

脂肪細胞分化中の代謝リプログラミングの正確な評価

著者

Guoxiao (Grace) Wang
Natalia Romero
Agilent Technologies, Inc.

概要

ミトコンドリアは細胞機能においてきわめて重大な役割を担っています。細胞の生体エネルギー需要を支えるだけでなく、環境シグナルの感知とそれに対する応答においても重大な役割を果たします。実際、ミトコンドリア機能障害は、いくつかの神経変性疾患や、糖尿病、循環器疾患、筋疾患、肝障害などの慢性疾患と関係があります。脂肪細胞におけるミトコンドリア機能障害は、肥満や2型糖尿病といった代謝性疾患に関連し、脂質代謝を低下させ、酸化ストレスを高め、これによって全身的な代謝がさらに妨げられます。脂肪細胞の分化中、ミトコンドリア活性は変化する代謝需要に合わせて調整されます。in vitro でのミトコンドリア機能の評価には Agilent Seahorse XF アナライザーが広く使用されていますが、成熟脂肪細胞での代謝表現型のモニタリングは、分化中に代謝速度が大幅に増加することから容易ではありません。このアプリケーションノートでは、in vitro での分化中の正確な代謝プロファイリングのために最適化されたワークフローについて取り上げます。このワークフローでは、Agilent Seahorse XF Flex アナライザーで、標準の Agilent Seahorse XFe24/XF Flex V7 PS 細胞培養マイクロプレートと Agilent Seahorse XFe24/XF Flex V28 細胞培養マイクロプレートを組み合わせて使用しました。これらのマイクロプレートを組み合わせることで、機器の検出範囲が拡大し、複数の分化段階にわたる幅広い代謝活性を優れた精度と正確度で捉えることができました。

はじめに

脂肪細胞におけるミトコンドリア機能は、エネルギー恒常性、脂質代謝、インスリン感受性において不可欠です。機能不全のミトコンドリアは、異常な脂質蓄積、インスリン抵抗性、酸化ストレスの増加につながり、肥満や2型糖尿病の原因になる可能性があります^{1, 2}。Agilent Seahorse XF アナライザーは in vitro および ex vivo でのミトコンドリア機能の評価に広く使用されています。しかし、成熟脂肪細胞におけるミトコンドリア機能や代謝の生体エネルギー表現型の継続的な定量モニタリングは、脂肪細胞分化時に代謝速度が大幅に増加することから容易ではありません。

3T3-L1 線維芽細胞は、特定の化学薬品混合物で処理すると培地中で成熟脂肪細胞に分化するため、脂肪細胞分化、脂肪細胞の代謝、および関連疾患に関わるメカニズムの研究に有益なツールとなっています。今回の研究では、3T3-L1 の成熟脂肪細胞への分化中、分化誘導前に2日間にわたって培養細胞をコンフルエンスに到達させました。分化の最初の2日間で、細胞は1回または2回の増殖サイクルを経て、ほかの多くの接着細胞タイプと比べて非常に高いコンフルエンスに達しました。また、3T3-L1 脂肪細胞の成熟に伴い PGC-1 α の発現が大幅に増加して褐色脂肪組織に匹敵するレベルに達し³、ミトコンドリア呼吸がさらに亢進しました。以上の要因が総合的に働いた結果、細胞の呼吸速度が非常に高くなりました（ウェルあたりの酸素消費速度が高い）。これらの細胞の高い呼吸速度のため、標準の Agilent Seahorse XFe24/XF Flex V7 PS 細胞培養マイクロプレート（XF V7）（p/n 100777-004）での細胞培養中、Seahorse XF による速度測定時にマイクロチャンバー内で低酸素状態が生じました。このように誘導された低酸素状態は、酸素消費速度（OCR）の過小評価と、測定間の不十分な酸素濃度の回復につながることがあります。

Agilent Seahorse XFe24/XF Flex V28 PS 細胞培養マイクロプレート（XF V28）（p/n 100882-004）は標準の XF V7 マイクロプレートに代わる24ウェルマイクロプレートであり、XF V7 マイクロプレートと同じウェル表面積を保ちながら、高呼吸の細胞に対応したより大きな容量のマイクロチャンバーを特長としています（XF V7 が 5.65 μ L であるのに対し、XF V28 は 22 μ L）。Agilent Seahorse XF Flex アナライザーで XF V28 マイクロプレートを使用する場合、高呼吸サンプル用に調整された測定プログラムを使用できます。より大きな容量のため、消費される酸素の保持容量が大きいこと、また改良された混合プログラムにより、マイクロチャンバーの低酸素状態が最小限に抑えられることから、高呼吸の細胞に対する全体的な正確度が向上します。

このアプリケーションノートでは、in vitro での脂肪細胞のさまざまな分化段階における代謝プロファイルの正確な測定のために最適化された、Seahorse XF Flex アナライザーを用いたワークフローを開発しました。このワークフローでは、標準の XF V7 マイクロプレートと XF V28 マイクロプレートを組み合わせ、Seahorse XF Flex アナライザーの最適化されたアッセイプロトコルと改良されたアッセイ性能を活用します。これにより、検出範囲が拡張され、分化の初期段階から完全な成熟細胞にいたるまでの脂肪細胞の代謝表現型の正確な特性解析が実現します。

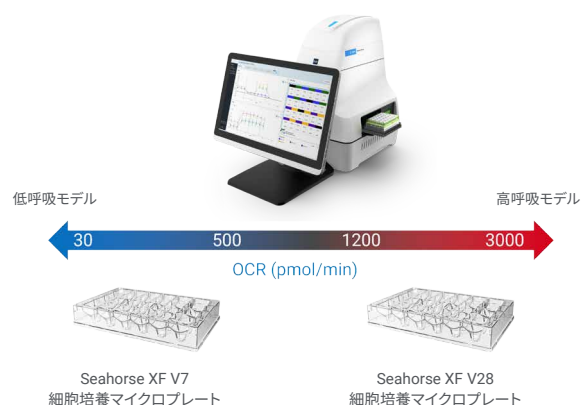


図 1. XF V7 および XF V28 マイクロプレートを組み合わせることにより Seahorse XF Flex アナライザーで得られる検出範囲を示す概略図

実験方法

3T3-L1 線維芽細胞の培養と脂肪細胞への分化

3T3-L1 線維芽細胞は ATCC から入手しました（CL-173）。細胞を維持するため、10% の Calf Bovine Serum（ATCC、30-2030）を添加した DMEM（Gibco、11995）で細胞を培養し、80% のコンフルエンスに達するまで継代培養しました。播種の前に、標準の XF V7 マイクロプレート（p/n 100777-004）または XF V28 マイクロプレート（p/n 100882-004）をウェルあたり 100 μ L の 0.2% ゼラチン（Sigma、G1393）で一晩コーティングしました。プレコンフルエント状態については、ウェルあたり細胞 10,000 個を播種し、翌日、アッセイを実施しました。分化段階の 0 日目（d0）とそれ以降のアッセイについては、ウェルあたり細胞 20,000 個を播種したところ、概して 2 日以内にコンフルエンスに達しました。

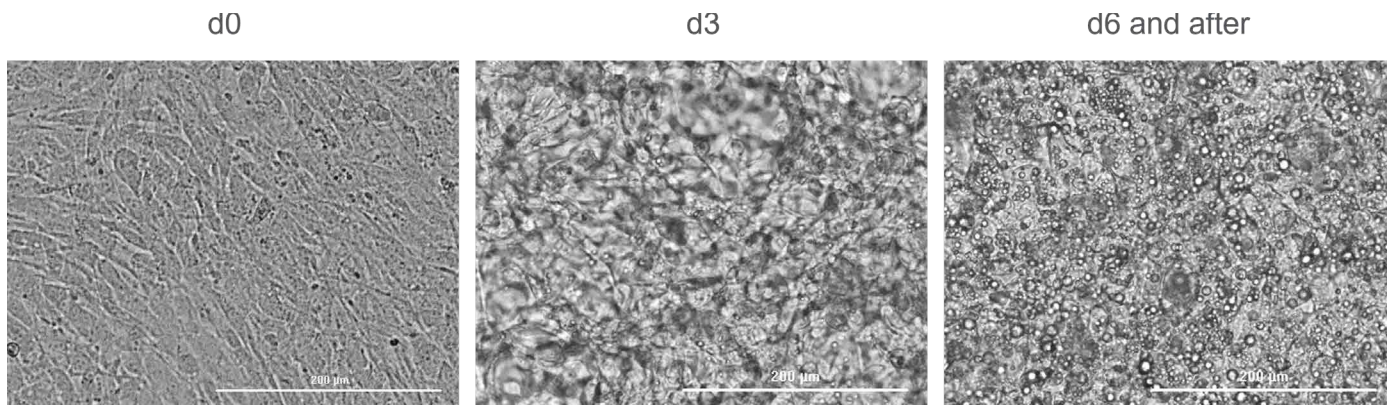


図 2. Agilent BioTek Cytation 5 細胞イメージング・プレートリーダーで撮影した 3T3-L1 細胞の位相差画像（倍率 10 倍）：分化前（d0）、分化中（d3）、成熟脂肪細胞（d6 以降）。スケールバー = 200 μm 。

コンフルエンスに達してから（ポストコンフルエンス）2 日後（d0）に、10% の FBS（HyClone、SH30070.03）、0.5 mM の IBMX（Sigma、I5879）、5 μM の ロシグリタゾン（Sigma、R2408）1 μM のデキサメタゾン（Sigma、D4902）および 200 nM のインスリン（Sigma、I9278）を添加した DMEM を使用して分化を誘導しました。誘導から 2 日後の 2 日目（d2）に、分化培地を、10% の FBS と 200 nM のインスリンを含む DMEM に交換しました。4 日目以降は、10% の FBS と 20 nM のインスリンを含む DMEM から成る分化培地で細胞を維持し、1 ~ 2 日ごとに新しい培地に交換しました。

Seahorse XF アッセイ

XF V7 マイクロプレートでのすべての実験には、アッセイテンプレートのデフォルトのプロトコル条件を使用しました（3 分間の混合、2 分間の待機、3 分間の測定）。Agilent Seahorse XFe24 アナライザーで XF V28 マイクロプレートを用いた実験にも、デフォルトのプロトコルを使用しました（3 分間の混合、2 分間の待機、3 分間の測定）。一方、Seahorse XF Flex アナライザーで XF V28 マイクロプレートを用いて実施した実験では、高呼吸サンプルに対し、 O_2 の回復を最大化するようにプロトコル条件を調整しました（3 分間の混合、0 分間の待機、4 分間の測定）。ただし、FCCP を添加してからロテノン/アンチマイシン A を添加するまでの期間については、例外的に 3 分間の混合、0 分間の待機、2.5 分間の測定という条件を使用しました（図 3）。

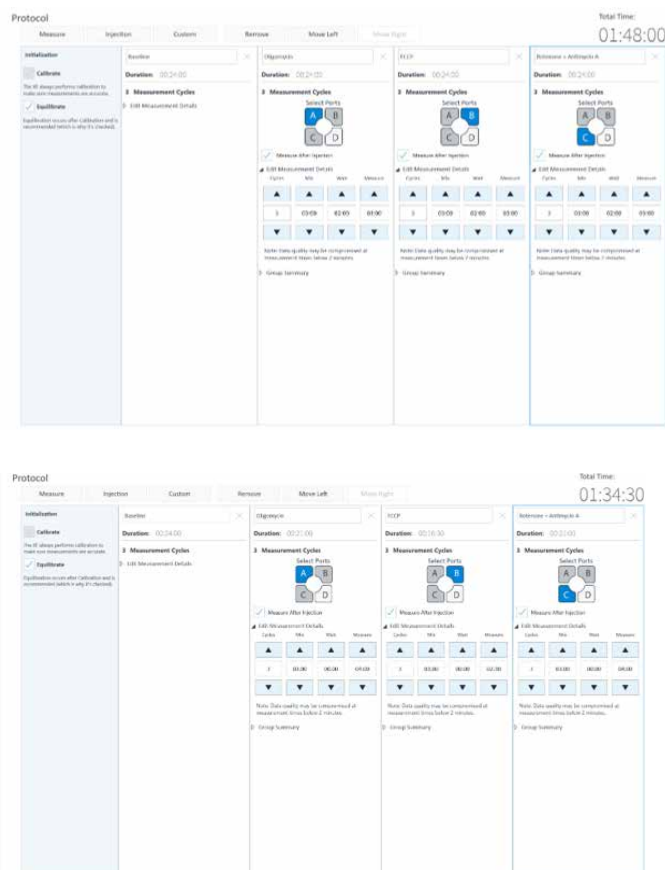


図 3. XF V7 (A) および XF V28 - Seahorse XF Flex (B) アッセイに用いた Seahorse XF ミトストレストテストのプロトコル条件

プレコンフルエントおよびポストコンフルエント (d0) の脂肪前駆細胞と、分化から 3、6、および 9 日目の細胞に対し、[Agilent Seahorse XF ミトストレステストキット](#) (p/n 103015-100) による測定を行いました。FCCP 濃度は、[ユーザーガイド](#)の推奨に従って各分化段階に応じて最適化しました。アッセイに使用した最終的な試薬濃度は、2.5 μM オリゴマイシン (Oligo)、2 μM FCCP、1 μM ロテノン/アンチマイシン A (R/A) です。ただし、プレコンフルエントの 3T3-L1 細胞に対しては 1.5 μM の FCCP を使用しました。

また、プレコンフルエントおよび d0 の脂肪前駆細胞と、6 日目 (d6) の成熟脂肪細胞に対し、[Agilent Seahorse XF 基質酸化ストレステストキット](#) (p/n 103672-100、103673-100、103674-100) による測定をキットの[ユーザーガイド](#)に従って実施しました。使用したオリゴマイシン、FCCP、およびロテノン/アンチマイシン A の濃度は、前述の Seahorse XF ミトストレステストアッセイ用に最適化したものと同じです。

プレコンフルエントの 3T3-L1 細胞には、Hoechst による核染色にもとづき細胞数を使用して正規化を行いました。分化が進行した段階では、細胞が積み重なって複数の層を形成することで核染色の信頼性が低下するため、データの正規化にタンパク質濃度を使用しました。

結果と考察

XF V7 マイクロプレートの利点と制限

XF V7 マイクロプレートは、速度測定中に容量 5.65 μL の一過性のマイクロチャンバーを形成することで高い感度を実現し、3T3-L1 脂肪前駆細胞をはじめとする多くの細胞タイプの呼吸の研究に非常に適しています。このことは、アッセイ中に観察される O_2 レベルの変化 (図 4A) から明らかであり、各測定中は勾配が比較的一定で、 O_2 の減少が控えめになっています。基礎呼吸の測定時および FCCP 注入後には、混合期間後に培地中の O_2 濃度の有効な回復も観察され、XF ミトストレステストにより正確な標準的 OCR カイネティクスグラフが得られました (図 4B)。

しかし、成熟脂肪細胞 (6 日目) に対して、または代謝活性が大幅に上昇している脂肪細胞分化プロセス中に、V7 プレートを使用して同様の実験を実施すると、細胞外培地中の初期 O_2 レベルが著しく低下しました (予測値約 150 mmHg に対して 75 mmHg 程度)。基礎条件でも、測定中にほぼ完全に O_2 が枯渇しています (図 4C)。また、FCCP 注入後には、ミトコンドリア脱共役によって OCR が上昇し、低酸素状態が進みました。この低酸素状態が、測定間の O_2 レベルの不完全な回復につながり、マイナスの予備呼吸能 (SRC) と不正確な OCR 測定という誤った結果になっています (図 4C および 4D)。これらの結果から、XF アッセイ中に O_2 レベルをモニタリングして、アッセイ条件を最適化する必要がある高呼吸の細胞モデルを特定することが、正確な代謝解析を行ううえできわめて重要であることは明らかです。

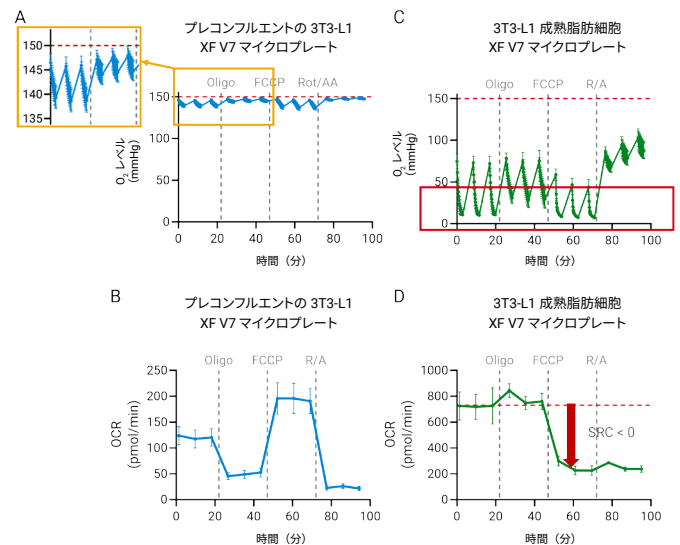


図 4. XF V7 マイクロプレートと Seahorse XF Flex アナライザーを用いた Seahorse XF ミトストレステストの比較：プレコンフルエントの 3T3-L1 線維芽細胞 (A、B)、成熟脂肪細胞 (C、D)。成熟脂肪細胞の高い呼吸により測定中に深刻な酸素欠乏が生じ (赤枠)、最大呼吸が過小評価されたことで、マイナスの予備呼吸能という誤った計算値が得られています (赤矢印)。

XF V28 マイクロプレートと Seahorse XF Flex アナライザーによる高呼吸細胞の OCR 測定の改善

高呼吸の細胞モデルにおける生体エネルギー測定を最適化するために、Seahorse XF Flex アナライザーを使用した、XF V28 マイクロプレートで分化した成熟脂肪細胞 (d6) の研究を並行して実施しました。図 5A に示すように、XF V28 マイクロプレートのより大きな容量のマイクロチャンバーにより、測定中に酸素レベルを推奨範囲に保つことができ ($\text{O}_2 > 50 \text{ mmHg}$)、XF V7 プレートで観察された低酸素状態 (図 4C) を効果的に回避できました。また、Seahorse XF Flex アナライザーに搭載されている、XF V28 マイクロプレート用に改良された混合プログラムにより、測定間のマイクロチャンバー内の再酸素化が改善されました (図 5A)。その結果、 O_2 の過度な欠乏が回避され、XF ミトストレステストにおいて、FCCP 注入後の予測どおりの OCR 上昇やプラスの予備呼吸能 (SRC > 0) など信頼性の高いカイネティクスグラフが得られました (図 5B)。

これに対し、XF V28 マイクロプレートで培養した同じ細胞を、Seahorse XFe24 アナライザーでデフォルトの混合プログラムと機器プロトコルを使用して解析した場合は（図 5C）、最適ではない混合パラメーターが原因で不十分な酸素回復が観察されました。その結果、ミトコンドリア機能の特性解析は不正確なものとなりました（図 5D）。

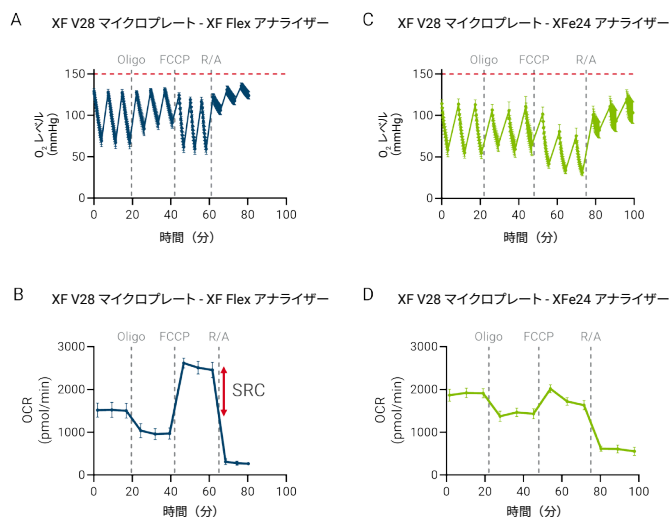


図 5. XF V28 マイクロプレートと Seahorse XF Flex アナライザー (A、B) および Seahorse XFe24 アナライザー (C、D) を用いた Seahorse XF ミトストレステストキットによる 3T3-L1 成熟脂肪細胞 (6 日目) の測定結果の比較。Seahorse XF Flex アナライザーに搭載されている、XF V28 マイクロプレート用に最適化された混合プログラムとプロトコルにより、最大呼吸が正確に測定され、プラスの予備呼吸能 (SRC、赤矢印) が得られています。

全体的には、XF V28 マイクロプレートと Seahorse XF Flex アナライザーを使用することで、高い活性の細胞タイプの代謝プロファイルを正確に測定することができます。さらに、さまざまな細胞タイプについて研究したところ、XF V7 マイクロプレートに最適な OCR 測定範囲が約 30 ~ 1,200 pmol/min であるのに対し、XF V28 マイクロプレートでは 3,000 pmol/min までの OCR を確実に測定できることがわかりました。ただし、基礎 OCR が 500 pmol/min 未満の細胞には XF V28 マイクロプレートは推奨しません。十分な感度が得られず、ノイズが増加し、データのばらつきが大きくなるからです。

表 1. XF V7 および XF V28 で推奨される OCR および O₂ レベル

	XF V7	XF V28
推奨 OCR	30 ~ 1,200 (pmol/min)	500 ~ 3,000 (pmol/min)
推奨 O ₂ レベル	165 ~ 50 mmHg	165 ~ 50 mmHg

XF V7 および XF V28 マイクロプレートを用いたアッセイの組み合わせによる、さまざまな脂肪細胞分化段階にわたる正確な代謝プロファイリング

前述のとおり、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化には細胞分裂によるクローン増殖が不可欠であり、この増殖は分化開始後の 2 日間間に起こります。3 日目以降は、細胞増殖が停止する一方で、成熟脂肪細胞への分化は継続されます。この分化には細胞量の増加と PGC1 α 発現の著しい上昇が伴い³、これによってウェルあたりの酸素消費速度が大幅に高まり、ミトコンドリア活性が大きく変化します。

脂肪細胞分化中に起こるこれらの生体エネルギーの変化を正確に解析するには、OCR 範囲と分化段階にもとづいて選択した、XF V7 および XF V28 の両方のマイクロプレートのデータが必要です。今回実施したさまざまな分化タイムポイントにわたる比較解析から、脂肪前駆細胞の評価には XF V7 プレートを用いるのが最善であり、3 日目以降については、XF V28 マイクロプレートの方が信頼性の高い測定値が得られることがわかりました（図 6A ~ D）。また、最大呼吸と予備呼吸能 (SRC) を正確に測定するために、分化段階ごとに FCCP 滴定も最適化しました。

図 6A ~ D に示すように、基礎 OCR と最大 OCR はどちらも分化が進行するほど増加しています。しかし、タンパク質含有量に対して正規化すると、成熟脂肪細胞 (6 日目および 9 日目) の ATP 産生呼吸と SRC は、3 日目より大幅に低下しています（図 6E ~ F）。これらの減少は、細胞数は安定しているものの、細胞の成熟に伴って総タンパク質量が継続的に増加することに起因しています⁴。

以上の結果は、脂肪細胞分化中のミトコンドリア適応を明らかに示しており、さまざまな分化段階にわたる動的な代謝変化を正確にモニタリングするうえで XF V7 および XF V28 マイクロプレートを組み合わせることの価値を強調しています。

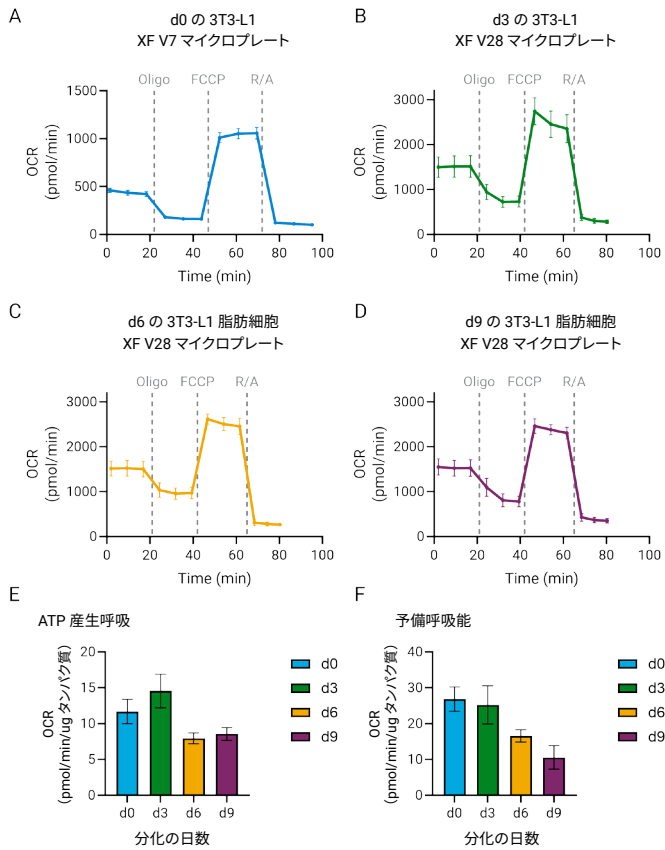


図 6. Seahorse XF Flex アナライザーで XF V7 および XF V28 マイクロプレートを組み合わせて使用した、Seahorse XF ミトストレステストによる分化中の 3T3-L1 細胞の解析結果。OCR カイネティクスプロファイル：d0 の脂肪前駆細胞 (A)、d3 の分化中の細胞 (B)、d6 (C) および d9 (D) の成熟脂肪細胞。ATP 産生呼吸 (E) と予備呼吸能 (F) (どちらもさまざまな分化段階にわたり総タンパク質含有量に対して正規化)

基質酸化ストレステストにより、3T3-L1 脂肪前駆細胞および成熟脂肪細胞の燃料依存性の違いを解明する

さまざまな細胞タイプにおいて、ミトコンドリア呼吸を支えるためにグルコース、脂肪酸、アミノ酸が主な燃料として使用されます。各基質に対する相対的な依存性を評価するために、基質酸化ストレステストを実施しました。その際、代謝阻害剤として、UK5099 (ミトコンドリアピルビン酸キャリア阻害剤)、Etomoxir (長鎖脂肪酸の酸化を阻害する CPT1 α 阻害剤)、および BPTES (グルタミンの酸化を標的とするグルタミナーゼ阻害剤) を使用しました。これらの阻害剤は、XF 基質酸化ストレステストキットのユーザーガイドに従って Seahorse XF ミトストレステストの試薬の前に注入しました。

このテストから、プレコンフルエントの 3T3-L1 線維芽細胞は、これらの 3 種類すべての阻害剤の影響を受け、グルコース、脂肪酸、およびグルタミンの代謝阻害時の最大呼吸は同等に減少しました (図 7A、E)。これに対し、d0 脂肪前駆細胞は、グルコースおよび脂肪酸の酸化に対して大きな依存性を示したものの、グルタミンの阻害剤への反応はより穏やかでした (図 7B、F)。一方、成熟脂肪細胞は異なる代謝パターンを示しました。OCR および ECAR のカイネティクスグラフに示すように、UK5099 および BPTES への曝露により基礎呼吸が一時的に急減し、同時に解糖活性が補償的に増加しました (図 7C ~ D)。しかし、これらの細胞はすばやく適応し、阻害剤の存在下でも、最大呼吸に著しい変化は見られませんでした (図 7G)。

以上より、脂肪前駆細胞のアッセイに V7 プレートを用い、また成熟脂肪細胞のアッセイに V28 プレートを用いれば、最大呼吸を正確に測定し、プラスの予備呼吸能が得られます。これにより、脂肪細胞のさまざまな分化段階における燃料依存性の正確な検出が容易になります。

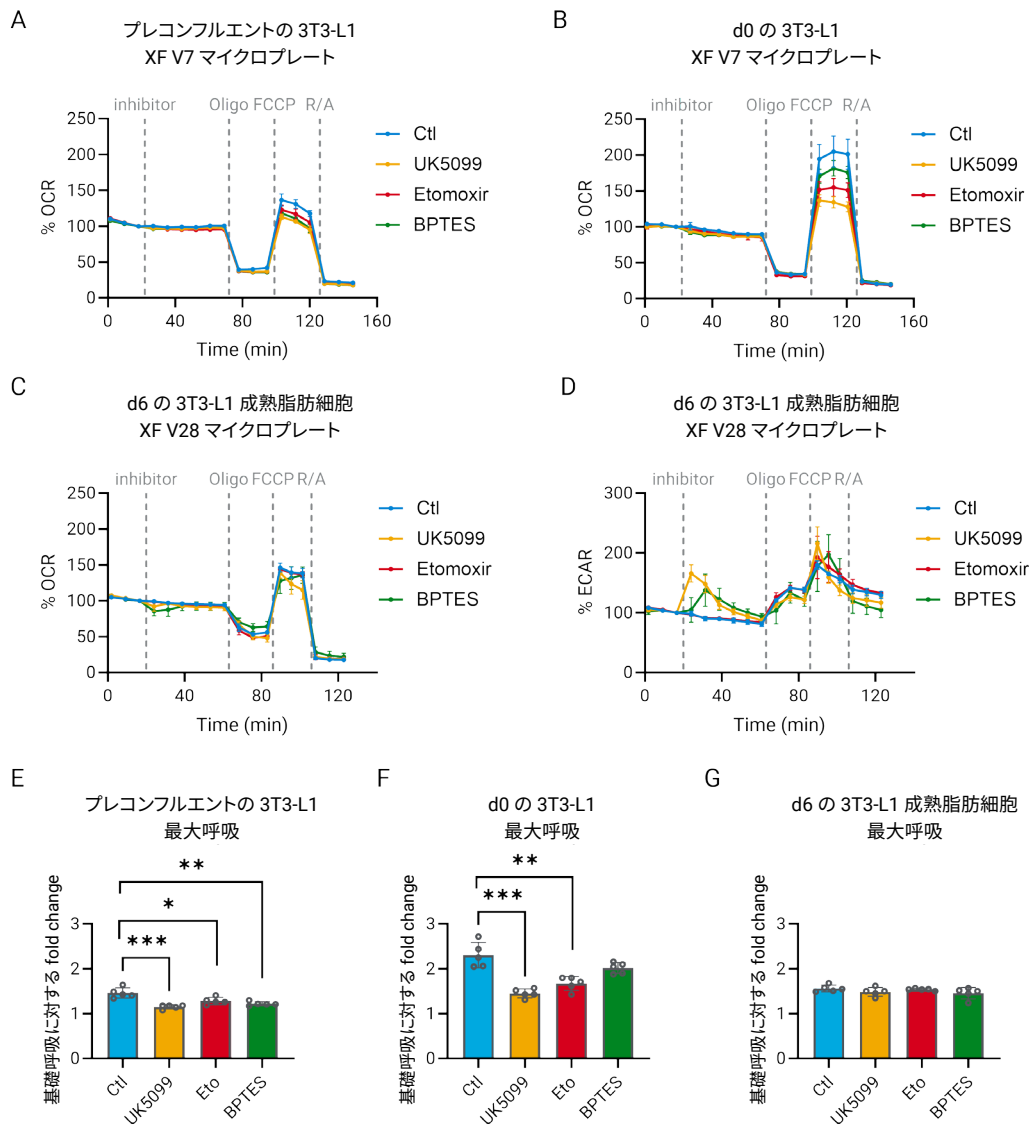


図 7. Seahorse XF 基質酸化ストレステストによる 3T3-L1 脂肪前駆細胞および成熟脂肪細胞の解析結果。測定 3 をベースラインとした OCR カイネティクスストレス：プレコンフルエントの 3T3-L1 線維芽細胞 (A)、d0 の脂肪前駆細胞 (B)、d6 の 3T3-L1 脂肪細胞 (C)。測定 3 をベースラインとした d6 の 3T3-L1 成熟脂肪細胞の ECAR カイネティクスストレス (D)。基礎呼吸を基準とした最大呼吸：プレコンフルエントの 3T3-L1 線維芽細胞 (E)、d0 の 3T3-L1 脂肪前駆細胞 (F)、d6 の 3T3-L1 脂肪細胞 (G)。2 回の独立した実験の代表データ。データは、5 テクニカル replicate の平均 \pm SD を表しています。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$

結論

細胞分化中の代謝リプログラミングは、分化系列決定において重要な役割を果たし、分化プロトコルの最適化のための貴重な知見を提供します。分化細胞の細胞機能に影響をおよぼす遺伝的摂動の理解を深め、治療薬の開発を導く助けにもなります。分化中には生体エネルギー代謝が激変するため、このプロセスが経るさまざまな段階におけるミトコンドリア活性を正確に測定することのできる適切なアッセイ条件を確立することが重要になります。Agilent Seahorse XF Flex アナライザーは、脂肪細胞分化の全過程にわたるミトコンドリア機能を正確に評価するためのワークフローを備えています。このワークフローにより、代謝測定を正確に行うための分化プロトコルや期間の調整などの必要が軽減され、細胞代謝とその調節に関する新たな見識がもたらされます。

参考文献

1. Das, S.; Mukhuty, A.; Mullen, G. P.; Rudolph, M. C. Adipocyte Mitochondria: Deciphering Energetic Functions across Fat Depots in Obesity and Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci* **2024**, 25(12). DOI: [10.3390/ijms25126681](https://doi.org/10.3390/ijms25126681) From NLM Medline.
2. Koliaki, C.; Roden, M. Alterations of Mitochondrial Function and Insulin Sensitivity in Human Obesity and Diabetes Mellitus. *Annu Rev Nutr* **2016**, 36, 337-367. DOI: [10.1146/annurev-nutr-071715-050656](https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071715-050656) From NLM Medline.
3. Morrison, S.; McGee, S. L. 3T3-L1 Adipocytes Display Phenotypic Characteristics of Multiple Adipocyte Lineages. *Adipocyte* **2015**, 4(4), 295-302. DOI: [10.1080/21623945.2015.1040612](https://doi.org/10.1080/21623945.2015.1040612) From NLM PubMed-not-MEDLINE.
4. Bernlohr, D. A.; Bolanowski, M. A.; Kelly, T. J., Jr.; Lane, M. D. Evidence for an Increase in Transcription of Specific mRNAs During Differentiation of 3T3-L1 Pre-adipocytes. *J Biol Chem* **1985**, 260(9), 5563-5567. DOI: [10.1016/S0021-9258\(18\)89059-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)89059-7) From NLM Medline.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

RA250418.239

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Published in Japan, May 22, 2025

5594-8321JAJP

このアプリケーションで使用した製品

アジレント製品

[Agilent Seahorse XF Flex アナライザー](#) 

販売店