

## 【はじめに】

本稿ではマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を用いた脂質代謝に関する食品機能性評価の手技のうち、脂肪細胞への分化誘導に焦点を絞って解説する。前駆脂肪細胞 3T3-L1 をコン플レントにまで培養し、適切な薬剤を添加して培養を続けると、細胞内に脂肪滴を蓄積した脂肪細胞に誘導することができる。この系は必ずしも生体内での脂肪細胞分化を反映していないという指摘もあるが、3T3-L1 細胞を用いて様々な食品由来の脂質代謝調節成分が見いだされており、有用な実験系である。本稿では高グルコース培地と 6 穴プレートを用いて 3T3-L1 細胞を培養する。

すでに食品機能性評価マニュアル題 I 集において「脂肪前駆細胞分化誘導試験」の手技が解説されている<sup>2)</sup>、(以下、前稿という)。前稿に記載された手技は、オイルレッド O による細胞の染色を用いた簡便な方法として手軽に実施できる反面、実験誤差が大きい、試料間の差が出にくい場合がある、などの問題点が指摘された。筆者らは不具合の原因のひとつが、分化誘導時に用いる培地中のグルコースの枯渇にあると考え、本稿では高グルコースのダルベッコ変法イーグル培地を使用する。

本稿では脂肪細胞分化誘導時に 6 穴プレートを用いる。6 穴プレートは 6 cm シャーレと比較して取り扱いやすく、多数の試料の評価に向いている。実験結果を統計計算する場合、少なくとも 3 連の実験結果が必要である。6 穴プレートを用いることによって n=3 から n=6 までの培養条件の管理が容易にできる。前稿でも指摘したように、24 穴プレートでは培養面積が小さいため、3T3-L1 細胞の分化の不均一さに由来する測定結果のばらつきが大きくなる。このため、より培養面積の大きい 6 穴プレートを用いるのがよい。培地容量は 3 ml である。

測定項目は、培地中の残存グルコース濃度、サイトカイン類の分泌、細胞内 GPDH 活性、トリグリセリド蓄積、PPAR $\gamma$ 発現の検出などを例示するが、必要に応じて選択する。可能な限りキット化された試薬類を用いることによって、評価法導入のハードルを低くした。培地中の残存グルコース濃度測定は培養を継続しながら頻回測定できる利点がある。予備的にインスリンで分化誘導させた時の残存グルコース濃度を測っておけば、作用未知の試料についても残存グルコース濃度をモニターすればおおまかな分化指標として役立つ。これに対して他の測定項目の多くは分化誘導後の細胞をプレートから回収する必要があるため、培養 1 穴に対して 1 つの測定値しか得られない。経時的に測定するためには培養穴を増やす必要がある。

なお、以下の記述には前稿と重複する部分もあることをお断りしたい。また、一般的な培養器具については特にメーカー型番を示さないで、各自で選択されたい。

## 【準備するもの】

1. 実験器具・機器等
  - ・クリーンベンチ
  - ・炭酸ガスインキュベータ
  - ・低速遠心機

- ・倒立生物顕微鏡
- ・乾熱滅菌器
- ・オートクレーブ
- ・マイクロピペット
- ・マイクロチューブ 1.5 ml
- ・クライオチューブ 2.0 ml
- ・プラスチック遠心管 15 ml, 50 ml
- ・血球計算盤（ビュルケルチュルク型，プラスチック製ディスクタイプが使いやすい）
- ・滅菌用シリンジフィルター
- ・分光光度計
- ・96穴マイクロプレートリーダー
- ・10 cm 培養ディッシュ
- ・6穴プレート
- ・メスピペット（1 ml, 10 ml）滅菌したもの
- ・パスツールピペット 滅菌したもの
- ・超低温保存庫（-80℃）
- ・電気泳動装置
- ・タンパク質電気転写装置
- ・化学発光検出装置（X線フィルムホルダ，現像室，あるいは専用のカメラ）
- ・化学発光解析プログラム

## 2. 試薬等

- ・ダルベッコ変法イーグル培地（高グルコース）H-DMEM（和光純薬）
- ・牛胎児血清 FBS, FCS
- ・抗生物質
- ・トリプシン-EDTA
- ・脂肪細胞分化誘導阻害物質：塩化バルベリン
- ・インスリン
- ・デキサメタゾン（サイクロデキストリン包接，水溶性）
- ・3-イソブチル-1-メチルキサンチン
- ・PBS（リン酸緩衝生理食塩水）
- ・Tris-HCL 緩衝液
- ・PVDF 膜
- ・ブロッキング用濾紙
- ・化学発光基質
- ・測定キット類（後述）

## 3. 調合・調整

1) 培地：DMEM はディーエムエム，ディーエムイーエムなどと読む。最後の M はメディアウム（培地）であるので，DMEM 培地，と表すのは M と培地が重複しており誤りである。

H-DMEM はプラスチックボトル入りの液体培地を購入すると便利である。必要に応じて抗生物質を添加する。FCS を 10% 容量となるようにボトルに添加した場合は，

FCS を培地と均一に混和させること。角ボトルは混和しづらいので注意を要する。分化誘導時に用いるインスリンと FCS を含む H-DMEM は必要量を少し上回る量（3 穴分であれば 10 ml, 15 ml 遠心管に入れておく）を前日までに調製しておいてもよい。

- 2) 培地調製の例：H-DMEM 450 ml, ペニシリン-ストレプトマイシン（100 倍濃縮液）4.5 ml, FCS 50 ml, インスリン（1,000 倍濃縮液）500  $\mu$ l を混和する。本稿では特にことわらない限り, 3T3-L1 細胞の培養には, 抗生物質を添加した培地を用いる。
- 3) インスリン（1,000 倍濃度）：インスリン（Sigma-Aldrich, I-1882）20 mg を超純水 20 ml に懸濁し, 6 mol/l の塩酸をマイクロピペットで少量ずつ加えて溶解する。フィルター滅菌後, クライオチューブに分注し-80°Cに保存する。
- 4) デキサメタゾン（200 倍濃度）（DX）：デキサメタゾン（水溶性, Sigma-Aldrich, D-2915）8.5 mg を超純水 25 ml に溶解し, フィルター滅菌後, クライオチューブに分注し-80°Cに保存する。
- 5) 3-イソブチル-1-メチルキサンチン（200 倍濃度）（MX）：3-イソブチル-1-メチルキサンチン（Sigma-Aldrich, II5879）555 mg を 25 ml のエタノール：超純水（1:1, v:v）溶液に溶解する。加温して 50-60°Cにすると溶解する。フィルター滅菌後, クライオチューブに分注し-80°Cに保存する。使用に際しては融解した MX 溶液を 60°C程度に加温して再溶解してよく混和すること。培地に添加して 1/200 に希釈されると沈殿することはない。

## 【プロトコール】

### 1. 3T3-L1 細胞の入手と継代培養

適当なセルバンクから 3T3-L1 細胞を入手する。国内のセルバンクを検索して申し込むと, ドライアイス詰めにして細胞のアンプルが送付されてくる。すぐに培養できない場合には-80°Cあるいは液体窒素中に保存する。

凍結細胞を融解して 3T3-L1 細胞の培養を開始する。純水を入れた小ビーカーにアンプルを入れて融解する。15 ml 遠心管に培地を 10 ml 程度加え, ここにアンプル中の細胞懸濁液を全量移して混和する。低速遠心で細胞を沈殿させたら, 上清を吸引除去し, 細胞沈殿を 10 ml の継代用培地（10%FCS を含む H-DMEM）に分散して 10 cm ディッシュに播種する。炭酸ガスインキュベータ中で培養し, 翌日細胞密度を観察する。

3T3-L1 細胞を培養し, 細胞ストックを液体窒素中に保存する必要がある。3T3-L1 細胞は低密度で継代培養しなくてはならない。培養器面積の 1/2 を超えない状態で維持することが好ましい。コンフレンスにまで増殖して継代すると分化能が低下すると言われている。また, 継代を繰り返した細胞も分化能が低下するので, 細胞を入手したら早い時期に細胞をストックしておくことが必要である。

3T3-L1 細胞は 1:8 のスプリットで継代培養を行う。細胞を観察し, 培養器面積の 1/2 に達したら継代培養を行う。ディッシュの位置によって細胞密度にムラができる場合があるので, 顕微鏡で何ヶ所か確認すること。トリプシン処理により剥離回収した細胞を 8 枚の 10 cm ディッシュに播種する。このときに+1 の継代番号をつける。1:8 のスプリットなので, +1 で細胞は 3 回分裂することになる。細胞が増殖したらディッシュ 1 枚あたり 1 アンプルに凍結し, 液体窒素容器中に保存する。+3 から+5 継代の細胞を

多数保管しておくといよい。

脂肪細胞分化に用いる 3T3-L1 は液体窒素中に保存した細胞を毎回融解して 10 cm ディッシュで培養したものを 1:8 にスプリットする。この 8 枚のディッシュから細胞を回収すれば、比較的多数の 6 穴プレートに対応できる。6 穴プレートを用いることから、n=3 あるいは n=6 で実験を組むと便利である。

## 2. 牛血清のロットチェック

3T3-L1 細胞の培養に用いる血清について 2 つの留意点がある。分化誘導時に牛胎児血清のロットによっては、インスリンを添加していないにもかかわらず脂肪細胞へ分化が大きく進む場合がある。分化誘導時にインスリン非添加と添加の培養試験を事前に行い、非添加で脂肪細胞への分化誘導が起こらないことを確認しておく。もうひとつは 3T3-L1 細胞の継代培養時には安価な新生仔牛血清を用いて培養できることである。もちろんこのとき牛胎児血清を用いて継代培養してもよい。

## 3. 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化誘導の手技

- 1) 概要：液体窒素中に保存してある 3T3-L1 細胞を融解して培養し、6 穴プレートに播種、コンフレンスに到達したら DXMX 培地で分化刺激をし、インスリンを含む培地で脂肪細胞への分化誘導を行う。他の細胞株のように、継代培養を並行しながらその一部を分化誘導に用いることはせず、毎回、決まった継代数の凍結細胞アンプルからスタートする。培地を週に数回交換しなければならない。カレンダーをよく確認して、培養計画を立てること。
- 2) 細胞の準備と 6 穴プレートへの播種：液体窒素に凍結してある細胞を融解し、培養をはじめ。融解した細胞懸濁液をパスツールピペットなどで 15 ml 遠心管に移し、10 ml 程度の培地を加えて懸濁する。低速遠心で細胞を沈殿させたら、10 ml の 10%FCS/H-DMEM に懸濁し、10 cm ディッシュに播種して培養する。ディッシュ底面積の 50%程度まで細胞が増殖したら、トリプシン処理によって細胞を回収し、全量を 10 cm ディッシュ 8 枚に播種する。コンフレンスまで培養してはならない。  
10 cm ディッシュで培養した細胞を回収し、細胞密度を  $1 \times 10^4$ /ml に調製して 6 穴プレートに 3 ml 播種する。播種する細胞密度が低いので、8 枚全部使う必要はないかもしれない。不要な細胞はこの段階で破棄する。3~4 日培養すると細胞がぎっしりプレート底面につまったコンフレンスに到達する。ここでもう 1 日そのまま培養を続け、次の分化刺激の操作を行う。
- 3) DXMX による分化刺激：DXMX 含有培地でコンフレンスに達した 3T3-L1 培地に分化刺激を与える。200 倍濃度の DX と MX 溶液を 10%FCS/H-DMEM にそれぞれ 200 分の 1 容量加えてよく混和しておく。6 穴プレートから培地を吸引除去する。この際、穴の端の壁面、穴底面から上 1 mm 程度の位置を狙って吸引ピペット（パスツールピペット）をあてるとよい。プレートを斜めにしてきれいに吸引する。次に 3 ml の DXMX 含有培地を穴壁面からゆっくり添加する。滴下してはならない。この操作は 6 穴プレート 1 枚ずつ行う。最初に培地を除去した穴の細胞が乾燥しないよう、手早く行う。48 時間培養する。
- 4) インスリン含有培地での培養：DXMX で刺激した 3T3-L1 細胞をインスリン含有培地で培養する。前項と同様に培地を吸引除去し、3 ml のインスリン含有培地を加

える。この培地には被験物質（被検物質）あるいはインスリンによる分化を抑制する対照物質として塩化ベルベリン（終濃度 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を添加する。あらかじめ 10 ml の 10%FCS/H-DMEM にインスリンと被験物質を添加したものを準備しておき、クリーンベンチ内で手早くこの培地と交換する。2~4 日ごとに培地交換を行う。しだいに細胞の形態が変化し、細胞の中に脂肪滴が多数みられるようになる。

- 5) 培養上清の回収：残存グルコース濃度を測定するための培養上清の回収は、培養穴から 100  $\mu\text{l}$  抜き取る。培地容量は少し減少するが、培養に影響はない。測定まで凍結保存する。サイトカイン類の分泌測定のためには数 ml の培養上清が必要なので、培地交換時に培養上清を回収する。
- 6) 細胞の回収と超音波処理による破碎：7~14 日程度インスリン含有培地で培養して細胞内に脂肪滴が十分蓄積したら、培地を除去し、細胞を回収・破碎して凍結保存する。この作業はクリーンベンチ外の実験台で手早く行う。回収前に 1 ml の PBS で培養穴を 1 回洗浄するだけで十分であるが、細胞が剥離する危険があるので注意深く行う。続いて 1 ml の氷冷した 1 mmol/L-EDTA2Na を含む 25 mmol/l Tris-HCL (pH 7.5) を加え、小型のセルスクレーパーで細胞を剥離する。1 ml のマイクロピペットを用いてよく懸濁し、細胞懸濁液をマイクロチューブに回収して氷冷する。3 穴ずつ行う。セルスクレーパーは同じ被験試料の 3 穴につき 1 本用いるとよい。セルスクレーパーは純水などで簡単な洗浄をしながら繰り返し使用する。

回収した細胞懸濁液は超音波処理によって破碎する。事前に超音波処理装置の出力と細胞の破碎度合いを調べておき、最小限の処理時間にとどめる。処理中発熱するので、小型ビーカーに氷を詰めたもののなかにマイクロチューブを置いて超音波発信コーン先端を浸して超音波処理を行う。 $-80^{\circ}\text{C}$  に凍結保存する。複数の分析項目がある場合には 1 穴あたりの試料を 4 分割するなどする。試料の凍結融解の反復は極力避ける。

- 7) ウェスタンブロッティング用試料：細胞回収の際、培地を除去した培養穴に SDS-PAGE 用試料調製液 500  $\mu\text{l}$  を加え、セルスクレーパーで剥離した後、超音波破碎して試料溶液とする。 $-80^{\circ}\text{C}$  に凍結保存する。ミニゲルのレーンあたり 5  $\mu\text{l}$  から 10  $\mu\text{l}$  用いる。
- 8) 観察用細胞のホルマリン固定：細胞に脂肪滴が蓄積する様子は、経時的に顕微鏡写真を撮影して保存する。顕微鏡メーカーの純正のカメラのほか、アイピースに取りつける安価で簡便なカメラもある。デジタルカメラを接眼レンズに接近させても撮影できる場合があるので、試されたい。同時に血球計算盤を撮影しておくともスケール表示時に役立つ。培地を吸引除去して、中性緩衝ホルマリン液で固定して標本として保存してもよい。

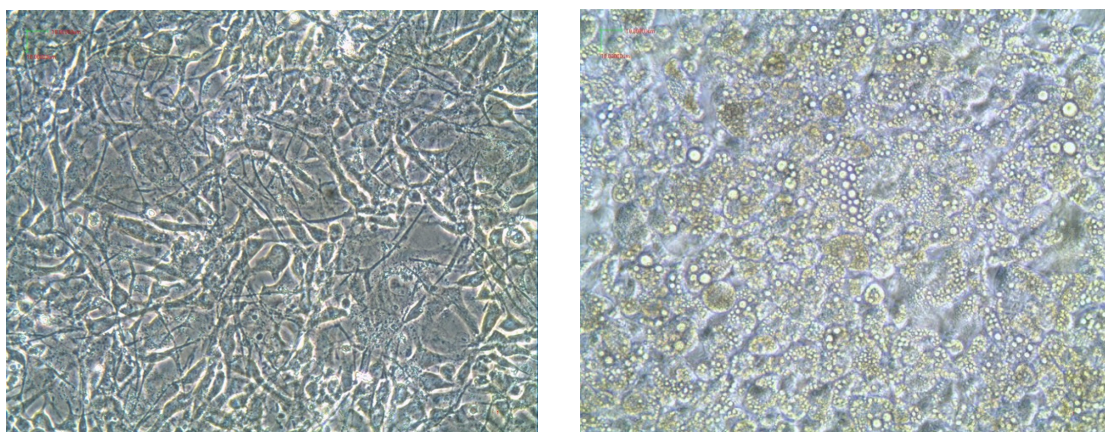


図 1. 細胞の位相差顕微鏡観察

分化していない細胞（左）と脂肪細胞へ分化して脂肪滴を細胞内に蓄積した細胞（右）

#### 4. いつ何を測定するか

測定項目にあわせて、3T3-L1 細胞の分化誘導の日数を事前に検討しておく必要がある。まず 3T3-L1 細胞に DXMX 存在下で脂肪細胞への分化刺激を与える。インスリンによって中性脂肪の合成を誘導する。培養を継続すると脂肪滴の増加が観察されるが、何日目まで培養するのがよいか、予備的に検討する必要がある。10 日目を過ぎると脂肪滴の蓄積によって、細胞の密度が培地より小さくなって培養面から盛り上がってくる。慎重に培地交換をしても細胞がはがれることがある。トリグリセリド測定値で差を出そうとすると、可能な限り長い培養を行いたい、回収に失敗する恐れがある。この点、GPDH 活性を指標にするのであれば、細胞がはがれる恐れのない時期に細胞を回収できる。測定項目にあわせて培養計画を立てられたい。

#### 5. 測定項目例と測定キット

下記の測定項目について、本稿では詳しい説明は行わないので、紹介してある測定キットを参照されたい。吸光度測定では、標準セル、マイクロセル、96 穴平底マイクロプレートを使い分けることで、試薬を節約できる。

- 1) 写真撮影：オイルレッド染色をせず、経時的に写真撮影を行う。前稿ではオイルレッドによる中性脂肪の染色像を観察したが、脂肪細胞に分化した 3T3-L1 細胞は形態が変わり、細胞内に脂肪滴が明瞭に観察されるようになるので、オイルレッド染色を行う必要はない。経時的に撮影しておけば、脂肪細胞への分化の過程を画像として保存できる。
- 2) 培地中の残存グルコース濃度測定：グルコース CII テストワコー（和光純薬），試料＝培養上清
- 3) 細胞のグルコース取り込み測定：2-デオキシグルコース (2DG) 代謝速度測定キット（コスモ・バイオ），試料＝細胞
- 4) GPDH 測定：GPDH 活性測定キット（コスモ・バイオ），グリセロール-3-リン酸脱水素酵素（GPDH）活性測定キット（タカラバイオ），試料＝細胞破砕液
- 5) トリグリセリド蓄積測定：ラボアッセイトリグリセライド（和光純薬），試料＝細胞破砕液

- 6) アディポサイトカイン分泌測定: マウスアディポカインアレイキット (R&D Systems, 和光純薬等取扱), 試料=培養上清
- 7) PPAR $\gamma$ 発現: 抗 PPAR $\gamma$ ウサギモノクローナル抗体 (CST ジャパン) などを用いて検出, HRPO 標識抗体を二次抗体として用い, 化学発光法で検出, 試料=細胞破碎液
- 8) 脂質代謝・糖質代謝関連遺伝子発現解析: マウス版メタボリックチップ“ジェノパール” MTBM-JX (三菱レイヨン), 試料=細胞

## 6. 測定値の補正

分化誘導しても細胞は増殖しないので, 6 穴プレートの 1 穴あたりの測定値を直接比較すれば十分ではあるが, 細胞の回収が完全でないこともある (洗浄時にはがれてしまうなどのため)。このような場合には試料中のタンパク質濃度を測定し, タンパク質あたりの GPDH 活性, タンパク質あたりのトリグリセリド量, などに換算するとよい。

## 7. 培養スケジュールの例

表 1. 3T3-L1細胞の培養スケジュール

day	-7			-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
処理ステージ	培養			刺激		分化誘導											
分化なし	Basal			Basal		Basal		Basal		Basal		Basal		Basal		Basal	
i なし	Basal			DXMX		Basal		Basal		Basal		Basal		Basal		Basal	
分化コントロール	Basal			DXMX		I		i		i		i		i		i	
試料1	Basal			DXMX		i + s1		i + s1		i + s1		i + s1		i + s1		i + s1	
試料2	Basal			DXMX		i + s2		i + s2		i + s2		i + s2		i + s2		i + s2	
試料3	Basal			DXMX		i + s3		i + s3		i + s3		i + s3		i + s3		i + s3	

Basal: FCS-H-DMEM, DXMX: DXMX を含む FCS-H-DMEM, i: インスリンを含む FCS-H-DMEM, i+s: インスリンおよび試料を含む FCS-H-DMEM (day0, 3, 7, 10 に交換, Day 12 に細胞回収の例)

### 【おわりに】

本稿ではマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 の分化誘導のための培養法について解説した。分化誘導して 7~14 日の間で細胞を回収して測定に用いるが, 培地や血清, 細胞のコンディションによって分化の度合いが変化することがあるので, 別の培養実験間の測定結果を比較することは困難である。予備実験で分化の様子をよく観察し, 細胞が浮遊してはがれる前に回収することが求められる。まずインスリンのみでの培養, つぎに n=1 で試料とともに培養して一連の測定を試してから本実験を行うとよい。

2016 年に MX 処理を長くすることによって分化誘導を向上させるという報告がされた。本稿では DXMX 刺激条件を 48 時間としているが, 脂肪細胞へ分化誘導したあとの代謝を研究する場合には, 参考になるかもしれない<sup>5)</sup>。

## 【参考文献】

- 1) Mackall JC, Student AK, Polakis SE, Lane MD. Induction of lipogenesis during differentiation in a "preadipocyte" cell line. *J Biol Chem.* 1976, 251(20): 6462-6464.
- 2) 三上一保, 新本洋士, 脂肪前駆細胞分化誘導試験－前駆脂肪細胞株(3T3-L1)を用いた脂質代謝改善機能評価法－, 食品機能性評価マニュアル集第I集, 2007, pp115-122. 社団法人日本食品科学工学会
- 3) 新本洋士, 岩下恵子, 小堀真珠子, 木村俊之, 山岸賢治, 鈴木雅博, マウス 3T3-L1 細胞に対するキハダ抽出物のトリグリセリド蓄積抑制作用, 日本食品科学工学会誌, 2005, 52 (11): 535-537.
- 4) 新本洋士, 山口貴士, 伊藤愛美, 星崎玲奈, 長縄康範, マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 の高グルコース培地中での分化誘導とベルベリンの分化抑制作用, 日本食品科学工学会誌, 2016, 63(10): 474-477.
- 5) Hua Y, Ke S, Wang Y, Irwin DM, Zhang S, Wang Z. Prolonged treatment with 3-isobutyl-1-methylxanthine improves the efficiency of differentiating 3T3-L1 cells into adipocytes. *Anal Biochem.* 2016, 507: 18-20.