

トピックス

成熟脂肪細胞由来の前駆脂肪細胞株DFAT-D1の樹立

埼玉医科大学ゲノム医学研究センターゲノム科学部門

八木 研, 岡崎 康司

日本大学生物資源科学部動物生体機構学研究室

近藤 大輔, 加野浩一郎

日本大学医学研究科細胞再生移植医学部門

近藤 大輔

はじめに

肥満研究においては、前駆脂肪細胞がどのような刺激を受け、どのような分子メカニズムで脂肪細胞へ分化しているかを解明することが重要な課題の1つである。これまで脂肪細胞の分化研究には前駆脂肪細胞株として3T3-L1や脂肪組織に含まれる間質・血管系画分(stromal-vascular fraction, SVF)が用いられてきた¹⁾。しかし、3T3-L1はマウス胚から樹立された細胞株でその由来がはっきりせず、生体の脂質代謝が反映されていない可能性を含んでいること、またSVFは前駆脂肪細胞以外に血管内皮細胞、血球系細胞などが混在していることに加えて、継代培養することができないなどの欠点があった²⁾。我々はこれらの欠点を解消すべく、マウスの成熟脂肪細胞由来の前駆脂肪細胞株DFAT-D1 (de-differentiated from fat cells of ddY mouse)を樹立したのでここに報告する³⁾。

1. 天井培養法によって得られる線維芽細胞様細胞

ddYマウス鼠径部より摘出した脂肪

んど有さない線維芽細胞様細胞を形成した。

2. 前駆脂肪細胞株DFAT-D1の樹立

得られた線維芽細胞様細胞を、培養ディッシュ内でsemi-confluentになるまで増殖させ、10%FBS, 0.25 μ Mデキサメタゾン, 0.5mMイソブチルメチルキサンチンおよび5 μ g/mlインスリンを添加したDMEM脂肪細胞分化誘導培地で2日間処理し、その後DMEM培地 (10%FBS)に培地を交換し培養を続けた。脂肪細胞分化誘導後4日後には細胞内に小さな油滴が確認されるようになった。我々はOil Red O染色することによって、脂肪細胞へ分化していることを確認している(図2A)。またこの細胞をマウス生体の胸骨上に移植すると、3週間後には同部位に脂肪組織が形成された(図2B)。

本細胞は前駆脂肪細胞としての性質を持ち、継代しても性質が安定していることが確認できたことから、本細胞を前駆脂肪細胞株DFAT-D1と名付けた。

組織をコラゲナーゼ処理することによって得られた成熟脂肪細胞を用いて天井培養(図1)を行った⁴⁾。

フラスコ上面に付着した単胞性脂肪細胞は、培養6日後において細胞質内に大きな脂肪滴を維持しつつ、その周辺に種々の大きさの脂肪滴を有する多胞性脂肪細胞の形態を示した。

培養1週間を過ぎると多胞性脂肪細胞は細胞分裂を繰返し、脂肪滴をほと

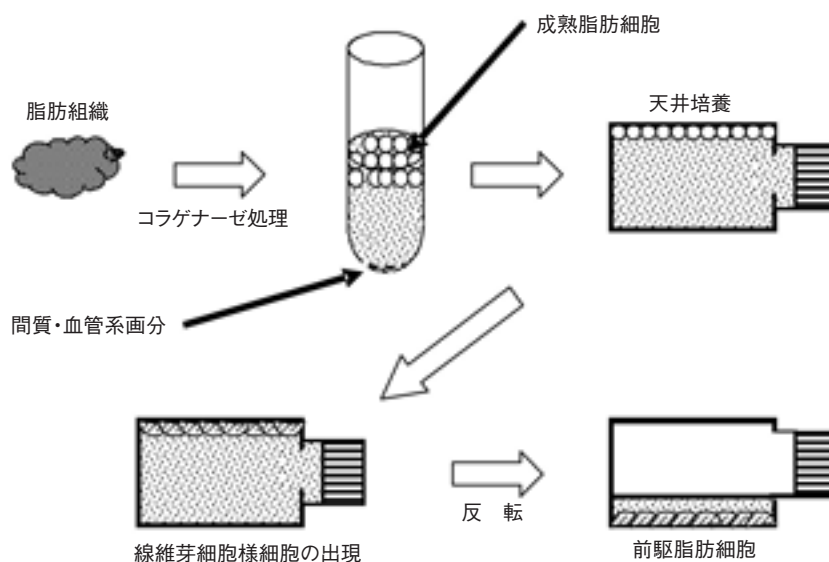


図1 天井培養法による前駆脂肪細胞株樹立の概要

3. 脂肪細胞分化誘導時における遺伝子発現変化

脂肪細胞分化において重要な働きをもつことが示唆されている *PPAR γ 1,2* および *C/EBP α , β , δ* について、DFAT-D1ならびに3T3-L1の脂肪細胞分化誘導時における遺伝子発現変化を定量RT-PCRを用いて調べた(図3)。

*PPAR γ 1*は分化誘導前から発現しており細胞増殖などの何らかの現象において機能していると考えられるが、分化誘導によって一時的に発現が抑制され、同時に*PPAR γ 2*の発現が誘導されていることから、従来から知られている通り、脂肪細胞分化には*PPAR γ 2*が

不可欠であると推察される。

C/EBP β が3T3-L1のように分化誘導に従って顕著に発現が促進されていないのは、*C/EBP β* の機能が転写レベルではなく、タンパク質修飾などによって調節されていることを示唆するものである。また、*C/EBP β* が分化誘導刺激によってタンパク質レベルで速やかに応答しているため比較的早期に*C/EBP α* の発現上昇が促進され、*PPAR γ 2*と協奏的に働いて脂肪蓄積に関連する遺伝子の発現を調節していると考えられる。

DFAT-D1は3T3-L1に比べて脂肪細胞分化誘導によって働く遺伝子の発現量の総量が相対的に少ないにも関わら

ず、glycerol-3-phosphate dehydrogenaseの酵素活性が高く(データは示していない)、*in vivo*でも脂肪組織へと分化する能力を持っていることから、3T3-L1よりも潜在的に脂肪細胞に近いと言えるのかもしれない。

まとめ

DFAT-D1は生体内の脂質代謝を反映する有用な細胞株であることが示唆された。本株は、より生体に近い脂肪蓄積シグナルを有しているため、脂肪細胞分化機構の解明、抗肥満薬の開発、薬剤応答検査などに有力なツールとなることが期待される。

最近になり、これまでSVFの中にadi-

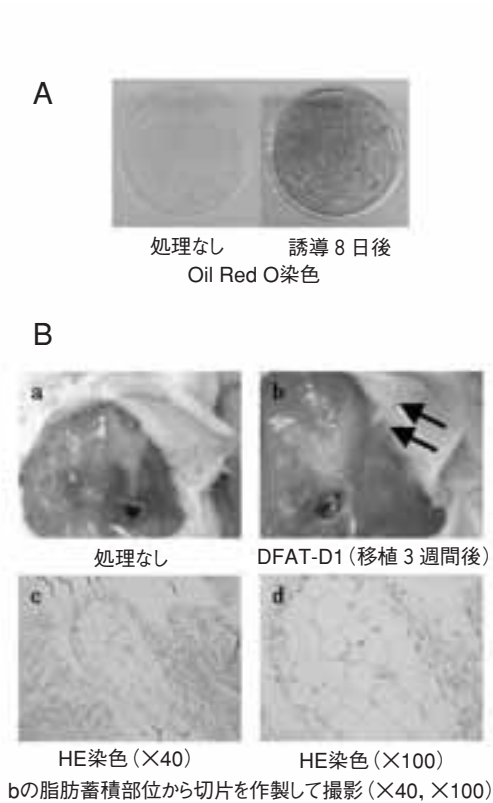


図2 前駆脂肪細胞株DFAT-D1の性質
A. (左図) 処理なし (右図) 脂肪細胞分化誘導8日後 (Oil Red O染色)
B. a. 処理なし b. マウス胸骨上にDFAT-D1を移植して3週間後にはDFAT-D1由来の脂肪蓄積(矢印)が観察できる. c. bの脂肪蓄積部位をHE染色したもの(×40) d. bの脂肪蓄積部位をヘマトキシリン・エオジン(HE)染色したもの(×100)

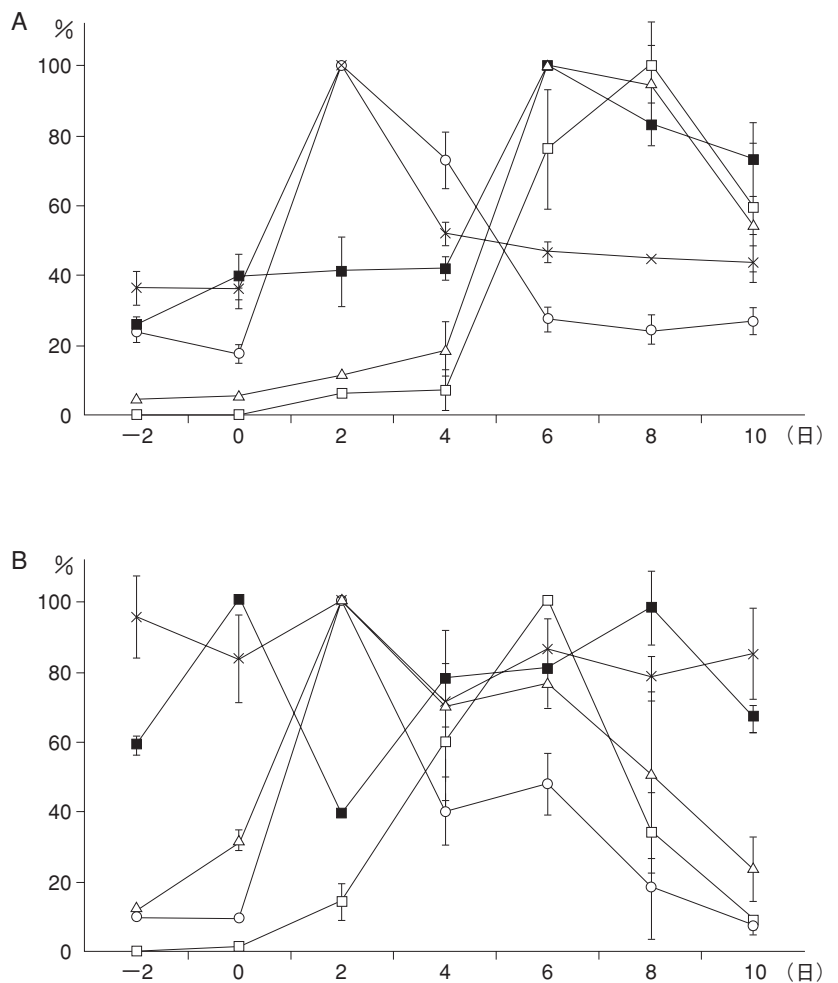


図3 脂肪細胞分化誘導時における分化マーカーの発現変化
A. 3T3-L1 B. DFAT-D1
■ *PPAR γ 1*, □ *PPAR γ 2*, △ *C/EBP α* , × *C/EBP β* , ○ *C/EBP δ*

pose derived stem cells (ADSC) と呼ばれる細胞が, 骨芽細胞や軟骨細胞, そして神経細胞や心筋細胞にも分化する可能性を示唆する報告が相次ぎ, 将来再生医療への利用が期待されるES細胞が抱える免疫や倫理的問題を, ADSCが克服できるものでは?との期待から大変注目を浴びている.

我々が樹立したDFAT-D1についても同様な能力を持つことが示唆されていることから(加野ら, 2004年日本分

子生物学会, 2005年日本再生医療学会), 今後本細胞が有する未知なる可能性に迫りたいと考えている.

文 献

- 1) Green H, Kehinde O: An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 1975, **5**: 19-27.
- 2) Gregoire FM, Smas CM, Sul HS: Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998, **78**: 783-809.
- 3) Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, et al.: A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **321**: 967-974
- 4) Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S, et al.: Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation* 1986, **31**: 42-49.

日本健康科学学会シンポジウム

日 時: 平成18年 1月28日(土) 10:00~17:00

場 所: 東京医科大学病院臨床講堂 6階

〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 TEL: 03-3342-6111

会 長: 信川 益明

問い合わせ先: 日本健康科学学会シンポジウム事務局

〒164-0001 東京都中野区中野 2-2-3 (株)へるす出版事業部内

TEL: 03-3384-8037, FAX: 03-3380-8627

E-mail: health-sci@herusu-shuppan.co.jp

<http://www.hs.ipu.ac.jp/HS/index.html>