

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12866

研究課題名(和文) 脂肪を燃やす褐色脂肪細胞における熱産生過程の非染色分子イメージング

研究課題名(英文) label-free molecular imaging of brown adipocytes in fat-burning processes

研究代表者

加納 英明(KANO, Hideaki)

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号：70334240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラマン分光法を基盤とした非染色・非標識・非破壊・非侵襲分子イメージング法を用いることで、褐色脂肪細胞の生きたまま、そのままの状態を可視化し、その特殊な脂質代謝過程の動態を明らかにすることを目標として、研究を行った。非線形ラマン(coherent anti-Stokes Raman scattering; CARS)分光イメージングを発展的に用いた脂質不飽和度イメージングを実現した。これに加え、細胞内脂質合成について積極的に介入する実験も行い、褐色脂肪細胞株は通常の状態では不飽和脂質を豊富に脂肪滴に蓄えていることを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Brown adipose tissue (BAT) has a unique feature of non-shivering heat production. It is important in particular for newborns to avoid hypothermia. It was believed so far that most of BAT disappear as infants grow up. However, recent study has shown that BAT still exist even in adults. However, detailed metabolic processes are not fully understood. Here, we studied brown adipocytes in vitro using ultrabroadband multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microspectroscopy. We observed characteristic vibrational bands with different vibrational contrast. The images of the vibrational bands at 2845, 1440, and 1298  $\text{cm}^{-1}$  mainly show lipid localization. In particular, the images of the vibrational bands at 3010, 1650, and 1261  $\text{cm}^{-1}$  show unsaturated lipid localization. The CARS imaging of unsaturated lipids are also investigated with suppression and overexpression of SCD1(Stearoyl-CoA desaturase-1).

研究分野：分子分光学・分子分光イメージング

キーワード：褐色脂肪細胞 ラマン CARS 分子イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

近年、我が国では食生活の欧米化や生活習慣の変化に伴う運動不足などにより肥満が増加している。過度の肥満は体重の増加だけでなく、高脂血症・2型糖尿病・高血圧などといった「生活習慣病」をもたらす原因と密接に関係する。そのため、肥満の予防および治療は現代医療において重要な課題であり、各方面から多大な関心が寄せられている。

そこで現在注目を集めているのが、「脂肪を燃焼する細胞」として知られている褐色脂肪細胞である。この細胞はミトコンドリアを介した特殊な熱生産機能を持ち、蓄えた脂肪を細胞内で熱に変換して基礎代謝を上げることができるため、身体の代謝能力を高める「痩せる細胞」として、盛んに研究されている。しなしながら、その特殊な脂質代謝能力について完全には解明されていない。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、ラマン分光法を基盤とした非染色・非標識・非破壊・非侵襲分子イメージング法を用いることで、褐色脂肪細胞の生きたまま、そのままの状態を可視化し、その特殊な脂質代謝過程の動態を明らかにすることを目標として、研究を行った。

### 3. 研究の方法

本研究にあたり、測定装置の高度化を目指した。まず、高出力高繰り返し白色レーザー光源の導入を行った。この光源は、cwQスイッチ・マイクロチップ Nd:YAG レーザーをベースとし、ファイバーアンプにより増幅した平均出力>1Wの近赤外光を発生させることが出来る。繰り返し周波数は0.82MHz、パルス幅は約85psである。この光源出力を2つに分け、一方をポンプ光(基本波:1064nm)として使用し、もう一方はフォトニック結晶ファイバー(photonic crystal fiber; PCF)を通すことで広帯域な波長成分を持つスーパーコンティニューム(supercontinuum; SC)光を発生させた。新規光源を用いたセットアップでは、非軸放物面鏡を導入することでSC光をコリメートし、色収差の低減を狙った。また、CARS光の高感度検出のため、近赤外域にて感度の高いCCD検出器の導入を行った。新規光源と従来光源は同一の光学定盤にのっているため、装置開発を進めると同時に、従来光源での測定も行いながら研究を行った。

### 4. 研究成果

装置改良を施して褐色脂肪細胞生細胞のコヒーレント・ラマン(coherent anti-Stokes Raman scattering; CARS)分光イメージングや第二高調波発生(second harmonic generation; SHG)イメージング、及び第三高

調波発生(third harmonic generation; THG)イメージングを行った。本研究で特筆すべき成果として、CARS分光イメージングの複数のチャンネルを用いた脂質不飽和度イメージングに成功したことが挙げられる。細胞内脂肪滴における脂質全量は、脂肪滴の構成分子であるトリアシルグリセロール(triacylglycerol; TAG)が持つ三つのエステル結合(C=O結合)により評価できる。このバンドは $1750\text{ cm}^{-1}$ に現れる。本研究では、このバンドを内部標準に用い、不飽和結合に由来するバンド強度を定量した。具体的には、 $1650\text{ cm}^{-1}$ に現れるcis C=C結合に由来するバンドを用いて、脂肪滴における不飽和度の定量的評価及びイメージングを行った。

褐色脂肪細胞の脂質代謝能力の特異性を評価するため、実験では白色脂肪細胞も同日に測定・比較した。さらに、細胞内脂質合成について積極的に介入する実験を行った。

具体的には、薬剤投与と遺伝子操作を行うことにより、代表的な不飽和脂肪酸合成酵素であるSCD1(Stearoyl-CoA desaturase-1)を抑制または過剰発現させた両脂肪細胞を用意した。また、薬剤投与や遺伝子操作には薬剤溶媒の導入やレトロウイルスの感染を伴うため、それらに対するコントロール細胞として、薬剤溶媒だけを入れた細胞と遺伝子変化を伴わないベクターのレトロウイルスに感染させた細胞も測定した。本研究では、白色、褐色脂肪細胞合わせて計10種の試料にて測定を行った。

褐色脂肪細胞にはHB2株を用いた。HB2株は褐色脂肪前駆細胞株であり、p53欠損マウスに由来する脂肪前駆細胞である。HB2細胞の培養にはDMEM培地(4.5g/mlグルコース入り)に10%ウシ胎児血清(fetal bovine serum; FBS)と抗生物質を添加したものを基本培地として使用し、5%CO<sub>2</sub>存在下、37°Cでインキュベートした。HB2細胞を褐色脂肪細胞に分化させる際は、チャンバースライドガラスに $3 \times 10^4$  cells/wellの細胞を播種して37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で1~2日間培養し、細胞がコンフルエントになったら培地を基本培地に交換し、以降培養を継続した。測定には分化誘導開始から6~7日目の、脂肪滴が細胞内に十分に蓄積した状態の細胞を使用した。

次に、SCD1を抑制した細胞株を用意した。分化誘導は通常の分化誘導と同様に行い、分化誘導の開始日から最終日までSCD1インヒビターであるPluriSInを培地に投与することによって作製した。本実験では、PluriSInの最終濃度が5µMになるように、2日ごとの培地交換の際に他の試薬と一緒にインヒビターを新たに培地に混ぜて、細胞に投与した。PluriSIn投与の際に溶媒としてジメチルスルホキシド(Dimethyl sulfoxide; DMSO)を使用したため、この細胞の比較細胞株(コントロール細胞株)として、インヒビターと同量のDMSOを加えた細胞株を用意した。

さらに、SCD1 を過剰発現した細胞株も用意した。この細胞の分化誘導では、分化誘導の開始日から最終日まで、SCD1 を過剰発現するウイルスベクターを持ったレトロウイルスに感染させることで作製した。

以上の細胞を、CARS/SHG/THG 分光イメージング装置にて測定した。SCD1 インヒビターにより SCD1 の発現を抑制した細胞では、エステル結合由来の C=O 結合のバンドで規格化した *cis* C=C 結合のバンドが有意に減少していた。すなわち、脂肪滴内の不飽和脂質量が、脂質総量に対して有意に減少している結果が得られた。他のバンドでも解析したところ、不飽和脂質に由来する C=C-H 伸縮振動(3015  $\text{cm}^{-1}$ )、C=C-H 変角振動(1260  $\text{cm}^{-1}$ )のバンドにおいても同様に顕著に減少した結果が得られた。このことから、SCD1 インヒビターによって細胞内の不飽和脂肪酸合成経路が阻害され、その効果が細胞内に蓄積した脂肪滴の脂質組成に現れていることがわかった。また、不飽和結合に由来する各バンドの増大に相反するように、*trans* C-C 伸縮振動

(1125 $\text{cm}^{-1}$ , 1068 $\text{cm}^{-1}$ )のバンド強度が大きくなっていった。このことから、SCD1 が阻害されることで過剰に蓄積された飽和脂肪酸が TAG となって脂肪滴に蓄積する際 *trans* C-C 結合のコンホメーションをとりやすいことがわかった。この結果が SCD1 inhibitor によるものであることを確認するため、SCD1 インヒビター無しの DMSO 導入の細胞についても比較・検討を行った。通常の褐色脂肪細胞と比べ、脂肪滴のスペクトルがほぼ同じであったため、本結果は SCD1 インヒビターによるものであり、投与時の溶媒である DMSO の影響はほぼないことがわかった。

同様に遺伝子操作による SCD1 過剰発現株を用いた測定を行ったところ、不飽和度の変化は少なかった。このことから、褐色脂肪細胞株は通常の状態では不飽和脂質を豊富に脂肪滴に蓄えていることが示唆された。以上の結果をまとめ、2018 年度の国際会議にてポスター発表を予定している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Erwan Capitaine, Nawel O. Moussa, Christophe Louot, Sylvia M. Bardet, Hideaki Kano, Ludovic Duponchel, Philippe Leveque, Vincent Couderc, and Philippe Leproux, Fast epi-detected broadband multiplex CARS and SHG imaging of mouse skull cells, Biomedical Optics Express, 査読有,

9(1), 2018, 245-253

DOI:10.1364/BOE.9.00024

加納 英明, スーパーコンティニューム光を用いた非線形光学イメージング, 応用物理 86(3), 186 (2017)

[学会発表](計 6 件)

Hideaki Kano, Label-free Live Cell Imaging using a White-light Laser Source, ISPlasma2018/IC-PLANTS2018, 2018 (招待講演)

加納 英明, 生細胞・生体組織を染めずに見る ~スーパーコンティニューム光を用いたラベルフリー・マルチモードル・イメージング~, 第4回超高速光エレクトロニクス(UFO)研究会, 2018 (招待講演)

加納 英明, 脂肪を燃焼する褐色脂肪細胞のラマン分光イメージング, 第9回 TIA シンポジウム, 2017

加納 英明, 脂肪を燃やす褐色脂肪細胞のラマン分光イメージング, 第1回 TIA かけはし 成果報告会, 2017

Hideaki Kano, CARS spectroscopic imaging of living cell and tissues using a supercontinuum light source, 9th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS-9), 2017, Canada

Hideaki Kano, Coherent nonlinear optical nonlinear optical spectroscopic imaging using a white-light laser source, Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, 2016, Hyougo (招待講演)

Hideaki Kano, Label-free, Multi-color Imaging of Live Cells and Tissues Using a White-Light Laser Source, 10th International Symposium on Nanomedicine, 2016 (招待講演)

Yuki Shimodaira, Masahiro Ando, Hiro-o Hamaguchi, Aya Fukuda, Koji Hisatake, and Hideaki Kano, CARS spectroscopic imaging and multivariate curve resolution analysis of brown adipocytes, Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, 2016 (ポスター受賞)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 5 件)

名称: 試料分析装置

発明者：池滝慶記・加納英明  
権利者：オリンパス株式会社・筑波大学  
種類：特願  
番号：2017-249741  
出願年月日：2017年12月26日  
国内外の別：国内  
名称：超解像顕微鏡  
発明者：池滝慶記・加納英明  
権利者：オリンパス株式会社・筑波大学  
種類：特願  
番号：2017-249738  
出願年月日：2017年12月26日  
国内外の別：国内  
名称：Super-resolution microscope  
発明者：加納英明・池滝慶記  
権利者：筑波大学・オリンパス株式会社  
種類：  
番号：US15/834230  
出願年月日：2017年12月7日  
国内外の別：国外（アメリカ）  
名称：超解像顕微鏡  
発明者：池滝慶記・加納英明  
権利者：オリンパス株式会社・筑波大学  
種類：特願  
番号：2017-009290  
出願年月日：2017年1月23日  
国内外の別：国内  
名称：超解像顕微鏡  
発明者：池滝慶記・加納英明  
権利者：オリンパス株式会社・筑波大学  
種類：特願  
番号：2016-251895  
出願年月日：2016年12月26日  
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：

〔その他〕

ホームページ等

<http://bukko.bk.tsukuba.ac.jp/~CARS/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加納 英明 (KANO, Hideaki)  
筑波大学・数理物質系・准教授  
研究者番号：70334240

### (2) 研究分担者

福田 綾 (Fukuda Aya )  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号：50436276