

論文の内容の要旨

氏名：鶴 町 仁 奈

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：頬脂肪体から調製した小成熟脂肪細胞由来の脱分化脂肪細胞は骨芽細胞分化能が高い

成熟脂肪細胞は、脂肪組織を構成する主要な細胞であり、終末分化し増殖能を失った細胞とされていた。松本らは、この成熟脂肪細胞から天井培養法によって非対称分裂にて生じた線維芽細胞様細胞が間葉系幹細胞に類似した性質を持つことを明らかにし脱分化脂肪細胞（以下、DFAT 細胞）と名付けた。DFAT 細胞は高い増殖能をもち、脂肪細胞だけでなく骨芽細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞、心筋細胞、神経細胞等への多分化能を有していることから組織工学や再生医療の細胞源として有用であると考えられている。また、この DFAT 細胞は同じく脂肪組織を構成する細胞中に存在する間葉系幹細胞（以下、ASC）に比較して骨芽細胞への分化能が高く、口腔領域の骨組織や歯周組織の再生に有用であることが報告されており、臨床的にも広く注目されている。

頬脂肪体は、被膜で包まれた限局性の脂肪塊であり、咬筋の前縁と頬筋の間の浅いくぼみに存在する。この頬脂肪体は局所麻酔と極小切開で口腔内から採取できる唯一の脂肪組織である。近年この頬脂肪体から DFAT 細胞が調製できることが報告され、頬脂肪体が歯科再生医療においてドナー細胞の採取部位として期待されている。

一般的に、成熟脂肪細胞の直径は 60-110 μm と報告されているが、近年 20 μm 以下の成熟脂肪細胞が増殖能を持つことが報告された。しかしながら、成熟脂肪細胞の大きさと DFAT 細胞への脱分化効率の関係性について調べた研究はほとんど見当たらない。そこで本研究では、ヒト頬脂肪体から採取した成熟脂肪細胞をその直径により 2 つのグループに分画し、それぞれの成熟脂肪細胞から脱分化した DFAT 細胞の細胞数と細胞特性について比較検討した。

本研究に使用した脂肪組織は、患者へのインフォームド Consent のもと、顎変形症の患者 5 名から顎骨移動手術時に過剰な脂肪組織として採取した頬脂肪体を用いた。ヒト頬脂肪体を細切後、0.1% のコラゲナーゼ溶液で 1 時間酵素処理を行い、濾過および遠心分離によって余分な細胞外基質成分を除去後、成熟脂肪細胞分画を調製した。酵素処理後に得られた成熟脂肪細胞分画 1 ml あたりに含まれる細胞の直径を測定し、20-39 μm 、40-59 μm 、60-79 μm 、80-99 μm 、100-130 μm の直径ごとの細胞数を比較した。その結果、頬脂肪体から調製した成熟脂肪細胞の直径 40 μm 未満の細胞分画が他の直径の細胞分画に比較して 5 倍以上の細胞数を示した。そこで、酵素処理後の成熟脂肪細胞を 40 μm および 100 μm のセルストレーナーを用いて直径 40 μm 未満の細胞分画（Small adipocytes; S-adipocytes）および直径 40-100 μm の細胞分画（Large adipocytes; L-adipocytes）の 2 種類に分けた。得られた 2 種類の細胞分画が共に成熟脂肪細胞であるかを確認するため、Nile Red および Hoechst を用いて蛍光染色を行った。S-および L-adipocytes 共に Nile Red および Hoechst 陽性を示し、成熟脂肪細胞から成る分画であることが確認された。次に、S-および L-adipocytes から DFAT 細胞が調製できるか検討を行うため、両細胞分画を 12.5 cm^2 のフラスコに 1.0×10^4 個ずつ播種し天井培養を行い、7 日後にフラスコを反転した。フラスコ反転時には S-および L-adipocytes から脱分化した線維芽細胞様の DFAT 細胞がフラスコ底面にコロニーを形成しているのを認めた。S-adipocytes から脱分化した DFAT 細胞を Small-DFAT (S-DFAT) 細胞、L-adipocytes から出現した DFAT 細胞を Large-DFAT (L-DFAT) 細胞とし、天井培養開始から 6、10、14、18 日目の DFAT 細胞数をそれぞれ測定した。その結果、天井培養開始 6、10、14 日目における S-DFAT 細胞数は L-DFAT 細胞数よりも有意に多かった。このことから、S-adipocytes は L-adipocytes に比較して早く DFAT 細胞へと脱分化することが示唆された。

次に、S-DFAT 細胞と L-DFAT 細胞の特性を比較検討した。細胞表面抗原発現解析の結果、間葉系幹細胞のマーカーである CD146 陽性細胞の割合は S-DFAT 細胞では L-DFAT 細胞に比較して約 1.5-2 倍多かった。遺伝子発現解析の結果、ES 細胞マーカーである c-MYC, KLF4, OCT3/4, SOX2, また骨

芽細胞, 脂肪細胞, 軟骨細胞の転写因子である RUNX2, PPAR γ 2, SOX9 の発現は両細胞間で同等であった。細胞増殖能, コロニー形成能および細胞周期についても両細胞間で有意な差は認めなかった。

多分化能については, *in vitro* における骨芽細胞への分化能をアルカリホスファターゼ (ALP) 活性, 石灰化 nodule のアリザリン赤染色および nodule 中のカルシウム定量にて評価した。脂肪細胞への分化能はオイルレッド O 染色で脂肪滴をもつ細胞数により評価した。骨芽細胞への分化誘導実験を行った結果, 分化誘導開始 3, 5 および 7 日目における ALP 活性は S-DFAT 細胞が L-DFAT 細胞に比較して有意に高く, さらに誘導開始 7 日目には S-DFAT 細胞の方が L-DFAT 細胞に比較してアリザリン赤染色に濃染した石灰化 nodule を顕著に認めた。また, 石灰化 nodule 中のカルシウム沈着量も誘導開始 7 日目および 21 日目において, S-DFAT 細胞では L-DFAT 細胞と比べて有意に高値を示した。一方, 脂肪細胞への分化誘導実験においては, S-および L-DFAT 細胞共に誘導開始 7 日目から約 5%の割合でオイルレッド O 陽性の脂肪滴を持つ細胞の出現を認め, 誘導開始 21 日目には約 65%の割合で細胞質内に脂肪滴を有した細胞へと分化した。しかし, 両細胞間のオイルレッド O 陽性細胞の割合に有意な差は認めなかった。

本研究の結論として, ヒト頬脂肪体から調製した成熟脂肪細胞には直径 40 μm 未満の大きさの S-adipocytes が多く, また S-adipocytes は L-adipocytes に比較して早期に DFAT 細胞へと脱分化することが明らかとなった。ヒト頬脂肪体から調製した直径 40 μm 未満の成熟脂肪細胞から脱分化した S-DFAT 細胞は, 直径 40-100 μm の成熟脂肪細胞から脱分化した L-DFAT 細胞に比較して骨芽細胞分化能が高く, 骨組織や歯周組織の再生に有用なことが示唆された。