

組織培養法による熱産生調節因子に関する
研究—特に褐色脂肪組織について—

(研究課題番号：57440029)

昭和58年度科学研究費補助金(一般研究A)

研究成果報告書

昭和59年3月

研究代表者 黒島 晨 汎

(旭川医科大学 生理学第一講座)

は し が き

温度適応、とくに寒冷に対する適応はヒトを含めた恒温生体にとって基本的に重要な機能である。この寒冷適応の代謝性機序について、いわゆる非ふるえ熱産生という特異的な熱産生の方法の存在が明らかにされて、その調節機構についても多くの研究が発表されている。本研究ではこの非ふるえ熱産生組織として最も代表的であることが知られている褐色脂肪組織の調節因子を明らかにする目的で、組織培養法を利用して行われたものである。この組織の培養には種々の困難な問題が見い出されたが、この組織の調節に関して幾つかの知見が得られ今後の研究に対する見通しが得られたと考えられる。

昭和59年3月

研究代表者 黒島 晨 汎

研 究 組 織

研究代表者 : 黒 島 晨 汎 (旭川医科大学医学部 教授)

研究協力者 : 八 幡 剛 浩 (旭川医科大学医学部 助手)

研 究 経 費

昭和 5 7 年度 1 1 , 0 0 0 千円

昭和 5 8 年度 2 , 5 0 0 千円

計 1 3 , 5 0 0 千円

研 究 発 表

口 頭 発 表

- 1) 八幡剛浩, 黒島晨汎: 内分泌因子による培養褐色脂肪組織の機能調節. 日本生気象学雑誌 20 (3) :28, 1983.
- 2) Yahata, T. & Kuroshima, A. : Regulatory mechanisms of brown adipose tissue function using the tissue culture method. 日本生理学雑誌 45 (8・9) :587, 1983.
- 3) 八幡剛浩, 黒島晨汎: 組織培養法による褐色脂肪組織機能調節機序の検討. 第61回日本生理学会大会 予稿集 p. 263, 1984.

研 究 成 果

1. 緒 言

ヒトをはじめとする恒温生体の生存にとって環境温度、とくに寒冷に対する体温調節能力は基本的生理機能として重要である。寒冷に適応するための代謝性機序として特徴的なのは非ふるえ熱産生の亢進であり、その典型的部位として、熱産生を唯一の機能として持つことが知られている褐色脂肪組織があげられる。この組織の機能は主として交感神経終末から放出されるノルアドレナリンによって調節されていることが知られているが、それ以外の内分泌性因子もまた関係していることが示唆されている。例えばグルカゴン、インシュリン、甲状腺ホルモン、副腎皮質ホルモンなどが多因子的に関与していると報告されている。

本研究では非ふるえ熱産生の生理的調節機序をさらに究明して、その全体像を知るために、褐色脂肪組織の組織培養法の手法を用いて、この組織の機能の発現と発達に関係する因子を直接検討しようとするものである。

2. 研究方法

1) 組織培養方法

実験にはWistar系ラットの新生児を用いた。24時間絶食させた生後1週間以内の新生児の肩甲骨間褐色脂肪組織を無菌的に取り出し、培養メEDIUMで湿らせた滅菌濾紙上で筋肉、白色脂肪組織、周囲膜状組織、血管等を手早く取り除いた後薄刀のカミソリで $0.5-1\text{mm}^3$ のブロックに細切した。この組織ブロックをラット尾部髄組織より抽出したコラーゲンでコーティングしてあるプラスチック製カバースリップ上に乗せ、このカバースリップを3.5mm径のカルチャーディッシュに入れそのままインキュベーター内に15分間放置した。カバースリップに乗せる組織ブロック数は10ヶとした。その後このカルチャーディッシュに2mlの培養

メディウムを加え、33℃又は37℃の水蒸気飽和-95%空気-5%CO₂気相下で組織培養を行った。培養メディウムは10%牛胎児血清添加メジウム199であり、抗生物質（ゲンタシン）を200μg/mlの割合で含んでいる。培養2日目に培養メジウムを交換する際に次に掲げる種々ホルモンを添加した。その後2日毎にホルモン添加メジウムを交換し、1ないし2週間培養した。

2) 添加ホルモン

褐色脂肪細胞の分化・成長への効果を検討するのに使用したホルモン及び因子の種類と添加濃度は次の通りである。インシュリン 40nM；グルカゴン 400 nM；ノルアドレナリン 6mM；インシュリン 40nM+グルカゴン 400nM；インシュリン 40nM+ノルアドレナリン 6mM；2.5S神経成長因子 10nM；インシュリン 40nM + 2.5 S神経成長因子 10 nM

3) 細胞学的検索

組織ブロックからの褐色脂肪細胞の outgrowth をチェックしながら1ないし2週間培養を行った。培養組織を2%パラフォルムアルデヒド+2%グルタルアルデヒドで4℃2時間固定、1%オスミック酸で4℃2時間固定後エポキシ樹脂に包埋し、これを超薄切片とし電子顕微鏡による細胞内微細構造観察を行った。褐色脂肪細胞分化、活性化の指標として outgrowth 細胞の脂肪蓄積状況、細胞サイズ及び培養ブロック内細胞の微細構造、特にミトコンドリアの変化に注目して添加ホルモン・因子の効果を検討した。

3. 研究結果

1) 培養法の検討

褐色脂肪細胞は、白色脂肪細胞程ではないにしても多量の脂質を含んでいるため比重が軽く、そのままでは組織が浮いてしまいうまく培養が出来ない。この組織あるいは細胞をカバースリップに付着させるには脂肪含有の少ない組織

を使えば良いのであるが、そのための1つの方法は胎児又は出生直後で未だ乳を飲んでいない新生児の褐色脂肪組織を用いることである。この様にして得られた褐色脂肪組織は細胞の outgrowth が良い様であるが、この方法はタイミングが難しい上に得られる組織量も少いところに難点がある。脂肪含有量の少ない組織を得るための他の方法は、組織提供動物を絶食させることである。生後1週目位迄の新生ラットを一晩絶食させることにより比較的良好な結果を得たが、生後日数が長くなると outgrowth が低下する様であったので本研究では生後3日目位の新生ラットを使用した。

次に組織片のカバースリップへの付着及び付着させた組織ブロックからの細胞の outgrowth の問題であるが、これはあらかじめラット尾部臍組織から抽出したコラーゲンでカバースリップをコーティングしておき、また組織ブロックをこのカバースリップに乗せた際直ちに培養メディウムを加えず、15分間インキュベーター内に置いた後に培養メディウムを加えることで良い結果が得られた。培養メディウムは初代培養に良いとされているメディウム 199 で検討し一応の成果が得られたのでこれを用いた。また、培養温度に関しては 33℃の方が 37℃よりも組織ブロック内細胞の壊死が少ないことが分かったので、以後 33℃で行うことにした。

2) 培養褐色脂肪組織からの細胞成長

組織の条件が良ければ、培養開始翌日にはかなりの数の細胞が組織ブロックから outgrowth しており、この細胞は分裂を重ね1ないし2週間目には outgrowth した細胞でカバースリップは被われる様になった。この細胞は fibroblast 様の形態を示しているが、培養4、5日頃より多くの脂肪滴を蓄積する細胞が出現した。脂肪を蓄積した細胞は次第に数を増し、細胞サイズも増大した。またそれに伴い、脂肪滴の数、サイズも増加してきた。また同じく培養4、5

日目頃より若い脂肪細胞が組織ブロックより出て来てカバーリップ上で成長するのが見られた。

3) 培養褐色脂肪細胞へのホルモンの効果

a. インシュリン、グルカゴンおよびノルアドレナリンの効果

outgrowthした細胞で見ると、ホルモン無添加のコントロール(C)(図6)に比べ、インシュリン40nMを投与した群(I)では脂肪蓄積開始時期も早くまた脂肪蓄積量も著しく多い(図7)。脂肪含有細胞のサイズを面積で表わしそのヒストグラムをとってみると、Cでは1000~2000 μ^2 のものが50%強を占めており、大型の細胞は見当らない。平均サイズは1,485 \pm 145.6 μ^2 であった(図1:上段)。これに対し、Iでは大型の細胞が多く出現しており、平均値は2,668 \pm 191.7 μ^2 とCより有意に大きい(図1:中段)。一方グルカゴン400nMをインシュリン40nMと同時に投与した群(I+G)でも細胞サイズの分布パターンは、Iとほとんど同じで平均値は2,605 \pm 167.7 μ^2 とやはりCよりも有意に大きくなっていった(図1:下段)。しかし、I+Gでは細胞内の脂肪滴のサイズ、量がIより小さくなっていった(図8)。組織ブロック内の細胞についても同様の傾向が得られ、Iで脂肪蓄積が促進し、I+GではIの脂肪蓄積効果が抑制されていた。またインシュリン40nM+ノルアドレナリン6nM投与(I+NA)でもI+Gと同様であった。

組織ブロック内細胞について微細構造を見てみると、Cのミトコンドリアはクリステが明瞭な物が多くミトコンドリアの長軸に平行に配列しているものが多数見られた(図9)。Iでは小型のミトコンドリアが多くクリステは未発達のものが多い(図10)。また細胞表面にはピノサイトーシスによる陥入が多数見られ(図11)、細胞質内にはこれに由来すると考えられる小胞で占められている域が広く見られた(図12)。

グルカゴン 400nM 投与群(G)ではゴルジ体、粗面小胞体の発達が良く、ミトコンドリアはCのものに似ていた(図13)。I + G(図14)、I + NA(図15)でもGに似て粗面小胞体、ゴルジ体が多く見られており、ミトコンドリアの状態はCに似ていた。

ミトコンドリアのサイズを比較してみると、Cの平均 $0.24 \pm 0.005 \mu^2$ に対し、Iでは小型のミトコンドリアが多くなり、平均値は $0.13 \pm 0.004 \mu^2$ と有意に小さかった。I + NAの分布パターンはIのものに似ており平均値は $0.14 \pm 0.004 \mu^2$ であった(図2)。I + Gでは平均 $0.18 \pm 0.005 \mu^2$ とIより有意に大きくなっておりGでは $0.16 \pm 0.006 \mu^2$ とI + Gとほぼ同じであった(図3)。

b. 神経成長因子の効果

インシュリンと神経成長因子の効果を比較した。細胞サイズのヒストグラムを図4に示す。

培養1週目の outgrowth 褐色脂肪細胞のサイズはC(図16)で $380 \pm 9 \mu^2$ 、Iで $700 \pm 20 \mu^2$ であり、前記実験での結果同様、Iでは脂肪の蓄積が促進している(図17)。神経成長因子10nM投与群(NGF)(図18)では $350 \pm 11 \mu^2$ とCと変わらず、一方インシュリン+神経成長因子投与群(I + NGF)(図19)では $540 \pm 17 \mu^2$ とIより有意に小さかった。培養2週目ではこの傾向がさらにはっきりする。C(図20)で $570 \pm 18 \mu^2$ 、I(図21)で $1,050 \pm 51 \mu^2$ 、NGF(図22)で $490 \pm 10 \mu^2$ 、I + NGF(図23)で $930 \pm 12 \mu^2$ でありIではCより有意に大となり、NGFはCより、またI + NGFはIよりそれぞれ有意に小さく脂肪滴サイズも小さかった。

1週間培養後の細胞の微細構造をみると、C(図24)、I(図25)では前記同様の特徴が見られた。NGF添加では極めて細長いミトコンドリアが多数見られ(図26,27)、また粗面小胞体の発達が著しい(図27)。I + NGFでは円形のミトコンドリアが多く、またミトコンドリアの径とほぼ

同じ大きさの小胞が沢山存在していた(図28,29)。ミトコンドリアのクリステはNGF、I + NGFともミトコンドリアの大型のもので顕著であった。ミトコンドリアのサイズはCの平均 $0.18 \pm 0.004 \mu^2$ (図5) に対し、Iでは小型のもの割合が多くなっているにもかかわらず平均値は $0.19 \pm 0.007 \mu^2$ (図5) とCと差がみられなかった。I + NGFでは $0.16 \pm 0.006 \mu^2$ とIより有意に小さくなっていった(図5)。一方、NGFでは $0.26 \pm 0.008 \mu^2$ とCより有意に大きくなっていった(図5)。

4. 考 察

褐色脂肪組織細胞の培養についてはいくつかの研究がなされている(Masters, 1965 ; Sidman, 1956a, b ; Dyer, 1968 ; Slavin & Elias, 1969, 1970 ; Dyer & Pirie, 1978 ; Né Chad et al., 1983 ; Né Chad, 1983 ; Sugihara et al., 1983)。これらは前駆細胞からの褐色脂肪細胞への分化に関する研究であり、培養が長期化するにつれ褐色脂肪細胞のミトコンドリアが小型化して白色脂肪細胞化し(Sidman, 1956 ; Dyer, 1968 ; Dyer & Pirie, 1978 ; Né Chad, 1983)、またNAに対する反応が見られない(Né Chad et al., 1983)など、褐色脂肪細胞の機能の発現・維持或いは機能亢進という点からの明確な結論は得られていない。褐色脂肪組織での熱産生を起す主因子はNAであり(Janský, 1973)、グルカゴンが褐色脂肪組織機能を亢進させることが示されている(Yahata & Kuroshima, 1981)ので先づこれらについて検討を加えた。

インシュリンが褐色脂肪細胞で脂肪の蓄積を促進することは明らかであり(Sidman, 1956 ; Masters, 1965 ; Slavin & Elias, 1970 ; Dyer & Pirie, 1978 ; Sugihara et al., 1983)。本研究の結果もこれらの報告と一致しており、コントロールに比ベインシュリン投与群では脂肪蓄積開始の時期も早く、蓄積速度も早い。そのため褐色脂肪細胞は大きな脂肪滴を含む様になり細胞サイズは有意に大きくなる。これはインシュ

リンの細胞基質取り込み促進作用の結果を反映しているものと考えられる。しかし、インシュリン投与細胞のミトコンドリアは小型のものが多く、またクリステの発達も良くないものが多いところから、この細胞の機能は高くないものと考えられる。一方インシュリンと共にグルカゴンを投与すると、細胞内脂肪滴は小さく量も少なくなる。しかし細胞サイズ自体は大きいままである。これは核の肥大と細胞質の増大によるものであろう。実際、培養肝細胞でインシュリンとグルカゴン同時投与によりDNA合成が促進する事が報告されている (Price, Jr., 1976 ; Friedman et al., 1981)。インシュリン+グルカゴン投与群のミトコンドリアはインシュリン投与群のものより大きくクリステも密であるものが多かったから、この細胞では細胞機能が亢進しているものと考えられる。一方、グルカゴン投与群のミトコンドリアはコントロールのものより小型化していたが、クリステの発達は良いものが多いところから、恐らくこの群ではミトコンドリアの分裂増殖が起きたことによると考えられる。また、インシュリンとNAを同時投与したもののミトコンドリアサイズのヒストグラムはインシュリン投与のものに良く似ている。しかしミトコンドリアの構造はむしろコントロールに類似していた。Masters (1972)はインシュリンは褐色脂肪細胞でミトコンドリアのモノアミンオキシダーゼ活性を増加させると報告しているので本実験でもNAの作用がインシュリンによって拮抗されている可能性もある。この点に関しては更に検討する必要がある。

神経成長因子の効果はおおむねグルカゴンの効果に似ていた。すなわち、インシュリンとの同時投与ではインシュリンの脂肪蓄積効果を抑制し、細胞質の増大を起す点、ミトコンドリアの大型化と多数の小胞の存在が見られている点、また、神経成長因子単独投与ではゴルジ体、粗面小胞体の発達が促されている点などである。神経成長因子は交感神経の神経節に作用して神経細胞の成長を促進させ更にNA生合成を促進させる (Kornblum & Johnson, Jr., 1982)。従って本実験で見ら

れた神経成長因子の効果は培養組織ブロック内の神経節（Derry et al., 1969）からのNA分泌促進による二次的なものの可能性があるが、もしそうであるならインシュリン+NA投与群でもミトコンドリアの大型化が起きている筈である。勿論、ホルモン濃度については検討を加えねばならないが、神経成長因子には神経成長を促進する作用の他にプロインシュリンとしての作用（Mukherjee & Mukherjee, 1982）や、細胞分裂促進作用と抑制作用の双方を持つ（Burstein & Greene, 1982）など種々のホルモン様作用があるところからここでみられた効果は神経成長因子の直接的な作用によるものかも知れない。しかし、褐色脂肪細胞の成長は内皮細胞の共存下で促進される事も報告されている（Björntorp, 1983）から、神経成長因子が、褐色脂肪組織内或いは添加血清中の未知の物質と協調的に働いている可能性は考えられる。

以上の研究の結果は、グルカゴン及び神経成長因子が交感神経のノルアドレナリンとともに褐色脂肪細胞の機能発現及びその維持に関与している事を示唆している。今後はこれら細胞の代謝機能への効果を調べることにより、褐色脂肪細胞の分化、機能発現とその維持に関する調節機構をさらに明らかにして行きたい。また褐色脂肪細胞培養によって、より直接的に細胞レベルでの検討を進めたい。

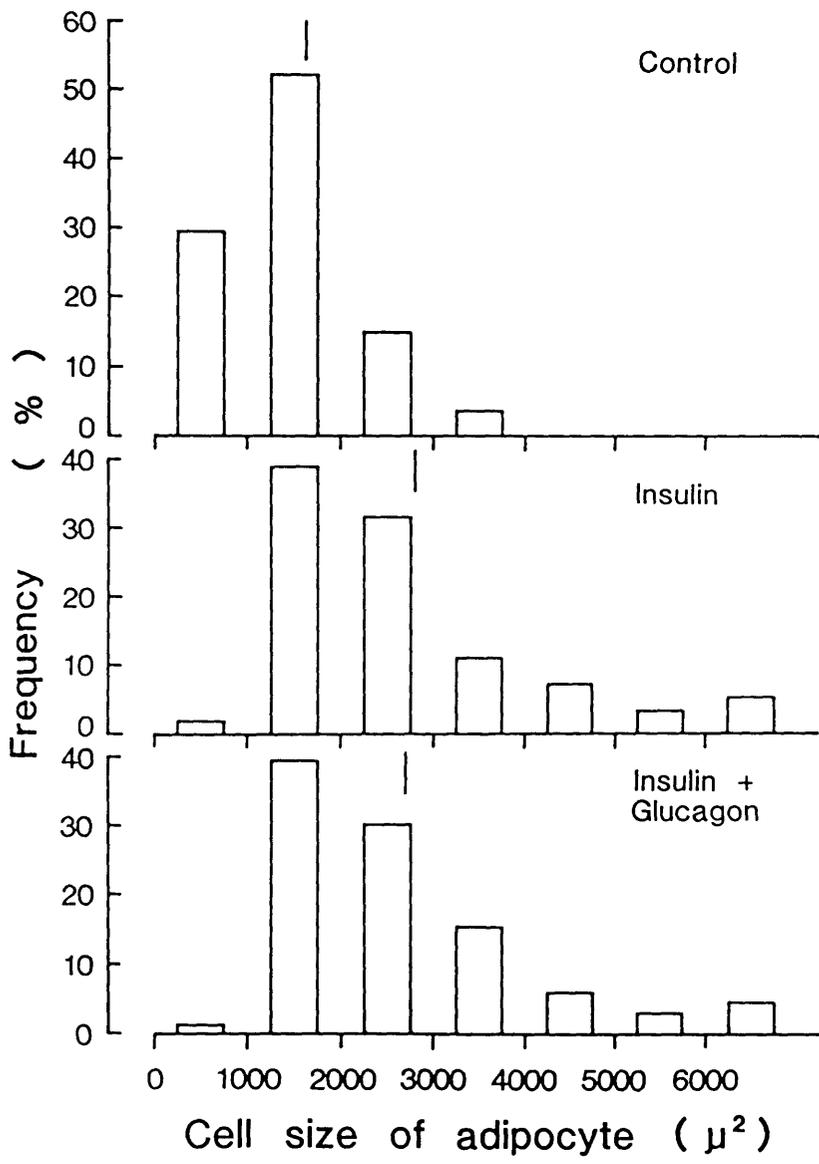


図1 組織外成長褐色脂肪細胞のサイズのヒストグラム

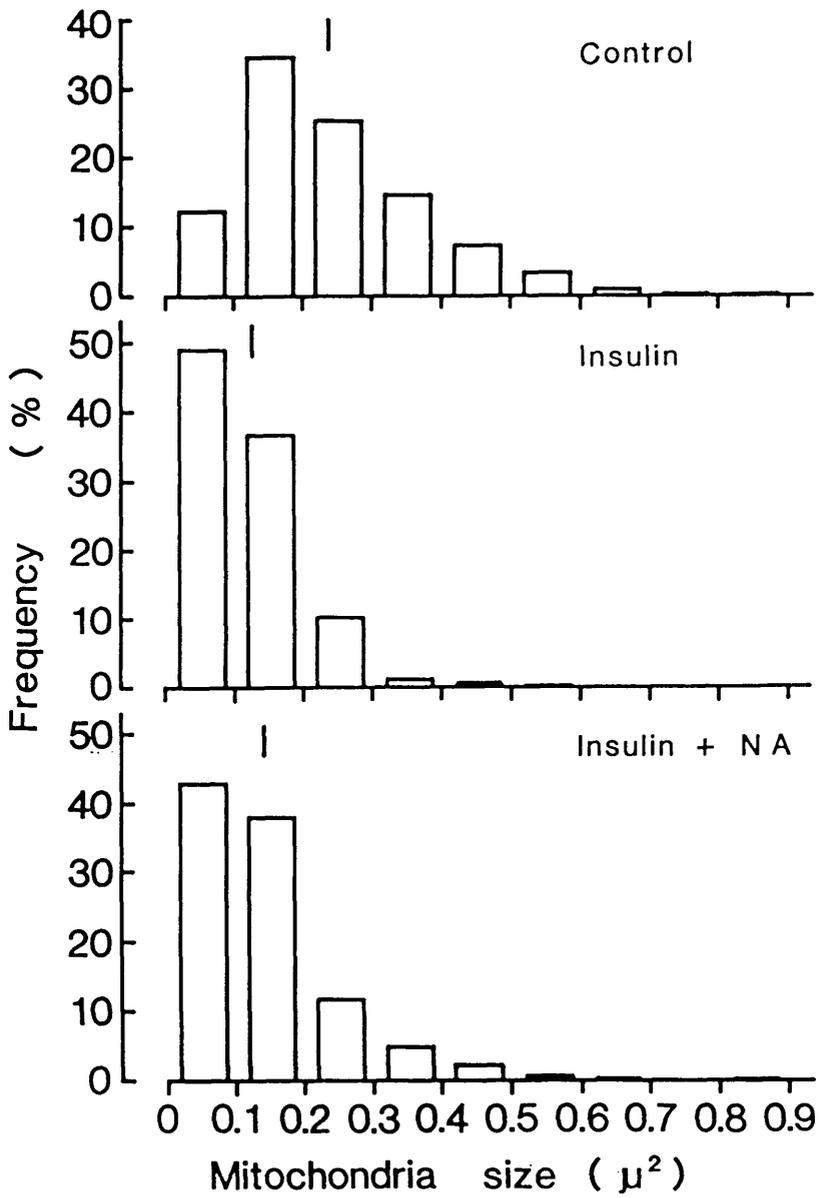


図 2 培養褐色脂肪組織内細胞のミトコンドリアサイズのヒストグラム

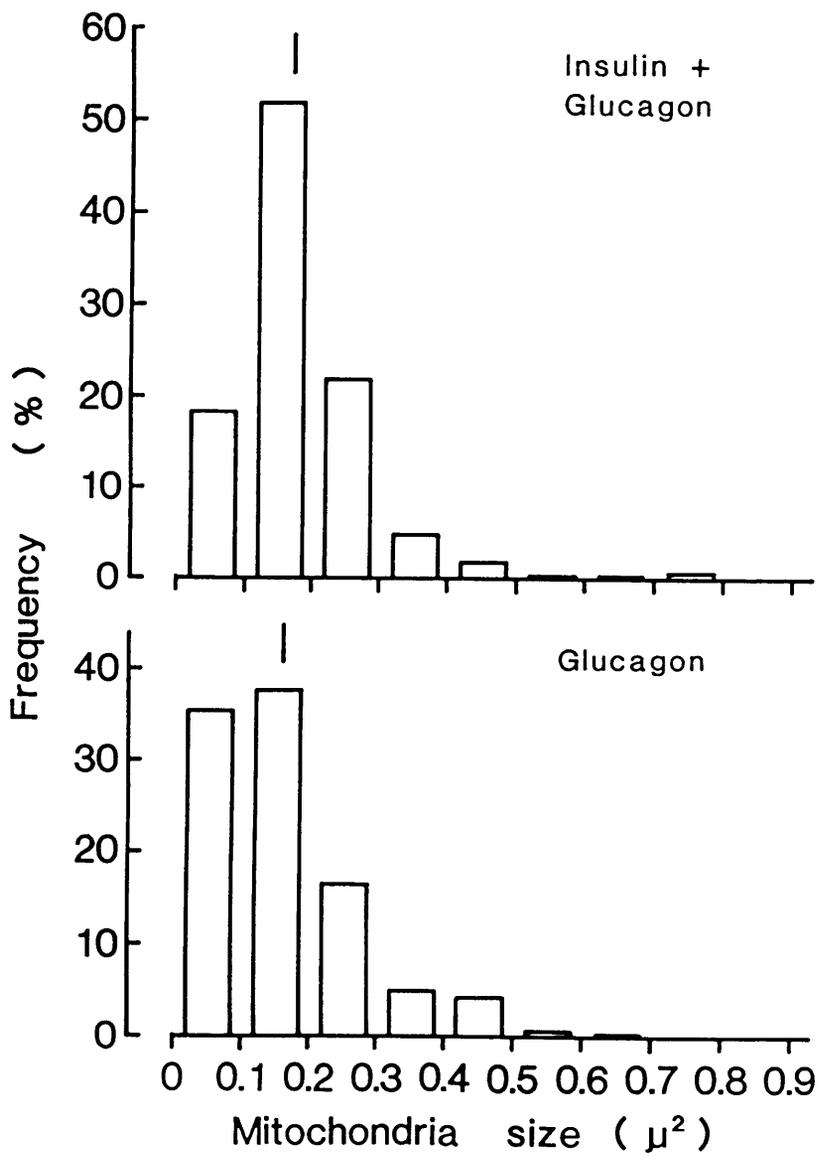


図 3 培養褐色脂肪組織内細胞のミトコンドリアサイズの内ヒストグラム

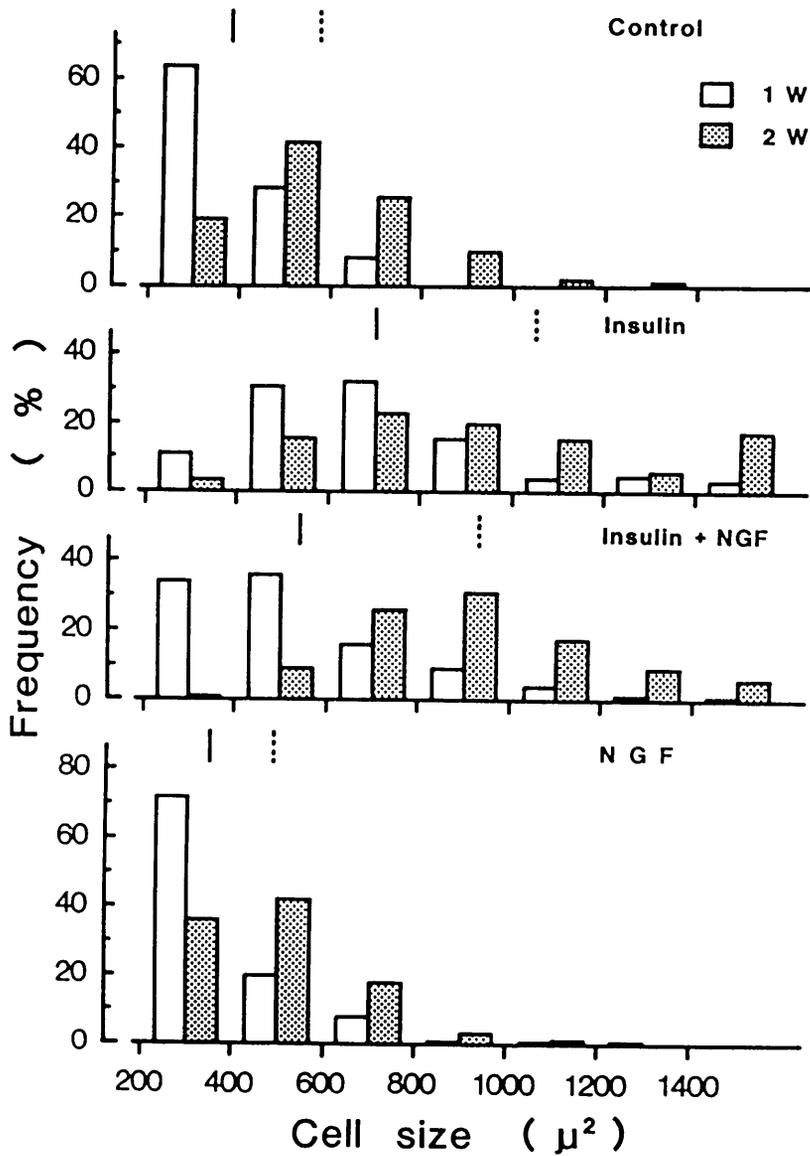


図4 組織外成長褐色脂肪細胞のサイズのヒストグラム
 1 W : 培養1週目 2 W : 培養2週目

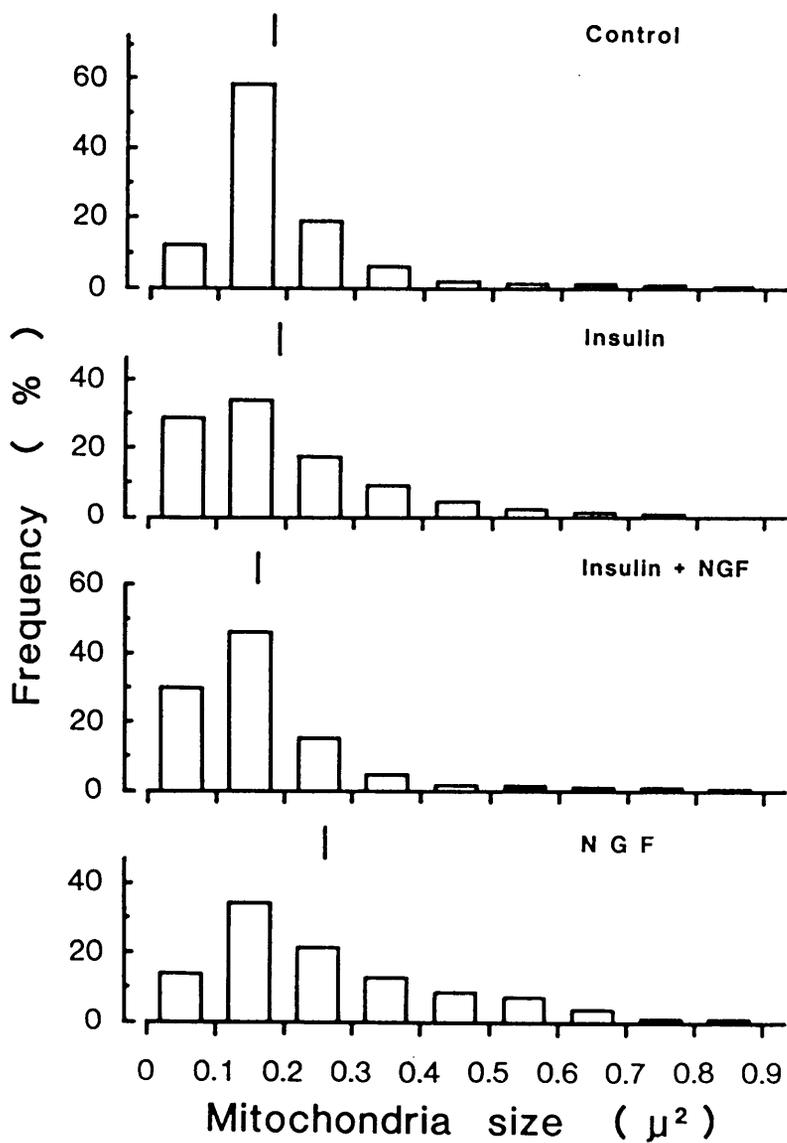


図5 培養褐色脂肪組織内細胞のミトコンドリアサイズの内分ヒストグラム

Plate I の説明

図 6 - 8 組織外成長褐色脂肪細胞の
位相着頭顕微鏡写真
× 160

図 6 . コントロール例

図 7 . インシュリン (40 nM) 投与例

図 8 . インシュリン (40 nM) ・ グルカ
ゴン (400 nM) 同時投与例

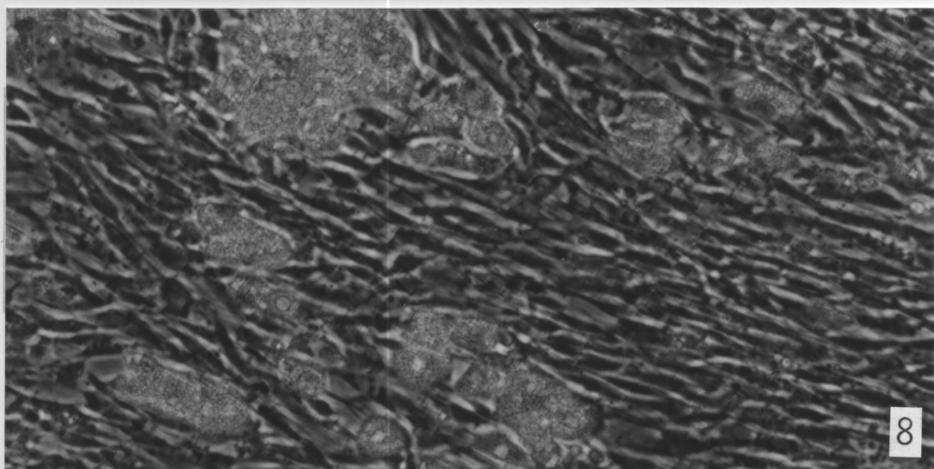
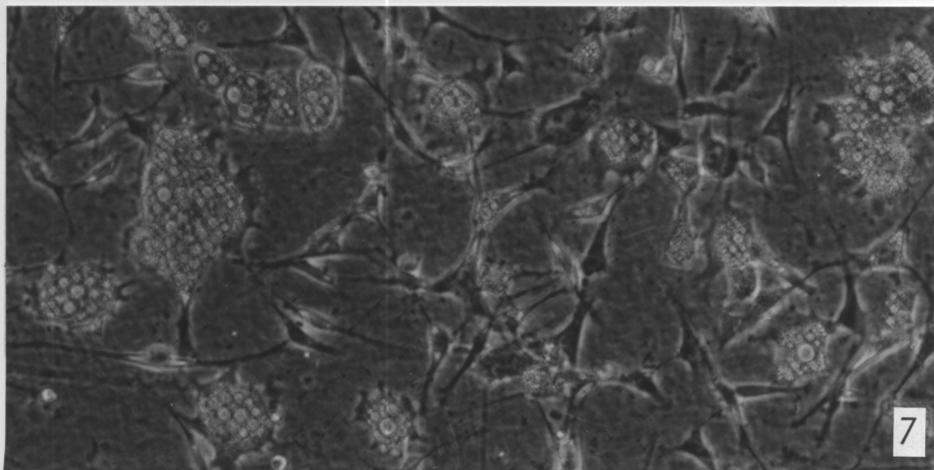
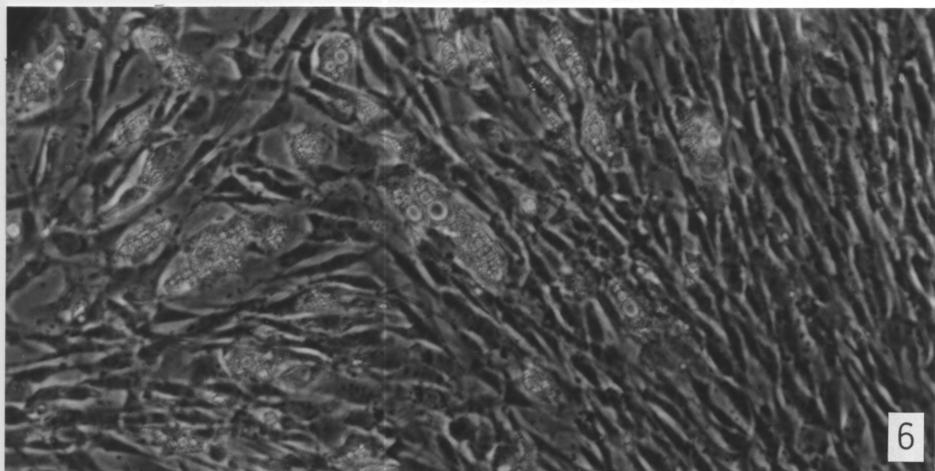


Plate II の説明

図 9 , 10 培養褐色脂肪組織ブロック
内細胞の電子顕微鏡写真
L : 脂肪
× 12,000

図 9 . コントロール例

図 10 . インシュリン (40 nM) 投与例

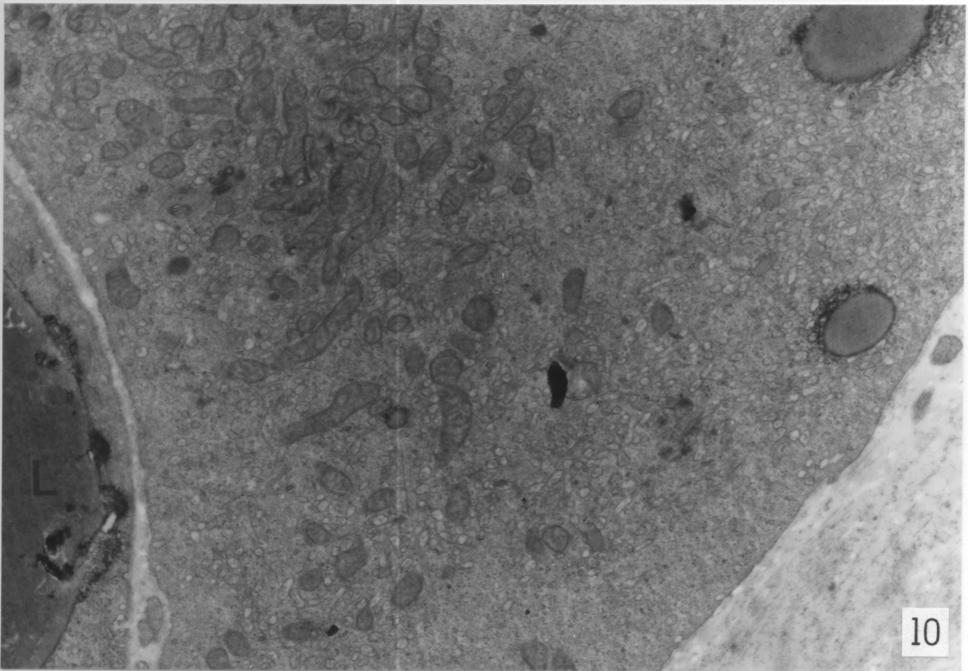
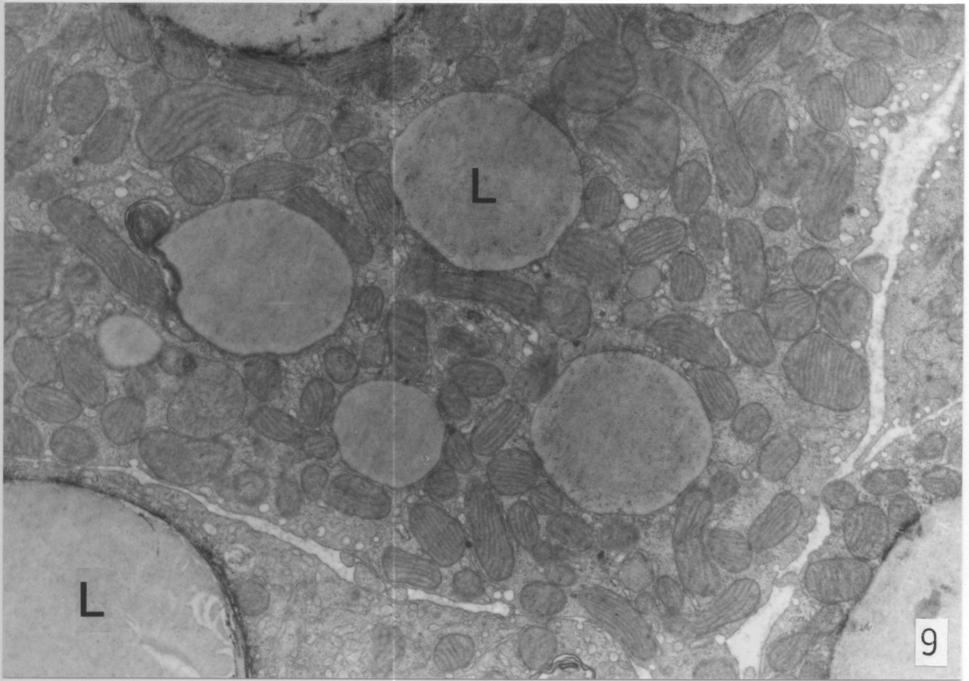


Plate III の説明

図 11 - 13 培養褐色脂肪組織ブロック
内細胞の電子顕微鏡写真
L : 脂肪 N : 核
× 20,000

図 11 . インシュリン (40 nM) 投与例で
見られたピノサイトシス . 矢印

図 12 . 同上例で見られた小胞群

図 13 . グルカゴン (400 nM) 投与例

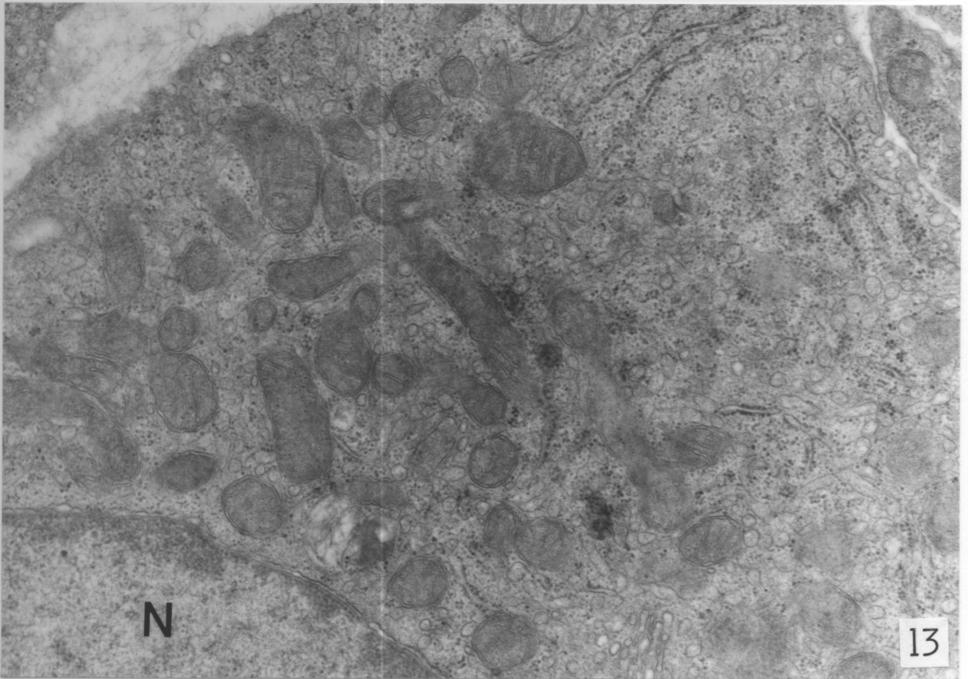
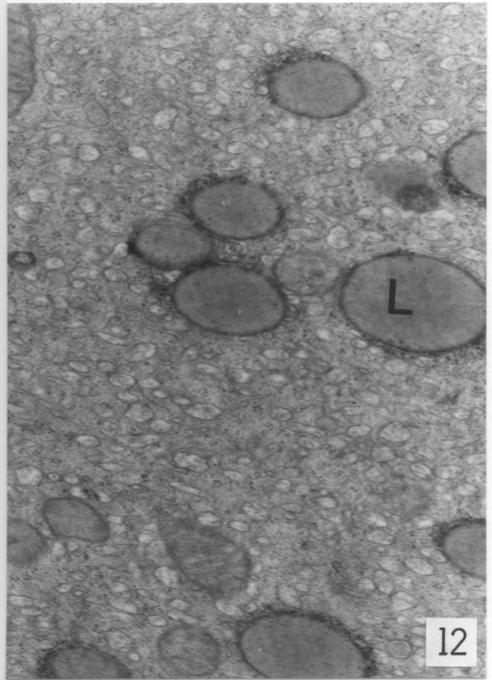
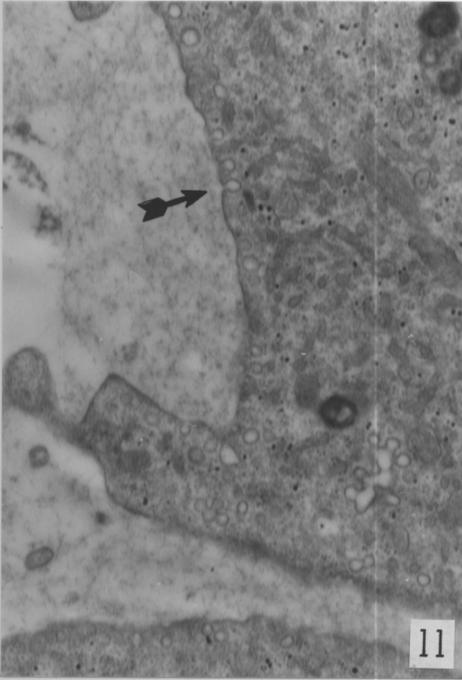


Plate IV の 説 明

図 14 , 15 培養褐色脂肪組織ブロック
内細胞の電子顕微鏡写真
L : 脂肪
× 12,000

図 14 . インシュリン (40 nM) ・ グルカ
ゴン (400 nM) 同時投与例

図 15 . インシュリン (40 nM) ・ ノルア
ドレナリン (6 mM) 同時投与例

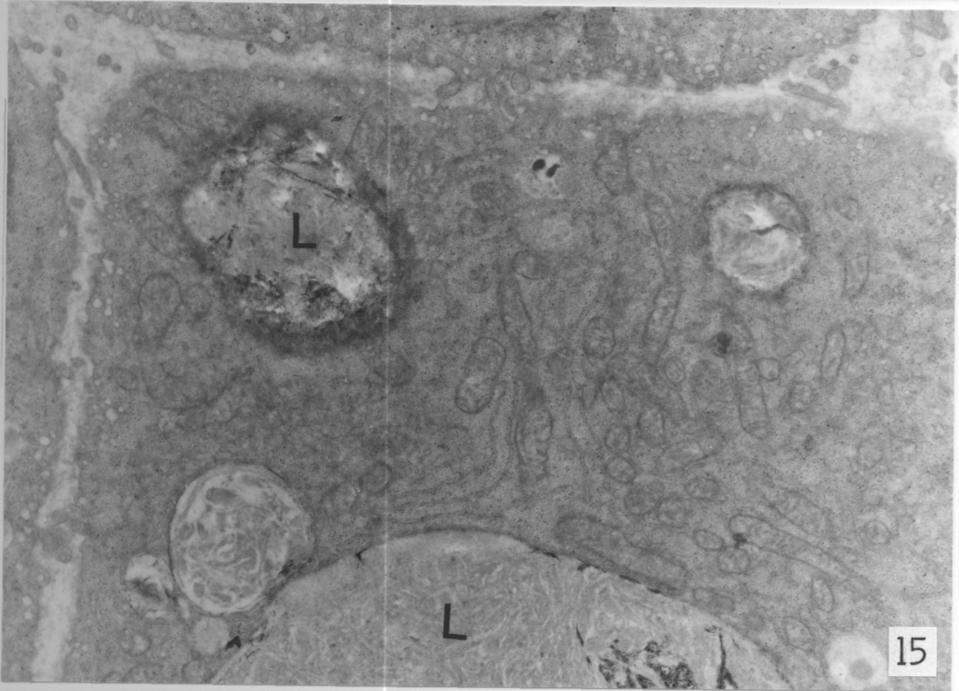
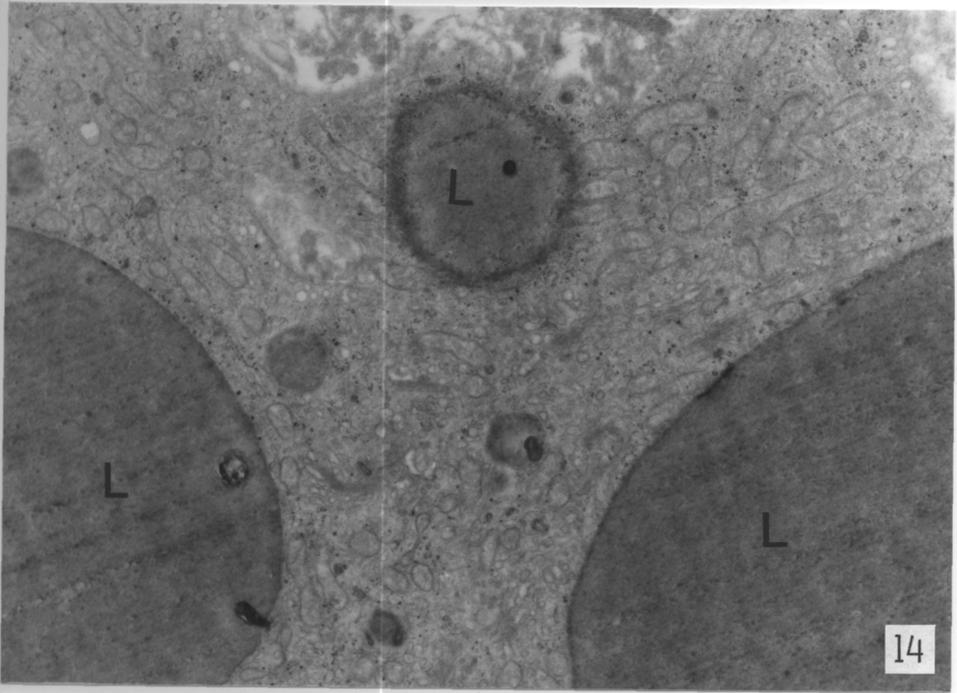


Plate V の説明

図 16 - 19 組織培養 1 週目の組織外成長
褐色脂肪細胞の位相差顕微鏡
写真

× 120

図 16 . コントロール例

図 17 . インシュリン (40 nM) 投与例

図 18 . 神経成長因子 (10 nM) 投与例

図 19 . インシュリン (40 nM) ・ 神経成
長因子 (10 nM) 同時投与例

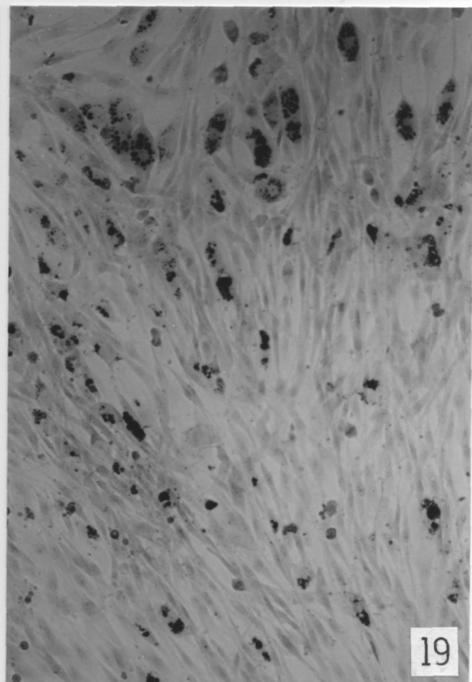
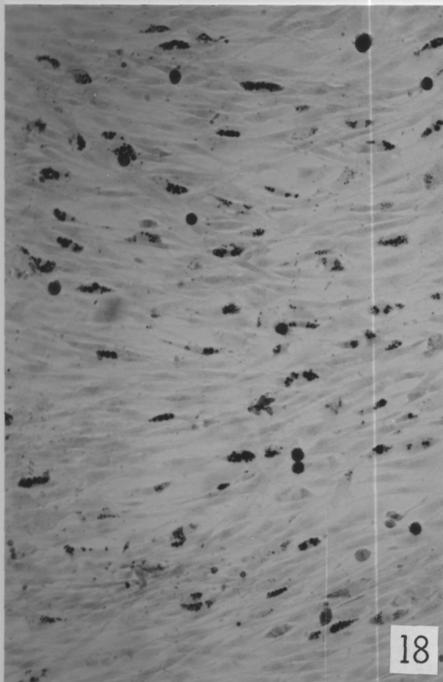
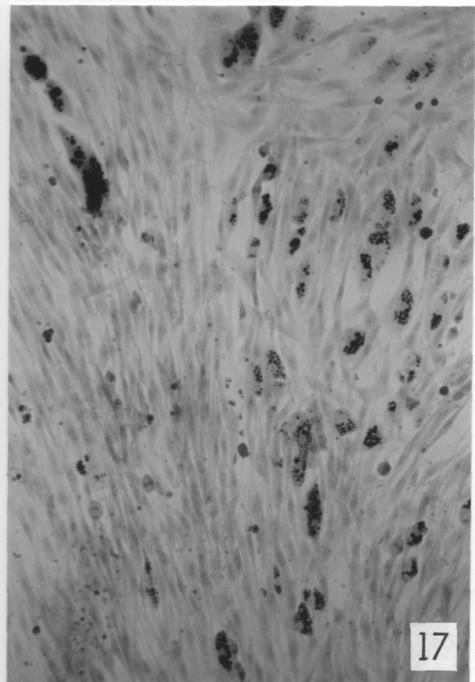
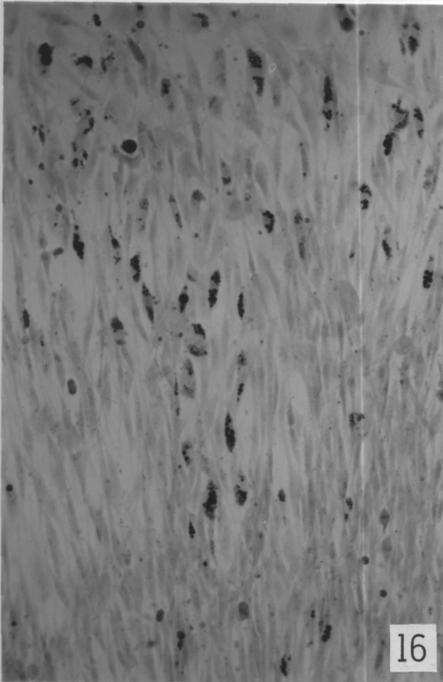


Plate VI の説明

図 20 - 23 組織培養 2 週目の組織外成長
褐色脂肪細胞の位相差顕微鏡
写真
× 120

図 20 . コントロール例

図 21 . インシュリン (40 nM) 投与例

図 22 . 神経成長因子 (10 nM) 投与例

図 23 . インシュリン (40 nM) ・ 神経成
長因子 (10 nM) 同時投与例

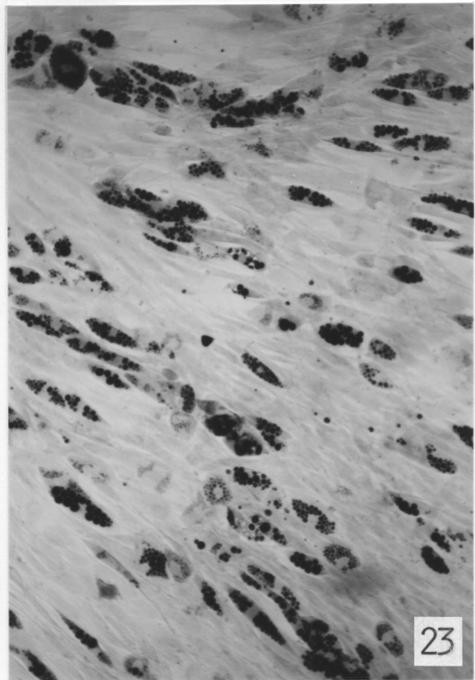
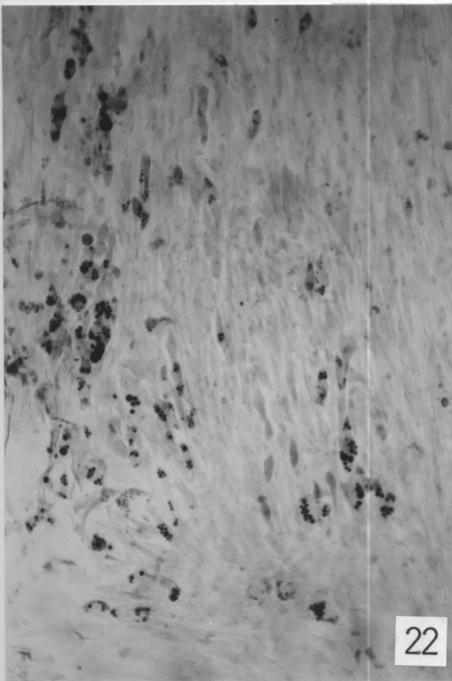
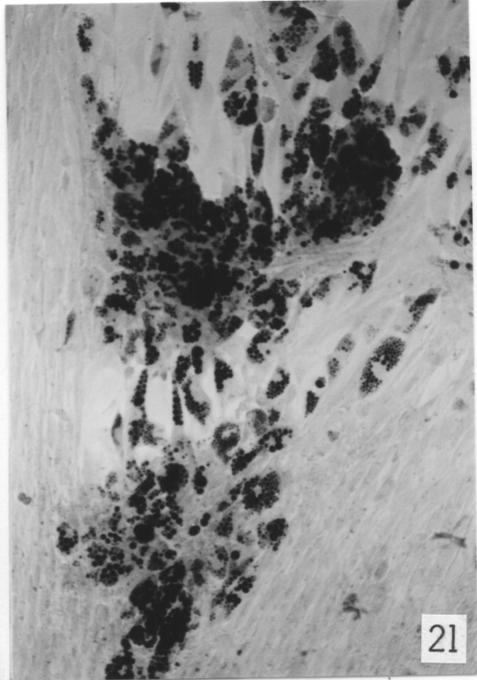
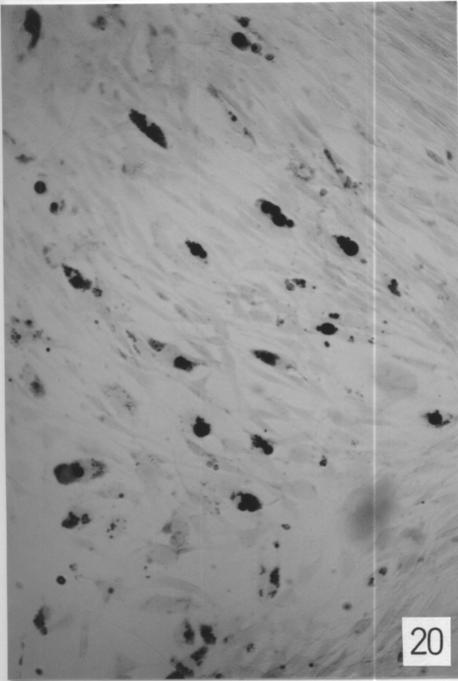


Plate VII の説明

図 24, 25 培養褐色脂肪組織ブロック内
細胞の電子顕微鏡写真
L : 脂肪
× 12,000

図 24 コントロール例

図 25 インシュリン(40 nM)投与例

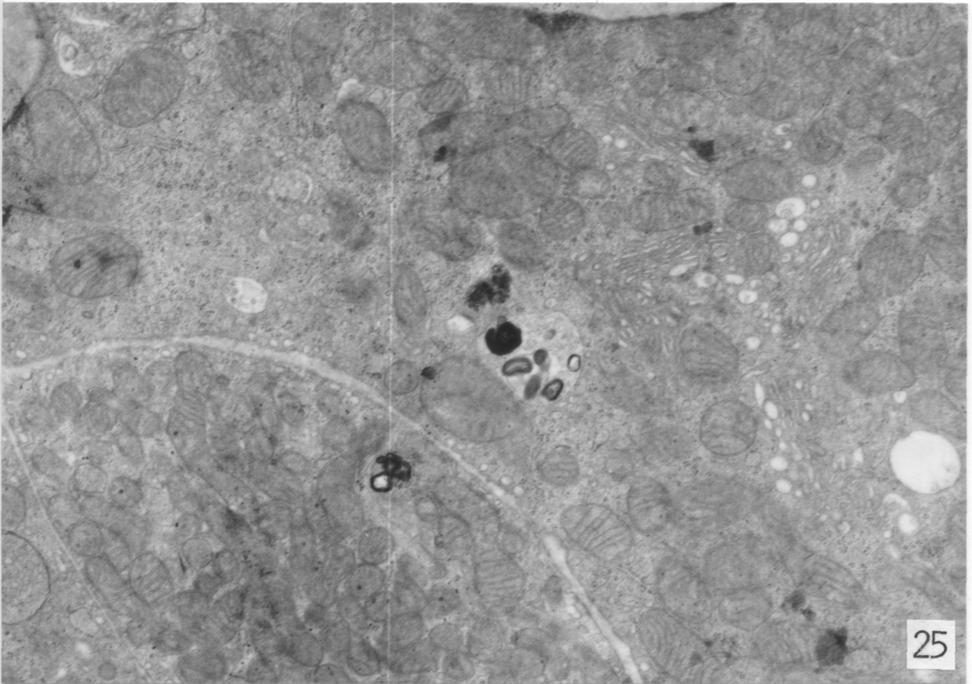
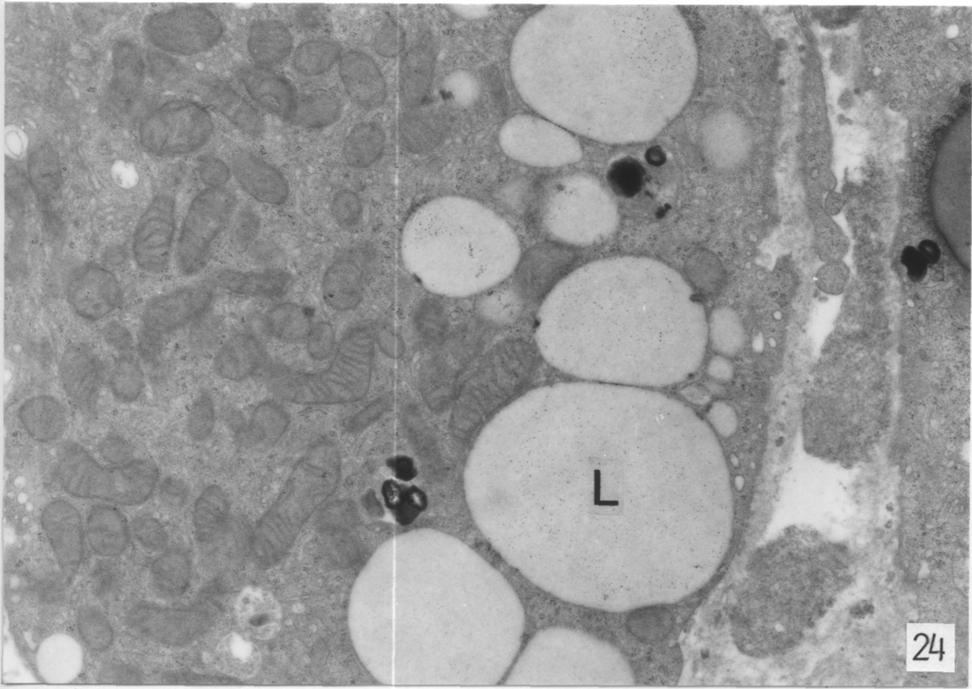


Plate VIII の説明

図 26, 27 培養褐色脂肪組織ブロック内
細胞の電子顕微鏡写真
L : 脂肪
× 12,000

図 26, 27 神経成長因子(10 nM)投与例

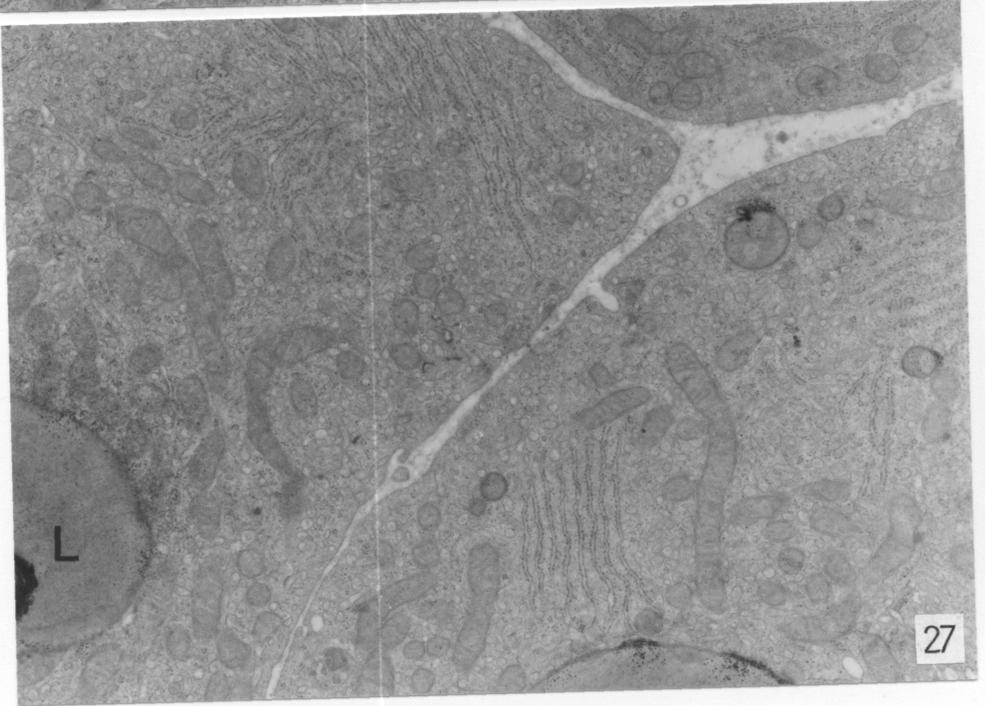
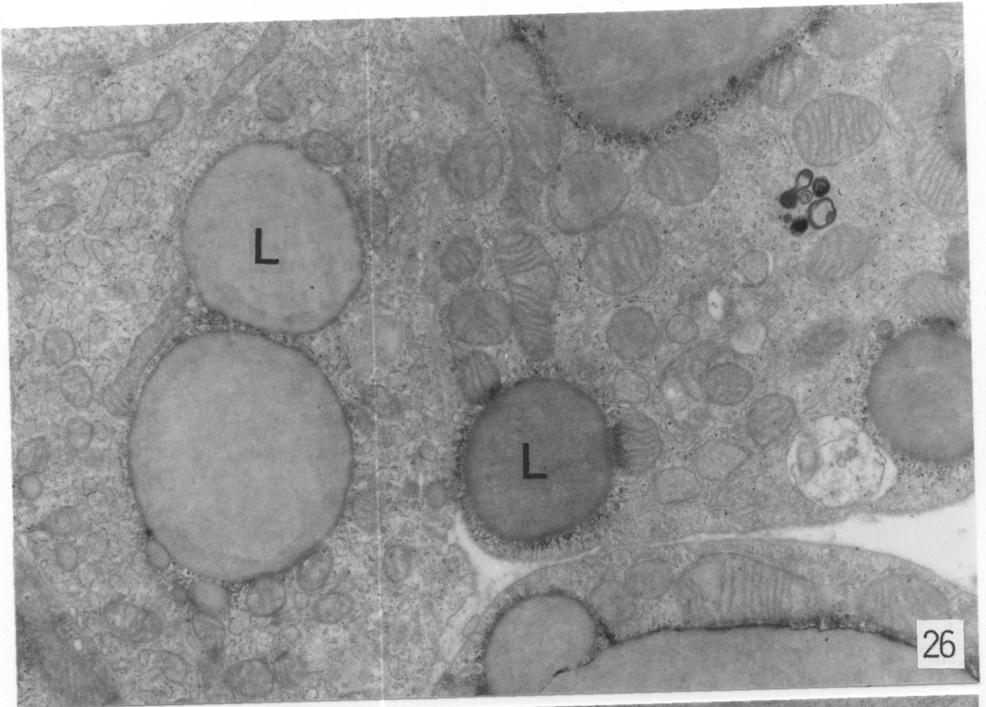


Plate IX の 説 明

図 28 , 29 培 養 褐 色 脂 肪 組 織 ブ ロ ッ ク 内
細 胞 の 電 子 顕 微 鏡 写 真

図 28 イ ン シ ュ リ ン (4 0 nM) ・ 神 經 成
長 因 子 (1 0 nM) 同 時 投 与 例
N : 核

× 1 2,0 0 0

図 29 同 上 例 で 見 ら れ た 小 胞 群

× 2 0,0 0 0

