

脂肪組織を基盤とした人体の不思議： 脂肪組織の基礎と培養システム

¹⁾ 国際医療福祉大学・福岡保健医療学部・医学検査学科

²⁾ 高木病院・病理部

³⁾ 佐賀大学・医学部・病因病態科学講座

戸田修二^{1),2)}、池田美穂²⁾、西田陽子²⁾、山口沙由莉²⁾、青木茂久³⁾、高瀬ゆかり²⁾

近年、脂肪組織を基盤とする肥満に伴う健康障害が先進国では深刻な社会問題となっている。脂肪細胞、前脂肪細胞、間葉系幹細胞からなる脂肪組織はエネルギー貯蔵、代謝、アディポカイン産生内分泌、間葉系幹細胞供給臓器であり、生体恒常性に必須の臓器である。本稿では、脂肪組織を基盤とする人体の不思議を理解するために、脂肪組織の基礎と脂肪組織の生体恒常性及び肥満の病態（メタボリックシンドローム）を研究するための培養システムについて紹介する。

はじめに

約700万年前に地球上に誕生した人類の歴史は、飢餓との戦いの歴史とも言える。その長い歴史の中で、効率よくエネルギーを貯蔵する臓器として、脂肪組織が発達したと推測される。しかし、近年、経済的に豊かな国々では過食による脂肪組織量の増加を基盤とした肥満やメタボリックシンドローム（肥満症）が社会問題化しており、いわゆる生活習慣病である糖尿病、高血圧、動脈硬化、癌、老化などの発症、病態に深く関わっていることが解明されつつある⁽¹⁾。

脂肪組織は全身に分布する間葉系組織であり、白色脂肪組織（white adipose tissue: WAT）と褐色脂肪組織（brown adipose tissue: BAT）よりなる。脂肪組織はエネルギー貯蔵・代謝の中心臓器であり、アディポカインを産生する内分泌臓器である。さらに、成熟脂肪細胞、前脂肪細胞、血管内皮細胞を有する脂肪組織は、間葉系幹細胞の供給臓器であり、再生医

療の分野でも注目されている⁽²⁻³⁾。

我々は、成熟脂肪細胞の天井培養法（杉原甫が開発）を確立し⁽⁴⁾、成熟脂肪細胞の増殖・分化や成熟脂肪細胞と他種細胞との細胞間相互作用を報告してきた⁽⁵⁻⁹⁾。さらに、脂肪組織が多種細胞を有する複合組織であることを考慮して、脂肪組織の器管培養法を確立し、脂肪組織の臓器特異的特性と他種細胞間相互作用の解析システムを樹立した⁽¹⁰⁻¹²⁾。

本稿では、脂肪組織の基礎を概説する。さらに、脂肪組織の生体恒常性や肥満、メタボリックシンドロームにおける役割とその制御機構を解析するための培養系を紹介する。

脂肪細胞の種類と脂肪組織の分類

脂肪細胞は、間葉系幹細胞より種々の分化因子により白色脂肪細胞（以下、脂肪細胞）と褐色脂肪細胞に分化する。最近、脂肪細胞と褐色脂肪細胞の中間段階のベージュ細胞が発見された⁽¹³⁾。生体では、脂肪細胞は内臓、皮下、各種臓器周囲に存在し、全身に広範囲に分布する。一方、褐色脂肪細胞は、副腎、脊柱周囲、鎖骨上窩、腋窩や肩甲骨間部に局在する。生理的には、脂肪細胞はエネルギー貯蔵・代謝細胞であり、褐色脂肪細胞は熱産生・エネルギー消費細胞である。すなわち、脂肪細胞は肥満の基盤細胞であり、褐色脂肪細胞は抗肥満細胞である（図1, 2）。一般に、脂肪組織は皮下、内臓、骨髄脂肪組織に分類される。我々は従来の脂肪組織の分類に加えて、心外膜下、乳腺、膝周囲、腎周囲、前立腺周囲などに存在する臓器特異的脂肪組織の概念を提

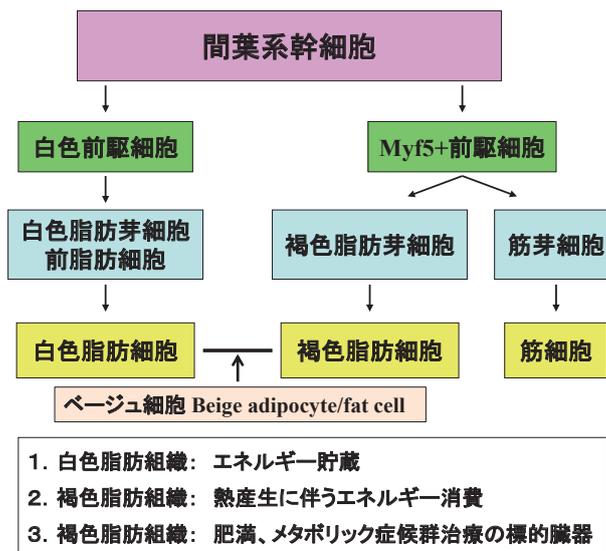


図1 白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞の分化系列。両者は間葉系幹細胞から分化する。褐色脂肪細胞は、転写因子Myf5 (myogenic factor 5) の発現により筋前駆細胞より、褐色脂肪芽細胞をへて終末分化する。一方、白色脂肪細胞はMyf5発現のない白色前駆脂肪細胞→白色脂肪芽細胞（前脂肪細胞）をへて終末分化する。ベージュ脂肪細胞（以下、ベージュ細胞）は、Myf5陰性の白色前駆細胞に由来する。生体では鼠径部などの白色脂肪組織中に寒冷環境などの刺激で誘導され、褐色脂肪細胞と同様にUCP-1 (uncoupling protein 1) を発現し、熱産生、エネルギー消費を行う。ベージュ細胞は、多房性脂肪滴、豊富なミトコンドリアを持ち、形態的にも褐色脂肪細胞に類似している。白色脂肪細胞はエネルギー貯蔵により肥満、メタボリックシンドロームの責任細胞であるが、熱産生に伴うエネルギー消費細胞である褐色脂肪細胞、ベージュ細胞は、肥満、メタボリックシンドローム治療の標的細胞である。

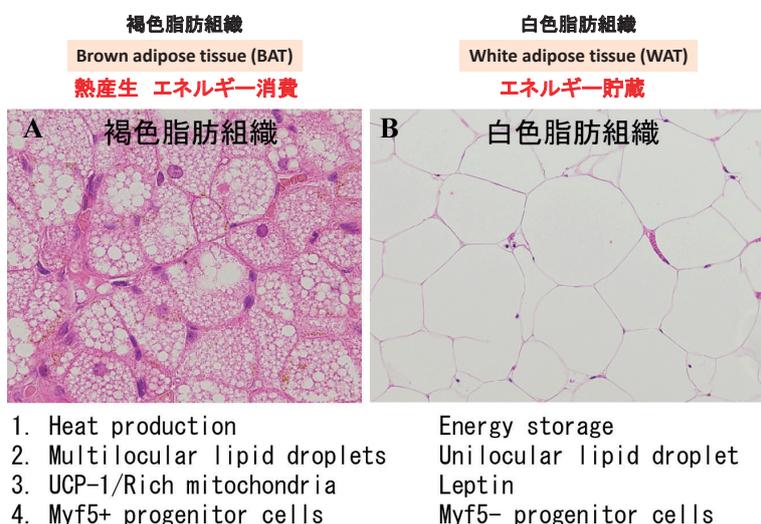


図2 脂肪組織の分類と組織形態（ヘマトキシリン・エオジン染色、H&E染色）。脂肪組織は長らく白色脂肪組織（WAT, white adipose tissue）と褐色脂肪組織（BAT, brown adipose tissue）に分類されてきたが、最近ベージュ細胞の発見により、ベージュ脂肪組織が認知された。褐色脂肪細胞は多房性脂肪滴と豊富なミトコンドリアを有し、好酸性の細胞質と多数の小型脂肪滴を持つ（A）。ミトコンドリアに局在するUCP-1により、熱産生を行うエネルギー消費細胞である。白色脂肪細胞は、脂質を貯蔵する大型の単房性脂肪滴を有し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本では、細胞質は大型の空胞状に見える（B）。主に中性脂肪を有するエネルギー貯蔵細胞であり、レプチンなどのアディポカインを産生する内分泌細胞でもある。ベージュ脂肪（beige adipocyte/fat cell）は、褐色脂肪細胞に形態的、機能的に類似しており、寒冷刺激などにより誘導される。

唱しており、将来的には全身脂肪組織を臓器特異的脂肪組織という概念で包括できると考えている (図3, 4)。一般に、メタボリックシ

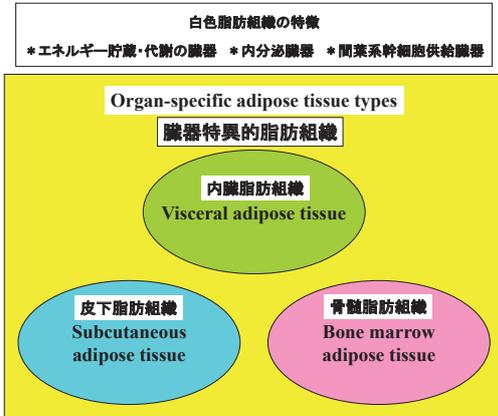


図3 全身脂肪組織の局在分類。一般に脂肪組織は内臓脂肪、皮下脂肪、骨髄脂肪組織に分類されるが、個々の臓器に分布する臓器特異的脂肪組織という概念に包括される。

ヒト心臓 心外膜下脂肪組織を有する



図4 ヒト心外膜下脂肪組織。心外膜下には脂肪組織が存在し、何らかの意義があると考えられているが、その詳細は不明である。この心外膜下脂肪組織は、典型的な臓器特異的脂肪組織に分類される。

ンドロームの標的組織は内臓脂肪組織 (腸間膜、大網) であるが⁽¹⁴⁾、皮下、骨髄、臓器特異的脂肪組織がその病態に関与するか否かの詳細は不明であり、今後の重要な研究課題である。さらに、臓器特異的脂肪組織の機能特性、間葉系幹細胞動態 (図5) や脂肪組織と臓器間相互作用を解明することにより、生体恒常性、組織再生、肥満、メタボリックシンドローム、

痩せ、癌、老化などの発症・病態における脂肪組織の役割とその制御機構が明らかになるものと思われる⁽¹⁵⁾。

脂肪組織由来間葉系幹細胞の分化

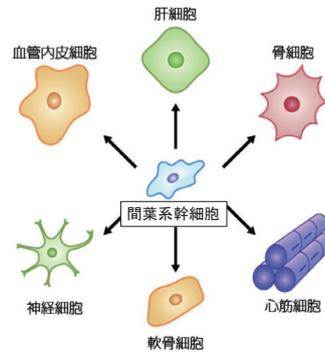


図5 脂肪組織由来間葉系幹細胞の分化。脂肪組織に局在する間葉系幹細胞は、種々の分化誘導因子により、心筋、血管内皮、神経、骨、軟骨、肝細胞などに分化する。これらの分化能を利用して、再生医療への応用が注目されている。

内臓脂肪組織と皮下脂肪組織の形態と特性

脂肪組織は大部分は成熟脂肪細胞と豊富な毛細血管網からなり、前脂肪細胞や間葉系幹細胞/多能性幹細胞は同定しがたい (図6)。これらの形態は、内臓脂肪組織と皮下脂肪組織では同様であり、形態的には区別することは

白色脂肪組織の構成細胞

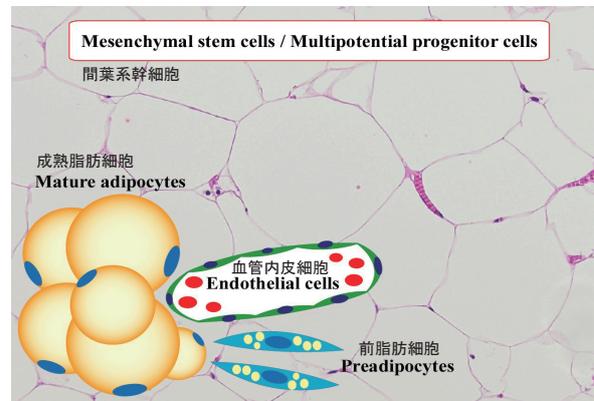


図6 脂肪組織の構成。脂肪組織は成熟脂肪細胞、血管網、前脂肪細胞、マクロファージやマスト細胞などの炎症細胞、間葉系幹細胞/多能性幹細胞などからなるが、幹細胞などは通常のH&E染色では同定し難い。

困難である。但し、脂肪細胞の個々のサイズは、皮下脂肪組織より内臓脂肪組織が大きい⁽¹⁶⁾。

近年、内臓脂肪組織と皮下脂肪組織の生理的な違いが、徐々に解明されてきている⁽¹⁶⁻¹⁸⁾。内臓脂肪組織はアディポネクチン産生能が高く、レプチン産生能が低い。皮下脂肪組織はその正反対である。また、両者は細胞外マトリックスの発現や浸潤リンパ球の種類などが異なる。さらに、肥満に伴って内臓脂肪組織は皮下脂肪組織に比較して、種々のサイトカインに対する反応性感受性が高く、慢性炎症を誘導し易く、メタボリックシンドローム発症・進展の中心臓器となる(図7, 8)。

メタボリックシンドロームにおける脂肪組織の形態

近年、メタボリックシンドローム (metabolic syndrome) における肥満脂肪組織には慢性炎症が持続していることが解明された⁽¹⁶⁾。真鍋らの脂肪組織イメージング法⁽¹⁹⁾により、肥満脂肪組織の形態と炎症の立役者が明らかにされた(図7, 8)。すなわち、急速な肥満脂肪組織では、小型脂肪細胞の再生とその近傍の血管新生が共存し (adipo-/angiogenic cell clusters)、脂肪細胞数が増加する (脂肪組織過形成 adipose tissue hyperplasia)。その後、adipo-/angiogenic cell clustersの数が減少し、脂肪細胞の肥大が誘導され、脂肪組織量が増大する (脂

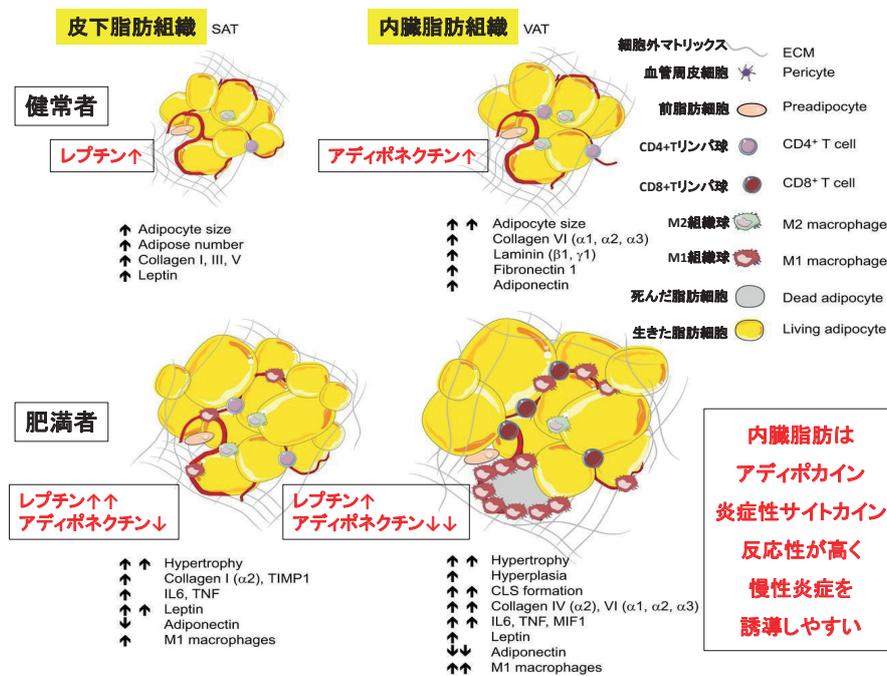


図7 健康者間、肥満者間及び両者間の皮下脂肪組織 (SAT, subcutaneous adipose tissue) と内臓脂肪組織 (VAT, visceral adipose tissue) の相違。健康者では、脂肪細胞のサイズはVATがSATより大きく、脂肪細胞の数は少ない。VATはアディポネクチンの産生、細胞外マトリックスであるラミニン、ファイブロネクチン、VI型コラーゲンの発現が高い。SATではレプチンの産生、I, III, V型コラーゲンの発現が高い。肥満者では、VATはサイズ及び数が増加する (hypertrophy & hyperplasia) のに対して、SATではサイズが主に大きくなる (hypertrophy)。VATではレプチン産生の増加、アディポネクチン産生の著明な減少が起こるが、SATではレプチン産生の著明な増加、アディポネクチン産生の減少が見られる。また、VATでは、炎症を誘導するクラウン様構造 (CLS, crown-like structure: 壊死脂肪細胞周囲にマクロファージが浸潤する構造)、IL6 (interleukin 6), TNF (tumor necrosis factor), MIF1 (macrophage inflammation factor-1) などの炎症性サイトカイン、炎症促進性M1マクロファージ、IV, VI型コラーゲンが著明に増加する。SATでは、IL6, TNF, M1マクロファージ、I型コラーゲン、TIMP-1 (metalloproteinase inhibitor-1) が増加する。慢性炎症は、SATと比較してVATにおいてアディポカイン、炎症性サイトカイン、M1マクロファージの複合的な仲介により誘導されやすいので、VATは肥満、メタボリックシンドローム発症、病態の中心組織となる。図は、Schoettl T, Fischer IP, Ussar S. J Exp Biol. 221(Pt Suppl 1):jeb162958。より引用、改訂された。

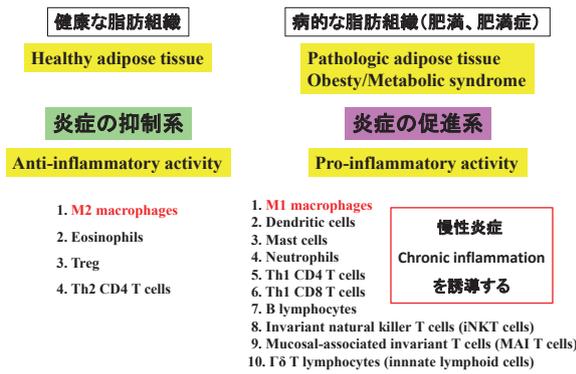


図8 健常者と肥満者の脂肪組織内浸潤細胞の相違。健常者の脂肪組織では、炎症抑制性M2マクロファージ、好酸球 (eosinophils)、調節性Tリンパ球 (Treg)、ヘルパー 2 CD4陽性Tリンパ球 (Th2 CD4+ T cells) が主体である。一方、肥満者の脂肪組織では、炎症促進性M1マクロファージ、マスト細胞 (mast cells)、樹状細胞 (dendritic cells)、好中球 (neutrophils)、ヘルパー 1CD4陽性Tリンパ球 (Th1 CD4 + T cells)、ヘルパー 1CD8陽性Tリンパ球 (Th1 CD8 + T cells) などのTリンパ球 (T lymphocytes)、Bリンパ球 (B lymphocytes) が増加し、慢性炎症 (chronic inflammation) が誘導される。

肪組織肥大(adipose tissue hypertrophy)。さらに肥満が進行すると炎症促進性M1マクロファージ (inflammation-promoting M1 macrophages) が脂肪細胞の周囲に王冠状 (crown-like structures) に浸潤し、脂肪組織に慢性炎症 (chronic inflammation) が誘導され、脂肪細胞機能障害 (脂肪組織不全adipose tissue failure/dysfunction) により、メタボリックシンドロームが発症する (図9)。我々は、この脂肪組織の慢性炎症にマクロファージに加えて、マスト細胞 (mast cells) が重要と考えている。

以上の脂肪組織の慢性炎症の立役者は、M1マクロファージ (活性型) であるが、CD8陽性T細胞がM1マクロファージを脂肪組織へリクルートする。一方、防御因子として、炎症抑制性M2マクロファージ (inflammation-suppressing M2 macrophages)、CD4陽性Th2細胞は脂肪組織の慢性炎症を抑制する⁽²⁰⁾。これらの慢性炎症で重要なサイトカイン (cytokines) は、IL-6、TNF- α である⁽²⁰⁾。メタボリックシンドロームにおける脂肪組織の慢性炎症が、生活

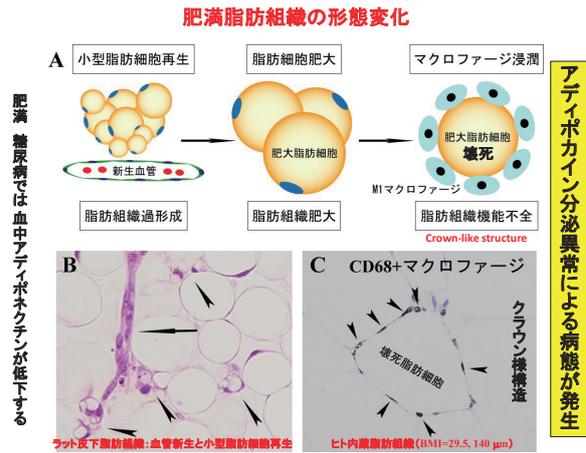


図9 肥満脂肪組織の形態変化。急速な肥満では小型脂肪細胞再生とその近傍での血管新生が共存して見られ、脂肪細胞数が増加する (脂肪組織過形成、A、B)。その後、脂肪細胞の肥大が誘導され、脂肪組織量が増大する (脂肪組織肥大、A)。さらに、肥満が進行するとM1マクロファージが脂肪細胞の周囲に浸潤 (クラウン様構造、C) し、慢性炎症が誘導され、脂肪組織機能障害 (脂肪組織機能不全、A) に陥る。B、小型脂肪細胞再生 (◀)、新生血管 (←)。B、H&E染色。C。マクロファージマーカー CD68の免疫染色。

習慣病である糖尿病、脂質異常症 (高脂血症)、動脈硬化、癌、老化の中心病態となる。

脂肪細胞・脂肪組織の培養システム

長らく、脂肪細胞のin vitro実験では前脂肪細胞株 (3T3-L1, 3T3-F442, Ob17) や単離前脂肪細胞の単層培養並びに単離成熟脂肪細胞の浮遊培養系が利用されてきた (図10)。しかし、これらの培養システムでは、成熟脂肪細胞の増殖・分化・機能を十分には解析することは不可能であった。1986年、杉原 甫 (佐賀大学名誉教授) が成熟脂肪細胞の培養法 (天井培養法) を世界に先駆けて確立したことにより、初めて成熟脂肪細胞のin vitro実験が可能となり、脂肪細胞が分子細胞生物学の檜舞台に登場することになった^(4,7)。ここでは、単離成熟脂肪細胞の天井培養法 (ceiling culture system of mature adipocytes) と脂肪組織の器官培養法 (organotypic culture system of adipose tissues) を紹介する。さらに、脂肪組織・他種細胞間

培養白色脂肪細胞と培養システムの種類

- 1. White adipose cell types**

 - 1) Preadipocyte cell lines: 3T3-L1, 3T3-F442 and Ob17
 - 2) Preadipocytes (S-100 protein+/CD44-/CD105-): adipose tissue-isolated vascular stromal fraction cells
 - 3) Mature adipocytes (unilocular fat cells)

2. Culture systems

 - 1) Monolayer culture for preadipocytes
 - 2) Floating culture for mature adipocytes
 - 3) Ceiling culture in a monolayer for mature adipocytes/tissue fragments
 - 4) Three-dimensional collagen gel culture for mature adipocytes/preadipocytes

図10 培養で利用される白色脂肪細胞、細胞株と培養システムの種類。脂肪細胞の細胞株 (cell lines) として前脂肪細胞 (preadipocytes) 由来の3T3-L1, 3T3-F422, Ob17が利用されてきた。また、消化酵素 (コラゲナーゼ) 処理により生体の脂肪組織から分離した血管・間質分画 (vascular-stromal fraction) から単離した前脂肪細胞 (S-100 protein+/CD44-/CD105-) も使われてきた。これらの脂肪は、単層培養 (monolayer culture) として培養される。成熟脂肪細胞 (mature adipocytes/unilocular fat cells) は浮遊培養 (floating culture) 系で培養されてきたが、長期の培養は困難である。杉原 甫が初めて報告した天井培養 (ceiling culture) や3次元コラーゲンゲル培養 (three-dimensional collagen gel culture) で、成熟脂肪細胞の長期培養が可能となり、成熟脂肪細胞の増殖・分化・機能解析が容易になった。

成熟脂肪細胞の天井培養法 (Ceiling culture method of mature adipocytes)

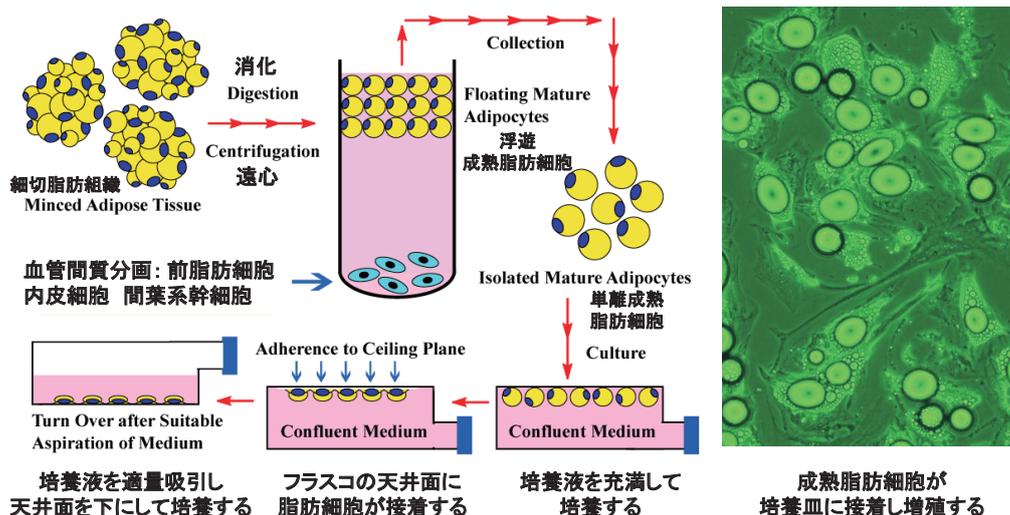


図11 成熟脂肪細胞の天井培養。細胞組織を細切し、コラゲナーゼ消化する。消化後、試験管に移し、遠心する。遠心後、比重の軽い成熟脂肪細胞が液面に局在し、血管・間質分画 (前脂肪細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞などを含む) は試験管の底に沈殿する。ピペットで液面の成熟脂肪細胞を採取し、培養用フラスコに移し、培養液をフラスコに充満させる。図のように、培養装置内にフラスコを入れ、約1週間程度静置する。成熟脂肪細胞がフラスコ面に接着したら、図のように、フラスコから培養液を適度に除き、フラスコの接着面を下にして、培養する。図右は、培養成熟脂肪細胞の位相差顕微鏡像である。

相互作用解析培養システム (adipose tissue-other cell type interaction-analyzing system) を紹介する。

ことも解明され、生体恒常性やメタボリックシンドロームの病態に密接に関与することが明らかとなった。

1. 成熟脂肪細胞の天井培養

成熟脂肪細胞は大型の単房性脂肪滴を細胞質に含有するので、比重が1未満であり通常の培養液中では浮遊性であり、培養皿に接着できない。それ故に、浮遊培養状態となり、成熟脂肪細胞は24-48時間程度しか生存できず、増殖・分化・機能解析が十分にできなかった。杉原は成熟脂肪細胞の浮遊性に着目して、画期的な天井培養法⁽⁴⁾を開発した(図11)。この培養系では、成熟脂肪細胞の長期培養が可能となり、成熟脂肪細胞のin vitro解析が容易となった。長らく成熟脂肪細胞は終末分化した増殖しない細胞と考えられていたが、天井培養法により増殖能を有する細胞であることが明らかになった。さらに、脂肪合成、脂肪分解がインスリン、アセチルコリンなどの生理活性物質に反応して、活発に誘導されることが判明し、まさに脂質代謝の中心細胞であることが証明された。また、レプチン、アディポネクチンなどのアディポカインを産生する

2. 脂肪組織の器官培養

脂肪組織は成熟脂肪細胞、前脂肪細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞などからなる複合組織である。それ故に、脂肪組織の再生、機能特性を解析するためには脂肪組織の器官培養が重要と考えられる。脂肪滴を有する脂肪組織は培養液中に浮遊するために通常の培養法では、長期培養が困難である。我々は、細切した脂肪組織片をI型コラーゲン・ゲルに包埋して培養する方法(詳細は文献10-12を参照)を樹立した(図12)。本培養系では、成熟脂肪細胞を4週間以上保持することが可能であり、増殖活性、中性脂肪や遊離脂肪酸などの脂質、レプチン、アディポネクチンなどのアディポカイン産生が見られ、しかもインスリン反応性が保持される。さらに、脂肪組織片から前脂肪細胞やCD44/CD105陽性間葉系幹細胞の活発な再生現象が見られる(図13-16)。我々は、脂肪組織再生機構仮説として、1) 細胞密度仮説 (Cell density theory)、2) ニッチ仮説 (Niche

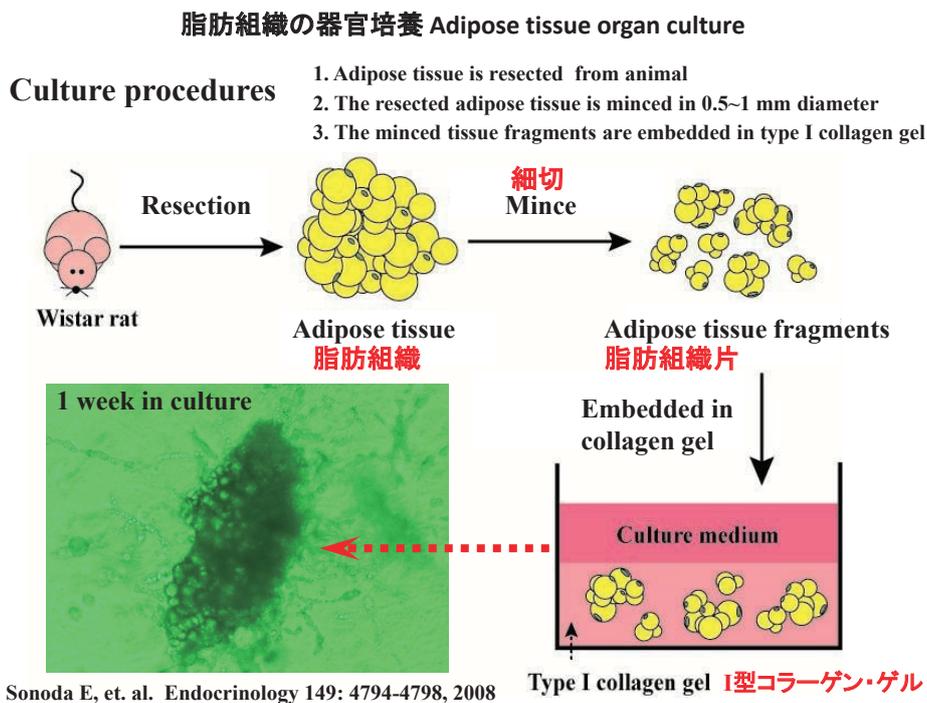


図12 脂肪組織の器官培養。脂肪組織を細切し、脂肪組織片(径0.5~1 mm)作製し、I型コラーゲンゲルに包埋して3次元培養する。図左下は、培養成熟脂肪細胞の位相差顕微鏡像である。

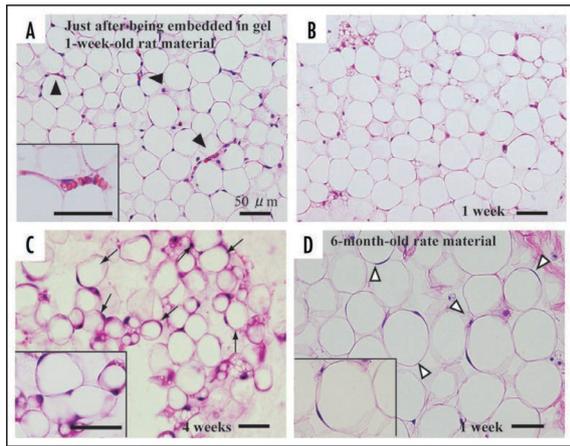


図13 器管培養における脂肪組織の形態。1週齢ラット皮下脂肪組織片のゲル包埋直後では、脂肪細胞と血管（◄、インセット）が明瞭である（A）。培養1（B）、4週後（C）でも脂肪細胞が明瞭に保持される。6ヵ月齢ラット皮下脂肪でも培養可能である（D）。ヘマトキシリン・エオジン染色。

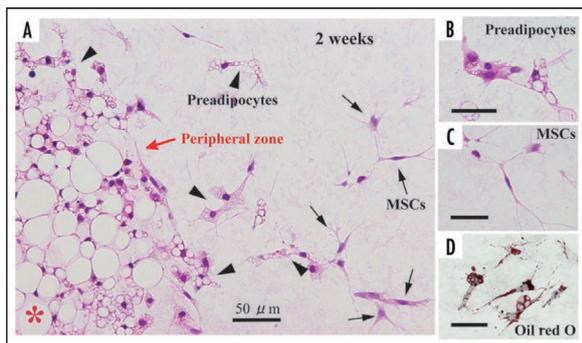


図14 培養脂肪組織片の辺縁部における形態変化。A、辺縁部では、微小脂肪滴を有する前脂肪細胞（◄）、間葉系幹細胞（←）が活発に再生する。B、D、脂肪滴を有する前脂肪細胞。C、間葉系幹細胞。組織片中心部（*）での脂肪細胞の形態変化は見られない。A, B, C, ヘマトキシリン・エオジン染色。D, オイルレッドO染色（脂肪染色）。

theory) を提唱しており (図17, 18)、現在この仮説を検証中である。脂肪組織片内の血管網は、培養1週間後には徐々に消失し、その長期保持は困難である。

以上のように、我々が開発した脂肪組織の器管培養法は成熟脂肪細胞の生存・機能保持

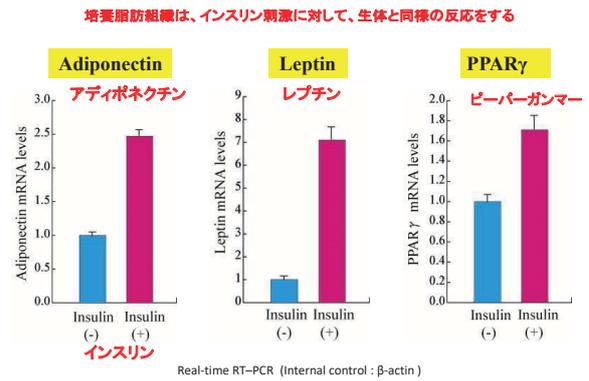


図15 培養脂肪組織のインスリン反応性。インスリン刺激により、アディポネクチン、レプチンの産生、脂肪細胞分化転写因子PPAR γ の発現が増加する。培養脂肪組織は、生体と同様のインスリン反応性を示す。

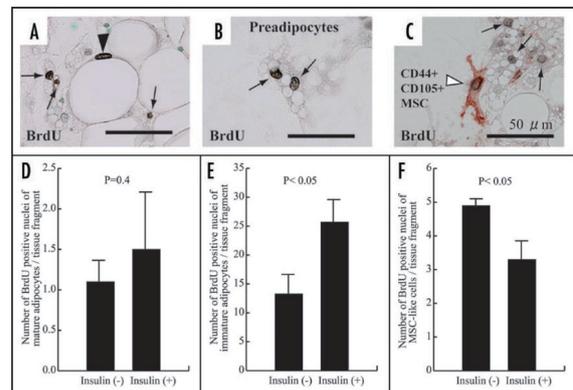


図16 培養脂肪組織の増殖能とインスリン反応性。成熟脂肪細胞（A）はインスリン刺激により増殖活性が増加する傾向が見られるが、有意差は見られない。しかし、前脂肪細胞（未熟脂肪細胞、B）はインスリン刺激により、増殖活性が有意に増加する。一方、間葉系幹細胞は、インスリン刺激により増殖活性が有意に減少する（C）。BrdU（プロモデオキシウリジン、増殖マーカー）、CD44/CD105（間葉系幹細胞マーカー）の免疫染色（A, B, C）。成熟脂肪細胞（◄）、前脂肪細胞（←）のBrdUの核内陽性像（黒）。間葉系幹細胞のCD44/CD105の細胞質内陽性像（赤）。

が長期間維持できること、前脂肪細胞や間葉系幹細胞の活発な再生が見られることから、脂肪組織の機能特性、再生、他種細胞との相互作用を解析するための有力な手段と考えられる。

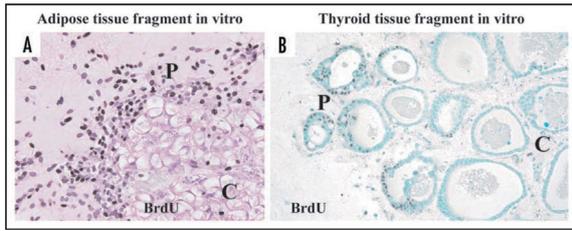


図17 脂肪組織片 (A) と甲状腺組織片培養 (B) における増殖活性 (BrdUの免疫染色)。脂肪組織片、甲状腺組織片の器官培養では、組織片辺縁部 (P) でBrdUの発現が高く、組織片中心部 (C) では著明に低い。すなわち、組織片辺縁部では増殖活性が高く、中心部では増殖活性が低い。以上の知見を基に、図18の組織再生機構仮説を提唱している。

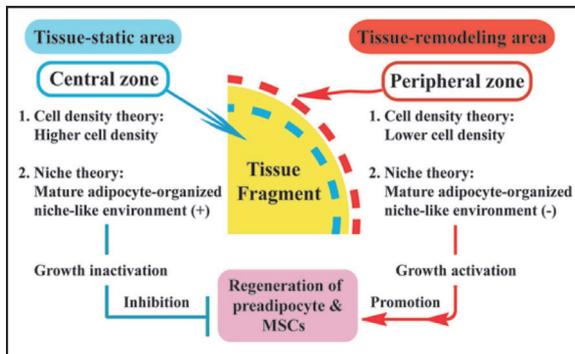


図18 組織片 (Tissue fragment) 培養を基盤にした脂肪組織再生機構仮説 (Toda S, et al. Organogenesis 2009, 5:50-56). 細胞密度仮説 (Cell density theory) では、脂肪組織片中心部 (Central zone: tissue-static area) は高細胞密度であり、接触阻害により、成熟脂肪細胞 (Mature adipocytes)、前脂肪細胞 (Preadipocytes)、間葉系幹細胞 (MSCs) の増殖が抑制される。一方、組織辺縁部 (Peripheral zone: tissue-remodeling area) は細胞密度が低く、接触阻害機構から逸脱しており、増殖が促進される。ニッチ仮説 (Niche theory) では、組織中心部は成熟脂肪細胞が多く、成熟脂肪細胞によるニッチ様環境形成のために細胞増殖が抑制される。組織辺縁部では成熟脂肪細胞が少なく、成熟脂肪細胞によるニッチ様環境形成がなく、増殖が促進される。細胞密度仮説、ニッチ仮説の両者の機序により脂肪組織の再生が調節されていると思われる。

3. 脂肪組織－他種細胞間相互作用解析システム

我々は、各種疾患の発症・病態における脂肪組織の役割とその制御機構を解明するために、脂肪組織の器官培養⁽¹⁰⁻¹²⁾を応用して、種々の正常並びに癌細胞との混合培養系を確立し報告してきた⁽²¹⁻³⁰⁾。本稿では、脂肪組織と腎尿細管上皮⁽²²⁾、心筋細胞との相互作用⁽²³⁾を簡単に紹介する (詳細は文献を参照されたし)。

腎周囲には豊富な脂肪組織が存在するので、以前から我々は脂肪組織と腎臓との密接な関係があるものと推測していた。脂肪組織片を包埋したコラーゲンゲル層上にMDCK尿細管上皮細胞を播種して混合培養すると (図19)、尿細管上皮細胞の肥大・極性化 (図20)、ZO-1、

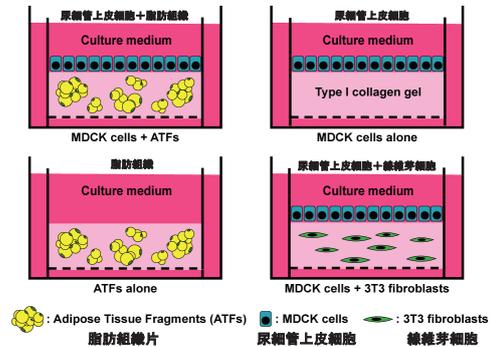


図19 脂肪組織－腎尿細管上皮細胞間相互作用解析モデル。底面がニトロセルロース膜からなる培養皿 (内皿) に脂肪組織片 (adipose tissue fragments, ATFs) をコラーゲンゲルに包埋し、ゲル上に尿細胞上皮細胞 (MDCK cells) を播種する。大型の培養皿 (外皿) に内皿を入れて、内皿、外皿に培養液を入れて培養する (左上)。コントロールとし、尿細管上皮単独 (右上)、脂肪組織片単独 (左下)、脂肪組織片の代わりに3T3線維芽細胞 (3T3 fibroblasts) と尿細胞上皮細胞の混合培養 (右下)。

aPKC、Cdc42などの極性化蛋白発現、塩素/ヨード輸送蛋白ペンドリン発現、上皮バリア機能が促進される。細胞質内グリコーゲンの産生、apical sideにおける微絨毛形成、basal sideにおける基底膜の形成が促進される。以上の脂肪組織誘導性の尿細管上皮の肥大・極性化は、レプチンが仲介因子であり、アディポネクチンは阻害因子である。さらに、細胞増殖とアポトーシスは抑制される。一方、尿細管上皮は、脂肪組織からの前脂肪細胞、間葉系

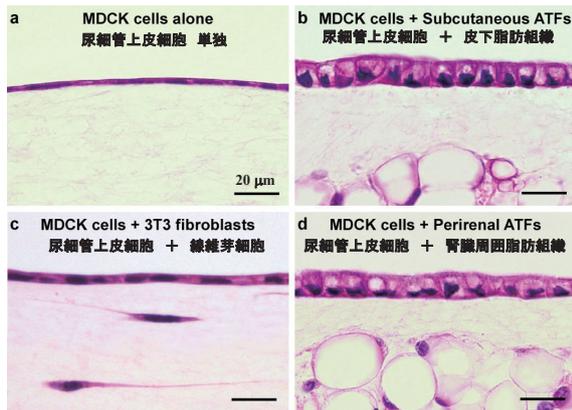


図20 脂肪組織－腎尿管上皮細胞間相互作用解析モデルにおける脂肪組織誘導性腎尿管上皮の形態変化。尿管上皮細胞単独培養 (a) に比較して、皮下 (b) 及び腎周囲脂肪組織 (c) は尿管上皮細胞の肥大と極性を促進する。線維芽細胞では、脂肪組織誘導性の尿管上皮細胞の肥大と極性を誘導できない (d)。

幹細胞の再生を抑制する。また、脂肪組織からのレプチン産生を抑制し、アディポネクチン産生を促進する。以上のように、脂肪組織と腎の活発な臓器間相互作用の存在が明らかになり、

メタボリックシンドロームにおける慢性腎臓病や腎癌⁽³⁰⁾の病態を解明するための有力な手段と思われる。

我々は、小腸、大腸などの消化管粘膜組織の長期器管培養系をすでに確立しており⁽²¹⁾、消化管粘膜と腸間膜脂肪組織との相互作用を現在解析中である。また、骨髄脂肪組織の培養系を樹立し、骨髄脂肪組織が骨芽細胞の増殖・分化を抑制することを報告した⁽¹¹⁾。この培養系では、造血細胞の保持が可能であり、骨髄脂肪組織と造血細胞との相互作用や白血病などの病態をより詳細に解析できるものと思われる。また、我々は脂肪組織が心筋細胞 (図21, 22) に脂肪毒性 (lipotoxicity) を誘導することを見出した⁽²³⁾。さらに、脂肪組織・肝細胞相互作用解析モデルを用いて、皮下脂肪組織ではなく、内臓脂肪組織が肝細胞に脂肪毒性を特異的に誘導することを発見した⁽²⁵⁾。最近、我々はメタボリックシンドロームにおける動脈硬化を解明するために、動脈硬化解析モデル (図23) を提唱している。これらの脂肪細胞・他種細胞間相互作用のメカニズム (図24) が徐々に解明されつつある。

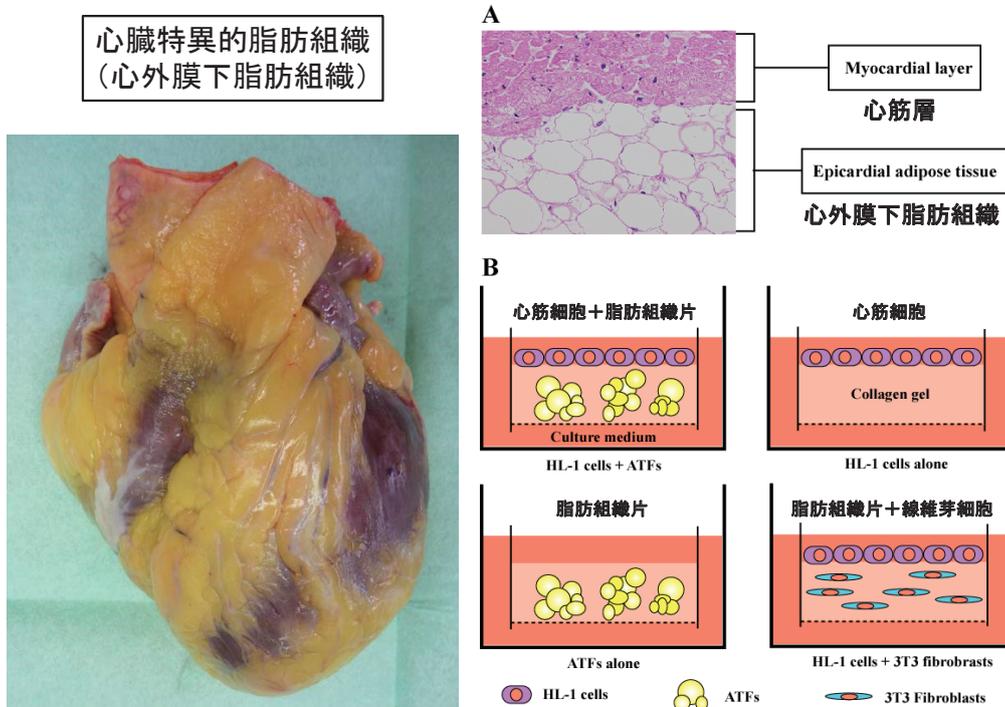


図21 脂肪組織－心筋細胞間相互作用解析モデル。心外膜下脂肪組織は、心臓特異的脂肪組織である (左、ヒト心臓)。心外膜下脂肪組織に局在する脂肪細胞は心筋細胞と接している (A)。図19と同様に、脂肪組織片と心筋細胞の混合培養、コントロール培養を行う (B)。HL-1 cells (心筋細胞株)、ATFs (脂肪組織片)、3T3 fibroblasts (線維芽細胞株)。

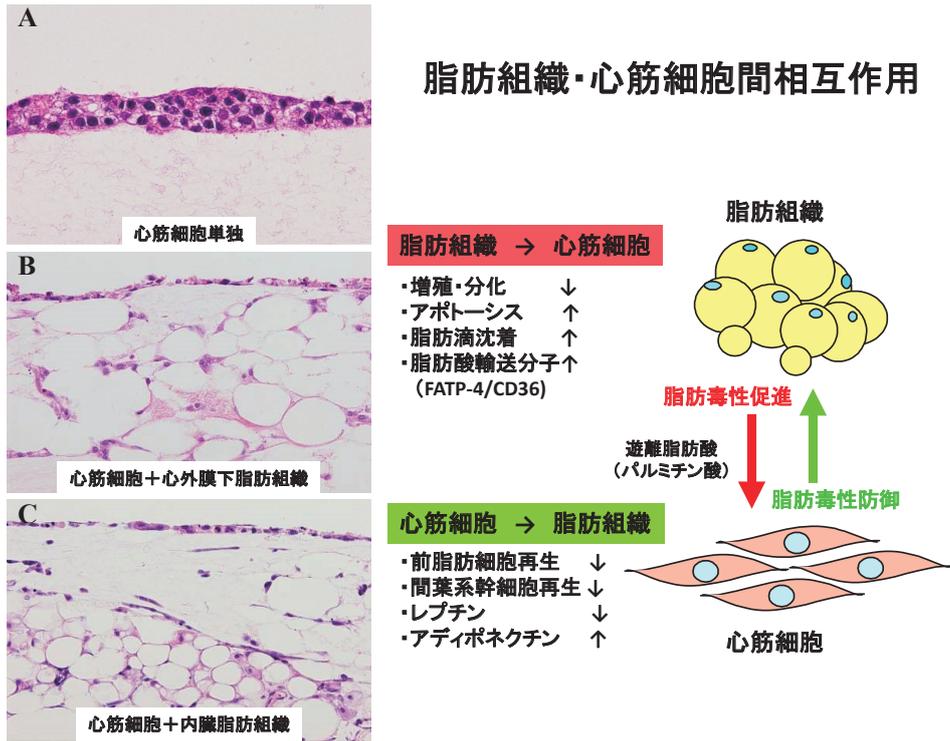


図22 脂肪組織-心筋細胞間相互作用解析モデルにおける心筋細胞の脂肪毒性。脂肪組織は、心筋細胞の脂肪滴沈着、脂肪酸輸送分子（FATP-4, CD36）発現を促進し、アポトーシス促進、増殖・分化抑制を誘導する（脂肪毒性の促進）。一方、心筋細胞は、脂肪組織における前脂肪細胞、間葉系幹細胞再生を抑制し、脂肪組織の増殖を抑制する。また、アディポネクチン産生を促進し、レプチン産生を抑制する。すなわち、心筋細胞は脂肪毒性の抑制に作用する。

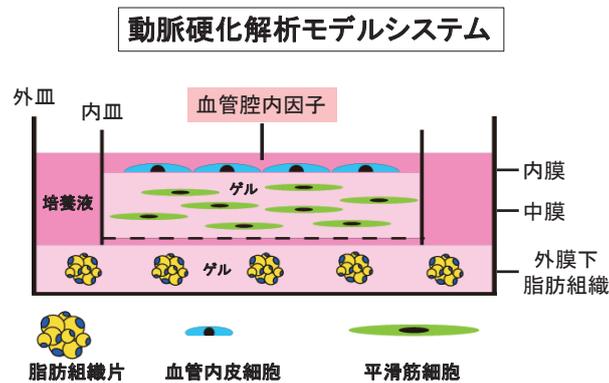


図23 動脈硬化解析モデル（脂肪組織-血管相互作用解析）。外血に、0.5-1 mm径に細切した脂肪組織片（0.5 ml）を5 mlのI型コラーゲン・ゲル内に包埋し、1日間培養する。同時に、底面がニトロセルロース膜から成る内血に平滑筋細胞を包埋したコラーゲン・ゲル層（1 ml）を作製し、そのゲル層上に内皮細胞（100万個）を播種し、1日間培養する。その後、内血を外血に入れて培養する。この時点で、内膜、中膜、外膜下脂肪組織からなる血管壁構造が再構築される。さらに、内血の培養液中に血管腔内因子であるコレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸など血清成分や単球などの血液細胞を入れて、血管腔内因子との相互作用の解析が可能である。対照は、内皮細胞、脂肪組織片の単独培養である。脂肪組織が内皮細胞、平滑筋細胞に与える影響の特異性を検証するために、外血に線維芽細胞（3T3細胞株）を培養した系を用いる。このモデルでは、脂肪組織-血管相互作用解析モデルで再現された現象を、ホルマリン固定切片、細胞から抽出した蛋白、遺伝子と細胞培養液を用いて解析する。

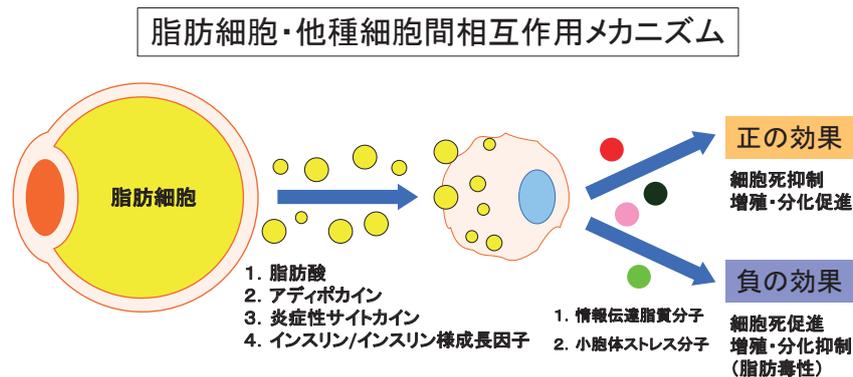


図24 脂肪細胞・組織が他種細胞に与える正の効果と負の効果。脂肪細胞・組織は、細胞種特異的に正の効果（細胞死抑制、増殖・分化/脂肪滴沈着促進）と負の効果（細胞死/脂肪滴沈着促進、増殖・分化抑制：脂肪毒性lipotoxicity）を誘導する。脂肪組織は、腎尿管上皮細胞、甲状腺濾胞上皮細胞、ある種の癌細胞には正の効果誘導する。一方、心筋細胞、肝細胞には負の効果誘導する。これらを仲介する因子は、脂肪酸、アディポカイン、炎症性サイトカイン、インスリン/インスリン様成長因子などが重要である。さらに、これらの因子が、細胞内情報伝達脂質分子を活性化することにより、上記現象が誘導されると考えられる。

これまで、我々は生体恒常性や肥満、メタボリックシンドローム、癌、老化などにおける臓器特異的脂肪組織の役割とその病態の一端を解明するために、培養モデルを提唱して来た。生物は多数の分子の織りなす複雑系であり、不思議に満ちた世界である。この不思議な世界に多くの若い研究者が船出することを願って筆を置く、Good luck。

謝辞

ここで紹介した研究結果の多くは、佐賀大学・医学部・病因病態科学講座在職中に得られた成果であり、昼夜を問わず研究に励み、多くの研究成果を見出し、発表してきた教室のスタッフ、大学院生の先生方に感謝申し上げます。また、このような機会を与えて頂いた日本ワンヘルスサイエンス学会理事長・藤谷 登教授に感謝申し上げます。

文献

1. Dulloo AG, Montani JP. Pathways from dieting to weight regain, to obesity and to the metabolic syndrome: an overview. *Obes Rev.* 2015 Suppl 1:1-6.
2. Cinti S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc.* 2001 60 (3):319-28.
3. Mazini L, Rochette L, Admou B, Amal S, Malka G. Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2020 21 (4):1306.
4. Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S, Yun K. Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation.* 1986 31 (1):42-9.
5. Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S, Toda S. Proliferation of unilocular fat cells in the primary culture. *J Lipid Res.* 1987 28 (9):1038-45.
6. Sugihara H, Yonemitsu N, Toda S, Miyabara S, Funatsumaru S, Matsumoto T. Unilocular fat cells in three-dimensional collagen gel matrix culture. *J Lipid Res.* 1988 29 (5):691-7.
7. Sugihara H, Funatsumaru S, Yonemitsu N, Miyabara S, Toda S, Hikichi Y. A simple culture method of fat cells from mature fat tissue fragments. *J Lipid Res.* 1989 30 (12):1987-95.
8. Inoue T, Toda S, Narisawa Y, Sugihara H. Subcutaneous adipocytes promote the differentiation of squamous cell carcinoma cell line (DJM-1) in collagen gel matrix culture. *J Invest Dermatol.* 2001 117 (2):244-50.
9. Manabe Y, Toda S, Miyazaki K, Sugihara H. Mature adipocytes, but not preadipocytes, promote the growth of breast carcinoma cells in collagen gel matrix culture through cancer-stromal cell interactions. *J Pathol.* 2003 201 (2):221-8.

10. Sonoda E, Aoki S, Uchihashi K, Soejima H, Kanaji S, Izuhara K, Satoh S, Fujitani N, Sugihara H, Toda S. A new organotypic culture of adipose tissue fragments maintains viable mature adipocytes for a long term, together with development of immature adipocytes and mesenchymal stem cell-like cells. *Endocrinology*. 2008 149 (10):4794-8.
11. Uchihashi K, Aoki S, Shigematsu M, Kamochi N, Sonoda E, Soejima H, Fukudome K, Sugihara H, Hotokebuchi T, Toda S. Organotypic culture of human bone marrow adipose tissue. *Pathol Int*. 2010 60 (4):259-67.
12. Toda S, Uchihashi K, Aoki S, Sonoda E, Yamasaki F, Piao M, Ootani A, Yonemitsu N, Sugihara H. Adipose tissue-organotypic culture system as a promising model for studying adipose tissue biology and regeneration. *Organogenesis*. 2009 5 (2):50-6.
13. Paulo E, Wang B. Towards a Better Understanding of Beige Adipocyte Plasticity. *Cells*. 2019 8 (12):1552.
14. Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006 444 (7121):881-7..
15. Sherling DH, Perumareddi P, Hennekens CH. Metabolic Syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2017 22 (4):365-367.
16. Schoettl T, Fischer IP, Ussar S. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *J Exp Biol*. 2018 221(Pt Suppl 1):jeb162958./jeb.162958.
17. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasan RS, Murabito JM, Meigs JB, Cupples LA, D'Agostino RB Sr, O'Donnell CJ. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2007 116 (1):39-48.
18. Saini S, Kaur Walia G, Pal Sachdeva M, Gupta V. Genomics of body fat distribution. *J Genet*. 2021;100:32.
19. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes*. 2007 56 (6):1517-26.
20. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes*. 2007 56 (6):1517-26.
21. Ootani A, Li X, Sangiorgi E, Ho QT, Ueno H, Toda S, Sugihara H, Fujimoto K, Weissman IL, Capecchi MR, Kuo CJ. Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat Med*. 2009 15 (6):701-6.
22. Udo K, Aoki S, Uchihashi K, Kawasaki M, Matsunobu A, Tokuda Y, Ootani A, Toda S, Uozumi J. Adipose tissue explants and MDCK cells reciprocally regulate their morphogenesis in coculture. *Kidney Int*. 2010 78 (1):60-8.
23. Anan M, Uchihashi K, Aoki S, Matsunobu A, Ootani A, Node K, Toda S. A promising culture model for analyzing the interaction between adipose tissue and cardiomyocytes. *Endocrinology*. 2011 152 (4):1599-605.
24. Nomoto-Kojima N, Aoki S, Uchihashi K, Matsunobu A, Koike E, Ootani A, Yonemitsu N, Fujimoto K, Toda S. Interaction between adipose tissue stromal cells and gastric cancer cells in vitro. *Cell Tissue Res*. 2011 344 (2):287-98.
25. Nishijima-Matsunobu A, Aoki S, Uchihashi K, Fujimoto K, Toda S. Three-dimensional culture model for analyzing crosstalk between adipose tissue and hepatocytes. *Cell Tissue Res*. 2013 352 (3):611-21.
26. Nakayama A, Aoki S, Uchihashi K, Nishijima-Matsunobu A, Yamamoto M, Kakihara N, Iwakiri R, Fujimoto K, Toda S. Interaction between Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Adipose Tissue in Vitro. *Am J Pathol*. 2016 186 (5):1180-94.
27. Yamamoto M, Uchihashi K, Aoki S, Koike E, Kakihara N, Toda S. Interaction between thyrocytes and adipose tissue in vitro. *Pathol Int*. 2016 66 (3):148-157.
28. Kawasaki-Nanri M, Aoki S, Uchihashi K, Yamamoto M, Udo K, Nishijima-Matsunobu A, Kakihara N, Noguchi M, Uozumi J, Toda S. Differential effects of adipose tissue stromal cells on the apoptosis, growth and invasion of bladder urothelial carcinoma between the superficial and invasive types. *Int J Urol*. 2016 23 (6):510-9.
29. Akutagawa T, Aoki S, Yamamoto-Rikitake M, Iwakiri R, Fujimoto K, Toda S. Cancer-adipose tissue interaction and fluid flow synergistically modulate cell kinetics, HER2 expression, and trastuzumab efficacy in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2018 21 (6):946-955.
30. Nagase K, Akutagawa T, Rikitake-Yamamoto M, Morito S, Futamata M, Tobu S, Noguchi M, Toda S, Aoki S. Cellular and physical microenvironments regulate the aggressiveness and sunitinib chemosensitivity of clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol*. 2021 254 (1):46-56.

Adipose tissue-based marvels of human body: Adipose tissue basis and its culture systems

¹⁾ Departments of ¹⁾ Medical Technology and Sciences, International University of Health and Welfare

²⁾ Pathology, Kouhou-kai Takagi Hospital

³⁾ Pathology & Microbiology, Saga University School of Medicine

Shuji Toda ^{1), 2)}, Miho Ikeda ²⁾, Yoko Nishida ²⁾, Sayuri Yamaguchi ²⁾,
Shigehisa Aoki ³⁾, and Yukari Takase ²⁾

Summary Recently, health problems driven by adipose tissue-based obesity have been serious social issues world wide, especially in advanced countries. Adipose tissue consisting of mature adipocytes, preadipocytes and mesenchymal stem cells is a multifunctional organ that actively carries out energy storage and metabolism, and both production of adipokines and mesenchymal stem cells. Thus, adipose tissue is essential for human body homeostasis. To better understand adipose tissue-based marvels of the body, here we introduce adipose tissue basis and its culture systems for investigating both the homeostasis and the obesity-associated pathological condition metabolic syndrome.

Key words: adipose tissue, adipocytes, adipokines, obesity, mesenchymal stem cells, metabolic syndrome, ceiling culture, culture model