

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591050

研究課題名(和文) 心筋細胞の生存・分化・脂肪毒性における脂肪組織の役割とその制御機構

研究課題名(英文) Roles of adipose tissue in survival, differentiation and lipotoxicity of cardiomyocytes

研究代表者

戸田 修二(Toda, Shuji)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：80188755

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)：本研究により、心外膜下、皮下、内臓脂肪組織は、心筋細胞の脂肪滴沈着、アポトーシスを促進し、増殖・構造・機能分化を抑制することが明らかとなった。即ち、上記3種類の脂肪組織は、心筋細胞に脂肪毒性を誘導する。この結果は、肥満者が心不全を発症しやすいという臨床データを支持するものである。本研究により、心筋細胞の脂肪毒性には、パルミチン酸、脂肪酸輸送分子(FATP-4, CD36)、酸化ストレス分子(8-OHdG, 4-HNE)が部分的に関与していることが示唆された。また、心筋細胞は、脂肪組織の再生、心筋細胞毒性因子であるレプチンの産生を抑制し、脂肪組織の脂肪毒性作用を防御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This research has shown that epicardial, subcutaneous and visceral adipose tissue types promote lipid droplet deposition and apoptosis of cardiomyocytes together with the inhibition of the growth and differentiation. That is, 3 adipose tissue types above promote lipotoxicity of cardiomyocytes. Our results support the clinical finding that obesity is closely associated with heart failure. Also, our study has demonstrated that the free fatty acid palmitate, fatty acid transport proteins of FATP-4 and CD 34, and oxidative molecules of 8-OHdG and 4-HNE may be involved in the lipotoxicity of cardiomyocytes. In addition, this research has shown that cardiomyocytes inhibit the development of preadipocytes and mesenchymal stem cells, and the production of cardiomyocyte-toxic adipokine of leptin from adipose tissue. That is, cardiomyocytes themselves protect against the adipose tissue-driven lipotoxicity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：脂肪組織 心筋細胞 脂肪毒性 メタボリックシンドローム 脂肪滴沈着 心不全 アポトーシス 遊離脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

心臓は心外膜下に臓器特異的脂肪組織を有するが、その生理的な役割は不明である。さらに、皮下、内臓脂肪組織の増加を基盤とする肥満、メタボリック症候群は心筋症、心肥大、心不全などの発症・病態に深く関与している (Curr Opin Lipidol 20:50-56, 2009)。それ故に、上記脂肪組織が心筋細胞の生存、構造・機能分化や心疾患の発症・病態に活発に影響していると予想される。しかし、脂肪組織が心筋細胞に与える直接的な影響を解析した研究は国内外にはなく、その詳細は不明である。

これまで、脂肪細胞、間葉系幹細胞 (MSC) を有する脂肪組織を培養することは困難であった。我々は初めて脂肪組織のコラーゲンゲル器官培養系を確立し、脂肪組織の長期維持、アディポカイン産生や MSC 再生現象を見出した (Sonoda, Toda et al. *Endocrinology* 149:4794-4798, 2008)。さらに、尿細管上皮-脂肪組織解析モデルを考案し、脂肪組織が尿細管上皮の極性化、機能分化、グリコゲン産生を促進し、細胞死を抑制すること、尿細管上皮が脂肪組織のアディポネクチン産生を促進し、レプチン産生、MSC 再生を抑制することを解明した (Udo, Toda et al. *Kidney Int* 78:60-68, 2010)。以上により、脂肪組織が心筋細胞に与える直接的な影響を解析することが初めて可能となった。

近年、肥満や糖尿病などのメタボリック症候群において心筋細胞の脂肪蓄積が脂肪毒性を誘導し、心不全の発症・病態に深く関与していることが示唆されている (Biochim Biophys Acta 1801: 311-319, 2010)。HL-1 心筋細胞株を用いた我々の予備実験でも、内臓脂肪組織が心筋細胞の脂肪蓄積、細胞死を促進する。それ故に、内臓脂肪組織が心筋細

胞に脂肪毒性を誘導することが予想されるが、その詳細は不明である。さらに、心外膜下や皮下脂肪組織の影響も不明であり、心筋細胞-脂肪組織相互作用下における心筋細胞の脂肪毒性の研究は国内外に報告はなく、その詳細は不明である。

以上の背景に基づいて、心筋細胞の生存、分化、脂肪毒性における脂肪組織の役割とその制御機構を解明する本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、心筋細胞-脂肪組織 (心外膜下、皮下、内臓) 解析モデルを用いて、以下の点を明らかにする。

1) 上記3種類の脂肪組織が、心筋細胞のアポトーシス、構造・機能分化に与える影響とその相違を解明する。

2) 上記3種類の脂肪組織が、心筋細胞の脂肪蓄積に伴う脂肪毒性に与える影響とその相違を解明する。脂肪毒性機構として、脂肪酸輸送分子、酸化ストレス・小胞体ストレス関連分子、遊離脂肪酸、アディポカインの関与を明らかにする。

3) さらに、心筋細胞が脂肪組織に与える影響も不明であるので、心筋細胞が、上記3種類の脂肪組織のアディポカイン・遊離脂肪酸産生、間葉系幹細胞再生とその分化系列に与える影響を解明する。

4) 上記1) 2) 3) の心筋細胞-脂肪組織相互作用の仲介因子を同定する。

3. 研究の方法

1) **材料:** 心筋細胞: 新生児マウス、ラット心筋を細切し、コラーゲナーゼ処理で単離した心筋細胞、成人心筋細胞の構造・機能分化を保持するマウス HL-1 心筋細胞株 (Proc Natl Acad Sci USA 95: 2979-2984, 1998) を用いる。脂肪組織: 12週齢マウス、ラットの皮下、内臓、心外膜下脂肪組織、剖検例のヒト皮下、内臓、心外膜下脂肪組織 (学内倫理委員会の認可症例) を細切した脂肪組織片を用いる。

2) **培養システム:** 心筋細胞-脂肪組織解析モデルを用いる。外皿 [1] に、0.5 mm 径に細切した脂肪組織片 (0.5 ml) を 5 ml の I 型コラーゲンゲル内に包埋し、1日間培養する。その後、コラーゲンでコーティングした底面がニトロセルロース膜から成る内皿 [2] に、心筋細胞 (10万個) を播種し、この内皿 [2] を、外皿 [1] に入れて、培養する。対照は、心筋細胞や脂肪組織の単独培養である。脂肪組織が心筋細胞に与える影響の特異性を検証するために、外皿 [1] に 3T3 線維芽細胞を培養した系で、内皿 [2] に心筋細胞を培養する。培養 1, 2, 3 週で、心筋細

胞 - 脂肪組織相互作用を、ホルマリン固定切片、グルタルアルデヒド固定電顕切片、細胞から抽出した蛋白、遺伝子と細胞培養液を用いて、以下のように解析する。

3) 心筋細胞の生存・構造・機能分化の解析: 心筋細胞のアポトーシスを ssDNA の免疫染色で、増殖 (HL-1 心筋細胞) を 24 時間ウリジン (BrdU) 摂取率で、萎縮・肥大を光顕で、構造分化をミトコンドリア、筋線維や Z バンド形成を示標に透過電顕で、機能分化をミオシン、トロポニン T、ANP、BNP の免疫染色、Western blot と real-time RT-PCR で検討し、心外膜下、内臓、皮下脂肪組織が心筋細胞の生存・構造・機能分化に与える影響とその相違を解明する。

4. 研究成果

1. 心外膜下、皮下、内臓脂肪組織は、心筋細胞の脂肪滴沈着、アポトーシスを促進する。
2. 上記 3 種類の脂肪組織は、心筋細胞の増殖、構造・機能分化を抑制する。
3. 上記 1, 2 の結果は、脂肪組織が心筋細胞に脂肪毒性を誘導することを示している。
4. 脂肪組織誘導性の心筋細胞の脂肪毒性機構には、パルミチン酸、脂肪酸輸送分子である FATP-4、CD36、酸化ストレス分子である 8-OHdG、4-HNE が部分的に関与しているが、アディポカインである leptin、アディポネクチンなどの関与は明瞭ではない。また、小胞体ストレス分子の関与も明瞭ではない。
5. 心筋細胞は、脂肪組織からの前脂肪細胞や間葉系幹細胞の再生を抑制する。このことは、脂肪組織の増加を抑制し、脂肪毒性を心筋細胞が防御していることを示唆する。
6. 心筋細胞は、脂肪組織からの leptin 産生を抑制し、アディポネクチン産生を促進する。この結果は、脂肪毒性を心筋細胞が防御していることを示唆する。

以上のように、脂肪組織と心筋細胞の明瞭な相互作用が解明された。脂肪組織は心筋細胞の脂肪毒性因子であるが、一方で心筋細胞自体が脂肪毒性防御因子として作用することが解明された。即ち、脂肪毒性促進因子と脂肪毒性防御因子のバランスが心筋細胞の生存に重要である。本研究により、脂肪組織の増加を基盤とする肥満やメタボリックシンドロームにおける心不全の発症には、脂肪組織誘導性の心筋細胞脂肪毒性が重要な発症因子であることが示唆される。さらに、脂肪毒性機構には、パルミチン酸などの遊離脂肪酸や酸化ストレスが関与していることが示唆される。今後、さらなる研究により、脂肪毒性因子とその防御因子を解明する予定である。本研究プロジェクトに関連して、以下の論文が作成された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 8 件)

1. Aoki S, Takezawa T, Oshikata-Miyazaki A, Ikeda S, Kuroyama H, Chimuro T, Oguchi Y, Noguchi M, Narisawa Y, Toda S. Epithelial-to-mesenchymal transition and slit function of mesothelial cells are regulated by the cross talk between mesothelial cells and endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 306(1):F116-22, 2014 査読有り
2. Aoki S, Udo K, Morimoto H, Ikeda S, Takezawa T, Uchihashi K, Nishijima-Matsunobu A, Noguchi M, Sugihara H, Toda S. Adipose tissue behavior is distinctly regulated by neighboring cells and fluid flow stress: a possible role of adipose tissue in peritoneal fibrosis. *J Artif Organs*. 16(3):322-31, 2013 査読有り
3. Nishijima-Matsunobu A, Aoki S, Uchihashi K, Fujimoto K, Toda S. Three-dimensional culture model for analyzing crosstalk between adipose tissue and hepatocytes. *Cell Tissue Res*. 352(3):611-21, 2013 査読有り
4. Uchihashi K, Aoki S, Matsunobu A, Toda S. Osteoblast migration into type I collagen gel and differentiation to osteocyte-like cells within a self-produced mineralized matrix: a novel system for analyzing differentiation from osteoblast to osteocyte. *Bone*. 52(1):102-10, 2013 査読有り
5. Aoki S, Ikeda S, Takezawa T, Kishi T, Makino J, Uchihashi K, Matsunobu A, Noguchi M, Sugihara H, Toda S. Prolonged effect of fluid flow stress on the proliferative activity of mesothelial cells after abrupt discontinuation of fluid streaming. *Biochem Biophys Res Commun*. 416(3-4):391-6, 2011 査読有り
6. Aoki S, Makino J, Nagashima A, Takezawa T, Nomoto N, Uchihashi K, Matsunobu A, Sanai T, Sugihara H, Toda S. Fluid flow stress affects peritoneal cell kinetics: possible pathogenesis of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int*. 31(4):466-76, 2011 査読有り

7. Nomoto-Kojima N, Aoki S, Uchihashi K, Matsunobu A, Koike E, Ootani A, Yonemitsu N, Fujimoto K, Toda S. Interaction between adipose tissue stromal cells and gastric cancer cells in vitro. Cell Tissue Res. 344(2):287-98, 2011 査読有り

8. Anan M, Uchihashi K, Aoki S, Matsunobu A, Ootani A, Node K, Toda S. A promising culture model for analyzing the interaction between adipose tissue and cardiomyocytes. Endocrinology. 152(4):1599-605, 2011 査読有り

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
戸田 修二 (Toda, Shuji)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：80188755

(2)研究分担者
挽地 裕 (Hikichi, Yutaka)
佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：90380774

(3)連携研究者
()

研究者番号：