

論文の内容の要旨

論文題目 **Thermo-sensitive Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV)
Channels in Mouse Adipocytes**

(マウス脂肪細胞における温度感受性 Transient Receptor Potential Vanilloid
(TRPV) チャンネルに関する研究)

氏名 菊池 宏信

脂肪細胞は、さまざまな刺激に応じてアディポサイトカインを産生、分泌し、糖、脂質代謝に重要な役割を演じている。また、肥満によるアディポサイトカインの産生異常は、糖尿病、高脂血症、高血圧などの生活習慣病を引き起こす要因である。また、脂肪組織は、温度などの刺激で、さまざまなサイトカインを産生し、各種病態に関係するとともに、生体の機能調節に重要な役割を演じている。最近、肥満に対する有効性が報告されているカプサイシンなどの辛味成分が、温度センサーとしての **transient receptor potential (TRP)** チャンネルを介し、脂肪細胞の機能調節に関与することが報告されている。実験的にもラットを高温と低温環境で飼育した場合に、有意に皮下脂肪の量が高温で飼育したほうが少ないことが報告されている。さらに、1月の平均の気温と **body mass index (BMI)** とは逆相関する、すなわち、気温が高いほど **BMI** が低いというヒトでの報告も見られる。このように、脂肪量は、温度と密接な関係にあることが推測される。温熱療法は、癌治療に用いられるが、肥満に対しても有用な方法である可能性がある。

また、近年、**interleukin-6 (IL-6)** は、炎症性サイトカインとされてきたが、脂肪細胞において産生、分泌されるとともに、運動などにより一過性に筋肉からも産生、分泌されるマイオカインと考えられている。こうした一過性に分泌される **IL-6** は、むしろ、脂肪分解、インスリン抵抗性の改善をみとめ、肥満などの病態の改善につながる可能性がある。この脂肪細胞における **IL-6** 分泌においても温度センサーとしての **TRP** チャンネルが関与している可能性が報告されているが、その詳細は不明である。**TRP** チャンネルは、**TRPC**、**TRPV**、**TRPM**、**TRPA**、**TRPP**、**TRPML** の 6 つのサブファミリーからなり、さらに **TRPC** には **C1-C7**、**TRPV** には **V1-V6**、**TRPM** には **M1-M8** までのサブタイプが報告されている。そこで、本研究は、温度センサーとしての **TRP** チャンネル、とくに **TRPV** チャンネルの脂肪細胞における発現と機能を明確にし、脂肪細胞を標的にした温熱刺激の効果とその分子的機序、生理機能調節メカニズムの解明することを目的とした。

本研究は、材料として脂肪前駆細胞のセルラインである **3T3-L1** 細胞および分化させた

3T3-L1 脂肪細胞を用い、Fura-2 AM による 2 波長励起法により細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定、リバーシ・トランスクリプターゼ・ポリメラーゼ・チェイン・リアクション (RT-PCR) 法、定量的 RT-PCR 法、免疫染色法、フローサイトメトリー法、ELISA 法などで検討した。また、成熟した adult の脂肪組織、皮下脂肪と内臓脂肪より蛋白及び total RNA を抽出して TRPV の蛋白及び mRNA 発現を検討した。

はじめに、3T3-L1 細胞における TRP family (canonical TRP (TRPC1-7), vanilloid-related TRP (TRPV1-7) さらに、melastatin-related TRP (TRPM1-8) mRNA の発現を定量的 RT-PCR 法により検討した結果、この細胞には、TRPC1, TRPV1, TRPV2, TRPV4 そして、TRPM7 が多く発現していた。とくに、TRPV1, 2, 4 は、温度、ストレッチ、さらには、細胞の膨化(低浸透圧)により活性化される温度感受性チャンネルであり、脂肪細胞の機能において重要な役割を演じていると思われる。なお、TRPV の発現量は $\text{TRPV2, TRPV4} > \text{TRPV1}$ であった。又、TRPV1 は、脂肪細胞の分化により mRNA は、増加したが、TRPV4 は、前駆細胞において、多く発現しており、各 TRP チャンネルは脂肪細胞の機能に異なった役割を演じていることが推測される。さらに、内臓脂肪の方が、皮下脂肪よりやや高温環境にあるため、内臓脂肪及び皮下脂肪における違いの有無についても検討したが、有意な発現量の違いは見られなかった。各チャンネルの温度による活性化の閾値は、TRPV1 ($>43^{\circ}\text{C}$), TRPV2 ($>49^{\circ}\text{C}$), TRPV4 ($>24^{\circ}\text{C}$) であり、実際に、脂肪前駆細胞及び分化した脂肪細胞に温度に感受性 TRPV チャンネルが機能しているか否か、Fura-2 AM を用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定を実施した。3T3-L1 前駆細胞で、細胞外温度を $20\text{-}50^{\circ}\text{C}$ に段階的に変化させたときの細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼす効果を検討した。3T3-L1 前駆細胞の外液の温度を段階的に上昇させると細胞外に Ca 存在下では、細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼす温度の影響は明らかでないが、細胞外に Ca 存在下では、細胞外温度を上昇すると明らかに細胞内 Ca^{2+} 濃度は増加した。その活性化閾値は、 25°C 以上と 40°C 以上に認められ、いくつかの温度センサーとしてのチャンネルの存在が示唆された。さらに、native な脂肪組織の TRPV 発現を検討すると TRPV1, TRPV2, TRPV4 の発現が確認された。これまで、脂肪細胞における TRPV1-4 の検討した報告では、TRPV1, TRPV4 の発現が報告されている。今回の RT-PCR ならびに Fura-2 の検討から、いくつかの TRPV の関与も考えられる。そこで、各種選択的 agonist による影響を検討した。capsaicin (TRPV1 agonist), probenecid (TRPV2 agonist), GSK1016790A (TRPV4 agonist) 及び TRPV1-V3 の agonist である 2-APB (TRPV1-3 agonist) は、細胞外 Ca 存在下では、細胞内 Ca 濃度の上昇をきたしたが、細胞外 Ca 非存在下では明らかな上昇をきたさなかった。さらに、これらの Ca 流入は、TRPV の非選択的拮抗薬である ruthenium red 抑制された。以上より、3T3-L1 脂肪前駆細胞には、温度感受性 TRPV チャンネル、TRPV1, TRPV2, TRPV4 が発現し、機能していることが考えられた。同様に、分化された 3T3-L1 脂肪細胞においても、これらの agonist による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が認められた。とくに、TRPV2, TRPV4 は、温度以外でも細胞の膨化、ストレッチで活性化することが報告されている。肥満の形成において、脂肪を取り込んだ細胞の膨化

が重要であるが、TRPV2, TRPV4 は、これらの病態においても、何らかの関与をしていることが推測される。

脂肪細胞の機能において、細胞内 Ca^{2+} 濃度が重要な役割を演じていることが知られている。そこで、脂肪細胞の機能における温度感受性 TRPV チャンネルの役割につき、脂肪前駆細胞の分化及び脂肪細胞の IL-6 分泌に及ぼす影響につき検討した。脂肪細胞への分化は、脂肪滴の BODIPY 染色により FACS で検討した。3T3-L1 前駆細胞を 42°C で1時間の温熱刺激を与えると、その後の脂肪細胞への分化が著明に抑制された。また、IL-6 は、炎症性サイトカインとされてきたが、脂肪細胞において産生、分泌されるとともに、運動などにより一過性に筋肉からも産生、分泌されるマイオカインと考えられている。こうした一過性の IL-6 分泌は、むしろ脂肪分解、インスリン抵抗性の改善をみとめ、肥満などの病態の改善につながる可能性がある。この脂肪細胞における IL-6 分泌においても温度センサーとしての TRP チャンネルが関与している可能性がある。最近、TRPV4 が脂肪細胞における炎症、エネルギー代謝に関与し、IL-6 分泌などにも直接関与していることが報告されている。分化した 3T3-L1 脂肪細胞において、 42°C で温熱刺激を与えると、Western blotting で IL-6 蛋白質の発現が亢進した。さらに、capsaicin, probenecid, GSK1016790A 投与では、ELISA により脂肪細胞からの IL-6 分泌が亢進した。

これらの実験結果から明らかとなったことをまとめると、以下のとおりである。(1) 3T3-L1 脂肪前駆細胞及び分化した脂肪細胞において、温度感受性 TRPV チャンネル、TRPV1, TRPV2, TRPV4 が発現し、native な脂肪組織においても TRPV1, TRPV2, TRPV4 の発現が確認された。(2) 3T3-L1 前駆細胞の外液の温度を段階的に上昇させると細胞外に Ca 存在下では、細胞外に Ca 存在下では、細胞外温度を上昇すると明らかに細胞内 Ca^{2+} 濃度は増加し、その活性化閾値は、 25°C 以上と 40°C 以上に認められ、いくつかの温度センサーとしてのチャンネルの存在が示唆された。(3) capsaicin, probenecid, GSK1016790A 及び TRPV1-V3 の agonist である 2-APB は、細胞外 Ca 存在下では、細胞内 Ca 濃度の上昇をきたした。(4) 3T3-L1 前駆細胞を 42°C で1時間の温熱刺激を与えると、その後の脂肪細胞への分化が著明に抑制された。さらに、分化した 3T3-L1 脂肪細胞において、 42°C で温熱刺激を与えると、Western blotting で IL-6 蛋白質の発現が亢進した。さらに、capsaicin, probenecid, GSK1016790A 投与では、ELISA により脂肪細胞からの IL-6 分泌が亢進した。

本研究の結果から、脂肪細胞における温度感受性 TRPV チャンネルが、肥満などの病態との関連する可能性があること、さらに、温熱刺激が肥満や糖尿病、高血圧などの生活習慣病にともなうインスリン抵抗性などの病態の改善につながる新たな治療法につながる可能性があると思われた。今後、臨床的検討が必要であると考えられた。