

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20179

研究課題名（和文）脂肪細胞における酸素および活性酸素種動態の解明

研究課題名（英文）Oxygen and reactive oxygen species dynamics in adipocytes

研究代表者

伊藤 栄紘（Ito, Hidehiro）

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：70707918

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本申請研究では、脂肪分解における細胞内酸素濃度変化、活性酸素種（ROS）と抗酸化剤の影響から、脂肪細胞の酸素とROS動態の解明を目指した。水溶性白金ポルフィリンを用いた脂肪細胞の酸素濃度イメージングでは、副産物で発生する一重項酸素により脂肪分解が阻害された。新たに合成した白金ポルフィリン修飾メソポーラスシリカナノ粒子を用いた細胞内酸素濃度イメージングでは脂肪分解の阻害は観察されず、一重項酸素の影響がないことが明らかになった。ROSによる脂肪分解阻害からの機能回復に向けて、様々な抗酸化剤を細胞へ添加して酸素濃度イメージングを行った際の細胞障害の軽減を調べた結果、グルタチオンの有用性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究で合成した白金ポルフィリン修飾メソポーラスシリカナノ粒子（PtP@MSN）による酸素濃度イメージングでは、一重項酸素による細胞への影響が見られなかった。PtP@MSNへの追加修飾により、生体成分との相互作用の低減や細胞取込み量の向上も達成され、細胞内酸素濃度イメージングに優れた酸素プローブを開発できた。また、グルタチオン、 α -トコフェロール、アスコルビン酸ナトリウムが抗酸化剤として一重項酸素による細胞障害の低減に効果があることが示された。今後、酸化ストレスを受けた細胞の状態などを調べる際に本研究成果で得られた知見が利用できると思われる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to understand the oxygen and ROS dynamics in adipocytes based on the effects of changes in intracellular oxygen concentrations, reactive oxygen species (ROS) and antioxidants on lipolysis. Oxygen concentration imaging of adipocytes using platinum porphyrins showed that lipolysis was inhibited by singlet oxygen generated as a byproduct. Using newly synthesized platinum porphyrin-modified mesoporous silica nanoparticles for intracellular oxygen concentration imaging showed no inhibition of lipolysis, indicating that singlet oxygen did not affect lipolysis. To restore function from inhibiting lipolysis by ROS, we investigated the reduction of cellular damage during oxygen concentration imaging by adding various antioxidants to cells. We found that glutathione was useful.

研究分野：生物無機化学

キーワード：脂肪細胞 活性酸素種 酸素濃度イメージング ポルフィリン メソポーラスシリカナノ粒子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界中で肥満者の増加により、糖尿病、高脂血症、高血圧などの生活習慣病を合併する患者数が増加し、医療福祉だけでなく社会問題としても大きな影響を与えている。肥満の悪性原因の一つとして、脂肪細胞内で発生する活性酸素種 (ROS) による酸化ストレスが挙げられる。生体内の ROS は酸素代謝の過程で発生し、主な酸素消費器官であるミトコンドリアの機能障害が肥満を引き起こす報告がある。肥満状態の脂肪細胞では、ROS 発生酵素の発現上昇と抗酸化酵素の発現低下の両方により ROS の産生が亢進する。この酸化ストレスの亢進により引き起こされるアディポサイトカインの発現・分泌異常や過剰に産生された ROS 自体が、インスリン抵抗性や代謝異常を合併するメタボリックシンドロームの原因である。一方、細胞レベルの脂肪代謝において酸素や ROS が関与することが明らかにされている。脂肪分解時はミトコンドリアの電子伝達系が亢進し酸素消費が増加する。しかし、肥満状態の脂肪細胞ではこの酸素消費が少ないと報告がある (Collins, *Diabetes*, 2011)。また理由は不明であるが、脂肪分解時に細胞内の ROS 濃度が時間経過と共に増加することが知られている (Ruderman, *J. BIO. CHEM*, 2012)。そして細胞内 ROS 濃度を低下させると脂肪分解酵素である Hormone Sensitive Lipase が脂肪的に近づくことができず、脂肪分解が起こりにくくなる報告もある (Corkey, *PLoS ONE*, 2012)。申請者らの先行実験結果から、脂肪分解促進剤を添加した脂肪細胞内で一重項酸素が発生した場合、通常起こるはずの脂肪分解が阻害されることが明らかになった (図 1)。これらの結果を踏まえると、脂肪分解には適切な ROS 濃度が存在することが考えられるが、これまでに細胞レベルでの酸素動態や脂肪分解に関与する ROS の種類や影響を詳細に検討した報告はない。

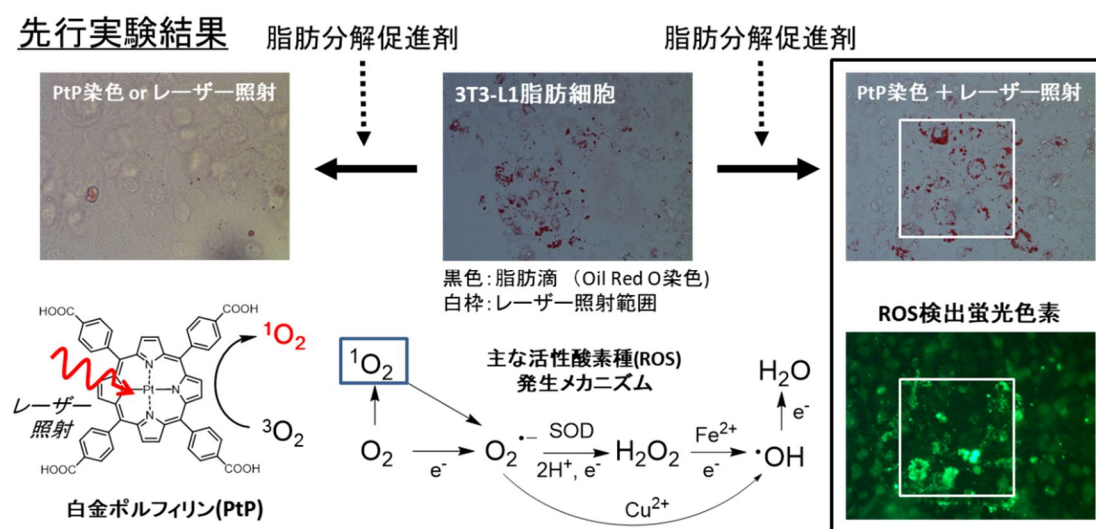


図 1. PtP を用いた酸素濃度イメージングにおける脂肪分解の阻害

2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪分解における細胞内酸素濃度変化、ROS刺激の影響と抗酸化剤による脂肪分解機能回復の観察から、脂肪細胞の酸素とROS動態を解明することである。本研究では、申請者らが開発した寿命測定共焦点顕微鏡によるイメージングシステムを用いることで、一細胞内の酸素濃度分布と脂肪滴の画像の高分解能かつ経時的な同時イメージングを達成できる (Ito, Kamachi, *Sci. rep.*, 2015)。さらに、副産物の一重項酸素が細胞へ影響を与えない改良酸素センシングプローブを用いることで、脂

脂肪分解への影響が無い酸素濃度イメージングが可能となる。これら独自の測定システムを用いて、脂肪細胞の細胞内酸素濃度変化と脂肪滴サイズを顕微鏡で同時観察し、脂肪分解時およびROS刺激時の酸素代謝への影響を明らかにする。

本研究で脂肪細胞への影響を調べるROSは、先行実験で効果が確認された一重項酸素を対象とする。従来では外部からROS自体や発生試薬を培地に添加するが、先行実験結果から酸素濃度イメージングに用いたプローブが副産物として発生させる一重項酸素が脂肪細胞へ影響を与えることが分かった。したがって、この反応を利用してレーザー照射範囲や時間を調整することで、既存の方法では困難な細胞内所定の位置に所定濃度の一重項酸素を発生させることが可能である。また、様々な抗酸化剤を添加し、ROSによる細胞障害の軽減からの機能回復を試みる。これらの技術により、一細胞レベルでのリアルタイムなROS刺激の影響を観察する。

3. 研究の方法

先行実験結果で、水溶性白金ポルフィリン(PtP)を用いた脂肪細胞の酸素濃度イメージングを試みたが、副産物で発生する一重項酸素により脂肪分解が阻害されてしまい、脂肪分解と酸素消費の関係を観察することができ

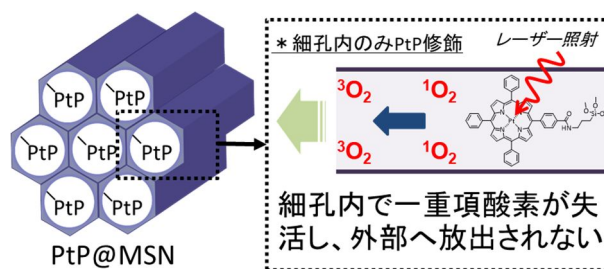


図 2. PtP@MSN の概略図

なかつた。申請者は一重項酸素が細胞へ影響を与えない PtP 修飾メソポーラスシリカナノ粒子 (PtP@MSN、図 2) を新たに開発した。この PtP@MSN は、細孔内のみ PtP を修飾しており、酸素との反応で発生した一重項酸素が孔内で失活することで細胞への流出を防ぐことが期待される。PtP@MSN の酸素応答性や水溶性向上のために、MSN 内外表面の追加修飾を試みた。PtP@MSN の細孔内にアルキル (メチル、ブチル、オクチル) 修飾をして、内部 PtP の分光特性を調べた。PtP@MSN の外部表面をポリエチレングリコール(PEG)で修飾して、培地中の分散性を評価した。さらに、効率よく PtP を細孔内に修飾するために、別の合成方法 (共縮合法) で PtP@MSN の調製を試みた。

脂肪細胞は、マウス線維芽細胞 3T3-L1 を既定のプロトコルで分化誘導して使用する。調製した脂肪細胞へ PtP@MSN と市販の脂肪滴蛍光色素 LipiDye を取り込ませ、寿命測定共焦点顕微鏡を用いた観察により細胞内酸素濃度と脂肪滴のイメージングを行った。脂肪分解促進剤であるホルスコリンを添加した時、細胞内酸素濃度と脂肪滴サイズの変化から脂肪分解時の酸素消費を評価した。また、酸素濃度イメージング後の ROS の発生量を ROS 検出試薬 H₂DCFDA で調べた。

ROS による脂肪分解阻害からの機能回復に向けて、様々な抗酸化剤を細胞へ添加して酸素濃度イメージングを行った際の細胞障害の軽減を調べた。マウス直腸癌由来細胞株 Colon-26 を用いて、抗酸化剤 (アスコルビン酸ナトリウム、 α -トコフェノール、アスコルビルグリコシド、パルミチン酸アスコルビルリン酸 3 ナトリウム、クエルセチン、ルチン、 β -カロテン、*N*-アセチルシステイン、グルタチオン) を取込ませ、その後 PtP を細胞に取り込ませて酸素濃度イメージングを行った。イメージング前後の細胞の形状から、ROS による細胞障害を評価した。細胞障害が軽減された抗酸化剤の一重項酸素消費能を調べるために、PtP と抗酸化剤を含む溶液に 405nm の LED 光を照射して、発生した一重項酸素を EPR 測定で検出した。

4. 研究成果

合成した PtP@MSN 分散溶液の吸収スペクトルを測定した結果、PtP 由来の Soret 帯と Q 帯のピークが観察された。また、PtP 単独では培地中で血清成分が含まれると発光強度が 16 倍増加したのに対して、PtP@MSN では増加率が 2.5 倍まで低減した。したがって、PtP@MSN では PtP と血清成分との相互作用が抑制され、発光強度変化がより酸素濃度により影響するようになったと言える。細孔内にアルキル修飾した PtP@MSN では水溶液中の発光強度が増加し、特にメチル修飾の場合 MSN 内で PtP の会合体形成の減少と血清成分との相互作用の抑制により発光強度の増加率が 1.5 倍まで低減した (図 3)。PtP@MSN 外部表面に PEG を修飾した場合、PtP@MSN の培地中での凝集体形成の抑制と細胞への取込み量の向上が見られた。このように、MSN 内外表面を追加修飾することで、酸素プローブの機能が向上した PtP@MSN が得られた。

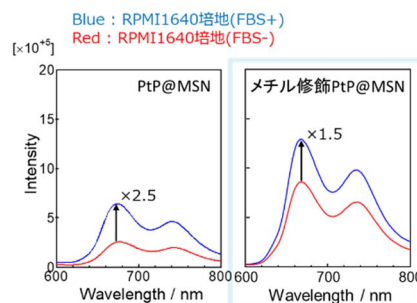


図 3. PtP@MSN の発光スペクトル

また、従来の PtP@MSN は合成した MSN の細孔内へ PtP を修飾して調製したが、修飾率が 3.6%と低く、細孔内で PtP の会合体が形成する課題があった。そこで、新たに MSN 合成時に PtP の細孔内修飾を同時に行う共縮合法で PtP@MSN の調製を試みた。共縮合法で調製した PtP@MSN (以降 PtP@cMSN と表記する) は、PtP の修飾率が 26%と増加しました。さらに PtP 量当たりの発光強度が、PtP@cMSN は PtP@MSN の 3 倍となりました。これは PtP 会合体形成による自己消光が減少したためであると考えられる。これらの結果から、共縮合法による PtP@MSN 合成の利点が示された。しかし、現在までに調製した PtP@cMSN は修飾される PtP 量が従来法と比べて低いという欠点もある。今後、これらの問題を解決してより良い酸素プローブとしての PtP@MSN の合成に取り組む。

合成した PtP@MSN を用いて、脂肪細胞の酸素濃度イメージング時における脂肪滴の状態を観察した。先行研究で PtP を用いた酸素濃度イメージングでは、脂肪分解促進剤を添加しても脂肪滴の減少は見られなかった (図 4A)。PtP@MSN による酸素濃度イメージングを行った細胞では、脂肪分解促進剤を添加した場合脂肪滴の減少が観察された (図 4B)。今回の酸素濃度イメージングの結果では、PtP、PtP@MSN どちらの場合も時間経過とともに細胞内の酸素濃度は若干減少した結果が得られた。PtP と PtP@MSN の細胞内酸素濃度イメージング後の細胞を ROS 検出試薬 H_2DCFDA で染色したところ、PtP の場合は細胞から ROS 存在による高い蛍光が観察されたのに対して、PtP@MSN の場合はほとんど蛍光が検出されなかった (図 5)。以上の結果から、PtP@MSN は酸素濃度イメージング時に発生する一重項酸素が細胞内に放出されず、脂肪細胞の脂肪分解には影響を与えない測定が可能であることが示された。

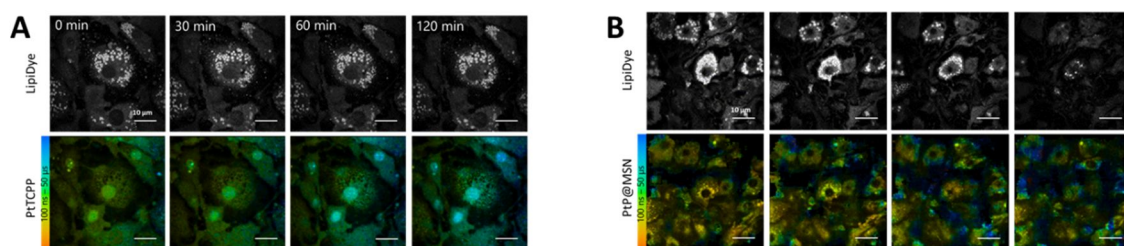


図 4. 脂肪分解促進剤添加後の細胞内脂肪滴、酸素濃度イメージング。A:PtP、B:PtP@MSN。

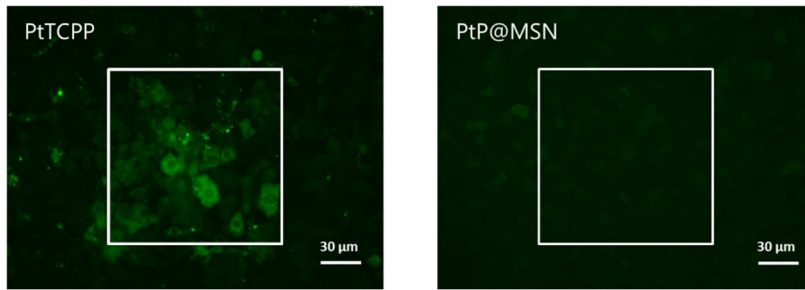


図 5. 脂肪細胞における酸素濃度イメージング後の細胞内 ROS 生成量 白枠：レーザー照射範囲

マウス直腸癌由来細胞株 Colon-26 を用いて、様々な抗酸化剤を取込ませた後、PtP を細胞に取り込ませて酸素濃度イメージング前後の細胞の状態を顕微鏡で観察した。抗酸化剤未添加時では細胞膜が損傷を受けたことによる細胞の肥大化が見られたが、グルタチオン添加時では、明らかに細胞の肥大化が軽減された（図 6）。このことからグルタチオンは酸素イメージングにおける細胞傷害を軽減できることが分かった。グルタチオン以外に、10 μM α -トコフェロール、1 μM アスコルビン酸ナトリウムを添加したところ、酸素濃度イメージング後の Colon-26 細胞の肥大化が軽減された。細胞が肥大化する原因としては PtTCPP への光照射によって発生する一重項酸素が、細胞膜と反応して過酸化脂質を生成していることが考えられる。抗酸化剤による細胞膜の損傷軽減のメカニズムとして 過酸化脂質生成の原因である一重項酸素や他の活性酸素種の直接的な消去、連鎖的な脂質過酸化反応の抑制、生成した過酸化脂質の修復・再生の 3 つが考えられる。グルタチオンの抗酸化メカニズム解明のために、EPR による一重項酸素発生量を分析・定量し、グルタチオンによる一重項酸素の消去能を検討した。EPR 測定の結果、一重項酸素はグルタチオンの濃度依存的に消去された（図 7）。したがって、グルタチオン添加による細胞膜傷害の軽減の理由の一つとして、グルタチオンによる一重項酸素の消去が挙げられる。

以上の結果から、脂肪細胞における酸素濃度イメージングにおける PtP@MSN の優位性と抗酸化剤グルタチオンの一重項酸素消去能が示された。今後は、改良した PtP@MSN や細胞障害低減が見られた抗酸化剤を用いて、当初の目的であった脂肪細胞における酸素と ROS 動態の解明を目指す。

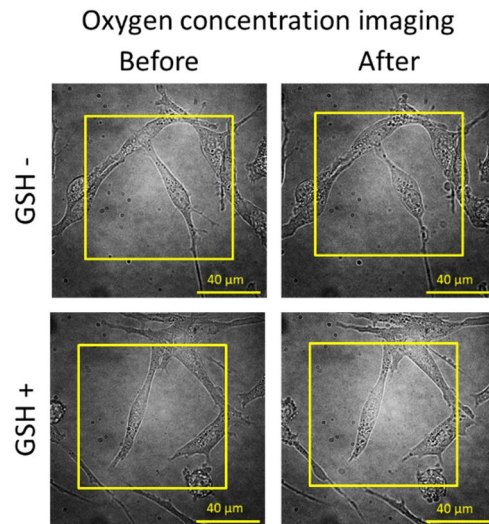


図 6. グルタチオン添加による酸素濃度イメージング後の細胞障害への影響 黄枠：レーザー照射範囲

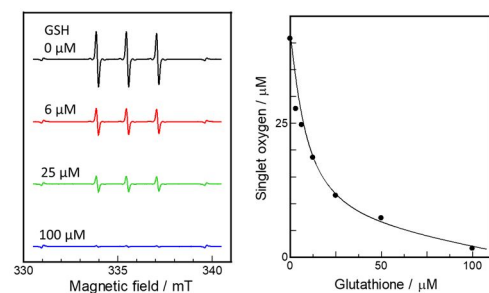


図 7. EPR 測定によるグルタチオンの一重項酸素消去能の検証

EPR 測定の結果、一重項酸素はグルタチオンの濃度依存的に消去された（図 7）。したがって、グルタチオン添加による細胞膜傷害の軽減の理由の一つとして、グルタチオンによる一重項酸素の消去が挙げられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊藤栄紘、山内杏里彩、尾台俊亮、岡本昌樹、蒲池利章
2. 発表標題 白金ポルフィリン修飾リン光性メソポーラスシリカナノ粒子を用いた3T3-L1脂肪細胞内酸素濃度イメージング
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hidehiro Ito, Arisa Yamauchi, Kazuma Maeda, Toshiaki Kamachi
2. 発表標題 Measurement of intracellular oxygen concentration change in 3T3-L1 cells by PLIM
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (Pacifichem 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内杏里彩、尾台俊亮、伊藤栄紘、岡本昌樹、蒲池利章
2. 発表標題 白金ポルフィリン修飾メソポーラスシリカナノ粒子を用いた脂肪細胞内酸素濃度イメージング
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------