

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26670360

研究課題名(和文)薬物及び低温曝露の脂肪組織における各種細胞に対する影響

研究課題名(英文)Effects of psychotropic agents and low temperature on adipocyte and adipose tissue

研究代表者

磯部 一郎 (ISOBE, Ichiro)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：30315907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞の生理的・病理的状态が心臓血管機能に影響し、時に重大な異常が発生する機序を探索し、法医解剖事例で遭遇する原因不明の突然死の病態の解明及び病態の指標を確立することを目指し、3T3-L1細胞を使用して種々の刺激に対する脂肪細胞の反応を解析できる脂肪細胞培養プロトコルを検討した。十分安定的な培養系を確立するには至らなかったが、継代数・細胞密度・培地添加物変更の時期などが脂肪細胞分化効率や脂肪細胞の安定性に関与することが示された。また、マウス由来の3T3-L1で活用できるRT-PCRやRNA interference実験の条件設定を、他細胞により検討した。

研究成果の概要(英文)：Our purpose was to investigate the roles of adipocyte on the pathophysiology of the cardiovascular system and to clarify the mechanisms underlying serious pathological outcome including sudden death and to find out biomarkers that indicate abnormal conditions of adipocyte. To achieve our purpose, we tried to prepare a culture system model of adipocyte using 3T3-L1 cell line. This cell line has been utilized widely as an adipocyte model, but the 3T3-L1 cell have originally fibroblast-like phenotype and have to be differentiated into adipocyte-like phenotype by a couple of reagents. Moreover, it is difficult to maintain the adipocyte-like phenotype for a long time in a culture system. We, therefore, tested various conditions of cell culture, and we recognized that the number of cell passage, cell confluency, or timing of addition or removal of differentiation reagents were important factors for establishing a stable culture system.

研究分野：医歯薬学 法医学 法医病理学 神経生化学 細胞生物学

キーワード：脂肪細胞 心筋細胞 内因性カンナビノイドシステム

1. 研究開始当初の背景

(1) 法医解剖事例では、生前の既往症や健康状態が明らかでなく、顕著な形態的病変も認められないことが少なからず経験される。そのような事例の死因としてしばしば致死的不整脈が推定されるが、不整脈の原因や誘因については診断根拠に乏しく不明となることが多い。近年の基礎的研究および臨床的研究から、脂肪組織における炎症反応等の変化と代謝機能・循環機能の病態との関連性が指摘されており、さらに、心外膜下の脂肪組織が、心房細動や冠動脈攣縮の発症に影響するという報告もある。このように脂肪細胞・脂肪組織の機能変化や異常が心臓血管系に重篤な障害を及ぼす可能性についてはあまり検討されていない。

(2) 特徴的な解剖所見の乏しい事例には向精神薬関連死や低体温症が含まれる。これらの病態において、例えば向精神薬長期服用者には肥満を呈する場合が少なくないこと、低温環境では脂肪細胞の代謝に変化が生じる可能性があることなどから、向精神薬や低温環境が脂肪細胞の機能に及ぼす影響を明らかにすることは病態の解明や診断指標の確立につながる可能性がある。

(3) 報告者らはこれまでに原因不明の突然死などにサーカディアンリズムや内因性カンナビノイドシステムの状態変化が関与している可能性の探索を進めてきているが、脂肪細胞においても寒冷刺激等で内因性カンナビノイドシステムに変化が惹起されることや脂肪組織からのアディポネクチン等の分泌がサーカディアンリズムをもっていることなどが報告されている。このような観点から脂肪細胞の機能状態とサーカディアン関連遺伝子、あるいは内因性カンナビノイド関連遺伝子の発現状態との関連性が推察される。

2. 研究の目的

(1) 脂肪組織には内分泌器官としての機能が備わっていることが明らかにされてきており、様々な病態との関連も推測されている。そこで、脂肪組織の機能異常が心臓血管系などに影響して致死的不整脈をはじめとする突然死をきたすような病態に関連するという仮説に基づき、脂肪組織における脂肪細胞や炎症細胞が様々な刺激に対する応答として、サイトカインやホルモンの発現状態などの変化を明らかにすることを研究テーマとした。

(2) 本研究では上記のテーマについて、細胞培養実験系により、脂肪細胞・心筋細胞等の株化細胞を用いて、種々の刺激によりそれぞれの細胞が、サイトカインなどの産生変化や、内因性カンナビノイドの関連遺伝子の発現変化に関する反応性・挙動を明らかにすることを第一の目的とした。

(3) 培養実験系において、脂肪細胞等の刺激に対する反応性や挙動に何らかの知見が得られた場合、それらの指標について法医解剖事例の組織を試料にした研究の進展も目指した。

3. 研究の方法

(1) 株化脂肪細胞として、線維芽細胞の形質を持つマウス由来の 3T3-L1 細胞はインスリン・デキサメタゾン・イソブチルメチルキサンチンの添加によって脂肪細胞への分化が誘導されることが知られている。この培養系が本研究の実験目的に適用ものであるかをまず検証するため、過去の報告にある培養方法を試みるとともに、最適な実験条件を確立の可能性を探索した。

(2) 培養心筋細胞の刺激反応性を検討する。ラットの株化心筋細胞である H9C2 細胞について、内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子の発現状態とカテコラミン等の刺激に対する発現変化を RT-PCR 法により検索した。PCR のプライマーなどの条件は我々がこれまで内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子を検討してきた主な材料がラット由来のグリオーマ細胞である C6 細胞であるため、その実験条件を適応した。また、マウス由来の 3T3-L1 細胞で内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子を検索するプライマーなどの条件をマウス神経芽細胞腫由来の Neuro2a 細胞により検討した。

(3) サイトカインや内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子の発現変化などの知見が得られた場合、その細胞内シグナル伝達系等の関与を検討する方法として、関連因子の RNA interference (RNAi) 実験を行うことを予定した。そこで 3T3-L1 細胞の培養実験系の確立に先立って、C6 細胞による RNAi 実験を実施し、その実験条件などを確認した。実験には、市販の事前に最適化された serum responsive factor (SRF) に対する short interfering RNA を含む RNAi キットなどを使用し、トランスフェクション試薬 (Lipofectamine2000) により実施した。

4. 研究成果

(1) 3T3-L1 脂肪細胞実験系の確立。
この細胞は前述のごとく、広く脂肪細胞研究に使用され、その培養方法はほぼ確立されているが、当初入手した細胞株は線維芽細胞としては容易に生育するものの、定法の分化誘

導刺激に対する反応性が不良で脂肪細胞としての形質を持つ細胞への分化効率が悪く、また一旦脂肪滴を持つ状態へ変化した細胞もその形質の維持率がよくないなど、実験系として不十分なものしか得ることができなかった。研究開始当初のこのような培養細胞の状態不良は、細胞継代時の細胞密度が高くなりすぎたことなどの影響が考えられたため、細胞密度が 80%コンフルエントを超えない状態で継代し分化誘導を行うなど、いくつかの変更を加えていったところ、本研究期間の後半に漸く分化誘導からインスリンのみを含む維持培地として比較的良好な脂肪細胞形質を保てるようになった(図1、2)。しかしながら、この培養細胞系において、種々の刺激に対する細胞の反応性を再現性よく検索できることを検証するまでには至らなかった。

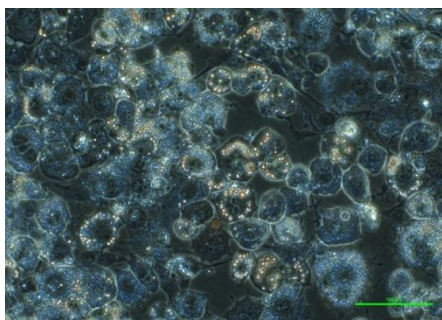


図1 3T3-L1細胞分化誘導4日目(Oil Red O染色)

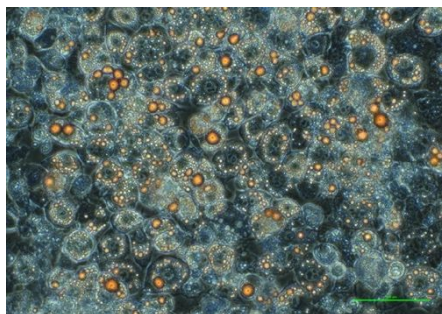


図2 3T3-L1細胞分化誘導2日、維持培地5日目(Oil Red O染色)

(2) 培養心筋細胞 H9C2 による内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子の解析。
脂肪組織が重大な影響を与える可能性が考えられる臓器に心臓がある。そこで本研究でも培養実験による心筋細胞と脂肪細胞の機能関連を考察する基礎的研究を想定して、H9C2細胞による実験を行なった。この細胞は分化誘導の処置などなしで心筋細胞のモデルとして使用されてきている。細胞は安定した状態で実験に使用できた(図3)。この細胞を用いて内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子の発現をラット心筋細胞から調整された mRNA の試料と比較して解析したところ、H9C2ではカンナビノイド受容体 CB1、CB2 の発現が極めて少ないことが示唆された(図4)。これはドーパミンやイソプロテレ

ノールなどのカテコラミンで刺激しても明らかな変化は認められなかった。

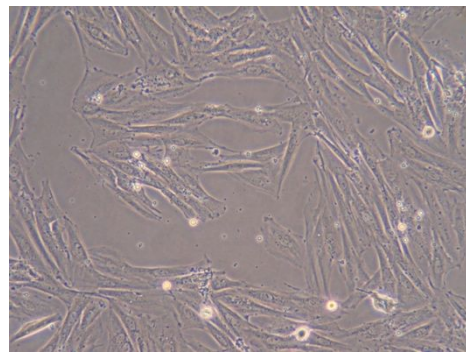


図3 H9C2細胞の位相差顕微鏡像

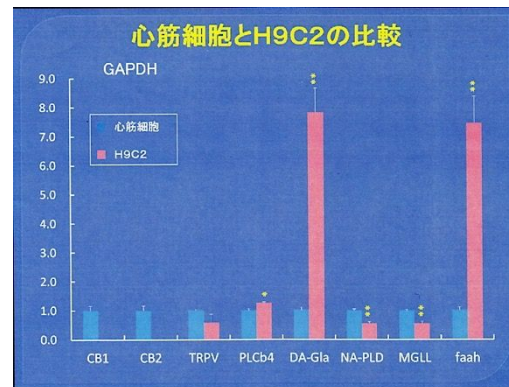


図4 ラット心筋細胞とH9C2細胞におけるRT-PCRによる内因性カンナビノイド関連遺伝子発現状況。いずれの遺伝子もラット心筋細胞の発現を1とした場合のH9C2における発現量の比率を示す(赤色)。内部標準にはGAPDHを用い、各データはn=3で1SEをbarで示した。CB1、CB2、TRPVはカンナビノイド受容体、その他はanandamideおよび2-arachidonoylglycerolの合成あるいは分解酵素である。

一方、マウス由来細胞について同様の遺伝子発現解析を行う準備としてマウス由来のNeuro2a細胞を用いたRT-PCRを新たにプライマーを用意して行なった。その結果、これらのプライマーを用いることで、これまでのラット由来細胞と同様に内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子の解析が可能であることが示唆された(図5)。

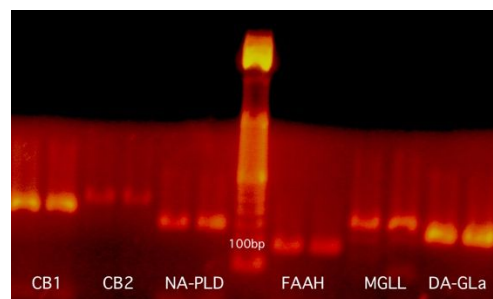


図5 マウス神経芽細胞腫 Neuro2a における内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子のRT-PCR Productの電気泳動。Realtime PCRでも融解曲線解析でほぼsingle peakが得られた。

(3) 遺伝子発現に関わる細胞内シグナル伝

達系遺伝子の RNA interference 法による機能抑制実験。

種々の遺伝子発現に関わる重要な因子として、serum responsive factor (SRF)の RNAi 実験を行なった。RNAi 実験キットの推奨条件によって、SRF の発現は十分に抑制された(図 6)。この条件において、CB1 等の発現変化を検索したが明らかな変化は検出できなかった。今後安定した脂肪細胞実験系において、脂肪細胞機能に関連する細胞内シグナル伝達系のファクターの検索を、RNAi 法を含めた手法によって解析を進める予定である。

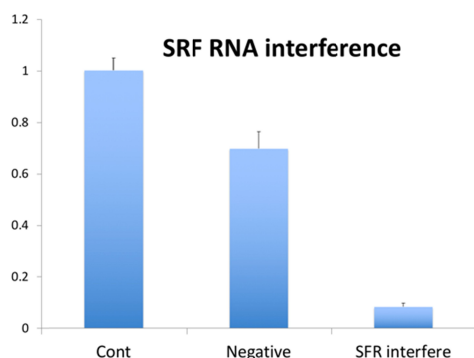


図 6 SRF に対する RNAi 処理による SRF の mRNA の抑制。Control に対して SRF mRNA は 10%程度に減少した。Negative はランダム配列に作成された siRNA をトランスフェクションしたもの。各条件 N=3 でのデータ。

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 1 件)

Kato S, Yanazaki M, Hayashi K, Satoh F, Isobe I, Tsutsumi Y, Fulminant group A streptococcal infection without gangrene in the extremities: Analysis of five autopsy cases, *Pathol Int* (査読有) 2018 DOI:10.1111/pin.12678. [Epub ahead of print]

[学会発表](計 7 件)

Ochi H, Hirata Y, Hamajima M, Isobe I, Expression change of cannabinoid receptors and production of dopamine with differentiation of PC12 cells by nerve growth factor, 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM), 2018.

越智 拓, 平田ゆかり, 濱島 誠, 磯部 一郎, グリア細胞におけるエンドカンナビノイドシグナリングは長期高濃度ドーパミン曝露によって強化される. 第 101 次日本法医学会学術全国集会, 2017.

越智 拓, 平田ゆかり, 濱島 誠, 磯部 一郎, グリア細胞におけるエンドカンナビノイドシグナリングに対するドーパミン曝露の影響. 第 2 回日本医用マスペクトル学会西部会, 2017.

Ochi H, Hirata Y, Hamajima M, Isobe I, Astrocytes regulate dopamine signaling through endocannabinoid system, 54th Annual meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), 2016.

越智 拓, 平田ゆかり, 濱島 誠, 磯部 一郎, 内因性カンナビノイドシステムを介したグリア細胞によるドーパミンシグナリング調節機構. 第 100 次日本法医学会学術全国集会, 2016.

Ochi H, Hirata Y, Hamajima M, Nakatome M, Isobe I. MAPK pathway regulates CB1 and TRPV1 mRNA expression in C6 rat glioma cell line. The 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM), 2014.

越智 拓, 平田ゆかり, 濱島 誠, 中留 真人, 磯部 一郎, 内因性カンナビノイドシステム関連遺伝子の発現制御における MAPK の関与. 第 57 回日本神経化学会. 2014.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

磯部 一郎 (ISOBE, Ichiro)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号: 3 0 3 1 5 9 0 7

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

越智 拓 (OCHI Hiroshi)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号: 7 0 5 2 7 7 0 4

平田 ゆかり (HIRATA Yukari)
藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：50156676

濱島 誠 (HAMAJIMA Makoto)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号：20189608

(4)研究協力者

なし