

種々の間葉系細胞における脂肪細胞の分化誘導について —ニワトリ血清因子の効果—

高橋 徳明

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座

(主任: 名和澄黄雄 教授)

(受付: 2002年10月21日)

(受理: 2002年11月15日)

Abstract: We have previously reported that chick serum (CKS) strongly induced adipogenesis in Meckel's chondrocyte *in vitro*, but little is known about the effects on other mesenchymal cells. In the present study, CKS-induced adipogenesis on the osteogenic MC 3 T 3-E 1 cells, mouse subcutaneous fibroblasts (MSF), and undifferentiated mouse dental pulp cells (MDP) were examined using light and electron microscopy, immunofluorescence staining, and BrdU-incorporation for DNA-synthesizing cells. Furthermore, MSF was cultured on a collagen-gel matrix that allowed maintenance of three-dimensional integrity. CKS facilitated lipogenesis and induced the formation of lipid droplets in all kinds of cells. Immunostaining showed the expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in immature adipocytes, and leptin and glucose transporter-4 in mature adipocytes. Adipocytes on collagen-gel matrix induced unilocular lipid droplets at a high frequency. These morphological observations strongly indicate that these lipid-rich cells retain sufficient features as intact adipocytes, although the adipocytes that were formed in the present study were multilocular adipocytes. Furthermore, it was suggested that CKS agents involved in adipocyte differentiation are a common inductive factor affecting various mesenchymal cells.

Key words: chick serum, adipocyte, differentiation, mesenchymal cell, cell culture

緒 言

白色脂肪細胞によって構成される脂肪組織は人体最大の組織で、脂肪合成や分解、脂溶性物質の貯蔵など活発なエネルギー代謝組織として機能している。白色脂肪細胞は、中性脂肪であるトリアシルグリセロールを成分とする単胞性の脂肪滴と、それを包含する扁平な細胞質によって構成される大型な球形細胞である¹⁻⁴⁾。

近年、脂肪細胞は脂質代謝機能の他に

leptin, TNF- α などの生理活性物質の内分泌器官として注目を集めている⁵⁻⁸⁾。Leptinは末梢脂肪組織から分泌され、視床下部のleptin受容体に作用して摂食を抑制する他に、細胞代謝活性を亢進させる働きを持つことが見いだされている⁹⁾。また、最近TNF- α が脂肪組織においても分泌されることが報告され、糖代謝に関わる生理活性作用を持つことが確認されている⁶⁻⁸⁾。これらの他にも、I型プラスミノゲン活性抑制因子 (Type I Plasminogen

Effects of chick serum agents on the induction of adipocyte differentiation in various mesenchymal cells

Noriaki TAKAHASHI

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Iwate Medical University, 1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020-8505)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 27: 166-177, 2002

Activator Inhibitor : PAI-I), ヘパリン結合性上皮成長因子 (Heparin Binding-Epidermal Growth Factor : HB-EGF), インスリン様成長因子 (Insulin-like Growth Factor : IGF) 等の成長因子⁹⁾や carboxy peptidase などの発現も見いだされており¹⁰⁾, 種々のアディポサイトカインを分泌する内分泌組織として重要視されている。

このような白色脂肪細胞は未分化間葉細胞から発生するといわれている¹¹⁾。脂肪組織の血管周囲には活発な増殖を有する線維芽細胞様細胞の存在が知られており, それらの細胞から前脂肪細胞が生じ, この前脂肪細胞における増殖阻害が細胞質中の脂質小滴の形成を刺激し, その後の脂肪細胞としての形態的变化を誘導するといわれている¹²⁾。しかしながら, 脂肪細胞の分化に際して未分化間葉細胞にどのような分化因子が作用するのか, 誘因となる物質の同定には未だ至っていないのが現状である。細胞培養による脂肪細胞の分化誘導には, 多能性幹細胞と前脂肪細胞との二系統の株細胞が用いられている。前者の多能性幹細胞には C3H マウスの胎仔からクローニングされた 10T1/2 細胞や CHEF/18細胞, Balb/c 3T3 細胞, RCJ3.1細胞¹³⁾に加え1246株細胞などがある。これらの細胞は, グルココルチコイドの濃度に依存して脂肪細胞, 筋細胞, 軟骨細胞系のいずれかに分化することができる¹⁴⁾。一方, 後者の細胞株では, マウス胎仔由来の 3T3-L1 細胞や 3T3-F442A 細胞^{15, 16)}は脂肪細胞としての多くの特徴を有し, 脂肪細胞の分化の解析に広く用いられている。これらの細胞はトリアシルグリセロールを蓄積する能力を持ち, デキサメタゾン, インスリン, メチルイソブチルキサンチンなどの分化誘導因子の添加が必須とされている¹⁷⁾。C57BL/6J ob/ob マウス由来の Ob17, Ob17由来の細胞系や10T1/2 細胞由来の TA1, 30A5 細胞系も各種の作用因子添加により脂肪細胞へ分化する前脂肪細胞系の細胞であり, 3T3 細胞系と同様に脂肪細胞の研究に用いられている^{14~17)}。こうした細胞培養系では, 分化誘導因

子の添加や, それぞれ細胞独自の培養環境維持が必要不可欠とされ, 一貫した結果を得ることが困難とされている。

最近, 我々は培養マウス胎仔メッセル軟骨細胞にニワトリ血清 (Chick serum : 以下 CKS と略す) を添加すると軟骨細胞が多量の脂肪滴を含んだ脂肪細胞様に形質転換することを報告した¹⁸⁾。この培養系は血清因子だけで, 高頻度の脂肪細胞が形成されるという利点を持つが, 他の間葉系細胞での効果については不明のままである。そこで, 今回線維芽細胞と歯髄細胞に加え, MC3T3-E1 細胞の3種類の細胞を用いて脂肪細胞の分化誘導を試みた。

従来, 皮下組織の線維芽細胞は, 脂肪細胞の前駆細胞として潜在的な能力を有すると考えられている。歯髄細胞は外胚葉性間葉由来の細胞であり, 未分化間葉細胞を主体とする一群の細胞の集塊からなっている^{19, 20)}。生体の歯髄組織には脂肪細胞は存在しないので, 脂肪細胞分化解析には最適な材料となり得る。さらに, マウス頭蓋由来の MC3T3-E1 細胞は骨芽細胞への分化が決定された 3T3 細胞系である^{21, 22)}。仮に, 骨芽細胞に分化の決定している MC3T3-E1 細胞が脂肪細胞に転化されるならば, MC3T3-E1 細胞に形質転換が生じたと考えられる。本研究は, このように表現型の異なる間葉系細胞を用いて, CKS の脂肪細胞の分化誘導能を形態的に解析を試みた。

材料および方法

1. 実験材料および培養方法

実験には生後のマウス線維芽細胞, 歯髄細胞と MC3T3-E1 細胞の3種類の培養細胞を用いた。MC3T3-E1 細胞はすでに骨分化型細胞として樹立され, 継代維持されたものである。

線維芽細胞と歯髄細胞では, 採取した皮下組織と歯髄組織片をメスで細切した後, phosphate buffered saline (以下 PBS と略す) で10回程洗浄した。得られた組織片を60mm培養皿 (Becton Dickinson LABWARE Franklin

Lakes, NJ., U.S.A) に植付けし, 10% Calf bovine serum (以下 CBS と略す) (Sigma Chemical Co, St. Rouis, MO., U.S.A), 60 μ g / ml 硫酸カナマイシン (Gibco B.R.L., Grand island NY., U.S.A), 0.3mM β グリセロリン酸 (Nacalai Tesque, INC. Kyoto, Japan), L-アスコルビン酸 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を添加した Dalbecco's MEM (D-MEM) (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Kyoto, Japan) で培養した。組織片から遊走した細胞がコンフルエントになった時点で, 継代用として回収した。

継代培養用の細胞は35mm培養皿の中央に静置した直径7mmのペニシリンダーカップ (0.28cm², Top Labo-ware, Osaka, Japan) 内に1.0 \times 10⁴個/0.2mlの濃度で播種し, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ の条件下で継代維持した。10% CBS 添加 D-MEM で培養した細胞をコントロール群とした。一方, 実験群は10%Chick serum (以下 CKS と略す) (Sigma Chemical Co, St.Rouis, MO., U.S.A) 添加 D-MEM を用いて同様の条件下で培養した。

2. BrdU による細胞分裂活性と細胞増殖率の観察

培養3日目の歯髄細胞の増殖能を bromodeoxyuridine (以下 BrdU と略す) の取り込みと細胞数の計測で評価した。CKS 添加による増殖への影響を検索するため, 歯髄細胞を CBS と CKS の存在下で3日間培養し, コンフルエント直前の細胞を0.5mg/ml濃度の BrdU 含有 D-MEM で30分処理した。標本は4%パラホルムアルデヒドで1~2時間固定後, BrdU 染色キット (Oncogene Research Products, Cambridge, MA., U.S.A) の染色法に準じて免疫染色を施した。BrdU は diaminobenzidine (以下 DAB と略す) 反応によって可視化した。BrdU 標識細胞は無作為に選ばれた5カ所 (1mm²) の平均として算定し, t 検定により有意差を検討した。

また, CBS と CKS で1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14日間培養した歯髄細胞は, 各時点で

3枚ずつ培養皿を回収し, 0.05%トリプシン-PBS 溶液にて細胞浮遊液を作成した。両者の細胞数はコールターカウンター Z 1 型 (Beckman Coulter K.K., U.K) で細胞数を計測し, t 検定法に従って統計学的に検索した。

3. 位相差顕微鏡と脂肪染色による観察

3種類の細胞のコントロール群と実験群をそれぞれ, 培養開始から14日目まで位相差顕微鏡で観察した。

また, 培養2, 7, 14日目のコントロール群と実験群細胞では, 4%パラホルムアルデヒド (室温) で1時間固定後, ズダンⅢによる脂肪染色を施し, 脂肪滴形成能について検討した。

ズダンⅢ染色液には, 70% アルコール100ml にズダンⅢ (日本理化学薬品株式会社, 東京) 2g を添加し, 振盪溶解したズダン溶液を用いた。組織標本は PBS で洗浄後, 37 $^{\circ}$ C で加温のズダンⅢ溶液で30分間染色した。その後, 50% 希釈アルコールで分別し, Delafield のヘマトキシリンでカウンター染色後, グリセリン溶液で封入した。

4. 免疫染色による観察

本研究では間接酵素抗体法と蛍光抗体法を用いて免疫染色を行った。培養 MC 3 T 3 -E 1 細胞と線維芽細胞の標本は4%パラホルムアルデヒド (4 $^{\circ}$ C) で1時間固定を行い, PBS で洗浄後, 3% H₂O₂ 液にて15分間処理した。0.1% Tryton-PBS にて15分間処理し, 再度 PBS で洗浄した後, 抗原賦活剤 (STUF MARK II (UNIVERSAL), Serotec Ltd., Hokkaido, Japan) を用いて92 $^{\circ}$ C, 15分間処理した。

GLUT-4 による免疫染色では, 各々の細胞を24時間, インスリンの存在下で培養し, その後, 同様に固定した。一次抗体として, 白色脂肪細胞に特異的な分化マーカーとされる peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ ; 1 : 100 希釈; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA., U.S.A), leptin (Affinity Bioreagents, Inc., Golden, CO., U.S.A), glucose transporter-4 (GLUT-4; 1 : 50 希釈; Santa Cruz) に37 $^{\circ}$ C で1時間

30分反応した²³⁻²⁵⁾。これらの試料はPBSで洗浄後、二次抗体として、200-500倍に希釈したHRP標識抗ヤギIgG (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH)と抗ウサギIgG (Cappel Organon Teknika Corp., West Chester, PA),あるいはFITC標識抗ヤギIgG (EY Laboratories, Inc., San Mateo, CA., U.S.A)と抗ウサギIgG (Cappel Organon Teknika Corp., West Chester, PA)を用いて、37℃で1時間30分間反応させた。

酵素抗体法では、DAB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., U.S.A)による発色反応を行い、光学顕微鏡にて観察した。蛍光抗体法では、FITCの標識反応をレーザー顕微鏡 (LSM-GB200; Olympus, Tokyo, Japan)を用いて観察した。コントロール標本として、一次抗体を欠いた二次抗体のみでの染色を行い、陽性反応がないことを確認した。

5. 透過型電子顕微鏡による観察

CKS誘導線維芽細胞とMC3T3-E1細胞をそれぞれ電子顕微鏡的に観察した。試料は冷2.5%のカコジール酸緩衝グルタルアルデヒド (pH7.2)で約2時間固定後、1%オスミウム酸により後固定を施した。その後、上昇アルコール系列で脱水後、QY-1とEPON812の混合液 (1:5)を通して通法に従ってEPON812に包埋した。組織標本はダイヤモンドナイフで培養皿に水平に超薄切片を作成し、酢酸ウランとクエン酸鉛で染色後、透過型電子顕微鏡 (H-7100; Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)にて観察した。

6. コラーゲンゲルによる三次元培養

単胞性脂肪細胞の形成には、三次元的な培養環境の維持が必要であると考えられる³⁶⁻³⁸⁾。本研究ではCKSによる脂肪細胞への分化過程をコラーゲンゲル (Cell matrix, Nitta Zerin Co., Ltd., Osaka, Japan)法によって解析した。

ディッシュ中央部に置かれたペニシリンドーカップに約2mmの厚さのコラーゲンゲルを充填し、その上に 1×10^4 個の線維芽細胞を播種した。6時間後に遊走細胞が確認できた時点で培

養液をCBS添加培養液からCKS添加培養液に置換した。培養液は3日毎に交換し、2週間培養した。培養細胞は、4℃の4%パラホルムアルデヒドで1時間固定後、ズダン染色とヘマトキシリン染色を施した。また、一部の培養線維芽細胞の試料は電子顕微鏡用として用いた。

結 果

1. 位相差顕微鏡および脂肪染色

(1) 線維芽細胞

CBSで一週間培養した線維芽細胞のズダン染色では、紡錘状を呈する細胞体に脂肪滴の形成はほとんど確認されなかった (図1A)。

一方、CKS添加培養では12時間後にはすでに細胞質中に小さな顆粒状の物質が出現した。以後培養時間の経過につれて顆粒状物質の数と大きさの増加が認められ、細胞の形態も紡錘状から円形細胞に移行した (図示せず)。培養一週間後では、細かな顆粒状の物質はほぼ細胞質全体にわたって充満していた (図1B)。

CKS添加培養1週間後の線維芽細胞のズダン染色では細胞質内の貯留物はズダン陽性の脂肪滴で、脂肪細胞への転換を示していた (図1C)。さらに培養期間を2~3週間延長しても単胞性脂肪細胞の形成は認められず、細胞は変性に陥りディッシュから剥離した (図示せず)。線維芽細胞では他の細胞に比べ、より大型の脂肪滴が形成され、長期間にわたって脂肪細胞の維持が可能であった。

(2) 歯髄細胞

CBS添加培養1週間後のマウス歯髄細胞は、細長い突起を有する線維芽細胞様の形態を呈した。これらの細胞は線維芽細胞と比較して、小型で、多角形の細胞が多く、ズダン染色では脂肪滴の形成が認められなかった (図1D)。

CKS含有培養の位相差像では歯髄細胞は線維芽細胞とMC3T3-E1細胞と同様に、やや細胞質に富んだ円形細胞に変化し、細胞質中に充満した脂肪滴が観察された (図1E)。

培養1週間後の歯髄細胞は、小型で丸いズダン陽性の脂肪滴で満たされていた。形成された

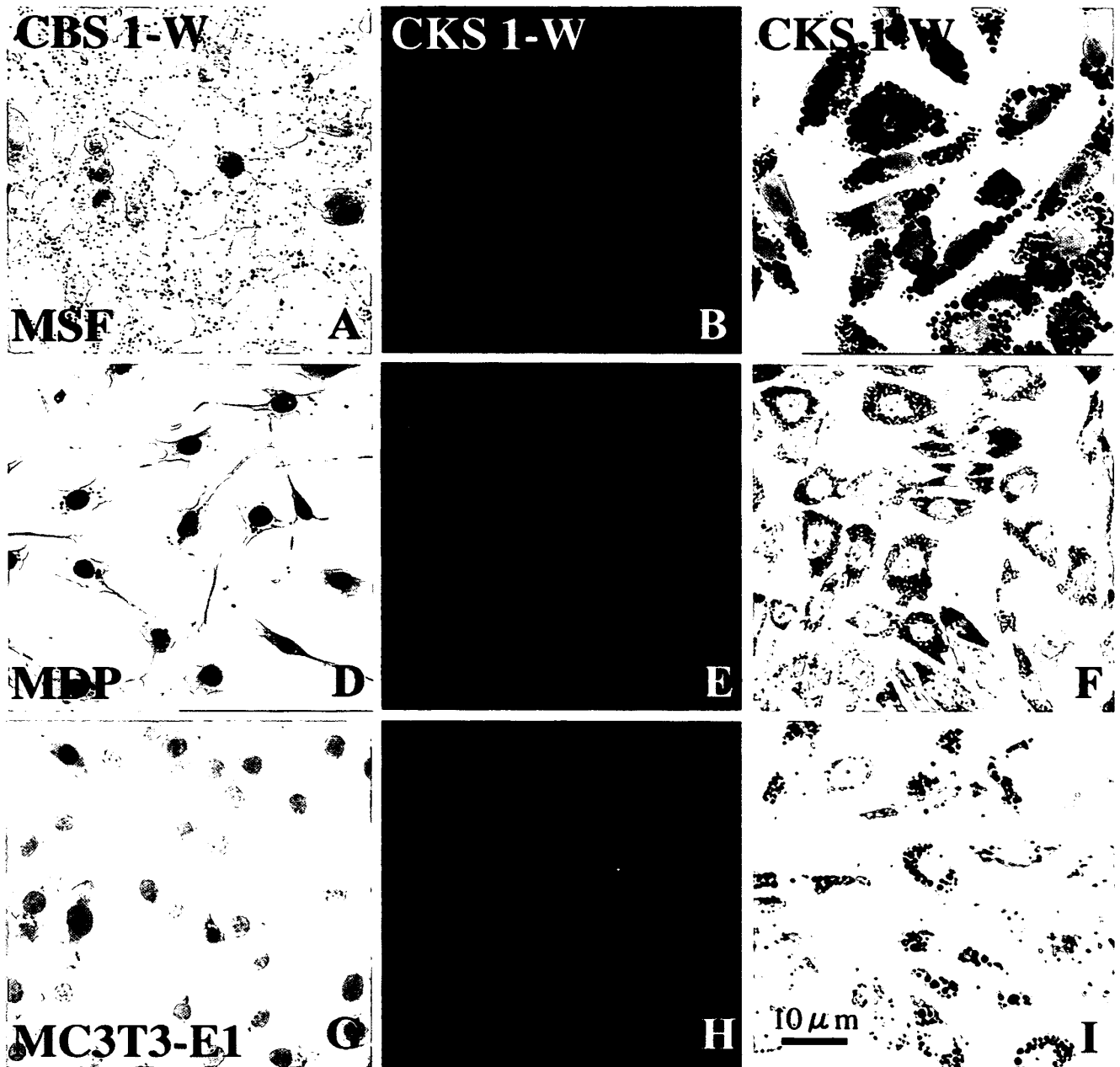


Fig. 1. Photomicrographs showing mouse subcutaneous fibroblasts (MSF), mouse dental pulp cells (MDP) and MC 3 T 3 -E 1 cells in control medium (A, D, G), and in CKS-added medium (B, C, E, F, H, I), as demonstrated by phase-contrast microscopy (B, E, H) and sudan III staining (A, D, G, C, F, I). After 1 week in the control medium, there was no formation of granular substances in the cytoplasm of any cell (A, D, G). After 1 week in the CKS-added medium, abundant granular substances were formed in the cytoplasm (B, E, H). When MSF, MDP and MC 3 T 3 -E 1 cells were grown for 1 week in CKS-added medium, granular lipid droplets showed sudan III-positive reaction (C, F, I). Bar : 10 μ m (all photos are on the same scale)

脂肪滴は他の 2 種類の細胞に比べ小型であったが、その数は最も多かった (図 1 F)。

(3) MC 3 T 3 -E 1

CBS で一週間培養した MC 3 T 3 -E 1 細胞のズダン染色では、大型な核を含む多角形の細胞として敷石状に配列し、脂肪滴はほとんど認め

られなかった (図 1 G)。

CKS に交換後、まもなく細胞質中に小型の顆粒状物質が散見されたが、培養 1 週間後には、これらは細胞質全体に分布していることが位相差顕微鏡によって観察された (図 1 H)。このような細胞質中の球状の小滴はズダン陽性の

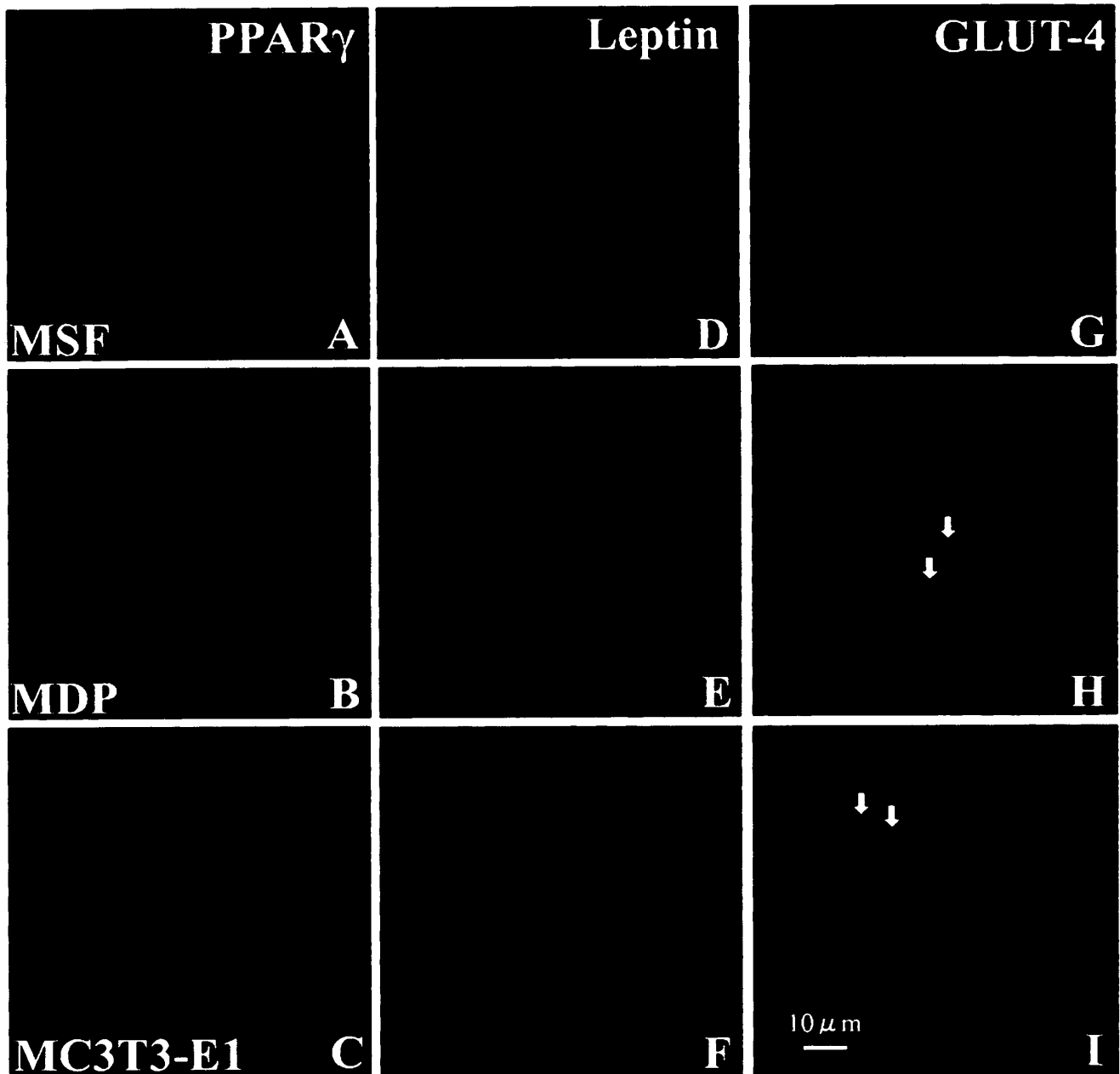


Fig. 2. Immunofluorescence staining for marker proteins of adipocyte differentiation in MSF (A, D, G), MDP (B, E, H) cells and MC 3 T 3 -E 1 (C, F, I) cells. Immunoreactivities for PPAR γ are recognized in the nucleus of each cell prior to lipogenesis in cultures in CKS-added medium (A, B, C). Immunostaining for leptin was positive in the lipid droplets in each adipocyte (D, E, F). After stimulation for 12hrs with insulin, GLUT-4 in CKS-added medium was immunolocalized in the cytoplasm and several vesicles of mature adipocytes (G and arrows in H and I). Bar : 10 μ m (all photos are on the same scale)

脂肪滴と一致することが判明した (図 1 I)。

2. 免疫組織染色による観察

(1) PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor γ)

コントロール培養では、いずれの細胞も PPAR γ に対する免疫反応は認められなかった

(図示せず)。一方、12時間 CKS 存在下で培養した線維芽細胞の PPAR γ に対する免疫染色ではほとんど全ての細胞の核に陽性反応が認められた (図 2 A)。同様の条件で処理した歯髓細胞と MC 3 T 3 -E 1 細胞でも、PPAR γ に対する免疫活性が核に限局した緑色の陽性反応として

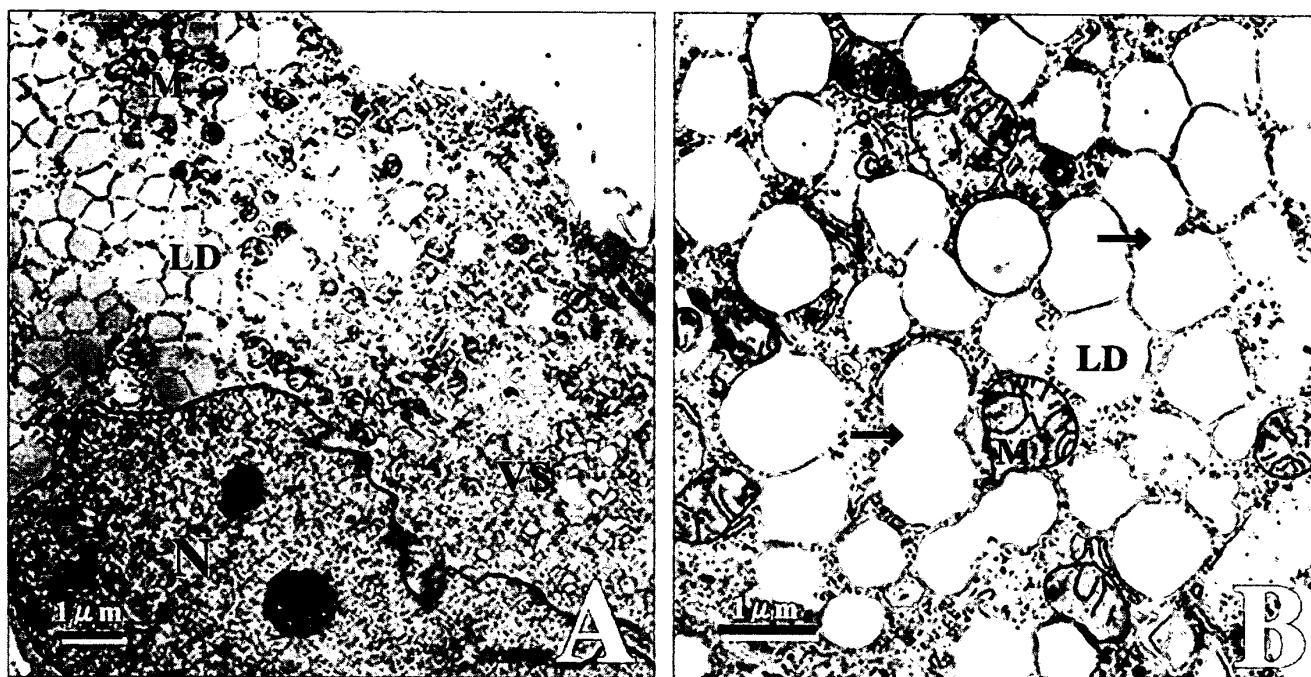


Fig. 3. Electron micrographs showed that the MC 3 T 3 -E 1 cell contained nucleus (N) with prominent nucleolus, and was filled with numerous lipid droplets (LD) and vesicular structure (VS). Cell organelles were poorly developed and a few mitochondria (M) could be seen among the lipid droplets (A). Bar : 1 μ m

Some lipid droplets (LD) were bounded by limiting membranes and these droplets were fused with each other (arrows in B). M : mitochondria, Bar : 1 μ m

認められた (図 2 B, C)。

(2) Leptin

Leptin の免疫染色では, CKS で 5 日間培養した線維芽細胞の脂肪滴に一致して蛍光反応が認められた (図 2 D)。培養 5 日後の歯髄細胞と MC 3 T 3 -E 1 細胞での leptin に対する蛍光免疫反応は細胞質中の顆粒状ないし球状構造物に反応が認められた (図 2 E, F)。しかしながら, これらの反応は線維芽細胞に比較して減弱傾向を示した。

(3) GLUT-4 (glucose transporter-4)

GLUT-4 に対する免疫活性は CBS と CKS で培養したいずれの細胞にも確認されなかったが, 200 μ g/ml のインスリンで CKS 培養細胞を 12 時間処理した場合にのみ, すべての細胞にその活性反応が認められた。GLUT-4 に対する線維芽細胞の蛍光免疫染色では, 脂肪滴を含むほとんどの細胞が陽性反応を示した。GLUT-4 の染色性は歯髄細胞と MC 3 T 3 -E 1 細胞に比べ, 線維芽細胞で最も強かった (図 2 G)。

一方, 歯髄細胞での反応は細胞質中の細かな点状の反応産物として認められた (図 2 H)。GLUT-4 の反応は MC 3 T 3 -E 1 細胞 (図 2 I) でも同様に陽性反応が認められたが, 歯髄細胞では三者の中で最も弱かった。

3. MC 3 T 3 -E 1 細胞における電子顕微鏡所見

CKS で誘導された MC 3 T 3 -E 1 細胞を透過型電子顕微鏡で観察すると, 核は明調で大型な核小体を含み, 細胞質には多数の脂肪滴が形成されていた。脂肪滴の間には, 少数のミトコンドリアや小胞が散見されたが, ゴルジ装置の発達は貧弱であった (図 3 A)。脂肪滴はほぼ同様の大きさで, 内部は電子密度の低い均一な物質で満たされていた。限界膜を有する脂肪滴同士が互いに融合し, より大型の脂肪滴に移行する像も見られた (図 3 B)。このような脂肪滴の大きさは細胞によって種々であったが, 形成過程は線維芽細胞や歯髄細胞でも同様であった。

4. 歯髄細胞における細胞増殖と DNA 合成能

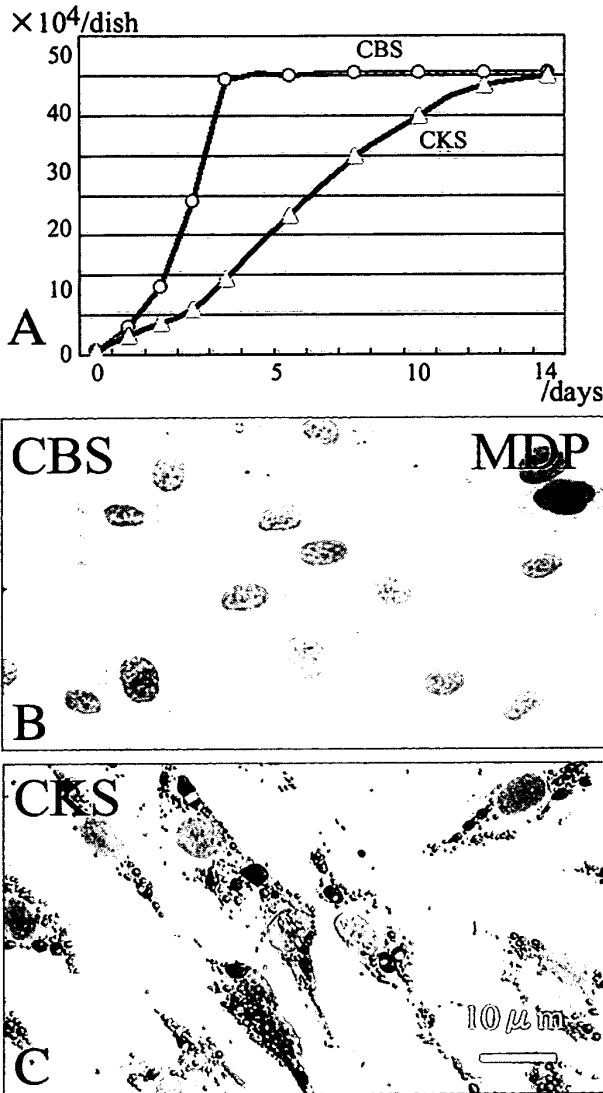


Fig. 4. Comparison with cell proliferation in MDP cells during 2 weeks. The cells of control cultures (CBS) proliferate greater than that of CKS-added cultures during the first 4 days, but subsequent proliferation in CKS-added cultures (CKS) continued slowly for 2 weeks (A). Analysis of DNA-synthesis in MDP cells after 3 days in culture. The number of BrdU-positive cells in CKS-added cultures (C) was slightly lower than that in control cultures (B). Bar: 10 μm

CBS と CKS 培養歯髄細胞間で細胞増殖率を比較すると、CBS 培養では培養 4 日後にコンフルエントに達し、以後 2 週間後まで、ほぼ同じ状態で推移した。これに対し CKS では急速な細胞増殖は認められず、培養 14 日目まで緩慢に増加した (図 4 A)。

培養 3 日後の歯髄細胞を用いて CBS と CKS

での BrdU の取り込みを解析した。コントロールの歯髄細胞では、ほとんど全ての細胞で BrdU の取り込みが認められた (図 4 B)。これに対し、CKS 培養歯髄細胞でも、ズダン陽性の脂肪滴を含有する細胞も含め、コントロールと同等の取り込みが認められた (図 4 C)。t 検定の結果では、両者間に有意差は認められなかった。

5. 線維芽細胞におけるコラーゲンゲル培養

ディッシュ上での二次元的な培養では、何れの細胞でも単胞性脂肪滴の形成には至らなかった。そこで、三次元構築の維持できるコラーゲンゲル法を用いて線維芽細胞における脂肪細胞分化過程を観察した。CKS 培養 2 週間後の線維芽細胞では、大半の細胞は核周囲に数個のズダン陽性の大型な脂肪滴が形成されていた。コラーゲンゲル表層の細胞では培養日数につれて、正常な脂肪細胞に類似した形態を示すものも認められた (図 5 A)。電顕的には平面培養で豊富に見られたミトコンドリアや小胞体などの細胞小器官は比較的少なく、細胞体は大型の脂肪滴で占められていた (図 5 B)。

考 察

最近、我々は CKS にメッケル軟骨細胞を脂肪細胞に形質転換させる能力があることを報告しているが、他種の間葉系細胞については不明のままであった。本研究では性質の異なる 3 種類の間葉系細胞を用い CKS による脂肪細胞分化誘導能を検討した結果、何れの細胞においても脂肪形成を誘導することから、CKS に種々の間葉系細胞に共通する脂肪分化誘導因子の存在することが示唆された。

CKS で誘導された細胞の位相差顕微鏡と脂肪染色による観察では、多くの顆粒状物質が認められ、これらはズダン陽性であることから脂肪滴であることは明らかである。これらの脂肪滴の大きさは各々の細胞によって異なっていたが、最も大型な脂肪滴を有する細胞は皮下線維芽細胞で、最も小型なものは歯髄細胞由来の脂肪細胞であった。MC 3 T 3 -E 1 細胞では両者

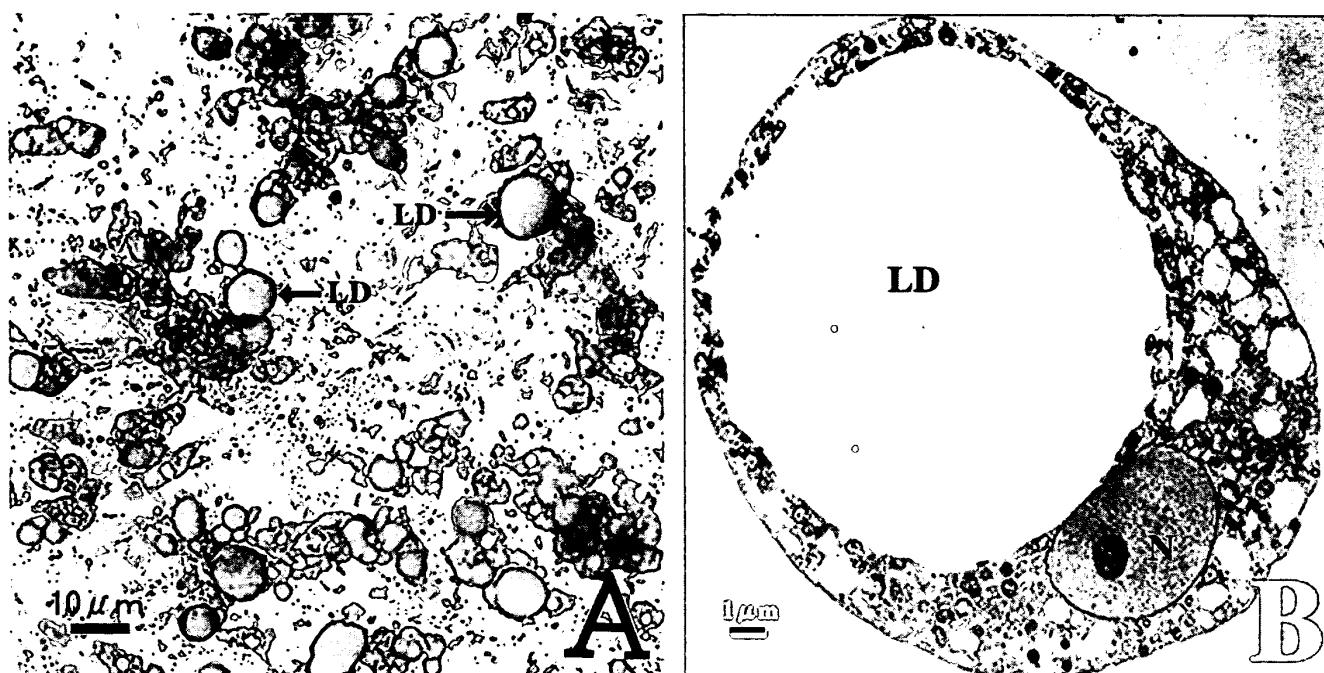


Fig. 5. MSF cultured for 2 weeks by the collagen-gel matrix method (A). These cells contained well-developed sudan III-positive lipid droplets (LD) at a high frequency. Bar: 10 μ m

Electron micrograph of a well-developed adipocyte grown on the collagen-gel matrix (B). Cell contained large lipid droplet (LD), oval nucleus (N), small mitochondria and vesicular structure. Bar: 1 μ m

の中間的な脂肪滴形成能を示した。仮に、脂肪滴の大きさによってCKSによる誘導効果を判定するならば、上記の細胞間での誘導効果は皮下組織中の線維芽細胞が潜在的に高い脂肪分化能を有しており、CKSによる脂肪分化に即応できたといえる。実際、Sugihara et al¹¹⁾は皮下組織から得た線維芽細胞様脂肪細胞が脂肪細胞に転化することを報告している。本来、未分化間葉細胞とされる歯髄細胞は、線維芽細胞と同じ程度の分化過程が予想されたが、脂質合成能は線維芽細胞に劣っていた。このことは、本来歯髄細胞は一定の細胞数を保持する組織として機能するため、歯髄細胞自体CKSを含む他種の環境因子に影響されにくい性質を持っているのかもしれない^{19,20)}。これに対し、MC3T3-E1細胞は、石灰化能を有する骨性細胞として方向付けられた樹立細胞系ではあるが、同じ3T3系の3T3-L1細胞や3T3-F442細胞^{14,15)}が脂肪細胞分化能を有しているので、形質転換の可能性は十分に考えられ、本研究の結果でも分化の程度は3種類の細胞中で平均的な結果を示した。こうした各々の細胞での脂肪滴形成能

を指標とする脂肪分化において、細胞継代直後の細胞により効果的にCKSは作用することから、CKSは増殖期の細胞に分化型細胞への形質転換を促進させる作用があると考えられる。

本研究で用いたいずれの細胞もCKSによって脂肪滴の形成が誘導されたが、形成された脂肪滴の大きさには差異が認められた。このような脂肪滴の性質を検討するため、脂肪細胞のマーカーとされるPPAR γ , leptin, GLUT-4に対する抗体を用いて免疫組織染色を行った。PPAR γ は脂肪細胞の分化初期に脂肪酸合成の核レセプターとして働く転写因子であり^{23~25)}、本研究で用いた3種類のいずれの細胞でもCKS添加12時間後には既に陽性反応が認められた。この結果は、CKSは脂肪滴形成に先がけた脂肪細胞の初期分化に作用することを示しており、従来の報告と一致するものであった^{26~28)}。leptinはヒトの妊娠期の胎盤やマウス胎仔の軟骨/骨、蝸牛管、毛包などにも発現が認められる蛋白である^{29,30)}。特に、脂肪細胞では、体内のエネルギー動態に伴い血中のleptin濃度と視床下部を介しての摂食抑制、促進をコントロー

ルする因子として成熟脂肪細胞によって分泌される^{31, 32)}。本研究で用いた3種類の細胞において、明瞭な免疫反応が脂肪滴から成る球状構造物に一致して認められることから、成熟脂肪細胞と同様の活発な leptin 合成が確認された。同様に成熟脂肪細胞の分化マーカーである GLUT-4 はインスリン刺激後、細胞質から細胞膜にトランスロケーションする因子である^{33~35)}。本研究においてもインスリン投与後12時間の GLUT-4 の免疫染色によって、その賦活化が確認されることから、CKS による脂肪細胞の誘導は活発なグルコース代謝に基づく脂肪酸合成の促進によるものと思われる。いずれにしても、本研究で用いた3種類の抗体は脂肪細胞特異的抗体であることから、免疫染色の結果は脂肪滴の大きさに関係なく、いずれの細胞も脂肪細胞としての十分な性質を保持していることが示唆される。

本研究の平面的な単層培養では、典型的な白色脂肪細胞の特徴とされる単胞性細胞の形成を見るには至らなかった。この単胞性脂肪細胞の形成には、とりわけ三次元足場の維持が重要視されている。そこで、コラーゲンゲル法による三次元的環境下での誘導を試みた。コラーゲンゲル法では、培養皿による平面培養に比較して表層部により大型の脂肪滴を有する脂肪細胞が何れの細胞種にも出現した。コラーゲンゲル法では表層部に単胞性脂肪細胞が多く出現したが、これは、杉浦ら^{12, 36~38)}が指摘しているように、単胞性脂肪細胞の形成には分化誘発物質や脂肪の合成能力に加えて、細胞骨格が重要な要素である可能性が考えられる。本研究による CKS による脂肪分化誘導能が初期の脂肪滴形成段階から単胞性脂肪細胞まで一貫して得られるためには三次元的構築の維持が不可欠であることを裏付けている。

今日まで、脂肪細胞の分化誘導の解析には、胎仔性樹立細胞や脂肪前駆細胞にデキサメタゾンやインスリンなどの誘導因子の添加が必須とされてきたが、本研究のように血清因子だけでの誘導はいままでに報告がなかった。CKS に

よる脂肪分化は、本研究で用いたシグマ社製以外の他社製品やロットによる相違が認められないことから、CKS 一般に共通した因子であることが推定される。また、本研究でコントロール血清として用いた CBS 以外の動物血清（羊、馬、兎、ヒト等）では脂肪分化誘導能は認められないことから¹⁸⁾、CKS に特異的な作用であると思われる。このような効果は CKS と CBS 間でのホルモン分析の結果からインスリンやエストロゲンのようなある種のホルモンの関与が想定される。現在までに CKS に含まれる脂肪誘導効果が何に起因するのか、十分には解明されていないが、今後本研究のような実験系の確立が脂肪分化の有用な培養モデル系になり得ると考えられる。

結 論

- 1) 線維芽細胞、歯髄細胞、MC 3 T 3 -E 1 細胞ともに CKS 添加によって脂肪細胞に形質転換することが判明した。
- 2) 脂肪滴形成能は線維芽細胞、MC 3 T 3 -E 1 細胞、歯髄細胞の順であったが、何れの細胞においても脂肪分化マーカーに免疫陽性を示した。
- 3) コラーゲン・ゲルによる三次元的培養法がより単胞性脂肪細胞の形成に効果的であった。
- 4) CKS による培養間葉細胞の脂肪細胞分化誘導は有用なモデルとなり得ることが証明された。

謝辞：稿を終えるにあたり、ご懇篤なる指導と校閲を賜った岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座名和橙黄雄教授ならびに石関清人講師に深甚なる謝意を表します。また、同口腔解剖学第二講座立花民子助教授に謹んで感謝の意を表します。さらに、本研究に際し数々のご教示、ご助言を戴いた同口腔解剖学第二講座藤原尚樹助手、遠藤真助手に厚く謝意を申し上げます。

本論文の要旨は、第47回日本解剖学会東北・

北海道連合地方会 (2001年9月9日, 札幌), 第107回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2002年3月29~31日, 浜松), 第48回日本解剖学会東北・北海道連合地方会 (2002年9月7日, 十和田) において発表した。

文 献

- 1) 伊藤 隆 : 組織学, 第18版, 南山堂, 東京, 78-79ページ, 1987.
- 2) 市川厚, 尾持昌次, 柴崎晋, 瀬戸口孝夫, 永田哲士, 三好萬左行, 山田和順共著 : 最新組織学, 第7版, 南江堂, 東京, 130ページ, 1979.
- 3) 小川和郎, 鈴木昭男, 清寺 眞, 永野俊雄, 橋本一成, 橋本正淑, 山田英智, 山元寅男, 渡辺陽之輔編 人体組織学2 結合組織・皮膚とその付属器官, 第1版, 朝倉書店, 東京, 67-105ページ, 1984.
- 4) Johnson, P. R., and Greenwood, M. R. C. : The adipose tissue, *In Cell and Tissue Biology : A Textbook of Histology (L. Weiss, Ed.)* 6th ed., pp., 189-209, 1988.
- 5) Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Mizuno, K., Matsuzawa, Y., and Matsubara, K. : Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene* 190 : 227-235, 1997.
- 6) Spiegelman, M. B., and Hotamisligil, S. G. : Through thick and thin : Wasting, obesity, and TNF- α . *Cell* 73 : 625-627, 1993.
- 7) Hube, F., and Houner, H. : The two tumor necrosis factor receptors mediate opposite effects on differentiation and glucose metabolism in human adipocytes in primary culture. *Endocrinology* 141 : 2582-2588, 2000.
- 8) Hotamisligil, S. G., Shargill, S. N., and Spiegelman, M. B. : Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259 : 87-91, 1993.
- 9) Richardson, L. R., Hausman, J. G., and Gaskins, R. H. : Effect of transforming growth factor-beta on insulin-like growth factor 1- and dexamethasone-induced proliferation and differentiation in primary cultures of pig preadipocytes. *Acta Anat.* 145 : 321-326, 1992.
- 10) Jürgen, K. N., Lloud, D. F., Oleg, V., Patsy, M. N., Yves, R., Donald, F. S., Raymond, J. C., Beverly, J. P., and Edward, H. L. : Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nature Genet.* 10 : 135-142, 1995.
- 11) 杉原 甫, 重松正森, 青木茂久 : 脂肪細胞の増殖・分化の細胞生物学, *Lipid* 9 : 218-224, 1998.
- 12) Sugihara, H., Yonemitsu, N., Miyabara, S., and Toda, S. : Proliferation of unilocular fat cells in the primary culture. *J. Lipid Res.* 28 : 1038-1045, 1987.
- 13) Grigoriadis, E. A., Heersche, M. N. J., and Aubin, E. J. : Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population : effect of dexamethasone. *J. Cell Bio.* 106 : 2139-2151, 1988.
- 14) Cornelius, P., MacDougald, A. O., and Lane, D. M. : Regulation of adipocyte development. *Annu. Rev. Nutr.* 14 : 99-129, 1994.
- 15) Green, H., and Kehinde, O. : Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* 1 : 113-116, 1974.
- 16) Green, H., and Kehinde, O. : An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5 : 19-27, 1975.
- 17) Gregoire, M. F., Smas, M. C., and Sul, S. H. : Understanding adipocyte differentiation. *Am. Physiol. Soc.* 78 : 783-809, 1998.
- 18) Ishizeki, K., Takahashi, N., and Nawa, T. : Phenotypic characteristics of adipocytes generated from Meckel's chondrocytes in response to chick serum *in vitro*. *Cell Tissue Res.* 309 : 251-260, 2002.
- 19) Ten Cate, A. R. ; 平井五郎, 矢嶋俊彦, 中原 皓, 三好作一郎, 滝口励司, 戸田善久, 脇田稔, 名和橙黄雄, 山本茂久, 小野瀬英夫, 武田正子, 川崎堅三, 後藤仁敏訳 Ten Cate 口腔組織学, 第3版, 医歯薬出版, 東京, 216-217ページ, 1992.
- 20) S. N. Bhaskar ; 尾持昌次訳 ORBAN'S 口腔組織・発生学, 第3版, 医歯薬出版, 東京, 142-145ページ, 1987.
- 21) Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S., and Yamamoto, S. : Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn. J. Oral Biol.* 23 : 899-901, 1981.
- 22) Baba, T. T. : Restoration of mineral depositions by dexamethasone in the matrix of non-mineralizing osteoblastic cells subcloned from MC3T3-E1 cells. *Cal. Tissue Int.* 67 : 416-421, 2000.
- 23) Forman, M. B., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, P. R., Spiegelman, M. B., and Evans, M. R. : 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 83 : 803-812, 1995.
- 24) Brun, P. R., Tontonoz, P., Forman, M. B., Ellis, R., Chen, J., Evans, M. T., and Spiegelman, M. B. : Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes & Dev.* 10 : 974-984, 1996.
- 25) Dieudonne, N. M., Pecquery, R., Leneuve, C. M., and Giudicelli, Y. : Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes : evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxi-

- some proliferator-activated receptor γ 2. *Endocrinology* 141 : 649-656, 2000.
- 26) Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, M. B. : Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79 : 1147-1156, 1994.
- 27) Tontonoz, P., Hu, E., Graves, A. R., Budavari, I. A., and Spiegelman, M. B. : mPPAR γ 2 : tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes & Dev.* 8 : 1224-1234, 1994.
- 28) Chawla, A., and Schwarz, J. E., Dimaculangan, D. D., and Lazar, A. M. : Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ : adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135 : 798-800, 1994.
- 29) Kume, K., Satomura, K., Nishisho, S., Kitaoka, E., Yamanouchi, K., Tobiume, S., and Nagayama, M. : Potential role of leptin in endochondral ossification. *J. Histochem. Cytochem.* 50 : 159-169, 2000.
- 30) Atanassova, P., and Popova, L. : Leptin expression during the differentiation of subcutaneous adipose cells of human embryos in situ. *Cells Tissues Organs* 166 : 15-19, 2000.
- 31) Caro, F. J., Sinha, K. M., Kolaczynski, W. J., Zhang, L. P., and Considine, V. R. : Leptin : the tale of an obesity gene. *Diabetes* 45 : 1455-1462, 1996.
- 32) MacDougald, A. O., Hwang, C-S., Fan, H., and Lane, D. M. : Regulated expression of the obese gene product(leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 : 9034-9037, 1995.
- 33) 小川 渉, 春日雅人 : 脂肪細胞におけるインスリン作用, *Lipid* Vol.9, No3, 247-252ページ, 1998.
- 34) Holman, G. D., and Kasuga, M. : From receptor to transporter. *Diabetologia* 40 : 991-1003, 1997.
- 35) 江崎 治, 角田伸代 : 医のあゆみ, 184 : 503-506, 1998.
- 36) Sugihara, H., Yonemitsu, N., Toda, S., Funatsumaru, S., and Watanabe, K. : Proliferation of small fat cells derived from unilocular fat cells of rats in collagen gel matrix culture. *Acta. Histochem. Cytochem.* 30 : 63-76, 1997.
- 37) Yamashita, K., and Takagi, T. : Appearance of adipose cells in connective tissue at the implantation site of bone matrix gelatin and bupivacaine injection. *Acta. Anat.* 145 : 406-411, 1992.
- 38) Sugihara, H., Yonemitsu, N., Toda, S., Miyabara, S., Funatsumaru, S., and Matsumoto, T. : Unilocular fat cells in three-dimensional collagen gel matrix culture. *J. Lipid Res.* 29 : 691-697, 1988.