

動物培養細胞を用いた非アルコール性脂肪肝の *in vitro* モデル系の構築†

波津優花*, 山本晃久*, 本松由依**, 薩 秀夫**

1 はじめに

飽食・過食の時代と言われて久しい今日、生活習慣病およびその複合した病態であるメタボリックシンドロームの増加は大きな社会的問題であり、その治療・予防は国民的・社会的に大きな関心事となっている。特に生活習慣病の中でも、飲酒歴がないにもかかわらずアルコール性脂肪肝症状に類似した肝機能障害である非アルコール性脂肪肝（非アルコール性脂肪性肝疾患, non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD）が近年注目されている。NAFLD は世界的に患者数が増加している肝疾患であり、肝疾患では最も患者数の多い common disease の一つである。NAFLD は日本においても“肝臓の生活習慣病”とも呼ばれ、その患者数は増加傾向にあり、現在 1000 万人以上と推定されている。また近年では NAFLD 患者数は中高年者に加えて若年者の増加もみられ、食生活の乱れ・さらなる食の欧米化が原因と推測されている。

NAFLD を含めた脂肪肝は、かつては良性疾患と思われていたが、最近では非アルコール性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) へと進展し、NASH が悪化すると肝線維化や肝硬変、さらには肝細胞がんといった重篤な疾患につながる事が知られている。さらに最近の研究では、NAFLD は肝臓疾患のみならず高血圧や糖尿病といった様々な生活習慣病の発症とも密接な関係があることがわかってきている。したがって、肝硬変・肝細胞がんといった重篤な肝疾患に加え多様な生活習慣病を予防する観点からも、NAFLD を食品成分によって予防・改善するというアプローチは極めて意義が高いと考えられる。

しかしながら、数多くの食品成分の中から NAFLD に対する予防効果が期待される食品成分を探索するには、NAFLD モデル系・評価系が必要と考えられる。NAFLD/NASH の予防が期待される食品成分の評価・解析法としては、マウスに高脂肪食を 12 週間摂取させることで NAFLD 状態を誘導するマウスモデル¹⁾、またガラクトサミンのマウス腹腔内投与によって誘導する NASH モデルなどが一部で報告されているが、あくまで動物を用いた系であり、動物飼育施設が必要である。またマウスなど動物を用いた評価系であることから、倫理的観点からも多くの実験動物を用いて様々な食品成分について検討することは困難であるのが現状である。

一方で株化細胞を用いた *in vitro* 評価系では、実験動物を用いる際のような倫理的問題もなく、通常の細胞培養設備を用いて簡便に多くの食品成分に関するスクリーニングが可能である。

そこで著者らは、先行例²⁾を元に動物培養細胞を用いて *in vitro* NAFLD モデル系の構築を試みることにした。さらに、先に報告されている *in vitro* モデル系²⁾を改良し、より好適な *in vitro* NAFLD モデル系の構築を目指した。

2 動物培養細胞を用いた *in vitro* NAFLD モデル系の構築

2・1 ヒト肝由来 HepG2 細胞の培養

ヒト肝由来モデル細胞として、HepG2 細胞を用いることとした。HepG2 細胞は、10%の牛胎児血清と抗生物質を適量含むダルベッコ変法イーグル培地を用いて 100 mm ディッシュに培養した。2, 3日に1回培地交換をおこない、細胞が80%程度のコンフルエントの状態になるとトリプシンを用いて継代操作をおこなった。

2・2 HepG2 細胞における脂肪滴蓄積の誘導

HepG2 細胞を 24 well plate に 1×10^5 cells/well で播種し、37°Cで培養後、翌日 5% BSA を含む無血清培地に置き換えて、さらに培養した。24 時間後に 5% BSA 含無血清培地 (control) または遊離脂肪酸であるパルミチン酸 (PA)、オレイン酸 (OA)、また PA と OA の両方 (遊離脂肪酸 Mix) をそれぞれ含む 5% BSA 含無血清培地に置き換えて、さらに 24 時間インキュベートした。

24 well plate の各 well から培地を除き、細胞を 500 μ L/well の PBS で 2 回洗浄した。4%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液を 165 μ L/well 加え、1 時間室温で放置し細胞を固定した。パラホルムアルデヒド/PBS 溶液を除き 200 μ L/well の Milli-Q 水で 2 回洗浄後、ろ過した 0.5% Oil red O/60% 2-プロパノール溶液を 250 μ L/well で加え、30 分間 37°Cでインキュベートした。染色後、60% 2-プロパノール 750 μ L/well で 1 回洗浄し、Milli-Q 水を 300 μ L/well 加えた。細胞の染色状態を顕微鏡観察後、Milli-Q 水を取り除き、2-プロパノール 200 μ L/well を添加し、5 分間振とうして Oil red O を溶出させた。96 well plate に各溶出サンプルを全量入れ、Microplate Reader Model 680 にて波長 490 nm で吸光度を測定した。

2・3 遊離脂肪酸が HepG2 細胞における脂肪滴蓄積に及ぼす影響

HepG2 細胞を 5%の遊離脂肪酸不含 BSA を含む無血清培地で 24 時間培養後、0.5 mM の PA, OA, 遊離脂肪酸 Mix (PA : OA = 1 : 1) を含む 5% BSA 含無血清培地に置き換えてさらに 24 時間インキュベートした。その後、Oil red O 染色で脂肪滴の蓄積を顕微鏡観察し、さらに吸光度を測定した。その結果、遊離脂肪酸 Mix 添加群ではコントロールに比べ脂肪滴の染色が観察された (Fig.

† 原稿受理 令和 2 年 2 月 28 日 Received February 28, 2020

* 生物工学専攻 食品生理機能工学研究室

** 生物工学科 食品生理機能工学研究室

1(A)). また吸光値の結果では、遊離脂肪酸 Mix 添加群で脂肪滴蓄積が増加する傾向が確認された (Fig. 1(B)).

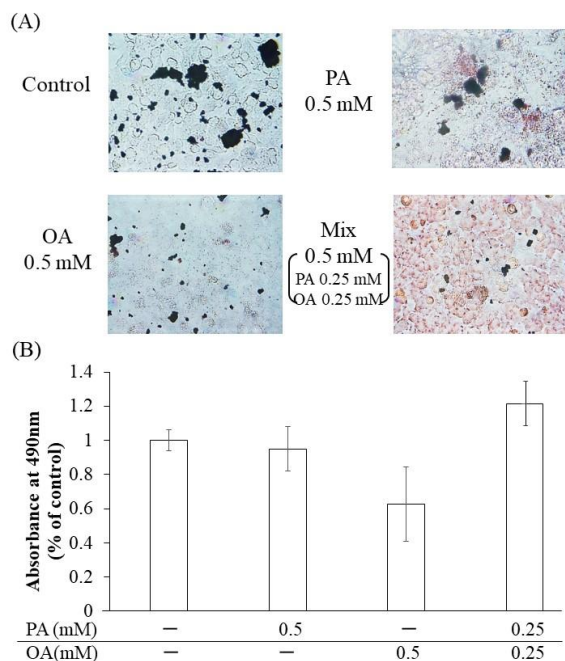


Fig. 1 無血清培地に添加した遊離脂肪酸が脂肪滴蓄積に及ぼす影響

(A) Oil red O 染色の顕微鏡画像 (B) 吸光度

2・4 遊離脂肪酸による脂肪滴蓄積誘導時の培地条件の検討

2・3にて遊離脂肪酸 Mix の添加によって、脂肪滴の染色が観察された。しかしながら吸光値で定量化したところでは、有意な吸光値増加はみられずに増加傾向にとどまった。また2・3の方法では、毎回安定して明確に観察できない場合もみられ、*in vitro* NAFLD モデル系の改良をおこなう必要が考えられた。

そこで前節の評価系からの改良として、HepG2 細胞を 24 well plate に播種した翌日に、無血清培地ではなく血清を含む培地（通常の培地）に PA, OA および遊離脂肪酸 Mix を 0.5 mM となるようにそれぞれ添加した。24 時間インキュベート後、Oil red O 染色で脂肪滴の蓄積を顕微鏡観察し、さらに吸光度を測定した。

その結果、Oil red O 染色では、特に OA と遊離脂肪酸 Mix による脂肪滴蓄積がより顕著かつ安定に観察された (Fig. 2(A))。また吸光値でも有意な増加が確認され (Fig. 2(B))、特にコントロール群を 1 とした場合 0.5 mM の遊離脂肪酸 Mix 添加群では、約 3 倍の吸光値を示した。

以上の結果より、「無血清培地での 24 時間培養+遊離脂肪酸を無血清培地に添加」といった条件から「無血清培地での培養をやめ、血清含培地+遊離脂肪酸を血清含培地に添加」に改良することによって、遊離脂肪酸による脂肪滴蓄積がより明瞭に染色が観察でき、また定量値も顕著に増加した。

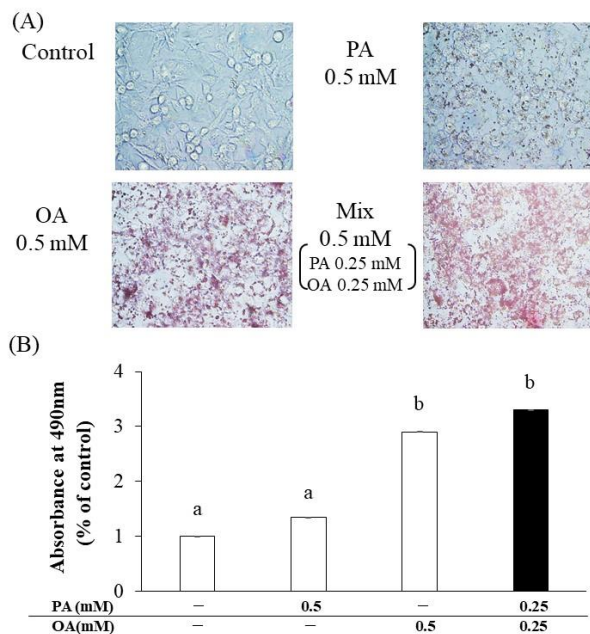


Fig. 2 血清含培地に添加した遊離脂肪酸が脂肪滴蓄積に及ぼす影響

(A) Oil red O 染色の顕微鏡画像 (B) 吸光度 (Tukey's test, 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$))

3 まとめ

本研究では、NAFLD を予防する食品成分を幅広く探索（スクリーニング）するための評価系として、ヒト肝モデル HepG2 細胞を用いて *in vitro* NAFLD モデル系の構築を目指した。まずプロトコル集などに記載されているとおり²⁾、無血清培地+遊離脂肪酸の条件を用いた結果、ある程度の脂肪滴の蓄積は観察された (Fig.1)。しかしながら、遊離脂肪酸による脂肪滴蓄積の誘導は十分ではなかった。そこで、無血清培地ではなく通常の血清を含む培地に遊離脂肪酸を加えて添加したところ、脂肪滴の蓄積は染色、吸光値ともに顕著に観察された (Fig.2)。この結果、HepG2 細胞の播種から Oil red O 染色までの評価日数も 4 日から 3 日へと短縮でき、より効率的に食品成分の探索をおこなうことが可能となった。今後は今回構築・改良された *in vitro* NAFLD モデル系を用いて、NAFLD 予防が期待される食品成分の探索を進める予定である。

参考文献

- 1) S.H. Ibrahim, et al., Animal models of nonalcoholic steatohepatitis: eat, delete, and inflame, *Dig. Dis. Sci.*, **61**(5), 1325-1336 (2016).
- 2) 江頭祐嘉合, HepG2 細胞を用いた脂肪蓄積評価, 機能性食品開発のための初期評価試験プロトコル集, シーエムシー出版, 113-116 (2017).