

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：10102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10413

研究課題名(和文) 継続的な農薬の投与は脂肪由来幹細胞のキャラクターを変化させるのか

研究課題名(英文) Does continuous exposure to pesticides alter the characteristics of adipose-derived stem cells?

研究代表者

小笠原 準悦 (Ogasawara, Junetsu)

北海道教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：20415110

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)：ヘキサクロロシクロヘキサン(HCH)の投与は、成熟型3T3-L1脂肪細胞にインスリン抵抗性を引き起こし、インスリン基質-1(IRS-1)のセリン307番のリン酸化を介した糖取り込み抑制作用を誘導することを見出した。3T3-L1細胞の分化過程に及ぼす影響について検討したところ、HCHは中性脂肪が顕著に蓄積した成熟型3T3-L1脂肪細胞へと分化させ、脂肪合成酵素群(FAS、ACC)のmRNAとタンパク質の発現を促すことが明らかとなった。さらに、FASの転写を調節するNF- κ BのmRNAとタンパク質の発現は有意に増加し、NF- κ BとFASプロモーターとの結合も有意に増加することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、有機塩素化合物系農薬が脂肪由来幹細胞の質の変化を介して肥満や2型糖尿病を誘導するかにについて検討することであり、従来の脂肪細胞中心仮説だけでは説明できなかった脂肪組織の再構築機構に対して脂肪由来幹細胞の役割を明確にし、農薬が直接的に脂肪由来幹細胞に及ぼす影響について科学的事実の立証を試みる点に学術的独自性がある。さらに、有機塩素化合物系農薬が細胞のキャラクター決定過程(分化過程)に及ぼす影響について従来に無い新しい情報を提供し、白色脂肪細胞の分化を調節する外因性物質の検索に対しても応用が期待できる。加えて、改めて農薬による害について明確にできる点において、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：It has shown that addition of hexachlorocyclohexane (HCH), one of a persistent organic pollutant, to 3T3-L1 adipocyte induces insulin resistance through phosphorylation of IRS-1 at Ser307, which has been shown to negatively regulate insulin signaling. Moreover, it has demonstrated that adding HCH to 3T3-L1 preadipocyte produces matured adipocyte which accumulates excess TG into the cell, thereby increase in the levels of both FAS and ACC proteins. Under this condition, it has observed that significant increase in binding both NF- κ B and FAS promoter region which is accompanied by a significant augmentation of NF- κ B mRNA and protein, suggesting that HCH would be associated with progression of type2 diabetes mellitus via induction of insulin resistance.

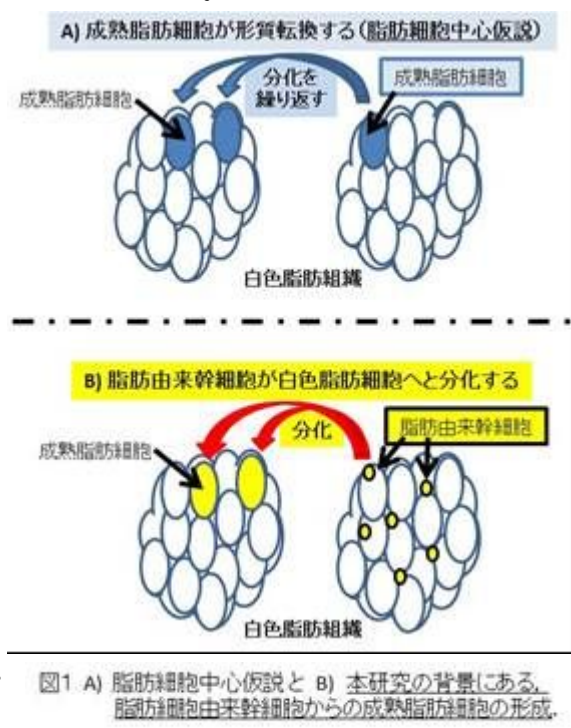
研究分野：衛生学

キーワード：脂肪由来幹細胞 インスリン抵抗性 3T3-L1細胞 農薬 細胞分化能

1. 研究開始当初の背景

近年、2型糖尿病罹患者の割合は世界レベルで爆発的に増え続けている。この現象は特に発展途上国で増加していることが報告されている (JAMA. 310:948-959, 2013; J Diabetes. 11:522-539, 2019)。これまで、2型糖尿病のほとんどは主に摂取エネルギー過多による肥満に由来すると理解されてきたが、抗肥満作用を有する善玉アディポカインであるアディポネクチンの遺伝子変異によって誘導されることや (Hum Mol Genet. 23: 1108-1119, 2014; Cardiovasc Diabetol. 15:17, 2016)、残留性のある難分解性有機汚染物質への暴露によっても誘導される事実 (Environ Health Perspect. 118:1235-1242, 2010; Environ Health Perspect. 121:153-161, 2013) が次々と明らかとなり、2型糖尿病はこうした複合的な作用により表現化されることがわかってきた。難分解性有機汚染物質の中でも、特に農薬は、農作物の生産性の向上や農作業労働力の軽減のために用いられてきた歴史を持ち、現在もなお脈々と使用されている。しかしながら、農薬には土壤残留性が高いものが多く、がんや呼吸器疾患をはじめとする様々な病態の発症に関係することが報告されており (Cancer Causes Control. 28:177-190, 2017; J Environ Sci (China). 51:361-370, 2017)、使用に際してはもろ刃の剣の様相を呈する。興味深い事に、殺虫剤として利用されてきた有機塩素化合物系農薬であるジクロロジフェニルトリクロロエタン (DDT) の白色脂肪細胞株への添加は、前駆脂肪細胞を肥大化した脂肪細胞へと分化させることが報告されており (Biochem Pharmacol. 63:997-1007, 2002; Pestic Biochem Physiol. 131:40-45, 2016)、これは DDT への暴露が前駆脂肪細胞の分化能へも影響を与えることを示唆している。

白色脂肪組織は主に成熟脂肪細胞や脂肪由来幹細胞から形成されている。脂肪由来幹細胞は間葉系幹細胞に分類され、脂肪細胞や血管内皮細胞、筋芽細胞などに分化しうる多能性細胞である (Biochim Biophys Acta. 1851:686-696, 2015, Int J Mol Sci. 5:20, 2019)。近年、脂肪由来幹細胞は白色脂肪組織の再構築機構に重要な役割を果たすことが示され (Nature. 453:783-787, 2008)、内外の因子によって脂肪由来幹細胞に何らかの異常が生じた場合には正常な機能をもつ脂肪細胞は補填されなくなり、結果的に白色脂肪組織内に異常な形質をもつ脂肪細胞が蓄積されることが想定されている (Int J Obes (Lond). 43:1256-1268, 2019)。こうした脂肪由来幹細胞の形質変換による脂肪組織の質の変化は、従来の成熟脂肪細胞の形質転換のみにより白色脂肪組織の形質を維持するという学説 (脂肪細胞中心仮説) (図 1 A) では説明できない。仮に農薬が脂肪由来幹細胞の遺伝子発現プロファイルに固有の変化を惹起した場合には、その変化を反映した成熟脂肪細胞が白色脂肪組織内に多く発現し、表現型や生体へも影響を与えるとも考えられる (図 1 B)。我々はすでに、有機塩素化合物系農薬であるヘキサクロロシクロヘキサン (HCH) を成熟型の 3T3-L1 脂肪細胞に添加することにより、活性酸素が産生著しく亢進し、インスリン刺激による糖の取り込みは有意に抑制されたインスリン抵抗性が生じることを見出している (Jpn J Clin Ecol 29: 45-59, 2021)。この結果は、有機塩素化合物系農薬が脂肪由来幹細胞の持つキャラクター決定能に影響を与える可能性を示唆している。



2. 研究の目的

本研究の目的は、有機塩素化合物系農薬が脂肪由来幹細胞の質の変化を介して肥満や 2 型糖尿病を誘導するかについて検討することである。

本研究では主として以下の 3 点を通じて、白色脂肪由来幹細胞の細胞形質の決定過程 (分化過程) に及ぼす有機塩素化合物系農薬の影響について検討することを目的とする。

- (1) 農薬の投与による個体の表現型の解析と、投与動物から単離した脂肪由来幹細胞における分化マーカーと脂質代謝関連分子の発現解析、ならびに新規ターゲット分子の検索。
- (2) 脂肪由来幹細胞の初代培養を通じた新規ターゲット分子の生理作用の解析。
- (3) 上記(1)(2)の結果を擬態した 3T3-L1 細胞株を利用した分子メカニズムの解明。

3. 研究の方法

【脂肪由来幹細胞の初代培養による検討】

1. コントロールマウスから単離した脂肪由来幹細胞を初代培養し、コントロール群、HCH 添加群、HCH/NAC 添加群の 3 群を作成し *in vitro* の系による検討を行うとともに、初年度の *in vivo* の結果と比較検討する。
2. 上述の 3 群の細胞を用いて、同定したターゲット分子の脂肪由来幹細胞内での挙動を共焦点レーザー顕微鏡と免疫組織化学法を用いて解析し（ウエスタンブロット法による確認も含む）、生理作用について検討する。

【株化細胞への擬態を介した *in vitro* の解析によるメカニズムの検討】

1. 同定したターゲット分子を確定するために、候補分子に対するプラスミッドベクターを構築し 3T3-L1 前駆脂肪細胞に遺伝子導入する。このとき、ターゲット分子の siRNA を導入した細胞も作成し、ターゲット分子の作用について広範なデータを取得する。いずれの細胞も免疫蛍光法によるタンパク質の発現解析を行う。遺伝子導入がうまく行かない時は、不活化センダイウイルスを用いた試薬を使用して遺伝子導入の向上に努める。
2. 分化マーカーの転写調節因子としての作用を検討するために、クロマチン IP 法とゲルシフト法を用いてターゲット分子のプロモータ領域への結合について検討する。DNA アレイの解析によってターゲット分子と関連する分子とのパスウェイ解析が可能であることから、新規のシグナル伝達経路を同定し、*in vitro* タンパク質発現系で標的タンパク質を複製し、試験管内での結合を評価することによって分子間相互作用を検討する。

4. 研究成果

有機塩素化合物系農薬であるヘキサクロロシクロヘキサン（HCH）の投与は、成熟型 3T3-L1 脂肪細胞にインスリン抵抗性を引き起こすことを見出した。この状況下では、インスリン基質-1（IRS-1）のセリン 307 番のリン酸化を介した糖取り込み抑制様相が誘導されることが明らかとなった。加えて、マウスへの継続的な投与によって血中インダシスの変化が観察され、インスリン抵抗性を惹起し、HCH の投与群では対照群と比較して 8 週目までは体重が有意に低下するものの、その後は体重が有意に増加することを観察した。鼠径部の白色脂肪組織量と後腹壁白色脂肪組織量も有意に増加した。一連の結果は、成熟型脂肪細胞のインスリン抵抗性に加えて脂肪由来幹細胞にもキャラクター変化が生じることを示唆している。そこで、3T3-L1 の成熟型への分化過程に HCH を投与して検討したところ、対象群と比較して HCH の添加により細胞内の中性脂肪が顕著に蓄積した成熟型 3T3-L1 脂肪細胞へと分化し、この状況下では脂肪合成酵素群（Fatty Acid Synthase :FAS, Acetyl-CoA Carboxylase: ACC）の mRNA とタンパク質の発現が促されることが明らかとなった。特に、FAS の転写を調節する NF-YA の mRNA とタンパク質に発現が有意に増加し、NF-YA と FAS プロモーターとの結合も有意に増加することが明らかとなった。本研究の結果から、HCH は 2 型糖尿病の一因である肥満化した白色脂肪細胞を生み出し、成熟型脂肪細胞に至ってはインスリン抵抗性を惹起することが示された。開発途上国で増えている 2 型糖尿病患者数の増加には、一部、HCH を代表とする農薬の摂取による影響も関与しているものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Osawa S, Kato H, Maeda Y, Takakura H, Ogasawara J, Izawa T	4. 巻 22
2. 論文標題 Metabolomic Profiles in Adipocytes Differentiated from Adipose-Derived Stem Cells Following Exercise Training or High-Fat Diet	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 966
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22020966	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 Amire A, Ogasawara J, Shirato K, Yoshida T	4. 巻 29
2. 論文標題 The 7-days-exposure to gammahexachlorocyclohexane causes resistance to insulin in differentiated mature 3T3-L1 adipocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Ecology	6. 最初と最後の頁 45-59
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小笠原準悦、白土 健、井澤鉄也
2. 発表標題 継続的な走運動トレーニングは肩甲部褐色脂肪組織量の低下を促す
3. 学会等名 第93回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白土 健、春日啓介、小笠原準悦、高成 準、石井晴之、木崎節子、苅田香苗
2. 発表標題 アスパラガス茎抽出物はニゲリシンによるマクロファージのIL-1 分泌誘導を軽減する
3. 学会等名 第93回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ken Shirato, Jun Takanari, Junetsu Ogasawara, Takako Kizaki
2. 発表標題 ETAS@50 suppresses SARS-COV-2 spike protein-induced pro-inflammatory responses in murine peritoneal exudate macrophages
3. 学会等名 The 30th Annual Meeting of International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小笠原準悦、アリムアミラ、白土 健、吉田貴彦
2. 発表標題 3T3-L1脂肪細胞のキャラクターはヘキサクロロシクロヘキサンにより変化する
3. 学会等名 第92回日本衛生学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小笠原準悦、アリムアミラ、吉田貴彦
2. 発表標題 小児期からの継続的な農薬への暴露が引き起こす白色脂肪細胞の生理応答変化
3. 学会等名 北海道学校保健学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ken Shirato, Keisuke Kasuga, Junetsu Ogasawara, Jun Takanari, Haruyuki Ishii, Takako Kizaki, Kanae Karita
2. 発表標題 Suppressive effect of ETAS@ on NLRP3 inflammasome activation in macrophage
3. 学会等名 The 31th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小笠原準悦、アリムアミラ、吉田貴彦
2. 発表標題 ヘキサクロロシクロヘキサンが導く3T3-L1脂肪細胞のインスリン抵抗性
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小笠原準悦、井澤鉄也	4. 発行年 2023年
2. 出版社 市村出版	5. 総ページ数 224
3. 書名 スポーツ指導者に必要な生理学と運動生理学の知識	

〔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