

3) 脂肪組織からの成熟脂肪細胞の単離・利用に関する実験操作

(独) 農研機構 近畿中国四国農業研究センター 関谷 敬三

はじめに

脂肪組織には白色脂肪組織と褐色脂肪組織があるが、単に脂肪組織という場合、一般に皮下や内臓周囲などに分布する白色脂肪組織を指す場合が多い。本項でも白色脂肪組織、その主な構成細胞である白色脂肪細胞を取り上げる。この組織を構成しているのは白色脂肪細胞だけでなく血管系の細胞やマクロファージなど間質細胞も含まれる。白色脂肪細胞は単房性の脂肪滴で満たされ、核や細胞質は細胞辺縁へ押やられている。大きさは直径が数十 μm から百 μm 位まで分布している。生体を飢餓にすると細胞容積は縮小し、肥満では増加する。体積にして 100 倍ほども変化するかなり特種な細胞である。細胞容積の変動は中性脂肪の増減に起因している。中性脂肪の合成、分解はインスリンなどのホルモン制御の元で活発に行われている。さらに、多くの生理活性物質（アディポサイトカイン）を分泌しメタボリックシンドローム、生活習慣病、炎症など多くの病態に深く関わっている。しかも、脂肪細胞の大きさによって分泌されるアディポサイトカインが異なり、大きく肥大した脂肪細胞からはメタボリックシンドロームを引き起こす TNF α 、PAI-1、レジスチン、MCP-1、IL-6 などが多く分泌されている。一方、小さい脂肪細胞からはアディポネクチンが多く分泌されメタボリックシンドロームを予防している。一方、脂肪細胞以外のマクロファージも TNF α など生理活性物質を分泌しメタボリックシンドロームなどに大きな影響を与えている。

このように最近では肥満やメタボリックシンドロームの増加とともに脂肪組織の機能に注目が集まってきている。私たちは脂肪細胞を用いた機能性成分の各種評価系を構築するとともに食品成分をスクリーニングしてきた。ここでは、以下の三つの実験系についてプロトコールを紹介する。

- ・ラットの脂肪組織から成熟脂肪細胞を単離調整する方法
- ・脂肪細胞を用いてインスリン感受性グルコース取り込みを測定する方法
- ・脂肪細胞の直径を測定する方法

成熟脂肪細胞の単離¹⁾

準備するもの

1. 器具

- ・ 経口投与針
- ・ 小型のはさみ 3 本 (図 1 参照, あるいはひげ剃り刃など鋭利な刃)
- ・ プラスチックシリンジ (20ml)
- ・ プラスチックビーカー (アシストコンテナ 70ml など)
- ・ ポリエステルメッシュ (東レ, テトエース # 6000 スターナイトなどの布地, 縦横約 200 μ m のメッシュになっている)
- ・ ウォーターバス (振盪機付き)

2. 試薬

- ・ Bovine Serum Albumin (和光一級で可, BSA)
- ・ collagenase (ヤクルト YK-101, Worthington Type I など)
- ・ glucose
- ・ アッセイバッファー (124.45 mM NaCl, 4.88 mM KCl, 0.95 mM CaCl₂, 0.74 mM MgSO₄, 0.30 mM Na₂HPO₄, 0.40 mM KH₂PO₄, 4.17 mM NaHCO₃, 22.74 mM HEPES, pH 7.4)
- ・ 1%BSA アッセイバッファー (アッセイバッファーに BSA を溶解し, pH 7.4 としたもの. BSA を溶解すると pH は低下する.)
- ・ コラゲナーゼ溶液 (1%BSA アッセイバッファーに 0.1%コラゲナーゼと 0.2%グルコースを溶解したもの)
- ・ ラット (6-8 週齢 Wistar 雄. 雌でも可)

プロトコール

まず, ウォーターバス (37 $^{\circ}$ C) の電源を入れ, 1%BSA アッセイバッファー, アッセイバッファー及びコラゲナーゼ溶液をウォーターバスに入れ温める.

- ・ 6-8 週齢 Wistar 雄ラット 2-3 匹をエーテルで麻酔
- ・ 頸椎脱臼して, 頸動脈からできるだけ脱血する.
- ・ 開腹して副睾丸・後腹壁脂肪組織を採取し, アッセイバッファー (37 $^{\circ}$ C) の入ったポリビーカーへ.
- ・ よく洗い, キムワイプの上で血管や膜などの組織を除去. 新しいアッセイバッファー (37 $^{\circ}$ C) に入れる.
- ・ よく洗い, 組織重量を測定.
- ・ 約 1g/ml のコラゲナーゼ溶液 (37 $^{\circ}$ C) 中に入れ, ポリビーカー中で 3 本の小さいはさみで細かくする (図 1). あるいは鋭利な刃物を用いて脂肪細胞組織

を小さくしたものをコラゲナーゼ溶液に入れる。



図 1



図 2

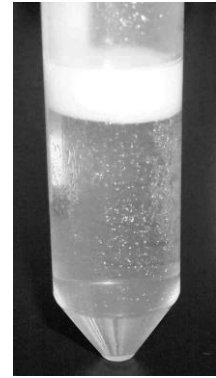


図 3

図 1 はさみ 3 本を重ねて組織を切る。(はさみの片方手前を固定し一方を前後に動かす)

図 2 ポリエステルメッシュをポリビーカーにかぶせ輪ゴムで止める。

中央を窪ませた所にコラゲナーゼ処理した脂肪組織を液ごと注ぐ。単離した脂肪細胞はメッシュで濾過されビーカーに入る。

図 3 遠心すると脂肪細胞は浮いて層をなす(上層の白い部分)。下層の液層と沈殿(間質細胞)を経口投与針で吸い取り除く。

- ・コラゲナーゼ溶液をウォーターバス中で浸透させ約 50 分間インキュベート。
- ・ポリエステルメッシュで単離された細胞を濾す。さらに上から温めた Hanks buffer で洗いながら細胞を漉す(図 2)。
- ・50ml 遠心チューブに移して遠心(約 500rpm, 40 秒, 常温)
- ・経口投与針で下の液層を捨てる。
- ・1%BSA アッセイバッファーを加えてゆっくり混ぜ、脂肪細胞を洗浄。
- ・遠心(500rpm, 40 秒, 常温)
- ・経口投与針で下の液層を捨てる。
- ・※をもう一度繰り返す。
- ・遠心(600rpm, 40 秒, 常温)(図 3)
- ・浮いている油をポリスポイトで除き、経口投与針で下の液層を捨てる。
- ・残った白い細胞塊を packed fat cell とする。

※

この packed fat cell を数十 μL ずつプラスチック試験管に分注すると脂肪細胞を用いた各種実験が出来る(次参照)。

注意点，応用等

脂肪細胞は低温にすると細胞内の中性脂肪が固化し機能が失われるので，必ず 18℃以上の室温下で行うこと．また，ガラスに接触すると細胞が壊れるのですべてプラスチック製のものをを用いること．

得られた脂肪細胞はそのまま実験に供することが出来る．また，無菌的に洗浄することにより培養することも可能である²⁾．

数週齢のラットからは小さな脂肪細胞がとれ 10 週齢以上になると大きな脂肪細胞がとれる．これらの細胞を用いることで大小の脂肪細胞の違いを生化学的，分子生物学的に調べることが出来る．また，培養すれば長期に渡って違いを調べることが出来る．

※印を付けた最初の遠心分離によって得られる沈殿の細胞には前駆脂肪細胞，単球やマクロファージなどの細胞も含まれている（間質細胞取得が目的なら遠心を強く行うこと）．この画分を無菌的によく洗浄し培養することで脂肪細胞へと分化させることもできる．肥満した脂肪組織ではマクロファージが多く浸潤しており脂肪細胞機能に悪影響を与えている．これら浸潤しているマクロファージを集め性質を解明することはメタボリックシンドロームなどの発症メカニズムの解明にも役立つ．

インスリン刺激脂肪合成

これはインスリン感受性を評価するためのグルコース取り込み量を測定する実験であり，ここでは放射性グルコースを用いグルコースからの脂肪合成を測定する³⁾．本実験は放射性物質を用いるので RI 実験室で行うこと．

準備するもの

1. 道具

- ・ピペットマン（200μl 用）
- ・先を切った 200μl チップ
- ・マイクロマン（250μl 用）
- ・10ml PP（ポリプロピレン）チューブ

2. 試薬

- ・¹⁴C-グルコース溶液（¹⁴C-グルコース原液が 3.7MBq/ml であればアッセイバッファーで十分の一希釈する）
- ・反応停止液（イソプロピルアルコール:ヘプタン:1N H₂SO₄=40:10:1）
- ・ヘプタン

- ・トルエンシンチレーター（有機溶媒用市販物あるいは DPO 12g, POPOP 300mg をトルエン 3L に溶解）
- ・バッファー等は前項と同じ

プロトコール

- ・ PP チューブに 1%BSA アッセイバッファーを 175 μ l ずつ分注.
- ・そこに packed fat cell (前項) を 40 μ l ずつ分注 (先を切ったチップで).
- ・37 $^{\circ}$ C で 20 分インキュベート.
- ・食品サンプル or vehicle (1%BSA アッセイバッファー) を 25 μ l 加える.
- ・37 $^{\circ}$ C で 10 分インキュベート.
- ・インスリン or vehicle (アッセイバッファー) を 25 μ l 加える.
- ・37 $^{\circ}$ C で 10 分インキュベート.
- ・ 14 C-グルコース溶液 (370kBq/ml) を 25 μ l 加える.
- ・37 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベート.
- ・反応停止液を 830 μ l 加えて 15 秒ボルテックス.
- ・ヘプタン 500 μ l, 水 250 μ l を加え, さらに 15 秒ボルテックス.
- ・遠心 (3,000rpm, 5 分, 室温)
- ・中性脂肪を含むヘプタン上層 250 μ l (2/5 量)をマイクロマンでカウンティングバイアルに移す.
- ・トルエンシンチレーターを約 10ml 加え, 放射活性をカウントする.

測定例

グルコースからの脂肪合成はインスリン存在下において約 3~5 倍ほど増加する (図 4). このインスリンの作用は $\text{TNF}\alpha$, アドレナリンなどによって阻害される. また, 食品成分中のインスリン様作用を示す成分の評価系としても利用出来る.

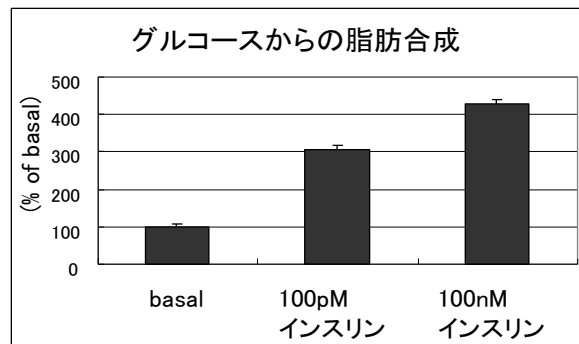


図 4 インスリンによるグルコースからの脂肪合成促進

注意点，応用等

中性脂肪を抽出したヘプタン上層は揮発性であるのでピペットマンでは定量的に採取できない。必ずポジティブディスプレイメント方式のマイクロマンを使用すること。脂肪細胞は浮いていてチューブ円周上に集まっているので、良く反応させようとチューブを振って脂肪細胞を拡散させたいが、振れば物理的刺激によりインスリン様作用が出てしまうし脂肪細胞が壊れるのでチューブは振らずに静置のこと。

もちろん ^3H -グルコース，放射性 2-デオキシグルコースなども用いることが出来る。また，インスリンの代わりにアドレナリン（食品サンプル）を添加すると脂肪分解が起こり溶液中にグリセロールと脂肪酸が放出される。グリセロールあるいは脂肪酸を定量すれば食品成分の脂肪分解活性を調べることが出来る。

脂肪細胞の直径測定

ここでは脂肪組織をオスミウムで固定し，個々バラバラになった脂肪細胞をコールターカウンターで直径，個数を測定する方法について紹介する⁴⁻⁶⁾。

準備するもの

1. 固定液

- ・ 2% 四酸化オスミウム - 0.05M コリジン HCl 緩衝液 (pH 7.4)
 - 1) 酸化オスミウム (IV) (オスミウム酸) (和光・特級 1g)
 - 2) 2,4,6-トリメチルピリジン (γ -コリジン) (和光・特級 500ml)

固定液 100ml 調整する場合

- ・ 2) を 605.9mg 量り取り H_2O 25ml に溶解し，0.5M コリジン緩衝液を作製する
- ・ 0.5M コリジン緩衝液 25ml に 0.1N HCl 22.5ml を加える
- ・ 100ml にメスアップする
- ・ 1) を 2g 加え完全に溶解する
- ・ pH 7.4 に調整し，遮光して冷蔵保存

2. 器具

- ・ 小メッシュ (25 μm ，金属製篩)
- ・ 大メッシュ (250 μm ，金属製篩)
- ・ 0.01% Triton-X - 生食溶液

プロトコール

1. 組織の固定

- ・ラット等の脂肪組織の摘出 ※乾燥しないように注意
- ・脂肪組織の重量測定
- ・固定液 5ml を分注したネジ蓋付試験管に組織片約 100mg を 4~5 片に細断して入れる。
- ・室温で静置 (細胞が固定されてバラバラになるまで, 数日~数月間)

2. 細胞の回収

- ・小メッシュ (25 μ m) の上に大メッシュ (250 μ m) を重ね, 固定しバラバラになった脂肪細胞を固定液ごと流しこみ, 蒸留水でよく洗浄する。
- ・結合組織や細胞片が残存する大メッシュを外す。
- ・小メッシュ上の固定脂肪細胞を蒸留水でよく洗浄し, 小片を除去する。
- ・0.01% Triton-X-生食溶液で 2~3 回洗浄する。
- ・0.01% Triton-X-生食溶液約 3ml とともに細胞を回収しネジ蓋付試験管に保存する。

注意点等

このようにした固定した細胞は長期保存できる。コールターカウンターの操作については説明書にしたがって行うこと。

おわりに

最近, 脂肪細胞の実験には 3T3-L1 前駆脂肪細胞を脂肪細胞様へと分化させて使用することも多用されるが, 3T3-L1 細胞は起源が分からないし生理的条件の反映という点で生体の成熟脂肪細胞を用いて各種機能を調べるのは重要である。また, 成熟脂肪細胞の油滴は単房であるが 3T3-L1 脂肪細胞様細胞は多房性であり違いがある。ここでは触れなかったが褐色脂肪細胞や間質細胞, 3T3-L1 前駆脂肪細胞の取扱については文献 2 に少し記載がある。

参考文献

- 1) Rodbell, M., Metabolism of isolated fat cells. *J. Biol. Chem.*, **239**, 375-380 (1964).
- 2) 関谷敬三, 奥田拓道, IX.機能細胞の培養とその応用 II-5) 脂肪細胞, 代謝, **29**, 83-93 (1992).

- 3) Abe, D., Saito, T. and Sekiya, K., Sennidin stimulates glucose incorporation in rat adipocytes. *Life Sciences*, **76**, 1027-1033 (2006).
- 4) Hirsch, J. and Gallian, E., Methods for the determination of adipose cell size in man and animals. *J. Lipid Res.*, **9**, 110-119 (1968).
- 5) Etherton, T.D., Thompson, E.H. and Allen, C.E., Improved techniques for studies of adipocyte cellularity and metabolism. *J. Lipid Res.*, **18**, 552-557 (1977).
- 6) Cushman, S.W. and Salans, L.B., Determinations of adipose cell size and number in suspensions of isolated rat and human adipose cells. *J. Lipid Res.*, **19**, 269-273 (1978).