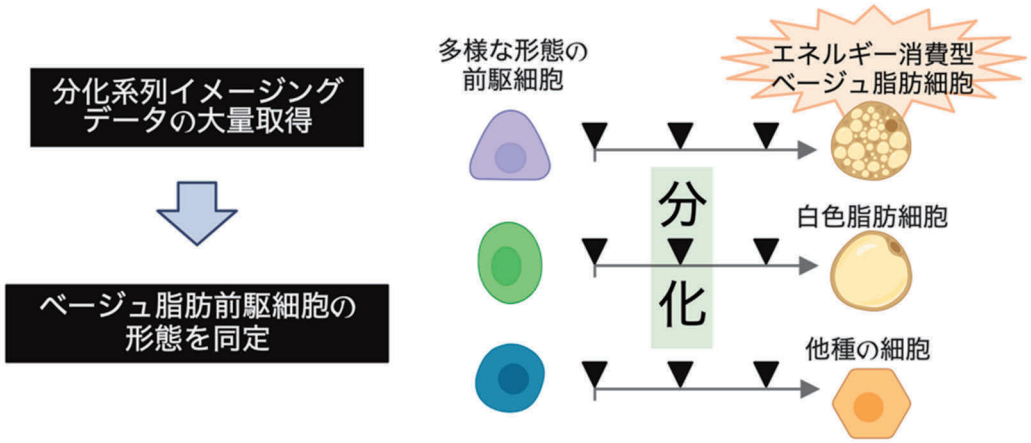
193　経時的1細胞計測によるベージュ脂肪前駆細胞の同定	服部　一輝

【目的】世界には 10 億人以上の肥満患者がいると報告されているにも関わらず、広範に適用可能な治療法は依然存在しない。一つの有望な戦略は、熱産生によってエネルギーを消費する細胞であるベージュ脂肪細胞を増加させるというものであるが、治療法としての確立には至っていない。大きな課題の一つは、脂肪組織内の多様な前駆細胞集団の中で、ベージュ脂肪細胞の前駆細胞の同定・単離が達成されていないことであると考える。組織の前駆細胞集団には、エネルギー消費能が低い白色脂肪細胞への指向性が高い前駆細胞なども含まれていると考えられるが、ベージュ脂肪細胞への分化指向性の高い前駆細胞を選別する手段が確立していない。そこで本研究では、ベージュ脂肪細胞の前駆細胞を形態学的に同定し、選別可能にすることで、新たな抗肥満戦略構築のための技術基盤を確立することを目標とした。

【方法】本目的を達成するべく、1 細胞・1 クローン脂肪細胞分化追跡系の構築を進めた。具体的には、以下の 3 つの方法論を用いることで、系の確立を目指した。1. 脂肪細胞 1 細胞分化誘導系の開発：脂肪前駆細胞をハイドロゲル内に空間的に分散させ、個々の細胞を三次元培養し、脂肪細胞へと分化誘導可能な条件を検討した。2. 1 細胞経時計測系の開発・概念実証：高速・大量調製が可能な、マイクロ液滴（油中水滴）を用いて、個々の細胞を経時計測する系の構築を試みた。3. 脂肪前駆細胞スフェロイドのための、シェル内培養系の構築：1 細胞培養系よりも分化効率の上昇が見込まれる脂肪前駆細胞スフェロイド系を経時計測するため、各スフェロイドを独立に培養可能な、ハイドロゲルを用いたシェル型培養ユニットの構築を試みた。

【結果】1. 脂肪細胞 1 細胞分化誘導系の開発：各種ハイドロゲルの中でも、特にコラーゲンゲル内で、一定割合の脂肪前駆細胞が分化することが明らかとなった。2. 1 細胞経時計測系の開発・概念実証：マイクロ液滴内で細胞を培養する系の構築に成功し、マイクロ液滴の物理的位置を固定することが可能なマイクロデバイスを開発することで、1 細胞経時計測を達成した。3. 脂肪前駆細胞スフェロイドのための、シェル内培養系の構築：アルギン酸とアガロースという、異なる性質をもったハイドロゲルを組み合わせることで、1 クローンスフェロイドを培養可能な、シェル型培養ユニットの構築に成功した。

本研究の概要



193. 経時的 1 細胞計測によるベージュ脂肪前駆細胞の同定

服部　一輝

東京大学 先端科学技術研究センター

Key words：ベージュ脂肪細胞，1 細胞計測，マイクロ液滴

緒　言

世界には 10 億人以上の肥満患者がいると報告されているにも関わらず、広範に適用可能な治療法は依然存在しない［1，2］。一つの有望な戦略は、熱産生によってエネルギーを消費する細胞であるベージュ脂肪細胞を増加させるというものであるが、治療法としての確立には至っていない［3］。大きな課題の一つは、組織内の多様な前駆細胞集団の中で、ベージュ脂肪細胞の前駆細胞が同定・単離が達成されていないことであると考える。組織の前駆細胞集団には、エネルギー消費能を持たない白色脂肪細胞への分化指向性が高い前駆細胞なども含まれていると考えられるが、ベージュ脂肪細胞への分化指向性の高い前駆細胞を選別する手段は確立されていない。

そこで本研究では、ベージュ脂肪細胞の前駆細胞を形態学的に同定し、選別可能にすることで、新たな抗肥満戦略構築のための技術基盤を確立することを目標とした。ベージュ脂肪細胞の前駆細胞を形態学的に同定するためには、(1) 1 細胞の分化を非侵襲的に経時計測する技術、(2) 計測結果に基づき細胞を分取する技術の 2 つが必要となるが、現時点で、この 2 要素を併せ持つ系は存在しない。そこで我々は、これら解析技術基盤の開発を進めた（図 1）。

具体的にまずは、ハイドロゲル内の三次元培養系で脂肪前駆細胞を分化させる条件を検討した。続いて、1 細胞経時計測系を開発し、その概念実証実験として、細胞外小胞放出の 1 細胞経時計測を達成した［4］。さらに、脂肪細胞分化の効率を上昇させるべく、脂肪前駆細胞のスフェロイド形成法を検討し、単一スフェロイドを経時計測するための培養方法も構築した。

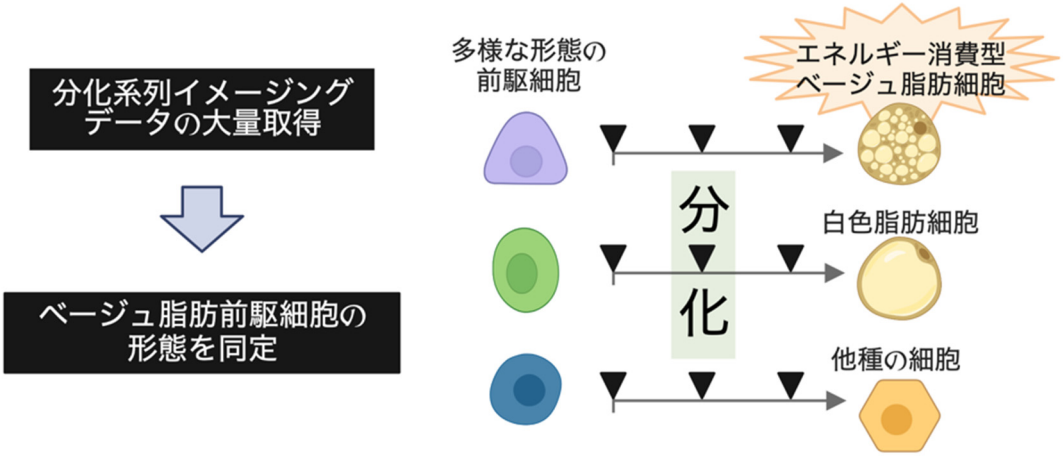


図 1. 概念図

本研究では、それぞれの脂肪前駆細胞が分化する過程で、その形態の経時変化を大量細胞から取得する。そして、脂肪分化が完了したのちに、情報を遡ることでベージュ脂肪前駆細胞の形態を同定する。

方法および結果

1. 脂肪細胞１細胞分化誘導系の開発

脂肪前駆細胞が１細胞単独で培養されている状態でも、脂肪細胞へと分化する条件を見出した。脂肪細胞を分化させる際には通常、培養ウェルの底面一面に細胞が敷き詰められた環境で培養を行う。しかしながら、1 細胞ごとの形態情報を正確に捉え、分取することを目的とするにあたって、それぞれの細胞が空間的に隔離された環境での分化誘導に挑んだ。具体的には、三次元培養系を用いて、分化誘導可能な条件を探索した。コラーゲンやアルギン酸をはじめとする、さまざまなハイドロゲルをさまざまな濃度で準備し、それら三次元ハイドロゲルの中に脂肪前駆細胞を封じ込めた。そして、薬剤による分化誘導刺激を加え、脂肪分化能を検討した。その結果、コラーゲン内で培養した際に、空間的に他細胞とは隔絶された環境に存在した細胞の一部が、脂肪細胞へと分化することを確認した。

2. １細胞経時計測系の開発・概念実証

続いて、マイクロ流体技術を活用し、250 pL という微小な液滴（油中水滴）に１細胞を封じ込め、経時計測する系を開発した。具体的には、細胞を含んだ直径 80 μm 程度の球状の液滴を、1 cm 四方のマイクロ流体デバイスの中に大量に敷き詰めることで、300 以上の細胞一つ一つからの細胞外小胞放出を 36 時間にわたって計測することを可能にした（図 2）。まず、液滴内に細胞と培地を共封入することで、液滴内細胞培養系を整えた。これに際し、細胞の生存率を最大化するべく、培地条件、液滴サイズ等を最適化した。そしてこの微小培養系を、1 分間に１万個以上というスピードで高速・大量調製することに成功した。さらには、特殊なマイクロデバイスを設計することで、それぞれの液滴の物理的位置を固定し、同一液滴、すなわち、同一細胞を経時計測することを可能にした。微小液滴培養系が大量に敷き詰められたマイクロデバイスは、顕微鏡用培養システムの中に設置し、自動化ステージを活用することで、長時間に亘る、大量細胞の自動経時計測を達成した（図 2）。

この計測系の概念実証実験として、蛍光ラベルした細胞外小胞を放出する細胞を液滴内に封じ込め、液滴内に放出・蓄積される「光る細胞外小胞」の量を高感度に追跡することで、各細胞からの細胞外小胞放出ダイナミクスを計測することに成功した。そして、各細胞が一つの細胞から二つの細胞へと増殖する一連の過程での細胞外小胞放出を、連続的に計測することに成功した。その結果、細胞が分裂するタイミングで、細胞外小胞の放出が特に亢進することを明らかにし、論文報告した（図 3）[4]。

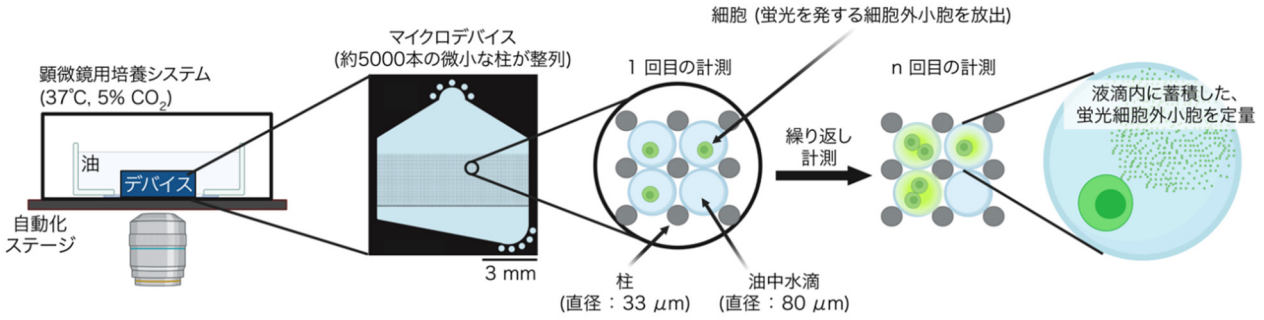


図 2. 開発した１細胞経時計測系
大量の１細胞ダイナミクスを多点で計測することが可能なプラットフォームを開発した。その概念実証として、蛍光ラベルした細胞外小胞の放出ダイナミクスを 36 時間に亘って計測した。

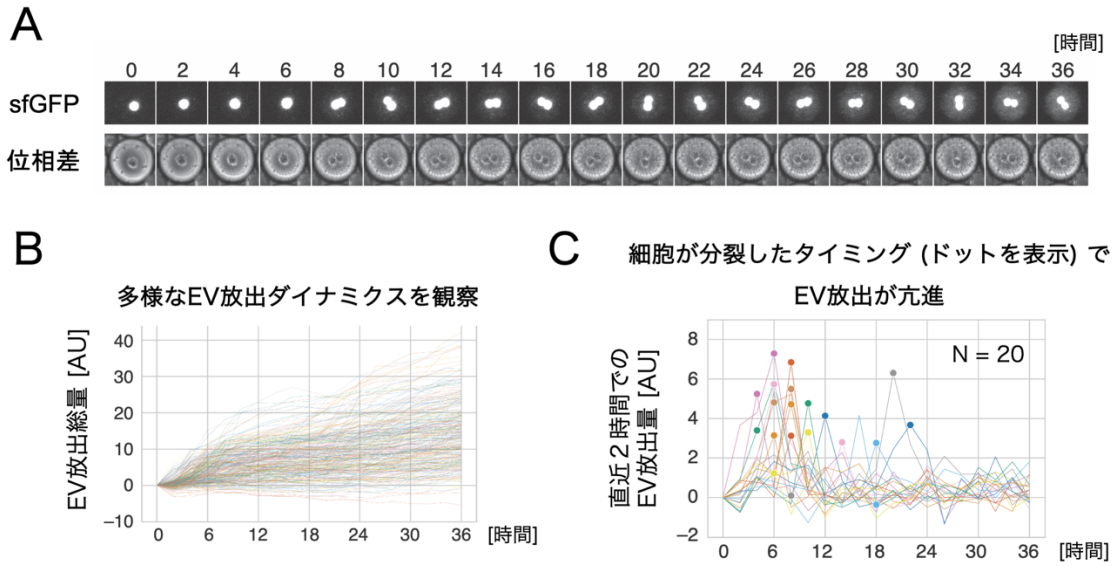


図 3. 1 細胞ダイナミクスの計測の実証（細胞外小胞放出の経時計測）

A） CD9-sfGFP でラベルした細胞外小胞が、微小液滴内に蓄積していく様子を捉えた、蛍光および位相差画像。液滴内・細胞外の領域に sfGFP のシグナルが蓄積している。注目すべきことに、8 時間の時点で細胞が分裂した様子が見て取れる。

B） 332 細胞からの細胞外小胞放出総量を並列計測した結果。放出量は、Python を用いた解析プログラムにより、計算している。

C） ランダムに選別した 20 細胞における、2 時間ごとの細胞外小胞放出量を計算した結果。細胞分裂のタイミングで細胞外小胞の放出量が顕著に亢進していることを見出した。

3. 脂肪前駆細胞スフェロイドのための、シェル内培養系の構築

脂肪前駆細胞がスフェロイドを形成することを確認し、さらに、各スフェロイドをユニット化するためのシェル型培養システムを構築した。結果 1 の項目で示した通り、他の細胞から空間的に隔離された細胞でも脂肪細胞へと分化しうることは確認できた。一方で、その効率は非常に低く、より高効率に脂肪細胞分化を誘導できる系が求められた。そこで、細胞間相互作用を維持した系として、スフェロイド形成法の検討を試みた。脂肪前駆細胞 1 細胞からスフェロイドを形成させることで、クローナルな細胞集団を作りつつも、充分な細胞間相互作用によって分化効率を上昇させることがねらいである。実際に、低吸着型 96 ウェル、および、384 ウェルプレート内に異なる濃度の脂肪前駆細胞を播種し、2〜4 日程度培養を行うと、スフェロイドが形成されるということを確認した。つづいて、各スフェロイドを図 2 で示したマイクロデバイス中などで経時計測するため、ハイドロゲルを用いたシェル型の培養ユニットを開発した。具体的には、アルギン酸をコア、アガロースをシェルとした、二重ゲル構造を作製した後、アルギン酸を溶解させることにより、アガロースシェルの構築に成功した（図 4）。

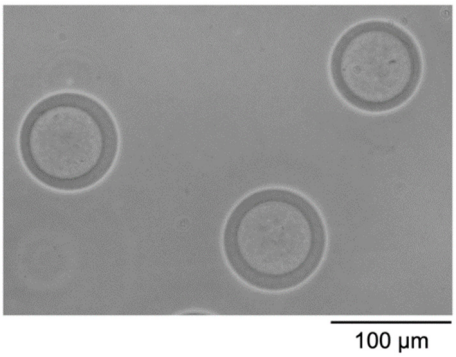


図 4. ハイドロゲルを用いた、シェル型の培養ユニット
中空構造のアガロースシェルの位相差画像。このシェル型ユニット内でスフェロイドを培養することを目指す。

考　察

脂肪細胞の分化を、1 細胞もしくはスフェロイドで経時計測する技術基盤が整いつつある。一方で、大量細胞の分化系列トラッキングを行うためには、いくつかのハードルを超える必要がある。1 細胞での分化トラッキングを実施するためには、現状よりも高効率に分化を誘導できる三次元培養系の開発が必要となる。他方、スフェロイドでの分化トラッキングのためには、シェル内で 1 細胞由来のスフェロイド形成が可能か、また、スフェロイドでの脂肪分化誘導が可能か、などの検討が必要となる。

本研究提案の達成によって、非侵襲的な形態解析を用いたベージュ脂肪前駆細胞の予測が実現すれば、高純度に当該細胞を収集することが可能となる。そして、選別した純度の高い細胞を用いて、薬剤探索スクリーニングや、細胞治療のための細胞調製が実現することを期待している。

共同研究者・謝辞

脂肪前駆細胞は、東京大学先端科学技術研究センターの酒井寿郎博士よりご供与頂いた。また、1 細胞経時計測系の開発・概念実証は、東京大学医学系研究科の小嶋良輔博士、および、東京医科大学医学総合研究所の吉岡祐亮博士との共同研究である。

文　献

1） Tremmel M, Gerdtham UG, Nilsson PM, Saha S. Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review. Int. J. Environ. Res. Public Health 14(4), 435, (2017), PMID: 28422077, DOI: 10.3390/ijerph14040435

2） Pilitsi E, Farr OM, Polyzos SA, Perakakis N, Nolen-Doerr E, Papathanasiou AE, Mantzoros CS. Pharmacotherapy of obesity: Available medications and drugs under investigation. Metabolism 92:170–192 (2018), PMID: 30391259, DOI: 10.1016/j.metabol.2018.10.010

3） Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM. New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. Cell Metabolism 29(1):27–37 (2019), PMID: 30503034, DOI: 10.1016/j.cmet.2018.11.002

4） Hattori, K., Goda, Y., Yamashita, M., Yoshioka, Y., Kojima, R., and Ota, S., Droplet array-based platform for parallel optical analysis of dynamic extracellular vesicle secretion from single cells, Anal. Chem. 94, 32, 11209–11215 (2022), PMID: 35797226 DOI: 10.1021/acs.analchem.2c01609