HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	脂肪細胞への分化過程における細胞及び脂肪滴の挙動 ： タイムラプス観察による一細胞レベルでの解明
Author(s)	永山, 昌史; 内田, 努; 平, 敏夫; 清水, 恭子; 郷原, 一寿
Citation	肥満研究, 13(1), 84-86
Issue Date	2007
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/25460
Type	article (author version)
File Information	obesity13-1.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

表題：

脂肪細胞への分化過程における細胞及び脂肪滴の挙動：

タイムラプス観察による一細胞レベルでの解明

著者： 永山 昌史[1]，内田 努[1]，平 敏夫[2]，清水 恭子[2]，郷原 一寿[1]

所属機関：

[1]北海道大学大学院工学研究科応用物理学専攻

[2]株式会社プライマリーセル

責任著者連絡先（永山 昌史）：

060-8628

北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目

Phone/Fax: 011-706-6637

e-mail: macci@eng.hokudai.ac.jp

ランニングタイトル： 脂肪細胞分化のタイムラプス観察

原稿種類： トピックス

原稿枚数： 10 枚　(図を含む)

表および図の数： 3 枚

はじめに

脂肪細胞の分化機構や機能の解明を目指した研究は，主に生化学的・分子生物学的手法を用いて精力的に行われ，これまでに分化のカギとなる転写因子(PPARs, C/EBPs)や脂肪細胞の機能に深く関わるサイトカイン(leptin, adiponectin, など)が数多く同定されてきた．現在，これら転写因子の発現量やサイトカインの分泌量における時間変化によって，脂肪細胞分化の時系列が記述されることが多い．しかしながら，このような分子レベルからのアプローチの多くは，培養ディッシュ内全ての細胞の平均的な挙動に関する知見を得るためのものである．これに対し，筆者らは脂肪細胞分化の過程をタイムラプス観察することで，個々の細胞がどのように形態変化をし，またどのように脂肪滴を蓄積していくのかを捉えることに成功した．この結果は，脂肪細胞分化における細胞の非同期的な挙動をより直接的に示すものである．

本稿では，まずタイムラプス観察の実験手順・装置の概略について述べ，分化過程における個々の細胞及び脂肪滴の挙動についての結果を示す．また，細胞増殖に関して内臓脂肪に特異的と思われる知見が得られたので，併せて報告する．

長時間タイムラプスのための装置と細胞

脂肪細胞分化の全過程をタイムラプス観察するために，培養ディッシュを密閉する手法[1)]を採用した．筆者らは，細胞の接着領域を制限しつつ大量の培地を供給するため，2 重構造のディッシュを使用している．内側ディッシュのみに細胞を播種し，丸 1 日培養した後，培地交換により浮遊細胞を完全に取り除く．次にシリコングリスを外側ディッシュの縁に塗布してから，pH調整済みの培地でディッシュを完全に満たす．最後に，UV滅菌したカバーガラスでディッシュを密閉し，顕微鏡へとセットする．

観察に用いた倒立型微分干渉顕微鏡は，ステージや対物レンズを含む顕微鏡全体が温調ボックスで覆われており，ボックス内は常に 37℃に維持されている．顕微鏡画像は CCD カメラを通して任

意の時間間隔で自動的にPCへと取り込まれる.

細胞はラット腸間膜脂肪組織より採取したstromal-vascular cells (SVCs)を用いた．この細胞は，筆者らが独自に開発した培地で培養すると，デキサメタゾン及びイソブチルメチルキサンチンによる一過性の誘導刺激を与えなくても 1 週間程度で脂肪細胞へと分化する[2]．このため，培地交換の不可能な密閉式培養ディッシュを用いた手法でも分化の全過程を観察できるという利点を持つ.

脂肪細胞分化における細胞の挙動

筆者らは上述の手法及び細胞を用いることで，脂肪細胞への分化過程を 5 日間に亘ってタイムラプス観察することに成功した[3]. 5 分間隔で撮影した顕微鏡画像シークエンスから 1 日ごとの画像を抜き出したものを図 1 に示す．矢印で示した細胞に着目すると，極性を持った線維芽細胞様の細胞形態(Day 1)から等方的な形態へと変化しながら，核周辺に無数の小さな脂肪滴が現れる(Day 3)．その後, 脂肪滴の数は減っていくものの, 残った脂肪滴が大きく成長していくことが分かる(Day 4-6). このように，特定の細胞がどのように形態変化をし，またどのように脂肪滴を蓄積していくのかを追跡することできる.

また，脂肪滴をほとんど含まない細胞や大きな脂肪滴を含む細胞も Day 3 の画像に見られることが示すように，全ての細胞における分化が同期して進行するわけではない．タイムラプス観察では個々の細胞において「脂肪滴が最初に現れる時期」と「脂肪滴の成長に要する時間」を求めることができるので，これらの“時間的なばらつき”によって脂肪細胞分化における非同期性を定量的に表現することが可能である.

さらに, 取得した画像シークエンスから動画を作成すると, 細胞の動きに関する知見が得られる. この動画によると，細胞は脂肪滴を蓄積した後も動きまわっており，細胞が密集している領域でさえ，互いの位置を入れ替えるようにしながら動いていることが分かった.

「(図 1)」

分化中の細胞における脂肪滴の生成と成長

次に，高倍の対物レンズを用いてタイムラプス観察を行うことで，脂肪滴の挙動を明らかにした(図 2)．分化中の細胞では，直径が 1 μm に満たない脂肪滴が葉状仮足内で次々に生成し，生成された脂肪滴は細胞体(細胞の中心部)に向かって移動していく．この移動の途中で，脂肪滴は隣接した脂肪滴との融合を繰り返し，最終的に直径数 μm にまで成長する．細胞体と仮足の境界部に到達すると，その脂肪滴の移動はほとんど止まる．このような脂肪滴の生成と移動に起因して，分化初期では脂肪滴がリング状に密集した領域が核周辺に形成されるのであろう(図 1, Day 3 参照).

高倍でのタイムラプス観察を行うと脂肪滴以外にも多くの顆粒状細胞小器官が観察される．そこで筆者らは，脂肪滴とその他の小器官とを区別するため，BODIPY 493/503 を用いることで細胞を固定することなく脂肪滴に蛍光染色を施した．この蛍光染色された細胞について，微分干渉像と蛍光像の両方を取得しながらタイムラプス観察を行っている[3)]．さらに，脂肪滴が蛍光染色されていれば，共焦点レーザー顕微鏡を用いることで 3 次元観察も可能となる．例えば，Bostromらは脂肪滴同士が融合する瞬間の構造変化を詳細に捉えることに成功している[4)]．

「(図 2)」

脂肪細胞分化過程に見られる細胞分裂

図 1 から明らかなように，腸間膜脂肪組織由来のSVCsはコンフルエントに達することなく，ほとんどの細胞が脂肪細胞へと分化する．さらに驚くべきことに，25%の細胞は脂肪滴を蓄積した後でも細胞分裂によって増殖することが明らかとなった(図 3). 分裂後の 2 匹の娘細胞にはそれぞれ親細胞の約 50%ずつの脂肪滴が含まれていた．これは，脂肪滴は細胞分裂に伴って 2 匹の娘細胞に等分配されるだけであり，脂肪滴自体は分裂しないことを示している．このような細胞分裂は播種 58～118 時間後に見られ，それ以降は見られなかった[3)].

これまでは，脂肪滴を蓄積する前に細胞の増殖(クローナルエクスパンジョン)が停止すると考えられてきた．その根拠となっているのが，PPAR-γの発現・活性化が脂肪滴の生成や蓄積に関与するタンパクの発現を誘導するのと同時に増殖阻害を引き起こすという実験結果である．これをふまえて，PPAR-γの活性化によって発現が誘導されるタンパクの一つであるペリリピンの免疫蛍光染色を行ったところ, 播種 72 時間後にはほとんど全ての細胞で脂肪滴表面にペリリピンが局在していた[3)]．つまり，播種 72 時間後にはPPAR-γが活性化しているにも関わらず，それ以降も細胞分裂が起こるのである．この結果は，脂肪細胞分化に伴う増殖停止がPPAR-γの活性化だけでなく，その下流で働く因子によって制御されていることを示唆する．

「(図 3)」

まとめ

タイムラプス観察の一番の利点は，前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞に至る過程を特定の細胞で追跡できる点である．これにより，脂肪細胞分化における個々の細胞の“時間的ばらつき”や，細胞及び脂肪滴の“動き”に関する知見が得られる．今後は，この“時間的ばらつき”と“動き”を指標とすることで，関連遺伝子のノックアウトや液性因子による刺激が脂肪細胞分化に与える影響を個々の細胞レベルで明らかにすることを目指す．

他の脂肪組織由来の SVCs や 3T3-L1 とは異なり，腸間膜脂肪組織由来の SVCs は分化誘導に接触阻害が必須ではないことと，脂肪滴が蓄積した後も細胞分裂によって増殖することが明らかとなった．この性質が腸間膜脂肪組織つまり内臓脂肪に特異的なものであれば，内臓脂肪型肥満とメタボリックシンドロームを結びつける重要な性質となるかもしれない．

尚，筆者らの論文[3)] のオンライン版ではタイムラプス観察の動画が公開されているので，興味を持たれた方はそちらを参照して頂きたい．

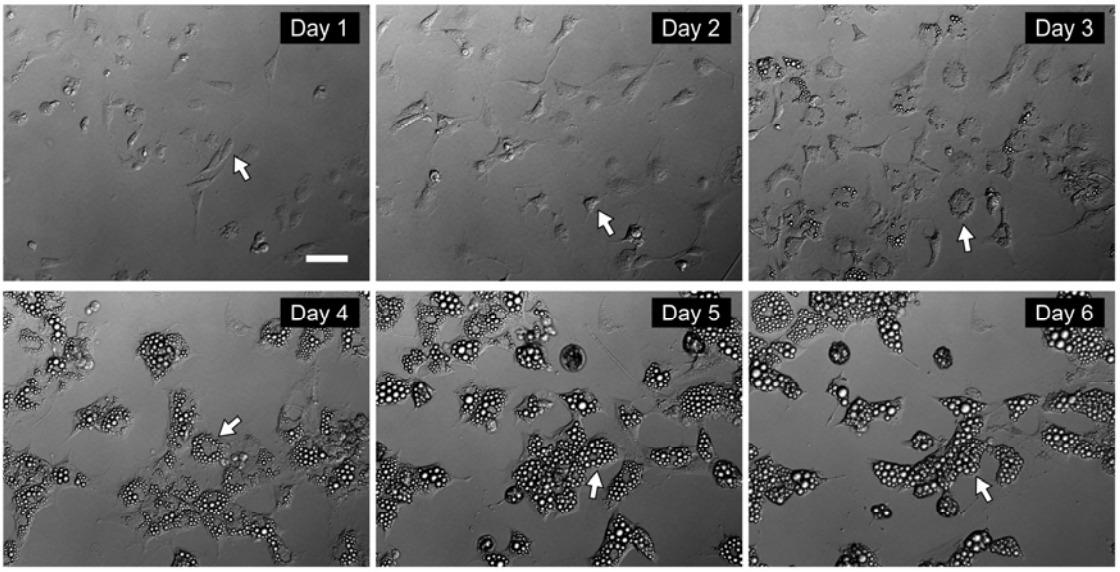
謝辞

本研究の遂行にあたり，京都大学大学院農学研究科の河田照雄教授には数々の貴重な御意見を頂戴いたしました．この場を借りて厚く御礼申し上げます.

文献

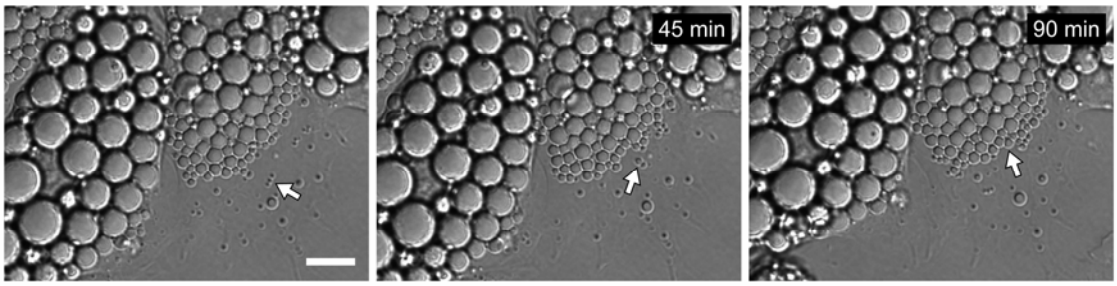
1) Haga H, Irahara C, Kobayashi R, et al.: Collective movement of epithelial cells on a collagen gel substrate. Biophys J 2005, **88**: 2250-2256.
2) Shimizu K, Sakai M, Ando M, et al.: Newly developed primary culture of rat visceral adipocytes and their in vitro characteristics. Cell Biol Int 2006, **30**: 381-388.
3) Nagayama M, Uchida T, Gohara K: Temporal and spatial variations of lipid droplets during adipocyte division and differentiation. J Lipid Res 2007, **48**: 9-18
4) Bostrom P, Rutberg M, Ericsson J, et al.: Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005, **25**: 1945-1951.

図1



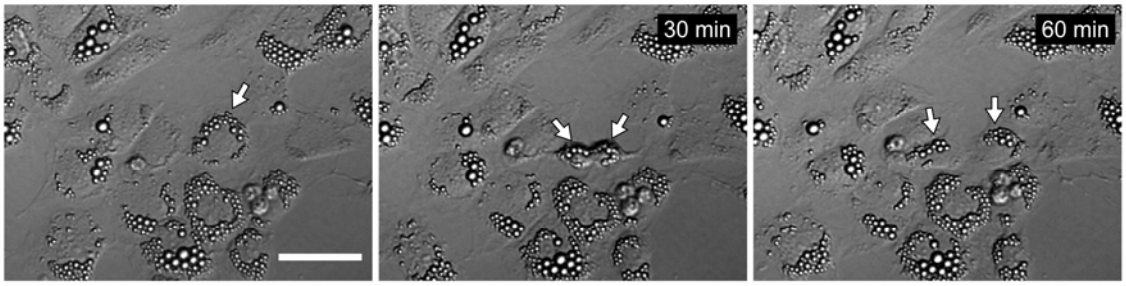
(100%)

図 2



(100%)

図 3



(100%)

図説明

図１　脂肪細胞分化のタイムラプス観察

矢印は全て同一の細胞を示す．図中の数字は播種からの経過日数を表す．バーは 50 μm.

図２　葉状仮足で生成した脂肪滴の移動及び融合

葉状仮足で生成した脂肪滴(矢印)が互いに融合しながら細胞体へと移動していく．バーは 10 μm.

図３　脂肪滴蓄積後の細胞における細胞分裂

脂肪滴を蓄えた細胞(矢印)が細胞分裂する．この際，脂肪滴は 2 つの娘細胞に等分配される．バーは 50 μm.