

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500539

研究課題名(和文) 培養心筋細胞機能発現に及ぼす培地内必須脂肪酸の重要性に関する革新的研究

研究課題名(英文) Effects of polyunsaturated fatty acids in medium on cultured cardiomyocyte function

研究代表者

中村 孝夫 (NAKAMURA, Takao)

山形大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00142654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまず胎児群、新生児群及び培養群の3群間の心筋細胞内脂肪酸含有量の比較検討を行い、培養系では新生児群に比して多価不飽和脂肪酸が著しく低値であるとの結論を得た。次に不足が示唆されたn-3系及びn-6系脂肪酸の培地内添加について、アルブミン結合体としての添加が細胞内取込みに優れていることを見出すとともに、取り込まれた脂肪酸の伸長反応が示唆され、拍動特性が3倍程度にまで向上できることを確認した。今後は添加脂肪酸の最適化を進める必要がある。

研究成果の概要(英文)：Fatty acid (FA) compositions in fetal, neonatal, and cultured cardiomyocytes (CMs) were evaluated and compared to each other. The results suggest that cultured CMs have considerably lower amount of polyunsaturated FAs (PUFAs) than neonatal ones do. Thus, we added some PUFAs, which were combined with albumin, into medium, and found that FAs were successfully incorporated in CMs, that FA elongation may have taken place, and that the beating performance was tripled. In the next stage, FAs to add should be optimized to gain the best mechanical performance.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：心筋細胞 培養 多価不飽和脂肪酸 ラット

1. 研究開始当初の背景

我々は心筋細胞を用いた組織工学的手法によって *in vitro* (生体外) での培養人工心室の構築を目指しているが、他の研究者と同様に、本研究開始当初でも解決すべき問題はまだ山積していた。すなわち *in vitro* 細胞培養環境では、培養細胞は *in vivo* (生体内) の心筋細胞に比較して、マクロ的な力学的性質からミクロ的な分子生物学的性質まで、多くの点で著しく劣っていることが指摘されており (例えば Nakamura et al., *J. Artif. Organs*, 2008; 11: 134-140) それを解決する手段として、遺伝子の導入など種々の試みがなされてきているが、暗中模索の状態が続いていた。

一方で我々は、糖代謝における脂肪酸の役割に関する研究を別途進めてきていたが、その過程で、特に必須脂肪酸である n-3 及び n-6 系多価不飽和脂肪酸の重要性が次第に明らかになってきた (例えば佐藤他、第 23 回生体・生理工学シンポジウム論文集、355-356、2008)。ところが極めて不思議なことに、組織工学的研究に限らず、これまでの細胞培養系培地には添加血清中に含まれる僅かな脂質以外の脂質は添加されていなかった。

特に心筋細胞でのエネルギー需要は、*in vivo* では主に脂質であるのに対し培養細胞ではほとんどが糖質であるとの指摘もあって (Neely and Morgan, *Annu. Rev. Physiol.* 1974; 36: 413-459 及び Suzuki et al., *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1997; 33: 595-598) このことが貧弱な機能発現に大きく関係していることが予想された。

脂質を構成する脂肪酸の中でも特に細胞内で生成できない必須脂肪酸は、*in vivo* において極めて多様で重要な役割を有している。例えば細胞膜を構成する主成分の一つであるばかりでなく、細胞受容体のリガンドになり、遺伝子を制御し、病態の制御を行い、エネルギーを供給しており (例えば Nagao and Yanagita, *Prog. Lipid Res.* 47, 123-146, 2008) 人工的細胞培養下といえども、正常な細胞機能発現のためには到底無視できない存在と考えられるが、水溶性培地中の脂質の取扱いが難しいことなどから、これまではほとんど検討されてきていなかった。

研究開始当初までには、アルブミンと結合させた脂肪酸を直接的に培地に添加するこ

とはもとより、細胞膜上の脂肪酸トランスポータの転位を増加させて脂質の取り込みを亢進させる物質が、例えばジピリダモールを初めとして見つかかり始めており (Luiken et al., *Mol. Pharmacol.* 2004; 65: 639-645) さらにはトリグリセライドの代謝にかかわるリポタンパク質リパーゼ活性を考慮すること (例えば Tsutsumi et al., *Metabolism* 1997; 46: 257-260) などの方法も考えて良いものと考えられた。従って、培地に脂肪酸を添加してその細胞取込みを増加させることは可能であって、それが培養心筋細胞機能の飛躍的な向上の鍵である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

これまで我々は、ラット胎児の心筋細胞を採取・単離し、初代培養を試みてきた。そこで本研究ではまず、ラットの培養心筋細胞 (Cul 群) と、新生児心筋細胞 (Neo 群) の脂肪酸組成及び含有量を、胎児心筋細胞 (Fet 群) のそれを基準として、比較検討することを第一の目的とした。

次に上記検討で Neo 群と Cul 群の間に差の見られた脂肪酸を重点的に培地に補充して細胞内に取り込ませることにより、Cul 群で不足していると考えられる脂肪酸の培養心筋細胞拍動特性に及ぼす効果について検討することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 心筋サンプルの採取

本研究の動物の取扱い及び実験法については、事前に山形大学動物実験委員会の承認を得た。Fet 群、Cul 群及び Neo 群の心筋細胞はそれぞれ下記の手順で得た。

生後 12 週齢前後の Wistar 系メスラットにペアリングを行い、胎生約 17 日目に安楽死させた。胎児ラットを摘出して頸椎脱臼により安楽死させて心臓を摘出した後、心筋組織のみを分離した群を Fet 群とした。

Cul 群では、Fet 群と同一の手順で採取した心筋組織を PBS 内で細切し、ピペッティングにより上清を除去した後、コラゲナーゼと D-グルコースを加えてさらにピペッティングし、恒温槽で 8 分間振盪培養してから上清を取り除いた。その後、再び同量のコラゲナー

ぜを加えて 8 分間振盪し、ピペティングしてから上清のみを 75 μm ステンレスメッシュに通過させた。これらの工程は 3 回繰り返した。

その後得られた上清を遠心分離し、上清を破棄してディッシュに播種し、インキュベータ内で培養を開始した。最初の培地交換は培養開始の翌日に行い、それ以降は 2 日に 1 回行って、14 日間培養した。培地には 10% 牛胎児血清、1% ペニシリン及び 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インスリンを含む DMEM/F12 を用いた。

Neo 群では、生後 9 日齢の Wistar 系ラットを安楽死させた後に心臓を摘出した。

Fig. 1 にラット胎生日数に対するサンプル採取条件を示す。

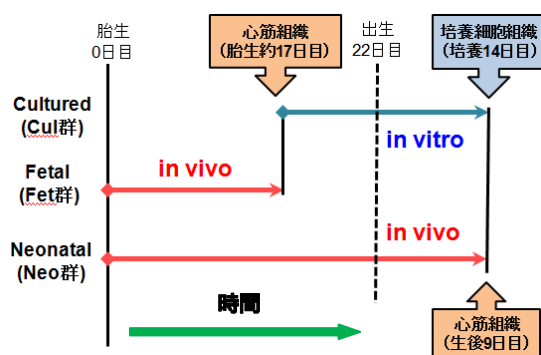


Fig. 1 心筋サンプルの採取条件。

Cultured = 培養群、Fetal = 胎児群、Neonatal = 新生児群。

(2) 脂肪酸分画

各群の組織は急速冷凍して十分に破砕し、クロロフォルム/メタノール溶液(Folch 液)内にて遠心分離を行い、脂質の溶出している最下層を採取した。その後市販のキットを用いてメチルエステル化及び精製を行い、ガスクロマトグラフィにて 24 種類(飽和脂肪酸 7 種、一価不飽和脂肪酸 6 種、 $n-3$ 系・ $n-6$ 及び $n-9$ 系多価不飽和脂肪酸それぞれ 4・6 及び 1 種)の脂肪酸組成 ($\mu\text{mol}/\text{g}$)を得た。内部標準にはノナデカン酸 ($\text{C}19:0$)を用いた。

(3) 脂肪酸の培地添加

上記の検討結果に基づき、不足していると考えられた脂肪酸の培地内添加法の検討と細胞内取込み量を測定した。

培地内への添加には最も簡単な方法であるアルブミンとの結合物を作製することとした。具体的にはまず $n-6$ 系多価不飽和脂肪酸の伸

長反応の基質であるリノール酸 ($\text{C}18:2n-6$)を用いて、リノール酸：アルブミン = 2 : 1 (mol)の割合で結合しているリノール酸アルブミン結合物を 10 ~ 200 μM となるよう培地に加え、14 日間培養して、Neo 群と同程度の細胞内リノール酸含有量となる添加量を求め、その添加量をその後の実験に用いた。またそのとき、培養心筋細胞内へ取り込まれた脂肪酸量を、培養前と培地交換直前の培養液中の脂肪酸量を測定してその差から求めるとともに、培養細胞重量も測定した。

次に同様の手続きを $n-3$ 系多価不飽和脂肪酸の伸長反応基質であるリノレン酸 ($\text{C}18:3n-3$)についても行い、添加量を決定した後、リノール酸との同時添加を試み、最後にこうして培養した心筋細胞の拍動特性を、培養細胞の顕微鏡動画画像から求め、比較した。

(4) 統計解析

各脂肪酸の群間比較には Steel-Dwass の検定を用い、有意水準は $P = 0.05$ とした。

4 . 研究成果

(1) Cul 群、Neo 群、Fet 群の脂肪酸含有量

飽和脂肪酸(ラウリン酸 ($\text{C}12:0$)、ミリスチン酸 ($\text{C}14:0$)、パルミチン酸 ($\text{C}16:0$)、ステアリン酸 ($\text{C}18:0$)、アラキジン酸 ($\text{C}20:0$)、ベヘン酸 ($\text{C}22:0$) 及びリグノセリン酸 ($\text{C}24:0$) は、全体的な傾向として Cul 群と Neo 群の含有量が同程度であった。また Fet 群が他の 2 群に比して高値であった。ただしラウリン酸含有量は他の脂肪酸の傾向とは異なっていた。

一価不飽和脂肪酸(ミリストレイン酸 ($\text{C}14:1n-5$)、パルミトレイン酸 ($\text{C}16:1n-7$)、オレイン酸 ($\text{C}18:1n-9$)、エイコセン酸 ($\text{C}20:1n-9$)、エルカ酸 ($\text{C}22:1n-9$) 及びネルボン酸 ($\text{C}24:1n-9$)) では、Neo 群の含有量が他の 2 群に比べて低い傾向が認められた。ただしネルボン酸はその傾向から外れ、Neo 群の含有量が最も多かった。それ以外の脂肪酸では Fet 群の含有量が最大であった。

多価不飽和脂肪酸では、全ての群で $n-3$ 系リノレン酸 ($\text{C}18:3n-6$) が検出されなかった。それ以外の 10 種類 ($n-3$ 系: リノレン酸、エイコサペンタエン酸 ($\text{C}20:5n-3$)、ドコサペンタエン酸 ($\text{C}22:5n-3$)、ドコサヘキサエン酸 ($\text{C}22:6n-3$); $n-6$ 系: リノール酸、エイコサ

ジエン酸(C₂₀:2n-6)、ジホモ リノレン酸(C₂₀:3n-6)、アラキドン酸(C₂₀:4n-6)、ドコサテトラエン酸(C₂₂:4n-6); n-9系: 5-8-11 エイコサトリエン酸(C₂₀:3n-9))の脂肪酸含有量の全体的な傾向としては、Fet群の含有量が最も高く、Cul群が最も低値であった。Neo群とCul群の比較では、Cul群のドコサテトラエン酸、リノール酸及びドコサヘキサエン酸が有意に低かった(P<0.05もしくはP<0.01)。

これらの結果、Cul群では多価不飽和脂肪酸が著しく不足している可能性が示唆された。

(2) 多価不飽和飽和脂肪酸の培地添加

アルブミンと結合させて培地に添加したリノール酸は、2日間で殆ど全量が培養心筋細胞に取り込まれた。この結果、培養心筋細胞に多価不飽和脂肪酸を取り込ませるには、この方法のみで十分であることが示唆された。

Neo群のリノール酸含有量に近い値は20 µM添加時に得られた。その添加濃度では、リノール酸添加群(Cul-La群)のリノール酸、アラキドン酸及びドコサテトラエン酸含有量が、Cul群やアルブミンのみ添加群(Cul-Al群)に比べて有意に高値であった(p<0.01もしくはp<0.05)。このことは、心筋細胞内で伸長反応が惹起されたことを示唆している。また細胞重量もCul-La群の方がCul-Al群よりも有意に重かった(p<0.01)。

次に、同様にしてn-3系のリノレン酸での検討を行ったところ、10 µM添加時が最もNeo群のリノレン酸含有量に近く、リノール酸添加時と同様、いくつかの長鎖n-3脂肪酸含有量も同時に増加して、やはり伸長反応が起きたものと考えられた。

そこでリノール酸(20 µM)とリノレン酸(10 µM)を同時添加したところ、約80%の添加脂肪酸が細胞に取り込まれ、同時添加による大きな問題は認められなかった。また単独添加の時と同様、伸長反応の効果が示唆されたが、Neo群とCul群の差が最も大きかったドコサヘキサエン酸では、その効果は顕著ではなかった。またネルボン酸とアラキドン酸でもNeo群との差は縮まらず、長鎖になればなるほど、伸長反応の効果が現れにくい傾向があることが示唆された。

しかしながらその状況下でも、心筋細胞の拍動特性はCul群と比較して収縮率で約2.0

倍、拍動数で約1.3倍向上していることが確認され、両者を合わせて約3倍(2.0x1.3)に改善した。

今後は伸長反応の基質ばかりでなく、Neo群との差が依然として見られるドコサヘキサエン酸などの個々の脂肪酸の添加も考慮して、脂肪酸の種類とそれぞれの添加量を最適化していくことにより、さらに拍動機能の向上が見込めるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1. Karimata T, Seya D, Wakatsuki T, Feng Z, Sato D, Nishina A, Kusunoki M, Nakamura T. Fatty acid composition in fetal, neonatal, and cultured cardiomyocytes in rats. In Vitro Cell Dev Biol Anim 49(10), 798-804, 2013 (DOI: 10.1007/s11626-013-9668-3) (査読有)
2. 若槻峻, 瀬谷大貴, 佐藤大地, 佐藤大介, 狩俣徹, 仁科淳良, 楠正隆, 中村孝夫. ラット培養心筋細胞の脂肪酸組成. 生体・生理工学シンポジウム論文集 27, 446-447, 2012 (査読無)

[学会発表](計5件)

1. 若槻峻, 佐藤大地, 瀬谷大貴, 狩俣徹, 岡田研吾, 楠正隆, 仁科淳良, 馮忠剛, 佐藤大介, 中村孝夫. リノール酸添加培地がラット培養心筋細胞脂肪酸組成に与える影響. 第51回日本人工臓器学会, パシフィコ横浜(横浜), 2013年9月28日
2. Sato D, Karimata T, Wakatsuki T, Feng Z, Nishina A, Kusunoki M, Nakamura T. Low contents of polyunsaturated fatty acid in cultured rat cardiomyocytes. MEDICON, Melia Sevilia (Seville, Spain), 2013.9.27
3. 佐藤大地, 瀬谷大貴, 若槻峻, 狩俣徹, 岡田研吾, 楠正隆, 仁科淳良, 馮忠剛, 佐藤大介, 中村孝夫. ラット培養心筋細胞の脂肪酸分布特性. 第50回日本人工臓器学会, アクロス福岡(福岡), 2012年11月23日
4. 若槻峻, 瀬谷大貴, 佐藤大地, 佐藤大介, 狩俣徹, 仁科淳良, 楠正隆, 中村孝夫. ラット培養心筋細胞の脂肪酸組成. 第27回生体・生理工学シンポジウム, 北海道大学学術交流会館(札幌), 2012年09月21

日

5. 佐藤大地, 瀬谷大貴, 狩俣徹, 馮忠剛, 中村孝夫. 胎児及び新生児ラット心筋組織の脂肪酸分布特性. 第49回日本人工臓器学会, 都市センターホテル(東京), 2011年11月26日

〔図書〕(計1件)

1. Sato D, Karimata T, Wakatsuki T, Feng Z, Nishina A, Kusunoki M, Nakamura T. Low contents of polyunsaturated fatty acid in cultured rat cardiomyocytes. In: R. Romero LM (ed.) IFMBE Proc Vol. 41 (XIII Mediterranean Conf Med Biol Eng Comput 2013), Springer (Heidelberg), 907-910 (total page number = 1950), 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村孝夫 (NAKAMURA, Takao)
山形大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 00142654

(2) 連携研究者

馮 忠剛 (FENG, Zhonggang)
山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 10332545

仁科 淳良 (NISHINA, Atsuyoshi)
日本大学・理工学部・教授
研究者番号: 00469884

(3) 研究協力者

楠 正隆 (KUSUNOKI, Masataka)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 80214956

佐藤大介 (SATO, Daisuke)
山形大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 60536960

堤 一彦 (TSUTSUMI, Kazuhiko)
徳島文理大学・薬学部・特任教授
研究者番号: なし