

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04607

研究課題名(和文) 成熟脂肪細胞に由来する脱分化細胞を用いた新規の再生医療用ドナー細胞の開発

研究課題名(英文) Dedifferentiated fat (DFAT) cells as a new donor cells for regenerative medicine.

研究代表者

加野 浩一郎 (KANO, Koichiro)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80271039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：終末分化した成熟脂肪細胞を脱分化誘導することによって、脱分化脂肪細胞(DFAT: de-differentiated from fat cells)を樹立した。DFATは増殖期においても種々の細胞の分化初期マーカーをすでに発現することから、細胞系譜における前駆細胞段階にあることが示された。また、DFATを種々の方法で分化誘導すると脂肪細胞に再分化するだけでなく、骨芽細胞および神経系細胞などに分化した。成熟脂肪細胞に由来するDFATは、単一な細胞群として安全、簡便かつ低コストで大量調整可能であることから、従来の幹細胞とは異なる新規の再生医療用ドナー細胞として有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：When mature adipocytes are subjected to an in vitro dedifferentiation strategy referred to as ceiling culture, these mature adipocytes can revert to a more primitive phenotype and gain cell proliferative ability. We refer to these cells as dedifferentiated fat (DFAT) cells. In the present study, we examined the multilineage differentiation potential of DFAT cells. DFAT cells obtained from adipose tissues of various animals exhibited a fibroblast-like morphology and sustained high proliferative activity. In vitro differentiation analysis revealed that DFAT cells could differentiate into adipocytes, osteoblasts and nerve cells under appropriate culture conditions. These results indicate that DFAT cells represent a type of multipotent progenitor cell. Since DFAT cells can be prepared from a small quantity of adipose tissue, they could facilitate cell-based therapies in small companion animals such as dogs and cats.

研究分野：細胞生物学、発生・再生生物学、再生医学

キーワード：成熟脂肪細胞 自発的脱分化 分化多能性 脱分化脂肪細胞 獣医再生医学

1. 研究開始当初の背景

現在、ヒトでは骨髄間質あるいは脂肪組織に存在する幹細胞を細胞源とした自家移植による再生医療が試みられているが、骨髄液および脂肪組織の採取に伴う侵襲性や、それらの組織を構成する多様な細胞群の混入によって品質が一定しないなどの問題点があり、それら間葉系幹細胞 (MSCs) の安全性を担保する標準化が大きな課題となっている。また、それらの組織中に含まれる幹細胞の数は約 0.01~1%と僅かであり、採取後における体外での増殖法の効率性や経済性など解決すべき問題が多く残されている。

研究代表者らは、皮下脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養し、自発的に脱分化させることによって、脱分化脂肪細胞 (DFAT 細胞) を取得できることを明らかにした (Yagi et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2004; Nobusue et al., *Cell Tissue Res*, 2008; Nobusue et al., *Nature Commun*, 2014)。DFAT 細胞は脂肪細胞に再分化するだけでなく、骨、軟骨、筋、上皮および神経細胞などに分化転換することも報告してきた (Matsumoto et al., *J Cell Physiol*, 2008; Oki et al., *Cell Struct Funct*, 2008; Kazama et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, Yamada et al., 2014)。また、我々は上述の研究成果を国際特許化した (特許第 5055613 号 (日本)、602004034912.7 (独)、1637590 (仏)、1637590 (英))。約 1g の皮下脂肪組織をコラゲナーゼ処理することによって、浮遊する脂肪細胞を単離し、天井培養すると約 50% の脂肪細胞が自発的に脱分化誘導され、非対称分裂によって DFAT 細胞が次々と産生される。最近、我々は脂肪組織の採取時の侵襲性を更に低減させるため、美容整形で用いられているチューメセント麻酔液をわずか 10 ml 皮下投与することによって単離される成熟脂肪細胞から DFAT 細胞を効率よく取得できることを明らかにした。これらのことは、

DFAT 細胞が、すでに再生医療に用いられている MSCs に比べて著しく侵襲性が低く、また極めて効率的に取得可能であることを示しており、DFAT 細胞は再生医療用のドナー細胞として優位性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

研究代表者らは、これまでの研究成果を基盤として、DFAT 細胞が新規の再生医療用ドナー細胞として有用性が高いことを報告してきた。DFAT 細胞の優位性は、低侵襲性および著しく低コストで作製できることから、獣医領域における新規の再生医療のドナー細胞として有望であると考えられる。本研究では、イヌあるいはネコ由来の脂肪細胞から DFAT 細胞を作製し、その増殖能および多分化能を調べることによって、獣医再生医療に対しても適用するかを明らかにする目的で行った。

3. 研究の方法

(1) イヌ皮下脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞に由来する DFAT 細胞の作製、および増殖能と多分化能

再生医療用のドナー細胞として DFAT 細胞を臨床応用するには、成熟脂肪細胞から均質な増殖および多分化能をもつ DFAT 細胞が安定的に取得できなければならない。本研究では、種々の犬種 (品種) および年齢の個体から採取した成熟脂肪細胞から DFAT 細胞を作製し、それぞれの DFAT 細胞の特性 (増殖および多能性) を明らかにすることを目的として研究を実施した。日本大学動物病院で外科手術の際に廃棄される皮下脂肪組織 (約 1g) を細切したのち、コラゲナーゼ処理した。処理後、フィルトレーションして未消化組織を除去したのち、低速で遠心分離して成熟脂肪細胞の画分を採取した。培養面積 12.5cm² のフラスコに 5 万個の成熟脂肪細胞を播種し、10%FBS 添加 DMEM で 14 日間培養した。培養後、成熟脂肪細胞から非対称分裂により生じる

DFAT 細胞の細胞数を調べた。

(2) DFAT細胞に由来する機能的な神経細胞の作製

DFAT 細胞を脊髄損傷モデルマウスに移植すると、後肢運動機能が回復するだけでなく、神経系細胞に分化すること示した。しかし、体外培養条件下で DFAT が神経細胞に分化するかについては明らかではない。本研究では、体外培養条件下における DFAT の神経細胞への分化能を明らかにする目的で行った。DFAT 細胞を 10%FBS 添加 DMEM で 24 時間培養したのち、b-FGF を添加した 20%FBS 添加 DMEM で 24 時間の前分化誘導を行なった。その後、バルプロ酸を添加した神経細胞分化誘導培地で 48 時間の分化誘導を行なった。分化誘導前、前分化誘導後および分化誘導後に細胞形態を観察したのち、定法に従って全 RNA を抽出した。リアルタイム PCR を用いて神経細胞特異的遺伝子の発現量を調べた。また、種々の神経細胞特異的タンパク質の局在性については、免疫蛍光染色して観察した。

(3) 内視鏡で採取した微量な内臓脂肪組織から作製した DFAT 細胞の増殖能

多能性をもつ脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)は、成熟脂肪細胞が自発的に脱分化することによって生成される。脂肪組織の 80~90%は成熟脂肪細胞で構成されていることから、内視鏡で採取できる微量の内臓脂肪組織からイヌ DFAT 細胞を取得可能であると考えられる。本研究では、内視鏡で採取される微量なイヌの内臓脂肪組織から細胞移植治療に必要なとされる数のイヌ DFAT 細胞が調整できるかを調べる目的で行った。動物病院に来診し、肝生検が必要と診断されたイヌ 5 頭のオーナーのインフォームドコンセントを得たのち、内視鏡を用いて肝臓付近にある内臓脂肪組織を採取し、重量を測定した。その後、脂肪組織をコラゲナーゼ処理することによ

って成熟脂肪細胞を単離したのち、天井培養して DFAT 細胞を作製した。その後、DFAT 細胞を継代し、20%FBS 添加 DNEM で 10~14 日間培養して細胞数を計測した。

4. 研究成果

(1) イヌ皮下脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞に由来する DFAT 細胞の作製、および増殖能と多分化能

培養7日後および14日後では、それぞれ $3\sim 4 \times 10^6$ 個/ 12.5cm^2 および $1.2\sim 1.6 \times 10^6$ 個/ 12.5cm^2 のDFAT細胞が採取された。ついで、作製したDFAT細胞の増殖能および多分化能について検討した。継代2~5代目までのDFAT細胞を 10^3 個 cm^2 で播種し、培養7日後における細胞数を調べた。その結果、 $3.5\sim 5 \times 10^4$ 個/ cm^2 のDFAT細胞が採取された。継代2~5代目のDFAT細胞の脂肪細胞および神経系細胞への分化能力を調べた結果、脂肪細胞および神経細胞特異的遺伝子およびタンパク質の発現が観察された。また、DFAT細胞の作製効率、増殖および多分化能は、犬種および年齢の影響はいずれにおいても認められなかった。

(2) DFAT細胞に由来する機能的な神経細胞の作製

分化誘導前のDFATは線維芽細胞様の形態を示していたが、前分化誘導後には細長い突起をもつ形態へと変化した。分化誘導後、DFATは神経突起および神経細胞体様の形態に変化した。リアルタイムPCRの結果、神経細胞特異的遺伝子(NSE, SYP)およびセロトニン(5-HT)作動性神経細胞特異的遺伝子であるTph2の発現量は、培養時間の経過に伴って増加した。また、5-HT神経特異的遺伝子であるSERTは、分化誘導後にのみ発現が検出された。しかし、ドーパミン、アセチルコリンおよびGABA作動性神経細胞特異的遺伝子であるTH, ChATおよびGAD65の発現は認められなかった。SYP, Tph2およびSERTの局在性を調べた結果、Tph2は核

周辺部に、SYPおよびSERTは細胞膜上に蛍光が観察された。以上の結果から、DFATは5-HT作動性神経細胞様細胞へ分化することが示唆された。

(3) 内視鏡で採取した微量な内臓脂肪組織から作製したDFAT細胞の増殖能

いずれの個体においても150~200mgの脂肪組織が採取された。採取した脂肪組織を細切したのち、コラゲナーゼ処理および濾過(孔径100 μ m)した結果、1~5 $\times 10^4$ 個の成熟脂肪細胞が採取された。20%FBS添加DMEMを満したフラスコに約 10^4 個/12.5cm²の成熟脂肪細胞を導入して天井培養を行った。その結果、天井培養14日後では、1~4 $\times 10^5$ 個/12.5cm²のDFAT細胞(初代)が取得された。フラスコに導入した成熟脂肪細胞の10~40倍のDFATが採取されることが示された。その後、DFAT細胞を1 $\times 10^4$ 個/mlで1~4枚の培養皿(55cm²)播種して継代培養すると、培養10~14日後において6~8 $\times 10^6$ 個/55cm²のDFAT細胞が取得された。従って、少なくとも6~24 $\times 10^6$ 個のDFAT細胞が1ヶ月程度で調整可能であることが示された。以上の結果から、内視鏡に用いて150~200mgと微量の内臓脂肪組織から細胞移植に十分なDFAT細胞の調整可能であることが示された。また、内視鏡で採取する脂肪組織を2倍に増やすと取得されるDFAT細胞数は約2.5倍になるが、採取時間や侵襲性に大きな違いはなかった。

<引用文献>

Oki Y, Watanabe S, Endo T, Kano K, Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can trans-differentiate into osteoblasts in vitro and in vivo only by all-trans retinoic acid, *Cell Struct Funct*, 2008, 33(2):211-222.

Kazama T, Fujie M, Endo T, Kano K, Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can transdifferentiate into skeletal myocytes in vitro, *Biochem Biophys Res Commun*, 377(3):780-785.

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-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential, *J Cell Physiol*, 2008, 215(1):210-222.

Nobusue H, Onishi N, Shimizu T, Sugihara E, Oki Y, Sumikawa Y, Chiyoda T, Akashi K, Saya H, Kano K, Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation, *Nat Commun*. 2014, 5:3368.

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(3):435-446.

Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, Kano K, A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 321(4):967-974.

Yamada H, Ito D, Oki Y, Kitagawa M, Matsumoto T, Watari T, Kano K, Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells promotes locomotor functional recovery by remyelination and glial scar reduction after spinal cord injury in mice, *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 454(2):341-346.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Shimizu M, Matsumoto T, Kikuta S, Ohtaki M, Kano K, Taniguchi H, Saito S, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Transplantation of dedifferentiated fat cell-derived micromass pellets contributed to cartilage repair in the rat osteochondral defect model. *J Orthop Sci*, 査読有, 2018, in press, DOI:10.1016/j.jos.2018.03.001.

Tsurumachi N, Akita D, Kano K, Matsumoto T, Toriumi T, Kazama T, Oki Y, Saito-Tamura Y, Tonogi M, Shimizu N, Honda M, *J Oral Sci*, 査読有, 2018, 60(1):14-23. DOI:10.2334/josnusd.16-0786.

Suzuki D, Akita D, Tsurumachi N, Kano K, Yamanaka K, Kaneko T, Kawano E, Iguchi S, Toriumi T, Arai Y, Matsumoto T, Sato S, Honda M, Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat

cells into three-wall defects in the rat periodontium induces tissue regeneration, *J Oral Sci*, 査読有, 2017, 59 (4):611-620. DOI:10.2334/josnugd.16-0878.

Nakayama E, Matsumoto T, Kazama T, Kano K, Tokuhashi Y, Transplantation of dedifferentiation fat cells promotes intervertebral disc regeneration in a rat intervertebral disc degeneration model, *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 2017, 493(2):1004-1009. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.09.101.

Mikrogeorgiou A, Sato Y, Kondo T, Hattori T, Sugiyama Y, Ito M, Saito A, Nakanishi K, Tsuji M, Kazama T, Kano K, Matsumoto T, Hayakawa M, *Dev Neurosci*. 査読有, 2017; 39(1-4):273-286. DOI:10.1159/000455836.

Ikado Y, Obinata D, Matsumoto T, Murata Y, Kano K, Fukuda N, Yamaguchi K, Takahashi S. Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells for the treatment of vesicoureteral reflux in a rat model. *Int Urol Nephrol*, 査読有, 2016, 48(12): 1951-1960.

Akita D, Kano K, Saito-Tamura Y, Mashimo T, Sato-Shionome M, Tsurumachi N, Yamanaka K, Kaneko T, Toriumi T, Arai Y, Tsukimura N, Matsumoto T, Ishigami T, Isokawa K, Honda M, Use of Rat Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells as a Cell Source for Periodontal Tissue Regeneration, *Front Physiol*, 査読有, 2016, 7:50. DOI:10.3389/fphys.2016.00050.

Tsurumachi N, Akita D, Kano K, Matsumoto T, Toriumi T, Kazama T, Oki Y, Tamura Y, Tonogi M, Isokawa K, Shimizu N, Honda M, Small Buccal Fat Pad Cells Have High Osteogenic Differentiation Potential. *Tissue Eng Part C Methods*. 査読有, 2016, 22(3):250-259. DOI:10.1089/ten.TEC.2015.0420.

〔学会発表〕(計 8 件)

萩原玲子、伊林志穂、沖 嘉尚、加野浩一郎、成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞 DFAT の肝細胞への分化、日本畜産学会 124 回大会、2018.

Hagiwara R, Ibayashi S, Oki Y, Kano K, Identification of the master regulator gene for hepatocyte differentiation in de-differentiated fat (DFAT) cells, 第 40 回日本分子生物学会年会、2017.

加野浩一郎、成熟脂肪細胞から多能性細胞をつくる ～脱分化脂肪細胞 DFAT の開発とその特性～、第 86 回原爆後障害医療研究所研究集会、2017.

加野浩一郎、成熟脂肪細胞から多能性細胞をつくる ～DFAT 細胞の特性と再生医療への応用展開～、先端医療実用化推進事業シンポジウム、2017.

渡辺真平、沖 嘉尚、加野浩一郎、成熟脂肪細胞由来の DFAT はセロトニンおよびグルタミン酸作動性神経細胞へと分化する、日本畜産学会第 122 回大会、2017.

渡辺真平、沖 嘉尚、加野浩一郎、成熟脂肪細胞由来の DFAT はセロトニン作動性神経細胞へと分化する、第 39 回日本分子生物学会、2017.

加野浩一郎、成熟脂肪細胞に由来する多能性細胞 DFAT の開発とその特性 ～獣医領域における再生医療への応用～、第 159 回日本獣医学会学術集会、2016.

加野浩一郎、終末分化した体細胞から多能性細胞をつくる - 自発的な脱分化と多能性獲得 -、第 8 回日本創傷外科学会総会・学術集会、2016.

〔図書〕(計 1 件)

加野浩一郎、成熟脂肪細胞に由来する DFAT 細胞の開発、*Bio Clinica*, 2017, 32:997-1002.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：哺乳動物由来の脱分化脂肪細胞から神経細胞を製造する方法及び哺乳動物由来の脱分化脂肪細胞から神経細胞への分化誘導用キット

発明者：杉谷博士、中野 令、松本太郎、加野浩一郎

権利者：学校法人 日本大学

種類：特許

番号：特願 2017-237231

出願年月日：平成 29 年 12 月 11 日

国内外の別：国外

〔その他〕

NHK スペシャル 人体～神秘の巨大ネットワーク～、「第 2 集 驚きのパワー 脂肪と筋肉が命を守る」、2017 年 11 月 5 日放送

ホームページ等

<https://www.abs-brs.com/research/lab-ctb/theme/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加野 浩一郎 (KANŌ, Koichiro)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：80271039

(2)研究分担者

森友 忠昭 (MORITOMO, Tadaaki)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：20239677

北川 勝人 (KITAGAWA, Katsuhito)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：50409067

伊藤 大介 (ITO, Daisuke)
日本大学・生物資源科学部・講師
研究者番号：40508694

沖 嘉尚 (OKI, Yoshinao)
日本大学・生物資源科学部・助教
研究者番号：70525667