

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12864

研究課題名(和文) 初代培養系培地内添加用多価不飽和脂肪酸カクテルの創製とその効果に関する革新的研究

研究課題名(英文) Effects of polyunsaturated fatty acids supplemented in medium on primary culture

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ドコサヘキサエン酸(DHA)及びアラキドン酸(AA)など5種類の脂肪酸単独添加培地でラット胎児心筋細胞の初代培養を行った結果、DHA 20 μ MとAA 50 μ M添加の場合に拍動能が最大となった。この時の遺伝子発現は両者で大きく異なっていた。DHA及びAAの同時添加ではそれぞれ10及び10～20 μ Mの場合に拍動能が最大となったが、その値はDHA単独添加時とほとんど変わらなかった。脂肪細胞培養では幼齢ラットよりも成ラット由来細胞での初代培養の方が優れていた。これにDHAを添加したところ、細胞生存率は若干改善されたが維持は難しかった。これらの結果、脂肪酸の及ぼす効果の細胞種依存性の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Primary culture of rat cardiomyocytes was conducted, using medium containing one of 5 fatty acids including docosahexaenoic (DHA) and arachidonic (AA) acids. Maximal contractile performance was obtained in cases of 20 μ M DHA and 50 μ M AA, with large difference in gene expression. Although combined supplementation of 10 μ M DHA and 10-20 μ M AA showed maximal performance of contractility, its level stayed rather close to that obtained in single DHA supplementation.

Primary culture of adult rat adipocytes was superior to that of juvenile one. However, even in the case of DHA supplementation, retaining of adipocytes remained difficult. These results may show effects of fatty acids are dependent on cell species.

研究分野：生体医工学

キーワード：再生医工学 脂質 初代培養 心筋細胞 脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

多価不飽和脂肪酸 (PUFA: 必須脂肪酸) は主たる細胞膜構成要素の一つであるのみならず、例えば受容体の ligand になって生理活性を発揮し、遺伝子を制御し、病態の制御を行うなど、極めて多様で重要な生理的機能を有している。すなわち人工的細胞培養環境下といえども、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。しかしながら通常の細胞培養に関する研究では一般的にこれまで、培地内に脂質がほとんど存在しないことの及ぼす影響について考慮されることは極めて少なかった。

我々は組織工学的手法による人工心室の構築を目指しているが、一般的に培養心筋細胞の発生応力は生体内のそれに比べていまだに著しく低いことが知られている。我々はその過程で PUFA の機能が培養系では全く考慮されていないことに気付き、初代培養心筋細胞組織の PUFA 含有量が生体内心筋組織のそれよりも著しく少ないことを明らかにし、例えばドコサヘキサエン酸の培地内への添加が、まだ最適条件ではないにもかかわらず数倍の拍動機能向上をもたらすことを見出した。

これらの経験から我々は、心筋細胞以外の種々の細胞の初代培養系でも、PUFA の機能を無視するわけにはいかないのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、脂質が重要な役目を担っていると考えられる 2 種類の細胞種 (心筋及び脂肪細胞) の初代培養を PUFA 添加培地で行い、その機能を無添加培地での培養結果と比較し、その結果から (i) 初代培養系における PUFA の重要性と、(ii) 細胞種に依存した、もしくは非依存的に最適な混合 PUFA (カクテル) の構成を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

これまでに我々が行ってきた手法を踏襲し、胎生 18 日のラット、もしくは幼齢ラットを麻酔下に犠牲させてそれぞれ心筋もしくは脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ処理により細胞を単離した。本研究におけるこれらの動物の取扱い並びに実験方法については、事前に山形大学動物実験委員会の承認を得た。

培養は通常の DMEM/F12 を基本とした標準的な培地に FBS もしくは NCS を加え、下記 PUFA を添加して、37 °C、5%炭酸ガス環境下で行った。なお脂肪細胞の培養初期には、浮遊する細胞の接着に有利な天井培養法を用いた。

添加した PUFA 種は、これまでの心筋細胞での研究で key となっていた 3 系のドコサヘキサエン酸 (DHA: 10~40 μM) 及び 6 系のアラキドン酸 (AA: 20~60 μM) を中心に、心筋細胞では 3 系のリノレン酸 (3~10 μM) 及びドコサペンタエン酸 (1~10 μM)

並びに 6 系のリノール酸 (10~30 μM) の添加を培養 3 日目から試みた。なおこれらの各 PUFA はアルブミン結合物として培地へ添加した。

まずそれぞれ単独の PUFA を添加して心機能などに及ぼす効果を検討し、細胞機能が最も大きく改善された PUFA 種を基本として、最適な添加コンビネーション (カクテル = 組み合わせ + 各添加量) を細胞種ごとに検討していくこととした。

(1) 心筋細胞

培養心筋細胞の機能評価は拍動能 (無負荷時の拍動収縮率) と脂肪酸含有量で行い、最適な PUFA 混合条件を検討した。拍動能については、培養 7 日目の拍動の様子を顕微鏡下に動画として記録し、拍動域の最大収縮フレーム及び最大弛緩フレームを検出してそれらの面積から収縮率を計算した。培養組織内脂肪酸含有量 (全 22 種) は、14 日間の培養後に組織を採取し、ガスクロマトグラム法により求めた。

またこれと並行して、DHA もしくは AA の単独添加で最大拍動能が得られた条件において、培養心筋細胞の 1 週間後までの遺伝子発現を非添加培養の場合と比較して、分子生物学的にも拍動能の改善要因について検討した。対象遺伝子は心筋分化マーカーとして Mlx2、Srf 及び Nkx2.5、心筋成熟マーカーとして cTnT、P300 及び Err、細胞接着因子として Cx43 及び Cdh2、並びに脂肪酸代謝マーカーとして Cd36、Ppar 及び Ppar を選び、actin を housekeeping 遺伝子として real time PCR 法にて相対発現量を求めた。

(2) 脂肪細胞

脂肪細胞では一般的に、いまだに初代培養法自体が確立されていない状況であって、培養初期に死滅したり、異種細胞に変化してしまうことなどが報告されている。そこでまず脂肪組織を採取するラットの週齢について検討し、その後脂肪細胞に対する増殖能が報告されている PPAR を活性化できる DHA の培地内添加によって、安定した初代培養を可能とできるかどうかを中心に検討した。脂肪細胞の確認には Oil Red O 染色法を用いた。

4. 研究成果

(1) 心筋細胞

ラット胎児から採取・単離した心筋細胞を用いてリノレン酸、ドコサペンタエン酸、DHA、リノール酸もしくは AA の単独培地内添加培養実験を行い、拍動能や細胞内脂肪酸分布を検討した結果、DHA 20 μM と AA 50 μM 添加の場合に自発的拍動収縮率が最も高くなり ($P < 0.05$ vs. 無添加群)、その時の培養細胞内多価不飽和脂肪酸分布が生体内のそれに最も近いことが分かった。興味深いことにこの結果は両方の脂肪酸添加で同様で

あって、得られた最大拍動収縮率の値も近かった。一方他の脂肪酸の単独添加時の拍動能の向上は、細胞内脂肪酸を生体内のそれに近づけても DHA と AA に比して著しく低かった。

そこで次にこの2種の脂肪酸の最適混合条件を検討した。5~30 μM の DHA 及び 10~60 μM の AA を組み合わせて同時添加培養実験を行い、拍動能及び組織中脂肪酸分布から最適混合条件を検討した。その結果、DHA 10 μM 及び AA 10~20 μM の同時添加の場合に拍動収縮率が最も高くなった。この時の脂肪酸分布は予想に反して生体のそれとは必ずしも近くなかった。またこの場合の混合添加濃度は、それぞれの単独添加時に最大拍動能が得られた濃度よりもどちらも低い値であった。すなわち単独添加時の最適濃度の単純な合算では添加量が多くなりすぎ、脂肪酸の細胞毒性の影響が生じるものと考えられた。

またこの同時添加で得られた最大拍動収縮率は、期待に反して DHA 単独添加時のそれとほとんど変わらず、PUFA のみで改善できる最大機能は、PUFA を組み合わせてもそれほど大きくはならない可能性が示唆された。しかしながら今回の拍動能の評価は無負荷条件で行っているため、生体内に近い負荷条件下では異なる結果となる可能性は残されている。また AA の添加は概して単位時間当たりの拍動数を下げる傾向があり、その結果これと1回あたりの拍動収縮率を乗じた単位時間当たりの拍動能は、AA の添加量が多い程低い傾向となった。

次に同程度の最大拍動収縮率が得られた DHA (20 μM) もしくは AA (50 μM) の単独添加時における心筋培養細胞の遺伝子発現を非添加培養の場合と比較したところ、DHA 添加では脂肪酸代謝マーカ Cd36 の発現が培養期間全体にわたって、並びに成熟マーカ P300 が培養7日目に有意に亢進していた ($P<0.05$)。一方 AA 添加の場合には培養4日目に成熟マーカ cTnT、細胞接着因子 Cx43 及び脂肪酸代謝マーカ Cd36 の発現亢進が見られた ($P<0.05$) が、それ以降は差がみられなくなった。これらの結果、得られた最大拍動収縮率は同程度であったが、両脂肪酸の心筋細胞への作用機序は大きく異なっている可能性が示唆された。

またその他の殆どの遺伝子がむしろ無変化だったことは、心筋の分化や成熟、細胞接着に関する遺伝子の主な発現変化は、今回検討しなかった PUFA 添加後1日以内には既に終了している可能性も考えられる。今後は添加後のより早い時間帯における遺伝子変化の検討も必要と考える。

(2) 脂肪細胞

最初に、一般的に用いられている幼齢ラット(3週齢)から採取した白色脂肪細胞を用いて PUFA を添加せずに培養実験を行ったところ、既報通りに数日内に多数の培養細胞

が死滅することが多いことを確認した。

そこで上記の結果となってしまう主因が播種細胞の未成熟性にあるものとの仮説を立て、高週齢ラット(6もしくは12週齢)から採取した細胞での初代培養を試みたところ、予想通りに改善がみられた。この結果脂肪細胞では、一般的に細胞増殖能が低いと考えられて培養が難しいとされている高週齢ラット由来細胞での初代培養成績の方がむしろ優れている可能性が示唆された。また6週齢ラットから採取した脂肪細胞の培養過程における脱落は12週齢のそれよりも多い傾向であり、より高週齢個体の脂肪細胞を用いることの有用性が示唆された。しかしながらこの場合でも、培養日数が進むにつれて多くの生存細胞の形態が変化し、脂肪細胞かどうか疑われる状況となっていった。

そこで脂肪細胞に対する増殖能が知られている PPAR を活性化する目的でまず DHA (20 μM) を PUFA の代表として単独培地添加し、初代培養を試みたところ、細胞生存率はさらに若干改善され、Oil Red O で染色される細胞数も増加した。しかしながら、一般的な脂肪細胞とは異なる形態の培養細胞を著明に抑制することは、残念ながらやはり困難であった。

これらの結果、PUFA の単純な培地添加で脂肪細胞の初代培養効率を上げることは困難である可能性が高いものと考えられた。今後は脂肪細胞としての機能を維持できているかどうかの評価指標及びその測定法の開発を含めて、安定培養の条件をさらに見つけ出していく必要があるものと考えられた。

(3) 最適な添加脂肪酸の細胞種依存性

これらの心筋細胞と脂肪細胞の初代培養実験の結果、最適な培地添加脂肪酸カクテルの細胞種依存性については詳細には検討できなかったものの、少なくとも DHA の添加実験からは心筋細胞と脂肪細胞に及ぼす個々の脂肪酸の効果が異なっていることが示唆され、細胞種依存性は存在するものと考えられた。

<引用文献>

- 例えば Nagao and Yanagita, Prog. Lipid Res. 2008; 47, 123-146
- Karimata et al, In Vitro Cell Development Biol -Animal 2013; 49: 798-804
- Nakamura et al, 10th ASCC Invited Session (Kota Kinabalu), 2015.6
- Sugihara et al, J Lipid Res 1987; 28: 1038-1045
- Sugihara et al, J Lipid Res 1989; 30: 1987-1995
- Oster et al, Appl Physiol Nutr Metab 2010; 35: 783-789
- Souza et al, Annals Nutr Metab 2009; 54: 258-267

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yamada K, Sato D, Nakamura T, Amano H, Morimoto Y: Unknown biological effects of L-glucose, ALA, and PUFA. J Physiol Sci, 査読有, 67 巻, 2017, 539-548
DOI:10.1007/s12576-017-0544-x

〔学会発表〕(計 6 件)

佐藤大介, 大鳥真紀, 馮忠剛, 楠正隆, 中村孝夫: 多価不飽和脂肪酸の培地添加は培養心筋細胞の拍動収縮能を改善する. 第 57 回日本生体医工学会大会(オーガナイズドセッション), 2018

Nakamura T, Sato D, Saito J, Feng Z, Takahashi K, Kusunoki M: Supplementation of arachidonic or docosahexaenoic acid in culture medium improves contractile performance of cardiomyocytes. World Cong Med Physics Biomed Eng, 2018

佐藤大介, 小坂薫, 斉藤丈, 楠正隆, 中村孝夫: ラット培養心筋細胞の拍動能及び脂肪酸組成に及ぼす多価不飽和脂肪酸の効果. 第 69 回日本生物工学会大会, 2017

斉藤丈, 小坂薫, 佐藤大介, 馮忠剛, 楠正隆, 中村孝夫: ラット初代培養心筋細胞の拍動能に及ぼすドコサヘキサエン酸及びアラキドン酸の効果. 第 56 回日本生体医工学会大会, 2017

小坂薫, 井口聖也, 佐藤大介, 馮忠剛, 楠正隆, 中村孝夫: 多価不飽和脂肪酸の培地添加がラット培養心筋細胞の拍動収縮能に及ぼす効果. SICE LE シンポジウム, 2016

Nakamura T: Polyunsaturated fatty acids to maintain cardiomyocyte function in culture. 2nd Bio-IST Symp (招待講演), 2016

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

楠 正隆 (KUSUNOKI, Masataka)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・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

(3) 研究協力者

馮 忠剛 (FENG, Zhonggang)
高橋 和昭 (TAKAHASHI, Kazuaki)
佐々木 寛之 (SASAKI, Hiroyuki)
小坂 薫 (KOSAKA, Kaoru)
井口 聖也 (IGUCHI, Seiya)
斉藤 丈 (SAITO, Jo)
高橋 紳八 (TAKAHASHI, Shinya)
大鳥 真紀 (OTORI, Maki)
矢野 瑞菜 (YANO, Mizuna)