

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号 : 24701
 研究種目 : 挑戦的萌芽
 研究期間 : 2011~2012
 課題番号 : 23659583
 研究課題名 (和文) 脂肪組織の機能的変化の可視化を目指した生体イメージング法の確立と診断への応用
 研究課題名 (英文) Establishments of *in vivo* imaging technique for functional visualization of adipose tissue and its potential application for diagnosis.
 研究代表者 井原 勇人 (IHARA HAYATO)
 和歌山県立医科大学・共同利用施設・講師
 研究者番号 : 00223298

研究成果の概要 (和文) : 我々は、脂肪組織重量の増加や脂肪細胞自体の肥大化など形態的・量的な変動だけではなく、脂肪組織の代謝や遺伝子発現などの機能的・質的な変化に注目し、悪玉アディポカイン遺伝子レポーター発現を指標として、生体イメージング可視化技術でモニターする系を構築出来ないか、その基礎的な検討を行った。将来的には、ただ単に脂肪が増え体重が増加したと言う側面だけでなく、増えた脂肪組織が病態生理的にどのような状態にあるかを推定可能な診断法への応用に繋がるものと考えられる。

研究成果の概要 (英文) : Our studies focused not only on morphological changes in an increase of adipose-tissue weight and adipocyte size, but also on functional changes in gene expression and metabolism of adipose tissue. In this report, we tried to establish an *in vivo* imaging technique using an adipokine-reporter gene as indicator of adipose-functional changes. In the future, using this imaging technique, we may provide a useful index of diagnosis for patho-physiological aspects of increased adipose tissue.

交付決定額

(金額単位 : 円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |

研究分野 : 医歯薬分野 分子細胞生物学、病態生理学

科研費の分科・細目 : 内科系臨床医学・放射線科学

キーワード : 生体イメージング、脂肪組織、病態生理機能、可視化

1. 研究開始当初の背景

(1) 脂肪組織は、これまで余剰エネルギーを溜め込むだけの静かな組織と考えられていたが、近年、様々な生理活性物質アディポカインを分泌し、体内で最大の内分泌器官として機能することが次第に明らかになってきた。これらアディポカインの産生異常がメタボリック症候群発症の原因の一つと考えられている。

(2) 申請者はこれらアディポカインのうち肥満と心血管系疾患発症を結びつける血栓危険因子 Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) が、脂肪細胞分化にともない核内受容体型転写因子 PPAR γ によって発現増強すること、また抗酸化ポリフェノール・レスベ

ラトロールが脂肪細胞分化を抑制し、インスリン抵抗性惹起物質レジスチン遺伝子発現を抑制することを明らかにしてきた。

(3) これらの知見を基に、脂肪細胞の病態生理学的側面を特徴付ける悪玉のアディポカイン遺伝子発現を、リアルタイム培養顕微鏡を用いてライブイメージングする研究を行っており、その中で生体イメージング法への応用を考えついた。

2. 研究の目的

(1) 本申請課題では、小動物を用いて悪玉アディポカイン遺伝子発現を指標にした質的な変化(病態生理機能変化)を生体内光イメージング法及び PET イメージング法で可視化し、

定量的にかつ実際の遺伝子発現量との相関性を確保できるかを検証しようとするものである。

(2) 将来的には、肥満に伴うメタボリック症候群発症リスクの診断法の確立や、レポーター導入肥満マウスを用いた新薬の治療効果の評価等の医学応用に繋げていきたいと考えている。

3. 研究の方法

(1) レポーター導入脂肪細胞の作成と細胞レベルでのレポーター発現制御の検証

① 申請者らの研究成果から、明らかとなっている PAI-1 遺伝子、レジスチン遺伝子の転写調節領域を PCR で増幅し、ルシフェラーゼ (Luc) レポーターの上流に繋ぎ、これら遺伝子プロモーターの制御下にレポーター遺伝子が発現する様にベクターを構築した。

② 次にこれらのベクターを培養脂肪細胞 3T3-L1 に導入し、ピューロマイシン薬剤耐性で選択の後、Luc レポーターは発光量によってスクリーニングし安定発現株を取得した。

(2) 生体内発光イメージング法による脂肪組織の病態生理機能の可視化

ヌードマウスを用いた生体発光イメージング法の検討：得られた安定発現株を用いてヌードマウスに部位特異的（内臓脂肪と皮下脂肪組織）に同数を同所移植し、以下の項目を検討した。

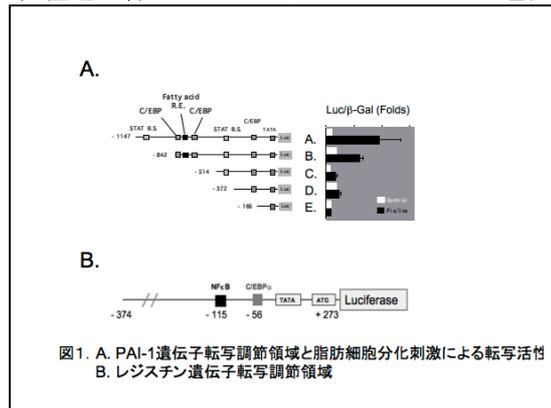
- 1) 移植細胞数とシグナルの定量性の相関
どの位の数のレポーター発現安定株細胞をヌードマウスのし棒細胞に移植すると十分なシグナル量とその定量性が確保出来るか検討した。
- 2) 移植部位依存的な発現・発光シグナル強度変化の検討
内臓脂肪・皮下脂肪組織の質的な違いに応じた発現・発光シグナルを検討した。
- 3) 内在性悪玉アディポカイン遺伝子発現とレポーター発光シグナルとの相関
悪玉アディポカイン遺伝子発現、PAI-1、レジスチン mRNA 発現と発光シグナルとの相関性の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 悪玉のアディポカイン (PAI-1 やレジスチン) 遺伝子転写調節領域/ルシフェラーゼレポーターを保持した培養脂肪細胞の安定発現株の取得 PAI-1 遺伝子、レジスチン遺伝子の転写調節領域/ルシフェラーゼレポーターベクターを前駆脂肪細胞 3T3-L1 細胞に導入し、ピューロマイシン耐性株を作成した (図 1)。

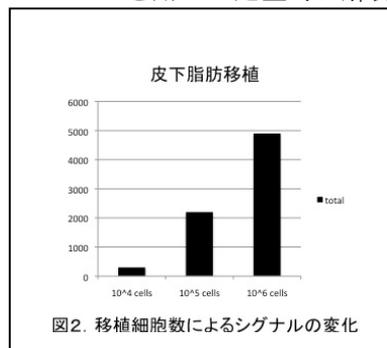
さらにこの中から脂肪細胞への分化能を保持し、かつ脂肪細胞分化によって発現増強

する安定発現株をルシフェラーゼアッセイによってスクリーニングし安定発現株を取得した。これらの安定発現株について脂肪細胞分化経過に伴いルシフェラーゼレポーター遺伝

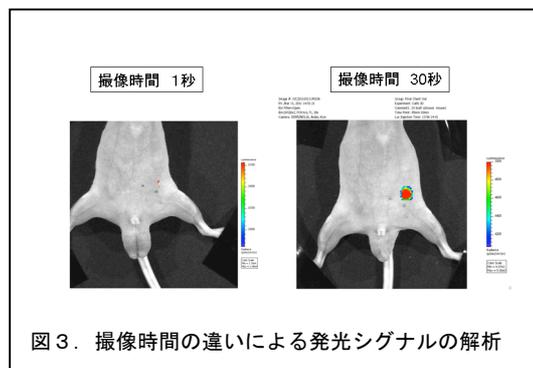


子が発現増強する事を確認した。

(2) 生理機能の異なる皮下脂肪組織と内臓脂肪組織への部位特異的移植による in vivo イメージング画像の定量性と mRNA 発現量との相関、各脂肪組織での質的变化の検証 定量解析するのに十分なシグナル量と移植細胞数との関係を調べるために、移植する安定発現株細胞の数を 0、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 cells と 5 段階に振り、またコントロール細胞株を同数移植し、In vivo 光イメージング画像解析装置 IVIS 200 を用いて定量的に解析した (図 2)。



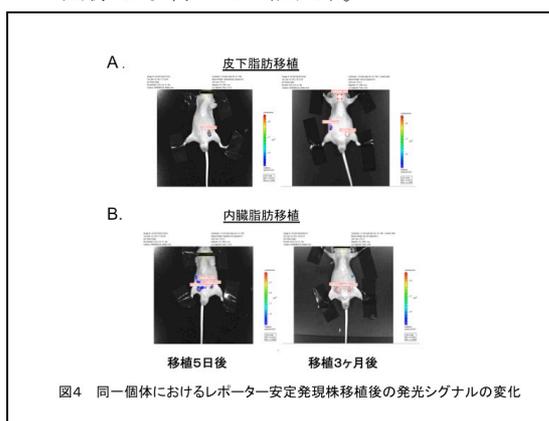
移植5日後ヌードマウスを麻酔し、ルシフェリン (150mg/kg) を腹腔内投与5分後の光イメージング画像を30秒間撮像した。 10^5 細胞数でも定量的に十分なシグナルが得られたが、 10^6 細胞数で安定なシグナル強度を得た (図 3)。



(3) 次にこの細胞を 10^6 個ヌードマウスの腹部の皮下脂肪および腹腔内臓脂肪に移植し、5日後、3ヶ月後の発光シグナルの定量的検討を行なった。5日後では定量的な解析が十分な範囲で行う事が出来たが、3ヶ月後にはレポーター・ルシフェラーゼの発現が減弱し、その程度には個体差もあった。以上のことからレポーター遺伝子安定発現株の移植による系は、メタボ発症のような長期に渉る観察には不向きである事が示唆された。

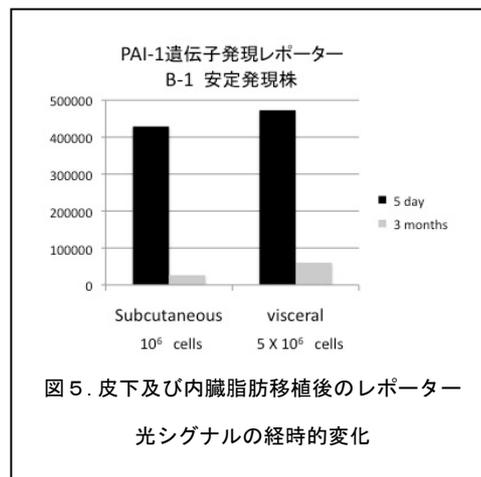
(4) 皮下脂肪と内臓脂肪組織への移植による生体光イメージング画像の比較と移植後の発光シグナルの経時変化

PAI-1・レポーター導入安定発現株をヌードマウスの麻酔下に、腹部皮下脂肪組織(10^6 細胞)並びに腹腔内臓脂肪組織(5×10^6 細胞)に移植した。腹腔内臓脂肪組織に移植したものは、光シグナルが生体内を通過して体外に出てくる過程で減弱する事が予想され、またプレ実験で皮下脂肪に移植した場合に比べて20~40%程に減弱することが認められたため、内臓脂肪組織には 5×10^6 細胞を移植した。移植後5日目と3ヶ月後に撮像し、光イメージング画像を取得した(図4)。



移植後5日目の内臓脂肪での総光シグナル量(分散して現れたものを合計)は、5倍量の細胞数を移植したにもかかわらず、皮下脂肪のそれに比べほとんど同程度であった。これは移植脂肪細胞でのレポーター遺伝子発現量が減少しているのではなく、生体内に存在する内臓脂肪から光が減弱する(約22%)ためであると考えられた。事実、内臓脂肪組織でのPAI-1 mRNA発現量が減少しているわけではないことから、このことが示唆された。

5日目のデータを見る限り、比較的短期の遺伝子発現変化をみるためには、レポーター発現株を移植する系は十分対応できるものと考えられた。



今回トライする事が出来なかったPETによるレポーター遺伝子発現の定量化する系についても今後チャレンジしていく予定である。

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7件)

1. Satomi, T., Ogawa, M., Mori, I., Ishino, S., Kubo, K., Magata, T., & Nishimoto, T: Comparison of Contrast Agents for Atherosclerosis Imaging Using Cultured Macrophages: FDG Versus Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide **JMN** 54 999-1004, 2013 (査読有)
2. 井原 勇人: 「抗酸化ポリフェノールによる脂肪細胞分化抑制機構のライブセルイメージング解析」和歌山医学 **63** (4), 162, 2012
3. Ogawa, M., Nakamura, M, Saito, Y., Kosugi, M, and Magata, Y : What Can Be Seen by 18F-FDG PET in Atherosclerosis Imaging? The Effect of Foam Cell Formation on 18F-FDG Uptake to Macrophages *In Vitro* **JMN** 53 55-58, 2012 (査読有)
4. 間賀田 泰寛: 放射能の投与量と収集時間が画質に与える影響に関する基礎検討 **核医学** 49(1), 23-25, 2012-02-29
5. 間賀田 泰寛: 中枢ニコチン受容体の in vivo イメージングプローブの開発 (AYUMI 長期ニコチン受容体刺激により誘発される生体機構変化) **医学のあゆみ** 237(11), 1057-1060, 2011-06-11
6. Koizumi, S., Gu, C., Amano, S., Yamamoto, S., Ihara, H., Tokuyama, T., and Namba, H.. Migration of mouse-induced pluripotent stem cells to

glioma-conditioned medium is mediated by tumor-associated specific growth factors. *ONCOLOGY LETTERS* **2**, 283-288, 2011 (査読有)

7. 井原勇人: 「赤ワインに含まれる抗酸化ポリフェノール・レスベラトロールの抗肥満・抗老化作用の解析 - 分子機構の解明とライブセルイメージングによる解析 - 」和歌山医学 **62** (4), 167, 2011

[学会発表] (計 6 件)

1. 井原勇人 「抗酸化ポリフェノールによる脂肪細胞分化抑制機構のライブセルイメージング解析」第 80 回 和歌山医学会総会 2012.
2. 井原勇人 「抗酸化ポリフェノール・レスベラトロールによる脂肪細胞分化抑制とアポトーシス誘導のライブセルイメージング」第 7 回 日本分子イメージング学会 2012
3. 井原勇人: 講演 「赤ワインに含まれる抗酸化ポリフェノール・レスベラトロールの抗肥満・抗老化作用の解析 - ライブセルイメージングによる解析を中心として - 」日本技術士会 中部食品技術士協議会 鳥羽市 (H23. 11. 19)
4. 井原勇人: 「赤ワインに含まれる抗酸化ポリフェノール・レスベラトロールの抗肥満・抗老化作用の解析 - 分子機構の解明とライブセルイメージングによる解析 - 」第 7 回 果実酒・果実飲料と健康に関する研究会 教育講演 和医大 (H23. 10. 2)
5. Koizumi, S., Yamamoto, S., Thura, M., Ihara, H., and Golannov, E.V.: Electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus up-regulates mitochondrial protein and stabilizes mitochondrial function in the cortex. *Neuroscience* **2011**, *Sfn* Washington DC, 2011
6. 井原勇人: 「脂肪細胞から分泌されるアディポカイン遺伝子発現制御機構 - 分子機構の解明と細胞イメージングによる解析 - 」第 1 回 生活習慣病研究セミナー 和医大 H23. 6. 27)

[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

井原 勇人 (IHARA HAYATO)

和歌山県立医科大学・共同利用施設・講師

研究者番号: 00223298

(2) 研究分担者

間賀田 泰寛 (MAGATA YASUHIRO)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス

研究所・教授

研究者番号: 20209399