

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580458

研究課題名(和文) 犬の再生治療に用いる新規細胞ソースとしての脱分化脂肪細胞(DFAT)

研究課題名(英文) Utilities of canine dedifferentiated fat cells for regenerative therapy.

## 研究代表者

西村 亮平(Nishimura, Ryohei)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：80172708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：犬の皮下脂肪組織から成熟脂肪細胞を単離し、培地を満たしたフラスコ中で天井培養すると脱分化し、間葉系幹細胞(MSC)の性質をもつ、脱分化脂肪細胞(DFAT)が得られた。一方、犬骨髓中の脂肪細胞を用いて同様に天井培養を行ったところ、脂肪細胞周囲の小型細胞が増殖した。この細胞を骨髓脂肪細胞周囲細胞(BM-PACs)と名付け、骨髓間葉系幹細胞(BMMSCs)と比較したところ、増殖能や多分化能、肝細胞増殖因子の発現に優れており、再生医療に有用な新たなMSCであると考えられた。さらに、BM-PACsの軟骨分化能に注目し、バイオ3Dプリンタを用いた犬軟骨の組織培養を試み、犬軟骨様組織の作製に一部成功した。

研究成果の概要(英文)：We successfully harvested canine dedifferentiated fat (DFAT) cells with the characteristics of mesenchymal stem cells by ceiling culture of mature adipocytes isolated from subcutaneous fat tissue. Inspired by DFAT cells, we also cultured adipocytes in canine bone marrow by ceiling culture method and found that small cells around adipocytes dominantly proliferated without dedifferentiation of adipocytes. We named these cells as bone marrow peri-adipocyte cells (BM-PACs) and compared their abilities as stem cells with bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs). Consequently, BM-PACs showed superior proliferation, multi-differentiation ability and HGF expression to BMMSCs. Therefore, BM-PACs can be new candidates for regenerative therapy in dogs. Further, focusing on chondrogenic ability of BM-PACs, we tried ex vivo culture of cartilage tissue using bio-3D printer and successfully fabricated tissue structures with a part of characteristics of canine cartilaginous tissue.

研究分野：再生医療

キーワード：脱分化脂肪細胞 骨髓 再生医療 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、犬の間葉系幹細胞 (MSCs) を用いた再生医療の確立を目指し、犬の骨髄間葉系幹細胞 (BMMSCs) あるいは脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADMSCs) の性状解析を行ってきた結果、増殖能や多分化能の比較から、ADMSCs が優れていると考えられた。しかし、ADMSCs はヘテロな細胞群であり、採取部位により分化能に差があるなど、幹細胞としての限界も認められた。一方、ヒトやげっ歯類において、脂肪組織から、成熟脂肪細胞を分離して天井培養すると脱分化し、MSC 様の性質を持つ脱分化脂肪細胞 (DFAT) が得られ、ADMSCs と比較し、クローナリティが高い細胞であることが報告されており、犬でも DFAT が得られれば、ADMSCs の課題を克服でき、再生医療に有用な細胞材料となることが期待された。

2. 研究の目的

犬の皮下脂肪組織から成熟脂肪細胞を分離し、天井培養を行うことで、犬でも脱分化脂肪細胞が得られるかを検討することを目的とした。さらに、骨髄液中に含まれる脂肪細胞についても、同様の能力を保有するかを検討した。

3. 研究の方法

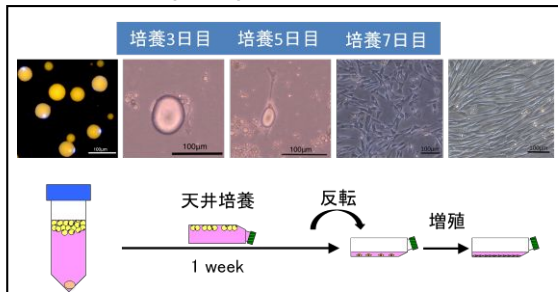
健常ビーグル犬から皮下脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ処理により成熟脂肪細胞を分離したのち、20%FBS 添加 DMEM 培地を満たしたフラスコ中で天井培養を行った。培養開始後、経時的に上面に付着した成熟脂肪細胞の形態変化を観察した。1 週間後にフラスコを反転させ、付着した脂肪細胞を 10%FBS 添加 DMEM 培地で 80-90%コンフルエントに達するまで増殖培養した。得られた細胞の増殖能を増殖曲線から評価するとともに、脂肪および骨分化誘導試験を行い、病理学的評価と qPCR による脂肪・骨分化マーカー発現変化から、脂肪・骨分化能を評価した。

骨髄中脂肪細胞は、骨髄間葉系幹細胞 (BMMSCs) の培養過程で浮遊して得られる脂肪層から得た。脂肪細胞を上述の方法で天井培養し、得られた細胞の増殖能および脂肪・骨・軟骨への分化能を同時に得られた BMMSCs と比較して評価した。また、FACS を用いて細胞表面抗原解析を行い、両細胞の差異について検討した。さらに、組織修復において大きな役割を担っている液性因子である肝細胞成長因子 (HGF) の発現に注目し、両者の HGF 発現を遺伝子およびタンパクレベルで比較した。実験の最後ではバイオ 3D プリンタを用いた犬軟骨組織の体外培養にも試みた。

4. 研究成果

犬皮下脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞は天井培養開始後 3 日目にはフラスコ上面に付着し、大型で類円形の細胞形態を示していたが、5 日目には線維芽細胞様の突起を形

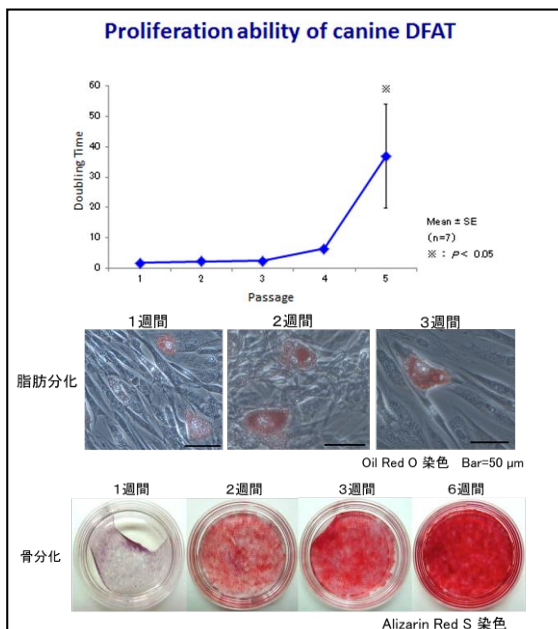
成し、脂肪含有量も低下していた。7 日目には細胞内の脂肪含有量はわずかとなり、線維芽細胞様細胞の形態を示し、増殖する様子が観察された (図 1)。



【図 1】犬 DFAT の培養

皮下脂肪組織から分離した細胞 (Nile Red および Hoechst33342 で染色して示す) を天井培養後、経時的に細胞の観察を行った。3 日後にはフラスコ上面への接着が認められ、脂肪蓄積量の減少とともに、突起形成がみられ、線維芽細胞様の細胞形態をとりながら、増殖した。培養開始から 10 日前後でコンフルエントに達した。

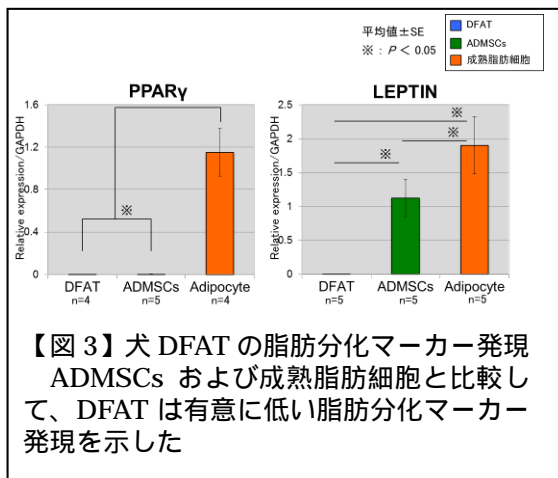
継代培養においては、第 4 継代以降で増殖能が低下し、ADMSCs と同等の増殖能であった。脂肪分化誘導により、Oil Red O 染色に陽性の脂肪滴を細胞質に含む類円形細胞の出現が確認され、経時的な脂肪滴含有量の増加と脂肪分化マーカー (PPAR $\gamma$ ・LEPTIN) の有意な発現上昇がみとめられた。一方、骨分化誘導により、誘導 2 週間後から Alizarin Red S 染に陽性を示すカルシウム沈着が認められ骨分化マーカーである RUNX2 発現は非誘導群と比較して有意に高く維持されており、OSTEOCALCIN 発現にも維持されていた (図 2)。



【図 2】犬 DFAT の増殖能と多分化能

犬の DFAT 第 4 継代以降、Doubling Time の延長がみられた。脂肪・骨分化誘導培地にて、経時的に脂肪蓄積およびカルシウム沈着が認められ、脂肪・骨分化能を持つことが示された。

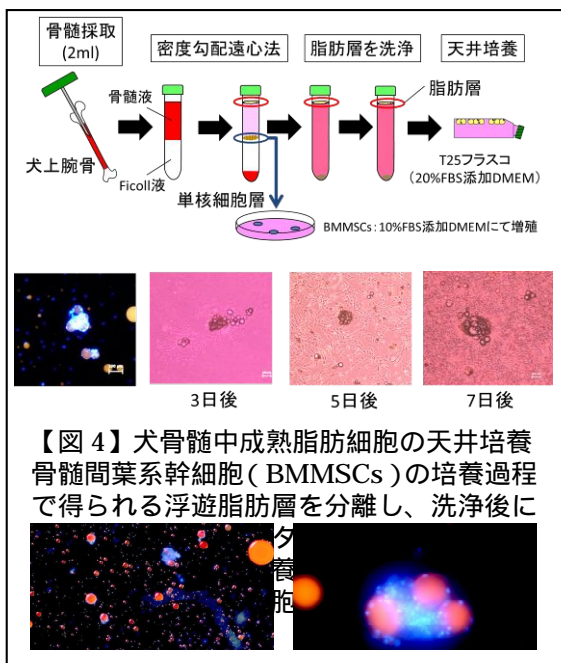
さらに、脂肪細胞および ADMSCs の脂肪分化マーカー発現を比較したところ、両者と比較し、有意に低い発現を示した（図3）。



【図3】犬 DFAT の脂肪分化マーカー発現 ADMSCs および成熟脂肪細胞と比較して、DFAT は有意に低い脂肪分化マーカー発現を示した

以上の結果から、犬の成熟脂肪細胞を天井培養することで、脂肪細胞から線維芽細胞様の細胞へ脱分化し、自己増殖能および脂肪・骨への分化能を持つ脱分化脂肪細胞（DFAT）が得られたと考えられた。

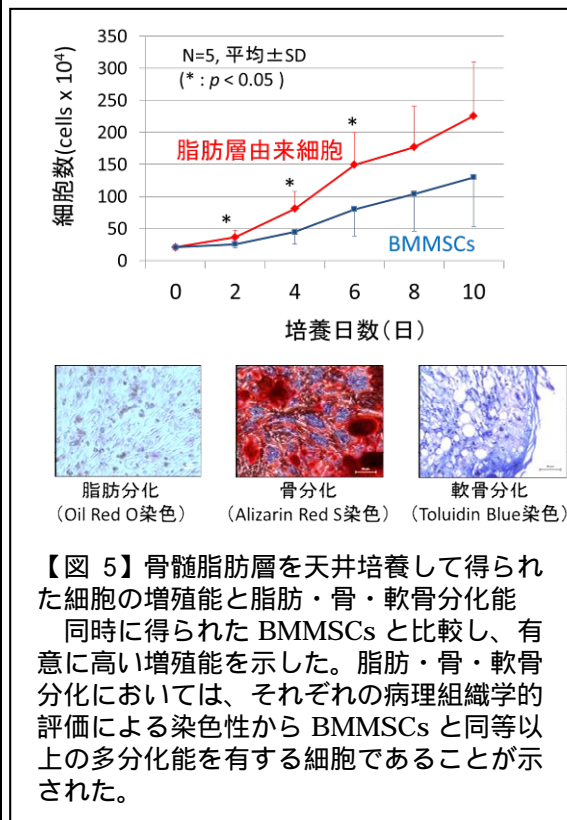
犬上腕骨より得られた骨髓液から密度勾配遠心法により単核細胞分離を行うと同時に、最上層の浮遊細胞層から脂肪細胞が得られた。DFAT と同様の方法で浮遊培養を行ったところ、線維芽細胞様細胞の増殖が培養開始後3日以降にみられ、7-10日後にコンフルエントに達した。タイムラプス顕微鏡を用いて、増殖過程を観察した結果、この細胞は脂肪細胞の脱分化により得られたものではなく、脂肪細胞周囲に接着している小型細胞の増殖によるものであった（図4）。



【図4】犬骨髓中成熟脂肪細胞の天井培養 骨髓間葉系幹細胞（BMMSCs）の培養過程で得られる浮遊脂肪層を分離し、洗浄後に

同時に得られた単核細胞層の接着培養に得られた BMMSCs と増殖能・多分化能を比較したところ、有意に高い増殖能と同等以上の多

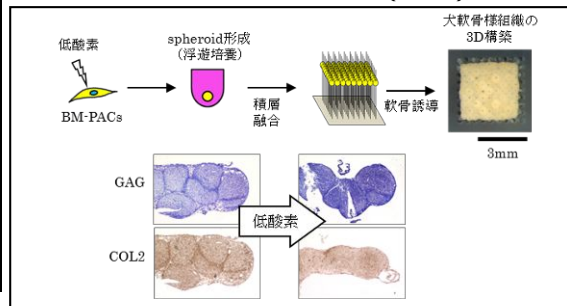
分化能を示す細胞であることが明らかとなり、BMMSCs より優れた間葉系幹細胞であると考えられた（図5）。



【図5】骨髓脂肪層を天井培養して得られた細胞の増殖能と脂肪・骨・軟骨分化能 同時に得られた BMMSCs と比較し、有意に高い増殖能を示した。脂肪・骨・軟骨分化においては、それぞれの病理組織学的評価による染色性から BMMSCs と同等以上の多分化能を有する細胞であることが示された。

犬骨髓中の脂肪細胞周囲に付着する細胞を骨髓脂肪細胞周囲細胞（Bone Marrow Peri-adipose Cells ; BM-PACs）と命名し、BM-PACs と BMMSCs の差を、複数の細胞表面抗原の発現から解析したところ、CD73 の発現に有意な差がみられた。また、BM-PACs は、炎症性サイトカインの TNF- $\alpha$  存在下で、組織再生に様々な効果を示す栄養因子である肝細胞成長因子（HGF）の発現上昇を示し、炎症がおこった組織の再生に貢献できることが示唆された。

研究の最後では、BM-PACs の軟骨分化能に注目し、BM-PACs を浮遊培養して得られるスフェロイドを積層・融合させた後、低酸素下で軟骨誘導を行うことで、犬軟骨組織の体外培養を試みた。結果、プロテオグリカンの発現は認められなかったものの、豊富なグリコサミノグリカン、II型コラーゲンの軟骨基質を発現する組織構造体を得ることができ、将来的に BM-PACs を用いた組織再生医療へ応用可能であることが示唆された（図6）。



【図6】BM-PACsのスフェロイドを用いた犬軟骨様組織の体外培養

BM-PACsのスフェロイドを積層・融合させ、低酸素かで軟骨分化誘導を行うことにより、軟骨基質であるグリコサミノグリカン(GAG)やⅡ型コラーゲン(COL2)を豊富に発現する組織構造体を作製可能であった。

#### 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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 6 件)

Endo K, Lin HY, Fujita N, Harada K, Kunitomi Y, Nakagawa T, Nishimura R., Hypoxic conditions and spheroid chondrogenesis aimed at canine cartilage tissue biofabrication, 4<sup>th</sup> Asian Meeting of Veterinary Surgery. 2015. Osaka. 査読あり

Lin HY, Endo K, Fujita N, Nakagawa T, Nishimura R., Ceiling culture of adipose layer isolated from canine bone marrow can generate promising mesenchymal stem cells for regenerative medicine, 4<sup>th</sup> Asian Meeting of Veterinary Surgery. 2015. Osaka. 査読あり

遠藤健太郎、林杏怡、藤田直己、中川貴之、西村亮平、犬軟骨のバイオアプリケーションを目指した Spheroid 培養法の検討、第 156 回日本獣医学会学術集会、2014 年、北海道、査読あり

林杏怡、遠藤健太郎、藤田直己、中川貴之、西村亮平、Comparison of bone marrow peri-adipocyte cells and bone marrow mesenchymal stem cells in dogs、第 156 回日本獣医学会学術集会、2014 年、北海道、査読あり

藤田直己、林杏怡、鍾承澍、遠藤健太郎、三ヶ島史人、中川貴之、西村亮平、犬骨髓中脂肪細胞を天井培養して得られる細胞は新たな間葉系幹細胞候補である、第 155 回日本獣医学会学術集会、2013 年、岐阜、査読あり

天野まど香、河原直哉、Chung Cheng-shu、由井翔、藤田直己、西村亮平、犬の脂肪由来間葉系幹細胞の採取部位による比較と脱分化脂肪細胞培養の試み、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年、岩手、査読あり

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)  
なし

取得状況(計 0 件)  
なし

〔その他〕

ホームページ：東京大学・大学院獣医外科学  
教室 HP  
(<http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/geka/>)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

西村 亮平 (NISHIMURA, Ryohei)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：80172708

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし