

心外膜下脂肪由来脱分化脂肪細胞(DFAT)の
心筋分化能の検討（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系循環器内科学専攻

遠山 一人

修了年 2015 年

指導教員 平山 篤志

【緒言】

わが国は、生活習慣の欧米化と平衡して、疾病構造が変化している。医療の発展と相成り、死因として、心血管疾患が年々増加傾向にある。重症心不全に対する治療として、薬物治療、非薬物治療の発展とともに予後の改善を図る医療がとられるが、難治性の予後不良である病態のため、これらに付与、代替する治療法の開発が急がれている。心臓移植は 2013 年に至っても年間 45 例ほどであり、わが国の宗教観、倫理観などの社会的側面も併せ、高度のドナー不足が生じている。近年、分子レベルで血管形成のメカニズムが徐々に明らかにされる中で、心筋再生の治療が臨床的に開始されている。細胞資源として、骨格筋芽細胞、骨髄由来幹細胞、心筋幹細胞、ES 細胞また iPS 細胞などが研究されている。しかし、これら細胞資源には、分化誘導効率が低いこと、がん化の可能性などがあり、諸問題を解決する研究が進められている。

Matsumoto ら¹⁾は、成熟脂肪細胞から、脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell : DFAT)を調製する技術を開発し、この細胞群は高い増殖能と多分化能を有することを明らかにした。DFAT は低侵襲で簡便な手技によって、少量の脂肪組織より調製することが可能であることから再生医療の細胞資源として期待される。

【目的】

脂肪細胞はその局在部位により、機能が異なることが知られている。脂肪細胞を脱分化させることにより得られる DFAT の分化指向性も脂肪組織の局在部位により異なることが示唆される。本研究では、ブタの心外膜下脂肪組織、及び

皮下脂肪組織からそれぞれ脂肪細胞を単離し、DFAT を調製した。そして、心外膜下脂肪由来 DFAT(epicardial fat-derived DFAT: EC-DFAT)、および皮下脂肪由来 DFAT(Subcutaneous fat-derived DFAT : SC-DFAT)の心筋への分化指向性を *in vitro* で比較検討した。

【対象と方法】

1. DFAT の調製方法

ブタより採取した皮下脂肪組織、心外膜下脂肪組織は、既報の調製方法に準拠して調製した¹⁾。培地は 2%FBS 含有 DMEM を使用した。作成された SC-DFAT、及び EC-DFAT はいずれも第 3 継代まで培養し、実験で使用した。

2. DFAT の分化誘導実験

DFAT の多分化能評価として、既報の方法^{1,3)}を用い、脂肪、骨、軟骨、平滑筋の分化誘導培養を行った。

3. リアルタイム RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)

遺伝子発現の評価は、TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法で行った。TaqMan プライマー/プローブとして、軟骨細胞系列の初期分化転写因子である SOX9、脂肪細胞分化系列の初期分化転写因子である PPAR γ 、心筋細胞系列の初期分化転写因子である GATA4 を使用し PCR を施行した。定量解析は、Ct(Threshold Cycle)値を用い、GAPDH の Ct 値を内部標準として、相対的に評価した。

4. 新生児ラット心筋細胞との共培養

新生児ラット心筋細胞は Lonza 社より購入した。新生児ラット心筋細胞用培地は、7.5%ウマ血清、7.5%FBS、0.1%ゲンタマイシン/アンホテリシン B 含有ラット心筋基礎培地(rat cardiac myocyte basal medium)を使用した。同培地を用いて、DFAT のみを培養したところ良好な生着、増殖が得られ、共培養が可能であることを確認した。直接的共培養は、新生児ラット心筋細胞(2.0×10^5 個)と、SC-DFAT(1.0×10^5 個)または EC-DFAT(1.0×10^5 個)を 24 ウェルプレートに播種し、直接的共培養を行った。また、シングルウェル ガラスベースディッシュに、新生児ラット心筋細胞(2.0×10^5 個)と、共培養前に PKH にて蛍光標識をした SC-DFAT(1.0×10^5 個)または EC-DFAT(1.0×10^5 個)を播種し共培養を行った。培養開始 7 日後に免疫蛍光染色を施行した。間接的共培養は、SC-DFAT または EC-DFAT(1.0×10^5 個)を 24 ウェルプレートに播種し、ラット心筋細胞用培地内で培養を行った。翌日、ラット心筋細胞(4.0×10^5 個)をセルカルチャーインサート(孔径 $0.4 \mu\text{m}$)上加え、DFAT を培養している 24 ウェルプレートにのせ、共培養を開始した。実験は全て triplicate で行い、評価した。

5. 免疫蛍光染色

7 日間の直接共培養後に、細胞は PBS で希釈した 4%ホルムアルデヒドで固定し、0.1% Triton-X で細胞膜の透過処理を行った。10%ヤギ血清含有 PBS を反応させ、ウサギ抗コネキシン 43 抗体(1:50)、ヤギ抗 Nkx2.5 抗体(1:50)、ウサギ抗トロポニン I 抗体(1:100)で一夜反応をさせた。翌日に、適切な二次抗体を用いて反応させ、核染色を行い、蛍光顕微鏡下で、デジタル撮影を行った。

6. 統計処理

RT-PCR の結果は、 $\text{mean} \pm \text{SE}$ でグラフに表記した。群間の比較は、Welch の検定を用いて、 $p < 0.05$ を有意水準とした。統計解析は JMP(Ver 9.0.0)を用いて行った。

【結果】

ブタの皮下脂肪組織および心外膜下脂肪組織より SC-DFAT と EC-DFAT を調製し、脂肪、骨、軟骨、平滑筋へ分化誘導実験を行った。その結果、SC-DFAT、EC-DFAT 共に脂肪、骨、軟骨、平滑筋への多分化能を有することが確認された。次に EC-DFAT および SC-DFAT における心筋、脂肪、軟骨初期分化マーカーの遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法で検討した。その結果、EC-DFAT は SC-DFAT に比べ、心筋初期分化マーカー GATA4 の発現が高く(図 1)、脂肪初期分化マーカー PPAR γ や軟骨初期分化マーカー SOX9 の発現は低いことが明らかとなった。次に PKH で蛍光標識した EC-DFAT、SC-DFAT をラット心筋細胞とともに 7 日間直接的共培養を行い、心筋特異的タンパク質の発現を免疫組織学的に検討した。心筋特異的転写因子 Nkx2.5 に対する免疫染色を行った結果、EC-DFAT の一部に核に一致して Nkx2.5 を発現している細胞が認められた。心筋のギャップ結合タンパク質コネキシン 43 に対する免疫染色を行った結果、EC-DFAT 間の細胞境界領域または、EC-DFAT とラット心筋細胞との細胞境界領域にコネキシン 43 が顆粒状に発現している所見が認められた。また心筋特異的収縮蛋白トロポニン I に対する免疫染色を行った結果、EC-DFAT の一部にトロポニン I 陽性の横紋構造を示す細胞が認められた(図 2)。また EC-DFAT で

は、共培養 3 日目頃より隣接するラット心筋細胞と同期して PKH 陽性の EC-DFAT が自律的に拍動する所見がしばしば観察された。一方、SC-DFAT では、Nkx2.5 発現細胞や、自律的拍動所見はまれにしか観察されなかった。

【考察】

本研究では新生児ラット心筋培養細胞との共培養を行うことで心筋分化の評価を行った。その結果、EC-DFAT では、心筋特異的転写因子 Nkx2.5 の発現やギャップ結合タンパク質であるコネキシン 43 の発現、トロポニン I を含むサルコメア構造を有し、自律的拍動が確認された。このように心外膜下脂肪に由来する DFAT が構造的、機能的に高い成熟度を示す心筋細胞へと分化する能力があることは、今回はじめて明らかになった所見である。DFAT は間葉系幹細胞に共通の多分化能を有しながら、採取部位近傍の間葉系由来組織に特異的な分化指向性を示すことが示唆された。このことは、目的とする臓器周囲の脂肪を DFAT に脱分化し、適切な誘導を与えることで、より効率的に必要な細胞を得るといった治療戦略が考えられる。重症心不全患者に対し EC-DFAT をどのように採取・調製するかは、今後の検討課題である。患者自身の開胸手術時に心外膜下脂肪組織を採取し、DFAT を調製する方法や、開胸手術を受ける第三者の心外膜下脂肪から DFAT を調製し、DFAT 細胞バンクを構築し他家移植するといった治療戦略が考えられる。現在、重症低心機能症例に対しては、侵襲的医療での加療や心臓移植が考慮されるが、いずれも経済的負担、厳しい適応基準と加療後の安全性が課題として存在する。EC-DFAT は、少量の脂肪組織

から安価に大量調製できるため、重症低心機能症例に対しても対応できる心筋再生医療用の細胞ソースとして期待できる可能性がある。

【まとめ】

本研究では、ブタの皮下脂肪組織および心外膜下脂肪組織から DFAT を調製し、新生児ラット心筋細胞と共培養することによって、DFAT の組織採取部位における分化指向性について検討した。EC-DFAT、SC-DFAT とともに、脂肪、骨、軟骨、平滑筋への多分化能をもつ DFAT が培養できた。これを用いて共培養による定量的評価、免疫蛍光染色による評価を行い、EC-DFAT は皮下組織由来 SC-DFAT に比し、心筋特異的遺伝子が有意に発現し、組織構造学的にも心筋分化能を有することが認められた。DFAT は、採取部位特異的に遺伝子が発現し、EC-DFAT は心筋再生の細胞資源として有用であることが示唆された。

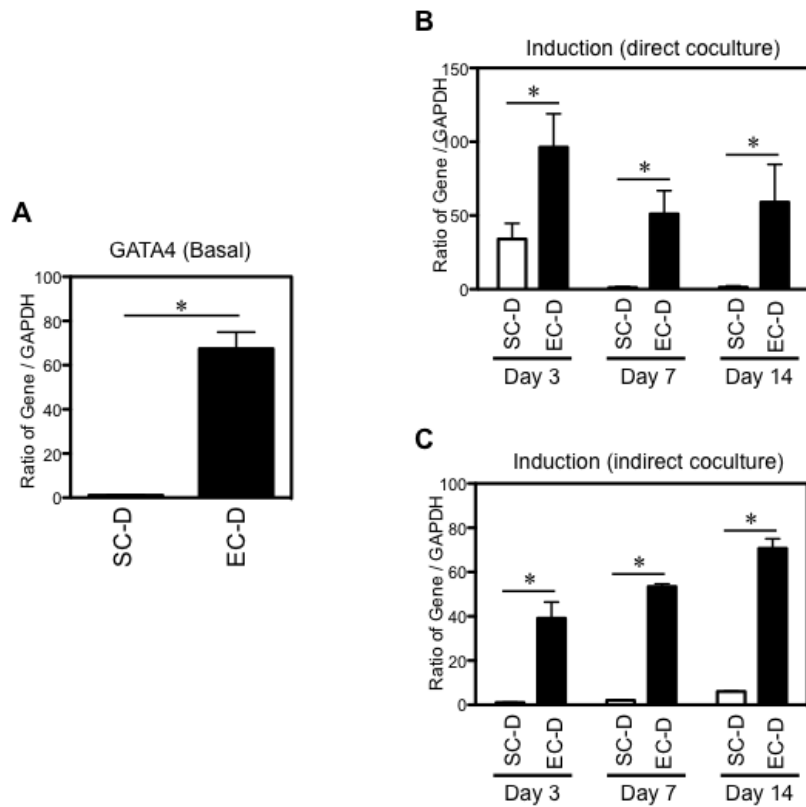


図 1. GATA4 遺伝子発現の比較 (リアルタイム RT-PCR 法)

SC-DFAT および EC-DFAT から Total RNA を抽出し、心筋初期分化マーカーGATA4 の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。A: 基礎発現の比較。B: ラット心筋細胞との直接的共培養による発現変化。C: ラット心筋細胞との間接的共培養による発現変化。GATA4 の遺伝子発現は、共培養開始前から、EC-DFAT で有意に高値を示し、直接的および間接的共培養後においても有意差は継続して認められた。(Bar : mean \pm SD, *:p<0.05)

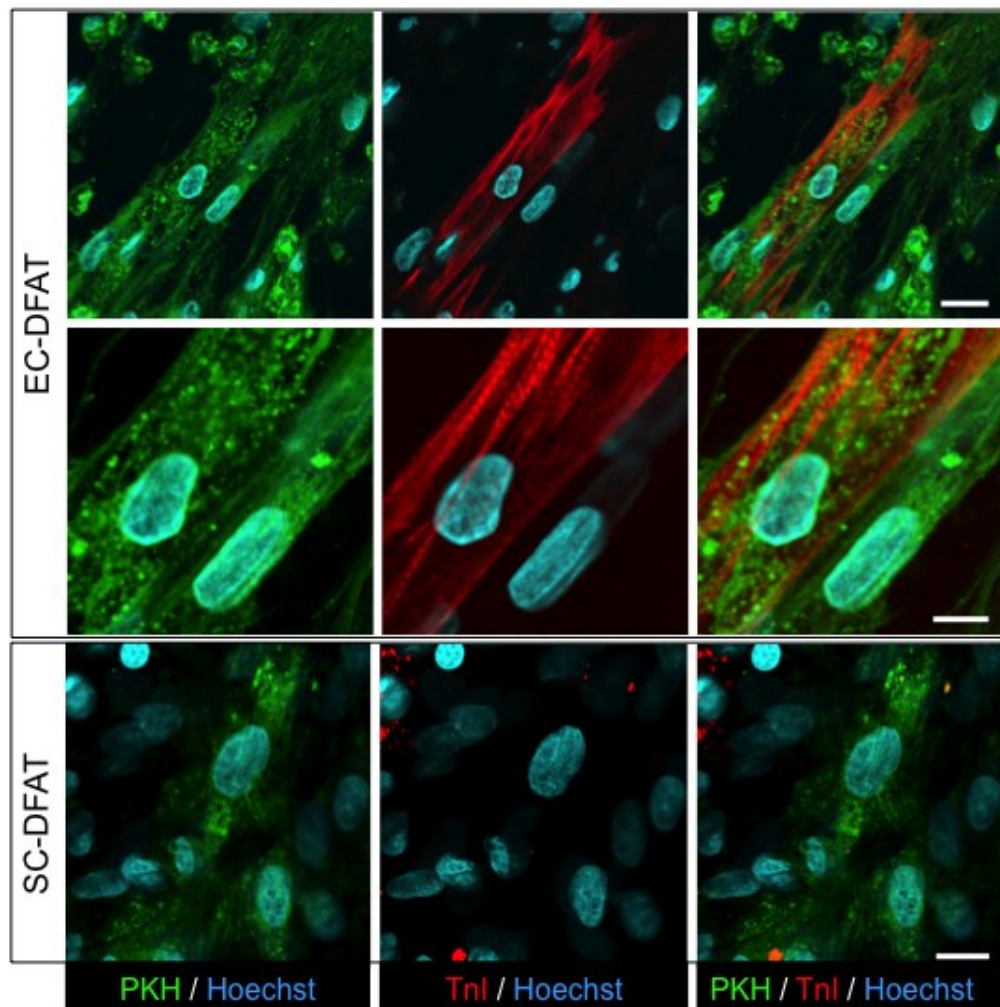


図2. ラット心筋細胞との共培養による EC-DFAT と SC-DFAT の心筋分化誘導

(トロポニン I の発現解析)

PKH で蛍光標識した EC-DFAT または SC-DFAT をラット心筋細胞とともに 7 日間直接的共培養を行い、心筋特異的タンパク質であるトロポニン I (TnI) に対する免疫染色を行った。核は Hoechst33342 で染色した。一部の EC-DFAT にトロポニン I 陽性のサルコメア構造が認められた。一方 SC-DFAT では大部分がトロポニン I 陰性であった。 Scale bar: 20 μm (上図)、5 μm (中、下図)。

【参考文献】

- 1) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J and Mugishima H: Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol*, 2008; 215:210-222
- 2) Jumabay M, Matsumoto T, Yokoyama S, Kano K, Kusumi Y, Masuko T, Mitsumata M, Saito S, Hirayama A, Mugishima H and Fukuda N: Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *J Mol Cell Cardiol*, 2009; 47:565-575
- 3) Sakuma T, Matsumoto T, Kano K, Fukuda N, Obinata D, Yamaguchi K, Yoshida T, Takahashi S and Mugishima H: Mature, adipocyte derived, dedifferentiated fat cells can differentiate into smooth muscle-like cells and contribute to bladder tissue regeneration. *J Urol*, 2009; 182:355-365