

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19590207
研究課題名（和文） ATPが引き起こす未分化脂肪細胞のケモタキシスのメカニズムと意義の検討
研究課題名（英文） Investigation of ATP-induced chemotaxis in preadipocytes
研究代表者 尾松 万里子 (OMATSU-KANBE MARIKO)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80161397

研究成果の概要：

マウスの前駆脂肪細胞である3T3-L1細胞を用い、その遊走性と生理的意義を検討した。未分化脂肪細胞はATPに対して正の化学走性を示したが、成熟脂肪細胞に遊走性を観察することはできなかった。次に、マウスの腸管膜を細胞外基質として用いたところ、細胞は約1時間で腸管膜表面に接着して移動を開始した。これらの結果から、未分化脂肪細胞は生体内においても遊走性を持ち、オリジナルの脂肪組織塊から派生した細胞が離れた場所に移動して接着し、増殖する可能性があると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：脂肪細胞，分化，細胞遊走，走化性，ケモタキシス，ATP，P2受容体，増殖

1. 研究開始当初の背景

終末分化した細胞以外の多くの細胞は、細胞外の刺激因子により細胞運動 (cell migration) を行うことが知られている。移動の方向が刺激因子の濃度勾配によって規定される遊走はケモタキシス (chemotaxis, 化学走性) と呼ばれ、白血球の炎症箇所への遊走、ミクログリア細胞の脳の損傷部位への遊走、癌細胞の浸潤、あるいは線維芽細胞の遊走などが知られている。ケモタキシスを引き起こすサイトカインはケモカインと呼ばれており、さまざまな体細胞から産生され、炎症反応、傷の修復、免疫応答などの生命維持活動に極めて重要な役割を果たしている。一方、細胞遊走の異常は、これらの作用の機能低下あるいは異常亢進を引き起こし、生体において多岐にわたる重大な影響を及ぼす。

これまで申請者らは、ラット褐色脂肪細胞を用いて細胞外 ATP の容量性 Ca^{2+} 流入制御機構を検討し、(1) ATP が P2 受容体を介して容量性 Ca^{2+} 流入の阻害を引き起こすこと、および(2) P2 受容体を介する細胞骨格タンパク質アクチンの細胞膜近傍における再構築が Ca^{2+} 流入阻害と密接な関係があることを見出した。細胞膜におけるアクチン再構築は細胞運動中に見られる現象であるが、褐色脂肪細胞は終末分化細胞であるため形態変化のみ見られ、細胞の移動はほとんどない。

近年、細胞外 ATP がミクログリア細胞においてケモカインとして働くことが報告され、損傷を受けた脳細胞からの ATP の放出がミクログリア細胞を引き寄せ、壊死組織

等の食食を促すと考えられている。そこで、未分化のマウス胎児由来前駆脂肪細胞株である 3T3-L1 細胞を用いたところ、ATP (10 μM , 5 min) によって強い細胞膜ラッフリング (波打ち膜) が観察された。ラッフリングは細胞運動の際、進行方向の細胞膜に葉状に広がる仮足 (葉状仮足) が形成されることによって見られる。3T3-L1 細胞は遊走性を持つ線維芽細胞から確立された株細胞であることから、ATP に対して化学走性を示す可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題は、3T3-L1 細胞を用いて ATP を初めとする細胞外ヌクレオチドによるケモタキシスの発生と調節機構の分子基盤を解明し、ATP が生体内で脂肪組織が増大する際に担う生理的意義を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 未分化 3T3-L1 細胞の培養

この細胞株は、100%コンフルエントになると接触障害をおこして増殖を停止し、分化へのプロセスが進み始める。従って、常に 70%コンフルエント以下の密度を保つように播種して継代を行う。

(2) 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化

100%コンフルエントになるまで細胞増殖させ、さらに3日間インキュベートし

てクローナルエクспанションをおこさせる。その後、インスリン、デキサメサゾン、イソブチルメチルキサンチンから成る分化誘導因子を加えて分化を開始させる。3日後、脂肪細胞へ分化した細胞をインスリンを含む培地で培養して培地中のグルコースを取りこませて脂肪滴を増大させる。その後は通常の培地で培養する。

(3) ケモタキシスアッセイ

細胞遊走を観察するために、カバーガラス上に細胞を接着させて培養し、ダン・ケモタキシスチャンバーに装着する。ATP等の濃度勾配を作成し、倒立型顕微鏡のステージ上に固定した後、37°Cで1時間インキュベートする。その間、5分毎に微分干渉像を撮影し、解析する。

(4) アクチン染色

細胞をホルマリン固定し、界面活性剤で処理した後、蛍光標識したファロイジンで染色し、共焦点走査型レーザー顕微鏡で観察する。

4. 研究成果

未分化脂肪細胞をATP刺激(10 μ M, 5分間)した後、ホルマリン固定して細胞骨格を構成するタンパクであるアクチン染色をおこなった。その結果、無処理の細胞では、ストレスファイバーが発達し、線維芽細胞で見られるような形状を示したが、ATP処理によってアクチンタンパクの形態は大きく変化した。即ち、細胞内に発達していたストレスファイバーは消失し、細胞膜近傍にアクチンが集積し、葉状仮足(ラメリポディア)およ

び糸状仮足(フィロポディア)が観察された。(図1)これらは、移動中の細胞の細胞膜によく見られるアクチンの形態であり、細胞骨格の再構築により、細胞が移動している可能性が示唆された。

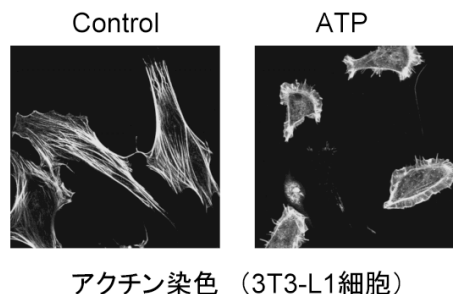


図1

未分化3T3-L1細胞は、培養中においても顕微鏡下の観察で細胞運動が観察された。即ち、起点を中心とした同心円状にランダムな移動をおこなった。このことから、この細胞が移動し易い性質を持っていることが推察された。(図2)

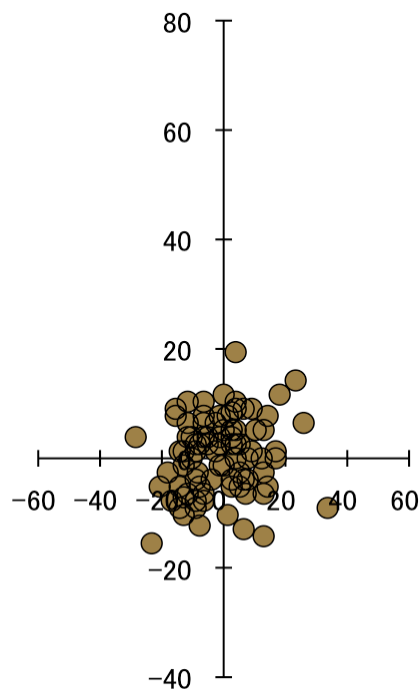


図2

次に、ATPの濃度勾配を作成して観察したところ、ケモタキシスが観察された。(図3)

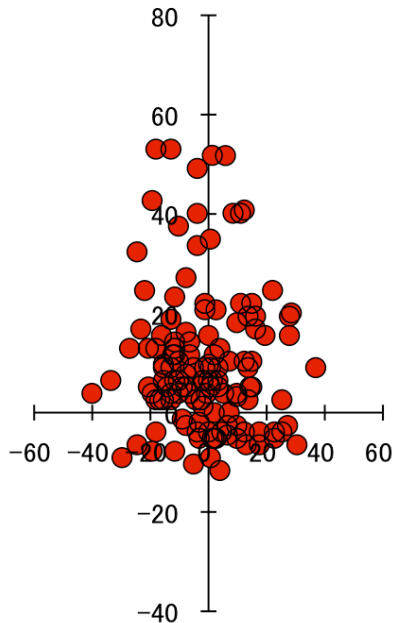


図3

これらのことから、細胞外ATPは未分化脂肪細胞に対してケモカインとして作用することがわかった。非特異的P2受容体阻害剤であるスラミンはこのケモタキシスを阻害しなかった。一方、成熟脂肪細胞はガラス表面に強固に接着し、遊走性を観察することはできなかった。

未分化脂肪細胞が生体内においても遊走をおこなうかどうかを調べる手段として、細胞外マトリックスとして腸管膜を用いてアッセイをおこなったところ、約1時間のインキュベートで細胞は腸管膜に接着し、細胞運動を開始することがわかった。

これらの結果から、未分化脂肪細胞は生体内においても遊走性を持ち、オリジナルの脂肪組織塊から派生した細胞が離れた場所へ移動して接着し、増殖する可能性があること

考えられた。

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 6 件)

- (1) Omatsu-Kanbe, M. and Matsuura, H. (2009) A novel type of self-beating cardiomyocytes in adult mouse ventricles. *Biochem. Biophys Res Commun.* 381, 361-366. (査読有)
- (2) Isoya, E., Toyoda, F., Imai, S., Okumura, N., Kumagai, K., Omatsu-Kanbe, M., Kubo, M., Matsuura, H., and Matsusue, Y. (2009) Swelling-Activated Cl⁻ Current in Isolated Rabbit Articular Chondrocytes: Inhibition by Arachidonic Acid. *J Pharmacol Sci.* 109, 293-304. (査読有)
- (3) Zankov, D. P., Toyoda, F., Omatsu-Kanbe, M., Matsuura, H. and Horie, M. (2009) Angiotensin II type 1 receptor mediates partially hyposmotic-induced increase of I_{Ks} current in guinea pig atrium. In press. (査読有)
- (4) 松浦 博, Dimitar P. Zankov, 尾松万里子, 堀江 稔 (2008) 心房筋伸展によるA₁受容体を介した緩徐活性型遅延整流性K⁺電流(I_{Ks})の増大; 心房細動のARBによるアップストリーム治療のメカニズム. *分子血管病* 9, 456-461. (査読有)
- (5) Hayase, F., Matsuura H., Sanada M., Kitada-Hamada K., Omatsu-Kanbe M., Maeda, K., Kashiwagi, A. and Yasuda, H. (2007) Inhibitory action of protein kinase Cβ inhibitor on tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in small dorsal root ganglion neurons in diabetic rats. *Neurosci Lett* 417, 90-94. (査読有)
- (6) 松浦 博, Dimitar P. Zankov, 尾松万里子, 磯野高敬, 豊田 太, 丁 維光, 堀江 稔 (2007). イオンチャネル異常による致死性不整脈. 心房筋細胞におけるA₁受容体を介した緩徐活性型遅延整流性K⁺電流(I_{Ks})の増大と活動電位の短縮—心房筋細胞治療におけるA₁受容

体遮断薬の有効性との関連—日本心電学会誌「心電図」**27**, 145-153. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

- (1) Omatsu-Kanbe, M., Fujii, Y & Matsuura, H. Cell migration of preadipocytes on the isolated mouse mesentery. *Journal of Physiological Sciences* **58**, S202, 2008. (第 85 回日本生理学会大会, 東京)
- (2) Zankov, D.P., Toyoda, F., Omatsu-Kanbe, M., Matsuura, H. & Horie, M. Angiotensin II Type 1 Receptor Partially Mediates Hypoosmotic-Induced Increase of Guinea Pig Atrial I_{Ks} Current. (52nd Annual Meeting of Biophysical Society, Long Beach, Florida, USA, February 2-6, 2008)
- (3) Omatsu-Kanbe, M., Fujii, Y & Matsuura, H. Extracellular ATP-induced cell migration of preadipocytes: Chemotaxis and chemokinesis. *Journal of Physiological Sciences* **57**, S86, 2007. (第 84 回日本生理学会大会, 大阪)
- (4) Fujii, Y., Omatsu-Kanbe, M., Isono, T. & Matsuura, H. Role of phosphoproteins modified by the stimulation of P2Y receptor in adipocyte differentiation. *Journal of Physiological Sciences* **57**, S125, 2007. (第 84 回日本生理学会大会, 大阪)
- (5) 松浦 博, Dimitar P. Zankov, 尾松万里子, 磯野高敬, 豊田 太, 丁 維光, 堀江稔. 心房筋細胞における AT_1 受容体を介した緩徐活性型遅延整流性 K^+ 電流 (I_{Ks}) の増大と活動電位の短縮—心房細動治療における AT_1 重油対遮断薬の有効性との関連—*Japanese Journal of Electrocardiology* **27**, 145-153, 2007 (第 23 回日本心電学会シンポジウム, 東京)
- (6) Zankov, D.P., Toyoda, F., Omatsu-Kanbe, M., Matsuura, H. & Horie, M. Angiotensin II Type 1 Receptor Partially Mediates Stretch-Induced Potentiation of the Slow Component of Delayed Rectifier Potassium Current in Guinea

Pig Atrium. (Scientific Session 2007 of American Heart Association, Orland, Florida, USA, November 4-7, 2007)

- (7) Kubo, T., Ding, W.-G., Toyoda, F., Fujii, Y., Omatsu-Kanbe, M., Miura, Y., Mino, T. & Matsuura, H. Upregulation of HERG potassium channel function by phosphatidylinositol-4-phosphatase 5-kinase. *European Heart Journal* **28**, 223-224 (European Society of Cardiology Congress 2007, Vienna, Austria, September 1-5, 2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾松 万里子(OMATSU-KANBE MARIKO)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 8 0 1 6 1 3 9 7

(2) 研究分担者

なし