

平成30年 5月25日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10934

研究課題名(和文)皮下脂肪細胞の部位特異的機能差の由来とその制御による移植用最適細胞調整法の探求

研究課題名(英文) Cellular functional differences of adipocytes between superficial and deep subcutaneous fat layer

研究代表者

窪田 吉孝 (KUBOTA, YOSHITAKA)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：10375735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：皮下脂肪組織は肉眼的に明瞭に区別できる浅層と深層の2層から構成されている。浅層の脂肪組織は厚い隔壁に囲まれており、一方、深層は薄く伸展性にとむ隔壁に囲まれていて、物理的な性質に差があるとみられている。しかし、近年、メタボリックシンドロームと深層の脂肪組織の蓄積に関連がみられることが相次いで報告され、代謝学的な違いがある可能性が指摘されているが詳細は不明だった。我々は、ヒト浅層、深層脂肪細胞の詳細な解析を行い、浅層の脂肪細胞が深層のそれと比べて脂肪分化能が高いことを明らかにした。また、その機序として脂肪分化関連遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化の差があることを明らかにした。

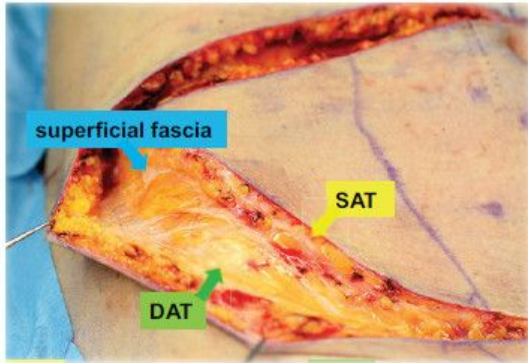
研究成果の概要(英文)：Subcutaneous fat tissue are consisted of two layers. One is superficial subcutaneous layer, in which fat lobules are surrounded by firm septum. The other is deep subcutaneous layer, in which fat lobules are surrounded by thin septum. It is thought that there are differences in physical properties between two layers. Recently, it is reported that accumulation of fat not in superficial layer but in deep layer is associated with metabolic syndrome. However, underlying mechanism was unclear. In the study, we performed cellular analyses of primary cultured human cells harvested from subcutaneous tissue. The subject of analysis in the study was ceiling culture derived-preadipocytes (ccdPAs). We revealed that ccdPAs from superficial layer retained higher adipogenic potential than those from deep layer even after long term culture. In cells from superficial layer showed higher lower DNA methylation of PPARG and higher PPARG expression.

研究分野：脂肪移植

キーワード：脂肪細胞 脂肪移植 細胞分化 エピジェネティクス DNAメチル化

### 1. 研究開始当初の背景

皮下脂肪組織は、浅筋膜で浅層と深層の解剖的に明瞭に構造が異なる2層に分けられている。これらの2層構造は肉眼的にも容易に区別可能であり、古くから解剖学の文献や教科書にも記載されている。また、皮下組織の2層構造は哺乳類全般に普遍的にみられる構造である。しかし、これらの2層構造の意義はよくわかっておらず、この点に関する研究はきわめて少ない



解剖学的に、浅層皮下脂肪組織を立方体形の脂肪小葉と強固な線維中隔から成る protective adipofascial system (PAFS)、深層皮下脂肪組織を扁平な脂肪小葉と滑動性に富む線維中隔から成る lubricant adipofascial system (LAFS) と呼び、それぞれ異なる生理的保護作用を持つと Nakajima らは報告した (Scand J Plast Reconstr Hand Surg, 2004)。また、形成外科学においては脂肪吸引術の臨床的な知見から肥満患者では皮下組織浅層よりも深層の脂肪蓄積度合いが強いことが経験的に知られていた。すなわち、皮下脂肪浅層と深層との間にはなんらかの代謝の差が存在するであろう事は示唆されていた。しかし、その詳細は不明であった。

以前から、皮下脂肪全体に対比して内臓脂肪蓄積が病的代謝とより強く相関することは詳細に研究されており、脂肪組織間に部位特異的な機能差があることはほぼ疑いのない事実であると考えられている。近年、代謝学領域から、皮下脂肪浅層ではなく深層の脂肪蓄積がメタボリックシンドロームなどの病的代謝状態と関連する、という報告が複数登場した。すなわち、形成外科学における肥満患者に対する脂肪吸引術において蓄積された知見を裏付けるように、代謝内科学的にも浅層・深層両者間に差が実際に存在する可能性を示唆する報告である。しかし、実際に浅層・深層のそれぞれの脂肪細胞間にどのような性質の違いがあるかは全く明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、皮下脂肪組織内の2層構造間に存在する部位特異的機能差の由来とその調節法を明らかにし、再生医療の目的別に適した細胞調製法を確立することで

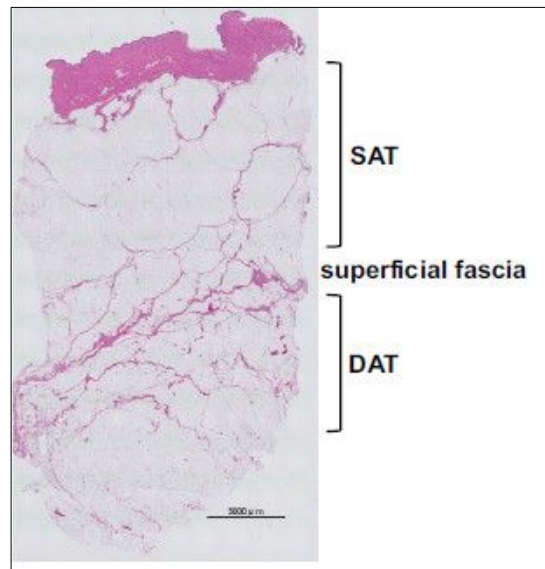
ある。

### 3. 研究の方法

代謝学的な異常がみられない標準体型 ( $19 < \text{BMI} < 25$ ) の女性から、手術時に廃棄される腹部皮下組織を回収した。

#### (1) 浅層・深層皮下脂肪組織の解剖学的分析

免疫組織化学染色により浅層・深層の脂肪組織、脂肪細胞の大きさを解析した。



#### (2) 浅層・深層皮下脂肪組織から分離した初代培養細胞を用いた脂肪分化能の解析

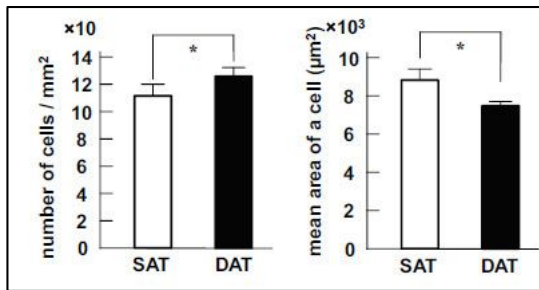
腹部皮下組織を細切してコラゲナーゼ処理の後遠心した。沈殿分画 (stromal vascular fraction, SVF) を培養して底面に接着した細胞群を脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cells, ASCs) とした。遠心処理物の上層浮遊分画を Sugihara が報告した天井培養法によって培養し天井面に接着した細胞群を天井培養由来前駆脂肪細胞 (ceiling culture-derived preadipocytes, ccdPAs) とした。両者を7週間培養の後、脂肪分化誘導培地で培養し、脂肪分化能を比較した。

#### (3) 脂肪分化関連遺伝子のエピジェネティクス解析

継代後も維持される分化能のポテンシャルの違いを明らかにするため、7週間培養後未分化状態の細胞からDNAを採取し、高解像度単一CpGサイトレベルDNAメチル化アッセイを行った。

### 4. 研究成果

(1) 浅層皮下脂肪組織の脂肪細胞は深層皮下脂肪組織の脂肪細胞と比べて大きい



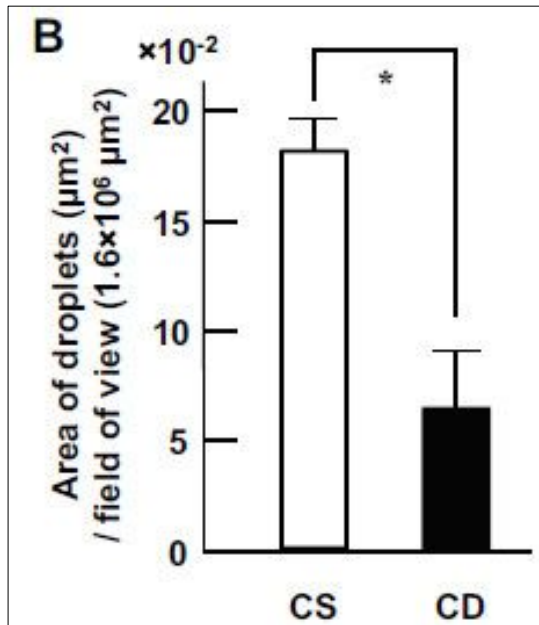
FABP4 染色した皮下脂肪組織切片の浅層・深層脂肪組織それぞれの単位面積あたりの脂肪細胞数および算出された平均脂肪細胞面積から、浅層皮下脂肪組織の脂肪細胞は浅層皮下脂肪組織のそれと比べて有意に大きかった。

また、皮下脂肪組織の PPARγ mRNA 発現は浅層皮下脂肪組織が深層皮下脂肪組織と比べて有意に高値だった。

(2) 浅層皮下脂肪組織由来の初代培養前駆脂肪細胞は深層皮下脂肪組織由来のそれと比べて脂肪分化能が高い

7 週間継代培養後も浅層皮下脂肪組織由来の初代培養前駆脂肪細胞は深層皮下脂肪組織由来のそれと比べて脂肪分化誘導により有意に高い脂肪分化能を示した。

また、PPARγ mRNA, 蛋白質の発現は浅



層皮下脂肪組織由来の初代培養前駆脂肪細胞が深層皮下脂肪組織由来の前駆脂肪細胞と比べて有意に高値だった。レプチンでも同様の差がみられた。一方、CEPBD は深層皮下脂肪組織由来の前駆脂肪細胞の方が高値だった。

(3) 浅層皮下脂肪組織由来の初代培養前駆脂肪細胞の PPARγ DNA メチル化率は深層皮下脂肪組織由来のそれと比べて低い

7 週間継代培養後、PPARγ 遺伝子の DNA メチル化率は浅層皮下脂肪組織由来の初代培養前駆脂肪細胞の方が深層皮下脂肪組織由来のそれと比べて低値だった。一方、レプチンには差がなかった。

以上の(1), (2), (3)の結果から、以下のことが考えられた。

- ・浅層皮下脂肪組織の脂肪細胞は深層皮下脂肪組織の脂肪細胞と比べて、PPARγ DNA のメチル化率が低いことから PPARγ を発現しやすく、脂肪分化しやすい。

- ・結果として、浅層皮下脂肪組織の脂肪細胞は深層皮下脂肪組織のそれとくらべて大きくなる。

- ・浅層皮下脂肪細胞のレプチンが深層皮下脂肪細胞と比べて高いのはレプチン DNA が発現しやすいからではなく、PPARγ DNA メチル化の差に起因して分化度が高くなった結果である。

#### 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 1 件)

Kosaka K, Kubota Y, Adachi N, Akita S, Sasahara Y, Kira T, Kuroda M, Mitsukawa N, Bujo H, Satoh K, Human adipocytes from the subcutaneous superficial layer have greater adipogenic potential and lower PPAR-γ DNA methylation levels than deep layer adipocytes. Am J Physiol Cell Physiol. 査読有 2016 Aug 1;311(2):C322-9.doi:10.1152/ajpcell.00301.2015. Epub 2016 Jun 1. PubMed PMID: 27251439.

[学会発表](計 1 件)

Kubota Y, Kosaka K, Adachi N, Akita S, Sasahara Y, Kira T, Kuroda M, Mitsukawa N, Bujo H, Satoh K. Human adipocytes from the subcutaneous superficial layer have greater adipogenic potential and lower PPAR-γ DNA methylation levels than deep layer adipocytes. Plastic Surgery the Meeting 2016. LA Convention Center, Los Angel, CA, USA, Sep. 24-Sep. 26, 2016

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

窪田 吉孝 (KUBOTA, YOSHITKA)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：10375735

##### (2)研究分担者

三川 信之(MITSUKAWA, NOBUYUKI)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：40595196

黒田 正幸(KURODA, MASAYUKI)  
千葉大学・医学部附属病院・特任准教授  
研究者番号：00253005