

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

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻
博士課程

河野 正太

2013

目次

	項
序文	1
第1章 ネコ脂肪組織からの脱分化脂肪細胞および脂肪由来 幹細胞の調製	
1. 緒言	5
2. 材料と方法	7
3. 結果	11
4. 考察	18
5. 小括	21
第2章 脱分化脂肪細胞および脂肪由来幹細胞の増殖能の評価	
1. 緒言	22
2. 材料と方法	23
3. 結果	25
4. 考察	30
5. 小括	32
第3章 脱分化脂肪細胞および脂肪由来幹細胞の多分化能の評価	
1. 緒言	33
2. 材料と方法	34

3. 結果	38
4. 考察	44
5. 小括	47
総括	48
謝辞	52
引用文献	53

序文

近年、再生医療に大きな期待が寄せられている。再生医療とは、幹細胞や前駆細胞を採取・培養・加工し、患者体内に移植することにより、損傷した臓器および組織の再生修復を促し、機能を回復する医療である。再生医療は、従来の薬物治療や外科治療では治癒困難な傷病または障害を抱える患者に治療の道を開く可能性がある。ヒトと同様、診断技術や治療法の改良によりイヌやネコなどの伴侶動物もまた高齢化している。再生医療が、高齢動物の疾病の進行予防や治療に貢献することが期待できる (Heuberger and Wakshlag, 2011; Webster et al., 2012)。

再生医療の中心的なアプローチは、幹細胞を用いた細胞移植治療である。幹細胞は、未分化な細胞であり、自己複製能を有すること、および複数の細胞系列に分化する能力をもつことが特徴である。幹細胞は、胚性幹細胞と体性幹細胞に大別される。胚性幹 (Embryonic stem: ES) 細胞は、三胚葉への分化能および無限増殖能を有する細胞であるが、倫理的問題や細胞移植による腫瘍形成のリスクなど臨床応用に向けて克服すべき課題がある。体性幹細胞のうち、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells: MSC) はFriedensteinらによって骨髄から初めて分離され (Friedenstein and Kuralesova, 1971)、現在まで最もよく研究されている体性幹細胞である。国際細胞治療学会はヒト MSC に関する議論の叩き台として MSC の最小基準を定義した： (1) 標準的な培養条件下においてプラスチックディッシュに接着すること、(2) CD73、CD90、および CD105 に陽性であり、CD34、CD45、CD14 また

は CD11b、CD79 α または CD19、および HLA-DR に陰性であること、(3) *in vitro* において骨芽細胞、脂肪細胞、および軟骨細胞に分化する多分化能を有することである (Dominici et al., 2006)。現在では、骨髄だけでなく、脂肪、臍帯血、歯髄、滑膜等の組織にも上記の条件を満たす MSC が存在していることが明らかになっている (Orbay et al., 2012; Wang et al., 2013)。MSC は、ES 細胞に比較して腫瘍形成のリスクが極めて低く、すでに様々な疾患を対象とした臨床試験が行われている。

近年、脂肪組織は MSC の採取源として注目されている。脂肪組織は、骨髄と比較すると比較的低侵襲に短時間で容易に採取でき、組織中の幹細胞数が多い。そのため脂肪組織中の MSC は臨床応用する上で多くの利点がある。しかしながら、MSC は最終細胞製品の中に他細胞が混入する可能性が高いことが臨床応用する上で大きな障壁である。安全性の高い再生医療を実現するために、理想的な移植細胞の条件として、より均質であることが求められている。

Kano, Matsumoto らのグループは成熟脂肪細胞を天井培養することで得られる線維芽細胞様の細胞が高い増殖活性と MSC に類似した多分化能を有することを明らかにし、これを脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cells: DFAT) と名付けた (Yagi et al., 2004; Matsumoto et al., 2008)。さらに、DFAT は脂肪組織から成熟脂肪細胞を選別後に調製されるため、他細胞が混入する可能性が低く、またドナーの年齢を問わず調整が可能であることが明らかにされている。こ

のような性質をもつ DFAT は再生医療に用いる新たな細胞として期待できる。

ネコの再生医療に関する研究は非常に少ない。現在までに、ネコの骨髄、脂肪組織および胎児付属組織から MSC が分離培養できることが示されている (Martin et al., 2002; Mitchell et al., 2006; Quimby et al., 2011; Iacono et al., 2012)。DFAT は、少量の脂肪組織から調製が可能であるため、体格の小さいネコの再生医療においても有望な細胞源になると期待できる。本研究の目的は、ネコの成熟脂肪細胞から DFAT を調製し、特性を評価することである。

第 1 章

ネコ脂肪組織からの脱分化脂肪細胞および脂肪由来幹細胞の調製

1. 緒言

脂肪組織は成熟脂肪細胞のほかに、間質血管画分 (Stromal vascular fraction: SVF) と呼ばれる種々の細胞群や毛細血管から構成されている。SVF は、脂肪間質細胞、マクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、血管周皮細胞、単球など様々な細胞が含まれている。近年、この SVF 中の 1~3% の細胞が多系列の細胞への分化能を有する MSC であることが複数の研究グループから報告されてきた (Astori et al., 2007; Fraser et al., 2008; Mizuno et al., 2012)。これは脂肪組織には骨髄の約 500 倍もの幹細胞が含まれていることを意味しており、脂肪組織は再生医療の新たな細胞供給源として注目されている。脂肪組織中の間葉系幹細胞は、processed lipoaspirate cells (PLA)、脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cell: ADSC)、脂肪組織由来間質細胞 (adipose-derived stromal cells: ASC) など様々な名称が使用されていたが、International Fat Applied Technology Society (IFATS) において、脂肪由来幹細胞 adipose-derived stem cell (ASC) という呼称で統一するようコンセンサスが得られている。ASC は、脂肪組織を酵素処理

し、遠心分離することで得られる SVF を体外培養し、プラスチックに接着する細胞集団として容易に分離できる。しかしながら、SVF は不均質な細胞集団であり、ASC に特異的な分子マーカーも未だ同定されていない (Bunnell et al., 2008; Reinders and Rabelink, 2010)。細胞治療の効果や安全性に関する確実な臨床エビデンスを担保するためには、均質な細胞製品が望ましい。

成熟脂肪細胞は終末分化した細胞であり、一般的に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、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。Kano, Matsumoto らのグループは、この細胞を脱分化脂肪細胞 (DFAT) と名付けた (Matsumoto et al., 2008)。DFAT は少量の脂肪組織から調製することができるため、ドナーに対する侵襲が低い。また、Matsumoto らは DFAT には他細胞の混入が少なく、均質性が高いことを報告している。したがって、DFAT は体格の小さいネコにおいても最適な再生医療用細胞源であると考えられる。現在までに、ヒト、マウス、ブタ、ウシおよびウサギから DFAT が樹立され、MSC と同等の多分化能を有すること、そして心筋梗塞、腎機能障害、脊髄損傷など様々な疾患モデルにおける治療効果をもつことを明らかにしてきた (Nur et al., 2008; Ohta et al., 2008; Jumabay et al., 2009)。

本章の目的は、ネコの成熟脂肪細胞から DFAT を調整し、ASC と比較することで DFAT の形質を明らかにすることである。

2. 材料と方法

1) 供試動物

本研究は、一般動物病院において予防的不妊を目的に卵巣子宮摘出術または卵巣摘出術を受けるネコ (1~3 歳齢) の飼い主に同意を得て行った。一般身体検査および病歴を聴取し、臨床上明らかな異常のないネコを対象にした。キシラジン 2.0 mg/kg i.v. (AnaSed[®], Lloyd Inc., IA) で導入し、ケタミン 10 mg/kg (ケタラール[®], Daiichisankyo, Tokyo, Japan) で麻酔状態を維持した。抗生物質としてアモキシシリン 15 mg/kg (アモスタック LA 注[®], Meiji Seika, Tokyo, Japan) を投与した。

開腹中に腹腔内脂肪組織の一部を採取し、およそ 37°C に加温した滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS) に保存した。採取から 6 時間以内の脂肪組織から成熟脂肪細胞および SVF を分離した。

2) DFAT の調製

DFAT の調製は、Matsumoto らの方法に従って行った (Matsumoto et al., 2008)。脂肪組織の重量を計測し、付着している結合組織および血管を除去した後、0.1% (w/v) コラゲナーゼタイプ II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 添加 DMEM の中で組織を細切し、37°C で 30 分間消化した。250 μ m 口径のフィルターで濾過し、135 g で 1 分間低速遠心分離した。

浮遊する細胞を採集し、2%牛胎児血清 (Fetal bovine serum: FBS) 添加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) で3回洗浄した。浮遊する細胞の一部を4%パラホルムアルデヒドで15分間固定し、PBSで洗浄後、AdipoRed (Cambrex, Walkersville, MD) および Hoechst33342 (Sigma-Aldrich) で10分間処理し、それぞれ脂肪滴および核を蛍光染色した。成熟脂肪細胞を20%FBS添加DMEMで満たした12.5 cm²培養フラスコに播種した。成熟脂肪細胞がフラスコの培養面に接触するようにフラスコを反転させ、天井培養を行った。天井培養中に細胞の形態を経時的に観察した。天井培養7日後に培地を10%FBS添加DMEMに交換し、細胞培養面が底面となるようにフラスコを再び反転させた。細胞は0.05%トリプシンおよび0.48 mM EDTAを用いて継代し、継代 (P) 3までの細胞を実験に用いた。

3) ASCの調製

ASCの調製は、Webbらの方法に従って行った (Webb et al., 2012)。脂肪組織をコラゲナーゼにより酵素処理し、成熟脂肪細胞を採集した後の細胞浮遊液を380 gで5分間遠心処理することにより、SVFを分離した。SVF (2~5 x 10⁶ 個) は12.5 cm²培養フラスコに播種し、20%FBS添加DMEMを用いて培養した。また、SVFの細胞300個をColony forming unit-fibroblast (CFU-F) 培養液 (NH CFU-F Media, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) に播種し、14日間の培養後にクリスタルバイオレット染色を行い、コロニー数を計測した。培

養 4 日後に 0.05%トリプシンおよび 0.48 mM EDTA を用いて継代し、P3 までの細胞を実験に用いた。

4) フローサイトメトリーによる細胞表面抗原解析

P1 において 60~80%コンフルエントになった DFAT および ASC の細胞表面抗原をフローサイトメトリーにより解析した。細胞数を 1×10^6 個に調整し、0.2%牛血清アルブミン (BSA) および 1 mM EDTA 添加 PBS にて細胞浮遊液を作製した。ウサギ血清アルブミンでブロッキングを施した後、細胞浮遊液に以下の一次抗体を 4°C で 30 分間反応させた。すなわち、抗ネコ CD14 抗体 (1:200, clone:CAM36A, VMRD, Pullman, WA)、抗ヒト CD34 抗体 (1:10, clone:581, Beckman Coulter, Fullerton, CA)、抗ネコ CD44 抗体 (1:200, clone:BAG40A, VMRD)、抗ネコ CD45 抗体 (1:200, clone:25-2C, VMRD)、抗ヒト α 平滑筋アクチン (α -SMA) 抗体 (1:200, clone:1A4, Dako, Glostrup, Denmark)、Phycoerythrin (PE) 標識抗ヒト CD90 抗体 (1:200, clone:5E10, BD Bioscience, San Jose, CA)、および PE 標識抗ヒト CD105 抗体 (1:20, clone:SN6, eBioscience, San Diego, CA) を用いた。また、 α -SMA については P2 の DFAT および ASC の細胞集団についても同様に解析した。無標識の一次抗体は、二次抗体として PE 標識ヤギ抗マウス Ig 抗体 (1:500, BD Bioscience) を用いて標識した。ヒト DFAT およびネコの末梢単核球を用いて、上記の抗体の交差性を確認した。7-Amino-ActinomycinD により死細胞を染色した後、1 サンプルにつき

1 x 10⁴ 個以上の生細胞について、CellQuest ソフトウェアパッケージ および BD FACS Calibur フローサイトメーター (Becton Dickinson, Bedford, MA) を用いて解析した。それぞれのアイソタイプコントロールのシグナルと比較し、陽性細胞の割合を計測した。

5) 統計

データは平均 ± 標準偏差で示した。解析ソフト SPSS 16.0 ソフトウェアパッケージ (SPSS Inc. Chicago, IL) を用いて統計学的解析を行った。データの比較は、Mann-Whitney U 検定を用いた。P < 0.05 を統計学的有意水準とした。

3. 結果

検討を行ったネコは 24 頭であった。全頭から重量約 0.5~1.0 g の脂肪組織を採取した。この脂肪組織から $1\sim 2 \times 10^6$ の成熟脂肪細胞、および $2\sim 5 \times 10^6$ の SVF を分離できた。DFAT および ASC は脂肪組織を採取したすべてのネコにおいて調整することが可能であった。

1) DFAT の調整

脂肪組織をコラゲナーゼ処理および遠心分離した後、浮遊する上層の細胞は、単核で単胞性の成熟脂肪細胞であった (図 1-1-A)。天井培養 3 日目には、一部の成熟脂肪細胞が細胞質を伸長させ、フラスコ天井の培養面に接着性を示した。接着した細胞は、非対称性に分裂し、線維芽細胞様の DFAT を産出した (図 1-1-B)。この DFAT は、対称性に分裂を繰り返し、5 日目にはコロニーを形成した (図 1-1-C)。7 日後にはサブコンフルエントに到達し、約 $5\sim 15 \times 10^5$ cells/cm² の細胞を得ることができた (図 1-1-D, 表 1)。

2) ASC の調整

コラゲナーゼ処理し DFAT を調製した同一の脂肪組織から SVF を分離し、接着培養することによって ASC を調製した (図 1-2-A, B)。脂肪組織から分離した SVF の細胞 300 個を CFU-F 培養液にて 14 日間培養

すると、 $2.2 \pm 0.4\%$ の細胞がコロニーを形成した。ASCを調製するSVFの至適播種濃度は 1.6×10^5 cells/cm²であった。この培養条件下では、増殖したASCは約4日後にサブコンフルエントとなり、約 $1.5 \sim 3.0 \times 10^5$ cells/cm²の細胞を得ることができた(図1-2-C, 表1)。

3) DFAT および ASC の細胞集団の解析

フローサイトメトリー解析により、同一個体に由来するP1のDFATおよびASCは、CD44 (91.1 ± 8.0 および $82.4 \pm 17.5\%$)、CD90 (90.4 ± 7.2 および $95.9 \pm 2.5\%$)、およびCD105 (95.6 ± 2.7 および $93.1 \pm 5.0\%$)に陽性であり、単球マーカーCD14、造血幹細胞マーカーCD34、および汎リンパ球マーカーCD45に陰性であった(図1-3)。また、ASCの細胞集団における α -SMA陽性細胞の割合は、P1において $15.2 \pm 7.2\%$ 、およびP2において $6.3 \pm 7.2\%$ であり、それぞれDFATの細胞集団のP1における $2.2 \pm 3.2\%$ 、およびP2における $1.5 \pm 0.6\%$ に比較して有意に高値であった(図1-4, $P < 0.05$)。

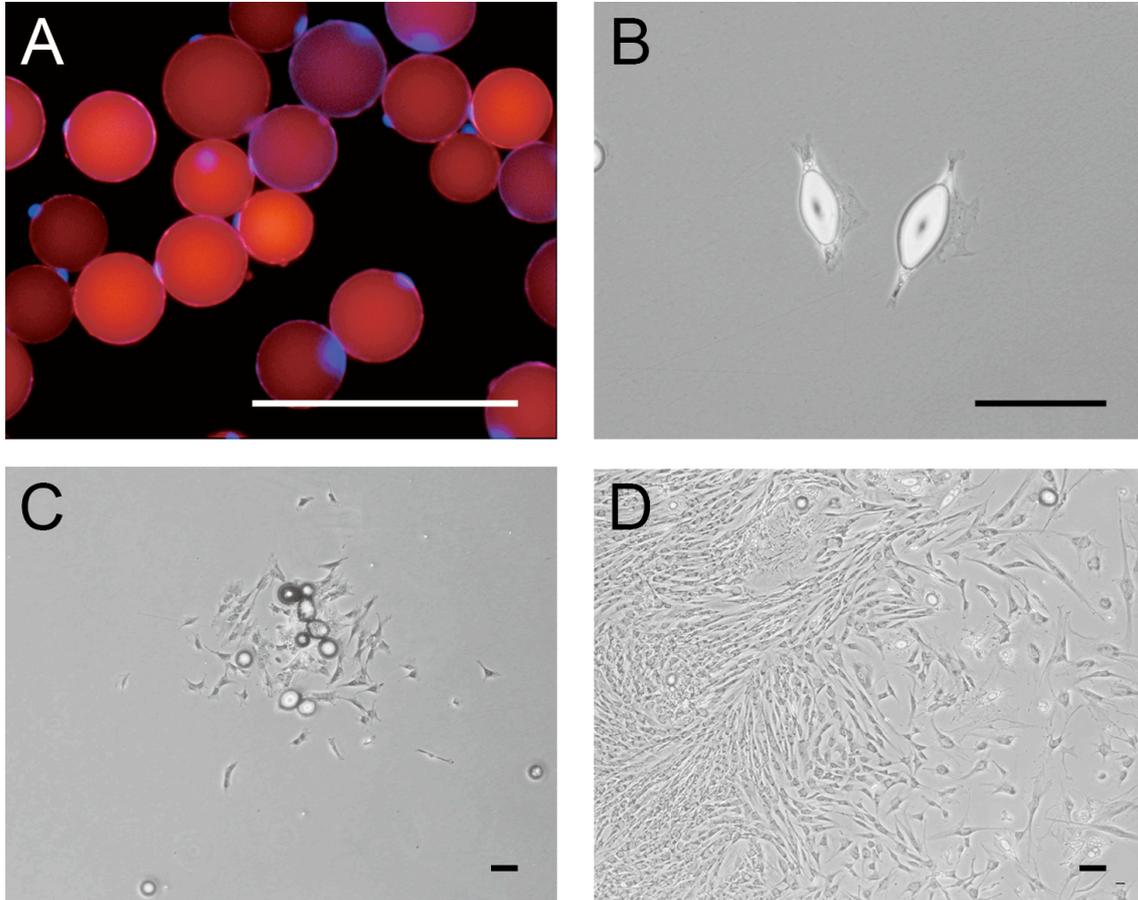


図 1-1. ネコ脂肪組織から単離・培養した成熟脂肪細胞の形態変化。単離した細胞の蛍光顕微鏡像 (AdipoRed および Hoechst33342, A)、ならびに天井培養 3 日目(B)、5 日目(C)、および 7 日目(D)の細胞の位相差顕微鏡像。Scale Bar: 100 μm 。

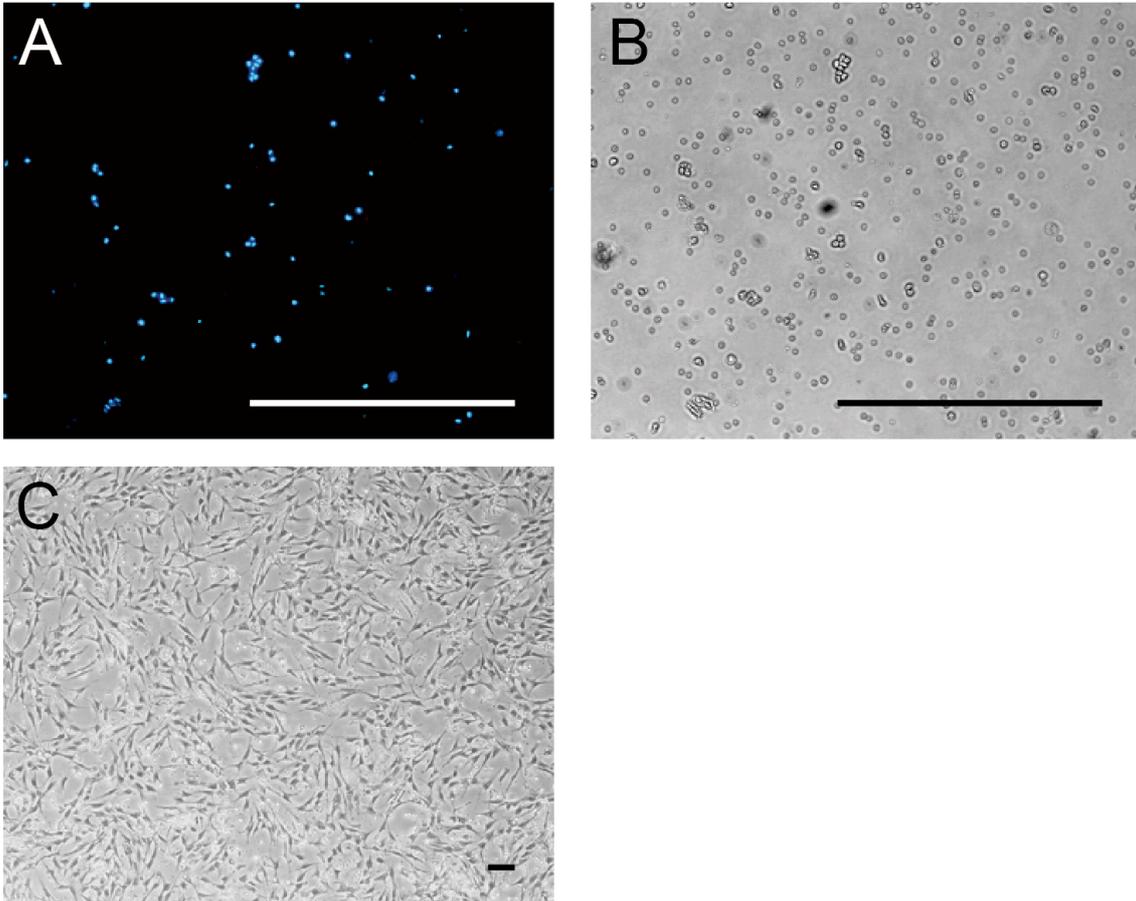
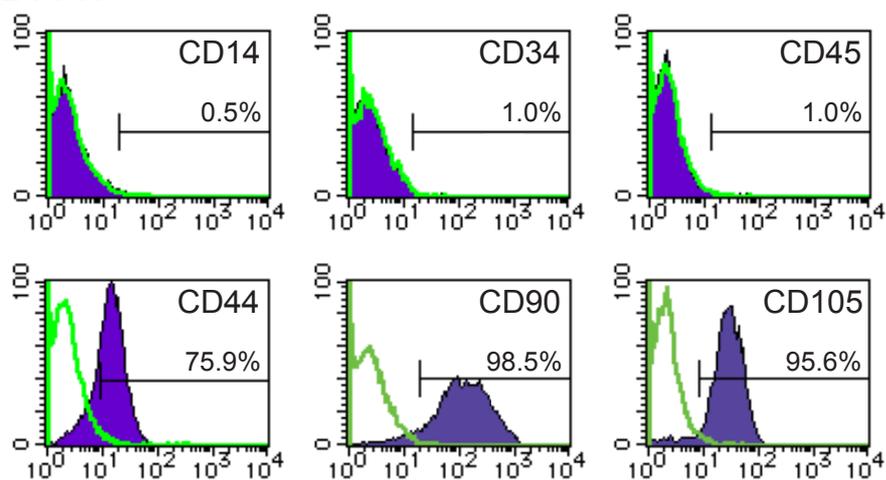


図 1-2. ネコ脂肪組織から単離・培養した間質血管画分 (SVF) の形態変化。単離・培養直後の細胞の蛍光顕微鏡像 (AdipoRed および Hoechst33342, A) および位相差顕微鏡像 (B)、ならびに培養 4 日目の位相差顕微鏡像(C)。 Scale Bar: 100 μm 。

表 1. P0 において得られる DFAT および ASC の細胞数

	猫種	性別	体重 (kg)	脂肪組織重量 (g)	P0において得られる細胞数 (cells/cm ²)	
					DFAT (7日目)	ASC (4日目)
Cat 1	雑種	雌	2.8	0.6	4.8 x 10 ⁵	3.3 x 10 ⁵
Cat 2	雑種	雌	3.1	0.4	8.0 x 10 ⁵	1.4 x 10 ⁵
Cat 3	雑種	雌	3.4	0.4	14.0 x 10 ⁵	2.7 x 10 ⁵
Cat 4	雑種	雌	3.0	0.5	4.6 x 10 ⁵	1.7 x 10 ⁵

DFAT



ASC

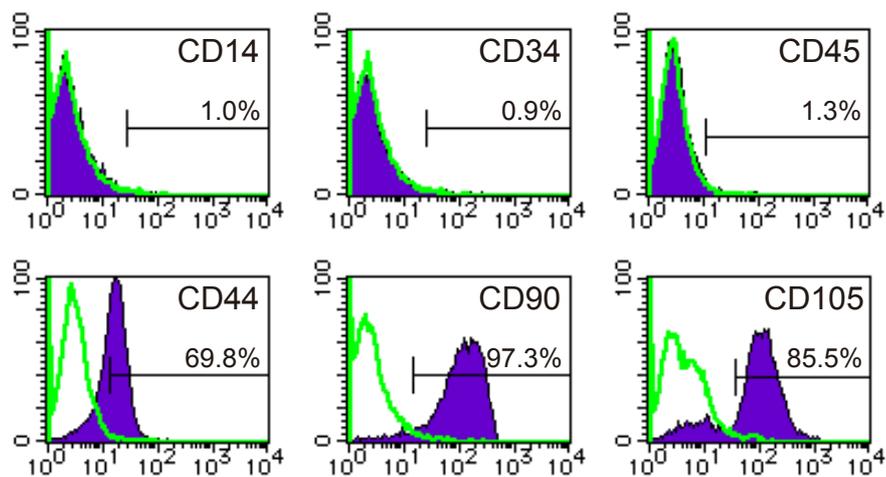


図 1-3. P1 における DFAT および ASC の細胞表面抗原の代表的なヒストグラム。マーカーシグナル (紫色) およびアイソタイプコントロールシグナル (緑色)。

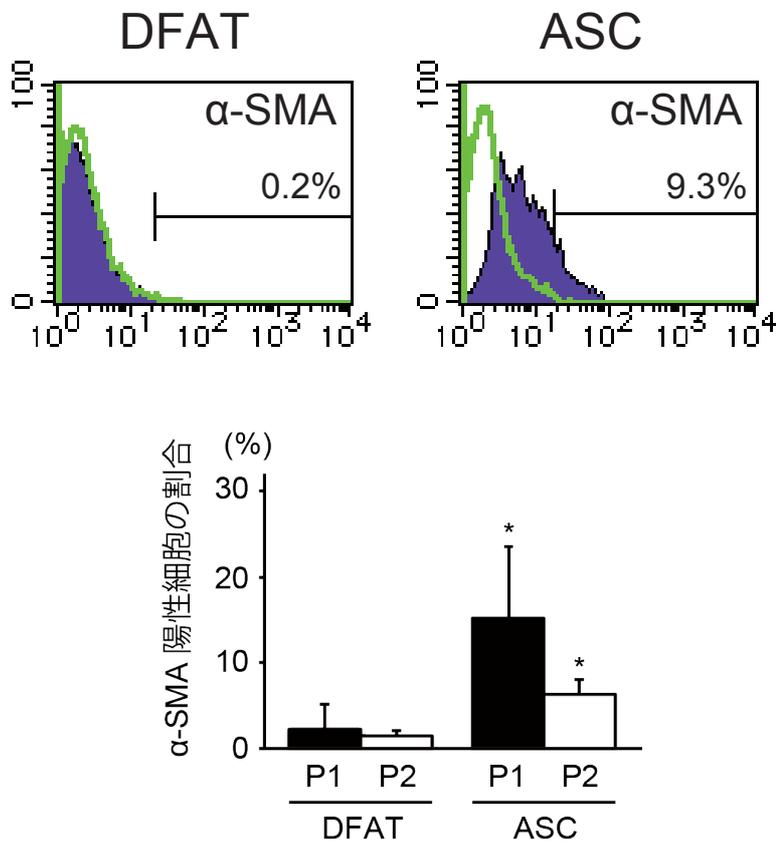


図 1-4. DFAT および ASC の α -SMA 陽性細胞の割合。P1 における DFAT および ASC の代表的なヒストグラム (上)。マーカーシグナル (紫色) およびアイソタイプコントロールシグナル (緑色)。P1 および P2 における DFAT および ASC の α -SMA 陽性細胞の比較 (下, 平均 \pm 標準偏差)。*: $P < 0.05$ 。

4. 考察

健康なネコの腹腔内脂肪組織から成熟脂肪細胞を分離し、これを天井培養することで、線維芽細胞様の DFAT を調製することができた。DFAT は少量の脂肪組織から大量調製が可能であることから、獣医療においても再生医療に用いる細胞として有用であると考えられる。

本研究はネコにおける DFAT の調製に関する初めての報告である。0.5~1.0 g の脂肪組織から $1\sim 2 \times 10^6$ 個の成熟脂肪細胞および $2\sim 5 \times 10^6$ 個の SVF を得ることができた。単離した成熟脂肪細胞の一部は、天井培養 3 日目で細胞質を伸長させ培養面に接着性を示すようになった。著者の研究グループは以前に、細胞核を蛍光ラベルした成熟脂肪細胞を天井培養し、タイムラプス撮影することにより、約 40% の成熟脂肪細胞から線維芽細胞様の形態を示す DFAT が非対称分裂によって産生されることを明らかにした (Matsumoto et al., 2008)。この DFAT は、その後は対称性に分裂し、高い細胞増殖活性を示すとともに、Lipoprotein lipase, Leptin, Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) などの脂肪細胞マーカー遺伝子の発現が消失しており、細胞増殖や分化調節に関わる遺伝子群の発現が増加していることを明らかにした (Matsumoto et al., 2008; Ono et al., 2011)。これまでの報告と同様に、ネコ DFAT もまた MSC に共通して発現する細胞表面抗原を有していることが明らかとなった。

ASC もまた少量の脂肪組織から大量に調製することが可能であった。ネコ脂肪組織から分離した SVF 中の約 2%の細胞がコロニーを形成する自己複製能を有する細胞であることが明らかになった。これはヒトやマウスにおける研究結果と合致する。Friedenstein らは、骨髄間質細胞を低密度に培養した結果、形態学的に線維芽細胞に類似した細胞コロニーを形成し、このような細胞は急速に接着し、in vitro において高い増殖能をもつ細胞であることを報告している (Friedenstein et al., 1970)。CFU-F コロニーを形成する細胞は多分化能をもっており、CFU-F アッセイは組織中の MSC 数を推測することが可能である (Friedenstein et al., 1987)。他動物種と同様に、ネコの骨髄単核球 0.05-0.005% の割合で CFU-F コロニーを形成する細胞が存在するという報告がある (Friedenstein, 1980; Owen and Friedenstein, 1988; Martin et al., 2002)。したがってネコの脂肪組織は骨髄に比較して 100~1,000 倍の間葉系幹細胞が存在している可能性がある。

ASC は SVF の一部の細胞であるため、細胞集団に ASC 以外の細胞が不均質に含まれている可能性がある。本研究において、平滑筋細胞マーカーである α -SMA について解析すると、P1 の ASC において約 15%、そして P2 において約 6%の細胞が陽性を示した。継代により陽性細胞の割合は減少しているものの、ASC には少なくとも P2 までは、平滑筋細胞が混入していることが明らかになった。ASC とは対照的に、DFAT の継代前後における α -SMA 陽性細胞数の変化は微小であった。成熟脂肪細胞は、SVF と異なり、低速遠心後に培養液中に浮遊する性

質をもつ。天井培養はこの性質を利用した培養方法であり、成熟脂肪細胞を選択的に培養することが可能である。また、DFAT は細胞密度の高い培養条件下において α -SMA に弱陽性を示す傾向がある。以上の理由から DFAT における平滑筋細胞の混入の可能性は低く、一部の DFAT が α -SMA 陽性を示した可能性がある。したがって、DFAT は、ASC に比較して、継代早期において血管平滑筋細胞などの混入が少ない、より均質な細胞集団であると考えられる。

5. 小括

健康な若いネコから採取した腹腔内脂肪組織から成熟脂肪細胞を単離し、天井培養することで DFAT を得ることが可能であった。DFAT は、ASC と同様に高い増殖能を有しており、さらに継代早期において ASC よりも均質な細胞集団であることが示唆された。

第 2 章

脱分化脂肪細胞および脂肪由来幹細胞の増殖能の評価

1. 緒言

第 1 章において、ネコにおいても DFAT を調製することが可能であることを示し、加えて DFAT は ASC に比較して均質性が高いことが示唆された。

一般的に用いられている幹細胞の基準の一つは、クローン増殖する自己複製能を有することである。従来から CFU-F アッセイは、未分化な自己複製能をもつ MSC を検出するために用いられてきた。現在までに DFAT が CFU-F コロニー形成能をもつか明らかにした報告はない。また同じ細胞種であっても、生物種によって適切な培養条件は異なる。本章の目的は、ネコ DFAT および ASC の CFU-F コロニー形成能および増殖能を評価し、適切な細胞培養条件を明らかにすることである。

2. 材料と方法

1) DFAT および ASC

第 1 章と同様の方法を用いて、同一個体に由来する脂肪組織から DFAT および ASC を調製した (n=4)。

2) CFU-F コロニー形成能

P1 の DFAT および ASC のコロニー形成能を評価するために、細胞密度 50 cells/ 35-mm 培養皿の密度に調整し、CFU-F 培養液 (NH CFU-F medium, Miltenyi Biotec) で 37°C 5%CO₂ インキュベーターで 14 日間培養した。細胞は 4%パラホルムアルデヒドで固定後、メタノールに溶解した 0.5%クリスタルバイオレットで 5 分間染色した。蒸留水で 2 回洗浄し、50 個以上の細胞からなる細胞集団をコロニーとして計測した。

3) 細胞増殖アッセイ

P1 の DFAT および ASC 細胞倍加時間 (PDT) を評価するために、1 x 10⁴ cells/ 35-mm 培養皿の密度で細胞を播種し、2 日おきに 10 日間細胞数を計測した。細胞倍加時間は以下の式にしたがって算出した。

$$PDT = \log_2[Nt/ N0]$$

Nt: 計測時の細胞数、N0: 播種した細胞数

3) 継代培養のための培養条件検討

P1 の DFAT および ASC 1×10^4 個を高グルコース (4.5 g/l) または低グルコース (1.0 g/l) の 10%FBS 添加 DMEM、または脂肪細胞用培養液 (CSTI303-MSC, Cell Science & Technology Institute, Miyagi, Japan) で継代培養した。また、細胞をラミネンコート培養皿 (BD Bioscience) を用いて継代培養を行い、細胞の形態を観察した。

4) 統計

データは平均 \pm 標準偏差で示した。統計学的解析は解析ソフト SPSS 16.0 を用いて行った。データの比較は、Mann-Whitney U 検定を用いた。 $P < 0.05$ を統計学的有意水準とした。

3. 結果

1) CFU-F アッセイ

DFAT および ASC は P1 の時点でいずれも CFU-F コロニー形成能を示した。DFAT のコロニー形成効率 ($35.8 \pm 4.4\%$) は、ASC ($20.8 \pm 5.2\%$) よりも有意に高かった ($P < 0.05$, 図 2-1)。

2) 増殖アッセイ

DFAT および ASC は紡錘形の形態であり非常に類似しており、10 日後にサブコンフルエントに達した (図 2-2)。P1 における DFAT および ASC の細胞倍加時間は、それぞれ 48 ± 9 時間および 50 ± 13 時間であり、両者に有意な差はなかった ($P = 0.48$, 図 2-3)。

3) 継代培養のための条件検討

P1 の DFAT および ASC の形態を観察すると、継代培養の経過に伴い、結節性の細胞凝集塊を形成した。この凝集はコンフルエントの時点で特に顕著となり、接着性を失い培養皿から剥離した。また、低グルコース DMEM または脂肪細胞用培養液 (CSTI303-MS) を用いた場合も、同様の現象が観察された。ラミネンコート培養皿を用いた場合、細胞がコンフルエントに達した後であっても凝集塊を形成せず、単層培養を維持することが可能であった (図 2-4)。

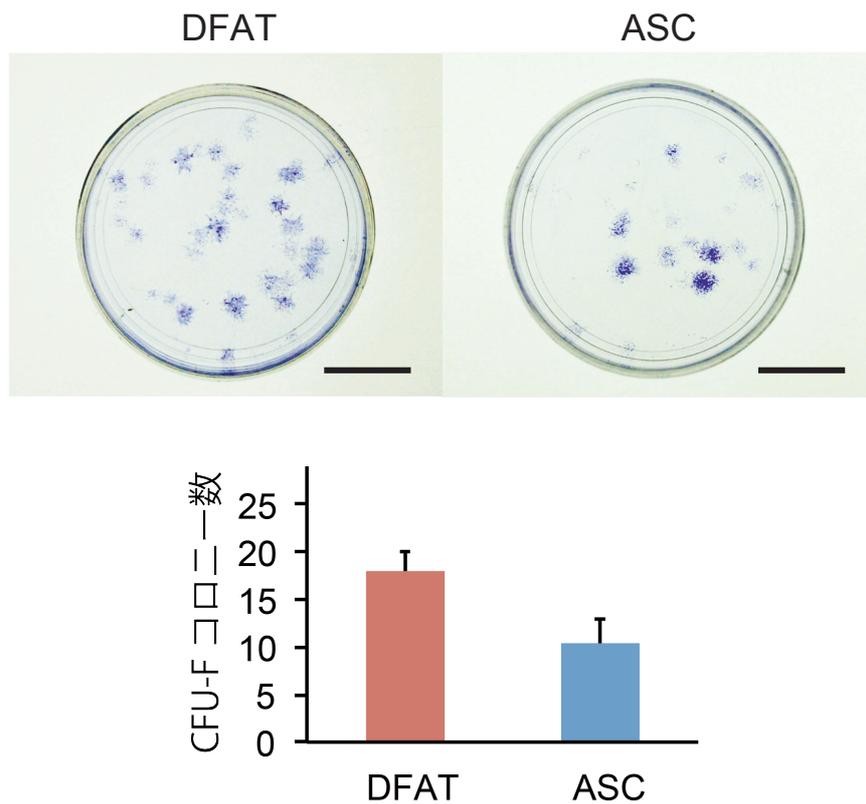


図 2-1. P1 における DFAT および ASC の CFU-F コロニー形成能の比較。DFAT および ASC を 50 cells/ 35-mm 培養皿の密度で培養し、21 日後に形成された代表的なコロニー (上段) およびコロニー数の定量評価 (下段, 平均 \pm 標準偏差)。Scale bar: 1 mm。*: $P < 0.05$ 。

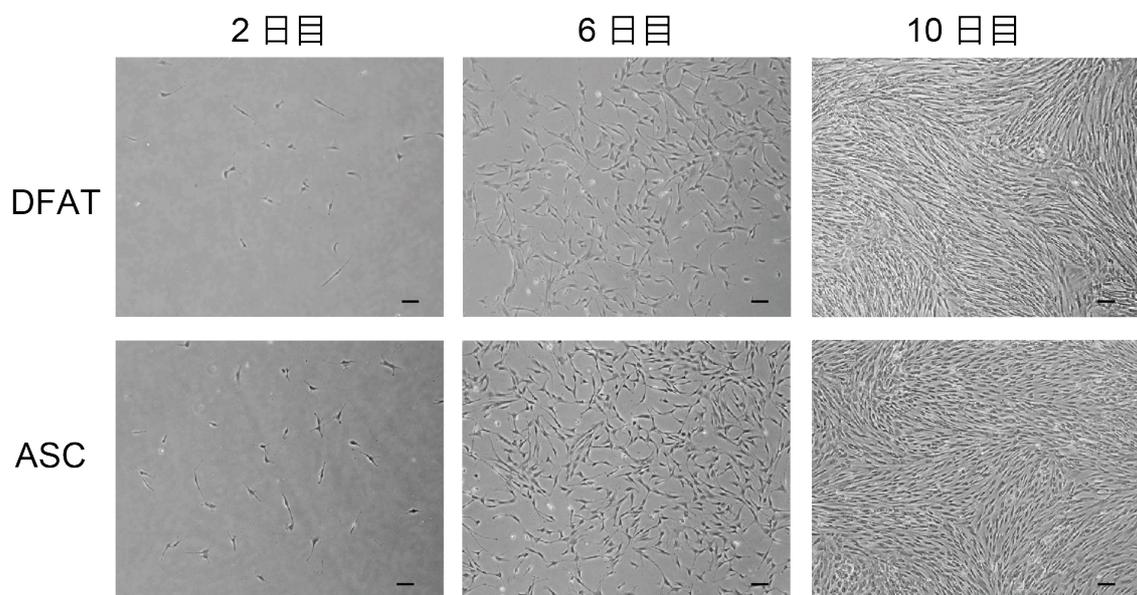


図 2-2. P1 における DFAT および ASC の代表的な細胞形態。1 x 10⁴/35-mm 培養皿の細胞密度で播種後、2、6、および 10 日目の位相差顕微鏡像。Scale bar: 100 μm。

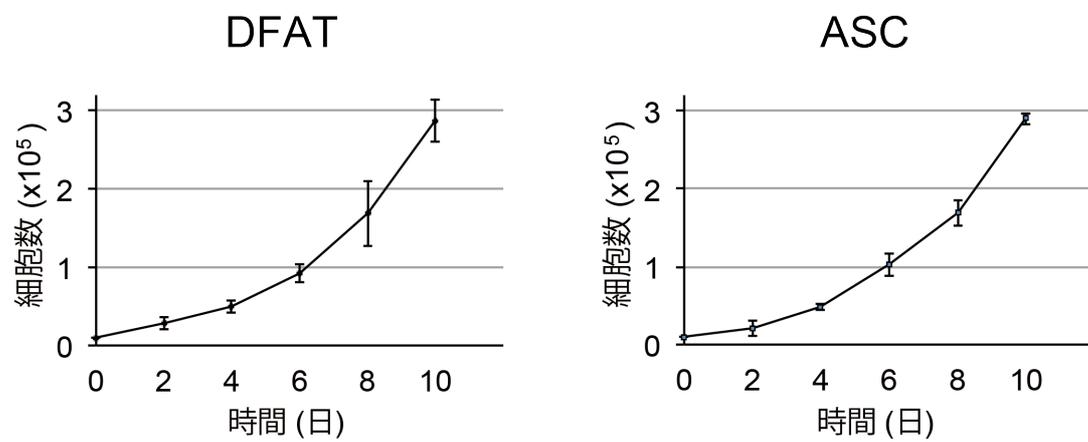


図 2-3. P1 における DFAT および ASC の増殖曲線。1 x 10³/cm² の細胞密度で播種後、10 日まで 2 日おきに細胞数を計測 (平均 ± 標準偏差)。

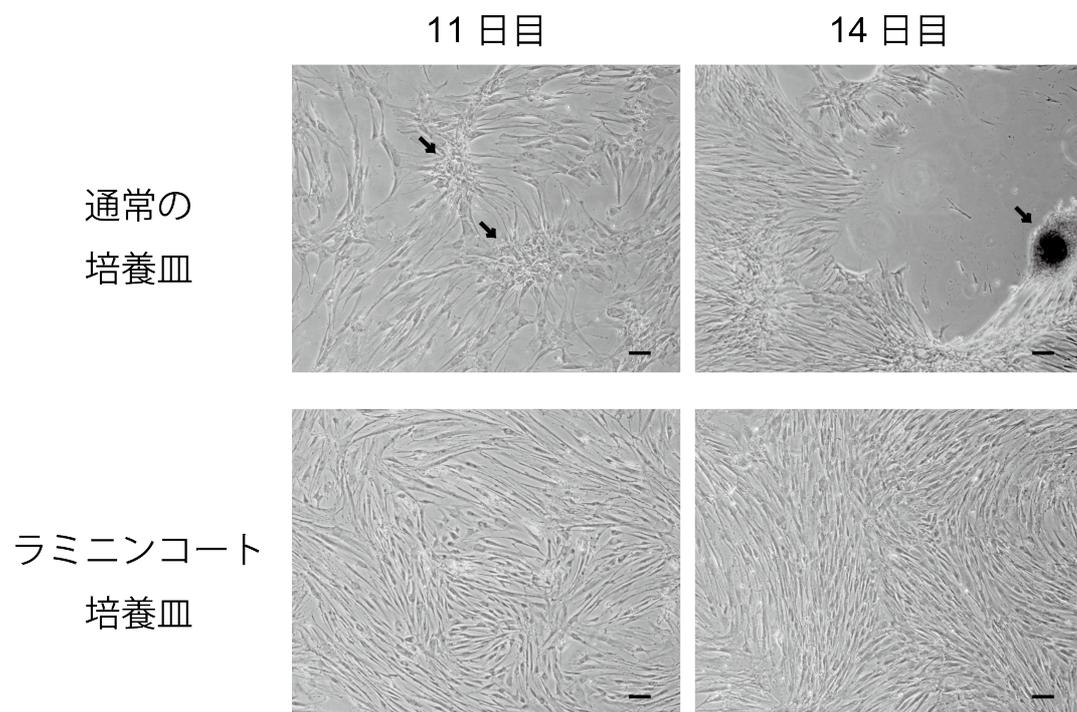


図 2-4. P1 の DFAT を通常の培養皿およびラミニンコート培養皿に播種した後、11 および 14 日目の細胞形態。培養経過に伴い形成された細胞凝集塊 (矢印) の位相差顕微鏡像。Scale bar: 100 μm 。

4. 考察

CFU-F アッセイは低密度に細胞を播種し、クローン増殖によるコロニー形成能を有する細胞を検出する。本研究では P1 における DFAT および ASC を低密度に培養し、コロニー形成能を比較した結果、DFAT において形成されたコロニー数は ASC の約 2 倍であった。P1 における ASC の CFU-F コロニー形成効率¹はヒト ASC における過去の報告の結果 (12.5%) にほぼ一致していた (McIntosh et al., 2006)。これらの結果より、DFAT は ASC に比較して自己複製能を有する未分化な細胞を多く含んでいる可能性が示唆された。

また、本研究において、ネコ DFAT の増殖活性は ASC と同等であり、細胞倍加時間の平均は 48~50 時間であった。この結果は、それぞれヒト、ラット、およびウサギの DFAT (Matsumoto et al., 2008; Sakuma et al., 2009; Kikuta et al., 2013)、ならびにヒト、ウマ、およびイヌの ASC の結果と同程度であった (Vidal et al., 2007; Izadpanah et al., 2008; Spencer et al., 2012)。

ネコ脂肪組織から調製した DFAT および ASC から細胞治療に必要な細胞数を得るためには継代培養による細胞増幅が必要である。両細胞とも継代培養に伴い細胞密度が高くなると、細胞同士が凝集し、剥離すること現象が観察された。この現象は、ヒト、ブタ、マウス、ラットの DFAT では観察されず (Matsumoto et al., 2008; Nur et al., 2008;

Ohta et al., 2008; Jumabay et al., 2009)、動物種特異的な現象であると考えられた。培養液および培養皿のコーティング基質を検討した結果、ラミニンコート培養皿を用いた場合に、細胞凝集塊は形成されず、14日以上の単層培養が可能であることが明らかとなった。Neupaneらは、イヌのASCをラミニンコート培養皿にて培養することで骨分化誘導する際に起こる細胞凝集を回避できることを報告している (Neupane et al., 2008)。ラミニンは基底膜を構成する細胞外マトリックスの一つであり、3種類のサブユニット鎖の組み合わせにより、16種類のアイソフォームが同定されている (Ekblom et al., 2003; Scheele et al., 2007; Tzu and Marinkovich, 2008)。本研究に用いたラミニン1はインテグリンを介して、細胞接着および生存を強化するホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3k) /Akt シグナル経路を活性化することが知られている (Gu et al., 2002; Ekblom et al., 2003; Gu et al., 2003)。したがって、ラミニンが PI3k/Akt シグナル経路を介してネコ DFAT および ASC の接着を強化することにより、細胞凝集を抑制し、単層培養の維持に寄与した可能性がある。以上のように、ラミニンコート培養皿は、DFAT および ASC の接着を強化し、長期的な継代培養を可能とするために有効であることが明らかになった。

5. 小括

ネコ DFAT は ASC に比較して自己複製能をもつ未分化な細胞を多く含んでいることが示唆された。DFAT および ASC は同程度の高い増殖能を示したが、長期の継代培養を行うためには足場としてラミニンが必要であることが明らかになった。

第 3 章

脱分化脂肪細胞および脂肪由来幹細胞の多分化能の評価

1. 緒言

第 1 章においてネコの成熟脂肪細胞から調製した DFAT が ASC と同様の細胞表面抗原を発現していることを明らかにし、第 2 章においては高い自己複製能および増殖活性を有することを明らかにした。

多分化能は、MSC の重要な特徴の一つである。ASC は *in vitro* において適切な分化誘導刺激によって、脂肪細胞、軟骨細胞、骨芽細胞へと分化する。

本研究の目的は、DFAT および ASC が多分化能を有することを評価することである。多分化能の評価には、脂肪、軟骨、および骨に加えて、平滑筋細胞への分化誘導を行った。

2. 材料と方法

1) 脂肪分化誘導

10%FBS 添加 DMEM を基礎培地として、1 μ M デキサメタゾン (Sigma-Aldrich) 、 0.5 mM 3-Isobutyl-L-methylxanthine (IBMX, Sigma-Aldrich)、0.5% Insulin-Transferin-Selenium-X (Invitrogen)を添加したものを脂肪分化誘導培地として用いた。DFAT および ASC は基礎培地を用いてラミニンコート培養皿上でコンフルエントまで培養し、脂肪分化誘導培地にて 37°C 5%CO₂ インキュベーターで 4 日間培養した。4 日以降は基礎培地に 1 μ M デキサメタゾンを添加した培地に変更し、3 日ごとに培地交換して 14 日目まで培養した。コントロールとして、ラミニンコート培養皿上でコンフルエントになった細胞を基礎培地で同期間培養した。

14 日後に脂肪滴を検出するために Oil Red O 染色を行った。培地が入ったままの培養皿に培地と同量の 4%パラホルムアルデヒドを加え、10 分間前固定した。固定液を捨て、さらに 4%パラホルムアルデヒドにて 1 時間固定した。Oil Red O を溶解したイソプロパノール溶液と純水を 3:2 (v/v) で混合して 10 分間室温に静置し、濾過した後、染色液として使用した。蒸留水で洗浄後、上記染色液にて 20 分間染色し、光学顕微鏡 (Eclipse TE 2000-U, Nikon, Tokyo, Japan) にて観察した。

2) 軟骨分化誘導

軟骨への分化誘導は、ペレット培養法にて行った (Johnstone et al., 1998)。P0 の DFAT および ASC を 0.05%トリプシンおよび 0.48 mM EDTA を用いて 2×10^6 cells/ml になるように細胞懸濁液を調整した。15 ml チューブに 1 ml (2×10^6 cells/ tube) ずつ分注し、300 g で 3 分間遠心した。上清を除去し、市販の軟骨分化誘導培地 (NH ChondroDiff medium, Miltenyi Biotec) を加え、さらに 500 g で 10 分間遠心した。空気の入りが可能になるようにキャップを緩め、2 日ごとにペレットが崩れないように培地交換した。

21 日間のペレット培養の後、ペレットを 4%パラホルムアルデヒドにて 1 時間固定した。実体顕微鏡 (VB-7000, Keyence, Osaka, Japan) にて観察後、5 μ m のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色、マッソントリクローム染色、およびトルイジンブルー染色を行った。また、2 型コラーゲンに対する免疫染色を行った。免疫染色は、0.2% Triton X-100 にて膜透過処理し、正常ヤギ血清によりブロッキングした後、ウサギ抗ヒト 2 型コラーゲン抗体 (1:500, Invitrogen) を 4°C で一晩インキュベートし、二次抗体として Alexa 594 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いて染色した。Hoechst33342 で核染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FluoView FV10i, Olympus) にて観察した。

3) 骨分化誘導

10%FBS 添加 DMEM を基礎培地として、100 nM デキサメタゾン、

10 mM β -グリセロリン酸、および 50 μ M L-アスコルビン酸を添加した培地を骨分化誘導培地とした。35-mm ラミネンコート培養皿を用いてコンフルエントまで培養した細胞を骨分化誘導培地にて 21 日間培養し、細胞の形態を位相差顕微鏡にて観察した。培地交換は 3 日ごとに行った。また、DFAT および ASC を 1×10^6 cells/ml の密度の細胞浮遊液を調整し、100 μ L を β -カルシウム三リン酸 (β -TCP)/ コラーゲンスポンジ (5 x 5 x 2 mm, β -TCP 径 100~300 μ m; 乾燥重量 β -TCP : コラーゲン = 10 : 1, Olympus Terumo Biomaterials, Tokyo, Japan) に播種し、骨分化誘導培地で 37°C 5%CO₂ インキュベーターにて 24 時間培養した。基礎培地で培養した細胞をコントロールとした。3~4 日ごとに培地交換し、同時に β -TCP/ コラーゲンスポンジを反転させた。

21 日間の培養後、培養皿にて培養した細胞および β -TCP コラーゲンスポンジを 4%パラホルムアルデヒドで 1 時間固定し、純水に溶解した 1% Alizarin Red S にて室温で 3 分間染色した。検体は 50%エタノールにて脱色し、実体顕微鏡にて観察した後、10 μ m 厚のパラフィン切片を作製し、光学顕微鏡 (Olympus BX50) にて観察した。

4) 平滑筋細胞分化誘導

5%FBS 添加 DMEM を基礎培地として、5 ng/ml TGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) を添加した培地を平滑筋細胞分化誘導培地とした。DFAT および ASC を 1×10^4 cells/ 35-mm 培養皿の密度に播種し、37°C 5%CO₂ インキュベーターにて 7 日間培養した。

7日間分化誘導した細胞は、4%パラホルムアルデヒドにて固定し、0.2% Triton X-100 で膜透過処理、正常ヤギ血清でブロッキングした後、マウス抗ヒト α -SMA抗体 (1:200) を4°Cで一晩インキュベートし、二次抗体として Alexa 594 標識ヤギ抗マウス IgG抗体 (1:500) を用いて染色した。Hoechst33342により核染色し、免疫蛍光顕微鏡 (Eclipse TE 2000-U, Nikon) を用いて観察した。

3. 結果

1) 脂肪分化誘導

脂肪分化誘導培地にて培養した細胞の一部は、7 日目ごろから細胞質内に小滴が出現した。この小滴は Oil Red O 染色により赤色に染色され、中性脂肪を主体とする脂肪滴であることが確認された。培養期間の経過に伴って、細胞質内に脂肪滴を含む細胞および脂肪滴のサイズが大きくなる様子が観察された (図 3-1, 分化誘導あり)。コントロールとして基礎培地で培養した細胞では、脂肪滴の存在は認められなかった (図 3-1, 分化誘導なし)。

2) 軟骨分化誘導

軟骨分化誘導培地で 21 日間ペレット培養したチューブ内に白色の細胞ペレットが形成された。このペレットは直径 1 mm 程度で、表面は滑らかであった (図 3-2)。2 型コラーゲンの免疫染色により、ペレットの一部が陽性を示した。また、トルイジンブルー染色によりペレット組織の一部が硝子軟骨の特徴的所見である紫色の異染性を示した。

3) 骨分化誘導

ラミニンコート培養皿で骨分化誘導培地にて培養した細胞は、7 日目には細胞凝集塊を形成し、培養皿から剥離する様子が観察された。

細胞を β -TCP/ コラーゲンスポンジに播種し、骨分化誘導した DFAT および ASC では、カルシウム沈着を検出する Alizarin Red S 染色によりスポンジの表面が強く赤色を示し、さらに内部では β -TCP の周囲にカルシウム沈着が観察された (図 3-3, 分化誘導あり)。基礎培地で同期間培養したコントロールでは、Alizarin Red S に陰性であった (図 3-3, 分化誘導なし)。

4) 平滑筋分化誘導

平滑筋細胞分化誘導培地にて 7 日間培養すると、DFAT および ASC とともに 50%以上の細胞が平滑筋マーカである α -SMA 陽性を示した (図 3-4, 分化誘導後)。ASC の一部の細胞は分化誘導前から α -SMA 陽性を示し、血管平滑筋細胞の混入が示唆された (図 3-4, 分化誘導前)。

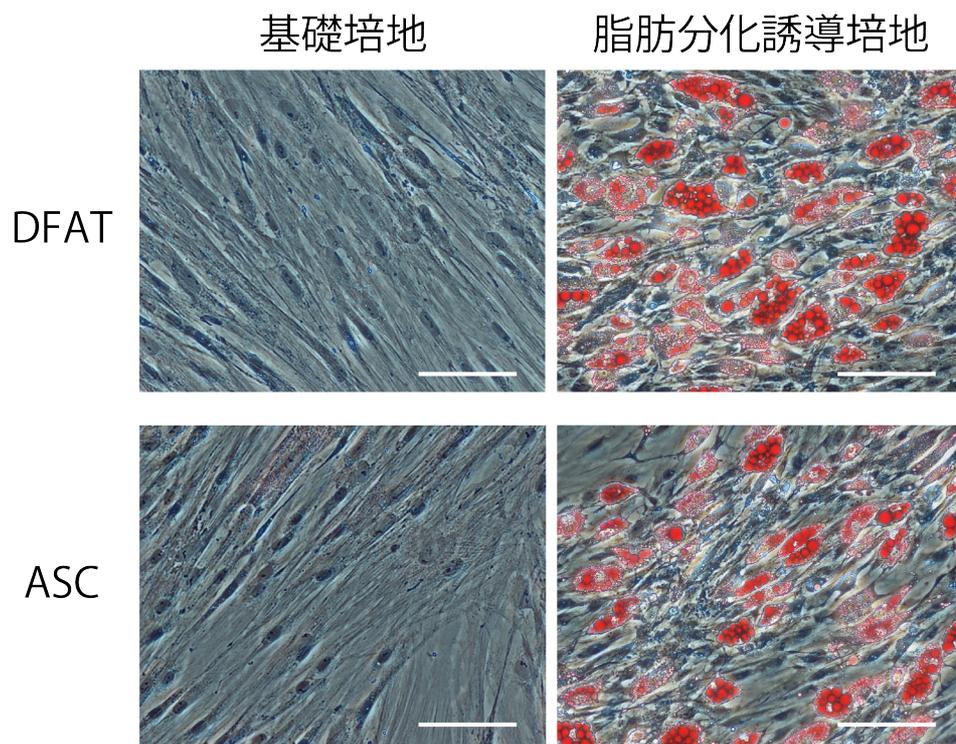


図 3-1. DFAT および ASC の脂肪分化能の評価 (Oil Red O 染色)。基礎培地 (誘導なし) および脂肪分化誘導培地 (誘導あり) にて培養した 14 日目の位相差顕微鏡像。Scale bar: 100 μm 。

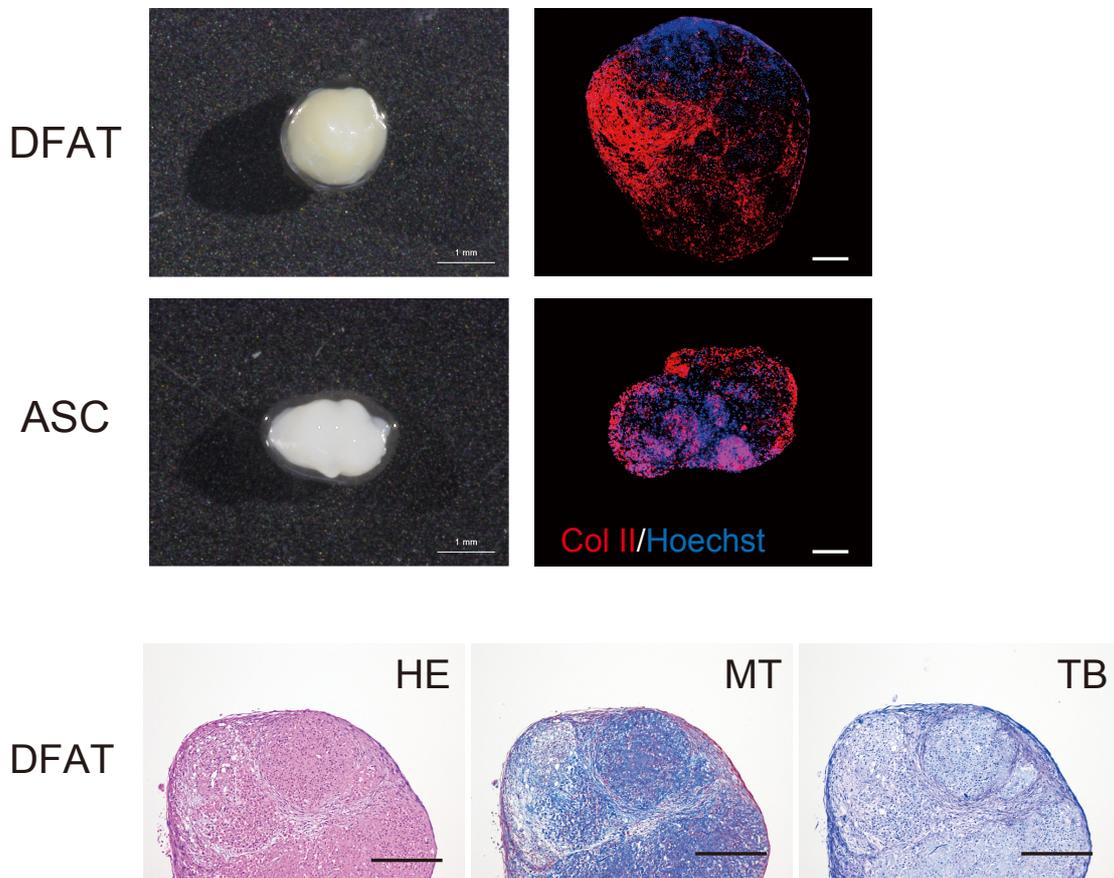


図 3-2. DFAT および ASC の軟骨分化能の評価。軟骨分化誘導培地にて 14 日間のペレット培養後に形成されたペレット (上段左) およびのペレット内部の 2 型コラーゲン (Col II) 免疫染色後の蛍光顕微鏡像 (上段右)。ヘマトキシリンエオジン染色 (HE)、マッソントリクローム染色 (MT)、およびトルイジンブルー染色 (TB) 後の光学顕微鏡像 (下段)。Scale bar: 200 μm 。

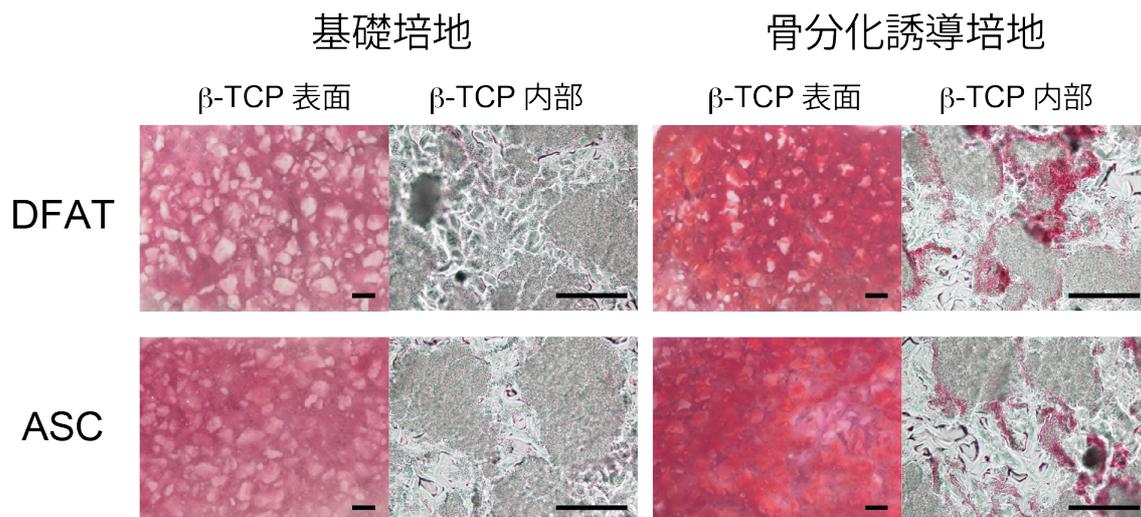


図 3-3. DFAT および ASC の骨分化能の評価 (Alizarin Red S 染色)。基礎培地および骨分化誘導培地にて培養 21 日後の β -TCP/コラーゲンスポンジの表面の実体顕微鏡像、および内部の光学顕微鏡像。Scale bar: 200 μ m。

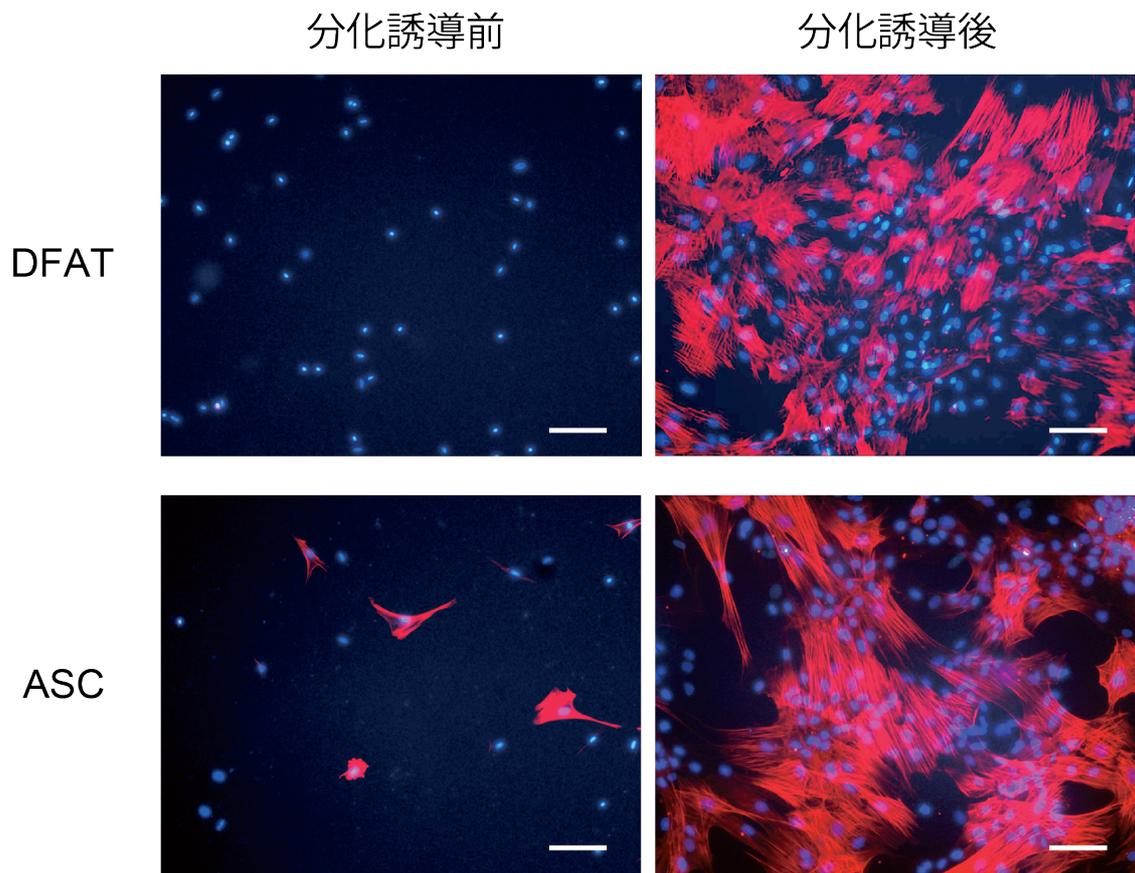


図 3-4. DFAT および ASC の平滑筋細胞分化能の評価 (α -SMA 免疫染色)。分化誘導前および誘導後における蛍光顕微鏡像。Scale bar: 100 μ m。

4. 考察

本章では、間葉系幹細胞の特性の一つである多分化能を評価した。Matsumoto らの報告 (Matsumoto et al., 2008) と同様に DFAT および ASC は、それぞれの分化誘導刺激により脂肪、軟骨、骨、および平滑筋細胞に分化する能力を有することが明らかになった。

デキサメタゾン、インスリン、IBMX を添加した脂肪分化誘導法により (Scott et al., 2011)、ネコ DFAT の脂肪分化能が証明された。デキサメタゾンはインスリンとの相互作用によりグルココルチコイド受容体を刺激し、MSC の様々な細胞系列への分化を誘導する (Grigoriadis et al., 1988)。また、IBMX はデキサメタゾンとともに PPAR γ の発現を誘導する (Kim et al., 2010; Gurriaran-Rodriguez et al., 2011)。誘導された脂肪細胞の分化度を明らかにするために、分子マーカーの発現解析や機能試験を行う必要がある。

ペレット培養により、表面の滑らかな軟骨様の細胞塊が形成された。ペレット内部は細胞外マトリックスに富み、硝子軟骨マーカーである 2 型コラーゲン陽性およびトルイジンブルー染色にて紫色の異染性を示す像が認められた。一方、このような硝子軟骨に特徴的な染色像はペレット表層近くのみ認められ、大部分は未熟な軟骨組織であることが示唆された。MSC を用いた軟骨の大量生産による関節疾患への応用が期待されており、より効率的に成熟した軟骨細胞へと分化させる

誘導法を開発する必要がある (Wakitani et al., 1994; Matsumoto et al., 2010)。

ネコ DFAT および ASC は細胞足場として β -TCP/コラーゲンスポンジを用いることで骨分化能を示した。デキサメタゾン は骨分化の重要な調節因子である Runt-related transcription factor 2 (Runx2)、Osterix (Osx)、および Bone morphogenetic protein (BMP) の発現を促進し、ALP 活性を上昇させる。 β -グリセロリン酸 および L-アスコルビン酸は、骨基質である 1 型コラーゲンの産生を促進し、カルシウム沈着に関与する。ヒトやブタの DFAT はコンフルエントの段階で骨分化誘導を開始する標準的な方法でカルシウムの沈着を認める骨芽細胞へ分化させることが可能である (Matsumoto et al., 2008)。第 2 章においてラミニンコート培養皿を用いることでコンフルエントに達した後に単層培養を維持することが可能であることが明らかになった。しかしながら、ラミニンコート培養皿を用いたとしても、骨分化誘導により細胞は凝集塊を形成し、ディッシュ表面から剥離した。近年の組織工学の進歩により、細胞の支持体としての役割を果たし、増殖および分化を促進するスキャホールドが注目されている (Liu et al., 2008; Matsushima et al., 2009)。 β -TCP コラーゲンスポンジをスキャホールドとした骨分化誘導によりネコの DFAT および ASC はカルシウム沈着を伴う骨芽細胞へ分化させることが可能であった。詳細な理由は明らかではないが、ネコの DFAT および ASC の *in vitro* における骨分化誘導には、スキャホールドと

してコラーゲンマトリックスの存在が重要であることが示唆された。

本研究において、ネコ DFAT は TGF- β 1 を添加した培養により α -SMA 陽性の平滑筋細胞への分化能を有することが明らかになった。間葉系幹細胞は平滑筋細胞への分化能をもつことが知られている (Kinner et al., 2002; Gong and Niklason, 2008; Kurpinski et al., 2010)。TGF- β 1 は MSC の平滑筋細胞への分化を誘導する重要なサイトカインである。Smad2 または Smad3 を small interfering RNA 導入によりノックダウンさせると α -SMA の発現が低下することから、TGF- β 1 による平滑筋細胞への分化誘導には Smad2 および Smad3 の活性化が関与している可能性が考えられている (Chen and Lechleider, 2004)。血管平滑筋細胞は血管の重要な構成成分の一つであり、血管の収縮弛緩の生理的な機能や血圧および血流分布を司っている。虚血部位に注入された MSC の一部は血管平滑筋細胞に分化し、脈管形成に寄与したとする報告がある (Gojo et al., 2003; Yoon et al., 2005)。DFAT もまた、平滑筋細胞の細胞系列に分化する可能性がある。ヒトおよびラットにおいて DFAT が、平滑筋細胞分化誘導により α -SMA, Calponin などの平滑筋特有のマーカーを発現し、膀胱平滑筋や尿道平滑筋の再生に寄与することが明らかにされている (Sakuma et al., 2009; Obinata et al., 2011)。今後、ネコ DFAT の *in vivo* における平滑筋細胞への分化能および平滑筋組織の再生能を検討する必要がある。

小括

ネコ DFAT および ASC は、分化誘導刺激によって脂肪細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、および平滑筋細胞に分化する多分化能を有することが明らかになった。

総括

健康な若齢のネコから採取した 1 g 未満の脂肪組織から成熟脂肪細胞を単離し、天井培養することで線維芽細胞様の DFAT を調製することに成功した。この DFAT は、ASC と同様に MSC に共通する細胞表面抗原を発現し、高い増殖活性を示した。ネコの DFAT および ASC は、継代培養後に細胞密度が高くなるにつれて細胞凝集塊を形成し、剥離に至る傾向が認められたが、ラミネンコート培養皿により凝集形成が抑制され、継代培養の維持が可能であることが明らかになった。さらに DFAT は ASC と同様に脂肪、軟骨、骨、平滑筋細胞といった間葉系の細胞系列への多分化能を有していることが証明された。

再生医療に用いる細胞として、DFAT には 3 つの有利な点がある。第一に、DFAT は均質な細胞集団である。本研究において、ASC は初代培養からの継代後、細胞集団に α -SMA 陽性細胞が検出されたが、DFAT においてはほとんど検出されなかった。また、本研究からは言及できないが、培養された ASC の細胞集団には血管内皮細胞が継代後も除去されずに残存することが報告されている (McIntosh et al., 2006; Mitchell et al., 2006)。この理由として、骨髄 MSC や ASC は不均質な細胞集団を付着培養することで得られる細胞群であるため他細胞が混入する可能性が高いことが考えられる (Clark and Keating, 1995; Zuk et al., 2001)。一方、DFAT は浮遊する成熟脂肪細胞を単離後に天井培養することで得られる細胞であることから、間質に存在する細胞群が除外されることが推察される。このような DFAT の性質は、DFAT による細胞治療が高い安全性と安定した効果をもたらす可能性を示唆して

いる。

第二に、DFAT は極めて少量の脂肪組織から調製することが可能である。Matsumoto らは以前に、 5×10^4 個の脂肪細胞、つまり 100 mg に相当する少量の脂肪組織から十分量の DFAT を得られることを報告している。ネコのような小動物では、得られる組織量も少ないため、より少量の組織から効率よく大量の多能性細胞を調製する技術が望まれる。DFAT は少量の脂肪組織から大量調製が可能のため、ネコの自家移植を用いた再生医療や細胞治療の細胞源として期待がもてる。

第三に、DFAT はドナー患者の年齢に関係なく調製することができる。我々のグループは 4 歳から 81 歳の 18 名すべての人間のドナーから DFAT を調製し、年齢にかかわらず多分化能をもつことを確認している。このような性質は、様々な年齢の患者に対して DFAT の自家移植を可能にする。本研究に供した脂肪組織はすべて若齢のネコから採取したものであり、高齢のネコから調製した DFAT においても特性を評価する必要がある。

骨髄 MSC および ASC は免疫調節能、血管新生能、および抗炎症作用をもち、これらの効果は主に細胞による多様なサイトカインの分泌が寄与している (Keating, 2012)。近年、ヒト DFAT が骨髄 MSC および ASC と類似したサイトカインの分泌能を有することが明らかとなり、ネコにおいても検証する必要がある (Kikuta et al., 2013)。

本研究には、いくつかの限界がある。第一に、健康な若齢の雌ネコにおける腹腔内脂肪組織のみをサンプルとして採取したことである。

ドナー年齢、性別、または採取方法や部位が MSC の数および性質に影響することが報告されている (Izadpanah et al., 2006; Schipper et al., 2008; Baglioni et al., 2009; de Girolamo et al., 2009; Siegel et al., 2013)。

また、ネコにおける DFAT による細胞治療を行うために、生体への移植実験により有効性および安全性を評価する必要がある。本研究により得られた知見が、ネコにおける再生医療の発展に貢献することが期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始懇篤なる御指導を賜りました日本大学医学部機能形態学系細胞再生移植医学分野 松本太郎教授および同生物資源科学部獣医内科学研究室 上地正実教授に深甚なる謝意を表します。また、貴重な御助言および御校閲を賜りました同獣医生化学研究室 杉谷博士教授、および同動物生体機構学研究室 加野浩一郎教授に深謝致します。

また、本研究を進めるにあたり、御協力および御助言頂きました同医学部細胞再生移植医学分野 風間智彦助手に深謝致します。

本研究を行う上で貴重な実験材料を快く提供して頂きました同生物資源科学部獣医内科学研究室研究員 原田佳代子先生に深謝致します。

日々多忙な診療および研究活動の中、甚大なるご協力を惜しまれなかった同医学部小児科学分野 風間美奈子博士および同医学部細胞再生移植医学分野 山元智衣博士に深謝いたします。

引用文献

Astori, G., Vignati, F., Bardelli, S., Tubio, M., Gola, M., Albertini, V., Bambi, F., Scali, G., Castelli, D., Rasini, V., Soldati, G., Moccetti, T., 2007. "In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med* 5, 55.

Baglioni, S., Francalanci, M., Squecco, R., Lombardi, A., Cantini, G., Angeli, R., Gelmini, S., Guasti, D., Benvenuti, S., Annunziato, F., Bani, D., Liotta, F., Francini, F., Perigli, G., Serio, M., Luconi, M., 2009. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J* 23, 3494-3505.

Bunnell, B.A., Flaat, M., Gagliardi, C., Patel, B., Ripoll, C., 2008. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45, 115-120.

Chen, S., Lechleider, R.J., 2004. Transforming growth factor-beta-induced differentiation of smooth muscle from a neural crest stem cell line. *Circ Res* 94, 1195-1202.

Clark, B.R., Keating, A., 1995. Biology of bone marrow stroma. *Ann N Y Acad Sci* 770, 70-78.

de Girolamo, L., Lopa, S., Arrigoni, E., Sartori, M.F., Baruffaldi Preis, F.W., Brini, A.T., 2009. Human adipose-derived stem cells isolated from young and elderly women: their differentiation potential and scaffold interaction during in vitro osteoblastic differentiation. *Cytotherapy* 11, 793-803.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.

Ekblom, P., Lonai, P., Talts, J.F., 2003. Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biol* 22, 35-47.

Fraser, J.K., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., 2008. Adipose-derived stem cells. *Methods Mol Biol* 449, 59-67.

Friedenstein, A., Kuralesova, A.I., 1971. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. *Transplantation* 12, 99-108.

Friedenstein, A.J., 1980. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematol Blood Transfus* 25, 19-29.

Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., Lalykina, K.S., 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3, 393-403.

Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Gerasimov, U.V., 1987. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 20, 263-272.

Gojo, S., Gojo, N., Takeda, Y., Mori, T., Abe, H., Kyo, S., Hata, J., Umezawa, A., 2003. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 288, 51-59.

Gong, Z., Niklason, L.E., 2008. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). *FASEB J* 22, 1635-1648.

Grigoriadis, A.E., Heersche, J.N., Aubin, J.E., 1988. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol* 106, 2139-2151.

Gu, J., Fujibayashi, A., Yamada, K.M., Sekiguchi, K., 2002. Laminin-10/11 and fibronectin differentially prevent apoptosis induced by serum removal via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- and MEK1/ERK-dependent pathways. *J Biol Chem* 277, 19922-19928.

Gu, Y.C., Kortessmaa, J., Tryggvason, K., Persson, J., Ekblom, P., Jacobsen, S.E., Ekblom, M., 2003. Laminin isoform-specific promotion of adhesion and migration of human bone marrow progenitor cells. *Blood* 101, 877-885.

Gurriaran-Rodriguez, U., Al-Massadi, O., Roca-Rivada, A., Crujeiras, A.B., Gallego, R., Pardo, M., Seoane, L.M., Pazos, Y., Casanueva, F.F., Camina, J.P., 2011. Obestatin as a regulator of adipocyte metabolism and adipogenesis. *J Cell Mol Med* 15, 1927-1940.

Heuberger, R., Wakshlag, J., 2011. Characteristics of ageing pets and their owners: dogs v. cats. *Br J Nutr* 106 Suppl 1, S150-153.

Iacono, E., Cunto, M., Zambelli, D., Ricci, F., Tazzari, P.L., Merlo, B., 2012. Could fetal fluid and membranes be an alternative source for mesenchymal stem cells (MSCs) in the feline species? A preliminary study. *Vet Res Commun* 36, 107-118.

Izadpanah, R., Trygg, C., Patel, B., Kriedt, C., Dufour, J., Gimble, J.M., Bunnell, B.A., 2006. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 99, 1285-1297.

Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., Yoo, J.U., 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238, 265-272.

Jumabay, M., Matsumoto, T., Yokoyama, S., Kano, K., Kusumi, Y., Masuko, T., Mitsumata, M., Saito, S., Hirayama, A., Mugishima, H., Fukuda, N., 2009. Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *J Mol Cell Cardiol* 47, 565-575.

Keating, A., 2012. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell* 10, 709-716.

Kikuta, S., Tanaka, N., Kazama, T., Kazama, M., Kano, K., Ryu, J.,

Tokuhashi, Y., Matsumoto, T., 2013. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Eng Part A* 19, 1792-1802.

Kim, S.P., Ha, J.M., Yun, S.J., Kim, E.K., Chung, S.W., Hong, K.W., Kim, C.D., Bae, S.S., 2010. Transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma requires activation of both protein kinase A and Akt during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 399, 55-59.

Kinner, B., Zaleskas, J.M., Spector, M., 2002. Regulation of smooth muscle actin expression and contraction in adult human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 278, 72-83.

Kurpinski, K., Lam, H., Chu, J., Wang, A., Kim, A., Tsay, E., Agrawal, S., Schaffer, D.V., Li, S., 2010. Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem Cells* 28, 734-742.

Martin, D.R., Cox, N.R., Hathcock, T.L., Niemeyer, G.P., Baker, H.J., 2002. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol* 30, 879-886.

Matsumoto, T., Kano, K., Kondo, D., Fukuda, N., Iribe, Y., Tanaka, N., Matsubara, Y., Sakuma, T., Satomi, A., Otaki, M., Ryu, J., Mugishima, H., 2008. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 215, 210-222.

Matsumoto, T., Okabe, T., Ikawa, T., Iida, T., Yasuda, H., Nakamura, H., Wakitani, S., 2010. Articular cartilage repair with autologous bone marrow mesenchymal cells. *J Cell Physiol* 225, 291-295.

McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Mitchell, J.B., Floyd, Z.E., Hammill, L., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Ting, J.P., Storms, R.W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X., Gimble, J.M., 2006. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* 24, 1246-1253.

Mitchell, J.B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z.E., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Storms, R.W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X., Gimble, J.M., 2006. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 24, 376-385.

Mizuno, H., Tobita, M., Uysal, A.C., 2012. Concise review:

Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine.

Stem Cells 30, 804-810.

Neupane, M., Chang, C.C., Kiupel, M., Yuzbasiyan-Gurkan, V., 2008.

Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. Tissue Eng Part A 14, 1007-1015.

Nur, R., Fukuda, N., Matsumoto, T., Medet, J., Kano, K., Yamamoto, C.,

Maruyama, T., Endo, M., Matsumoto, K., 2008. Implantation of

dedifferentiated fat cells ameliorates habu snake venom-induced chronic renal dysfunction in tenascin-C-deficient mice. Nephron Exp Nephrol 110, e91-98.

Obinata, D., Matsumoto, T., Ikado, Y., Sakuma, T., Kano, K., Fukuda, N.,

Yamaguchi, K., Mugishima, H., Takahashi, S., 2011. Transplantation of

mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells improves urethral sphincter contractility in a rat model. Int J Urol 18, 827-834.

Ohta, Y., Takenaga, M., Tokura, Y., Hamaguchi, A., Matsumoto, T., Kano,

K., Mugishima, H., Okano, H., Igarashi, R., 2008. Mature

adipocyte-derived cells, dedifferentiated fat cells (DFAT), promoted functional recovery from spinal cord injury-induced motor dysfunction in

rats. *Cell Transplant* 17, 877-886.

Ono, H., Oki, Y., Bono, H., Kano, K., 2011. Gene expression profiling in multipotent DFAT cells derived from mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 407, 562-567.

Orbay, H., Tobita, M., Mizuno, H., 2012. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells Int* 2012, 461718.

Owen, M., Friedenstein, A.J., 1988. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 136, 42-60.

Quimby, J.M., Webb, T.L., Gibbons, D.S., Dow, S.W., 2011. Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: a pilot study. *J Feline Med Surg* 13, 418-426.

Reinders, M.E., Rabelink, T.J., 2010. Adipose tissue-derived stem cells: can impure cell preparations give pure results? *Nephrol Dial Transplant* 25, 3805-3807.

Sakuma, T., Matsumoto, T., Kano, K., Fukuda, N., Obinata, D., Yamaguchi,

K., Yoshida, T., Takahashi, S., Mugishima, H., 2009. Mature, adipocyte derived, dedifferentiated fat cells can differentiate into smooth muscle-like cells and contribute to bladder tissue regeneration. *J Urol* 182, 355-365.

Scheele, S., Nystrom, A., Durbeej, M., Talts, J.F., Ekblom, M., Ekblom, P., 2007. Laminin isoforms in development and disease. *J Mol Med (Berl)* 85, 825-836.

Schipper, B.M., Marra, K.G., Zhang, W., Donnenberg, A.D., Rubin, J.P., 2008. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg* 60, 538-544.

Scott, M.A., Nguyen, V.T., Levi, B., James, A.W., 2011. Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 20, 1793-1804.

Siegel, G., Kluba, T., Hermanutz-Klein, U., Bieback, K., Northoff, H., Schafer, R., 2013. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med* 11, 146.

Tzu, J., Marinkovich, M.P., 2008. Bridging structure with function:

structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 199-214.

Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S.J., Young, R.G., Mansour, J.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., 1994. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76, 579-592.

Wang, X., Wang, Y., Gou, W., Lu, Q., Peng, J., Lu, S., 2013. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *Int Orthop* 37, 2491-2498.

Webb, T.L., Quimby, J.M., Dow, S.W., 2012. In vitro comparison of feline bone marrow-derived and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Feline Med Surg* 14, 165-168.

Webster, R.A., Blaber, S.P., Herbert, B.R., Wilkins, M.R., Vesey, G., 2012. The role of mesenchymal stem cells in veterinary therapeutics - a review. *N Z Vet J* 60, 265-272.

Yagi, K., Kondo, D., Okazaki, Y., Kano, K., 2004. A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem Biophys*

Res Commun 321, 967-974.

Yoon, Y.S., Wecker, A., Heyd, L., Park, J.S., Tkebuchava, T., Kusano, K., Hanley, A., Scadova, H., Qin, G., Cha, D.H., Johnson, K.L., Aikawa, R., Asahara, T., Losordo, D.W., 2005. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 115, 326-338.

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211-228.