

## 論文の内容の要旨

論文題目 Roles of Voltage-Gated Calcium Channels in Mouse Preadipocytes  
和訳 マウス脂肪細胞における電位依存性カルシウムチャネルの役割に関する研究  
指導教員 永井 良三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 小栗 淳

肥満形成のメカニズムを、脂肪細胞からとらえると、脂肪細胞が肥大することであり、その数を増すことである。脂肪前駆細胞が主に増殖し、脂肪細胞へ分化して、脂肪細胞の数が増加する。一方で、細胞増殖に対して、イオンチャネルが重要な役割を持つことがわかっている。電位依存性カルシウムチャネル ( $Ca_v$ ) は、さまざまな細胞に遍在しており、細胞増殖を含めた様々な重要な役割を担っている。 $Ca_v$  はその薬理学的性質や電気生理学的性質により、T 型、L 型、N 型、P/Q 型、R 型に分類される。 $Ca_v$  は  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  の 5 つのサブユニットから成り、 $\alpha_1$  サブユニットが中心機能を担うが、 $\alpha_1$  サブユニットは、 $\alpha_{1A-1}$  および  $\alpha_{1S}$  の 10 種類が同定されている。最近、マウスにおいて、選択的 T 型  $Ca_v$  ブロッカー投与により、高脂肪食による体重増加を抑制するという報告がなされ、 $Ca_v$  は肥満治療の標的となりうることが示唆された。しかし、脂肪細胞における  $Ca_v$  に関しては、これまでに詳細な報告がなされていない。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、生後 2-4 日のマウス皮下組織から単離した脂肪前駆細胞の初代培養細胞を用い、パッチクランプ法、リバーシ・トランスクリプターゼ・ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (RT-PCR) 法、免疫染色法、細胞増殖アッセイ、フローサイトメトリー法などで、マウス脂肪前駆細胞における  $Ca_v$  の薬理学的および分子生物学的特徴を検討した。

パッチクランプを用いた検討では、3T3-L1 細胞において、細胞を  $-100\text{mV}$  に保持し、 $400\text{msec}$  で種々の脱分極パルスを与えると、速い内向き電流が観察された。細胞外液の  $\text{Na}^+$  を膜非透過性陽イオンの  $\text{NMDG}^+$  に置換したが、速い内向き電流は影響をうけなかった。また、ナトリウムチャネル ( $\text{Na}_v$ ) ブロッカーであるテトラドトキシン (TTX)  $10\mu\text{M}$ 、L 型  $Ca_v$  ブロッカーであるニカルジピン  $1\mu\text{M}$  では、抑制されなかったが、T 型  $Ca_v$  ブロッカーであるミベフラジル  $30\mu\text{M}$  を外液に投与すると、ほぼ完全に抑制された。細胞外  $10\text{mM}$  カルシウムを  $10\text{mM}$  バリウムに完全に置換すると、内向き電流はやや減少した。加えて、Bay K 8644 でこの電流は増強されなかった。これらのことから、この 3T3-L1 に発現する内向き

電流には、閾値の高い L 型  $\text{Ca}_v$  や、 $\text{Na}_v$  は関与しておらず、非 L 型  $\text{Ca}_v$  の関与が示唆された。次に、膜電位固定法で 3T3-L1 の膜電流を測定した。同じ細胞で、 $-40\text{mV}$  と  $-100\text{mV}$  に固定し、 $100\text{ms}$  の脱分極パルスを与えた。 $-40\text{mV}$  の固定では、内向き電流は誘発されなかったが、 $-100\text{mV}$  に固定した時、 $-50\text{mV}$  より脱分極側で、一過性の内向き電流が誘発された。一過性内向き電流は約  $-20\text{mV}$  でピークとなった。 $+50\sim+60\text{mV}$  で電流はゼロとなった。リーク電流をサブトラクトし内向き電流のピークを測定して得られた電流電圧関係をかくと、膜電位のステップ状変化に伴って、過渡的な電流（テール電流）が観察され、電位依存性チャネルであることが示唆された。この 3T3-L1 に発現する電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル電流 ( $\text{I}_{\text{Ca}}$ ) の活性化ならびに不活性化曲線をボルツマン方程式でプロットしたところ、単一の指数でプロットされ、不活性化の  $V_h = -51\text{mV}$ ,  $k = 8.4\text{mV}$ 、活性化の  $V_h = -30\text{mV}$ ,  $k = 7.3$  であった ( $n=5$ )。

次に、種々の  $\text{Ca}_v$  ブロッカーが、3T3-L1 細胞における  $\text{I}_{\text{Ca}}$  に与える影響を調べた。3T3-L1 細胞を  $-100\text{mV}$  に保持し、種々の脱分極パルスを  $400\text{msec}$  間隔で  $+0\text{mV}$  まで与え、T 型  $\text{Ca}_v$  ブロッカーであるミベフラジルとニッケル ( $\text{Ni}^{2+}$ ) による  $\text{I}_{\text{Ca}}$  電流に対する効果を検討した ( $n=5$ )。電流のピークの抑制効果を種々の濃度についてプロットした。データは平均 $\pm$ 標準偏差 ( $n=5$ ) で示され、ミカエリスメンテン式  $\%抑制率 = 100 / \{1 + (\text{IC}_{50} [\text{mibefradil or Ni}^{2+}]^1)\}$  でフィットした。 $\text{IC}_{50}$  (50% 抑制濃度) はミベフラジルで  $3\mu\text{M}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$  で  $200\mu\text{M}$  であった。他、各タイプ  $\text{Ca}_v$  ブロッカー、ミベフラジル  $10\mu\text{M}$ 、NNC55-0396  $10\mu\text{M}$  (T 型  $\text{Ca}_v$  ブロッカー)、SNX-482  $100\text{nM}$  (R 型  $\text{Ca}_v$  ブロッカー)、 $\omega$ -agatoxin IVA  $100\text{nM}$  (P 型  $\text{Ca}_v$  ブロッカー)、 $\omega$ -conotoxin GVIA  $500\text{nM}$  (N 型  $\text{Ca}_v$  ブロッカー)、ニカルジピン  $10\mu\text{M}$  (L 型  $\text{Ca}_v$  ブロッカー) による %抑制率を調べたところ、T 型  $\text{Ca}_v$  ブロッカーであるミベフラジルと NNC55-0396 の 2 つが有意に  $\text{I}_{\text{Ca}}$  を抑制した。これらのことから、脂肪前駆細胞には T 型  $\text{Ca}_v$  が発現していることが示唆された。また、 $\text{Ni}^{2+}$  に対する感受性から、T 型  $\text{Ca}_v$  の中でも  $\alpha_{1G}$  サブユニットで構成される T 型  $\text{Ca}_v$  が発現していることが推測された。

次に分子学的検討を行った。3T3-L1 細胞の total RNA を用いた RT-PCR 法で 3T3-L1 細胞に発現する  $\text{Ca}_v$  の種類を遺伝子分析した。 $\alpha_{1A}$  ( $\text{Ca}_v2.1$ )、 $\alpha_{1B}$  ( $\text{Ca}_v2.2$ )、 $\alpha_{1C}$  ( $\text{Ca}_v1.2$ )、 $\alpha_{1E}$  ( $\text{Ca}_v2.3$ )、 $\alpha_{1G}$  ( $\text{Ca}_v3.1$ )、 $\alpha_{1H}$  ( $\text{Ca}_v3.2$ ) の発現が認められた。さらに、3T3-L1 細胞とマウス単離脂肪前駆細胞に発現する  $\text{Ca}_v$  遺伝子量を、Real-time RT-PCR 法で定量した。両者において、 $\text{Ca}_v$  を主にコードしているのは  $\alpha_{1G}$  であった。さらに抗  $\text{Ca}_v3.1$  抗体の免疫細胞染色により染色され、ウエスタンブロットにより  $\text{Ca}_v3.1$  蛋白が確認された。これらは RT-PCR の結果を支持し、マウス脂肪前駆細胞において主に  $\text{Ca}_v3.1$  が  $\text{I}_{\text{Ca}}$  を形成していると考えられた。

続いて、脂肪前駆細胞から脂肪細胞に分化すると、 $\text{Ca}_v$  はどのように変化するか検討した。3T3-L1 細胞、マウス単離脂肪前駆細胞から分化を誘導すると、オイルレッド O 染色で細胞内の脂肪滴を観察できる脂肪細胞が得られた。3T3-L1 細胞と、3T3-L1 を分化させた脂肪細胞、また、マウス単離脂肪前駆細胞と、そこから分化した脂肪細胞において、 $\alpha_{1G}$ 、

脂肪細胞のマーカー遺伝子である adipose protein 2 (aP2)、脂肪前駆細胞のマーカー遺伝子である Pref-1 の mRNA 発現量を Real-time RT-PCR 法で比較すると、aP2 mRNA の発現量は、いずれの分化した脂肪細胞において顕著に増加、Pref-1 mRNA の発現量は減少した。さらに、 $\alpha_{1G}$  mRNA の発現量は、分化後に有意に減少した。ウエスタンブロットにおいても、分化した脂肪細胞における Cav3.1 蛋白量は、脂肪前駆細胞のものに比べて、有意に減少していた。抗 Cav3.1 抗体の免疫細胞染色においても、分化した脂肪細胞においては、脂肪前駆細胞に比べて、弱い染色となった。以上より、分化によって、Cav3.1 の発現は少なくなり、Cav3.1 は特に前駆細胞において、生理的機能を有していることが示唆された。

$\alpha_{1A}$ (Cav2.1)、 $\alpha_{1G}$ (Cav3.1)、 $\alpha_{1H}$ (Cav3.2) について、様々なマウス白色脂肪組織における mRNA 発現量を調べた。チャールズリバー社の C57BL/6J マウス、肥満モデル ob/ob マウス、ヘテロ ob/+ マウスから単離した脂肪前駆細胞における  $\alpha_{1G}$  の発現を調べると、いずれの白色脂肪組織においても、3T3-L1 細胞に比べて、 $\alpha_{1G}$  の発現は有意に少なかった。脂肪細胞の種類にかかわらず、分化後は Cav3.1 の発現は減り、その役割が小さくなっていることが推測された。

siRNA で  $\alpha_{1G}$  を抑制した時の影響について調べた。 $\alpha_{1G}$  に対する siRNA を導入し、real time RT-PCR 法で  $\alpha_{1G}$  mRNA の発現を調べると著明に減少しており、ウエスタンブロットでは Cav3.1 蛋白量も減少していた。 $\alpha_{1G}$  に対する siRNA を導入した細胞を用い、ホールセルパッチクランプ法で  $I_{Ca}$  を調べたところ、コントロールに比べて、有意に  $I_{Ca}$  の減少がみられた。

細胞増殖アッセイにより、種々の Cav ブロッカーが、3T3-L1 細胞の増殖に与える影響を調べた。T 型 Cav ブロッカーであるミベフラジルと NNC55-0396 は濃度依存的に細胞増殖を抑制した。一方で、L 型 Cav ブロッカーであるジルチアゼム、ニカルジピンの抑制効果は少なかった。さらに、NNC55-0396 とジルチアゼムがセルサイクルに与える影響をフローサイトメトリーで調べた。NNC55-0396 10 $\mu$ M に暴露して培養した 3T3-L1 細胞は、S 期と G2/M 期の割合が小さく、G0/G1 から S, G2/M 期への移行が抑制されていることが示された。ジルチアゼムでは、コントロールの細胞と同様の細胞分裂が観察された。さらに、 $\alpha_{1G}$  に対する siRNA の処理が 3T3-L1 の細胞増殖に与える影響についての検討でも、 $\alpha_{1G}$  の抑制により、G2/M 期の割合が少なく、G0/G1 から S, G2/M 期への移行が抑制されていることが示された。

これらの実験結果から、(1) マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 セルラインにおいて、 $\alpha_{1G}$  でコードされる T 型 Cav (Cav3.1)が優位に発現していること、(2) マウス組織から単離した脂肪前駆細胞においても、Cav3.1 が優位に発現していること、(3) 脂肪前駆細胞から脂肪細胞に分化すると、Cav3.1 発現レベルは低下し、同様にマウス肥満モデルから単離した脂肪細胞においても、Cav3.1 発現レベルは低かったこと、(4) T 型 Cav ブロッカーであるミベフラジル、NNC55-0396 は脂肪前駆細胞の増殖を抑制し、 $\alpha_{1G}$  に対する siRNA の導入によっても同様に細胞増殖の抑制がみられたこと、が示された。以上より、マウス脂肪前駆細胞に

おいては、 $\alpha_{1G}$  でコードされる T 型  $Ca_v3.1$  が、前駆細胞の増殖に重要な役割を演じていることが判明した。

本研究から、さまざまな生活習慣病の原因となる肥満形成の抑制に、T 型  $Ca_v$  ブロッカーが治療の新しい標的になりうることも示唆された。ただし、臨床的応用には、さらなる検討が必要であると考えられる。