

膝蓋下脂肪体に由来する脱分化脂肪細胞 (DFAT) の 特性及び機能解析

松本太郎¹⁾, 谷本浩二²⁾, 遠藤則行²⁾, 中西一義²⁾, 田中正史³⁾, 副島一孝⁴⁾, 三木敏生⁵⁾,
大島猛史⁶⁾, 加野浩一郎⁷⁾, 坂井学⁸⁾, 中山智宏⁹⁾, 枝村一弥¹⁰⁾, 片岡則之¹¹⁾, 檜村勉⁴⁾,
李予昕¹⁾, 月村直樹¹²⁾, 秋田大輔¹²⁾, 風間智彦¹⁾, 長岡悠紀¹⁾

Characterization and functional analysis of dedifferentiated fat cells derived from infrapatellar fat pad

Taro MATSUMOTO¹⁾, Koji TANIMOTO²⁾, Noriyuki ENDO²⁾, Kazuyoshi NAKANISHI²⁾,
Masashi TANAKA³⁾, Kazutaka SOEJIMA⁴⁾, Toshio MIKI⁵⁾, Takeshi OSHIMA⁶⁾, Koichiro
KANO⁷⁾, Manabu SAKAI⁸⁾, Tomohiro NAKAYAMA⁹⁾, Kazuya EDAMURA¹⁰⁾, Noriyuki
KATAOKA¹¹⁾, Tsutomu KASHIMURA⁴⁾, Yuxin LI¹⁾, Naoki TSUKIMURA¹²⁾, Daisuke
AKITA¹²⁾, Tomohiko KAZAMA¹⁾, Yuki NAGAOKA¹⁾

要旨

脱分化脂肪細胞 (DFAT) は成熟脂肪細胞を天井培養することにより調製される間葉系幹細胞 (MSC) に類似した多能性細胞である。本研究では、変形性膝関節症患者の膝蓋下脂肪体からDFATを調製し形質解析や機能解析を行い、皮下脂肪から調製したDFATと比較検討を行った。その結果、膝蓋下脂肪体由来DFATは皮下脂肪由来DFATと同様の形質と多分化能を示し、さらに皮下脂肪由来DFATに比べて、細胞増殖能、軟骨分化能、軟骨変性抑制作用が高いことが明らかになった。変形性膝関節症に対する治療用細胞として膝蓋下脂肪体由来DFATは高い有効性を持つことが期待できる。

1. はじめに

関節軟骨は、無血管組織で自己修復能力に乏しいため、一度損傷すると再生させることは困難であると考えられている。近年、軟骨再生を期待した細胞治療が注目されている。実際に軟骨欠損や変形性膝関節症に対し、自己軟骨細胞や間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells: MSC) を用いた細胞治療が行われ、その有効性が報告されている¹⁾。特にMSCは患者自身の骨髓や脂肪組織から培養調製が可能であり、軟骨分化能に加えて免疫制御作用や抗炎症作用を持つことから、軟骨変性疾患に対する高い治療

効果が期待されている。

膝関節に存在する脂肪組織である膝蓋下脂肪体 (Infrapatellar fat pad: IFP) (図1) は、関節鏡手術や膝の観血的手術においてしばしば切除され、医療廃棄物として扱われるため、細胞治療に利用しやすい組織と考えられている。膝蓋下脂肪体由来MSCは、骨髓由来MSCや皮下脂肪由来MSCに比

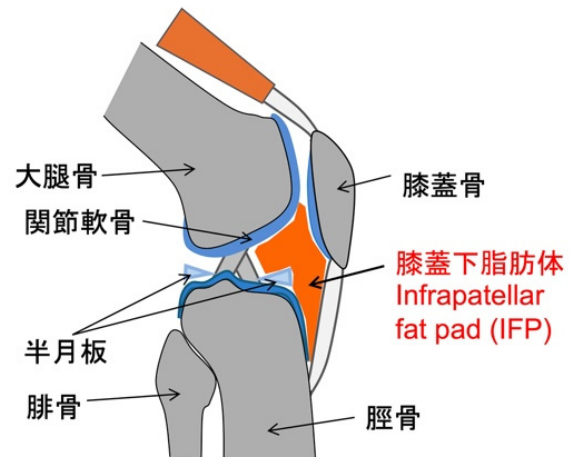


図1 膝蓋下脂肪体 (IFP) の局在部位

- 1) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野,
 - 2) 日本大学医学部整形外科系整形外科学分野,
 - 3) 日本大学医学部外科学系心臓血管外科学分野,
 - 4) 日本大学医学部形成外科学系形成外科学分野,
 - 5) 日本大学医学部生体機能医学系生理学分野,
 - 6) 日本大学医学部耳鼻咽喉・頭頸部外科学系耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野,
 - 7) 日本大学生物資源科学部応用生物科学科, I
 - 8) 日本大学生物資源科学部獣医内科学研究室,
 - 9) 日本大学生物資源科学部獣医放射線学研究室,
 - 10) 日本大学生物資源科学部獣医外科学研究室,
 - 11) 日本大学工学部機械工学科,
 - 12) 日本大学歯学部歯学科歯科補綴学第II講座
- 責任者連絡先: 松本太郎, matsumoto.taro@nihon-u.ac.jp

べ良好な軟骨分化能を示すことが明らかにされており、軟骨再生治療用細胞として注目されている²⁾。一方、MSCはヘテロな細胞集団であり、その品質は個体差が大きいことが知られている。とくに高齢者や糖尿病などの基礎疾患を持つ患者から調製したMSCは、増殖能や分化能の低下がしばしば認められる。

Matsumotoら³⁾は、成熟脂肪細胞を天井培養することで調製される脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell : DFAT) が高い増殖能とMSCと同等の多分化能を示すことを明らかにした。DFATの調製法の概略を図2に示す。DFATはドナーの年齢や基礎疾患に左右されず、少量の脂肪組織から均質なMSC様細胞を調製できるため、実用性の高いMSC代替細胞として期待されている。DFATは、皮下脂肪組織のみならず膝蓋下脂肪体からも調製可能であるが、その形質や分化指向性、治療活性については十分に解明されていない。そこで本研究では、変形性膝関節症患者の膝蓋下脂肪体からDFATを調製し、形質解析や機能解析を行い、同じ患者から採取した皮下脂肪由来DFATと比較検討を行った。そして変形性膝関節症に対する治療用細胞としての特性評価を行った。

2. 対象及び方法

日本大学医学部附属板橋病院整形外科において、人工膝関節置換術を施行する変形性膝関節症患者より同意を得た上で、手術時に余剰となり破棄予定の膝蓋下脂肪体および膝関節上前方の皮下脂肪組織の提供を受けた (n=7, 女性, 年齢64~87歳)。ヒト組織を用いたすべての実験は、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て実施

した (承認番号:RK160209-6)。摘出された膝蓋下脂肪体の一部は、パラフィン切片標本を作成し、Elastic van Gieson (EVG) 染色を行い、組織学的解析を実施した。皮下脂肪 (subcutaneous fat: SC) 由来のDFAT (SC-DFAT) と膝蓋下脂肪体由来のDFAT (IFP-DFAT) は既報³⁾に従い調製し、細胞表面抗原をフローサイトメトリーで解析した。

SC-DFAT, IFP-DFATの細胞増殖能はWST-1アッセイにて評価した。SC-DFAT, IFP-DFATの脂肪分化能の評価は、脂肪分化誘導培地にて14日間培養後、Oil red O染色を行い、その染色強度を定量比較した。SC-DFAT, IFP-DFATの骨分化能の評価は、骨分化誘導培地にて14日間培養後、alizarin red S染色を行いその染色強度を定量比較した。SC-DFAT, IFP-DFATの軟骨分化能の評価には、Pellet培養法⁴⁾を用いて両細胞を軟骨分化誘導培地を含む15 mLポリプロピレンチューブ内で21日間培養し、軟骨様細胞塊を誘導した。そして誘導された軟骨様細胞塊の重量比較および組織学的解析を行った。組織学的解析は、軟骨様細胞塊のパラフィン切片標本を作成し、Toluidine Blue染色, Alcian Blue染色, Safranin O染色を行い評価した。また免疫組織化学的解析としてアグリカンに対する免疫染色を行い、両細胞の比較評価を行った。軟骨様細胞塊の硫酸化グリコサミノグリカン (sulphated glycosaminoglycans: sGAG) の定量法として、検体をprotease Kで56℃, 15時間処理後、dimethylmethlene blueを作用させ、吸光度計を用いてsGAG量を定量評価した。

軟骨分化に係る遺伝子発現解析として、SC-DFAT, IFP-DFATを軟骨分化誘導培地を用いて培養後、0, 7, 14日の時点で両細胞からRNAを抽出し、軟骨分化マーカーであるSOX-9, COL2A1の発現をリアルタイムRT-PCR法を用いて測定した。軟骨変性抑制, 免疫制御, 抗炎症作用に係る遺伝子発現解析として、SC-DFAT, IFP-DFATを100 mmディッシュに播種し、80%コンフルエントとなった時点で、TNF- α (10 ng/ml) を添加した。添加後12時間, 72時間後に両細胞からRNAを抽出し、免疫制御能に関与するProstaglandin E2 (PGE2, 遺伝子名PTGS2), 抗炎症作用に関与するTNF-stimulated gene 6 (TSG6, 遺伝子名TNFAIP6), 軟骨保護作用に関与するProteoglycan 4 (PRG4), Bone morphogenetic protein 2 (BMP2), Bone morphogenetic

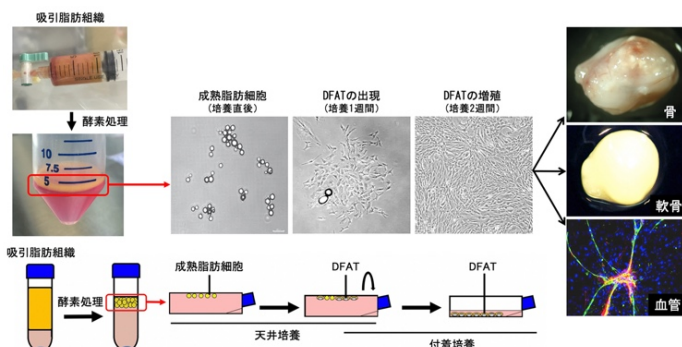


図2 脱分化脂肪細胞 (DFAT) の調製法

protein 6 (*BMP6*) の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR法を用いて測定した。

滑膜線維芽細胞との共培養実験は、6 well プレートと0.4 mm孔を有するセルカルチャーインサーターを用いて実施した。6well プレートにはArticular Engineering社から購入したヒト滑膜線維芽細胞を播種し、セルカルチャーインサーターにSC-DFATまたはIFP-DFATを播種した。各細胞が80%コンフルエントに到達した時点で共培養を24時間行い、TNF- α (10 ng/ml) を添加し、12時間後に滑膜線維芽細胞からRNAを抽出した。そして軟骨基質分解酵素であるa disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (*Adamts4*) や炎症性サイトカインであるInterleukin 6 (*IL6*) の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR法を用いて測定した。内部標準として18s rRNAの発現を同時に測定し、18s rRNAに対する相対的定量解析 (Comparative CT法) を行った。2群間比較にはMann-Whitney U testを使用し、3群間の比較はOrdinary one-way ANOVAおよびTukey's multiple comparisons testにより有意差検定を行った。p < 0.05を統計学的有意差ありと判定した。

3. 結果

ヒト膝蓋下脂肪体のEVG染色像を図3に示す。膝蓋下脂肪体は結合組織から構成される隔壁で分画された大小不動の小葉から構成され、隔壁の内部には

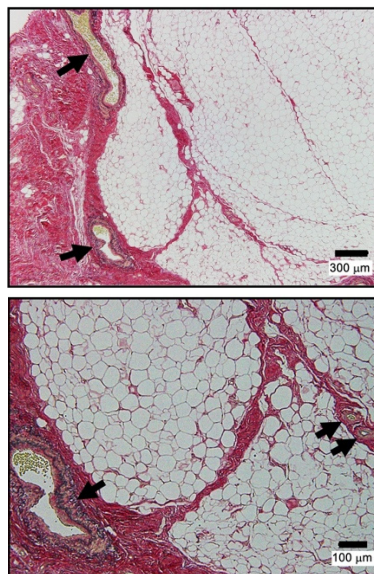


図3 膝蓋下脂肪体 (IFP) のEVG染色像 (矢印は血管を示す)

血管が豊富に発達している所見が観察された (図3矢印)。

次に膝蓋下脂肪体から単離した脂肪細胞からDFATの調製を試みた。その結果、皮下脂肪と同じ調製方法で膝蓋下脂肪体からDFATの調製が可能であることが確認された。皮下脂肪からの調製と比べ、天井培養過程における細胞の形態変化や生成されたDFATコロニーの形態に顕著な違いは見られなかった。SC-DFATおよびIFP-DFATの細胞表面抗原解析の結果、両細胞ともにMSC陽性マーカーであるCD90, CD73, CD105がいずれも96%以上陽性を示し、一方、陰性マーカーである血管内皮細胞マーカーCD31, CD34, リンパ球マーカーCD45, 単球・マクロファージマーカーCD11b, CD14, ヒト白血球抗原マーカーHLA-DRはいずれも0.8%未満であった (図4)。これらの結果から、SC-DFATと同様に、IFP-DFATも国際細胞治療学会が定めたMSCの最小基準⁵⁾に合致する表面抗原発現プロファイルを示すことが確認された。

SC-DFATおよびIFP-DFATの細胞増殖能を比較した結果、培養4日目にはSC-DFAT群に比べIFP-DFAT群で細胞数が増加する傾向が認められ、培養7日目には、SC-DFAT群に比べIFP-DFAT群で有意 (p < 0.05) に細胞数が高いことが示された。SC-DFATおよびIFP-DFATの脂肪分化能を比較した結果、IFP-DFAT, SC-DFAT共に、同等のOil-red O染色強度を示し、両細胞間に明らかな違いは認められなかった。SC-DFATおよびIFP-DFATの骨分化能を比

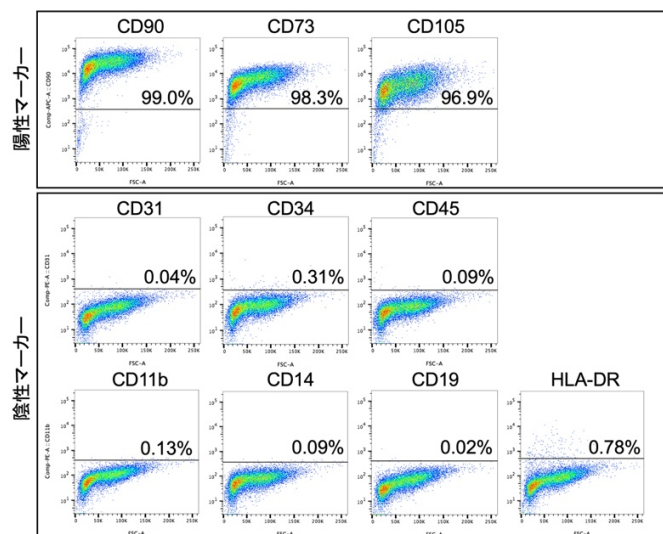


図4 IFP-DFATの細胞表面抗原解析

較した結果、両細胞ともに、同等の Alizarin red S 染色強度を示し、両細胞間に明らかな違いは認められなかった。軟骨分化能の比較では、IFP-DFAT および SC-DFAT とともに、直径 1.5-2.0 mm の軟骨様細胞塊の形成が認められた。検討した全てのドナーにおいて、IFP-DFAT から誘導された軟骨様細胞塊の重量は、SC-DFAT から誘導されたものよりも重かった (図 5)。

軟骨様細胞塊の組織学的解析結果を図 6 に示す。Toluidine Blue 染色では、IFP-DFAT は SC-DFAT に比べ、軟骨基質に特徴的な紫色の異染像が強く認められた。同様に Alcian Blue 染色では、軟骨成分である酸性ムコ多糖類を示す青藍色の染色像を強く認め、Safranin O 染色では、関節軟骨プロテオグリカ

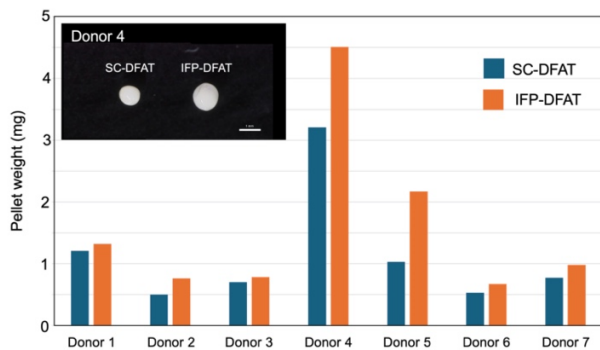


図 5 SC-DFAT, IFP-DFAT から誘導した軟骨様細胞塊の形態と重量比較

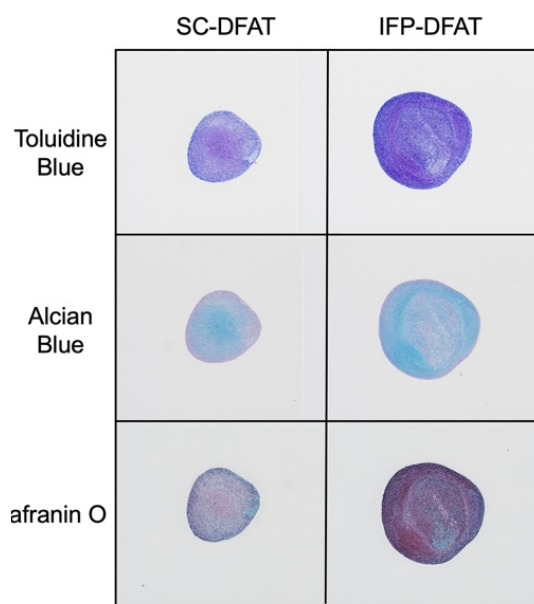


図 6 SC-DFAT, IFP-DFAT から誘導した軟骨様細胞塊の各種染色像

ンを示す赤色の染色像を強く認められた。軟骨特異的プロテオグリカンであるアグリカンに対する免疫組織染色像を図 7 に示す。IFP-DFAT は SC-DFAT に比べ、軟骨様細胞塊の周辺部位を中心にアグリカンの発現が強く認められる傾向があった。

軟骨細胞外基質の主要構成成分である硫酸化グリコサミノグリカン (sGAG) 量を定量した結果、IFP-DFAT は SC-DFAT に比べて有意 ($p < 0.05$) に高い値を示した。

軟骨分化マーカー遺伝子の発現解析を行った結果、軟骨分化の初期マーカーである *SOX9* は、軟骨分化誘導に伴い SC-DFAT, IFP-DFAT とともに同等の発現増加がみとめられた。これに対し、軟骨細胞の終末分化マーカーである II 型コラーゲン (*COL2A1*) の分化誘導後 14 日目における発現は、IFP-DFAT は SC-DFAT に比べ有意 ($p < 0.05$) に高値を示した。以上より、IFP-DFAT は SC-DFAT に比べ、軟骨分化指向性が高いことが示唆された。

軟骨変性抑制に係る遺伝子発現解析を行った結果、軟骨変性抑制、軟骨保護に係る *PRG4* や *BMP2* の発現は、IFP-DFAT が SC-DFAT に比べて顕著に高いことが明らかになった。一方、軟骨保護に作用する *BNP6* の発現は SC-DFAT で高いことが示された。滑膜線維芽細胞との共培養実験では、SC-DFAT, IFP-DFAT とともに滑膜線維芽細胞からの *ADAMTS4* や *IL6* の発現を同程度に抑制する作用が認められた。免疫制御・炎症抑制に係る遺伝子発現解析を行った結果、免疫制御能に関与する *PTGS2*、抗炎症作用に関与する *TNFAIP6* の発現は、両細胞共に TNF α 刺激下に発現が認められた。*PTGS2* の発現は SC-DFAT で高く、*TNFAIP6* の発現は IFP-DFAT で高い

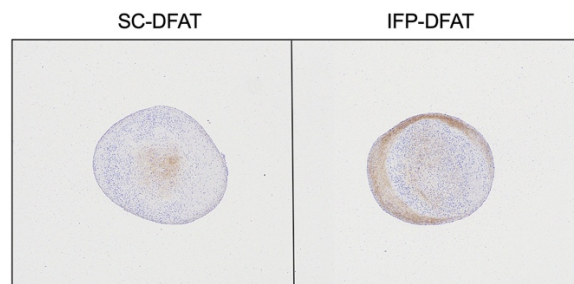


図 7 SC-DFAT, IFP-DFAT から誘導した軟骨様細胞塊のアグリカン免疫染色像

傾向が認められた。これらの解析結果のまとめを表1に示す。

4. 考察

IFP-DFATの形質解析を行った結果、国際細胞治療学会が定めたMSCの最小基準⁵⁾に合致する形質と多分化能を示すことが明らかになった。また同じ患者に由来するIFP-DFATとSC-DFATの比較検討を行った結果、IFP-DFATはSC-DFATに比べ、細胞増殖能、軟骨分化能、軟骨変性抑制作用に優れていることが示された。Ozekiら⁶⁾は、ラット変形性膝関節症モデルに対する滑膜由来MSCの軟骨変性抑制作用は、MSCから分泌されるTSG6, PRG4, BMP2, BMP6などの抗炎症作用や軟骨保護作用を有する液性因子のパラクライン効果によるものであることを報告している。また、MSCは変形性膝関節症患者の滑膜や軟骨から分泌される炎症性サイトカインや軟骨基質分解酵素の分泌を間接的に抑制することが明らかにされている⁷⁾。本研究の成果より、DFATを変形性膝関節症患者の関節内に投与した場合、MSCと同様の機序、すなわちパラクライン作用を介した直接的な抗炎症、軟骨保護効果や、軟骨変性に係わる滑膜細胞や軟骨細胞からの液性因子分泌を間接的に抑制することで、軟骨変性の進行を抑制する可能性が示された。実際、Endoら⁸⁾は、前十字靱帯切離と内側半月板切除によるラット変形性膝関節症モデルに対してラットSC-DFATを関節内投与し

た結果、軟骨変性を抑制できることを報告している。今後、同様の疾患モデルや臨床研究を用いてIFP-DFATがSC-DFATに比べて優れた治療効果を示すか検討することが望まれる。膝蓋下脂肪体は、皮下脂肪組織に比べて組織採取に伴う侵襲性は高いが、変形性膝関節症に対する人工関節置換術などを行う際に追加の侵襲なく採取できるといった利点がある。IFP-DFATの臨床応用例として、人工関節置換術を行った対側の膝関節に自家移植したり、拡大培養を行い他家移植用細胞として利用するといった応用が考えられる。Fujiiら⁹⁾は、最近、膝蓋下脂肪体由来するDFATは膝蓋下脂肪体由来するMSCに比べ、脂肪分化能や軟骨分化能が高いことを報告している。このような研究結果は、IFP-DFATによる細胞治療が既存の細胞治療に比べてより有効性が高く、将来的に変形性膝関節症に対する有効な治療法となる可能性を示唆している。

5. 結語

膝蓋下脂肪体から調製したDFAT (IFP-DFAT) は、皮下脂肪から調製したDFAT (SC-DFAT) と同様に、MSCに類似した形質を示し、軟骨、脂肪、骨への多分化能を示した。特に、IFP-DFATはSC-DFATに比べて、高い細胞増殖能と軟骨分化指向性を有することが明らかとなった。また、IFP-DFATおよびSC-DFATの双方で、軟骨変性抑制、免疫制御、抗炎症に関与する遺伝子発現が確認され、IFP-DFATは特

表1. SC-DFAT, IFP-DFATの機能解析結果のまとめ

評価項目		SC-DFAT	IFP-DFAT
細胞増殖能	WST-1 吸光度	+	++
脂肪分化能	Oil red O染色強度	+	+
骨分化能	Alizarin red S染色強度	+	+
軟骨分化能	ペレット重量	+	++
	ペレットsGAG量	+	++
	SOX9 発現	+	+
	Type II collagen (COL2A1) 発現	+	+++
軟骨変性抑制	PRG4 発現	+	+++
	BMP2 発現 (TNF α 刺激下)	+	+++
	BMP6 発現	++	+
	滑膜線維芽細胞からのADAMTS4 発現抑制 (TNF α 刺激下)	++	++
	滑膜線維芽細胞からのIL6 発現抑制 (TNF α 刺激下)	+	+
免疫制御・炎症抑制	PGE2(PTGS2) 発現 (TNF α 刺激下)	++	+
	TSG-6(TNFAIP6) 発現 (TNF α 刺激下)	+	++

に軟骨抑制に関連する遺伝子の発現が高い傾向が認められた。これらの結果は、IFP-DFAT が変形性膝関節症に対して高い治療活性を示す可能性を示唆している。

謝辞

本研究は第4期日本大学理事長・学長特別研究の助成を受けて行われたものであり、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) Burke J, Hunter M, Kolhe R, Isales C, Hamrick M, Fulzele S. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell based therapy for osteoarthritis. Clin Transl Med 2016; 5 (1) :27.
- 2) Garcia J, Mennan C, McCarthy HS, Roberts S, Richardson JB, Wright KT. Chondrogenic potency analyses of donor-matched chondrocytes and mesenchymal stem cells derived from bone marrow, infrapatellar fat pad, and subcutaneous fat. Stem Cells Int 2016; 2016:6969726.
- 3) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. J Cell Physiol 2008; 215 (1) :210-222.
- 4) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284 (5411) :143-147.
- 5) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8 (4) :315-317.
- 6) Ozeki N, Muneta T, Koga H, Nakagawa Y, Mizuno M, Tsuji K, et al. Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats. Osteoarthritis Cartilage 2016; 24 (6) :1061-1070.
- 7) Lopa S, Colombini A, Moretti M, de Girolamo L. Injective mesenchymal stem cell-based treatments for knee osteoarthritis: from mechanisms of action to current clinical evidences. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2019; 8 (1) :16944.
- 8) Endo N, Matsumoto T, Kazama T, Kano K, Shimizu M, Ryu K, et al. Therapeutic potential of dedifferentiated fat cells in a rat model of osteoarthritis of the knee. Regen Ther 2024; 26:50-9.
- 9) Fujii S, Endo K, Matsuta S, Komori K, Sekiya I. Comparison of the yields and properties of dedifferentiated fat cells and mesenchymal stem cells derived from infrapatellar fat pads. Regen Ther 2022; 21:611-9.