

脂肪細胞の炎症性変化におけるミトコンドリアの役割

Mitochondrial dysfunction causes inflammatory changes in 3T3-L1 adipocytes

長谷川 千織¹, 伊香賀 玲奈¹, 行方 衣由紀², 田中 光², 田中 直子¹

¹大妻女子大学家政学部, ²東邦大学薬学部

Chiori Hasegawa¹, Reina Ikaga¹, Iyuki Namekata², Hikaru Tanaka², and Naoko Tanaka¹

¹Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University

12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-8357 Japan

²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University

2-2-1 Miyama, Funabashi-shi, Chiba, 274-8510 Japan

キーワード：脂肪細胞, ミトコンドリア, バイオイメージング

Key words : Adipocyte, Mitochondria, Bioimaging

抄録

【目的】ミトコンドリアはエネルギー代謝における主要な細胞内小器官であり、細胞の状態を積極的に制御していることが明らかになってきている。本研究では、白色脂肪細胞モデルである3T3-L1細胞を用いて、脂肪細胞の炎症性変化におけるミトコンドリアの役割を解明することを目的とした。【方法】3T3-L1細胞を脂肪細胞に分化させ、分化誘導後17日目に脱共役剤FCCPを2 μ Mとなるように添加した培地に交換し、24時間培養した。培養した細胞のミトコンドリア、脂肪滴、核を蛍光染色して、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、炎症性サイトカインのmRNAをリアルタイムPCR法を用いて定量した。【結果および考察】蛍光観察から、FCCPを添加した細胞でミトコンドリアが小さく分裂し、エネルギー代謝が抑制されていることが示された。ミトコンドリアは脂肪滴周辺から離れて細胞全体に分散して存在していた。炎症性サイトカインTNF- α 、IL-6、MCP-1のmRNA発現量が有意に増加しており、ミトコンドリアATP合成の抑制によって脂肪細胞に炎症性変化が引き起こされることが示された。

1. 序論

ミトコンドリアはエネルギー代謝を担う細胞内小器官であり、細胞の炎症性変化にも関わるものが近年明らかになってきている^[1,2]。一般的に白色脂肪細胞にはミトコンドリアが少ないと言われてきたが、本研究室では白色脂肪細胞モデルの3T3-L1細胞において、ミトコンドリアが脂肪滴の周囲に集まっている様子が観察されたことを報告した^[3]。

本研究では脂肪細胞の炎症性変化においてミトコンドリアがどのように関わるのかを明らかにするための第一歩として、脱共役剤FCCPを添加して培養したときの影響を調べたので報告する。

2. 方法

2.1. 細胞培養

マウス胎仔由来線維芽細胞3T3-L1を10% calf serum / 20mM HEPES / 100 μ g/ml Penicillin-Streptomycin (PS)を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO)を用いて5%CO₂下、37°Cで培養した。Confluentまで培養後、10% Fetal bovine serum (FBS) / 20mM HEPES / 100 μ g/ml PS / 10 μ g/ml Insulin / 2.5 μ M Dexamethasone / 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthineを含むDMEMを用いて2日間培養し、脂肪細胞への分化誘導を行った。その後10% FBS / 20mM HEPES / 100 μ g/ml PS / 10 μ g/ml Insulinを含むDMEMで2日間、さらに10% FBS / 20mM HEPES / 100 μ g/ml PSを含むDMEM (分化維持培地)で、分化誘導後17日目まで培養した。^[4]

2.2. 脱共役剤による処理

脱共役剤として Carbonyl cyanide-p-trifluoro-methoxyphenylhydrazone (FCCP) を使用した。分化誘導後 17 日目に、エタノールに溶解した FCCP を $2\mu\text{M}$ の濃度になるように分化維持培地に添加し 24 時間培養した。

FCCP 処理と同様のエタノール濃度になるように培地にエタノールを添加して培養した細胞を Control とした。

2.3. mRNA の定量

細胞から ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて Total RNA を抽出し、Prime Script RT Master Kit RR036A (TaKaRa) を用いて cDNA に変換した。SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用い、ABI-7300 Real-Time PCR System で mRNA の定量を行った。リファレンス遺伝子として β -actin を用いた。[5]

2.4. 蛍光観察

ミトコンドリアを MitoTracker Green-AM (励起波長 488nm, 観察波長 500-530nm), 脂肪滴を Nile Red (励起波長 543nm, 観察波長 560nm 以上), 核を Hoechst33342 (790nm 二光子励起, 観察波長 390-465nm) でそれぞれ染色し, 高速走査型共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Zeiss) を用いて撮像した。得られたデータは LSM Image Browser (Carl Zeiss) で解析し, Adobe Photoshop Elements 10.0 で画質の微調整を行った。

3. 結果

3.1. ミトコンドリア状態変化の蛍光観察

コントロール細胞と FCCP で 24 時間処理した細胞の蛍光観察画像を図 1 に示す。コントロール細胞ではミトコンドリアが融合して, ひも状の形態が鮮明に観察された (図 1A)。

FCCP 処理をした細胞のミトコンドリアは, 断片化して 1 つ 1 つが小さな球状の形に分裂していると考えられた。さらに細胞全体に分散している様子が観察された (図 1B)。

3.2. 炎症性サイトカイン発現量への影響

FCCP 処理による細胞への影響を調べるため, 炎症性サイトカインの TNF- α , IL-6, MCP-1 の mRNA 量を定量した (図 2)。

炎症性サイトカインの mRNA 発現量は TNF- α

で 2.9 倍, IL-6 で 10.8 倍, MCP-1 で 3.8 倍に有意に増加した。FCCP によるミトコンドリア ATP 合成の障害が脂肪細胞の炎症性変化を誘発していると考えられた。

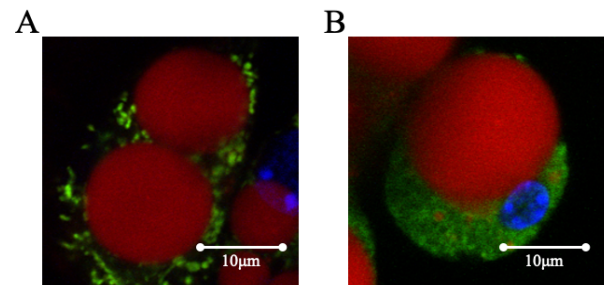


図 1. ミトコンドリアと脂肪滴の蛍光観察
コントロール細胞 (A) と FCCP 処理細胞 (B) の様子を示した。MitoTracker Green-AM でミトコンドリア (緑), Nile Red で脂肪滴 (赤), Hoechst33342 で核 (青) を染色し, 共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

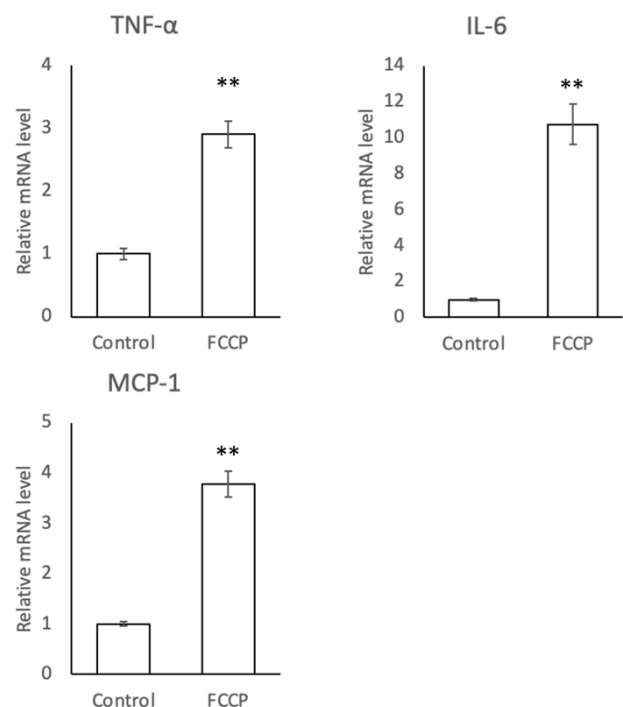


図 2. 炎症性サイトカインの mRNA 発現量
FCCP 処理細胞の炎症性サイトカイン TNF- α , IL-6, MCP-1 の mRNA 発現量を, Control 細胞に対する相対発現量として示した。**: $p < 0.01$ で有意差あり。

4. 考察

本研究では、ミトコンドリア ATP 合成の脱共役剤 FCCP が 3T3-L1 脂肪細胞にどのような影響を与えるか調べた。炎症性サイトカインである TNF- α , IL-6, MCP-1 の mRNA 発現量は有意に増加し、ミトコンドリア ATP 合成の低下が脂肪細胞の炎症性変化を引き起こすことが示された。

一方、FCCP 処理した細胞のミトコンドリアは断片化し、細胞質に広がっている様子が観察された。1分ごとに30分間連続撮影した動画から、コントロール細胞ではミトコンドリアが融合と分裂を繰り返し活発に動く様子が観察されたが、FCCP 処理をした細胞ではほとんど動かなかった（データは示さず）。これらの結果から、FCCP 処理による脱共役で膜電位が消失することによって、ミトコンドリアの機能が大きく低下していると考えられた。

脂肪細胞が肥大化すると、脂肪細胞で合成される炎症性サイトカインの発現量が増加し、これらが脂肪組織周辺の血管に炎症を引き起こし、また血液を介して全身の器官に影響を与え、インスリン抵抗性や高血圧といったいわゆるメタボリックシンドロームを引き起こすことが知られている。

本実験の結果から、ミトコンドリア ATP 合成の低下は短期間でも炎症性サイトカイン発現量の顕著な増加を引き起こすことが示された。脂肪滴は小胞体で合成され、小さな脂肪滴が融合することによって肥大化する。脂肪滴の肥大化を感知して炎症性サイトカインの発現量を増加させるスイッチとして、ミトコンドリアが何らかの役割を果たしている可能性も考えられ、脂肪滴とミトコンドリアの相互作用について今後さらなる検討を行いたい。

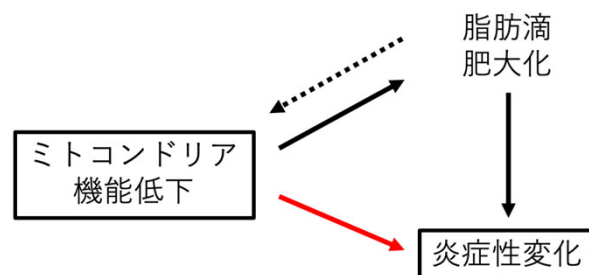


図3. 脂肪細胞の炎症性変化に関する模式図
本研究の結果を赤矢印で表した。破線矢印は推測。

付記

本研究は、大妻女子大学人間文化研究所の研究助成 (DA2711, K2710) を受けたものである。

引用文献

- [1]Wilson-Fritch L *et al.* Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol.* 2003, 23(3), 1085-1094.
- [2]Patti ME *et al.* The Role of Mitochondria in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Endocr Rev.* 2010, 31(3), 364-395.
- [3]Hasegawa C *et al.* The role of mitochondria on the formation of lipid droplets in adipocytes: Live cell imaging of mitochondria and lipid droplets. *Int. J. Hum. Cult Stud.* 2015, 25, 268-271.
- [4]Gregoire FM *et al.* Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 1998, 78(3), 783-809.
- [5]Suzuki T *et al.* Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques.* 2000, 29(2), 332-337.

Abstract

Inflammatory cytokines secreted from adipocytes are known to induce hypertension and insulin resistance resulting in Type 2 diabetes. Mitochondria, which is the keystone of energy metabolism, are continuously controlling cellular states probably including inflammatory states. In this study, we investigated the role of mitochondria on inflammation in 3T3-L1 adipocytes. We cultured 3T3-L1 cells for 17 days after differentiation and treated them with a mitochondrial oxidative phosphorylation uncoupler, FCCP (2 μ M in culture medium), for 24 hours. In the cells treated with FCCP, mitochondria appeared to divide and spread away from the lipid droplets. The mRNA expression of TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-6 (Interleukin 6) and MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1) in those cells was significantly increased, indicating that mitochondrial dysfunction induced inflammatory changes in 3T3-L1 adipocytes.

(受付日: 2020年10月6日, 受理日: 2021年1月8日)

長谷川 千織（はせがわ ちおり）

現職：大妻女子大学家政学部食物学科助手

大妻女子大学大学院人間文化研究科修士課程修了。

専門は栄養生化学および細胞生物学。大学院在学中より一貫して脂肪細胞の炎症性変化とミトコンドリアの関係を調べている。