

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590241

研究課題名(和文) アルコールの脂質代謝産物が各種細胞の情報伝達系に及ぼす効果の機能形態学的な検証

研究課題名(英文) Effect of FAEEs on intracellular signalling

研究代表者

佐藤 洋一 (Sato, Yoh-ichi)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：40118253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)： アルコール飲酒に伴い、各種の脂肪エチルエステル(FAEEs)が体内で精製され、膵腺房細胞や血球系細胞ではFAEEsによって細胞内情報伝達系の乱れが引き起こされると報告されたことから、各種FAEEsに対する反応を、血管系や血球系、外分泌細胞で検討した。

実験には共焦点レーザー顕微鏡を用いてカルシウムイメージングと生細胞・死細胞分別をおこなった。その結果、各種FAEEsによる刺激は、先行研究で示されたほど明瞭なものではなかった。この理由は、組織形態を保ったままの標本でありダメージを受けにくかったためと思われる。また単離細胞で観察された反応は、溶媒に用いたDMSOによる非特異的反応であった。

研究成果の概要(英文)： To investigate whether free fatty acid ethylesters (FAEEs) can induce cell damage, we observed intracellular $[Ca^{2+}]_i$ dynamics in peritoneal cells, pancreatic acinar cells and isolated vascular specimens. Palmitoleic acid ethyl ester might induce slight increase of $[Ca^{2+}]_i$ in some peritoneal cells, and Oleic acid ethyl ester caused $[Ca^{2+}]_i$ increase in pancreatic acinus. In pancreatic specimens, dead cells increase in number after FAEEs-perfusion, however the increase cannot statistically verified. FAEEs were dissolved in DMSO, however the solvent can induce cell damage. In conclusion, in the experiment, we cannot detect any evidences of FAEEs' effect on intracellular signalling.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：解剖学 細胞・組織 シグナル伝達 生理活性 脂肪酸エステル

1. 研究開始当初の背景

【着想に至った経緯】

私たちはこれまで、組織形態を保った生組織標本を用いて細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変動の画像解析を行ってきたが、異種細胞間あるいは臓器間に著しい機能的な差異があることを指摘してきた。細胞の機能は生理的な伝達物質のみならず、体内で生成された代謝物質によっても影響を受けられることから、本実験計画を立案した。

【学術的背景】

アルコール飲酒による精神・身体的な障害は大きな社会問題になっている。飲酒による細胞障害は、1) エチルアルコールそのものが細胞に直接に悪影響を与えるものと、2) その代謝産物によるもの、とに大別される。後者の例として着目されているのが脂肪酸エチルエステル (FAEEs) である。エチルアルコールは体内で脂肪酸のカルボキシル基とエステル結合することで、様々な FAEEs を生成する。最近になり、FAEEs の或るものは、膵臓や単核血球細胞に障害を引き起こすことがわかってきた (Gerasimenko et al., PNAS 106, 2009; Alhomsy et al., Alcohol Clin Exp Res 32, 2008)

2. 研究の目的

膵臓腺房細胞では、或る FAEE がイノシトール三リン酸 (IP_3) 受容体を介して、細胞内カルシウム貯蔵場からの Ca^{2+} 動員を引き起こし、結果として細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を上昇させることが示された。しかしながら、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇そのものは通常の分泌機転でも起きており、FAEEs 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がなぜ膵腺房細胞の細胞障害に結びつくのか、はっきりしていない。細胞外への消化酵素逸脱がどういった機構で生じているかも不明である。また、唾液腺や涙腺などの分泌腺組織でも同様のことが起きているかどうかは、全く調べられていない。腺細胞は内腔側と基底

側では構造的な相違 (すなわち機能的な極性) が明瞭であることから、 $[Ca^{2+}]_i$ 変動を空間的および時間的解像度に優れた機器で解析する意義は極めて大きいと思われる。また、FAEEs が血中の単核細胞 (細胞種は未同定) にネクロシスやアポトーシスを起すとされているが、それがどんな状態のいかなる血球なのか、また細胞死に陥る経緯や $[Ca^{2+}]_i$ 動態に及ぼす効果も、いまだ詳細に調べられていない。

これまでの報告からすると、FAEEs が何らかの機序を介して $[Ca^{2+}]_i$ 動態などの細胞内情報伝達系を乱していることが容易に想像できるとは言え、細胞内情報伝達系は細胞の種類により大きく異なる上に、臓器あるいは部位に応じて各種リガンドの受容体の分布も変わっていることから、FAEEs に対する反応を各種細胞・臓器で比較検討する必要がある。また一方では、FAEEs にも飽和・不飽和の別があり、FAEEs と総称される全てのものが一様に細胞障害を引き起こすとは思われないが、その比較検証はなされていない。ちなみに、アルコール代謝物に最初に暴露される血管系や、嗜癖の座である神経系で FAEEs の効果を見た例は無い。

そこで本研究では、各種 FAEEs が血管系、神経系、血球系、外分泌系の各種細胞に及ぼす効果を、細胞内情報伝達系の要とも言うべき $[Ca^{2+}]_i$ 変動の解析と、免疫組織化学や *in situ hybridization* と (透過型ならびに走査型) 電子顕微鏡などの形態学的手法、および Western blot などの生化学的方法を組み合わせ、機能と形態の両面から検討した。

3. 研究の方法

標本

動物: ラット (Wistar、BW 250-350gr)

細胞: 腹腔内遊離細胞 (マスト細胞、遊走性白血球)

組織: 単離細動脈と細静脈 (精巣)、単離膵

膵腺房

標本採取法は、これまでの Ca^{2+} imaging 方に準じた。できるだけ組織形態を保ったままの標本とするため、採取組織・細胞は保護的作用のある BSA を加えたリンゲル液内で処理し、純化コラゲナーゼで結合組織を除去した。

試薬

Ca^{2+} 感受性色素として、INDO-1 あるいは Fluo-8 を用いた。また損傷細胞を可視化するため、Ethidium homodimer と Calcein/AM を負荷した（生細胞は緑、損傷細胞は赤色蛍光を発する）。

顕微鏡

紫外線励起のできる高速共焦点レーザー走査型顕微鏡（Nikon RCM-8000 改良型）で、Indo-1 負荷標本を観察し、 $[Ca^{2+}]_i$ を表す画像を取得し、各細胞に ROI を定めて時系列的な変化を解析した。また Fluo-8 あるいは Calcein/Ethidiumhomodimer 負荷標本は一般的な共焦点レーザー走査型顕微鏡（Zeiss LSM 510）を使用し、 $[Ca^{2+}]_i$ 変動あるいは、また生細胞・死細胞の割合を求めた。

刺激ならびにイメージング

上記組織・細胞をレーザー顕微鏡で観察しながら、以下の脂肪酸を含んだリンゲル液で 30 ~ 1 時間周囲を灌流し、細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変動を観察した。得られた画像データは RCM の画像解析プログラムでデータ処理するとともに、Image J とプラグインを使って TIFF あるいは JPEG 画像とし、動画作成を試みた。

灌流液に加えた FAEEs (DMSO を溶媒として使用)

Stearic acid ($10^{-3} \sim 10^{-5}$ M)

Myristic Acid ($10^{-3} \sim 10^{-5}$ M)

Linoleic Acid ($10^{-3} \sim 10^{-5}$ M)

Linolenic Acid ($10^{-3} \sim 10^{-5}$ M)

Arachidonic Acid ($10^{-3} \sim 10^{-5}$ M)

Oleic Acid ($10^{-3} \sim 10^{-5}$ M)

Palmitic Acid ($10^{-3} \sim 10^{-5}$ M)

Lauric Acid ($10^{-3} \sim 10^{-5}$ M)

Palmitoleic Acid ($10^{-3} \sim 10^{-5}$ M)

4. 研究成果

平成 23 年度

ラットから膵膵腺房および腹腔内単核球、肥満細胞の標本を作成し、各種 FAEEs を $10^{-7} \sim 10^{-4}$ M の濃度で作用させた。その結果、先行研究の報告で効果があるとされていた Palmitoleic Acid Ethyl Ester は膵膵の $[Ca^{2+}]_i$ 変動をきたさなかった。また Oleic Acid Ethyl Ester も幾分の上昇をみたものの、さほど明瞭な変動ではなかった。

しかしながら、エチジウムホモダイマーによる細胞死イメージングでは死に至る細胞が多くみられた。 Ca^{2+} イメージング法では、観察対象細胞に限られるため、反応した細胞を見落としている可能性が高い。また、膵膵腺房の形がきちんと保たれている正常な膵膵腺房では変化がほとんど無いのに対し、膵膵腺房分離処理中に傷害をうけて膵膵腺房の形が歪になった標本ほど、FAEEs による細胞死は顕著にみられた。血球系の細胞では、Palmitoleic Acid Ethyl Ester で一部の単核細胞で急激な $[Ca^{2+}]_i$ 変動を引き起こしたが、マスト細胞にはほとんど効果がなかった。エチジウムホモダイマーによる細胞死イメージングの結果もほぼ同様であった。

平成 24 年度

先行研究に比べて反応が弱かったのは、FAEEs が灌流液中の BSA と結合したせいかもしれないということから、精製 BSA を使用したバッファーで実験をおこなった。

それにもかかわらず、本年度も同様に $[Ca^{2+}]_i$ では変化が少なく、先行研究で記載されているほど、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇による細胞障害は重要でないように思われた。先行研究では完全単離膵膵細胞を使用していたが、我々は

腺房構造を維持したままの生組織標本を用いていることから、細胞に対するダメージが軽減されたせいかもしれない。また、平成 24 年度に用いた高速レーザー顕微鏡は光ダメージがおきにくく、生理的な反応を人工産物無しに観察することに適したものであるのに対し、先行研究で用いられた顕微鏡ではゆっくりした走査による光ダメージが生じていた可能性もある。なお、前年同様に、ラット腹腔から得られた血球系の細胞では、Palmitoleic Acid Ethyl Ester で一部の単核細胞で急激な $[Ca^{2+}]_i$ 変動を引き起こしたが、その細胞種を同定するには至らなかった。

平成 25 年度

先行研究に倣って、もう一度試薬を調整しなおし、実験を継続したが、同様に $[Ca^{2+}]_i$ では変化が少なかった。組織形態を保ったままの標本はダメージを受けがたい状況にあると思われたことから単離細胞（ラット腹腔から得られた血球系の細胞）で実験をおこなった。Palmitoleic Acid Ethyl Ester で一部の単核細胞で急激な $[Ca^{2+}]_i$ 変動を引き起こしたことから、濃度を変えて実験をおこなっていたが、実験途中で DMSO 単体を流したところ、同様の $[Ca^{2+}]_i$ 変動が観察された。従って、予備実験から観察していた変動は、人工産物であった可能性がでてきたことから、全て実験をやりなおしたところ、DMSO による細胞膜の透過性向上による非特異的な反応であることが明らかとなった。

副次的実験結果（平成 24 年度～）

この実験をおこなうに際し、血管系へ及ぼす影響を調べるため、臍動脈に加え細静脈標本の作製を企画し、カルシウムイメージングをおこなったところ、興味深い知見が得られた。

【血管平滑筋の形態観察】

蛍光像では、細動脈では紡錘形の平滑筋が

1～3 層輪状に取り巻くのに対し、細静脈では 1 層の多角形～星形の平滑筋細胞が配列していた。また細静脈の平滑筋細胞は敷石状に並んでいるとは言え、細胞間に隙間が見られた。但し、これは血管標本を取り出す際に伸展を余儀無くされたため生じた人工産物である可能性が高い。そこで、細胞間の接合を詳細に観察するため、通常の電顕組織標本を作成し、連続した薄切切片をもとに STEM モードで観察して立体構築を試みる実験を始めた。

新規研究手法の開発へつなげる研究

【細動脈と細静脈の血管平滑筋の反応性の解析】

細動脈は組織内血流制御において、また細静脈は炎症機転の場として重要である。そうした血管本来の組織形態を保ったままの血管標本で $[Ca^{2+}]_i$ 変動を観察したところ、細動脈の紡錘形をした平滑筋は、ノルアドレナリン、セロトニン、ATP、アンギオテンシン（ $10^{-4} \sim 10^{-5} M$ ）によって $[Ca^{2+}]_i$ が上昇したが、細静脈の多角形をした平滑筋はノルアドレナリンとアンギオテンシンに対する反応が見られたものの、セロトニンや ATP に対する反応は認められなかった。ノルアドレナリンとアンギオテンシン に対する細静脈平滑筋の反応は、細胞外カルシウムを除去しても観察されたが、サブシガルギン前処理で抑制されたことから、細胞内カルシウム貯蔵場からの動員機転が関与していることが確かめられた。但し、眼球から採取された細静脈の血管平滑筋は ATP によって反応が引き起こされた。これが P2X 受容体によるものか、P2Y 受容体が関与しているものかを明らかにする必要がある。

平滑筋細胞の形が異なることから、機能的意義も異なることが容易に想像されるとは言え、いままできちんとした解析がなされてこなかった。今回の結果は、いわゆる昇圧物質は静脈平滑筋の反応を引き起こすが、局所的な伝達物質に過ぎない ATP やセロトニンは、

細静脈の反応を引き起こしていない。則ち、全身的な血圧上昇という現象は細動脈血管抵抗だけではなく静脈系の反応も考慮しなければいけないことを示していると思われる。尤も、中枢神経系の静脈は、他の臓器の静脈系と異なっていることが予想されることから、脳表面の細静脈を採取した実験を加えなければならないが、昨年度は比較的採取が簡単な眼球の血管系で実験を施行した。

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. Miura H, Saino T, Sato, M, Satoh Y: The role of protease activated receptors in the intracellular calcium dynamics of neurons and satellite cells in the rat superior cervical ganglia. *Bioimages* 19: 17-27 (2011) (査読有り)
2. Yan J, Akutsu H, Satoh Y: The morphological and functional observation of the gap junction proteins in the oviduct epithelia in young and adult hamsters. *Okajima Folia* 88 (2):57-64 (2011) (査読有り)
3. 佐藤洋一, 齋野朝幸, 阿久津仁美: カルシウムイメージング技術の基礎。日本組織細胞化学会編 組織細胞化学 2011 p175-185 (2011)
4. Kamada Y, Saino T, Oikawa M, Kurosaka D, Satoh Y: P2Y purinoceptors induce intracellular calcium dynamics of acinar cells in rat lacrimal glands. *Histochem Cell Biol* 137:97-106 (2012) (査読有り)
5. 佐藤洋一: 右の結腸, 左の結腸の発生学的・解剖学的差異 胃と腸 47巻13号 (2012) 1920-1926
6. Oikawa M, Saino T, Kimura K, Kamada Y, Tamagawa Y, Kurosaka D, Satoh Y: Effects of protease-activated receptors (PARs) on intracellular calcium dynamics of acinar cells in rat lacrimal glands. *Histochem Cell Biol* (in press) DOI 10.1007/s00418-013-1082-0 (査読有り)
7. Tamagawa Y, Saino T, Matsuura M, Satoh Y: Mechanism of spironolactone-induced Ca²⁺ increase in rat testicular arteriole smooth muscle cells revealed by real-time laser confocal scanning microscopy. *Arch Histol Cytol* (in press) (査読有

- り)
8. Sawai T, Uzuki M, Miura Y, Kamataki A, Matsumura T, Saito K, Kurose A, Osamura YR, Yoshimi N, Kanno H, Moriya T, Ishida Y, Satoh Y, Nakao M, Ogawa M, Matsuo S, Kasai H, Kumagai K, Motoda T, Hopson N: World's first telepathology experiments employing ultra-high-speed internet satellite, nicknamed "KIZUNA". *J Pathol Inform* [Downloaded free from <http://www.jpathinformatics.org> on Tuesday, October 01, 2013, IP: 202.244.195.175]

[学会発表](計5件)

1. 佐藤洋一: バイオイメージングの実際. 第28回医学生物学電子顕微鏡技術学会講演会 2012年5月, 盛岡
2. 佐藤洋一: 各種臓器由来の血管平滑筋の細胞内カルシウム動態. 日本顕微鏡学会第56回シンポジウム 2012年11月, 札幌
3. Yoh-ichi Satoh, Tomoyuki Saino, Kazuki Masu, Makoto Matsuura, Toshinari Misaki, Yasunori Tamakawa, Kana Sasaki: Functional heterogeneity of blood vessels: with special reference to Ca²⁺ dynamics of smooth muscles. International Symposium Anatomical Science for advance in health and clinical therapy, Aug 2013, Sendai
4. 佐々木香奈, 平川正人, 齋野朝幸, 佐藤洋一: 血管平滑筋の細胞内カルシウム動態に及ぼす神経伝達物質の効果—細動脈と細静脈の比較—. 第59回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会 2013年9月, 札幌
5. Higashio H, Satoh Y: The GTPase Rab37 participates in the control of mast cell degranulation. 第36回日本分子生物学会年会, 12.3-12.6/2013, 神戸

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤洋一(教授)

研究者番号: 40118253

(2)研究分担者

齋野朝幸(准教授)

研究者番号: 40305991

東尾 浩典(助教)

研究者番号: 50342837

(3)連携研究者

松浦 誠(講師)

研究者番号: 00405846

葉原 芳昭(教授)

研究者番号: 30142813

石田 陽治 (教授)
研究者番号 : 70151389

永井 健治 (教授)
研究者番号 : 20311350

小笠原 邦昭 (教授)
研究者番号 : 00305989

阿久津 仁美 (助教)
研究者番号 : 30398482