

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16998

研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞を用いた体幹部皮下脂肪と眼窩脂肪の違いに関する基礎研究

研究課題名(英文) Basic research on the difference between subcutaneous fat in the trunk and orbital fat using DFAT

研究代表者

酒井 成貴 (SAKAI, shigeki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：00464941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は眼窩脂肪を含む顔面皮下脂肪と体幹部皮下脂肪の違いに関する基礎研究を行うものである。脂肪細胞に関連してADSCが有名であるが多くのSVFを継代培養してセレクションをかける必要がある。成熟脂肪細胞からの直接培養が可能なDFATではセレクションが必要ない。今回、眼窩の成熟脂肪細胞を正確に反映するDFATの作成に成功した。また体幹部皮下脂肪と眼窩脂肪のマイクロアレイによる解析では有意差はないもののTSHRが眼窩脂肪よりも体幹部皮下脂肪の方に多く発現を認めた。TSHRが高くないことはTSH値が低下しても甲状腺眼症が改善しないことと一致していることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顔面半側萎縮症やSLE・強皮症に伴う顔面の脂肪萎縮のように顔面の皮下脂肪にのみ萎縮の起こる疾患も存在する。また甲状腺眼症の眼球突出は難治性の疾患であり、時に失明に至ることも知られている。眼球突出に対しては外科的な眼窩底の打ち抜き術などが行われているが合併症も散見される。しかし、眼球突出を来たず眼窩脂肪の増生は抑制できていない。皮下脂肪と内臓脂肪の違いの研究はあるが、皮下脂肪と眼窩脂肪の違いについての研究はほとんどない。皮下脂肪の中でも顔面の皮下脂肪と体幹部の皮下脂肪も発生的に別のもと考えられ、眼窩脂肪を含む顔面皮下脂肪と体幹部皮下脂肪の違いに関する基礎研究は今後の創薬治療に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：This is a basic study of the difference between subcutaneous fat in the face, including orbital fat, and subcutaneous fat in the trunk. ADSC is well known for adipocytes, requires subculture and selection from stromal vascular cells. DFAT, on the other hand, can be cultured directly from mature adipocytes and does not need to be selected. This time, we succeeded in creating an ORBITAL DFAT that accurately reflects mature adipocytes in orbit. Although there was no significant difference in microarray analysis of trunk subcutaneous fat and orbital fat, TSHR was more frequently expressed in trunk subcutaneous fat than in orbital fat. No correlation was found between TSH levels and thyroid eye disease, confirming that a decrease in TSH was consistent with no improvement in thyroid eye disease.

研究分野：形成外科

キーワード：脱分化脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

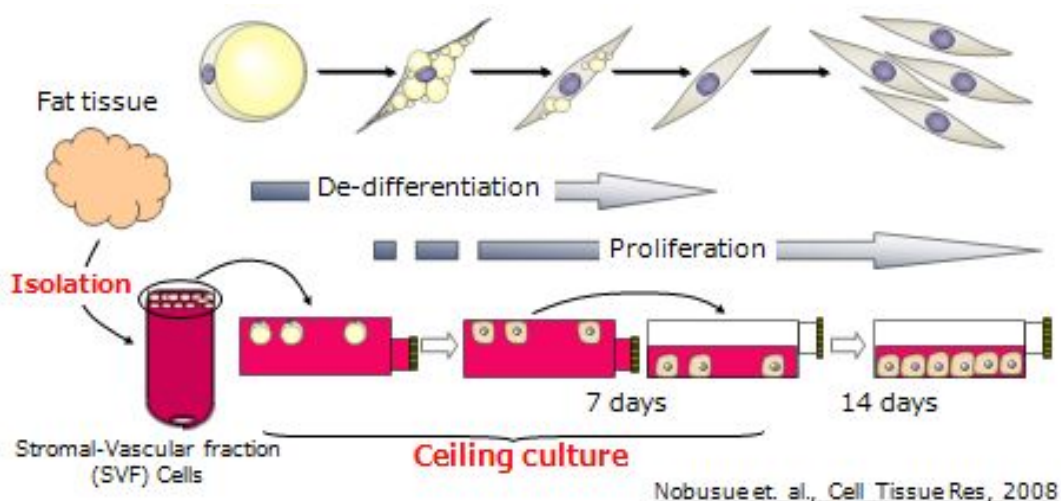
甲状腺眼症などの眼球突出は難治性の疾患であり、患者のQOL (quality of life: 生活の質) に著しく影響し、時に失明に至ることも知られている。現代の医療では眼球突出に対しては外科的な処置として、眼窩の拡大手術や眼窩底の打ち抜き術などが行われているが、術後の複視や眼球運動障害などの合併症も散見される。つまり、未だ確立された治療法はない。

甲状腺眼症の本体は TSAb や IGF-1 による直接的な刺激によるものと、リンパ球 (Th1) やマクロファージによる炎症性変化が重症度に関与することは明らかとされている。これらは外眼筋や眼窩の炎症を引き起こし、外眼筋の機能不全を来し複視の原因となる (Endocrinology, September 2013, 154(9):2989-2991)。甲状腺眼症の治療や創薬研究のために様々な遺伝子導入などを用いて実験マウスが作成され、解析に使用されている。しかし、眼球突出を来たす眼窩脂肪の増生には関しては未解明のままである。これまでに皮下脂肪と内臓脂肪の違いに関して研究されているものは散見される。そこで皮下脂肪と眼窩脂肪の違いに着目をした。皮下脂肪の中でも顔面の皮下脂肪と体幹の皮下脂肪も発生的に別のものと考えられており、顔面半側萎縮症や SLE・強皮症に伴う顔面の脂肪萎縮のように顔面の皮下脂肪にのみ萎縮の起こる疾患も存在する。眼窩脂肪を含む顔面皮下脂肪と体幹部皮下脂肪の違いに関する基礎研究は未だ詳細には行われていない。

2. 研究の目的

本研究は眼窩脂肪を含む顔面皮下脂肪と体幹部皮下脂肪の違いに関する基礎研究を行い将来実用可能な眼窩脂肪増生抑制薬の開発を最終目的とする。申請者は眼窩脂肪増生の治療法開発のため、体幹部皮下脂肪と眼窩脂肪の違いを脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell, 以下 DFAT と記載) を用いて解明する発想に至った。代表的な幹細胞である骨髄由来間葉系幹細胞と脂肪由来間葉系幹細胞を比較すると、成熟脂肪細胞は手術検体から容易に採取可能であり、1g 程度のわずかな検体からの脂肪由来幹細胞は培養が可能である。対して骨髄由来間葉系幹細胞などは骨髄穿刺などの患者への侵襲が大きいが、その点では脂肪細胞の採取は低侵襲であり患者の負担を少なくすることである。眼窩由来の線維芽細胞、つまり脂肪由来間葉系幹細胞の培養はすでに Orbital Fat-derived Stem Cell (OFSC) として研究が行われ、甲状腺眼症にマクロファージの影響が強いことが報告されている (Stem Cell Res Ther. 2014 Aug 13;5:9)。脂肪由来間葉系幹細胞や骨髄由来間葉系幹細胞のような幹細胞は接着培養時に様々な細胞の混在する中で発育され、後に単クローンとして分離するためにはフローサイトメトリーなどでソーティングが必要である。対して DFAT は浮遊している成熟脂肪細胞のみからの採取になるので比較的単一の細胞群として培養可能である。

しかし、DFAT の作成には培養液に用いる血清の選択や天井培養に用いる細胞数などの条件検討が必要であり一部の施設でしか行われていないため、未だかつて眼窩脂肪由来の DFAT は in vitro に使用されておらず、新規性に富んだ世界初の試みとなる。この点で体幹部皮下脂肪と眼窩脂肪の違いを明らかにするには最適な実験材料である。(下図参照: 当研究室と連携する信末助教の論文より抜粋)



DFAT は一般的な接着培養により複数回にわたる継代でも増殖能が落ちることなく多

分化能を維持することが報告されている。iPS 細胞のような全能性はないものの遺伝子導入が不要であり、実際の細胞の維持には多額の費用は必要ない、このため大量に培養が可能であり、資料の枯渇が少なく再現性が保たれる。これまでの研究で骨・軟骨・脂肪・心筋・血管など中胚葉系の限られた分化が確認されており、これらの細胞を焦点とした有効な治療法のない疾患に対しての幹細胞移植治療のドナー細胞としての活躍が期待されている。

前述のように DFAT は成熟脂肪細胞から脱分化させたものであり、その部位による成熟脂肪細胞の性質を明確に反映すると考えられ、生体内では評価できない細胞分化過程レベルでのメカニズムの解明が予想される。甲状腺眼症に伴う眼球突出の機序解明に大いに貢献できるため本研究に DFAT が最適と考える。我々は眼窩脂肪から採取した成熟脂肪細胞を脱分化させ多分化能を有する脱分化脂肪細胞を作成し、眼窩脂肪増生の発生機序の解析と治療法の開発をすることを目的とした。

3. 研究の方法

眼窩脂肪を含めた顔面皮下脂肪と体幹部皮下脂肪の違いを細胞分子レベルで比較検討するため、下記に示すように段階的に実験を行った。

(1) 体幹部皮下脂肪および眼窩脂肪の回収と単離

体幹部皮下脂肪と眼窩脂肪を回収するために倫理委員会承認のもとで採取を行った。採取した細胞の一部は ISOGEN を用いて RNA を回収し、残りの細胞はホモジネート後にコラゲナーゼ Type を用いて 37 の温浴槽で 40-60 分間よく攪拌し、セルストレーナーを用いて線維組織を除去した。次に遠心分離を行い浮遊する成熟脂肪細胞を回収し、沈殿している SVF を回収し、それぞれはメディウム 10ml にて洗浄したのちに再度遠心分離を行い精製したのちに回収した。回収した SVF は一般的な培養皿を用いて継代を行い、成熟脂肪細胞はフラスコを用いて天井培養を行い、約 1 週間かけて ADSC と DFAT を回収した。

(2) ADSC の培養と分化誘導

同時に、先行実験として ADSC を用いて確認実験としての細胞培養と分化誘導を行った。培養には DMEM (10%FBS、1%PS) を用いて組織培養を行った。1x10⁵/Well として細胞を均一に播種し、24 時間で接着を確認し、翌日に脂肪分化誘導培地を添加。3 日目に脂肪分化維持培地に変更とした。試薬 A および B と A+B とコントロールの 4 群を作成し 4 週間かけて培養を行った。一部から RNA 抽出し、残りを ORO 染色とした。抽出した RNA は cDNA に合成し、C/EBP-、SREBP-1、C/EBP-、PPAR (TaqMan) を用いて Real-time PCR で解析を行った。

(3) 体幹部皮下脂肪と眼窩脂肪の比較検討

さらに本研究の根幹となる体幹部皮下脂肪と眼窩脂肪の比較検討を行った。採取した脂肪細胞を ISOGEN に添加し、RNA の抽出を行った。網羅的解析として Clariom D GeneChip を用いてマイクロアレイ解析を行った。

(4) 眼窩脂肪由来の ADSC および DFAT の比較

眼窩から採取された脂肪組織の一部を ISOGEN によって RNA 抽出を行い、残りの脂肪組織をコラゲナーゼ処理し、SVF と成熟脂肪細胞に分離した。それぞれを培養し、最終的に 3 継代を行い、ADSC と DFAT を回収した。回収したそれぞれの細胞を ISOGEN によって RNA 抽出を行った。

脂肪組織、ADSC、DFAT のそれぞれから抽出した RNA を cDNA に合成し、C/EBP-、SREBP-1、C/EBP-、PPAR (TaqMan) を用いて Real-time PCR で解析を行った。

4. 研究成果

< 体幹部皮下脂肪および眼窩脂肪の回収と単離 >



(Fig1) 眼窩脂肪からの DFAT の作成

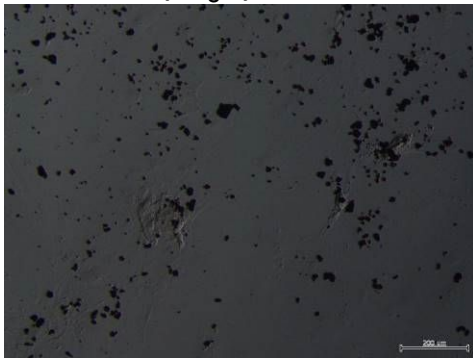
術中に余剰と判断された脂肪組織を生理食塩水で含浸させたガーゼで包み、手術終了時に回収した。回収した脂肪組織を手動的に細断の後にコラゲナーゼ処理を行い、遠心分離を行うことによって、SVF と成熟脂肪細胞に分離することは容易であった。ADSC には DMEM に 10%FBS と 1%PS を添加したメディウムを使用し、DFAT には DMEM に 20%FBS と 1%PS を添加したメディウムを使用する既存の方法により体幹部皮下脂肪および眼窩脂肪から DFAT および ADSC の樹立を行うことは可能であることが証明された (Fig1)。

しかしながら、たまたま同一個体からの眼窩脂肪と体幹部皮下脂肪を同時に採取が可能であった 3 症例で比較検討をしたところ 3 症

例中 2 例で眼窩脂肪の DFAT を樹立することができたが、体幹部皮下脂肪からは DFAT の樹立ができなかった。考察として、同時採取可能であった症例で使用した体幹部皮下脂肪は電気メスにより採取されており、熱損傷による影響があったのではないかと思われる。ただし、仮説として体幹部皮下脂肪よりも眼窩脂肪の方が DFAT を樹立しやすい可能性も考えられた。補足であるが、眼窩脂肪の DFAT が樹立できなかった 1 例は単に RNA 採取に使用したときに、残量が少なくなりほとんど成熟脂肪細胞が回収できなかったためである。樹立ができない事例として、脂肪細胞の不足、コンタミネーション、天井培養用のフラスコのフィルター詰まり、キャップの破損などを経験した。

< ADSC の培養と分化誘導 >

すでに入手が可能であった体幹部皮下脂肪の ADSC を用いて分化誘導および脂肪分化マーカーの評価を行った。分化誘導は 1×10^5 /Well として細胞を均一に播種し、24 時間で接着を確認し、翌日に脂肪分化誘導培地を添加し、3 日目に脂肪分化維持培地に変更と 4 週間培養を行った。また、既存の論文より、いくつかの脂肪分化抑制薬の候補を挙げ、有効性の期待される試薬 A および B を決定した。この試薬 A を添加した群および試薬 B を添加した群と試薬 A+B を添加した群と Vehicles を添加したコントロール群の 4 群を作成し 4 週間かけて培養を行った。結果、ORO 染色では明らかな分化の差は認めなかった (Fig2)。

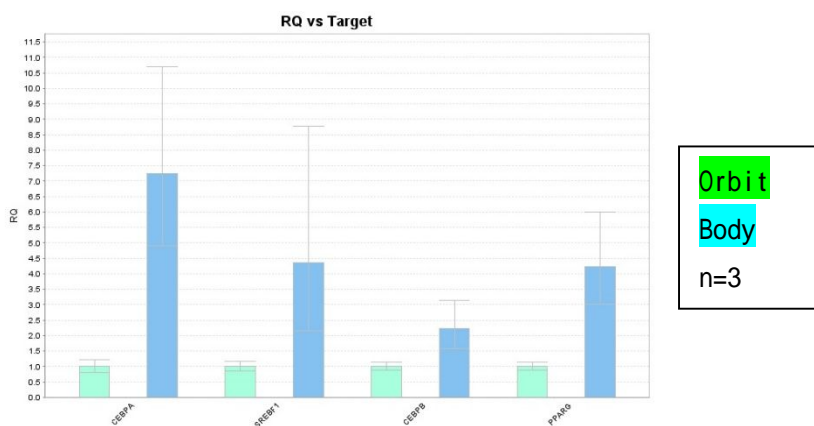


(Fig2) 培養 4 週間後の ORO 染色

Real-time-PCR を施行したところ、A+B 群において C/EBP- のみが優位に上昇し、脂肪分化抑制とは逆の結果となった (Data not shown)。既存の文献では C/EBP- が低下するデータが出ていたが細胞種が 3T3-L1 であること、培養期間が 1 週間であることによる違いも考えられた。候補試薬の濃度や培養期間の再検討が必要となった。

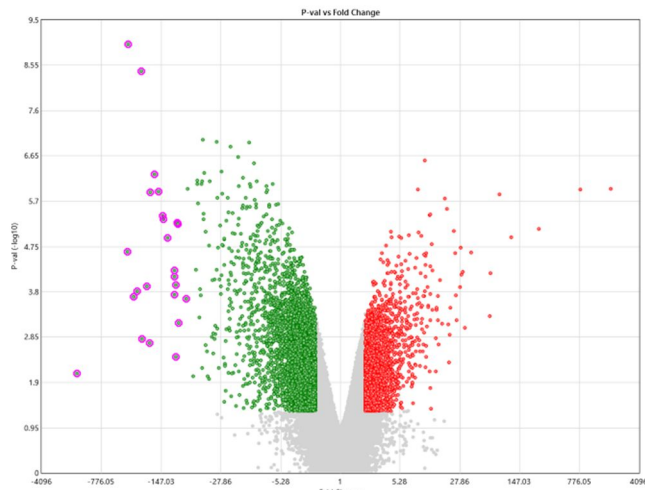
< 体幹部皮下脂肪と眼窩脂肪の比較検討 >

同一個体から眼窩脂肪と体幹部皮下脂肪が採取可能であった 3 症例において、眼窩脂肪と体幹部皮下脂肪の違いを確認するため ISOGEN を用いて RNA の抽出を行った。cDNA を合成の後に脂肪分化マーカーである C/EBP-、SREBP-1、C/EBP-、PPAR を用いて Real-Time-PCR を行い比較した。結果、眼窩脂肪と体幹部皮下脂肪とでは体幹部皮下脂肪の方が脂肪分化マーカーである C/EBP-、SREBP-1、C/EBP-、PPAR すべてにおいて有意な上昇を認めていた (Fig3)。



(Fig3) 眼窩脂肪および体幹部皮下脂肪の脂肪分化マーカーの比較

この結果は体幹部脂肪の方が明らかに成熟脂肪としての性質を示しており、眼窩脂肪は脂肪分化が低い可能性を示唆していた。脂肪分化マーカー以外にも違いが予想されたためマイクロアレイを用いて網羅的解析を行った。眼窩脂肪において複数の有意な発現遺伝子を同定することができた。これらの結果では炎症に起因する遺伝子発現を示すものが多く、今後の治療の重要な制御因子であることを示唆していた (Fig4)。

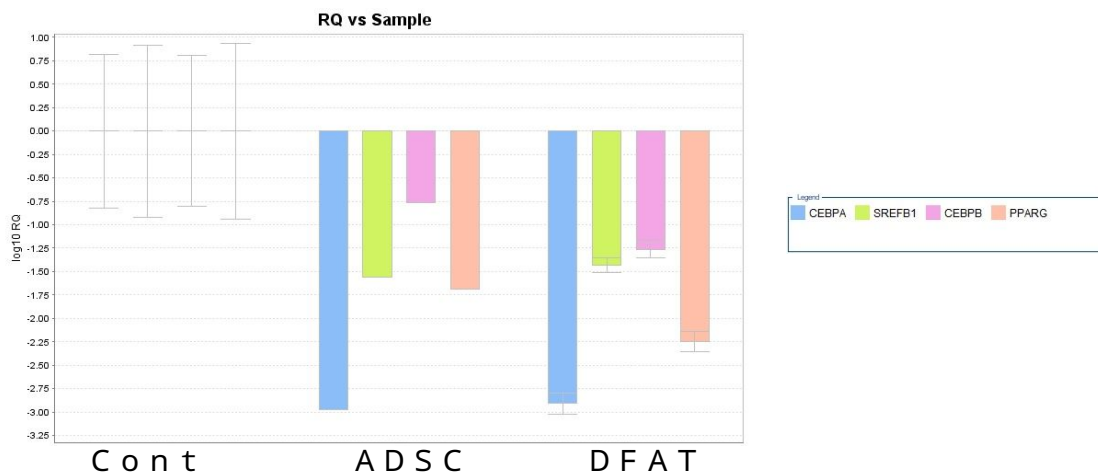


(Fig4) マイクロアレイ (n = 3) 眼窩脂肪に有意に発現している遺伝子が緑色で示される。

さらに興味深いことに、有意差はないものの TSHR が眼窩脂肪よりも体幹部皮下脂肪の方に多く発現しているという結果を得ることができた。これまでの臨床において TSH 値と甲状腺眼症との相関性は認めておらず、TSH が低下しても甲状腺眼症の改善を認めないことと一致していた。

< 眼窩脂肪由来の ADSC および DFAT の比較 >

将来的に創薬研究を行う上で DFAT が優れているのか確認するために ADSC と DFAT の違いについて検証を試みた。眼窩脂肪 3 例をコントロールとし、既存の ADSC およびコントロールと同一個体の DFAT 2 例を用い Real-time PCR を行った。眼窩脂肪細胞と比較して DFAT は脂肪分化マーカーである C/EBP-、SREBP-1、C/EBP-、PPAR すべての低下を認めた (Fig5)。DFAT は脱分化が成立していることを示しているが、同時に ADSC とも同様の性質を示していた。今回使用したマーカーは脂肪分化に限定的であり、甲状腺ホルモンとは関係のないものであった。今後はこれらの関連因子についての研究が望まれ、その第一歩として基礎データを得ることができたと考ええる。



(Fig5) ADSC および DFAT の脂肪分化マーカー C/EBP-、SREBP-1、C/EBP-、PPAR の低下

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------