

ヒト頬脂肪体から単離・調製した脱分化脂肪細胞の特性

Characterization of dedifferentiated fat (DFAT) cells derived from size-dependent adipocytes

鶴町仁奈¹⁾, 秋田大輔²⁾, 加野浩一郎³⁾, 松本太郎⁴⁾, 鳥海 拓⁵⁾, 風間智彦⁴⁾, 沖 嘉尚³⁾, 田村瑛子¹⁾, 外木守雄⁶⁾, 磯川桂太郎⁷⁾, 清水典佳¹⁾, 本田雅規⁵⁾
Niina TSURUMACHI¹⁾, Daisuke AKITA²⁾, Koichiro KANO³⁾, Taro MATSUMOTO⁴⁾, Taku TORIUMI⁵⁾, Tomohiko KAZAMA⁴⁾, Yoshinao OKI³⁾, Yoko TAMURA¹⁾, Morio TONOIGI⁶⁾, Keitaro ISOKAWA⁷⁾, Noriyoshi SHIMIZU¹⁾, Masaki J. HONDA⁵⁾

¹⁾ 日本大学歯学部歯科矯正学講座, ²⁾ 日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座, ³⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野, ⁴⁾ 日本大学生物資源科学部応用生物科学科, ⁵⁾ 愛知学院大学歯学部口腔解剖学講座, ⁶⁾ 日本大学歯学部口腔外科学講座, ⁷⁾ 日本大学歯学部解剖学第Ⅱ講座

【要旨】

脂肪組織から単離できる成熟脂肪細胞を天井培養することで非対称分裂にて現われる脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)は高い増殖能と多分化能を有することが報告されている。従来, 成熟脂肪細胞の大きさは約 60~100 μm ととらえられていたが, 近年, 40 μm 未満の大きさの脂肪細胞の存在も確認された。しかしながら, 成熟脂肪細胞の大きさと脱分化脂肪細胞への脱分化について検討した報告はこれまでにない。そこで本研究では, 脂肪細胞の大きさに着目し, 大きさの異なる成熟脂肪細胞分画から出現した DFAT 細胞の特性について検討した。

その結果, ヒト頬脂肪体から単離した成熟脂肪細胞には 40 μm 未満の大きさの S-adipocytes (small adipocytes) が多く存在し, S-adipocytes は L-adipocytes (Large adipocytes) に比較して有意に早く DFAT 細胞へと脱分化することが明らかとなった。

【背景および目的】

成熟脂肪細胞は長年, 終末分化し増殖能を失った細胞と考えられていたが, 天井培養法により非対称分裂に生じる線維芽細胞様細胞が間葉系幹細胞に類似した性質を持つことが明らかにされ, 脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)と名付けられている。DFAT 細胞は高い増殖能と, 脂肪細胞, 骨芽細胞, 軟骨細胞, 平滑筋細胞, 血管内皮細胞, 心筋細胞, 神経細胞等への多分化能を有していることから組織工学や再生医療の細胞源として有用である¹⁾。また, この DFAT 細胞は同じく脂肪組織を構成する細胞中に存在する脂肪組織由来の間葉系幹細胞(以下, ASC)に比較して骨芽細胞への分化能が高く, 口腔領域の骨組織や歯周組織の再生にも有用であることが報告され, 再生医療における移植細胞源として広く注目されている。咬筋の前縁と頬筋の表面に存在する頬脂肪体は, 局所麻酔と極小切開で口腔内から採取できる唯一の脂肪組織であり, DFAT 細胞が単離できることが報告されている。また, 従来, 成熟脂肪細胞の直径は 60-110 μm ととらえられていたが, 近年 20 μm 以下の成熟脂肪細胞が増殖能を持つことが報告されている²⁾。しかしながら, 成熟脂肪細胞の大きさと DFAT 細胞への脱分化の効率の関係性については明らかではない。

そこで本研究では, ヒト頬脂肪体から採取した成熟脂肪細胞を直径により2つのグループに分取し, それぞれの大きさの成熟脂肪細胞分画から脱分化した DFAT 細胞数を経日的に比較検討

した。さらに、それぞれの大きさの成熟脂肪細胞分画から出現した DFAT 細胞の特性についても比較検討を行った。

【方法】

日本大学歯学部付属歯科病院に来院した顎変形症の患者 5 名から顎骨移動手術時に余分な脂肪組織として採取した頬脂肪体を用いた。ヒト頬脂肪体を細切後、0.1%のコラゲナーゼ溶液にて 60 分間酵素処理を行い、濾過および遠心分離、成熟脂肪細胞分画を単離した。酵素処理後に得られた成熟脂肪細胞分画 1 ml あたりに含まれる成熟脂肪細胞の直径をコールターカウンタにて測定し、20-39 μm , 40-59 μm , 60-79 μm , 80-99 μm , 100-130 μm の直径毎の細胞数を比較した。酵素処理後の成熟脂肪細胞に対してセルストレナーを用いて 40 μm 未満の細胞分画 (small adipocytes; S-adipocytes) および 40-100 μm の細胞分画 (Large adipocytes; L-adipocytes) の 2 種類に分取し、Nile Red および Hoechst を用いて蛍光染色を行った。次に、S-adipocytes および L-adipocytes から DFAT 細胞を単離できるか検討を行うため、両細胞分画を 12.5 cm^2 のフラスコに 1.0×10^4 個ずつ播種し天井培養を行い、7 日後にフラスコを反転した。S-adipocytes から出現した DFAT 細胞を S-DFAT 細胞、L-adipocytes から出現した DFAT 細胞を L-DFAT 細胞とし、天井培養開始から 6, 10, 14, 18 日目の DFAT 細胞数をそれぞれ測定した。

次に、細胞表面抗原発現解析、遺伝子発現解析、細胞増殖能、コロニー形成能、細胞周期および多分化能を検討し、S-DFAT 細胞と L-DFAT 細胞の特性を比較した。

【結果】

頬脂肪体から単離した成熟脂肪細胞の直径は 40 μm 未満の細胞分画が他の直径の細胞分画に比較して 5 倍以上の細胞数を示した。S-adipocytes および L-adipocytes 共に Nile Red および Hoechst 陽性を示し、両細胞分画共に成熟脂肪細胞であることが確認された。フラスコ反転時には S-adipocytes および L-adipocytes 共にフラスコ底面に線維芽細胞様の DFAT 細胞がコロニーを形成が確認され、天井培養開始 6, 10, 14 日目における S-DFAT 細胞数は L-DFAT 細胞数よりも有意に多かった。このことから、S-adipocytes は L-adipocytes に比較して有意に早く DFAT 細胞へと脱分化することが示唆された。

細胞表面抗原発現解析の結果、間葉系幹細胞のマーカーである CD146 陽性細胞の割合は S-DFAT 細胞では L-DFAT 細胞に比較して約 2 倍多かった。遺伝子発現解析の結果、ES 細胞マーカーである c-MYC, KLF4, OCT3/4, および SOX2, また骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞の転写因子である RUNX2, PPAR γ 2, SOX9 の発現は両細胞間で同等であった。細胞増殖能、コロニー形成能および細胞周期についても両細胞間で有意な差は認めなかった。

多分化能については、in vitro における骨芽細胞への分化能をアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、石灰化 nodule のアリザリン赤染色および nodule 中の Ca 定量にて評価した。脂肪細胞への分化能はオイルレッド O 染色で脂肪滴をもつ細胞数により評価した。骨芽細胞への分化誘導実験において、分化誘導開始 3, 5 および 7 日目における ALP 活性は S-DFAT 細胞が L-DFAT 細胞に比較して有意に高く、さらに誘導開始 7 日目に S-DFAT 細胞の方が L-DFAT 細胞に比較してアリザリン赤染色に濃染した石灰化 nodule を顕著に認めた。また、石灰化 nodule 中の Ca 沈着量も誘導開始 7 日目および 21 日目において、S-DFAT 細胞では L-DFAT 細胞と比べて有意に高値を示した。脂肪細胞への分化誘導実験において、S-DFAT 細胞および L-DFAT 細胞共に誘導開始 7 日目から約 5%の細胞がオイルレッド O 陽性を示し、誘導開始 21 日目には約 65%の細胞が陽性を示した。両細胞間のオイルレッド O 陽性細胞の割合に有意な差は認めなかった³⁾。

【結語】

ヒト頬脂肪体から単離した成熟脂肪細胞には40 μ m未満の大きさの細胞集団が多く存在し、早くDFAT細胞へと脱分化することと、高い骨芽細胞分化能を有することから歯科口腔領域における骨組織や歯周組織の再生⁴⁾に有用であることが示唆された。

【参考文献】

- 1) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**: 210-222.
- 2) Kajita K, Mori I, Hanamoto T, et al. Pioglitazone enhances small-sized adipocyte proliferation in subcutaneous adipose tissue. *Endocr J* 2012; **59**: 1107-14.
- 3) Tsurumachi N, Akita D, Kano K, et al. Small Buccal Fat Pad Cells Have High Osteogenic Differentiation Potential. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016; **22**: 250-9.
- 4) Akita D, Kano K, Saito-Tamura Y, et al. Use of Rat Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells as a Cell Source for Periodontal Tissue Regeneration. *Front Physiol* 2016; **7**: 50.