

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19919

研究課題名（和文）解糖系振動とレプチン振動による白色脂肪細胞のレプチン分泌メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of leptin secretion mechanisms in white adipocytes by metabolic oscillations

研究代表者

柴田 賢一（Shibata, Kenichi）

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・非常勤教員

研究者番号：90753799

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：白色脂肪細胞はエネルギーを脂肪として蓄え、レプチンなどのホルモンを分泌する。レプチンの異常は肥満や糖尿病の原因になり、詳細な分泌メカニズムの解明は極めて重要である。褐色脂肪細胞は脂肪を消費して体温の産生する事で肥満を改善し、健康状態を改善することが知られる。本研究は、膵臓の細胞と同様に脂肪細胞においてもホルモン分泌と代謝が連結しているという仮説を検証するため、まずは代謝振動を起こし、ホルモン分泌と振動が同期しているかどうかを検証しようとした。本研究ではホルモン分泌との関連性の解明には至らなかったものの、両脂肪細胞とも生体内で起こりうる刺激によって代謝振動を起こすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白色脂肪細胞はエネルギーを脂肪として蓄え、レプチンなどのホルモンを分泌しており、レプチンの異常は肥満や糖尿病の原因になる。また、褐色脂肪細胞は脂肪を消費して体温の産生する事で肥満を改善し、健康状態を改善することが知られる。膵臓の細胞では代謝振動によって効率的なホルモン刺激を実現しており、白色脂肪細胞においても同様の現象が起こっている可能性がある。振動的な代謝はエネルギー産生効率が高い事が予想されているため、褐色脂肪細胞でも代謝振動により効率的な発熱を実現している可能性がある。両細胞において代謝振動の観察に成功したことは、ホルモン刺激や発熱効率を通じて健康状態の改善に貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：White adipose cells store energy as fat and secrete hormones such as leptin. Dysfunctions in leptin can cause obesity and diabetes, and it is important to elucidate the detailed secretion mechanism. Brown adipose cells are known to ameliorate obesity and improve health conditions by consuming fat and producing body heat. To test the hypothesis that hormone secretion and metabolism are linked in adipocytes as in pancreatic beta cells, this study first attempted to generate metabolic oscillations to verify whether the oscillations are synchronized with hormone secretion. Although this study did not elucidate the link between hormone secretion and metabolism, it did show that both adipocytes undergo metabolic oscillations upon stimuli that can occur in vivo.

研究分野：生物物理学

キーワード：白色脂肪細胞 褐色脂肪細胞 代謝振動

1. 研究開始当初の背景

白色脂肪細胞はエネルギーを脂肪として蓄え、飽食ホルモンのレプチンなどを分泌する。白色脂肪細胞は、脂肪-膵島軸と呼ばれる脂肪・膵臓・脳の相互作用を通じて血糖値の調節を担っており(図1)、レプチンの異常は肥満や糖尿病の原因になる[Kalra et al., *Regul Pept* 2003]。更に、妊娠や[Tessier et al., *Placenta* 2013]、がん[Garofalo & Surmacz, *J Cell Physiol* 2006]、心疾患[Sattar et al., *J Am Coll Cardiol* 2009]、アルツハイマー病[McGuire & Ishii, *Cell Mol Neurobiol* 2016]など生命と健康に多大な影響を及ぼすホルモンであり、詳細な分泌メカニズムの解明は極めて重要である。しかし、レプチンは1994年に発見された比較的新しいホルモんで、その分泌メカニズムは十分に解明されていない[Tsubai et al., *Heliyon* 2016]。また、レプチン分泌と解糖系(糖代謝)が連動していることを示唆するデータは散見されるものの、 β 細胞のように解糖系がホルモン分泌と直接連動している可能性は見過ごされてきた。

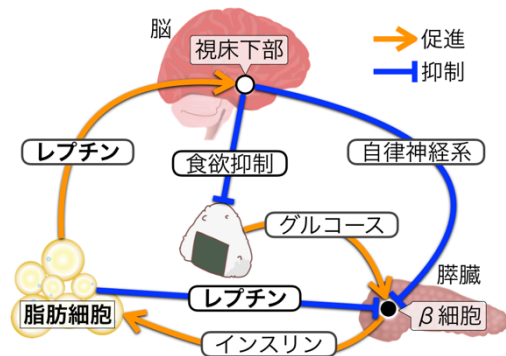


図1 脂肪-膵島軸:①血糖値の上昇により β 細胞がインスリンを分泌。②インスリン刺激によりレプチンが分泌され食欲を抑制。③レプチンが直接または自律神経系を通じてインスリン分泌を抑制。

2. 研究の目的

解糖系がホルモン分泌と直接連動していると仮定すると、代謝振動が起きればレプチン分泌も連動して振動すると予想される(図2)。そこで本研究では、レプチン濃度の時系列変化およびNADHで観測される代謝振動の因果関係を明らかにすることで、レプチン分泌と解糖系の関連性を明らかにすることを目的とした。

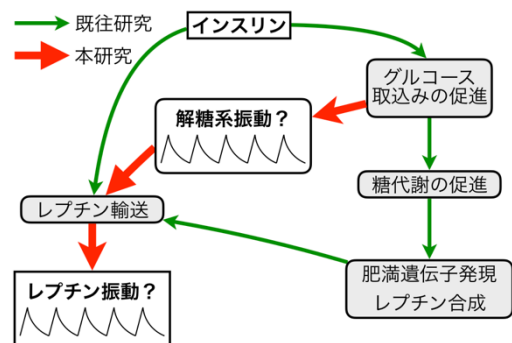


図2 代謝振動とレプチン分泌が連動しているとする本研究の仮説。代謝振動によりレプチン振動が起きるのではないかな。

3. 研究の方法

白色脂肪細胞として、培養方法および白色脂肪細胞への分化方法が確立されているマウス由来線維芽細胞3T3-L1細胞を用いた。申請時には着目していなかったが、後の文献調査で発熱して体温を作る褐色脂肪組織が解糖系を亢進していることが分かったので、3年目からは褐色脂肪細胞C3H10T1/2も新たに用いた。

3T3-L1を白色脂肪細胞へ分化させる方法は確立されていたが、それは表面処理を施したプラスチックシャーレ上のことであって、NADH振動に用いるスライドグラス上ではうまく分化しないことが本研究により判明した。そのため、まず、スライドグラスに各種表面コ

ーティングを施して分化させる方法を検討し、その後、蛍光観察用のプラスチック培養容器を用いて、NADH の自家蛍光以外の方法で代謝振動を観察する方法を検討した。

3T3-L1 と C3H10T1/2 はどちらも分化手法が確立されている。3T3-L1 はインスリン (Ins) 10 μ g/mL と、デキサメタゾン (DEX) 1.0 μ M、3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX) 0.5 mM を用いて白色脂肪細胞へ分化させた。この時、ロシグリタゾンを加えると分化効率が高くなることが知られているため、ロシグリタゾンの有無も検討した。さらに、スライドグラス状では効率よく分化しなかったため、いくつかの培養・分化容器についても検討した。C3H10T1/2 は DEX と、IBMX、Ins、T3、インドメタシン、ロシグリタゾンを含む分化誘導培地に交換し培養し、2 日間の処理後に T3 を含む分化培地へと交換して褐色脂肪細胞へ分化させた。C3H10T1/2 の分化に用いる試薬の濃度は論文ごとに異なるため、これらの濃度についても検討した。C3H10T1/2 を用い始めた段階では、3T3-L1 の研究によって既に効率的な培養・分化容器および蛍光観察手法が確立されていたため、3T3-L1 の培養・分化容器と観察手法を採用した。

グルコース取り込み速度と油滴の蓄積量は、それぞれ 2-NBDG とオイルレッド O で染色し、それぞれ蛍光強度と色素の蓄積量で定量化した。3T3-L1 と C3H10T1/2 における代謝振動の誘発は、それぞれインスリンまたは脂肪酸を用いた。

4. 研究成果

3T3-L1 の分化・蛍光観察手法の検討

標準的な分化手法を用いた場合、シャーレでは良好に分化するものの、NADH 観察に適したスライドグラス上では分化効率が非常に低いことが判明した。そこで、いくつかの代表的なコーティングを施したスライドグラスと、シャーレと同じコーティングをした蛍光観察用 96 ウェルプレートを試したところ、NADH 蛍光観察を用いる限り分化効率と蛍光観察は両立できないことが判明した。そこで、今後は 96 ウェルプレートを培養・分化容器として用いることにした。

表 1 3T3-L1 の培養容器 (表面処理および表面電荷) と分化効率および NADH 観察の可否

培養容器	表面処理	表面電荷	分化効率	NADH 蛍光観察
シャーレ	Nuncion Delta	-	良好	不可
コートなしスライドグラス	なし	-	低効率	良好
MAS コート スライドグラス	MAS	+	分化しない	良好
コラーゲンコートスライドグラス	コラーゲン	不明	分化中に剥離	可能
バニリンコートスライドグラス	バニリン	-	分化しない	良好
96 ウェルプレート	Nuncion Delta	-	良好	再現性が低い

次に、分化処理中にロシグリタゾンを加えると 3T3-L1 の白色脂肪細胞への分化効率が向上することが報告されているため、ロシグリタゾンによる分化効率の向上について検討した。オイルレッド O で染色するとオイルレッド O が油滴に溶解するため、オイルレッド O 含有量を油脂の含有量とすることができる。そこで、オイルレッド O の含有量によって 3T3-L1 の分化効率を定量化した。ロシグリタゾンを加えると目視でも顕微鏡観察でも分かるほ

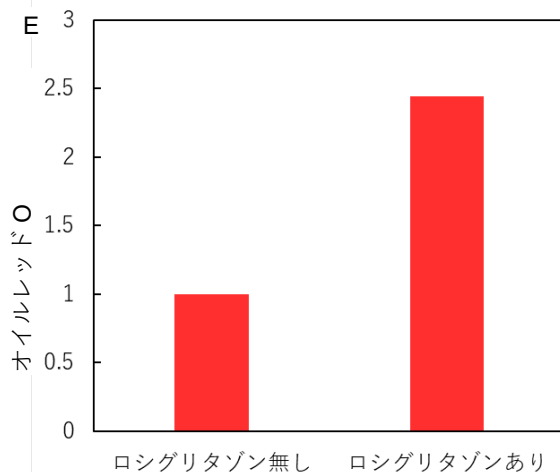
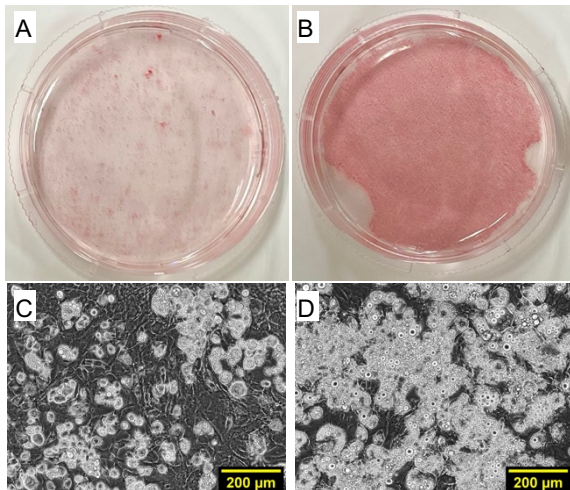


図3 ロシグリタゾンによる分化効率の向上：(上段) 分化処理後の3T3-L1細胞をオイルレッドO染色したもの。(中段) 位相差顕微鏡写真。(A & C) ロシグリタゾンなし。(B & D) ロシグリタゾンあり。(E) 脂質含有量をオイルレッドO含有量として測定(ロシグリタゾンなしを1とした)。

どに分化効率が向上し、オイルレッドO含有量はおよそ2.5倍に増加した(図3)。

インスリン濃度と3T3-L1白色脂肪細胞のグルコース取り込み速度

グルコース取り込み速度が速いほど代謝振動を起こしやすいことが予想されている。そこで、インスリンによって白色脂肪細胞のグルコース取り込み速度を向上させ、代謝振動を起こさせることを考えている。そこで、インスリン濃度とグルコース取り込み速度の関係を検討した。検討した範囲で最もグルコース取り込み速度を記録した100 μg/mLのインスリンを用いることとした(図4)。

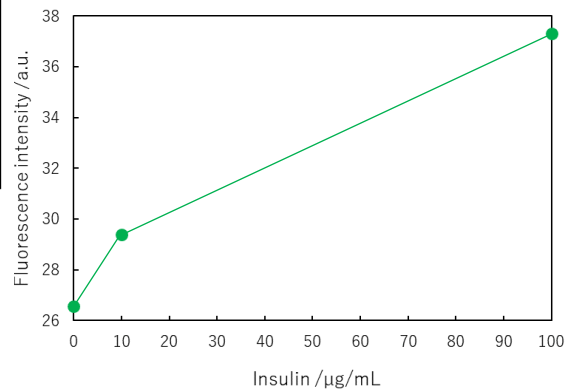


図4 インスリン濃度によるグルコース取り込み速度の違い。グルコース取り込み速度は2-NBDGの蛍光強度として測定した。

白色脂肪細胞3T3-L1の代謝振動

これまで、がん解糖系振動の研究はスライドグラス上で培養したがん細胞をグルコース飢餓処理し、グルコースを加えることで解糖系振動を観察してきた。白色脂肪細胞はインスリンによってグルコース取り込みを大幅に増加させるため、グルコース飢餓せず、グルコース存在下でインスリンを加えることで代謝振動を誘発した。また、NADHの自家蛍光は非常に弱いため、いかに蛍光観察用とはいえプラスチックの自家蛍光が影響して再現性よく観察することができなかつた。そこで、ミトコンドリアの膜電位としても代謝振動を観察できるのではないかと考え、白色脂肪細胞をローダミン123で染色して同様に実験した結果、再現性よく代謝振動を誘発することに成功した(図5)。

褐色脂肪細胞C3H10T1/2の代謝振動

褐色脂肪細胞は脂肪を消費して熱(体温)を産生する細胞である。発熱する直接の仕組みは脱共役タンパク質UCP1に脂肪酸が結合することによって起こる。脱共役が起こると解糖系が亢進し、グルコース取り込み速度が上昇するため、脂肪酸でUCP1を活性化させる

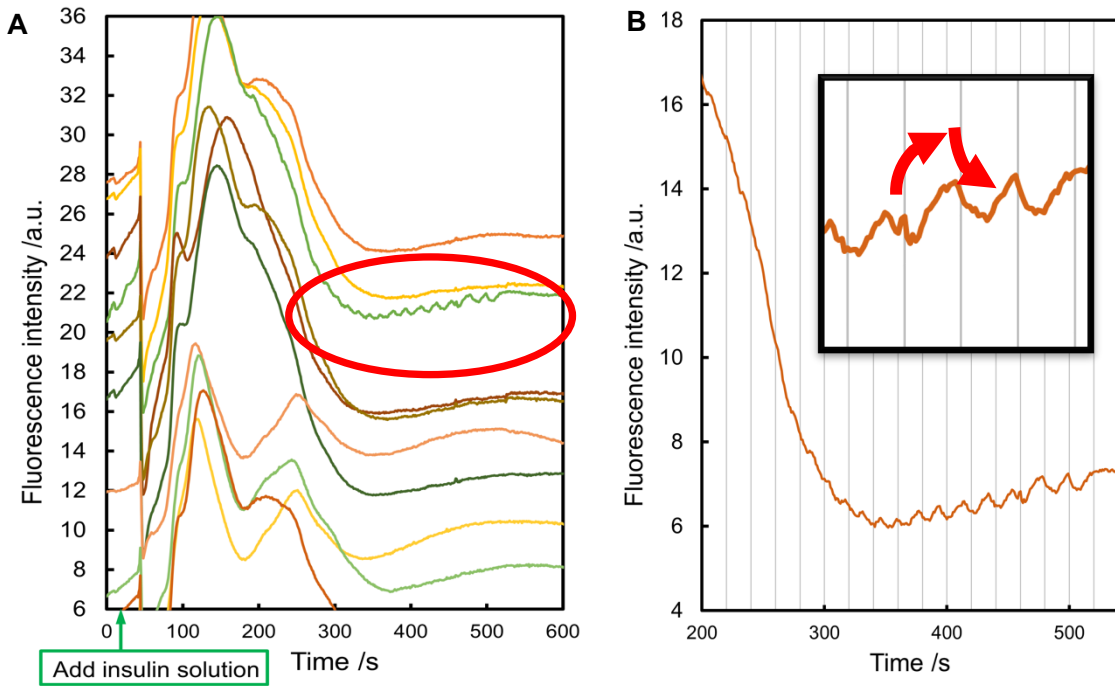


図5 ローダミン 123 の蛍光による白色脂肪細胞 3T3-L1 における代謝振動の観察結果。(A) 膜電位振動として代謝振動の観察に成功した。(B) A の振動している部分の拡大図。

と代謝振動を観察できる可能性がある。そこで、褐色脂肪細胞に分化した C3H10T1/2 にリノール酸を暴露することで UCP1 を活性化させたところ、代謝振動を観察することに成功した (図 6)。

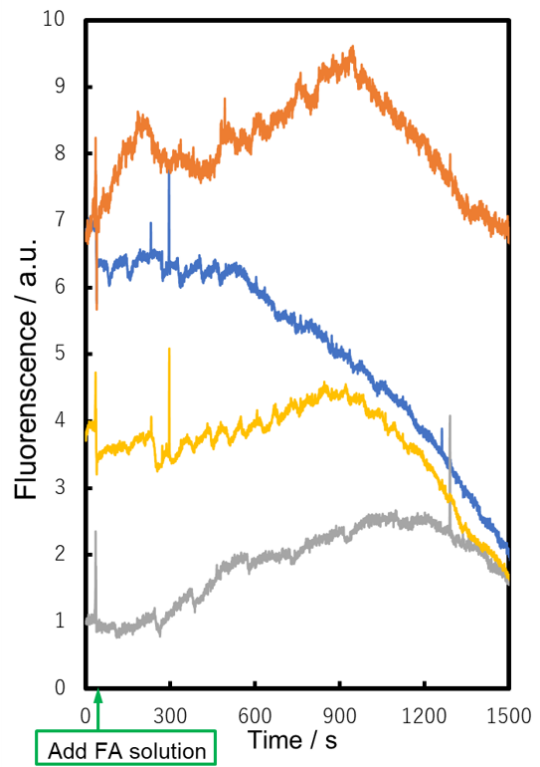


図6 ローダミン 123 の蛍光による褐色脂肪細胞 C3H10T1/2 における代謝振動。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Amemiya Takashi, Shibata Kenichi, Takahashi Junpei, Watanabe Masatoshi, Nakata Satoshi, Nakamura Kazuyuki, Yamaguchi Tomohiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Glycolytic oscillations in HeLa cervical cancer cell spheroids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16454	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 雨宮隆, 柴田賢一, 山口智彦	4. 巻 279
2. 論文標題 今, 数理が面白い-医学・生物学への応用 がん細胞の解糖系振動と悪性度診断への応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 183-187
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 無
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 Amemiya Takashi, Shibata Kenichi, Watanabe Masatoshi, Nakata Satoshi, Nakamura Kazuyuki, Yamaguchi Tomohiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Glycolytic Oscillations in Cancer Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physics of Biological Oscillators	6. 最初と最後の頁 245 ~ 259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-030-59805-1_15	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 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大平泰央, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 がん細胞におけるミトコンドリアを含めた代謝中間体振動モデル
3. 学会等名 第31回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田雅貴, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 解糖系振動におけるミトコンドリアの役割
3. 学会等名 第31回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大沼萌香, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 アストロサイト-ニューロン共培養系における解糖系振動
3. 学会等名 第31回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田優月, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 脂肪細胞の解糖系振動とレプチン振動
3. 学会等名 第31回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤白直人, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 乳がん細胞の解糖系振動
3. 学会等名 第31回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田郁真, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 低酸素誘導因子HIFがヒト子宮頸がんHeLa細胞の解糖系振動へ及ぼす影響
3. 学会等名 第31回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡部颯斗, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 がん細胞の解糖系振動と悪性度の関係解明
3. 学会等名 第32回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田郁真, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 低酸素誘導因子HIFがHeLa細胞の解糖系振動に及ぼす影響
3. 学会等名 第32回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松原亮矢, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 数理モデルを用いたエネルギー代謝機構の分析
3. 学会等名 第32回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平原陸人, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 解糖系振動を用いた褐色脂肪細胞の機能評価
3. 学会等名 第32回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野果鈴, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 内皮由来物質が解糖系振動に与える影響
3. 学会等名 第32回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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

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