

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659027

研究課題名（和文） 褐色脂肪細胞は増えるのか？

研究課題名（英文） Can brown adipocytes proliferate ?

研究代表者

梶本 和昭 (KAJIMOTO KAZUAKI)

北海道大学・大学院薬学研究院・特任准教授

研究者番号：10416216

研究成果の概要（和文）：

本研究では、マイクロスライサーを用いて生きた状態のBAT組織スライスを作製し、生細胞観察用の各種蛍光色素を用いて染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡にて生きた状態の褐色脂肪細胞を観察することに成功した。また、BATの組織培養法を確立し、培養組織のリアルタイム観察により、組織を固定することなく組織中の成熟褐色脂肪細胞を生きたまま可視化する手法を確立した。この手法により、BATだけでなく白色脂肪組織(WAT)のリアルタイム観察も可能になった。この生組織観察法を用いて、成熟褐色脂肪細胞が分裂・増殖する様子を捉えるための検討を種々試みた。少なくとも検討に用いた条件下では、成熟褐色脂肪細胞の分裂はおろか運動する様子も観察されなかった。そこで、単離した褐色脂肪細胞における遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより網羅的に解析したところ、成熟褐色脂肪細胞では、前駆細胞と比べて細胞周期や分裂・増殖の制御に関連する多数の遺伝子において発現レベルが顕著に低下していることが判明した。これらの結果から、BATの機能亢進時に生じる組織肥大は、成熟褐色脂肪細胞の増殖による細胞数の増加よりも、前駆細胞の増殖・分化による寄与が大きいことを強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have established the methodology for live brown adipose tissue (BAT) imaging of a tissue slice prepared by a microslicer using a confocal laser scanning microscopy. In addition, we have succeeded the slice culture of brown adipose tissue using a membrane filter for organ culture. This methodology was also applicable for the live tissue imaging of white adipose tissue (WAT). By this observation method, we attempted to find the proliferation of mature brown adipocytes in BAT, however, we failed to find it under the various culture conditions. Thus, we next analyzed the gene expression profiles in primary cultured brown preadipocytes and mature brown adipocytes using a microarray. As a result, numerous genes involved in the regulation of cell cycle and proliferation were down-regulated in mature brown adipocytes, compared to preadipocytes. These findings strongly suggest that hypertrophy of BAT induced by cold exposure is mainly resulted from the proliferation of preadipocytes and differentiation of them into mature brown adipocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞・組織、遺伝子、マイクロアレイ、褐色脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪組織 (BAT) は、哺乳動物の体内でエネルギーの燃焼を専門に営む唯一の組織であり、脂肪を積極的に燃焼し、筋肉運動を必要としない熱産生を行うことが古くから知られている。ラットやマウスを寒冷環境下で1週間程度飼育 (寒冷馴化) すると BAT が著しく肥大化し熱産生機能が亢進する。この時、摂食量は増加するにも関わらず、体重はむしろ減少することから、食餌から摂取したエネルギーさえも速やかに燃焼し熱産生を行っていると考えられる。BAT が肥大化する要因としては、「褐色脂肪細胞が肥大する」か「細胞数が増加する」かの二通りが考えられ、後者の場合、BAT 中に存在する「前駆細胞が増殖・分化して新たな褐色脂肪細胞を形成する」か「成熟脂肪細胞が分裂・増殖する」かの二通りが考えられるが、申請者らの予備的な検討において、寒冷馴化した BAT の顕微鏡像では前駆細胞が大量に増殖している様子は観察されなかった。一方、エネルギーを貯蔵する白色脂肪細胞に関して、肥満における白色脂肪組織の肥大化には、成熟細胞の分裂・増殖が深く関わっていることが報告されている。これらのことから、寒冷馴化で BAT が肥大する際には、「成熟褐色脂肪細胞が分裂・増殖しているのではないか？」と考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では、「褐色脂肪組織の機能亢進時に生じる組織肥大が、成熟褐色脂肪細胞の増殖による細胞数の増加によってもたらされる」という作業仮説に基づき、生体内における褐色脂肪組織の立体構造を保持した状態で培養できる新たな組織培養法を確立して、培養細胞レベルでは評価できない成熟褐色脂肪細胞の増殖能をリアルタイムに可視化することで証明するとともに、組織肥大に伴う成熟褐色脂肪細胞の増殖を誘発する分子メカニズムを遺伝子レベルで解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) マイクロスライサーを用いた BAT 組織スライスの作製と生組織観察

Wister ラット (5 週齢、雄) の肩甲骨間 BAT を摘出し、マイクロスライサー (堂阪イーエム、DTK-1000) を用いて未固定の組織スライス (250 μ m 厚) を作製したのち、膜電位感受性ミトコンドリア染色色素である TMRM

(tetramethyl rhodamine methyl ester)、脂肪滴染色色素 BODIPY493/503、核染色色素 Hoechst33342、微小管染色色素 Tubulin Tracker Green、アクチン染色色素 Rhodamine-Phalloidin を用いて蛍光染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (ニコン、A1) にて生組織蛍光観察を行った。

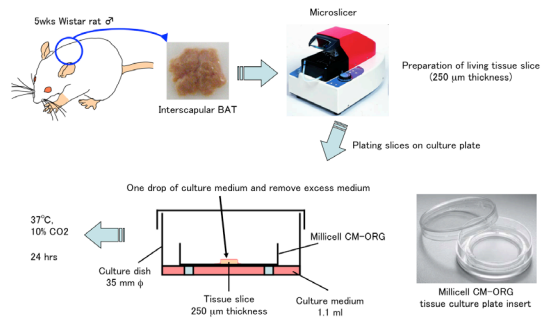
また、本法にて作製した BAT 組織スライス中の褐色脂肪細胞が生きた状態で保持されていることを確認するため、グルコースの蛍光誘導体 2-NBDG を用いたグルコース取り込みの蛍光観察も同様に行った。

(2) 寒冷暴露したラットの BAT 生組織観察

Wister ラット (5 週齢、雄) を 4°C で 48 時間寒冷暴露したのち、BAT を摘出して上記と同様に生組織蛍光観察を行い、室温飼育の場合とどのような形態変化が認められるかを比較した。

(3) メンブレンフィルターを用いた気-液界面における BAT 組織スライス培養

Wister ラット (5 週齢、雄) の BAT 組織スライスを上記と同様の方法で作製した後、組織培養用カルチャーインサート (Millipore、Millicell CM-ORG) 上に静置し、培地 1.1ml を入れたディッシュ (35mm 径) 中に静かに置き、37°C で 24 時間インキュベーションした (下図)。インキュベーション後、組織スライスを取り出し、上記と同様に各種蛍光色素を用いて染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。



(4) 褐色脂肪細胞の初代培養とマイクロアレイ解析

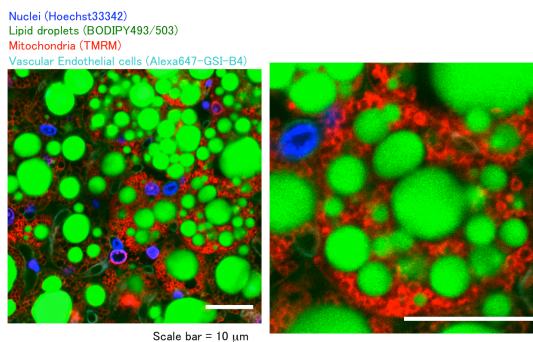
Wister ラット (5 週齢、雄) の BAT から間質-血管細胞画分を分離し、常法に従って初代培養を行い、未分化細胞および成熟褐色脂肪細胞から total RNA を抽出した。遺伝子発現解析のための蛍光標識 cRNA サンプルの調製には Low Input Quick Amp Labeling キット (アジレント社) を用い、Whole Rat Genome 4x44K マイクロアレイにて網羅的な遺伝子発

現プロファイルの比較解析を行った。

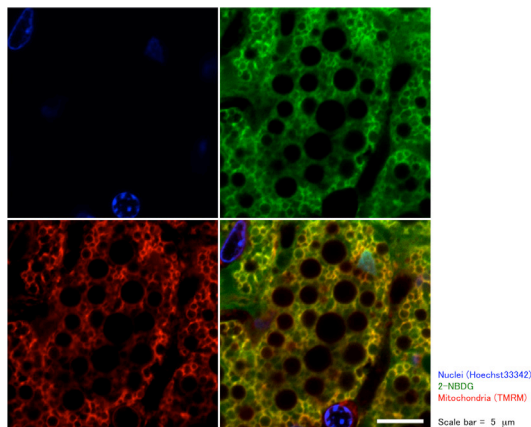
4. 研究成果

(1) 生組織スライスの作製と蛍光観察

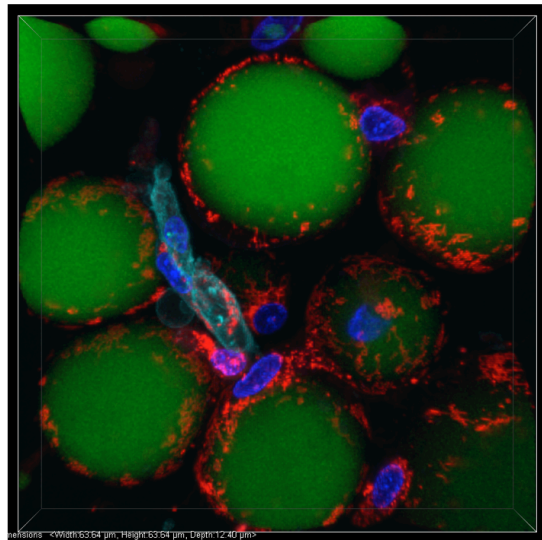
一般に、組織の蛍光観察を行う際には、凍結切片やパラフィン切片を用いるのが通例であるが、これらの方法では生きた状態の組織構造や細胞の状態を観察することは不可能である。そこで、マイクロサイザーを用いて生体から摘出した直後の BAT を未固定の状態ですライスし、生細胞観察に良く用いられる蛍光色素にて染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。その結果、多房性脂肪滴を有する褐色脂肪細胞が極めて明瞭に観察でき、さらにその細胞内には直径約 $1\ \mu\text{m}$ 程度のミトコンドリアが多数観察された(下図)。



これは、過去に電子顕微鏡を用いて観察された BAT 組織像とも良く一致しており、光学顕微鏡レベルでも組織内の細部まで極めて鮮明に観察できることが明らかとなった。また、ミトコンドリアの染色に用いた TMRM は膜電位依存性の染色色素であり、これによってミトコンドリア像が観察できたことから、生きた状態で組織スライスを作製し、観察することも出来ることも明らかとなった。グルコースの蛍光誘導体である 2-NBDG の取り込みが組織スライスで観察できたことから、BAT の生組織スライスの作製と観察に成功したと考えられる。



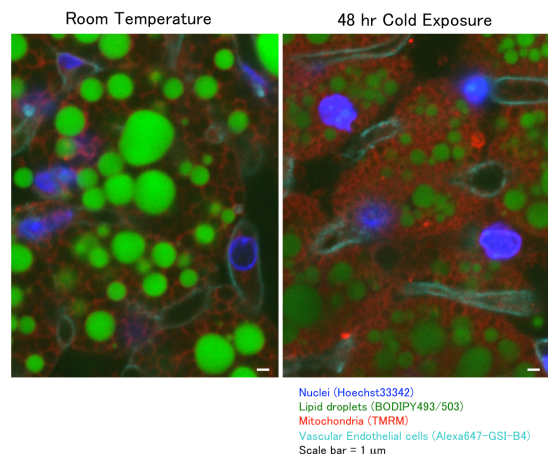
また、当初の計画にはなかったが、同じ方法を用いて白色脂肪組織(WAT)の生組織観察を試みた結果、単房性脂肪滴を有する白色脂肪細胞が明瞭に観察でき、脂肪滴の周囲を取り囲むようにミトコンドリアが分布している様子が観察された。



Nuclei (Hoechst33342)
Lipid droplets (BODIPY493/503)
Mitochondria (TMRM)
Vascular Endothelial cells (Alexa647-GSI-B4)

(2) 寒冷暴露による BAT の形態変化

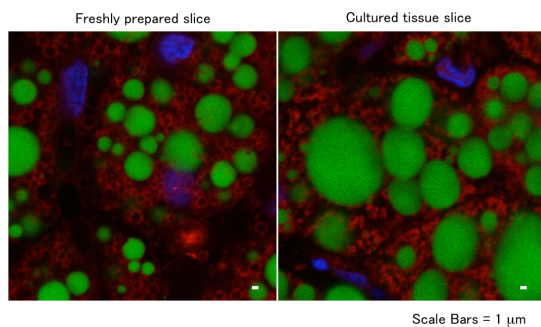
BAT の熱産生機能が活性化することが知られている寒冷条件下でラットを飼育した際に、BAT の組織内でどのような形態学的変化が認められるのかについて上記の生組織観察法を用いて検討を行った。その結果、寒冷暴露したラットの BAT 内の褐色脂肪細胞では、脂肪滴の大きさが顕著に縮小し、蓄積した脂肪が燃焼されていることが強く示唆された。また、寒冷暴露した BAT では、室温と比較してミトコンドリアの大きさが小さくなる一方で、数が顕著に増加している様子が認められた。この結果は、寒冷暴露によって BAT の熱産生機能が活性化していることも良く一致しており、



BAT の機能変化を反映した形態変化を観察することに成功したと考えられる。

(3) メンブレンフィルターを用いた気-液界面におけるBAT組織スライス培養

本研究では、成熟した褐色脂肪細胞が増殖能を有するとの作業仮説に基づき、その分裂・増殖の様子を可視化することを目的としている。そのため、BATを生きた状態を維持して培養する手法が不可欠となる。そこで、脳海馬の組織培養に用いられるメンブレンフィルター上でのスライス培養法がBATにも適用可能かどうかについて検討を行った。その結果、BATの組織スライスをメンブレンフィルター上で24時間インキュベーションした後でも、褐色脂肪細胞のミトコンドリアは膜電位を保持しており、生きた状態で培養可能であることが明らかとなった。しかしながら、このようにして培養した組織スライスを多数観察しても、褐色脂肪細胞が分裂している様子は全く観察されなかった。



(4) 褐色脂肪細胞の初代培養とマイクロアレイ解析

分化後に共通して発現が上昇した遺伝子群のGene Ontology (Top10)

Ontology	GO ACCESSION	GO Term	corrected p-value	Count In Selection	% Count In Selection	Count In Total	% Count In Total
Cellular component	GO:0005739	mitochondrion	0.000	148	40.33	1105	7.96
Biological process	GO:0006082	organic acid metabolic process	0.000	43	11.72	469	3.38
Biological process	GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	0.000	42	11.44	466	3.36
Cellular component	GO:0044444	cytoplasmic part	0.000	236	64.31	4107	29.80
Biological process	GO:0006629	lipid metabolic process	0.000	60	16.35	615	4.43
Biological process	GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	0.000	35	9.54	279	2.01
Cellular component	GO:0044429	mitochondrial part	0.000	66	17.98	482	3.47
Molecular function	GO:0016491	oxidoreductase activity	0.000	60	16.35	596	4.30
Molecular function	GO:0003824	catalytic activity	0.000	150	40.87	3825	27.57
Molecular function	GO:0048037	cofactor binding	0.000	42	11.44	232	1.67

分化後に共通して発現が低下した遺伝子群のGene Ontology (Top10)

Ontology	GO ACCESSION	GO Term	corrected p-value	Count In Selection	% Count In Selection	Count In Total	% Count In Total
Cellular component	GO:0044427	chromosomal part	0.000	44	11.31	268	1.93
Biological process	GO:0022402	cell cycle process	0.000	38	9.77	490	3.53
Cellular component	GO:0005854	nucleoplasm	0.000	58	14.91	341	2.46
Biological process	GO:0051301	cell division	0.000	34	8.74	137	0.99
Biological process	GO:0022403	cell cycle phase	0.000	20	5.14	140	1.01
Biological process	GO:0006259	DNA metabolic process	0.000	50	12.85	464	3.34
Biological process	GO:0006280	DNA replication	0.000	27	6.94	95	0.68
Biological process	GO:0007049	cell cycle	0.000	35	9.00	177	1.28
Cellular component	GO:0044428	nuclear part	0.000	67	17.22	1329	9.58
Cellular component	GO:0044422	organelle part	0.000	117	30.08	3232	23.29

上述の通り、BATの組織スライスを用いた組織培養には成功したものの、褐色脂肪細胞が増殖する様子をとらえることはできなかった。そこで、褐色脂肪細胞が分裂能を有するか否かを細胞レベルで明らかにするために、褐色脂

肪細胞の初代培養を行い、未分化の前駆細胞との間で遺伝子発現プロファイルの差異を網羅的に解析した。その結果、成熟した褐色脂肪細胞では、前駆細胞と比較して細胞周期や分裂・増殖の制御に関連する多数の遺伝子群の発現が顕著に低下していることが明らかとなった。これらの結果から、褐色脂肪組織の機能亢進時に生じる組織肥大は、成熟褐色脂肪細胞の増殖による細胞数の増加よりも、前駆細胞の増殖・分化による寄与が大きいことを強く示唆された

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Hossen N, Kajimoto K, Akita H, Hyodo M, Harashima H. “Vascular-targeted nanotherapy for obesity: Unexpected passive targeting mechanism to obese fat for the enhancement of active drug delivery.” *J Control Release*. (2012) 163: 101-110. (査読有)

[学会発表] (計1件)

梶本和昭. “褐色脂肪とミトコンドリア” 若手研究者 公開特別シンポジウム ミトコンドリアとDDS2, 2012年1月20日(札幌, 北海道大学薬学部)

[その他]

ホームページ

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/mirai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶本 和昭 (KAJIMOTO KAZUAKI)
北海道大学・大学院薬学研究院・特任准教授
研究者番号: 10416216

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし