

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25862009

研究課題名(和文)顎顔面部脂肪細胞および筋細胞の分化制御機構の確立

研究課題名(英文) Establishment of a preadipocyte differentiation mechanism in facial area

研究代表者

平田 佳永 (Hirata, Kae)

大阪大学・歯学部附属病院・医員(歯科医師)

研究者番号：00638596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ロイコトリエンは生体内で合成される局所の脂溶性メディエーターであるが、脂肪細胞分化における役割は不明である。本研究は、ロイコトリエンと脂肪細胞の分化・成熟との関連を明らかにすることを目的とした。3T3-L1前駆脂肪細胞分化の過程でロイコトリエンB4 (LTB4) 経路を阻害したところ、成熟脂肪細胞への分化が阻害された。siRNAを用いてLTB4のGタンパク質共役型受容体であるBLT1、BLT2の発現を抑制したところ、成熟脂肪細胞への分化が阻害された。これらの結果から、LTB4-BLTシグナル伝達経路が脂肪細胞の分化に関与し、BLTの発現抑制が脂肪細胞の分化を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Various inflammatory mediators related to obesity might be closely related to insulin resistance. Leukotrienes (LTs) are involved in inflammatory reactions. However, there are few reports regarding the role of LTs in adipocyte differentiation. Therefore, we investigated the role of leukotriene B4 (LTB4)-leukotriene receptor (BLT) signaling in mouse 3T3-L1 fibroblastic preadipocyte differentiation to mature adipocytes. Mouse 3T3-L1 preadipocytes were treated with lipoxygenase inhibitors, BLT antagonist, and small interfering RNA (siRNA) for BLT1 and BLT2 to block the LTB4-BLT signalling pathway, then the adipocyte differentiation was evaluated. Blockade of BLT signaling suppressed preadipocyte differentiation into mature adipocytes. In addition, knockdown of BLT1 and BLT2 by siRNAs dramatically inhibited differentiation. These results indicate the LTB4-BLT signaling pathway may positively regulate preadipocyte differentiation.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：脂肪細胞分化 生活習慣病 生理活性物質 siRNA 歯科矯正学 歯科薬理学

1. 研究開始当初の背景

近年の矯正歯科治療では、軟組織パラダイムという治療概念に基づいて治療計画が立案されている。また、若々しい容貌を保つために脂肪組織の存在は不可欠である。よって、脂肪細胞の分化・成熟過程を明らかにし、周囲組織との相互作用を解明することは、歯科矯正学の臨床においても意義深いことである。

脂質はシグナル分子としての役割を持ち、ステロイドホルモンなどの内分泌性因子、局所で一過性に産生され生理活性を発揮するオートコイド性因子、細胞内セカンドメッセンジャーとして生体の恒常性維持に深く関与する。また、脂肪細胞は、自身の分化および成熟過程でさまざまなアディポサイトカインを産生して、周囲の細胞の分化や増殖に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。

ロイコトリエン (leukotriene : LT) はリポキシゲナーゼ (lipoxygenase : LOX) 経路で局所の細胞膜アラキドン酸から合成され、近傍の細胞膜受容体に作用して標的細胞に特有の応答を引き起こすオートコイド性の脂溶性メディエーターである。ロイコトリエンのうち、LTB₄ は白血球遊走作用をもち、炎症性疾患やアレルギー性疾患に関与する。LTB₄ 受容体として G タンパク質共役型受容体である BLT1 および BLT2 が同定されており、従来より BLT1 は炎症反応に深くかかわると考えられてきた。肥満とインスリン抵抗性との間にはさまざまな炎症性メディエーターの関与が報告されているが、一方で局所の炎症性メディエーターであるロイコトリエンと脂肪細胞の分化・成熟に関する報告はきわめて少ない。

そこで、ロイコトリエン経路と脂肪細胞の分化・成熟との関連に着目し、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化系を用いてその役割を明らかにすることを目的に本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、局所の炎症性脂溶性メディエーターである LTB₄ と脂肪細胞分化との関連

を明らかにすることを目的とした。また、脂肪細胞の分化・成熟過程を明らかにすることにより、将来的には軟組織パラダイムに基づいた矯正歯科治療に応用することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) in vitro培養細胞実験系での検討

脂肪細胞分化系のモデルとして一般的に汎用されているマウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いる。3T3-L1 前駆脂肪細胞がコンフルエントになった段階で、1μM rosiglitazone, 150nM insulin, 1μM dexamethasone および 100μM 3-isobutyl-1-methylxanthine を含む分化誘導メディウムを用いて成熟脂肪細胞への分化誘導を行う。

LOX 阻害薬として nordihydroguaiaretic acid (NDGA)、特異的な 5-LOX 阻害薬として AA-861、LTB₄ 受容体拮抗薬として ONO-4057 を用いて、脂肪細胞分化の過程における LTB₄ 経路の影響を検討する。成熟脂肪細胞への分化の評価は、Oil Red O 染色および細胞内 triacylglycerol (TG) 含量の測定により行う。

(2) siRNAを用いた検討

BLT1 および BLT2 の発現を抑制するため、それぞれに特異的な small interfering RNA (siRNA) を作製する。前駆脂肪細胞にトランスフェクションして BLT1 および BLT2 の発現を特異的に抑制し、成熟脂肪細胞への分化誘導を行って Oil Red O 染色および細胞内 TG 含量の測定により成熟脂肪細胞への分化を評価する。

(3) データの解析・結果の妥当性に関する検討および研究の総括

得られたすべてのデータの解析を行い、その妥当性に関して検討を行う。妥当性に関しては、相互にデータの信頼性等を検証し、研究協力者である和田孝一郎教授と討論する。本研究の成果について国際的な学術雑誌に投稿するとともに、国内外の学会で発表を行う。

4. 研究成果

3T3-L1 前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化の過程で、LOX 阻害薬の NDGA を処置したところ、濃度依存的に成熟脂肪細胞への分化が抑制された。同様に、特異的な 5-LOX 阻害薬として AA-861 を処置した場合も、像度依存的に成熟脂肪細胞への分化が抑制された。さらに、LTB₄ 受容体拮抗薬 ONO-4057 の処置によっても、成熟脂肪細胞への分化が抑制された。これらの結果から、脂肪細胞分化に LTB₄ 経路が関与していること、および LTB₄ 経路を阻害することにより、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化が抑制されることが明らかになった。

3T3-L1 細胞分化における LTB₄ 受容体 BLT1、BLT2 のシグナル伝達経路の影響を検討するため、3T3-L1 分化誘導後の BLT1、BLT2 の発現をウエスタンブロットングにて確認したところ、成熟脂肪細胞への分化が進むにつれて、BLT1、BLT2 タンパク質の発現が増加することが明らかになった。

そこで、BLT1 および BLT2 に特異的な siRNA を作製して、ウエスタンブロットングにて siRNA の抑制効果を確認後、3T3-L1 前駆脂肪細胞にトランスフェクションし、成熟脂肪細胞分化への影響を検討した。BLT1 の発現を抑制して、成熟脂肪細胞への分化誘

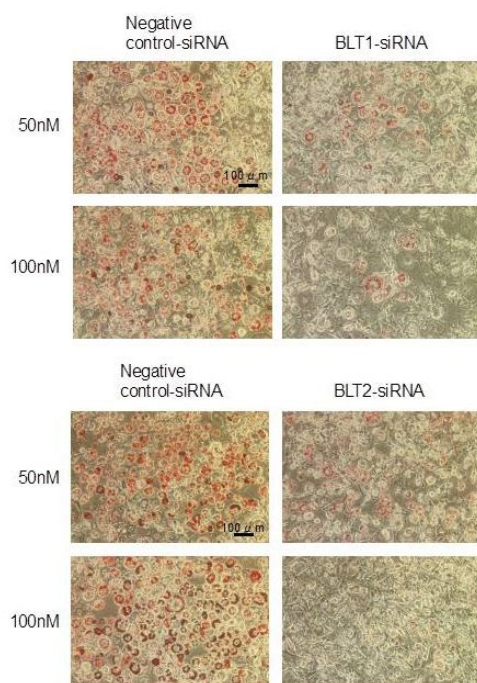


図1: BLT1, BLT2の発現抑制による前駆脂肪細胞分化への影響

導を行ったところ、negative control では細胞内脂肪蓄積が増加したのに対し、BLT1 の発現抑制により成熟脂肪細胞への分化が抑制された (図1)。同様に BLT2 の発現を抑制した場合も、成熟脂肪細胞への分化が抑制された (図1)。

さらに、3T3-L1 前駆脂肪細胞に BLT1-siRNA および BLT2-siRNA を同時にトランスフェクションし、両受容体の発現を同時に抑制したところ、成熟脂肪細胞への分化が相乗的に抑制された。

これらの結果から、3T3-L1 前駆脂肪細胞において、BLT1、BLT2 の発現抑制により成熟脂肪細胞への分化が抑制され、BLT を介したシグナル伝達経路により LTB₄ が脂肪細胞分化に関与することが明らかになった。

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3件)

Kae Hirata, Seiji Haraguchi, Wakako Tome, Takashi Yamashiro. Two-phase treatment in a patient with a skeletal Class III malocclusion: Early orthopedic treatment and subsequent camouflage treatment with temporary anchorage devices. *Orthodontic Waves*, 73, 2014, 102-109. 査読有.

DOI: 10.1016/j.odw.2014.06.002

Haruna Okamoto, Takakazu Yagi, Kae Hirata, Seiji Haraguchi. Treatment of a severe skeletal open bite with transverse maxillary distraction osteogenesis. *The Journal of Osaka University Dental Society*, 58, 2014, 91-98. 査読有. DOI: なし

Kae Hirata, Koichiro Wada, Yuka Murata, Atsushi Nakajima, Takashi Yamashiro, Yoshinori Kamisaki. Critical role of leukotrien B4 receptor signaling in mouse 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Lipid in Health and Disease*, 12, 2013, 122. 査読有.

〔学会発表〕(計7件)

村田 有香、平田 佳永、和田 孝一郎、山城 隆．脂肪細胞分化における microRNA の役割．第 73 回日本矯正歯科学会大会、2014 年 10 月 20-22 日、千葉．

(2)研究分担者
なし

平田 佳永、谷川 千尋、相川 友直、社浩太郎、古郷 幹彦、山城 隆．口唇裂・口蓋裂患者における上顎骨前方部延長術後 1 年の顎顔面形態の変化．第 73 回日本矯正歯科学会大会、2014 年 10 月 20-22 日、千葉．

(3)連携研究者
なし

清水 英孝、太田 嘉幸、平田 佳永、山城 隆、由良 義明．術直前に副甲状腺機能亢進症が判明した骨格性下顎前突症の 1 例．第 24 回日本顎変形症学会・学術大会、2014 年 6 月 10-11 日、福岡．

(4)研究協力者
和田 孝一郎 (WADA Koichiro)
島根大学医学部・教授
研究者番号：90263467

平田 佳永、谷川 千尋、森田 知里、相川 友直、石濱 孝二、古郷 幹彦、飯田 征二、山城 隆．非対称な上顎骨前方部延長術を行った骨格性 3 級の片側性唇裂および口蓋裂の症例．第 38 回日本口蓋裂学会・学術集会、2014 年 5 月 29-30 日、札幌．

谷川 千尋、平田 佳永、相川 友直、石濱 孝二、吉田 千秋、社浩太郎、古郷 幹彦、飯田 征二、山城 隆．第 38 回日本口蓋裂学会・学術集会、2014 年 5 月 29-30 日、札幌．

村田 有香、和田 孝一郎、平田 佳永、山城 隆．マイクロ RNA による脂肪細胞分化の制御．第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19-21 日、仙台．

平田 佳永、谷川 千尋、森田 知里、山城 隆．骨格性 2 級の偽性副甲状腺機能低下の一症例．2013 年 6 月 16 日、岐阜．

6．研究組織

(1)研究代表者

平田 佳永 (HIRATA Kae)