

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月 31日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22616005

研究課題名（和文）細胞支持基盤の弾性調節で飽和脂肪酸によるインスリン抵抗性を克服する試み

研究課題名（英文）An attempt to deal with saturated fatty acid-induced insulin resistance by the stiffness of the extracellular matrix

研究代表者

李 勤凱 (LI QINKAI)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：10571531

研究成果の概要（和文）：硬度調節の可能な二次元細胞培養システムで3T3-L1脂肪細胞を培養した場合、パルミチン酸負荷による炎症誘発効果が肥満状態の脂肪組織の硬度を模した細胞外基質で最大化することをこれまで報告している。今年度は三次元環境における脂肪細胞機能の解析に取り組んだその結果、細胞外基質の硬度のみならず、細胞外基質による圧縮が脂肪細胞機能を制御する新たな因子として発見した。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that 3T3-L1 adipocytes exhibit palmitate-induced proinflammatory response most prominently, when they are seeded on 2-D matrices, which have a stiffness that correspond to that of obese adipose tissues. We then analyzed how mechanical properties of the matrices affect adipocyte functions, when they are seeded in a 3-D environment. Here we report that not only the stiffness of the matrices but also compression of the matrices regulate adipocyte functions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：メカノバイオロジー

キーワード：細胞外基質、硬度、脂肪細胞、慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

急増する糖尿病への対処に糖代謝研究の飛躍的発展が待たれる。過食・運動不足で個々の脂肪細胞が肥大化して肥満が発生し、糖尿病発症の主要な原因の一つとなることが知られている。脂肪細胞は種々のアディポカインを血中に分泌して全身のインスリン感受性に影響を与える。肥満で肥大化した脂肪細胞はアディポネクチンなどのインスリン感受性を亢進させるアディポカイン分泌を減少させ、Interleukin-6 (IL-6) や monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) などのインスリン抵抗性を増大させるアディポカイン分泌を増加させる。後者は脂肪組織に炎症細胞を遊走させ、脂肪組織を慢性炎症の状態にする。慢性炎症は、脂肪細胞からのインスリン抵抗性を増大させるアディポカイン分泌をさらに増加させる。また脂肪組織の慢性炎症は、細胞内に蓄積された中性脂肪の分解とその分解産物である遊離脂肪酸の血液中への放出を促進する。脂肪組織由来のインスリン抵抗性を増悪させるアディポカインおよび遊離脂肪酸は、肝臓や骨格筋などのインスリン標的臓器に働きかけ、これらの臓器におけるインスリン作用を阻害してインスリン抵抗性を発生させ、糖尿病発症に寄与する。また脂肪組織由来のこれらの因子は血管壁の慢性炎症も誘発し、動脈硬化発生にも寄与する。脂肪組織の慢性炎症によるインスリン抵抗性にアディポネクチンを投与することである程度改善効果が見られるが完全ではない。これは体内の脂肪組織からインスリン抵抗性増悪アディポカイン供給が続いていることによると推定できる。根本的なインスリン抵抗性の解決には、脂肪組織のインスリン抵抗性、慢性炎症を改善す

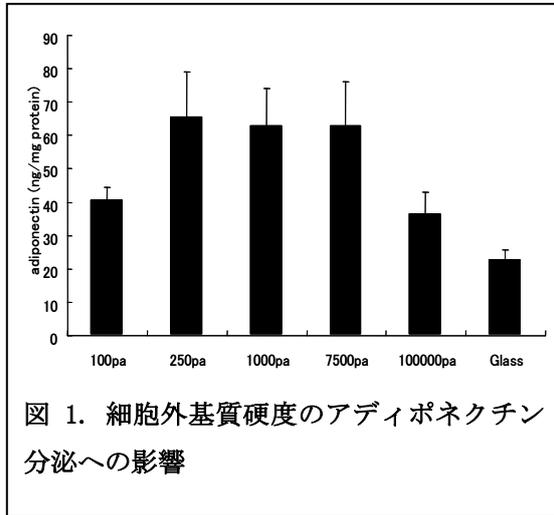
る必要性が考えられる。このような作用を持つ薬剤としてチアゾリジン系が知られているが、心血管系へのリスクのため、市販の同系薬剤に使用注意の喚起がなされている状態であり、新たなアプローチが待たれている。

糖尿病研究に頻用される手段の一つは、細胞外基質などの表面加工で細胞接着を可能としたプラスチック或いはガラスに細胞を蒔き、様々な刺激への細胞応答を観察する。その大前提は、上記の環境で細胞が生体内と同じ挙動を示すことである。しかしこれまでの培養脂肪細胞では体内における脂肪細胞機能の再現に限界があった。そのために培養脂肪細胞を用いた糖尿病治療に役立つ化合物の探索において培養細胞が生体内の脂肪細胞と異なる挙動を示し、化合物探索を誤った方向に導く事例が数多く見られた。

細胞は周囲の環境を、液性因子と受容体の結合、細胞間の接着、接着因子と細胞外基質との結合など多彩な方法で認識する。これらは、特定の分子同士の特異的な相互作用による。しかし近年、細胞外基質に接着する細胞は、 $\alpha 1 \beta 1$ インテグリンと1型コラーゲンの結合など、接着因子と細胞外基質間の特異的な結合に始まる情報伝達のみならず、細胞外基質の硬度などの物理的情報にも応答することが見出された。研究代表者は、3T3-L1 脂肪細胞が、脂肪組織同様の硬度を持つゲル上でインスリンシグナルを増強させ、初代培養脂肪細胞同様の糖輸送担体発現パターンを示すこと、さらにインスリン依存性4型糖輸送担体の細胞膜移行を増やすことを最近報告した。また3T3-L1 脂肪細胞によるアディポネクチン産生が脂肪組織同様の硬度を持つゲル上で最大となる(図1)。したがって細胞外基質の硬度が、脂肪細胞が体外の培養環

境においても生体内と同様の細胞機能を発揮するための因子の一つである、と研究代表者らは考えている。

過剰摂取でインスリン抵抗性を来たす栄養素の一つに飽和脂肪酸が知られている。飽和脂肪酸投与により脂肪細胞の肥大化と



ともに 6 型コラーゲン分泌増加が見られるが、6 型コラーゲンの合成を抑制すると飽和脂肪酸で脂肪細胞が肥大化してもインスリン抵抗性を来たさないことが最近報告された。そこで当プロジェクトでは、脂肪細胞の肥大化で生じる細胞-細胞外基質間の歪(メカニカルストレス)がアディポカイン分泌に代表される脂肪細胞機能異常を誘発するとの仮説を立てた。

そこで脂肪細胞の培養環境にメカニカルストレスを加えることで、肥満・糖尿病状態における脂肪細胞機能異常を正確に表現できることを目指した。

2. 研究の目的

細胞外基質の生化学的環境のみならず、生物物理的環境をも生体内の脂肪組織のそれらに合致させることで、生体内における脂肪細胞機能を再現する 3T3-L1 脂肪細胞の培養を目指した。脂肪細胞機能としては、肥満・糖尿病状態におけるアディポカイン分泌異常

の再現を目指した。二次元の細胞培養系で細胞外基質の硬度が脂肪細胞にメカニカルストレスを与える重要な因子であることを昨年度までに発見している。今年度は三次元の培養系において脂肪細胞機能にメカニカルストレスを与える生物物理的因子を探索した。

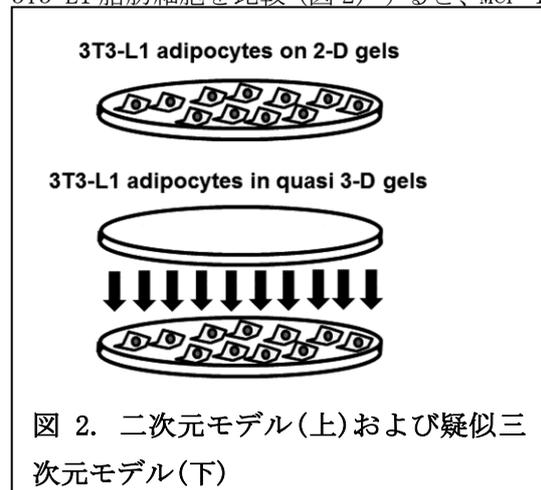
3. 研究の方法

(1) 硬度調節の可能なポリアクリルアミドゲル二枚の間に 3T3-L1 脂肪細胞を挟んで圧縮し、アディポカイン分泌を評価した。

(2) 正常マウスあるいは肥満糖尿病モデルの ob/ob マウスから単離された脂肪組織に 0-9 g/5.76 cm² の重石を載せ、組織の圧縮によるアディポカイン分泌への影響を評価した。

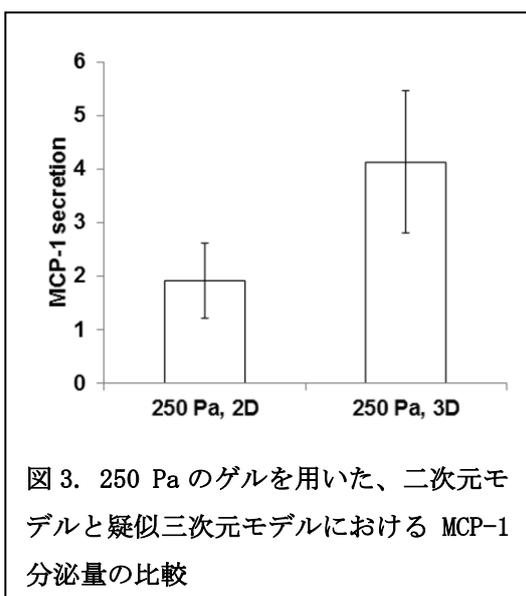
4. 研究成果

(1) 正常脂肪組織と同じ硬度である 250 Pa のソフトゲル上 (2 次元モデル) で培養した 3T3-L1 脂肪細胞と、ソフトゲルを重ねてサンドイッチ状 (擬似 3 次元モデル) で培養した 3T3-L1 脂肪細胞を比較 (図 2) すると、MCP-1

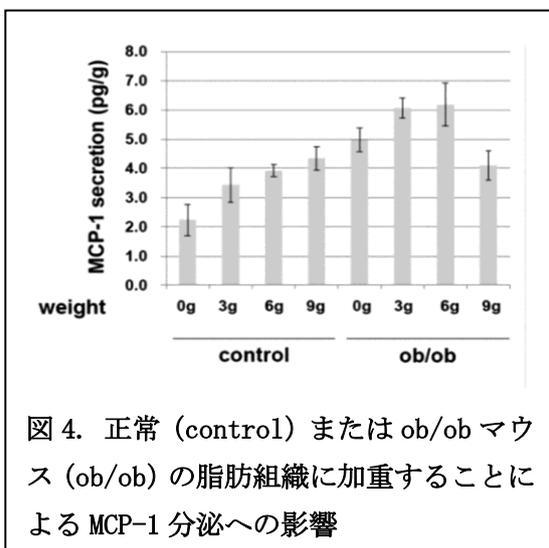


の分泌量が、擬似 3 次元モデルで培養された脂肪細胞の場合、約 2 倍高くなることが明らかとなった (図 3)。即ち、擬似 3 次元モデルでの脂肪細胞の培養においては、細胞外基質の硬さが培養細胞に影響するだけでなく、細

胞に加えらるるソフトゲルによる圧縮も大きな影響を与えることが明らかとなった。



(2) 正常群の脂肪組織では、加重が負荷されるに従って、MCP-1 の分泌量が増大することが示された。また、ob/ob 群の脂肪組織では、6 g までの加重を付加すると、MCP-1 の分泌量がさらに増大した(図4)。



したがってこのことから、正常な脂肪組織に圧縮を加えることで肥満脂肪細胞の組織と同様の性状を示し、肥満脂肪細胞の代替として使用できることが分かった。更に、肥満脂肪細胞の組織に圧縮を加えることにより、肥

満脂肪細胞から更に病態の悪化した脂肪細胞を作製できることが分かった。

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1件)

① 李勤凱、保坂利男、原田永勝、中谷豊、船木真理

Activation of Akt through 5-HT_{2A} receptor ameliorates serotonin-induced degradation of insulin receptor substrate-1 in adipocytes.

Mol Cell Endocrinol. 査読あり

365(1): 2013 Jan 5;25-35

[学会発表] (計1件)

① 李勤凱、Macrophages sense matrix rigidity and participate in development of chronic inflammation in adipose tissues. 2012. 5. 18、第55回日本糖尿病学会年次学術集会、パシフィコ横浜 (横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 勤凱 (LI QINKAI)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号: 10571531

(2) 研究分担者

船木 真理 (FUNAKI MAKOTO)

徳島大学・病院・特任教授

研究者番号: 10467821

秦 明子 (HATA AKIKO)

徳島大学・病院・学術研究員

研究者番号: 20570948

(3) 連携研究者 なし