

ブタ心外膜下脂肪組織に由来する脱分化脂肪細胞の特性解析

Characteristic analysis of porcine epicardial adipose tissue-derived
dedifferentiated fat cells

遠山一人¹⁾, 風間智彦²⁾, 加野浩一郎³⁾, 平山篤志¹⁾, 松本太郎²⁾
Kazuto TOYAMA¹⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾, Koichiro KANO³⁾,
Atsushi HIRAYAMA¹⁾, Taro MATSUMOTO²⁾

¹⁾日本大学医学部内科学系循環器内科学分野, ²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野, ³⁾日本大学生物資源科学部応用生物科学科

【要旨】

脱分化脂肪細胞(DFAT)は成熟脂肪細胞より調製される多能性細胞である。本研究では、ブタから心外膜下脂肪由来 DFAT (EC-DFAT)、および皮下脂肪由来 DFAT(SC-DFAT)を調製し、心筋細胞などへの分化能を比較検討した。遺伝子発現解析では、EC-DFAT は SC-DFAT に比べ、心筋初期分化マーカーGATA4 の発現が有意に高かった。ラット心筋細胞との共培養による心筋分化誘導の結果、EC-DFAT は SC-DFAT に比べ、心筋特異的転写因子 Nkx2.5 やトロポニンI 陽性細胞の出現率が高く、心筋細胞と協調的拍動を示す細胞が多く観察された。以上より EC-DFAT が心筋細胞への分化指向性が高いことが明らかとなった。EC-DFAT は心筋再生を目的とした細胞治療の新たな細胞ソースとなり得る可能性がある。

【背景および目的】

薬物治療に抵抗性を示す重症心不全に対して、近年、細胞治療が注目されており、自家骨髄単核球や骨格筋芽細胞などを用いた臨床研究が開始されている。これら細胞治療の作用機序は移植細胞から分泌される液性因子のパラクライン効果によるものであることが明らかになっている。心筋症など心筋自体の変性に起因する病態の場合、心筋細胞に直接分化し心機能を改善させるポテンシャルをもつ治療用細胞が望まれる。Matsumoto ら¹⁾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調製される脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell : DFAT)が、高い増殖能と間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)に類似した多分化能を獲得することを明らかにした。DFAT は少量の脂肪組織より大量調製することが可能であることから再生医療の細胞資源として期待される。また DFAT は心筋への分化能を有することが報告されている²⁾。脂肪細胞はその局在部位により機能が異なることが知られていることから、DFAT の分化指向性も脂肪組織の局在部位により異なることが示唆される。本研究では、ブタの心外膜下脂肪組織、及び皮下脂肪組織からそれぞれ脂肪細胞を単離し DFAT を調製した。そして、心外膜下脂肪由来 DFAT (Epicardial fat-derived DFAT: EC-DFAT)、および皮下脂肪由来 DFAT (Subcutaneous fat-derived DFAT : SC-DFAT)の心筋細胞などの分化能を比較検討した。

【方法および結果】

ブタの皮下脂肪組織および心外膜下脂肪組織より SC-DFAT と EC-DFAT を既報³⁾に従い調製し、脂肪、骨、軟骨、平滑筋へ分化誘導実験を行った。その結果、SC-DFAT、EC-DFAT 共に脂肪、骨、軟骨、平滑筋への多分化能を有することが確認された。次に EC-DFAT および SC-DFAT における心筋、脂肪、軟骨初期分化マーカーの遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法で

検討した。その結果、EC-DFAT は SC-DFAT に比べ、心筋初期分化マーカーGATA4 の発現が高く、脂肪初期分化マーカーPPAR α や軟骨初期分化マーカーSOX9 の発現は低いことが明らかとなった。次に PKH で蛍光標識した EC-DFAT、SC-DFAT をラット心筋細胞とともに7日間直接的共培養を行い、心筋特異的タンパク質の発現を免疫組織学的に検討した。心筋特異的転写因子 Nkx2.5 に対する免疫染色を行った結果、EC-DFAT の一部に核に一致して Nkx2.5 を発現している細胞が認められた。心筋のギャップ結合タンパク質コネクシン 43 に対する免疫染色を行った結果、EC-DFAT 間の細胞境界領域または EC-DFAT とラット心筋細胞との細胞境界領域にコネクシン 43 が顆粒状に発現している所見が認められた。また心筋特異的収縮蛋白トロポニン I に対する免疫染色を行った結果、EC-DFAT の一部にトロポニン I 陽性の横紋構造を示す細胞が認められた (図 1)。

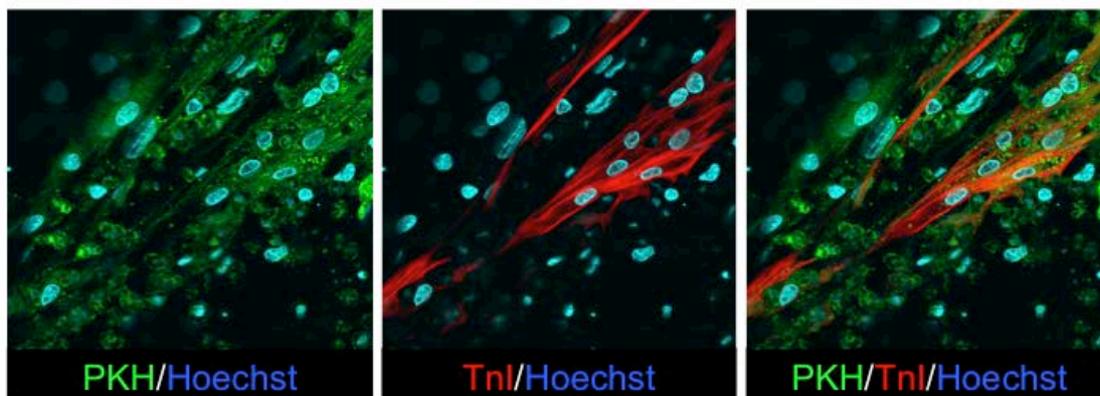


図 1. ラット心筋細胞との共培養による EC-DFAT のトロポニン I 発現

また EC-DFAT では、共培養3日目頃より隣接するラット心筋細胞と同期して PKH 陽性の EC-DFAT が協調的拍動する所見がしばしば観察された(図2)。これに対し SC-DFAT では、Nkx2.5 発現細胞や、協調的拍動所見はまれにしか観察されなかった。

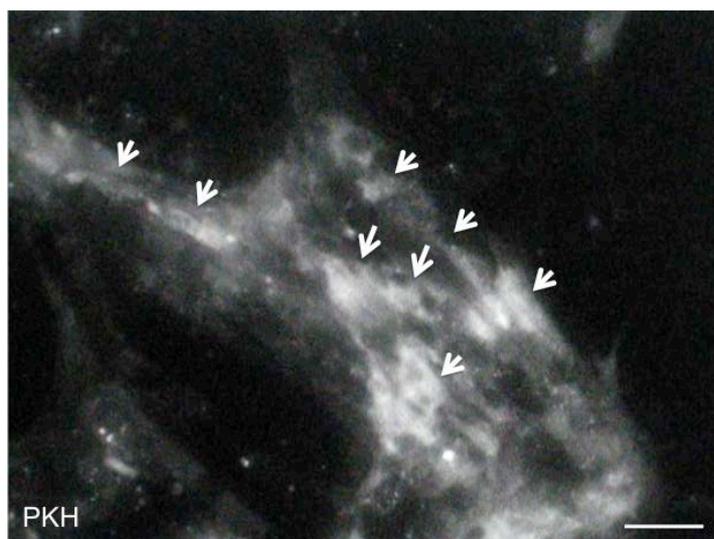


図 2. ラット心筋細胞との共培養による EC-DFAT の協調的拍動像 (矢印は動画にて拍動を認める DFAT を示す。Scale bar 20 μ m)

【考察】

本研究では DFAT は MSC に共通の多分化を有しながら、採取部位近傍の間葉系組織への分化指向性を示すことが示唆された。Kim ら⁴⁾は、皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞では、血球細胞由来 iPS 細胞に比べ、造血関連遺伝子の DNA 脱メチル化の程度が弱いことを示し、元の細胞のエピジェネティック修飾が初期化されても記憶されていることを報告した。DFAT の採取組織による分化指向性の差異も、このようなエピジェネティック・メモリーが関与している可能性がある。

本研究では EC-DFAT は、心筋分化誘導にて心筋特異的転写因子 Nkx2.5 の発現やギャップ結合タンパク質であるコネキシン 43 の発現、トロポニンIを含むサルコメア構造の出現、心筋細胞との協調的拍動が確認された。これらの所見は EC-DFAT が構造的、機能的に高い成熟度を示す心筋細胞へと分化する能力を有することを示唆している。現在、重症心不全患者に対しては、補助人工心臓や心臓移植が考慮されるが、いずれも経済的負担、厳しい適応基準と加療後の安全性が課題として存在する。EC-DFAT は、高い心筋細胞への分化能に加え、少量の脂肪組織から安価に大量調製できるため、重症心不全に対する新たな細胞治療用ソースとして期待できる。

【参考文献】

1. Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, et al. (2008) Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *Journal of Cellular Physiology*, 215(1): 210–222.
2. Jumabay M, Matsumoto T, Yokoyama SI, Kano K, Kusumi Y, et al. (2009). Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47(5): 565–575.
3. Sugihara H, Yonemitsu N, Miyahara S, Toda S. (1987) Proliferation of unilocular fat cells in the primary culture. *Journal of Lipid Research* 28(9):1038-1045.
4. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, et al. (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467(7313): 285-290.