

脱分化脂肪細胞 DFAT における新規マーカーの探索

風間 智彦¹⁾

Identification of novel markers for dedifferentiated fat (DFAT) cells

Tomohiko KAZAMA

要旨

我々は、成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞 (DFAT) が、高い増殖能と間葉系幹細胞 (MSC) に類似した多分化能を示すことを明らかにし、新しい再生医療用細胞として実用化を目指した研究を行ってきた。本研究では、同一ドナーから皮下脂肪組織および骨髄組織の提供を受け、皮下脂肪細胞由来 DFAT (SC-DFAT)、脂肪組織由来幹細胞 (ASC)、骨髄脂肪細胞由来 DFAT (BM-DFAT)、骨髄由来 MSC (BM-MSC) を調製した。そして各細胞の細胞表面抗原発現プロファイルの検討、マイクロアレイ解析による発現遺伝子の網羅的解析を行い、DFAT を規定する新規マーカーの同定を試みた。その結果、DFAT では CD34 や HLA-DR の発現率が 0.1% 未満と著明に低く、これらが DFAT の品質を保証する陰性マーカーになり得る可能性が示唆された。また ASC や BM-MSC に発現せず SC-DFAT や BM-DFAT に特徴的に発現する遺伝子群の同定に成功した。これらの遺伝子は DFAT の品質や機能を規定する新規分子マーカーとなり得る可能性がある。

1. はじめに

近年、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) が高い増殖能と多分化能を有することが明らかにされ、骨、軟骨、脂肪、歯周組織などの再生医療における移植用細胞として有望な細胞と考えられている¹⁻⁴⁾。我々は、成熟脂肪細胞を天井培養という方法で培養することにより得られる脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) が、MSC に類似した高い増殖能と多分化能を獲得することを明らかにした⁵⁾。DFAT は非常に少量 (約 1g) の脂肪組織から大量調製でき、他細胞の混入がほとんどなく (0.1% 以下) 均質な細胞群であること、ドナー年齢や基礎疾患に関係なく多分化能を有する細胞が調製できることから、低コストで実用性の高い治療用細胞として期待できる。一方、細胞治療の効果や安全性を担保するためには、製造された DFAT の品質や性能を確認できる適切なマーカーの同定が必要である。

本研究では、同一ドナーから皮下脂肪組織および

骨髄組織の提供を受け、皮下脂肪組織から皮下脂肪細胞由来 DFAT (Subcutaneous fat-derived DFAT: SC-DFAT) と脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cell: ASC) を、骨髄組織から骨髄脂肪細胞由来 DFAT (Bone marrow fat-derived DFAT: BM-DFAT) および骨髄 MSC (Bone marrow MSC: BM-MSC) を調製した。そして各細胞の細胞表面抗原発現プロファイルの検討、マイクロアレイ解析による発現遺伝子の網羅的解析を行い、DFAT を規定する新規マーカーの同定を試みた。

2. 材料および方法

日本大学医学部附属板橋病院整形外科にて人工股関節置換術を受ける患者より同意を得た後、術後廃棄予定の皮下脂肪組織ならびに骨髄組織の提供を受けた (日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会承認: 整理番号 RK-121012-3)。皮下脂肪組織、骨髄組織より成熟脂肪細胞を単離し、既報⁵⁾

1) 日本大学医学部
風間智彦: kazama.tomohiko@nihon-u.ac.jp

に従い天井培養を行うことにより、SC-DFATとBM-DFATを調製した。また各組織のストローマ分画を付着培養することによりASCとBM-MSCを調製した。調製した4種類の細胞の各種細胞表面抗原発現をフローサイトメーターを用いて測定した。また、調製された各種細胞からtotal RNAを抽出・精製を行ない、cDNAを合成した。GeneChip® Hybridization Oven 645, GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix)を用いてハイブリダイゼーションを行い、GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix)を用いて、蛍光イメージの測定を行った。データの解析はオミックスデータ解析用ソフトウェアであるQlucore Omics Explorer (QLUCORE)を使用した。

3. 結果

フローサイトメトリー解析の結果、SC-DFAT, ASC, BM-DFAT, BM-MSCは間葉系細胞マーカー(MSC陽性マーカー)であるCD73, CD90の発現率がいずれも98%以上であった(図1)。間葉系細胞マーカーの一つであるCD105の発現率は、SC-DFAT, ASC, BM-DFATではいずれも98%以上であったが、BM-MSCでは94.2%と他細胞に比べ

や低率であった。MSC陰性マーカーであるCD34, CD45, HLA-DRの発現率は、SC-DFAT, ASC, BM-DFATではいずれも0.1%未満であったが、BM-MSCではCD34 0.14%, CD45 0.085%, HLA-DR 2.3%と他細胞に比べて高率であった(図2)。SC-DFAT, BM-DFATに共通して特異的に発現するマーカーの同定には至らなかった。

DNAマイクロアレイ解析の結果、SC-DFATとASC, BM-DFATとBM-MSCはそれぞれ、酷似した遺伝子発現プロファイルを示し、階層的クラスタリング解析でも非常に距離が近い群として分類された。ASCで発現が低くSC-DFATで特徴的に発現する遺伝子を解析した結果、49個の遺伝子が同定された。またBM-MSCで発現が低くBM-DFATで特徴的に発現する遺伝子を解析した結果、9個の遺伝子が同定された。一方、SC-DFATおよびBM-DFATに共通して特徴的に発現する遺伝子の同定には至らなかった。

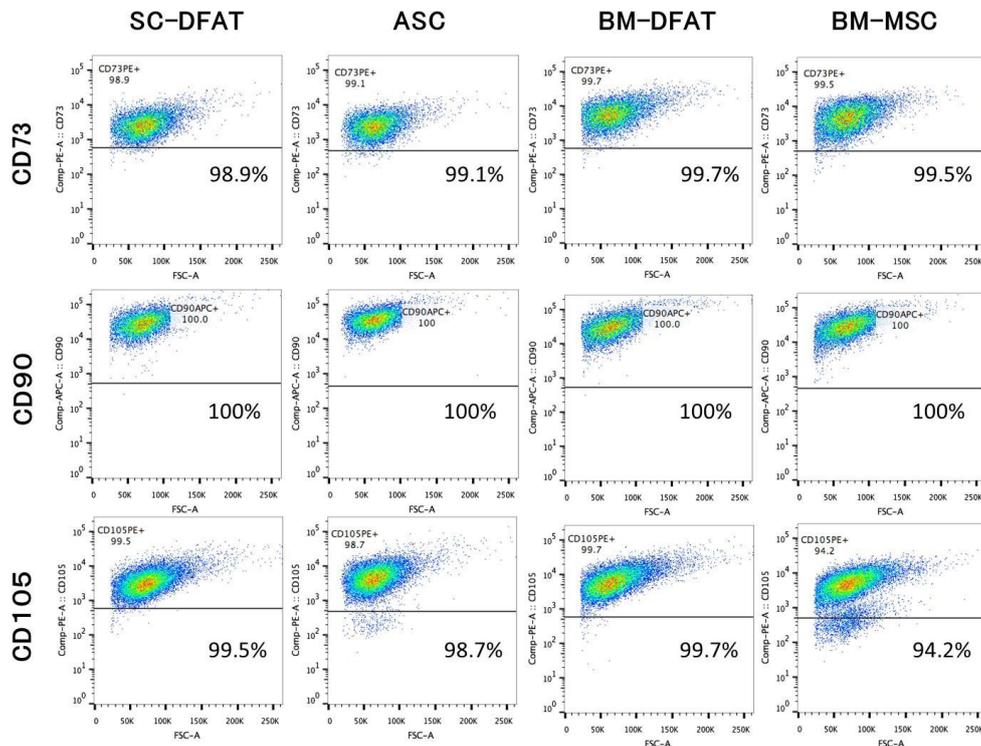


図1 各種細胞における細胞表面抗原の解析:MSC最小基準・陽性マーカー

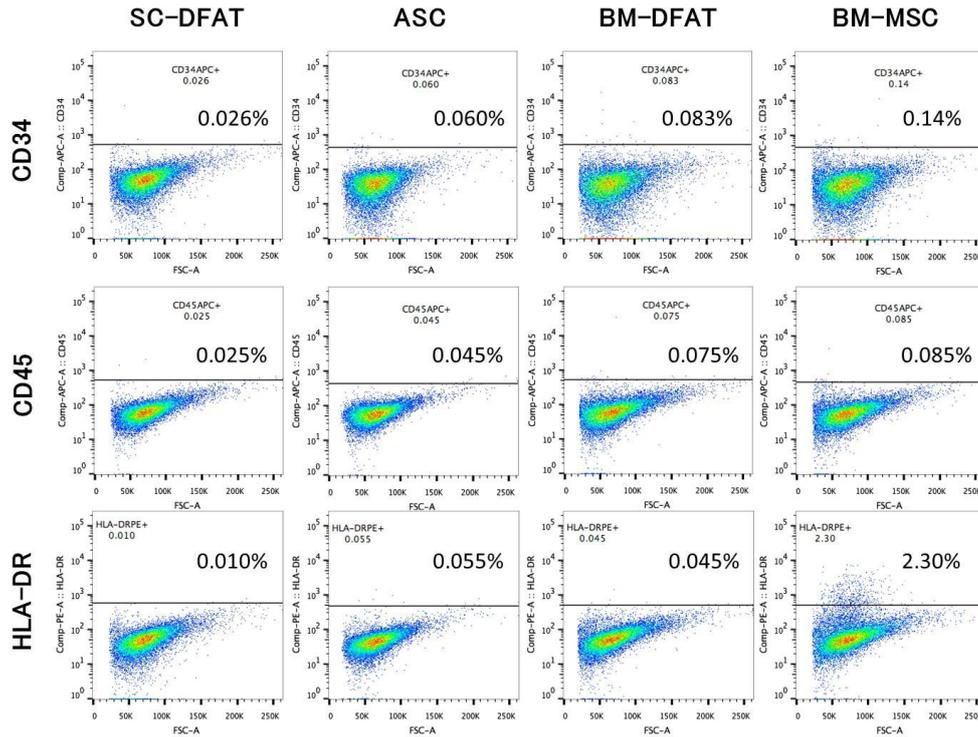


図2 各種細胞における細胞表面抗原の解析:MSC最小基準・陰性マーカー

4. 考察

今回、フローサイトメトリー解析の結果、SC-DFAT、BM-DFATに共通して特徴的に発現する細胞表面抗原マーカーの同定には至らなかった。一方、SC-DFAT、BM-DFATともにCD34、HLA-DRといった陰性マーカーの発現率が0.1%未満と非常に低いことが明らかになった。この所見は、血液細胞などの異種細胞の混入率が極めて低いことを示唆している。HLA-DRは免疫原性に大きく影響する主要組織適合抗原であるため、HLA-DRの発現が極めて低いことは、拒絶が起りにくく移植安全性が高いことを担保する所見であるといえる。したがってHLA-DRは、DFATの高い移植安全性を予測する上で有用な陰性マーカーとなることが示唆された。

またDNAマイクロアレイ解析の結果、SC-DFATやBM-DFATに特徴的に高発現する遺伝子群を同定することができた。今後、これらの遺伝子の機能解析を行い、DFATの品質や機能を規定する新規分子マーカーとして有用であるかを明確にしていく予定である。

文献

- 1) Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288:413-419.
- 2) Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H et al. A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 313:503-508.
- 3) Matsubara T, Suardita K, Ishii M et al. Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*. 2005; 20:399-409.
- 4) Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N et al. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol*. 2004; 75:1281-1287.
- 5) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol*. 2008; 215: 210-222.