

## 原著論文

# マウス線維芽細胞3T3-L1のアディポネクチン分泌におけるウシ胎児血清 (FBS) 代替品血清 EquaFETAL<sup>®</sup> を使用した実験条件の検討

飯塚 讓

東京女子医科大学医学部 微生物学免疫学分野

## Effects of the fetal bovine serum alternative “EquaFETAL<sup>®</sup>” on the lipid content and adiponectin secretion in 3T3-L1 adipocytes

Yuzuru Iizuka

Department of Microbiology and Immunology, Tokyo Women’s Medical University School of Medicine

### 要旨

**【目的】** ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum : FBS) は、脂肪細胞に分化する性質を有するマウス線維芽細胞 3T3-L1 を培養する上で良く利用されている。本研究は、汎用性とコスト面を考慮した FBS に代わる手段を提案することを目的とし、FBS 代替品血清が 3T3-L1 に及ぼす影響を調べた。

**【方法】** FBS 代替品血清 EquaFETAL を使用して 3T3-L1 の分化誘導を行い、脂肪滴の蓄積量とアディポサイトカインの一種であるアディポネクチン分泌量を経時的に測定した。さらに、分化誘導後 Day 8 と Day 14 において、アディポネクチン分泌が誘導される条件を検討した。

**【結果】** 3T3-L1 の培養に FBS 代替品血清を使用することで、脂肪滴の蓄積能を有する脂肪細胞に分化誘導可能であることが示された。アディポネクチンの基礎分泌量に対しては、FBS 代替品血清が分化誘導開始後 Day 8 ~ 10 をピークに、FBS 血清培養条件と比べて早い段階から減少させる可能性が示唆された。アディポネクチン分泌誘導因子の効果は、今回の実験条件では確認できなかった。

**【結論】** 本研究で得られた知見は、3T3-L1 を FBS 代替品血清で分化誘導した報告が少ない現状において、意義のある基礎的データとなりうると考えられる。しかしながら、アディポネクチン分泌が誘導および維持される条件は、今後さらに詳細な検討を行う必要がある。

**キーワード :** 3T3-L1、FBS 代替血清、脂肪細胞分化、アディポネクチン

**Key Words:** 3T3-L1, fetal bovine serum alternative, adipocyte differentiation, adiponectin

## I. はじめに

現代は、飽食に伴うエネルギーの過剰摂取、身体活動の低下によるエネルギー消費量の減少といった、ライフスタイルの乱れから引き起こされる肥満が問題となっている。肥満状態では、過剰な中性脂肪が脂肪細胞に蓄積することで、脂肪細胞の肥大化が生じる。肥大した脂肪細胞からは tumornecrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、interleukin-6 (IL-6)、monocyte chemoattractant protein 1 等の

炎症性サイトカインおよび多量の遊離脂肪酸が放出され、全身の糖・脂質代謝に悪影響を及ぼすことが知られている (Cusi, 2010 ; Suganami et al., 2010)。正常な脂肪細胞は糖・脂質代謝改善作用、抗炎症作用を有するサイトカインであるアディポネクチンを分泌していることも明らかになり (Kadowaki et al., 2005)、脂肪細胞の内分泌機能に関する研究は著しく進展してきた。特に近年は、健康志向の高まりから肥満や生活習慣病の予防と改善に関心が集まり、これらの予防効果を有する

食品由来成分に関する研究が多くなされている。

機能性成分のヒトに対する有効性について、最終評価をするためには臨床試験を実施すべきであるが、機能性成分の探索研究を行う場合は簡便な手法が適している。その一つである細胞実験は、主に初代培養細胞と株化された培養細胞を用いる方法が挙げられ、後者は初代培養細胞と比較して結果の再現性が高く、扱いが容易であるという利点がある。株化された培養細胞であるマウス線維芽細胞3T3-L1は、比較的簡単に脂肪細胞への分化が可能であり、脂肪細胞を対象として機能性成分の抗肥満効果を検討する際に有力な選択肢の一つとなる。

3T3-L1の分化誘導法はすでに確立されており、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、デキサメタゾン、インスリンの存在下で培養することで、鋭角的な形状である前駆脂肪細胞から、脂肪細胞に特徴的な円形細胞に形態が変化する(Rubin et al., 1978)。分化に伴い、脂肪蓄積、アディポサイトカイン産生といった脂肪細胞としての特性を示すようになるため、実験目的に合わせて分化誘導条件を精査することが重要である。加えて、3T3-L1の分化に影響を与える要因は多く存在していることから、優れた分化能を示す実験条件を確立することが必要となる。

細胞培養は通常、細胞の成長に必要な栄養素を添加した「培地」と呼ばれる液体の中で行う。さらに、培地には動物の血清を加えることが多く、ウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum:FBS)が良く利用されている。血清には細胞の増殖因子および増殖に必要な栄養素、各種ホルモン等が含まれ、細胞の増殖に大きく影響することが、多くの研究によって明らかになっている(Hayashi et al., 1976; Kuri-Harcuch et al., 1978; Morikawa et al., 1982; Kawada et al., 1990)。しかしながら、血清の構成成分は採取した動物個体により異なるため、それぞれのメーカー、ロット等の違いにより性能に差が生じるという欠点がある(江口ら, 2012)。動物血清を用いて細胞実験を行う際は、有害成分を含有しない、増殖および分化の度合いが優れている、再現性のある結果が得られる等、高い性能を有する血清を選出することが望ましいと考えられる。

このような血清の良否による影響は、代替製品を使用することで低減できる可能性がある。無血清培地は、血清の代わりとして血清に含まれる既知の成長因子を添加した培地であり、成分が明確で一貫性があるという利点がある。一方、価格が高価で使用可能な細胞種が決まっていることから、使用できる研究環境および条件に限られるという欠点がある。FBS代替品は、製品により製造方法は様々であるが、免疫グロブリン、成長因子、総タンパク質含有量等の成分が均質かつFBSと同等であり、ロットの違いによる組成の差が小さいとされている。また、FBSより安価であるという利点もあり、汎用性とコスト面を考慮すると、比較利用しやすい代替手段であると考えられる。FBSと比べると文献数は限られているが、FBS代替品を使用して3T3-L1を培養した研究もなされている(Tseng et al., 2008; Zemmyo et al., 2019)。しかしながら、3T3-L1に対する影響は完全には検討されておらず、冒頭で上述したアディポサイトカインの分泌に対するFBS代替品の挙動は明らかになっていない。

FBSに対するFBS代替品の性能を評価する際、比較対照となるFBSの構成成分のロット差で、FBS代替品による実験結果の見解が変わることが推察される。西ら(1983)は、3種類の培養細胞に対して8社48ロットのFBSを選別した結果、3種類すべての細胞に使用可能なロットは2割弱であったと報告している。このように、完全な比較対象となり得るFBSの選出は困難であるため、FBS代替品の評価を行うにあたり、FBSを使用した複数の文献と比較することが、妥当性を確保できる一つの手段となると考えられる。

そこで本研究では、FBS代替品を用いて優れた分化能とアディポネクチン分泌能を示す3T3-L1の実験条件を明らかにすることを目的とした。具体的には、FBS代替品血清EQUA FETAL(以下、「FBS代替品血清」と記載)を添加した培地で3T3-L1の培養・分化誘導を行い、分化誘導期間による脂肪蓄積およびアディポネクチン基礎分泌量の変化、アディポネクチン分泌誘導因子に対する感受性の有無を調べ、FBSを使用した他文献と参照することで評価した。

## II. 材料と方法

### 1. 試料

マウス線維芽細胞3T3-L1は、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所JCRB細胞バンクから分譲を受けた(登録番号: JCRB9014)。3T3-L1は、FBS代替品血清EquaFETAL (Atlas Biologicals, Inc.) を10% (v/v) 濃度、ペニシリン-ストレプトマイシン (Penicillin-Streptomycin: PS) 溶液 (富士フィルム和光純薬株式会社) を1% (v/v) 濃度になるように添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM) (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いて、5% CO<sub>2</sub>、37°C条件下で培養した。3-イソブチル-1-メチルキサンチン (富士フィルム和光純薬株式会社)、デキサメタゾン (Sigma-Aldrich Co. LLC.) およびピオグリタゾン塩酸塩 (富士フィルム和光純薬株式会社) は、ジメチルスルホキシド (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) (富士フィルム和光純薬株式会社) に溶解させてストック溶液を作成した。各試薬を培地に添加する際は、DMSO濃度が0.1% (v/v) 以下となるようにした。必須アミノ酸は、MEM必須アミノ酸溶液 (×50) (富士フィルム和光純薬株式会社) を使用し、推奨量として10% EquaFETAL、1% PS含有DMEMに50倍希釈となるように添加した。

### 2. 分化誘導

分化誘導はSongら (2017) の方法を一部改変して行った。具体的には、6-wellプレートに播種し

た3T3-L1が100% コンフルエントに達して2日後に、3-イソブチル-1-メチルキサンチンを0.5mM、デキサメタゾンを1μM、インスリン(Sigma-Aldrich Co. LLC.) を10μg/mLの濃度になるように添加した10% EquaFETAL、1% PS含有DMEMに交換した (Day 0)。その後、2日毎に10μg/mLインスリン、10% EquaFETAL、1% PS含有DMEMに交換した (Day 2、4、6、8、10、12)。脂肪細胞への分化は、前駆脂肪細胞に認められる鋭角的な形状 (図1A) から、脂肪細胞に特徴的な円形細胞 (図1B) への形態学的な変化と、Oil Red O染色による細胞内脂肪量の定量結果により確認した。本研究における3T3-L1の観察および撮影には、すべて位相差顕微鏡AE2000 (株式会社島津理化) と顕微鏡デジタルシステムMoticam1000 (株式会社島津理化) を使用した。

### 3. Oil Red O染色

3T3-L1の分化誘導開始後、Day 0、2、8、10、12、14において、細胞内に形成された脂肪滴を観察するためOil Red O染色した。3T3-L1をりん酸緩衝食塩水 (富士フィルム和光純薬株式会社) で1回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (富士フィルム和光純薬株式会社) で15分間固定後、60% (v/v) イソプロパノールにより1分間脱水した。次に、5mg/mL Oil Red O (富士フィルム和光純薬株式会社) 含有イソプロパノール: 超純水 = 3 : 2の割合で調製したOil Red O溶液で30分間染色した後、超純水で2回洗浄し、位相差顕微鏡下で観察した。観察後の細胞を60%

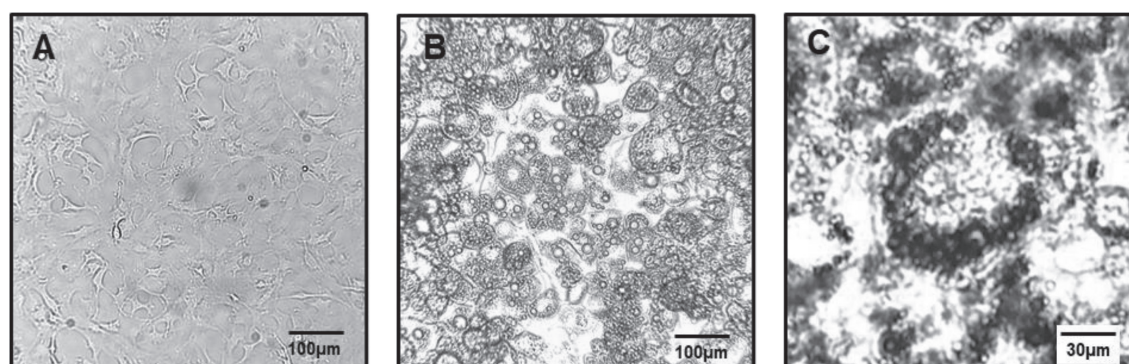


図1 3T3-L1の脂肪細胞分化とOil Red O染色像

(A) 分化誘導前の3T3-L1、(B) 分化誘導開始後Day14の3T3-L1、(C) 分化誘導開始後Day14の3T3-L1におけるOil Red Oの染色像。



イソプロパノールで洗浄し、4% (v/v) Nonidet-P40 (Sigma-Aldrich Co. LLC.) 含有イソプロパノールを加えて5分間振とうすることで、色素抽出液を得た。これを紫外可視分光光度計UV-1800 (株式会社島津製作所) を使用して500nmの吸光度を測定し、細胞内脂肪滴の定量を行った。

#### 4. 培地中アディポネクチン濃度の測定

3T3-L1のアディポネクチン基礎分泌量の測定では、分化誘導開始後Day 0、2、8、10、12、14において、PS溶液のみを1%濃度になるように添加したDMEMに交換した。これを24時間後に回収し、1600rpm、5分間遠心して得られた上清を、分析に供するまで-80°Cで凍結保存した。アディポネクチン分泌に対するピオグリタゾンの影響を検討する際は、分化誘導開始後Day 8、14において、PS溶液が1%濃度、ピオグリタゾン塩酸塩が10 $\mu$ M、20 $\mu$ Mになるように添加したDMEMに交換した。対照群の培地は、ピオグリタゾン塩酸塩溶液の代わりに同量のDMSOを添加した。これらを48時間後に回収し、上記と同様の処理を行い-80°Cで凍結保存した。培地中アディポネクチン量は、マウス/ラットアディポネクチンELISAキット (大塚製薬株式会社) を使用して測定した。なお、各DMEMの使用量は、6-wellプレート1 wellあたり2mLとした。

#### 5. 統計解析

すべての実験は3回の試験を繰り返し行い、得られたデータを平均値 (mean)  $\pm$  標準偏差 (SD) で示した。統計解析はエクセル統計 (株式会社社会情報サービス) を使用した。2群間の比較には対応のないt-検定、3群以上の比較は一元配置分散分析により、Tukey-kramer検定で各群間の比較検定を行い、 $P < 0.05$  で有意差ありとした。

### III. 結果

#### 1. FBS代替品血清を使用した3T3-L1の分化誘導条件下における脂肪量の推移

本研究では、まず初めに分化誘導開始後Day 0からDay14までの期間における脂肪蓄積量の変化を調べることで、FBS代替品血清を使用した3T3-L1の培養条件下で、分化に伴う細胞内脂肪滴の増加が認められるか確認した。

各分化誘導期間の代表的なOil Red Oの染色像と、吸光度の測定による定量結果を図2に示す。分化誘導開始後Day 0、2では、Oil Red Oによる染色がほとんど認められなかったが、Day 8以降において明らかな染色が確認された (図2 A)。各分化誘導期間における吸光度は、分化誘導開始後Day 0、2と比較して、それぞれDay 8、10、12、14で有意に高値を示した。Day 8以降における吸光度の平均値は、Day 10、12、14と分化誘導日数が経過するごとに、Day 8に対して、それぞれ約1.3倍、1.6倍、1.8倍の増加が認められた (図2 B)。

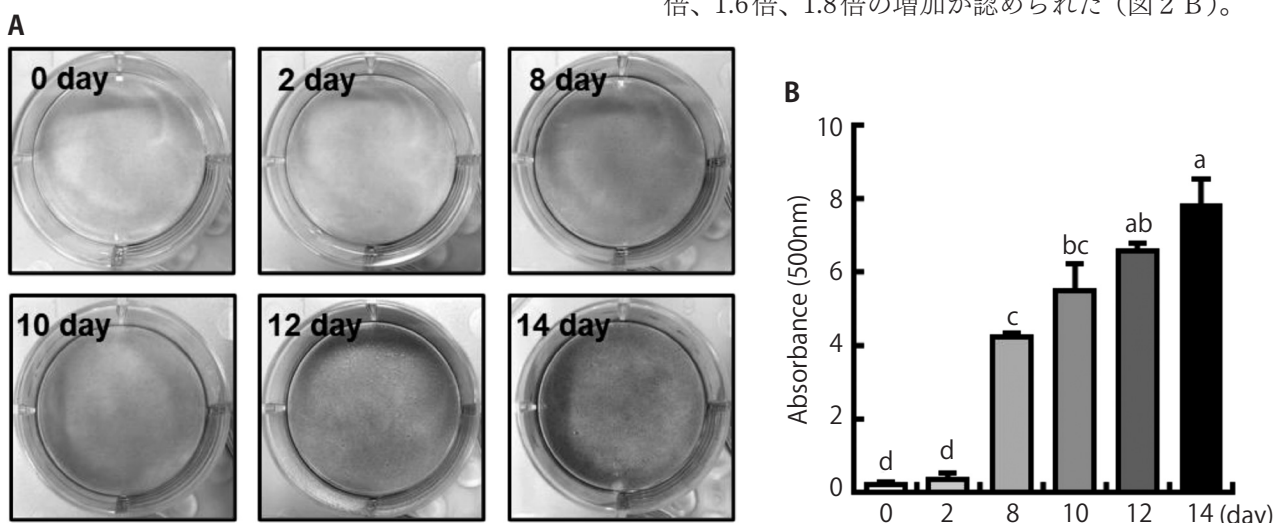


図2 3T3-L1の分化誘導に伴う脂肪滴蓄積量の推移

(A) Oil Red Oによる6-wellプレートの染色像、(B) Oil Red O染色の定量結果。データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した (n=3)。統計解析はTukey-kramer検定の多重比較法を使用し、有意水準は $P < 0.05$ とした。異なるアルファベット間で有意差有り。

## 2. 必須アミノ酸が3T3-L1の脂肪細胞分化に伴う脂肪蓄積に及ぼす効果

対照群および必須アミノ酸増量群の培地中必須アミノ酸量を表1、代表的なOil Red Oの染色像と、吸光度の測定による定量結果を図3に示す。分化誘導開始後Day14において、本研究の条件下ではOil Red Oの染色像と定量値ともに、培地中の必須アミノ酸を増量することによる影響は認められなかった(図3 A, B)。

## 3. FBS代替品血清を使用した3T3-L1の分化誘導条件下におけるアディポネクチン基礎分泌量の推移

分化誘導開始後Day 0、2、8、10、12、14における24時間のアディポネクチン分泌量を図4に示す。Day 0、2のアディポネクチン分泌は非常に少なく、Day 8以降から多くの分泌が認められるようになった。しかしながら、Day 8の培地中アディポネクチン量と比較すると、Day12、Day14は有意に低値を示し、分化誘導日数が経過するごとに減少する傾向があった(図4)。

## 4. FBS代替品血清を使用した3T3-L1培養条件下におけるアディポネクチン分泌の誘導

分化誘導開始後Day 8とDay14における、ピオグリタゾン添加後48時間の培地中アディポネクチン

ン量の変化を図5に示す。本研究では10 $\mu$ M、20 $\mu$ Mの濃度でピオグリタゾンに作用させたが、Day 8とDay14ともに、対照群と比較してアディポネクチン分泌の有意な変化は認められなかった(図5 A, B)。

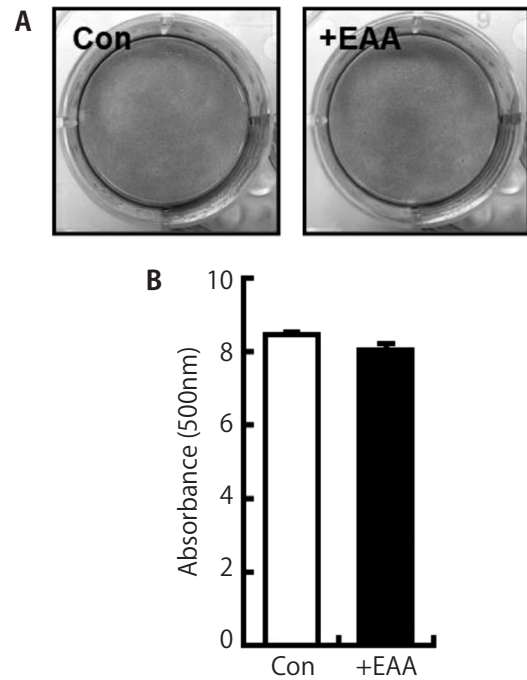


図3 必須アミノ酸の増量による脂肪滴蓄積量の変化

(A) Oil Red Oによる6-wellプレートの染色像、(B) Oil Red O染色の定量結果。分化誘導開始後Day14の3T3-L1を使用。データは平均値±標準偏差で示した(n=3)。統計解析はStudentのt-検定を使用し、有意水準はP<0.05とした。対照群はControl (Con) 群、必須アミノ酸増量群は+Essential Amino Acid (EAA) 群と表記。

表1 対照群と必須アミノ酸増量群の培地中アミノ酸濃度\*

Amino acids	Group	
	Con	+EAA
L-Arginine HCl	84.00	206.27
L-Cystine	48.34	70.92
L-Histidine HCl H <sub>2</sub> O	42.00	82.35
L-Isoleucine	105.00	154.31
L-Leucine	105.00	154.31
L-Lysine HCl	146.00	214.22
L-Methionine	30.00	44.22
L-Phenylalanine	66.00	97.06
L-Threonine	95.00	139.80
L-Tryptophan	16.00	25.69
L-Tyrosine	71.59	105.48
L-Valine	94.00	138.04

\*単位はmg/L。対照群はControl (Con) 群、必須アミノ酸増量群は+Essential Amino Acid (EAA) 群と表記。

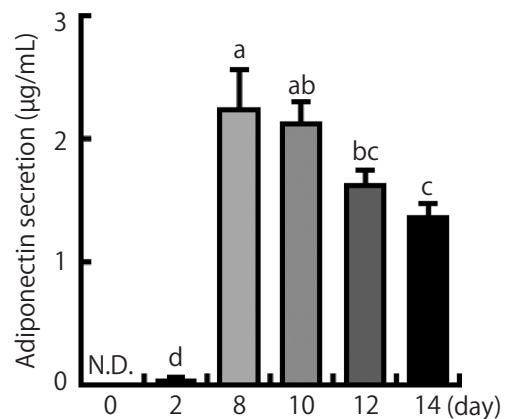


図4 3T3-L1の分化誘導に伴うアディポネクチン分泌量の推移

24時間のアディポネクチン分泌量。データは平均値±標準偏差で示した(n=3)。統計解析はTukey-kramer検定の多重比較法を使用し、有意水準はP<0.05とした。異なるアルファベット間で有意差有り。不検出の場合はNot detected(N.D.)と表記した。

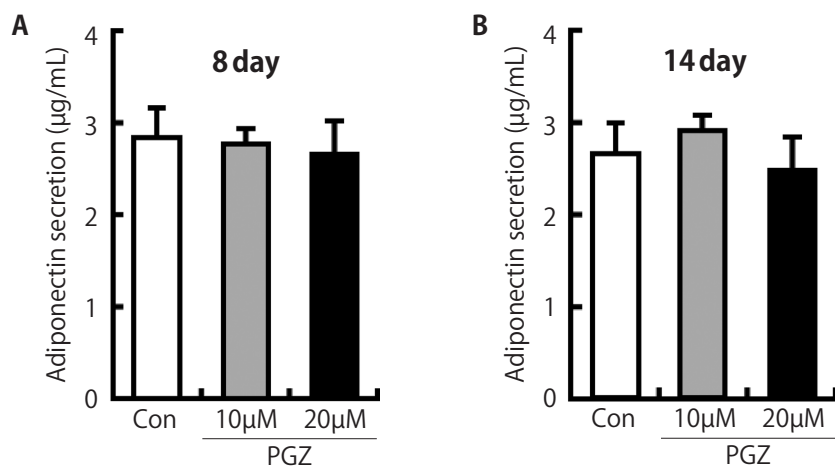


図5 ピオグリタゾン添加によるアディポネクチン分泌量の変化

48時間のアディポネクチン分泌量。データは平均値±標準偏差で示した (n=3)。統計解析はTukey-kramer検定の多重比較法を使用し、有意水準は $P<0.05$ とした。対照群はControl (Con) 群、ピオグリタゾン添加群はPioglitazone (PGZ) 群と表記。

#### IV. 考察

3T3-L1による細胞実験で用いられる血清について、培養と分化誘導にFBSを用いた文献 (Martins et al., 2020 ; Tamura et al., 2020)、培養を仔ウシ血清 (Calf Serum : CS)、分化誘導をFBSで行った文献 (Fan et al., 2019 ; Kwon et al., 2020) が見受けられる。培養にCS、分化誘導にFBSを用いたFuら (2005) の検討では、分化誘導開始後Day 0、2の3T3-L1において脂肪滴の蓄積は非常に少なく、Day 9以降で増加することが示されている。培養と分化誘導をFBSで行った沢谷ら (2008) は、分化誘導開始後Day 0ではほとんど脂肪蓄積が認められないが、Day 7以降で増加し、Day14で最も多く確認されたことを報告している。また、Sakuraiら (2009) は、3T3-L1の分化誘導開始後Day 4、8、12、16において、分化誘導期間に伴い脂肪滴の量が有意に増加することを明らかにしている。これらの報告と同様に、FBS代替品血清を使用して培養および分化誘導を行った本研究においても、Day 0、2と比較してDay 8以降で多くの脂肪滴が認められるようになり、Day 8からDay14の間で分化誘導期間に伴い脂肪滴の蓄積が増加した。FBS代替品血清を使用して3T3-L1を培養することで、脂肪滴の蓄積能を有する脂肪細胞に分化誘導可能であることが確認できた。

3T3-L1の分化誘導は、様々な因子によって促進

されることが明らかになっており、培地の構成成分としてはビタミンB<sub>6</sub>およびビタミンC (Kawada et al., 1990)、必須アミノ酸であるリシン (Kyoya et al., 2011) が挙げられる。必須アミノ酸は安価に購入が可能で、細胞の生存期間の延長、生合成における細胞への負荷減少といった作用も期待できることから、必須アミノ酸を増量した培地を使用して3T3-L1を培養・分化誘導し、脂肪滴の蓄積が促進されるか検討した。本研究では、必須アミノ酸溶液を製品の推奨濃度で使用したところ、分化誘導開始後Day14の3T3-L1に対して脂肪滴量を増加させるには至らなかった。後藤ら (2013) は、必須アミノ酸であるロイシンが3T3-L1の脂肪蓄積を抑制することを報告しており、脂肪滴蓄積能の向上を目的として必須アミノ酸溶液を使用する際は、有効濃度を検討することに加え、抑制的に作用するアミノ酸を除いた組成で培地に添加する必要があることが示唆された。ただし、フェニルアラニンといった一部のアミノ酸は脂肪細胞のアディポネクチン分泌を促進することが報告されている (Srinivasan et al., 2019)。アミノ酸添加培地で培養した3T3-L1を用いてアディポネクチン分泌促進因子を探索する場合は、添加されたアミノ酸自身による影響を考慮する必要があると考えられる。

脂肪細胞のアディポネクチン産生は、核内受容体の peroxisome-proliferator-activated receptor  $\gamma$



(PPAR $\gamma$ )によって制御されており、標的遺伝子であるアディポネクチン遺伝子の転写および翻訳が増加することが、アディポネクチン分泌が促進されるメカニズムの一つと考えられている (Maeda et al., 2001; Banga et al., 2009)。一方、TNF- $\alpha$ 、IL-6等の炎症性サイトカインは、アディポネクチンの遺伝子発現を低下させる (Fasshauer et al., 2002; Fasshauer et al., 2003)。脂肪細胞に分化した3T3-L1は、培養期間に伴って炎症性サイトカインの分泌が増加することが報告されており、アディポネクチンの分泌低下との関連が推察されている (Ito et al., 2007)。具体的には、FBSを用いて3T3-L1を分化誘導した文献において、アディポネクチン分泌は脂肪細胞への分化に伴って増加し、分化誘導開始後Day12をピークとして徐々に減少することが報告されている (Sato et al., 2013; Prostek et al., 2014)。本研究では、分化誘導開始後Day 8、10においてアディポネクチン分泌が最も多く、Day12以降で低下したことから、FBS代替品血清の使用はアディポネクチンの基礎分泌に対してピークを早める可能性が示唆された。今後は、分化誘導期間におけるPPAR  $\gamma$  発現の変化、炎症性サイトカイン分泌の推移について解析を行い、FBS代替品血清がアディポネクチン分泌に及ぼす影響を詳細に解明する必要があると考えられる。以上の結果をふまえて、FBS代替品血清使用時におけるアディポネクチンの基礎分泌量が多い分化誘導期間、少ない分化誘導期間をそれぞれDay 8、Day14として、アディポネクチン分泌誘導因子の影響を調べた。

PPAR $\gamma$ アゴニストであるピオグリタゾン、PPAR $\gamma$ の活性化を介してアディポネクチン分泌を増加させることから、3T3-L1を使用してアディポネクチン分泌の挙動を検討した研究において、ポジティブコントロールとして利用されている (Fukuen et al., 2005; Banga et al., 2009)。特に、FBSを使用したFukuenら (2005)の文献では、分化誘導開始後Day 7の3T3-L1に対して10 $\mu$ Mのピオグリタゾンを48時間作用させ、アディポネクチン分泌の有意な増加を確認している。この文献を参考に、本研究ではピオグリタゾンの濃度を10 $\mu$ M、20 $\mu$ Mとして48時間作用させたが、アディポネクチン分泌の

有意な増加は認められなかった。分化誘導開始後Day16の3T3-L1に、同様の時間で100 $\mu$ Mのピオグリタゾンを使用し、アディポネクチン分泌の増加を確認している文献 (Kanda et al., 2008)があることを考慮すると、FBS代替品血清を使用する条件下でピオグリタゾンを作用させる場合は、20 $\mu$ M以上の濃度で検討する必要があると考えられる。ピオグリタゾンを作用させた3T3-L1のアディポネクチンの遺伝子およびタンパク質発現を測定し、転写と翻訳、分泌の過程に及ぼす影響を調べる等、さらに詳細な検討を行う必要がある。

今後の解析が必要な点として、48時間のアディポネクチン分泌量を測定した図5の結果において、分化誘導開始後Day 8とDay14の対照群が同程度 (Day 8 : 2.833  $\pm$  0.337 $\mu$ g/mL) (Day14 : 2.666  $\pm$  0.324 $\mu$ g/mL)であったことも挙げられる。24時間のアディポネクチン基礎分泌量を測定した図4の結果では、分化誘導開始後Day 8が2.244  $\pm$  0.315 $\mu$ g/mL、Day14が1.353  $\pm$  0.115 $\mu$ g/mLとなり、これらの値から48時間の分泌量を推測すると、それぞれ約4.5 $\mu$ g/mL、約2.7 $\mu$ g/mLとなる。分化誘導開始後Day14の実測値はこれと同等であったが、予想外なことにDay 8においては大きな差が認められた。3T3-L1のアディポネクチン分泌が低下する要因として、上述した炎症性サイトカインの曝露に加え、酸化ストレスの関与も報告されている (Soares et al., 2005)。FBS代替品血清を使用して48時間培養することで、分化誘導開始後Day 8の条件においては、炎症性サイトカイン分泌や酸化ストレスの増加が急激に誘導された可能性がある。今後は、アディポネクチン分泌の抑制因子に対しても焦点を当てた条件検討が必要になると考えられる。

## V. 結論

FBS代替品血清を使用して3T3-L1を培養することで、脂肪滴の蓄積能を有する脂肪細胞に分化誘導可能であることが示された。分化誘導期間に伴うアディポネクチンの基礎分泌量は、比較的早い段階から減少する傾向があり、FBS代替品血清はアディポネクチン分泌量およびその維持に影響を与える可能性が示唆された。これらの知見は、FBS

代替品血清で培養した3T3-L1に関する報告が少ない現状において、意義のある基礎データとなりうると考えられる。しかしながら、アディポネクチン分泌誘導因子によるアディポネクチン分泌の促進作用は確認できなかった。3T3-L1を成熟脂肪細胞として再現性のある実験に用いるためには、培養・分化誘導および試薬を添加する条件を最適化することが重要となるため、今後さらに詳細な検討を行う必要があると考える。

## VI. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に御協力下さった皆様に深く感謝の意を表しますとともに、本研究は令和元年度淑徳大学学術奨励研究助成費を受けて実施したものであることを記し、厚く御礼申し上げます。

## VII. 利益相反

記載すべき利益相反はありません。

## 文献

- Banga, A., Unal, R., Tripathi, P., et al. (2009). Adiponectin translation is increased by the PPARgamma agonists pioglitazone and omega-3 fatty acids. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(3), E480–489.
- Cusi, K. (2010). The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Current Diabetes Reports*, 10(4), 306–315.
- 江口竜一ラファエル, 江畑利奈, 加藤小百合, 他 (2012). 動物細胞の培養における血清の影響と成長因子の探査. *化学と生物*, 50(5), 383–384.
- Fan, L., Xu, H., Yang, R., et al. (2019). Combination of Capsaicin and Capsiate Induces Browning in 3T3-L1 White Adipocytes via Activation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma/\beta$  (3)-Adrenergic Receptor Signaling Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(22), 6232–6240.
- Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., et al. (2002). Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(3), 1084–1089.
- Fasshauer, M., Kralisch, S., Klier, M., et al. (2003). Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(4), 1045–1050.
- Fu, Y., Luo, N., Klein, R. L., et al. (2005). Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *Journal of Lipid Research*, 46(7), 1369–1379.
- Fukuen, S., Iwaki, M., Yasui, A., et al. (2005). Sulfonylurea agents exhibit peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonistic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 23653–23659.
- 後藤剛, 高橋信之, 河田照雄 (2013). 分岐鎖アミノ酸代謝系による脂肪細胞のエネルギー代謝制御機構の解明. *大豆たん白質研究*, 16(34), 133–137.
- Hayashi, I., Sato, G. H. (1976). Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature*, 259(5539), 132–134.
- Ito, A., Suganami, T., Miyamoto, Y., et al. (2007). Role of MAPK phosphatase-1 in the induction of monocyte chemoattractant protein-1 during the course of adipocyte hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 282(35), 25445–25452.
- Kadowaki, T., Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine Reviews*, 26(3), 439–451.
- Kanda, Y., Matsuda, M., Tawaramoto, K., et al. (2008). Effects of sulfonylurea drugs on adiponectin production from 3T3-L1 adipocytes: implication of different mechanism from pioglitazone. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 81(1), 13–18.
- Kawada, T., Aoki, N., Kamei, Y., et al. (1990). Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation, from preadipocytes to adipocytes, of 3T3-L1 cells.



- Comparative Biochemistry and Physiology A: Comparative Physiology, 96(2), 323–326.
- Kuri-Harcuch, W., Green, H. (1978). Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75 (12), 6107–6109.
- Kwon, C. H., Sun, J. L., Kim, M. J., et al. (2020). Clinically confirmed DEL-1 as a myokine attenuates lipid-induced inflammation and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes via AMPK/HO-1- pathway. *Adipocyte*, 9(1), 576–586.
- Kyoya, T., Ishida, A., Nakashima, K., et al. (2011). The effects of concentrations of lysine in media on differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Animal Science Journal*, 82(4), 565–570.
- Maeda, N., Takahashi, M., Funahashi, T., et al. (2001). PPAR $\gamma$  ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*, 50(9), 2094–2099.
- Martins, F. F., Aguila, M. B., Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2020). Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids lessen the expression of PPAR $\gamma$ /Cidec affecting adipogenesis in cultured 3T3-L1 adipocytes. *Acta Histochemica*, 122(2), 151504.
- Morikawa, M., Nixon, T., Green, H. (1982). Growth hormone and the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell*, 29(3), 783–789.
- 西義介, 長谷川真樹子, 乾直道 (1983). 牛胎仔血清の選別について. *組織培養研究*, 2(1), 71–74.
- Prostek, A., Gajewska, M., Kamola, D., et al. (2014). The influence of EPA and DHA on markers of inflammation in 3T3-L1 cells at different stages of cellular maturation. *Lipids Health Disease*, 13, 3.
- Rubin, C. S., Hirsch, A., Fung, C., et al. (1978). Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 253(20), 7570–7578.
- Sakurai, N., Mochizuki, K., Kameji, H., et al. (2009). (-)-Epigallocatechin gallate enhances the expression of genes related to insulin sensitivity and adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes at an early stage of differentiation. *Nutrition*, 25(10), 1047–1056.
- Sato, H., Sugai, H., Kurosaki, H., et al. (2013). The effect of sex hormones on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activity in mature adipocytes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(4), 564–573.
- 沢谷里江, 小山洋一, 永易彩 (2008). 3T3-L1脂肪前駆細胞の分化に対するプロリルヒドロキシプロリンの影響. *酪農学園大学紀要 自然科学編*, 33(1), 13–18.
- Soares, A. F., Guichardant, M., Cozzone, D., et al. (2005). Effects of oxidative stress on adiponectin secretion and lactate production in 3T3-L1 adipocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(7), 882–889.
- Song, J., Li, C., Lv, Y., et al. (2017). DHA increases adiponectin expression more effectively than EPA at relative low concentrations by regulating PPAR $\gamma$  and its phosphorylation at Ser273 in 3T3-L1 adipocytes. *Nutrition & Metabolism*, 14, 52.
- Srinivasan, V., Radhakrishnan, S., Angayarkanni, N., et al. (2019). Antidiabetic effect of free amino acids supplementation in human visceral adipocytes through adiponectin-dependent mechanism. *Indian Journal of Medical Research*, 149(1), 41–46.
- Suganami, T., Ogawa, Y. (2010). Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(1), 33–39.
- Tamura, K., Goto-Inoue, N., Miyata, K., et al. (2020). Effect of treatment with conditioned media derived from C2C12 myotube on adipogenesis and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes.

PloS One, 15(8), e0237095.

Tseng, Y. H., Kokkotou, E., Schulz, T. J., et al. (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*, 454(7207), 1000–1004.

Zemmyo, D., Miyata, S. (2019). Evaluation of Lipid Accumulation Using Electrical Impedance Measurement under Three-Dimensional Culture Condition. *Micromachines (Basel)*, 10(7).

## Abstract

Fetal bovine serum (FBS) has widely been used for growth and maintenance of cell cultures. 3T3-L1 is one of the most commonly used preadipose cell lines and is characterized by its differentiation from the fibroblastic phenotype to adipocytes. Given its versatility and cost-effectiveness, the FBS alternative “EquaFETAL<sup>®</sup>” should be available for conventional use. The present study examined the experimental conditions necessary for the sufficient storage of 3T3-L1 lipid droplets and secreted adiponectin using EquaFETAL<sup>®</sup>. Oil Red O staining showed that EquaFETAL<sup>®</sup> maintained the ability of 3T3-L1 adipocytes to accumulate lipid droplets. Adiponectin production peaked at days 8 to 10 of the differentiation periods and tended to decrease until day 14. These findings are considered significant as few reports have examined the influence of EquaFETAL<sup>®</sup> on 3T3-L1 culture. However, adiponectin secretion-inducing factor had little effect on 3T3-L1 culture in the present study. Further investigation is needed to establish culture conditions necessary for adiponectin secretion inducer ability.