

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790179
 研究課題名 (和文) マグネシウムイオンによる脂肪細胞の生理機能調節メカニズムの解明
 研究課題名 (英文) Regulation of physiological functions by magnesium ions in white adipocytes
 研究代表者
 井上 華 (INOUE HANA)
 東京医科大学・医学部・助教
 研究者番号：20390700

研究成果の概要 (和文)：本研究ではまず初めに、生体から急性単離した脂肪細胞の細胞生理学的研究に適したプレパレーションの確立を行った。次にこのプレパレーションを用いて、白色脂肪細胞に容積感受性クロライドチャンネルが発現しており、脂肪細胞の容積調節に重要な役割を果たしていること、また糖尿病マウスではこのイオンチャンネルの発現量が減少していることを明らかにした。さらにマグネシウムによって活性が制御される MIC チャンネルが白色脂肪細胞に発現していることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)： In the present study, we have established the methods to prepare white adipocytes suitable for various physiological experiments. In this preparation, it was clarified that the volume-sensitive chloride channel is expressed and involved in volume regulation in white adipocytes. Expression level of this channel was decreased in white adipocytes from diabetic animals. Moreover, it was also revealed that white adipocytes express MIC channel which is regulated by both intracellular and extracellular magnesium ions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：分子・細胞生理学

1. 研究開始当初の背景

マグネシウムイオンは様々な細胞内酵素反応やイオンチャンネル活性を制御する重要なイオンである。肥満と関連した糖尿病では血中および細胞内マグネシウムイオン濃

度の低下が見られることから、脂肪細胞におけるマグネシウムイオン調節の破綻が疾患と関連している可能性が指摘されている。脂肪細胞において主要な生理刺激であるインスリンやグルコースは、心筋や骨格筋、

すい臓の細胞で細胞内マグネシウムイオン濃度を上昇させることが報告されているが、白色脂肪細胞のマグネシウムイオン動態に関しては、全く明らかになっていない。これは、生体から単離した白色脂肪細胞は、細胞質のほとんどが単胞性の脂肪滴で占められているために培養液中で浮遊し培養皿底面へ接着せず、細胞レベルでの蛍光イメージングや電気生理実験の遂行が技術的に困難であることが一因となっている。

2. 研究の目的

細胞生理学的実験に適した白色脂肪細胞のプレパレーション法を確立し、これを用いてマグネシウムイオンが白色脂肪細胞の生理機能にどのような役割を果たしているのかを検討する。

3. 研究の方法

(1) カバーガラスに細胞外マトリクスをコーティングし白色脂肪細胞を天井培養によって接着させる。コーティング剤を色々試し電気生理実験やイメージングに耐えうる接着を維持するものを見出す。

(2) (1) のプレパレーションを用い、パッチクランプ法による電気生理実験を行う。白色脂肪細胞にどのような膜輸送体（主にイオンチャンネル）が発現しどのような生理学的な役割を果たすのかを検討する。

(3) (1) のプレパレーションを用い、細胞内マグネシウムイオン濃度変化を furaptra を用いた蛍光イメージングによって観察する。インスリンやグルコースなどの生理刺激によって細胞内マグネシウムイオンがどのように変化するのかを検討する。

4. 研究成果

(1) 各コーティング剤による接着性と生理実験適応の可否を次の表に示す。

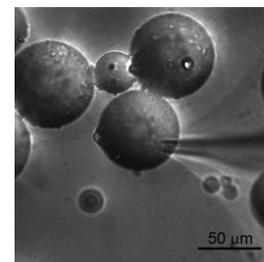
	コラーゲン	ポリエチレニミン	CellTak	Matrigel
電気生理実験	×	×	△*	○
イオンイメージング実験	×	×	×	×

*試薬ロット間でバラつきが大きい

生体内で白色脂肪細胞の主な細胞外マトリックスであるコラーゲンは接着が弱く電気生理実験・イメージング実験には不向きで

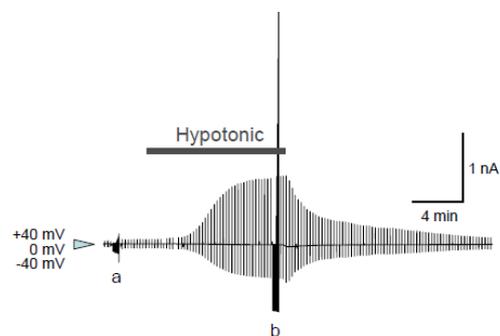
あることが分かった。電気生理実験には CellTak および Matrigel で接着させたものが使用できるが、イオンイメージング実験に使用できるほどの強固な細胞接着はどのコーティング剤にも認められなかった。

(2) CellTak または Matrigel でカバーガラスに接着させた白色脂肪細胞にパッチクランプ法を適用し

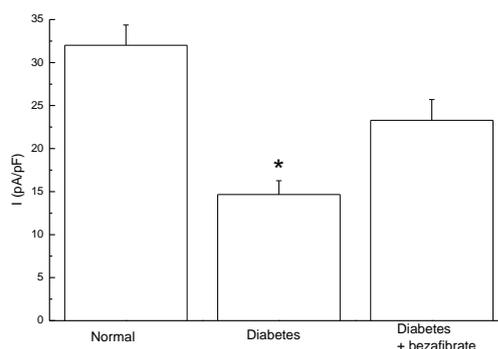


(右写真)、イオンチャンネルの発現について検討を行った。白色脂肪細胞には容積感受性クロライドチャンネル、MIC チャンネル、遅延整流型 K チャンネルが機能的に発現していることが明らかになった。

①容積感受性クロライドチャンネルは、細胞を低浸透圧刺激によって膨張させることで活性化される（下図）。

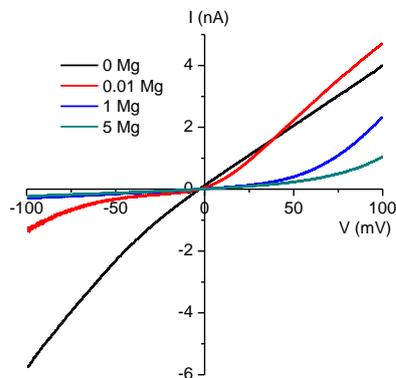


このチャンネルは白色脂肪細胞の細胞容積の調節に関与しているが、糖尿病マウスの白色脂肪細胞では、このチャンネルの発現が減少しており、糖尿病病態を改善する薬剤の投与によって発現が回復すること（下図：bezafibrate は糖尿病を改善し容積感受性クロライドチャンネルの発現も部分的に回復）を明らかにした（論文発表）。



②マグネシウムイオンによって活性が制御される MIC チャンネルが白色脂肪細胞に発現することが確認された（次ページ図）。しかしながら現在までのところ、白色脂肪細胞で細胞内マグネシウムイオン濃度を変化させると考えられる刺激（β受容体アゴニスト、イ

ンスリン、ATP およびグルコース)によって、MIC チャンネルの活性の制御は確認できていない。今後は引き続き白色脂肪細胞におけるMIC チャンネルの生理的機能について検討を行う。



上図：細胞外マグネシウム濃度を変化させると電流値が変化する。同様に細胞内マグネシウムイオンによってもMICチャンネルは活性制御を受けることを明らかにした。

(3) 生体から単離した白色脂肪細胞はその細胞質のほぼ99%が中性脂肪であるため、イオン濃度はそれ以外の1%の細胞質で変化すると考えられる。細胞容積の1%の蛍光変化を観察するのは、接着の弱い(つまりフラフラと動く)細胞では非常に困難であり、本申請研究期間内では成功していない。イオンイメージングは初代培養などをして強固に基質(カバーガラス)に接着した脂肪細胞で行う必要があると考えられる。

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)

H. Inoue, N. Takahashi, Y. Okada & M. Konishi (2010) Volume-sensitive outwardly rectifying chloride channel in white adipocytes from normal and diabetic mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298, C900-C909 査読有

[学会発表] (計3件)

H. Inoue, N. Takahashi, Y. Okada & M. Konishi (2008) Volume-sensitive chloride channel activity in freshly isolated white adipocytes. 日本生理学会大会

井上 華、小西真人 (2009) 白色脂肪細胞における容積感受性クロライドチャンネルの機能的発現と容積調節への関与。東京医科大学医学会総会

H. Inoue, N. Takahashi, Y. Okada & M. Konishi (2008) Volume-sensitive chloride channel activity in freshly isolated white adipocytes from normal and diabetic mice. International Congress of Physiological Sciences

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 華 (INOUE HANA)

研究者番号：20390700

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

