

## 論文の内容の要旨

氏名：河野 正太

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：ネコの脱分化脂肪細胞および脂肪由来幹細胞の調製と特性評価

再生医療は、幹細胞や前駆細胞を移植することで損傷した臓器を修復し、失われた機能を回復する医療である。獣医療においても新規の治療アプローチとして期待されている。間葉系幹細胞（MSC）は自己複製能および多分化能を有する細胞であり、比較的安全性が高く、広く臨床試験が行われている。MSCは骨髄だけでなく、他の多くの成体組織から分離できることが報告されてきた。その中でも脂肪組織は、近年大きく注目されている細胞源である。脂肪組織は、採取に伴う侵襲が低く、含まれるMSC量が多いことから、利便性が高い。しかしながら、ネコのような小動物においては、採取可能な脂肪組織の量が限られており、より少量の組織からMSCを調製することが望ましい。終末分化細胞である成熟脂肪細胞は、通常増殖能を示さないが、天井培養という特殊な方法で培養することにより脱分化し、増殖能をもった線維芽細胞様の細胞を得ることができる。我々の研究グループは、ヒトやブタにおいて、この脱分化脂肪細胞（dedifferentiated fat cell: DFAT）が自己複製能や間葉系細胞系列への分化能を有し、MSCと非常に類似した形質を獲得することを明らかにした。また、DFATは、高齢者や小児からも調製が可能であり、他細胞の混入が極めて少ない。DFATは少量の脂肪組織から調製できるため、ネコにおいても有望なMSC採取源になると考えられる。本研究では、ネコの脂肪組織からDFATを調製し、MSCとしての特性を脂肪由来幹細胞（ASC）と比較した。

### 1. ネコ脂肪組織からのDFATとASCの調製

一般動物病院において、予防的不妊を目的に卵巣摘出術を実施する健康なネコ24頭から腹腔内の脂肪組織の一部を採取した。脂肪組織（ $0.5 \pm 0.1$  g）をコラゲナーゼによる酵素処理および低速遠心することで、成熟脂肪細胞層とそれ以外の細胞群である間質血管画分に分離させた。成熟脂肪細胞を培養液で満たしたフラスコに播種し、7日間の天井培養を行い、細胞の形態変化を観察した。培養1日目では、未だ球形の脂肪細胞であったが、培養3日目には脂肪細胞がフラスコ天井面において接着性を示し、7日目には脂肪細胞から分裂した紡錘形の細胞（DFAT）からなるコロニーを形成した。DFATは7日でサブコンフルエントに達し、得られる細胞数は $9.9 \pm 5.5 \times 10^6$ であった。ASCは、間質血管画分を接着培養することで調製し、4日でサブコンフルエントになり、 $2.8 \pm 1.1 \times 10^6$ の細胞数が得られた。また、細胞表面抗原をフローサイトメトリーにより解析した結果、DFATおよびASCはP1において、血球系マーカーCD14（ $1.2 \pm 0.2$  および  $3.5 \pm 3.2\%$ ）、CD34（ $0.8 \pm 0.3$  および  $1.0 \pm 0.2\%$ ）、CD45（ $0.7 \pm 0.4$  および  $0.8 \pm 0.3\%$ ）陰性、間葉系幹細胞マーカーCD44（ $91.1 \pm 8.0$  および  $82.4 \pm 17.5\%$ ）、CD90（ $90.4 \pm 7.2$  および  $95.9 \pm 2.5\%$ ）、CD105（ $95.6 \pm 2.7$  および  $93.1 \pm 5.0\%$ ）陽性を示し、いずれのマーカーにおいても発現に差はなかった。細胞膜透過処理をし、 $\alpha$ -平滑筋アクチン（ $\alpha$ -SMA）発現を解析するとASCにはP1において $15.2 \pm 7.2\%$ の $\alpha$ -SMA陽性細胞が検出され、継代後（P2）においても $6.3 \pm 1.6\%$ 認められた。これに対しDFATはP1で $2.2 \pm 1.5\%$ 、

および P2 で  $1.5 \pm 0.6\%$  であり、ASC に比較してそれぞれ有意に低かった ( $P < 0.05$ )。

少量のネコ腹腔内脂肪組織から DFAT および ASC の調製に成功した。また、P1 および P2 の ASC には平滑筋細胞の混入がある程度認められる一方、DFAT は平滑筋細胞の混入が少ないことが明らかになった。

## 2. ネコ DFAT と ASC の増殖能の比較

前章で得られた DFAT の Colony forming unit-fibroblast (CFU-F) コロニー形成能および増殖能を ASC と比較した。CFU-F アッセイでは、DFAT ( $35.7 \pm 4.4\%$ ) は ASC ( $15.2 \pm 7.2\%$ ) より有意に高いコロニー形成能を示した ( $P < 0.05$ )。P1 における DFAT および ASC の細胞増殖曲線を作成し、細胞倍加時間を算出した。細胞倍加時間は、DFAT は  $48 \pm 9$  時間、ASC は  $50 \pm 13$  時間であり、両者に差異はなかった。両細胞ともに P1 においてコンフルエントに近づくにつれ、細胞凝集塊を形成した。培養条件を検討した結果、ラミニンコート培養皿が凝集を抑制することが明らかになった。

以上の結果から、DFAT は ASC と同様に高い増殖能を有しており、DFAT は ASC に比べ自己複製能を有する細胞の割合が多いことが明らかになった。また、DFAT および ASC の継代培養時には、ラミニンコート培養皿を使用することで細胞の凝集・剥離を抑制し、長期間の継代培養が可能になることが明らかとなった。

## 3. ネコ DFAT と ASC の多分化能の評価

前章で DFAT および ASC が自己複製能を有していることを明らかにした。本章では DFAT および ASC の *in vitro* での脂肪、軟骨、骨、および平滑筋細胞への分化能を評価した。両細胞とも脂肪への分化誘導培地で培養した結果、細胞質内に脂肪滴を検出し、脂肪分化能を有していることを確認した。軟骨分化能の評価には軟骨分化誘導培地にてペレット培養を行い、ペレットの一部が 2 型コラーゲン陽性およびトリインブルー染色によりメタクロマジーを示し、軟骨分化能を確認した。骨分化誘導実験では、ラミニンコート培養皿を用いたが、分化誘導した群では細胞凝集し、培養皿から剥離した。細胞足場とし  $\beta$ -TCP/collagen スポンジに細胞を播種し、骨分化誘導培地で培養することにより、スポンジ表面が強く染色され、内部には  $\beta$ -TCP 周囲にカルシウム沈着を示す細胞が認められ、両細胞の骨分化能を確認した。両細胞を平滑筋細胞分化誘導培地で培養することにより、DFAT、ASC ともに  $\alpha$ -SMA 陽性を示すようになり、平滑筋細胞への分化能を確認した。

以上の結果から、ネコ DFAT および ASC は、骨、軟骨、脂肪、平滑筋細胞への多分化能を有しており、MSC 様の特性を有することが明らかになった。

## 総括

健康なネコの腹腔内から採取した脂肪組織から DFAT および ASC の調製に成功した。ネコにおける MSC や ASC に関する報告は非常に少なく、DFAT に関しては本研究が初めての報告となる。DFAT、ASC ともに増殖活性と多分化能を示し MSC 様の形質を有するが、DFAT は、ASC に比べて、P1 または P2 の段階でより均質であり、コロニー形成能が高いことが明らかになった。また、ネコ ASC および DFAT の継代培養にはラミニンコートした培養皿が必要であることが明らかになった。本研究結果より DFAT は、

より少量の脂肪組織から均質かつ自己複製能の高い細胞を調製することができる可能性が示唆された。したがって、DFATは、体格の小さいネコにおいても、適した治療用細胞になる可能性がある。本研究により得られた知見に基づき、今後ネコ DFAT から傍分泌される栄養因子や免疫制御能、様々な投与経路による体内動態等を検討し、さらに種々の疾患モデル動物への移植実験を行うことにより、従来の治療方法では治癒困難な傷病または障害に苦しむネコに対する新規の細胞治療につながることを期待できる。