、脂質合成系に対する抑制作用および、脂肪酸酸化系に対する亢進作用は認められず、脂質代謝系に作用して中性脂肪を減らすのではなく、細胞分化自体が抑制されていることが確認された。さらに、このとき少なくとも2種類のストレス応答性分子に関して活性変化を示唆する結果が得られ、阻害実験により、そのうちの1分子に関して、分化抑制作用の明らかな軽減が観察され、圧力変化を媒介し、脂肪細胞分化を制御する上流因子の一つであることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、トレーニング領域などで臨床応用の進む、「加圧」が直接的に細胞分化を制御しうるということが解明され、これまで注目されることの殆どなかった細胞分化、組織・臓器分化に注目した、安全性、有用性、双方の観点からのさらなる研究の必要性が明らかとなった。本研究は軽度加圧培養の再生医療、細胞治療へのさらなる応用の可能性をも示唆しており、産業、医療への応用につながることを期待される。さらに、肥満での脂肪組織内でおこる機械的ストレスとの類似性から、病態生理学的な意義との関連についても今後検討を進めたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：We found for the first time in the world that mild pressor stress suppressed differentiation in 3T3-L1 cells. Although the expression levels of some factors involved in adipogenesis were decreased, neither lipid synthesis nor fatty acid oxidation was enhanced, indicating that cell differentiation itself was inhibited rather than triglycerides being reduced by lipid metabolism. Furthermore, at least two stress-responsive molecules were found to have altered activity, and inhibition experiments showed a clear reduction in the differentiation inhibitory effect of one of these molecules, strongly suggesting that it is one of the upstream factors that mediates pressure changes and regulates adipocyte differentiation.

研究分野：薬理学、生理学、運動生理学

キーワード：脂肪細胞分化 加圧ストレス 脂肪細胞 細胞分化 3T3-L1細胞 トレーニング ストレス応答 再生医療

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

後述するように、トレーニング領域における「加圧」の応用は広まりつつあるが、手法は多岐にわたり、しばしばその作用の根拠として説明される酸素状態の変化(低酸素状態もしくは酸素分圧増大)などには一貫するものが少なく、その科学的根拠は脆弱である。臨床的に加圧ストレスの応用が広まるのに対し、加圧ストレスが細胞や生体に対して与える直接的な影響は殆ど解明されていない。加圧培養による骨分化促進(JCB, 2009)など、細胞分化への影響が近年示唆され、加圧培養技術の再生医療、細胞治療への応用が期待され始めている。

このような各種の「加圧」下での身体運動により効率的に体脂肪率の低下が生じるとされること、また、肥満時に生じる脂肪細胞の肥大化により、生理学的に加圧ストレスと類似の機械的圧ストレスが脂肪組織内で生じることなどから、我々はこれまで殆ど注目されていない、加圧ストレスそのものが細胞や組織に与える影響、特に生理学的意義が明快と思われる脂肪細胞の分化ならびに機能に対する影響を解明したいと考えた。脂肪細胞は代謝疾患の発症ならびに治療において重要な標的の一つであり、メタボリックシンドロームや肥満の病態および治療を考える上で重要であるだけでなく、脂肪移植は申請者らが過去病態研究に取り組んだ脂肪萎縮症の唯一の根本治療法となりうるため、稀少疾患に対する再生医療の観点からも将来的意義が大きいと考え、本研究計画を立案、遂行した。

2. 研究の目的

本研究では、加圧ストレスが生体に与える影響を解明し、将来的にメタボリックシンドローム、肥満などの代謝疾患予防、治療戦略の立案および再生医療などへ活かすための基盤となる知見を得ることを目的に、細胞レベルでの加圧ストレスの直接的効果の解析を行う。

本研究では過去の基礎的知見が豊富かつ比較的扱いが容易でありながら、代謝疾患や脂肪萎縮症の予防、治療への応用が期待できる脂肪細胞に着目し、細胞分化および、脂質代謝を中心とするエネルギー調節系や内分泌機能などの細胞機能に対する加圧ストレスの直接的な影響とその分子メカニズムを明らかにすることを旨とする。

繰り返しになるが、加圧ストレスが細胞に及ぼす直接的な作用は殆ど解明されていないものの、細胞分化に影響を与える可能性が示唆され、いわゆる「加圧」トレーニングなどとは異なるコンセプトにより、再生医療を中心とする疾患予防、治療に役立つと考えられるようになってきた。穏やかな加圧ストレスの細胞に対する直接的影響を検討した研究はこれまでに報告が殆ど無く、また、脂肪細胞に対する研究は皆無であることから、本研究計画では本領域の基盤的な研究として、3年間の間に脂肪細胞の分化と脂質代謝を中心とする細胞機能に対象を絞って主に細胞レベルでの加圧ストレスの直接的効果の解析を行う。

3. 研究の方法

本研究では脂肪細胞分化誘導のモデル系として汎用される、3T3-L1細胞を主に用いる。研究の進展により必要が生じた際はラットもしくはマウス由来脂肪細胞およびstromal vascular フラクション(SVF)、脂肪間質細胞(ASC)などを用いた解析の実施も検討する。

3T3-L1細胞はinsulin, dexamethasone, IBMXなどの試薬の添加により8~12日間ほどで脂肪滴を伴う成熟脂肪細胞様の細胞に分化する。このプロセスはこれまでによく調べられており、分化に対して経時的に責任を担う一連の転写因子が明らかにされている。本研究ではまず、3T3-L1細胞を0.01 MPa程度の緩やかな加圧環境下で培養し、(1)分化誘導刺激後の中性脂肪含量、脂肪細胞マーカー分子(aP2, leptin, adiponectin等)の発現量などを調べることで、加圧ストレスが脂肪細胞の分化に及ぼす影響を明らかにする。この経時変化より、(2)加圧ストレスにより影響を受ける可能性のある分化責任遺伝子群(転写因子)を絞り込み、それらの変化を明らかにする。このとき、(3)脂質代謝制御に関わる因子を同様に解析し、分化と脂質代謝のどちらが変化しているのかを検証する。一方、(4)加圧ストレスによる細胞内情報伝達系への影響をストレス応答性分子に着目してスクリーニング的に解析し、候補となる上流因子(加圧ストレスセンサー分子)を同定する。(5)見出した上流因子に対する阻害剤、ドミナントネガティブ体強制発現、siRNA等を用いた選択的発現抑制などの(1~4)に対する影響を解析し、加圧ストレスが脂肪細胞分化や脂質代謝制御に及ぼす影響の分子メカニズムを包括的に解明する。また、これら解析結果の解釈に影響を与えうる、(6)細胞生存率、細胞増殖率、内分泌機能(アディポサイトカイン)などに加圧ストレスが及ぼす影響も検証し、影響があれば(4-5)と同様のストラテジーにより、その分子メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

(1)

前述のように 3T3-L1 細胞は insulin, IBMX, dexamethasone による分化誘導刺激により、脂肪細胞様の特徴を獲得し、また、その分子プロセスが個体レベルにおける脂肪細胞分化と極めて類似していることから確立された脂肪細胞分化のモデル実験系として汎用されている。3T3-L1 細胞を緩やかな加圧環境下で培養し、分化誘導を行ったところ、分化誘導 4 日目ごろから通常培養下の細胞と培養ディッシュのレベルで形態学的な差異が認められ、12-14 日後にはその差は明らかなものとなった。3T3-L1 細胞分化の評価に汎用される oil red O を用いた染色においても明らかな差異が認められ、緩やかな加圧は 3T3-L1 細胞の分化を抑制するものと考えられた。染色後の oil red O を 2-propanol にて抽出し、吸光度にて定量的評価を行ったところ、14 日目で 30%程度の分化抑制が生じていると推定された。

脂肪細胞分化の主な指標の一つである、細胞数あたりの細胞内中性脂肪含量を定量したところ、分化誘導 4 日目より加圧環境下での培養による低下が認められ、14 日目では 80%近い低下が認められ、脂肪細胞の特徴である中性脂肪の蓄積が加圧培養により著明に低下することが明らかとなった。プレリミナリーに得ていた結果を安定して再現させることに成功し、軽度加圧ストレス負荷による脂肪細胞分化抑制を強く示唆する結果を得た。

(2)

脂肪細胞分化において CEBP β などの一連の転写因子が鍵となることが 3T3-L1 細胞を用いた研究により明らかとなっている。転写因子の作用は一般的に発現量と相関することから、加圧培養によるこれらの因子の発現量に対する作用を経時的に調べたところ、CEBP β の mRNA 発現量は分化誘導 14 日後の時点でやや低下する傾向にあったものの、期間を通して有意な変化は認められなかった。一方、もう一つの脂肪細胞分化を司る代表的因子である PPAR α の発現量を調べたところ、分化誘導 8 日目より明らかな低下が認められた。PPAR α の作用として分化誘導 8 日目は遅いのだが、4 日目には低下傾向が見えており、加圧培養による分化抑制には PPAR α が一定の役割を果たしているものと推測される。

(3)

中性脂肪の蓄積は脂肪細胞の特徴であり、(1)で示したように加圧培養は中性脂肪に関連する指標を低下させることから脂肪細胞分化に対し抑制的に作用するものと考えられる。さらに、形態学的な変化も確認されたことから、分化そのものに対する作用が生じていることが強く示唆されるものの、脂質代謝系への作用の結果を見ている可能性も考えられる。そこで、脂質代謝系への影響を検討した。

脂質合成系の中心的制御を行う因子、SREBP1c の発現量を経時的に検討したところ、加圧培養による変化は認められなかった。さらに、その下流で脂質合成に直接関わる分子の一つである FAS の発現量変化を調べたところ、やはり有意な変化は認められなかった。よって、脂質合成を抑制した結果を観察したものではないと考えられる。一方、脂肪酸酸化を司る代表的酵素である、PPAR α の発現量変化を検討したところ、早い時期より比較的強く抑制されていることが判明した。PPAR α 下流の酵素に関しても同様の変化が認められたことから、脂肪酸酸化は亢進しておらず、むしろ抑制されていることが明らかとなった。いずれにせよ、加圧培養は脂質代謝系に作用して中性脂肪含量を低下させる可能性は低く、(1)で観察された変化は脂質代謝系への作用を介したものではないと考えられた。

(4)

軽度の加圧ストレス負荷による細胞内情報伝達因子の変化を検討したところ、少なくとも 2 種類のストレス応答性分子に関して、活性変化に関連する指標の変化が認められた。そのうち、比較的強い変化が見られた分子に関して、作用を阻害する実験を行ったところ、加圧培養環境下の 3T3-L1 細胞分化の抑制に対する影響はなく、予想に反してその関与の可能性は低いと推測された。一方、他の分子に関して、同様に阻害効果を検証する実験を行ったところ、軽度加圧ストレス負荷による分化に対する抑制的な作用は明らかに軽減された。本分子が加圧ストレスに対するセンサーそのものであるかどうかは明確ではないが、培養における圧力の変化を媒介し、脂肪細胞分化を制御する上流因子の一つであることが強く示唆された。

(5)

これまでの検討結果が細胞の生存率や増殖率の変化を反映している可能性があるため、軽度加圧培養下における細胞生存率、増殖率の変化を検討したところ、観察期間における軽度加圧ストレスによる影響はなく、細胞増殖や細胞死などはこれまでの観測結果に影響を及ぼしていないことが確認された。また、本実験条件により、細胞増殖率の変化や細胞死の増加などが引き起こされないことも確認された。

以上の結果より、自然にも起こりうる、0.01 MPa 程度の極めて軽度の加圧によるストレスが脂肪細胞分化を抑制することが明らかとなり、そこに、PPAR 等の分子が関与することが明らかとなった。本研究により、トレーニング領域などで臨床応用の進む、「加圧」が直接的に細胞分化を制御しうるということが解明され、これまで注目されることの殆どなかった細胞分化、組織・臓器分化に注目した、安全性、有用性、双方の観点からのさらなる加圧ストレスに対する研究の必要性が明らかとなった。本研究は軽度加圧培養の再生医療、細胞治療へのさらなる応用の可能性をも示唆しており、将来的に産業、医療への応用につながることを期待される。さらに、肥満による脂肪細胞肥大化の際に脂肪組織内でおこる機械的ストレスとの類似性から、このような脂肪組織内部では似たようなメカニズムで脂肪細胞分化に対する抑制的な機構が生じている可能性が示唆され、病態生理学的な意義との関連についても今後検討を進めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasumasa Ikeda, Hirofumi Hamano, Yuya Horinouchi, Licht Miyamoto, Tasuku Hirayama, Hideko Nagasawa, Toshiaki Tamaki, Koichiro Tsuchiya	4. 巻 67
2. 論文標題 Role of ferroptosis in cisplatin-induced acute nephrotoxicity in mic	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Trace Elem Med Biol .	6. 最初と最後の頁 126798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtemb.2021.126798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 宮本理人	4. 巻 57
2. 論文標題 スダチの香りが有する抗メタボリックシンドローム作用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 207-209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14894/faruawpsj.57.3_207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsuchihashi Y, Abe S, Miyamoto L*, Tsunematsu H, Izumi T, Hatano A, Okuno H, Yamane M, Yasuoka T, Ikeda Y, Tsuchiya K	4. 巻 17
2. 論文標題 Novel Hydrophilic Camptothecin Derivatives Conjugated to Branched Glycerol Trimer Suppress Tumor Growth without Causing Diarrhea in Murine Xenograft Models of Human Lung Cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Pharm.	6. 最初と最後の頁 1049-1958
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 宮本理人	4. 巻 18
2. 論文標題 手近な汎用機器を活用した映像配信による板書型講義の簡便な遠隔講義実現とその実践	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 大学教育研究ジャーナル	6. 最初と最後の頁 36-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 宮本理人*, 佐藤洋美	4. 巻 140
2. 論文標題 薬学に革新をもたらす最先端技術の世界 ~基礎研究から臨床まで~	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 薬学雑誌	6. 最初と最後の頁 961-962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 宮本理人*, 奥山聡	4. 巻 155
2. 論文標題 ユニークな天然物資源を活かした、地域産業、国際化、医療に貢献する薬理学研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 201-201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 宮本理人*, 阿部真治、根本尚夫、土屋浩一郎	4. 巻 140
2. 論文標題 分岐鎖オリゴグリセロールを用いた難水溶性化合物の親水化技術と医薬品への応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 薬学雑誌	6. 最初と最後の頁 1001-1006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮本理人、土屋浩一郎
2. 発表標題 グルカゴン分泌調節におけるSGLT2とAMPKの役割 - 糖尿病に対する薬物治療の観点から -
3. 学会等名 第94回日本薬理学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮本理人、土屋浩一郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ソフトドリンク技術資料	5. 総ページ数 15
3. 書名 徳島特有の香酸柑橘、すだちによるメタボリックシンドローム改善作用とその分子機構	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	土屋 浩一郎 (Tsuchiya Koichiro) (70301314)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授 (16101)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	土橋 有希 (Tsuchihashi Yuki)		
研究 協力者	庄野 正行 (shono masayuki)		
研究 協力者	常松 保乃加 (Tsunematsu Honoka)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------