

脂肪細胞の成熟過程におけるミトコンドリアの役割

—脂肪滴とミトコンドリアの可視化—

The role of mitochondria on the formation of lipid droplets in adipocytes:
Live cell imaging of mitochondria and lipid droplets

長谷川 千織¹, 伊香賀 玲奈^{2,5}, 行方 衣由紀³, 田中 光³, 田中 直子⁴

¹大妻女子大学大学院人間文化研究科, ²お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科,
³東邦大学薬学部, ⁴大妻女子大学家政学部, ⁵大妻女子大学人間生活文化研究所

Chiori Hasegawa¹, Reina Ikaga^{2,5}, Iyuki Namekata³, Hikaru Tanaka³, and Naoko Tanaka⁴

¹Graduate School of Studies in Human Culture Studies, Otsuma Women's University
12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

²Graduate School of Humanities and Sciences, Ochanomizu University
2-1-1 Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan 112-8610

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University
2-2-1 Miyama, Funabashi-shi, Chiba, Japan 274-8510

⁴Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University
12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

⁵Institute of Human Culture Studies, Otsuma Women's University
12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

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】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いる。しかし、アディポネクチンなどを分泌し代謝にも積極的に関わることが近年わかってきており、白色脂肪細胞とエネルギー代謝の要であるミトコンドリアの間には密接な関係があるのではないかと考えられる。そこで本研究では、脂肪細胞の成熟過程とミトコンドリアの関連性を、脂肪滴とミトコンドリアの簡易的な蛍光染色方法を用いて可視化することを目的とした。【方法】マウス線維芽細胞3T3-L1を脂肪細胞に分化させ、分化誘導後8日目と32日目の脂肪滴とミトコンドリアを蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、それぞれのミトコンドリアの蛍光強度を解析した。【結果及び考察】分化誘導後8日目と32日目で蛍光強度に有意差はなかったが、32日目のほうが増加傾向にあり、ミトコンドリアの機能は保たれていることが示唆された。また、分化誘導後8日目も32日目もミトコンドリアが脂肪滴を囲むように存在する様子が観察された。

1. 序論

脂肪滴の肥大化は脂肪細胞のサイトカインの合成, 分泌を促し, 脂肪細胞周辺の血管や神経を含む結合組織全体の炎症を引き起こし, 生活習慣病の原因になると言われている^[1,2]. ミトコンドリアはエネルギー代謝の要であり, 様々な生命現象に重要な役割を担っているが, このような脂肪細胞の炎症性変化や脂肪滴の状態の制御にも重要であ

ることが近年わかってきている^[3,4]. また, 脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンはミトコンドリアを活性化することも報告されており, 脂肪細胞とミトコンドリアは深く関連していると考えられる^[5].

マウス線維芽細胞 3T3-L1 は脂肪細胞への分化誘導刺激を与えると脂肪滴を蓄積し, 白色脂肪細胞様の性質を示す. 脂肪滴は分化誘導後の日数が

経つにつれて大きくなり、脂肪細胞の成熟過程を観察することができる。

本研究では、脂肪滴の成熟過程におけるミトコンドリアの役割を探るための一つの方法として、脂肪滴とミトコンドリアの可視化を試みた。

2. 方法

2.1. 細胞培養

マウス線維芽細胞 3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化させて実験を行った。10% calf serum (CS) / 20mM HEPES / 100 μ g/ml Penicillin / Streptomycin (PS) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO 社)を用いて 5%CO₂ 下, 37°Cで培養した。Confluentの状態にした後, 10% Fetal bovine serum (FBS) / 20mM HEPES / 100 μ g/ml PS / 10 μ g/ml Insulin / 2.5 μ M Dexamethasone (DEX) / 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)を含む DMEM を用いて 2 日間培養し, 脂肪細胞への分化を行った。その後 10% Fetal bovine serum (FBS) / 20mM HEPES / 100 μ g/ml PS / 10 μ g/ml Insulin を含む DMEM で 2 日間培養後, 10% Fetal bovine serum (FBS) / 20mM HEPES / 100 μ g/ml PS を含む DMEM を用いて分化誘導後 8 日目, 32 日目までそれぞれ培養を続けた。

2.2. 蛍光染色

ミトコンドリアは 5 μ g/ml Rhodamine 123 を用いて室温で 30 分染色し, 脂肪滴は 1 μ M Nile Red を用いて室温で 5 分染色した。

2.3. 蛍光観察

染色後の細胞は, 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。Rhodamine 123 は 488nm で励起し, 500-530nm の観察波長で撮像し, Nile Red は 543nm で励起し, 560nm 以上の観察波長で撮像した。画像は 0.39 μ m ごとの Z スライス画像を連続的に撮像した。得られたデータは LSM Image Browser (Zeiss) で解析し, Adobe Photoshop Elements 10.0 により画質の微調整を行った。

2.4. 蛍光強度解析方法

デジタルドットあたりの Rhodamine 123 の蛍光強度の平均を, Image J を用いて解析した。

3. 結果

3.1. 脂肪滴とミトコンドリアの蛍光観察

分化誘導後 8 日目と 32 日目の細胞の携行し基礎像を図 1 に示す。分化誘導後 8 日目の細胞では脂肪滴は小さく, ミトコンドリアは細胞全体に広がって存在しているように見えるが (図 1A), 脂肪滴周辺を拡大すると (図 1C), ミトコンドリアが脂肪滴の周りに引き寄せられているような様子が観察できる。32 日目では核が潰れたように見えるほど脂肪滴が大きくなり, ミトコンドリアも狭い空間に凝縮されていた (図 1B) が, ここでも脂肪滴を覆うようなミトコンドリアの様子が観察された (図 1D)。

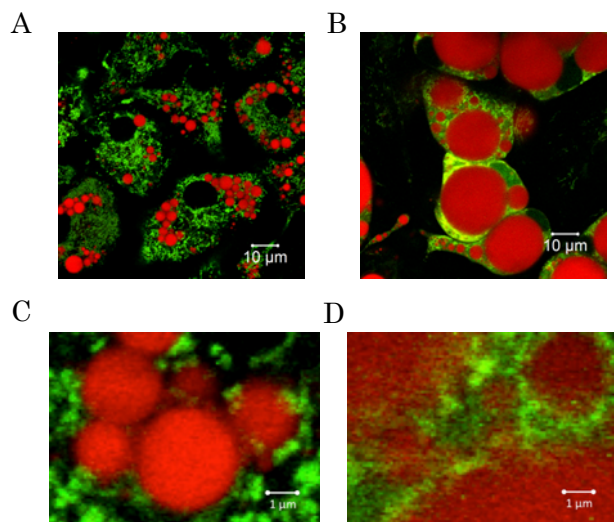


図 1. 脂肪滴の成熟過程における脂肪滴とミトコンドリアの様子。分化誘導後 8 日目 (A, C) および 32 日目 (B, D) の様子を示した。C, D: は拡大図。

Rhodamine 123 でミトコンドリア (緑), Nile Red で脂肪滴 (赤) を染色し, 共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

3.2. ミトコンドリア密度の解析

脂肪滴の成熟にともなって, ミトコンドリアをはじめとする他の細胞内オルガネラの存在するスペースは小さくなっていくが, このときミトコンドリアの密度に変化があるかどうかを調べる目的で, 脂肪滴周辺の Rhodamine 123 の蛍光強度を解析した (図 2)。蛍光スライス画像における単位面積当たりの蛍光強度は, 有意差はないものの, 分化誘導後 32 日目で増加傾向が見られた。

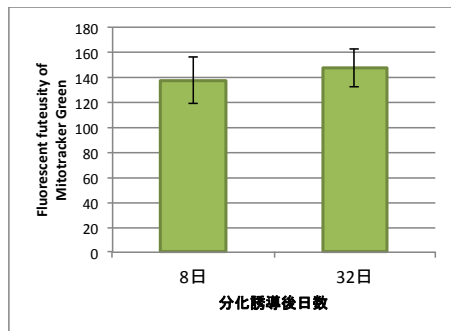


図 2. Rhodamine 123 の蛍光強度

Rhodamine 123 のデジタルドットあたりの蛍光強度を Image J で解析した。分化誘導後 8 日目, 32 日目のそれぞれについて 1 つの細胞あたり 10 カ所, 独立した 3 つの細胞を解析し, 結果を平均±標準偏差でグラフ化した。

4. 考察

3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化誘導すると, 脂肪滴が合体して大きくなるにつれ, 細胞全体でミトコンドリアが占める空間は減少していくが, 単位体積あたりの Rhodamine 123 の蛍光強度は, 特に脂肪滴周辺では増加傾向が見られ, 脂肪滴の成熟や脂肪の利用にミトコンドリアが重要な役割を果たしていることを視覚的に捉えることができた。分化誘導後 32 日目の細胞では, 特に脂肪滴周辺にミトコンドリアが集まり, 脂肪滴を囲むように存在している様子が観察できた。

Rhodamine 123 はミトコンドリアの膜電位に影響を受けるため, 32 日目における蛍光強度の増加傾向は膜電位の上昇を反映している可能性もある。ミトコンドリアの機能低下は一般的に膜電位の低下を引き起こすことから, 脂肪滴の成熟過程において, 脂肪滴周辺でのミトコンドリアの重要性は保たれているか, むしろ高まっていることが示唆された。

白色脂肪細胞におけるミトコンドリアの機能に関する研究はまだ始まったばかりであるが, 年々注目度が増している。本研究では, 脂肪滴とミトコンドリアの簡易な蛍光染色法を用い, 生きた状態での脂肪滴とミトコンドリアの形態を観察することに成功した。脂肪滴がさらに成熟し脂肪細胞に炎症性変化が起こると, ミトコンドリアにどのような影響があるか, このシステムを用いてさらに検討していきたい。

付記

本研究は, 大妻女子大学人間生活文化研究所の研究助成 (DB2613) を受けたものである。

引用文献

- [1] Kassem Makki et al. Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. ISRN Inflammation. 2013. Article ID 139239.
- [2] John N. Release of Inflammatory Cytokines by Human Adipose Tissue is Enhanced in Obesity and Primarily due to the Nonfat Cells. Vitamins and Hormones. 2006. 74, 443-477.
- [3] Wilson-Fritch et al. Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. Mol Cell Biol. 2003. 23(3), 1085-1094.
- [4] Mary-Elizabeth et al. The Role of Mitochondria in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. Endocr Rev. 2010. 31(3), 364-395.
- [5] Iwabu M et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. Nature. 2010, 464(7293), 1313-1319

Abstract

White adipocytes have endocrine functions and secrete hormones and cytokines in response to various changes in their energy states. Mitochondria are the keystones of energy metabolism and they continuously join and divide, controlling the energy states of the cells. In contrast to the brown adipocytes, which is specialized for the non-shivering thermogenesis and in which the role of the mitochondria in cellular function has been intensively investigated, the role of mitochondria in the white adipocytes is virtually unknown. In this study, we observed 3T3-L1 adipocytes, the model of white adipocytes during differentiation by live cell imaging with fluorescent dyes focusing on the mitochondria and the lipid droplets. The shapes of mitochondria were clearly observed in the cells on 32 days after differentiation, although the lipid droplets were well-developed and the space for mitochondria was limited in the cells. At all differentiation stages, mitochondria appeared to be gathered around the lipid droplets, which suggests the existence of some functional relationships between the mitochondria and lipid droplets.

(受付日 : 2015 年 8 月 14 日, 受理日 : 2015 年 8 月 31 日)

長谷川 千織 (はせがわ ちおり)

現職 : 大妻女子大学大学院人間文化研究科修士課程 2 年

大妻女子大学家政学部食物学科食物学専攻卒業

修士論文課題として「ミトコンドリアと脂肪滴の相互作用が脂肪細胞の炎症性変化に与える影響」について研究を行っている。