

平成22年5月26日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2009
課題番号：19580348
研究課題名（和文）成熟脂肪細胞に由来する神経系細胞の分化特性および移植に関する研究
研究課題名（英文）Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells Can Transdifferentiate Into Neural Cells And Promote Functional Recovery From Spinal Cord Injury-Induced Motor Dysfunction In Rodents
研究代表者 加野 浩一郎（KANO KOICHIRO） 日本大学・生物資源科学部・准教授 研究者番号：80271039

研究成果の概要（和文）：GFP マウスの成熟脂肪細胞由来する神経系細胞を移植し、体内での分化および組織化の状況を調べるに有効な DFAT-GFP を樹立した。DFAT-GFP を体外および体内で神経系細胞へ分化誘導すると、神経細胞特異的な形態に変化するとともに、Nestin、NSE、 β III tubulin、NF、S100、GFAP および CNPase などの神経細胞特異的遺伝子およびタンパク質を発現した。以上のことから、脂肪細胞から神経系細胞を作出できることが示された。

研究成果の概要（英文）：When mature adipocytes were isolated from adipose tissue and grown in ceiling culture, transformation into fibroblast-like cells without lipid droplets occurred. These fibroblast-like cells, termed de-differentiated fat (DFAT) cells, could proliferate and could also redifferentiate into mature adipocytes. DFAT cells expressed neural markers such as nestin, NSE, β III tubulin, NF, S100, GFAP and CNPase. Allografting of DFAT cells into spinal cord injury (SCI)-induced rodents led to significant recovery from hindlimb dysfunction. Grafted cells were detected at the injection site, and some of these cells expressed β III tubulin. These results indicate that DFAT cells can transdifferentiate into neural cells, and contribute to the promotion of functional recovery. These findings also suggest that mature adipocytes could become a new source for cell replacement therapy to treat central nervous system disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：脂肪細胞、脱分化、分化転換、神経系細胞

1. 研究開始当初の背景

体細胞の多能性に関する研究は、胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚性幹（ES）細胞や骨髄液中に存在する間葉系幹細胞を含む細胞群（MSCs）を用いて活発に行なわれている。

それら幹細胞は、種々の分化誘導培地で分化誘導すると多種多様な細胞に分化することから、細胞生物学および発生生物学分野の研究材料として重要であるだけでなく、バイオテクノロジーや再生医療への応用が期待さ

れている。しかし、ES細胞の樹立および維持は現在においても著しく煩雑でコストも高く、またマウス以外の動物種においては樹立することは著しく困難である。また、ES細胞は受精卵に由来することから、その作出および利用には倫理的な問題を始めた未解決な諸問題が山積している。一方、骨髓液から採取されるMSCsは種および年齢を問わず採取および維持がES細胞に比べて格段に容易であり、自家移植できるなどES細胞が抱える問題点の多くをクリアしている。しかし、骨髓液は多種多様な細胞群から構成されており、その中に含まれる幹細胞の割合は0.01%程度とごく僅かである。MSCsを他細胞群の混入なしに単離するにはフローサイトメトリーなど高額な精密機器が必要であり、移植するのに必要とされる細胞数を確保するのは困難である。

我々は、成熟脂肪細胞を脱分化誘導することによって、種々の細胞に分化する脱分化脂肪細胞(DFAT)を作出することに成功している。DFATは、脂肪細胞に再分化するだけでなく、骨、軟骨、骨格筋、平滑筋、心筋および腱細胞など中胚葉系の細胞に分化することを見出している。このことは、体表部にある皮下脂肪組織中に豊富に存在する脂肪細胞から種々の分化細胞を大量に調整することが可能であることを示しており、再生医療を始めとした多種多様な応用が考えられる。しかし、脂肪細胞由来のDFATが外胚葉由来の神経系細胞に分化転換するかについては不明である。もし、DFATが神経系細胞に分化転換可能であれば、すなわち脂肪細胞から神経系細胞を大量に調整可能な培養系が確立できれば、多方面において極めて有用であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、中胚葉由来の成熟脂肪細胞を脱分化誘導することによって樹立した多能性前駆細胞“DFAT”が胚葉を越えて、外胚葉由来である神経系細胞に分化転換するかを明らかにする目的で行なった。さらに、脊髄損傷部位にDFAT由来の神経系細胞を移植することによって、それらが移植部位において生着および分化するかを調べた。

3. 研究の方法

成熟脂肪細胞を天井培養することによって脱分化誘導し、多能性前駆細胞DFATの樹立を試みた。樹立したDFATを神経系細胞に分化転換誘導し、神経系細胞に分化転換するかを細胞生物学および分子生物学的手法を用いて調べた。さらに、DFAT由来の神経系細胞を脊髄損傷部位に移植し、その後の動態について免疫組織化学および生理学的に検討した。

4. 研究成果

(1) 移植後に追跡可能なDFAT-GFPの樹立

成熟脂肪細胞由来するDFATから分化誘導した神経系細胞を移植し、体内での分化および組織化の状況を調べるに有効なDFATを樹立することを目的として、GFPマウス成熟脂肪細胞からDFATの樹立を試みるとともに、移植後におけるDFAT-GFPが追跡できるかを検討した。皮下脂肪組織を酵素処理およびフィルトレーションして採取した脂肪細胞画分をFACS解析した結果、すべてが成熟脂肪細胞であった。単離した成熟脂肪細胞を天井培養すると、細胞質内に小さな脂肪滴を複数有する多胞性脂肪細胞あるいは線維芽様細胞へと形態変化し、活発に増殖した(図1)。

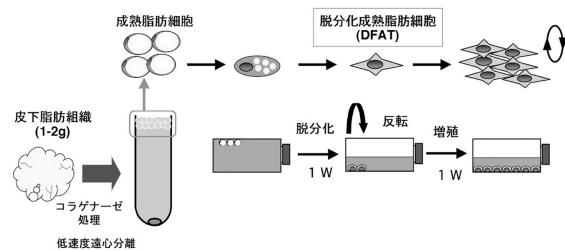


図1. 天井培養によるDFATの作製

次いで、脂肪細胞由来のDFAT-GFPが脂肪細胞に再分化するかについて調べた。その結果、分化誘導7日後、ほとんどの脱分化脂肪細胞(DFAT-GFP)が成熟脂肪細胞へと再分化した。DFAT-GFPの発光、増殖および分化能力は継代を繰り返しても維持された。以上の結果から、DFAT-GFPは均一な増殖および分化能力をもつ前駆細胞株であることが示された。また、DFAT-GFPは移植4週間後においてもGFPの発光が維持されたことから、DFAT-GFP由来の神経系細胞の体内における分化および組織化の解明に有効なツールになると考えられる(図2)。

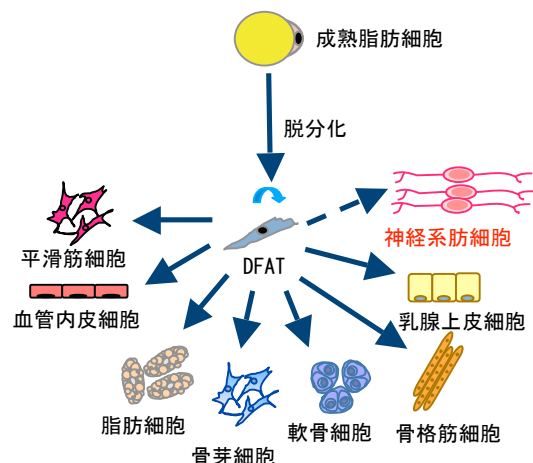


図2. 脂肪細胞から神経系細胞をつくる

(2) DFAT-GFPの神経系細胞への分化転換

(1)で樹立した GFP マウス成熟脂肪細胞由来の DFAT-GFP が胚葉を越えて神経系細胞へ分化転換するかを明らかにする目的で行なった。その結果、DFAT-GFP は分化誘導 4 時間後に神経細胞特異的な形態に変化した。さらに、Nestin、NSE、 β III tubulin、NF、S100 および CNPase などの神経細胞特異的遺伝子およびタンパク質を発現することが明らかとなった。また、DFAT-GFP 由来の神経系細胞が神経系細胞特異的な機能を有するかを調べるための長期培養系の開発を試みた。サブコンフルエントに到達した DFAT-GFP の培地を β メルカプトエタノールおよび 10%FBS 添加した DMEM の分化誘導培地で 24 時間培養したのち、B27 添加した DMEM (無結成培地) に培地交換して 6 日間培養した。その結果、培養 6 日後においても神経細胞様の形態が維持され、また増殖する細胞も観察された (図 3)。以上の結果から、成熟脂肪細胞に由来する DFAT-GFP は神経系細胞へ分化転換することが世界で初めて示された。

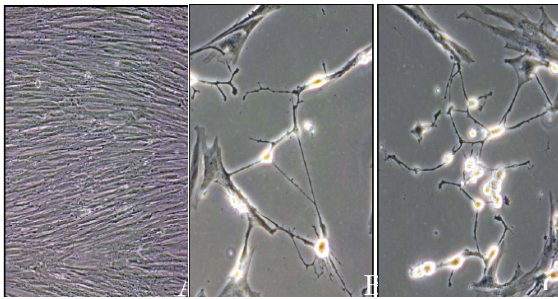


図 3. 神経分化誘導後における DFAT の形態変化

(3) DFAT-GFP における移植条件の検討

in vivo 外傷性脊髄損傷モデルマウスを用いた種々の幹細胞あるいは前駆細胞の移植実験において、移植細胞の状態がその後の組織形成に及ぼす影響については殆ど明らかにされていない。そこで、DFAT 由来の神経系細胞の移植条件を調べるための予備検討として、我々がすでに確立している脂肪細胞分化誘導培養系において DFAT を種々の分化段階で移植し、脂肪組織形成の状況を詳細に調べた。コンフルエント期 (C 期) は血管新生因子の bFGF、VEGF-A および Ang-1 を発現したが、脂肪細胞分化マーカーである PPAR γ 2 および GLUT4 の発現は認められなかった。分化初期 (ED 期) では PPAR γ 2 および GLUT4 の発現が示され、上記の血管新生因子に加えて Ang-2 の一過的な発現増加が認められた。分化後期 (LD 期) では PPAR γ 2 および GLUT4 の発現は増加したが、血管新生因子の発現はほとんど認められなかった。ついでこれらの DFAT-GFP をマウス胸部皮下に移植し、その後

の動態について組織学的に調べた。C 期では線維芽細胞のみが観察され、血管の発達はほとんど認められなかった。一方、ED 期では移植塊内において血管新生が顕著に認められ、発達した白色脂肪組織を形成した。LD 期では、移植塊内において血管の発達は全く認められず、移植細胞のほとんどが分化状態を維持できずにネクローシスを起こした。以上の結果から、ED 期の DFAT-GFP を移植した時のみ脂肪組織を形成することから、前駆脂肪細胞の分化程度が移植後の脂肪組織形成に影響することが示された (表 1)。現在、以上の成果を基に DFAT 由来の神経系細胞の至適移植条件について検討している。

表 1. DFAT-GFP 移植による脂肪組織形成

	移植した個体数	脂肪組織形成した個体数
C 期	11	0 (0%)
ED期	20	17 (89%)
LD期	14	3 (29%)

(4) 脊髄損傷モデル動物への DFAT の移植
成熟脂肪細胞から樹立した DFAT に由来する神経系細胞を脊髄損傷モデルへ移植することによって、それら神経系細胞が移植部位において生着および分化するかを明らかにする目的で行なった。マウスおよびラット皮下脂肪組織から成熟脂肪細胞を単離し、天井培養により脱分化を誘導後、DFAT を作製した。まず、得られた DFAT の神経細胞分化能について in vitro で検討した。次いで、重錘落下法により作製した外傷性脊髄損傷モデル動物に DFAT の移植注入を行なうことによって、後肢運動機能を Basso Beattie Bresnahan (BBB) スコアで経時的に評価した。さらに移植細胞の生着および分化について脊髄切片を用いて免疫組織染色を行なった。その結果、DFAT を神経系細胞へと分化誘導すると、神経細胞で観察される細長い突起および丸い細胞体を有する形態へと変化するだけでなく、神経細胞特異的な遺伝子およびタンパク質を発現した。また、脊髄損傷モデル動物に脱分化脂肪細胞の移植を行ったところ、BBB スコアの改善および損傷部位での移植細胞の生着や神経系細胞への分化が認められた。以上の結果は、神経再生療における新規の移植ドナー細胞として成熟脂肪細胞が有用であること、また今後ヒトでの応用も期待できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Nobusue H, Kano K, Establishment and Characteristics of Porcine Preadipocyte Cell Lines Derived from Mature Adipocytes, *J Cell Biochem.* 2010. 109: 542-552, 2010. (査読有)
- ② Ohta Y, Takenaga M, Tokura Y, Hamaguchi A, Matsumoto T, Kano K, Mugishima H, Okano H, Igarashi R, Mature adipocyte-derived cells, dedifferentiated fat cells (DFAT), promoted functional recovery from spinal cord injury-induced motor dysfunction in rats. *Cell Transplant.* 2008. 17: 877-86. (査読有)
- ③ Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H, Mature Adipocyte Drived Dedifferentiated Fat Cells Exhibit Multilineage Potential, 2008. 215: 210-222. (査読有)
- ④ Nobusue H, Endo T, Kano K, Establishment of a preadipocyte cell line derived from mature adipocytes of GFP transgenic mice and formation of adipose tissue. *Cell Tissue Res.* 2008. 332: 435-46. (査読有)

[学会発表] (計3件)

- ① 加野浩一郎、成熟脂肪細胞に由来する多能性前駆細胞 DFAT の樹立と特性、第 51 回歯科基礎医学会学術大会、2009 年 9 月 9 日、新潟市
- ② 信末博行、飯島明日香、遠藤克、加野浩一郎、前駆脂肪細胞の分化程度は移植後の脂肪組織形成に影響を及ぼす、日本畜産学会第 109 回大会、2008 年 3 月 27 日、水戸市
- ③ 信末博行、遠藤克、加野浩一郎、GFP マウス成熟脂肪細胞に由来する前駆脂肪細胞株の樹立と脂肪組織形成、日本畜産学会第 108 回大会、2007 年 9 月 26 日、岡山市

[その他]

ホームページ等

<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/NA/0005684/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加野 浩一郎 (KANO KOICHIRO)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：80271039

(2) 研究協力者

信末 博行 (NOBUSUE HIROYUKI)

日本大学・生物資源科学部・博士研究員

研究者番号：60323482

沖 嘉尚 (OKI YOSHUNAO)

日本大学・生物資源科学部・助手

研究者番号：70525667