

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	阿里木 阿米熱
-------	-----	-----	---------

学 位 論 文 題 目

The 7-days-exposure to gamma-hexachlorocyclohexane causes resistance to insulin in differentiated mature 3T3-L1 adipocytes
(7 日間のガンマ型シクロクロロヘキサンへの暴露は成熟型 3T3-L1 脂肪細胞にインスリン抵抗性を惹起する)

共 著 者 名

小笠原準悦、白土 健、吉田貴彦

Japanese Journal of Clinical Ecology 29巻
令和3年 掲載予定

研 究 目 的

残留性のある難分解性有機汚染物質への暴露により2型糖尿病が誘導されるとする報告がなされ、農薬との関係が指摘されている¹⁾。農薬は、農作物の生産性の向上や農作業労働力の軽減へ利点があるものの、土壌への残留性が高いことから生体への安全性について懸念されてきた。実際、日本において長年殺虫剤として利用されてきたジクロロジフェニルトリクロロエタン（DDT）を分化誘導培地に添加した前駆白色脂肪細胞では、中性脂肪の含量が有意に増加する成熟型白色脂肪細胞へと分化することが報告されており²⁾、農薬は白色脂肪細胞のキャラクターを変化させることが示唆されている。

γ 型ヘキサクロロシクロヘキサン(γ -HCH)は、DDTと同様に有機塩素化合物系農薬として使用されてきた背景を持つが、使用に際して人体に様々な悪影響が生じることから³⁾、日本を含めて先進諸国ではすでに使用が禁止されている。一方、開発途上国では一般的な農薬として現在も継続して使用されている⁴⁾。興味深いことに、近年、開発途上国において2型糖尿病が増加していることが報告されている⁵⁾。DDTは2型糖尿病の発症と連関する白色脂肪細胞への修飾能を有するため、 γ -HCHもまた白色脂肪細胞の生理作用へ何らかの病態変化を引き起こす可能性も否定できない。

本研究は、 γ -HCHが成熟型脂肪細胞の耐糖能（または、糖取り込み能）へ及ぼす影響について、培養実験系にてエヴィデンスとその背景にあるメカニズムの検討を目的とした。

材 料 ・ 方 法

1. 3T3-L1前駆脂肪細胞の成熟型脂肪細胞への分化誘導方法と γ -HCHの処理

3T3-L1前駆脂肪細胞をコラーゲンタイプ1をコーティングした25cm²フラスコへ播種し、培養器内で37℃、5%二酸化炭素の条件でコンフルエントになるまで培養した。その後、分化誘導培地に変換し3日間培養し、さらに維持培地に変換して4日間培養した。

7日間の分化誘導培養で得られた成熟型脂肪細胞をコントロール群 (γ -HCH非添加群) と γ -HCH群にわけ、それぞれの条件でさらに7日間培養した。分化誘導開始から14日後の細胞を用いて全てのアッセイを行った。

2. 細胞生存率の検討

分化誘導後の成熟型脂肪細胞に再終濃度が0 μ M (γ -HCH非添加群)、25 μ M、50 μ M、100 μ M、1000 μ Mの γ -HCHを添加下に7日間培養し、培養液中に放出されるLactate Dehydrogenase (LDH) 量をLDH cytotoxicity detection kitを用いて測定した。残った細胞は、プロテアーゼ阻害薬カクテルとフォスファターゼ阻害薬カクテルを含むM-PERタンパク質抽出液に懸濁して回収後、タンパク質量の定量に供した。

3. インスリン刺激による細胞内への糖取り込み量の測定

7日間の培養が終了したコントロール群と γ -HCH群の成熟脂肪細胞から培養液を除去し、無血清培地を添加し6時間培養した。培養終了後の細胞をKRBH緩衝液で3回洗浄した後、2%濃度のBSAと1mMのインスリンを含むKRBH緩衝液に懸濁して培養器内で正確に18分間培養した。その後、1mMの2-デオキシグルコースを加えさらに20分間培養した。培養終了後の細胞を200mMの糖取り込み阻害剤を含むKRBH緩衝液を加えて3回洗浄し、インスリン刺激による糖の取り込みを行った細胞を作成した。細胞の回収は、10mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液に懸濁しセルスクレーパーを用いて行った。細胞懸濁液は27Gの針を含むシリンジによりホモジナイズし、80℃で15分間の熱処理を行った。その後、4℃の条件で15000 $\times$ g、20分間の遠心を行いサンプルを調整した。得られたサンプルは、2-Deoxyglucose uptake measurement kitを用いて2-デオキシグルコース量を測定した。

4. 細胞内活性酸素種の測定

細胞をコラーゲンタイプ1をコーティングした24-wellプレートに播種し、成熟型脂肪細胞へと分化させた後、 γ -HCHの有無の環境下で7日間培養した。活性酸素種は、ROS-GloTM H₂O₂ assay kitを用いて発光を蛍光プレートリーダーで読み取り定量した。定量に際し、各well内の細胞数をCell Count Normalization kitを用いて測定した値で除することにより平衡化した。

5. PCRを用いたmRNA発現の解析

培養終了後の細胞よりトータルRNAを抽出した後、Super Script[®] IV cDNA 反応システムを用いてcDNAを合成し、リアルタイムPCRのサンプルとした。リアルタイムPCRは、PoeweUpTM SYBER Green Master MixとApplied Biosystems StepOne[®] Real-Time PCR systemを用いて行った。

6. タンパク質の抽出とイミューブロットティング

培養終了後の細胞をプロテアーゼ阻害薬カクテルとフォスファターゼ阻害薬カクテルを含むM-PERタンパク質抽出液に懸濁し細胞質タンパク質を回収した。同時に、遠心分離法を用いて細胞膜分画のタンパク質を回収した。得られたタンパク質抽出液は、SDS-PAGEにより分離し、PVDFメンブレンに転写後、各抗体を用いて目的タンパク質の発現を解析した。

成 績

1. γ -HCHはインスリン刺激による成熟型脂肪細胞への糖取り込みを抑制する

γ -HCHの投与量は、50 μ Mで細胞死が引き起こされなかったことから本研究では50 μ Mを非毒性濃度として添加することで統一した。この状況下では、コントロール群と比較して γ -HCH群において細胞内への糖の取り込みが有意に低下した。

2. γ -HCHは細胞内活性酸素種の産生を促しGLUT4の細胞膜上への移行を抑制する

γ -HCHの添加により、Glucose Transporter 4 (GLUT4) のmRNA発現と細胞内におけるタンパク質の発現は、コントロール群と比べて有意に増加した。一方、細胞膜上に発現するGLUT4タンパク質は、 γ -HCHの添加により有意に低下した。3T3-L1脂肪細胞内で活性酸素種 (ROS) の産生が増加するとGLUT4タンパク質の細胞膜上への移行が抑制されることが報告されているため、細胞内活性酸素種の発現量について検討したところ、 γ -HCHの添加によりROSの発現の有意な増加が確認できた。この状況下では、ROSのマーカー分子群のmRNA発現も有意に増加した。

3. γ -HCHはJNKの活性化を介してインスリン刺激による糖取り込みシグナルを抑制する

γ -HCHの添加は、細胞内のJNKのリン酸化（活性化）を促した。この状況下では、インスリン刺激による糖取り込みイベントを抑制するInsulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) のセリン307番目のリン酸化も有意に増加した。加えて、 γ -HCHは糖取り込み時に活性化されるAKT2のリン酸化を有意に抑制し、その下流に発現しGLUT4の細胞膜への移行を促すAKT Substrate 160 (AS160) のリン酸化も有意に抑制した。

考 案

白色脂肪細胞より過剰に分泌されたTNF- α は、オートクライン・パラクライン作用によって白色脂肪細胞自身のインスリン刺激による糖取り込みを抑制する。このメカニズムの一つとして、IRS-1のセリン307番目のリン酸化によるインスリン・シグナルカスケードの不活性化が報告されている。しかし本研究において、 γ -HCHはむしろ3T3-L1脂肪細胞におけるTNF- α のmRNAとタンパク質の発現を有意に低下させ、培養液中のTNF- α への分泌量はコントロール群と同様であった。 γ -HCHはTNF- α 非依存的にIRS-1のセリン307番目のリン酸化を引き起こし、これは活性酸素種の産生増大に伴うJNKの活性化に起因することが示唆された。さらに本カスケードの下流で生じるAKT2とAS160の非活性化はGLUT4の細胞膜への移行を抑制し、最終的に、インスリン刺激による糖の取り込み能を低下させることが明らかとなった。白色脂肪組織は成熟型の白色脂肪細胞に富んでいるため、 γ -HCHの継続的な暴露は糖取り込み能の低下した成熟型脂肪細胞を作り出し、結果的に2型糖尿病の病態を呈する個体を生み出す可能性が考えられ、環境汚染の進む地域での2型糖尿病の有病率の増加の一部を説明するものと考ええる。

結 論

γ -HCHは成熟型3T3-L1脂肪細胞の活性酸素種の産生を促し、それに伴うJNKの活性化はIRS-1のセリン307番目のリン酸化を増加させることによってインスリン刺激による糖取り込みを抑制する、インスリン抵抗性を引き起こすことが示唆された。

引用文献

- 1) Turyk M, Anderson HA, Knobeloch L, et al. Prevalence of diabetes and body burdens of polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers, and p,p'-dipenyldichloroethene in Great Lakes sport fish consumers. *Chemosphere* 75: 674-679, 2009
- 2) Kim J, Sun Q, Yue Y, et al. 4,4'-Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and 4,4'-dichlorodipenyldichloroethylene (DDE) promote adipogenesis in 3T3-L1 adipocyte cell culture. *Pestic Biochem Physiol* 131: 40-45, 2016
- 3) Wacławek S, Silvestri D, Hrabák P, et al. Chemical oxidation and reduction of hexachlorocyclohexanes: a review. *Water Res* 162: 302-319, 2019
- 4) Saez JM, Benimeli CS, Amoroso MJ. Lindane removal by pure and mixed cultures of immobilized actinobacteria. *Chemosphere* 89: 982-987, 2012
- 5) Misra A, Gopalan H, Jayawardena R, et al. Diabetes in developing countries. *J Diabetes* 11: 522-539, 2019

