

蛍光ナノ粒子を用いた細胞内脂肪滴の三次元可視化法を適用した脂肪細胞の分化誘導と肥満モデル動物における脂肪蓄積過程の解析

横田一成・小川智史・秋吉英雄

目 的

脂肪細胞は、燃料分子のトリアシルグリセロールを貯蔵する部位であり、体内の栄養状態やホルモン作用にตอบสนองして貯蔵脂肪を加水分解して遊離の脂肪酸を動員することで体内のエネルギーの恒常性の維持に関与する。しかし、過剰なエネルギー摂取や運動不足により、脂肪細胞の数の増加や脂肪細胞の肥大を伴う肥満が発生する。脂肪細胞の形成過程には、繊維芽細胞様の未分化の前駆脂肪細胞が増殖後、分化誘導刺激を受けてクローン増殖期と呼ばれる時期を経て脂肪形成プログラムに関連する細胞内因子の遺伝子発現が促進される。その後、終末分化相において脂肪滴の蓄積が促進されて成熟脂肪細胞となる。脂肪細胞内の脂肪滴の表面には、ペリリピンなどの特異的な蛋白質が付着しており、脂肪細胞内での脂肪滴の形成機構に興味を持たれる。培養系の制御された条件で成熟脂肪細胞への分化能を持つマウスの前駆脂肪細胞株の 3T3-L1 細胞株は、脂肪細胞の形成過程を研究するのに有用である。我々は、この培養系での異なるライフステージの脂肪細胞でのアラキドン酸カスケード経路の発現調節と関連するプロスタノイド類の役割を解明してきている (Xu et al. 2006 ; Mazid et al. 2006 ; Chowdhury et al. 2011)。また、関連研究として、高脂肪食を摂取した肥満モデル動物のマウスを用いて、糖質や脂肪の消化吸收を抑制する機能性食品因子として、トチノミ種皮由来の高度重合性プロアントシアニジンの抗肥満効果を報告した (Kimura et al. 2011)。このように、脂肪細胞での分化誘導や成熟過程での脂肪蓄積、さらに、肥満における脂肪細胞の肥大化や制御などについて、脂肪細胞内での脂肪滴形成の時空間的な解析は、生活習慣病の発生や予防の観点で重要な研究課題となっている。

今回、培養脂肪細胞での分化誘導過程や成熟過程での脂肪蓄積の形態学的な解析として、蛍光ナノ粒子を用いた細胞内脂肪滴の三次元可視化技術を適用して、脂肪細胞での脂肪滴の形成過程や肥大化の特性を解明したいと考えた。また、この研究手法を利用して、肥満モデル実験動物での異なる部位での内臓脂肪や皮下の脂肪組織での脂肪蓄積機構や、抗肥満作用を示す機能性食品由来の機能性因子の作用特性を探求する研究に発展させることを目指して以下の研究を行った。

材料と方法

前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞の培養と脂肪細胞へ分化誘導と成熟化

マウスの前駆脂肪細胞株の 3T3-L1 細胞株を、脂肪細胞形成のための分化誘導と成熟過程の培養実験に用いた。常法に従い、まず、前駆脂肪細胞の 3T3-L1 細胞を生育培地で飽和になるまで培養し、その 2 日後に、 $1 \mu\text{M}$ デキサメタゾン、 0.5 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン、そして、 $10 \mu\text{g/ml}$ インスリンを含む分化誘導培地で 45 時間処理した。引き続き、 $5 \mu\text{g/ml}$ インスリンを含む成熟培地を用いて 2 日ごとに培地交換をしながら、成熟期後の最大 10 日まで培養を行った。また、培養脂肪細胞内の脂肪蓄積の確認のために、常法に従って Oil Red O による固定細胞内の脂肪滴の染色を行った (Xu et al. 2006 ; Mazid et al. 2006 ; Chowdhury et al. 2011)。

蛍光ナノ粒子を用いた培養脂肪細胞での細胞内脂肪滴の三次元可視化解析

成熟期後の 6 日目および 10 日目の培養脂肪細胞を使用した。三次元可視化解析には、酸化亜鉛ナノ光デバイスの蛍光標識剤を用いた細胞内の脂肪球を識別する技術 (秋吉英雄・藤田恭久, 特願 2010-126562: 細胞内脂肪球イメージング方法, イメージング用蛍光材およびイメージング蛍光材製造方法) を使用した。培養された成熟期の脂肪細胞を、4% パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液 (pH 7.4) 溶液で固定した。そして、イソプロピルアルコール水溶液で処理した後、酸化亜鉛ナノ光デバイスを含むイソプロピルアルコール溶液中で、 37°C で 5 分間、反応させた。イソプロピルアルコールで洗浄した後、シャーレ内にグリセリンを滴下して培養の成熟脂肪細胞を封入した。これらのサンプルは共焦点レーザー顕微鏡オリンパス FV1000,あるいは、ライカ TCS SP5 を使用し、励起波長 405 nm, 蛍光波長 460-480 nm にて撮影を行った。

結 果

培養脂肪細胞内の脂肪球は、酸化亜鉛ナノ光デバイスによって青緑色の蛍光 (460-480 nm) として観察された。これらの蛍光強度は減衰することなく、長時間にわたって観察できた。

成熟期後の6日目の脂肪細胞では、培養脂肪細胞は細胞質の中央に核が位置し、核周囲に脂肪滴が一層に偏在して観察された。脂肪滴の大きさは細胞によって異なり、小型～中型の脂肪滴が観察された。三次元の観察の結果、脂肪滴は重なることなく一列に並んでおり、球形の脂肪滴が隙間なく細胞内に無数に分布していた。

成熟期後の10日目の脂肪細胞では、6日目と同様に培養脂肪細胞は細胞質の中央に核が位置し、核周囲に脂肪滴が観察された。脂肪滴の大きさは大型で細胞質内に密に認められ、脂肪滴間のスペースは狭く、密に配列していた。三次元の観察により、脂肪細胞内の脂肪滴の配列は細胞によって異なっており多彩な分布であることが確認された。10日目の細胞では、脂肪蓄積が進行しており、特に肥大化した少数の成熟脂肪細胞を認めた。

考 察

マウスの前駆脂肪細胞株の3T3-L1細胞が、生育期、分化誘導期を経て脂肪蓄積をする成熟期の培養脂肪細胞の三次元観察として、酸化亜鉛ナノ光デバイスを用いた実験手法が有効であった。特に、成熟期後の培養の6日目の成熟脂肪細胞の観察では、脂肪滴の大きさが細胞によって異なっているが、脂肪滴の配列は一層であった。一方、成熟期後の10日目の脂肪細胞では、脂肪滴のサイズが大型となり、配列も密で細胞質内に充満して認められる脂肪細胞が多かった。今回の蛍光ナノ粒子を用いた細胞内の三次元可視化法は、培養脂肪細胞内の脂肪滴の微細な変化を解析するのに有用であることがわかった。今後は、生きた状態で6日目から10日目を経時的に観察することで、脂肪細胞の脂肪滴形成過程および脂肪細胞の肥大化を精査したいと考える。

我々は、最近の研究で、高脂肪食を数ヶ月、マウスに給餌して得た肥満モデル動物を用いて、未利用の食糧資源であるトチノミの種皮に由来する高度重合性のプロアントシアニン類が、高脂肪食による脂肪組織や肝臓で

の脂肪蓄積を顕著に抑制することを明らかにしている(Kimura et al. 2011)。上記の方法は、肥満動物での組織や細胞内での脂肪滴の三次元観察にも有用と考えられるので、今後、そのような肥満モデル動物での脂肪蓄積過程の経時的および空間的な特異な変化の解析に適用することで、機能性食品因子の特異的な抗肥満作用の発見が期待できるものと考えられる。

引用文献

- Xu, L., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., and Yokota, K. (2006) Gene expression of arachidonate cyclooxygenase pathway leading to the delayed synthesis of prostaglandin E₂ and F_{2α} in response to phorbol 12-myristate 13-acetate and action of these prostanoids during life cycle of adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1761: 434-444.
- Mazid, M. A., Chowdhury, A. A., Nagao, K., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., and Yokota, K. (2006) Endogenous 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ synthesized by adipocytes during maturation phase contributes to upregulation of fat storage. *FEBS Letters*, 580: 6885-6890.
- Chowdhury, A. A., Rahman, M. S., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Ishikawa, T., Shono, F., and Yokota, K. (2011) 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ interferes inducible synthesis of prostaglandins E₂ and F_{2α} that suppress subsequent adipogenesis program in cultured preadipocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 95: 53-62.
- Kimura, H., Ogawa, S., Sugiyama, A., Jisaka, M., Takeuchi, T., and Yokota, K. (2011) Anti-obesity effects of highly polymeric proanthocyanidins from seed shells of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata* BLUME). *Food Res. Int.* 44: 121-126.