

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

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻
鶴町 仁奈
(指導:清水典佳教授)

目 次

概 要 2
緒 言 7
材料および方法 10
成 績 18
考 察 22
結 論 27
謝 辞 29
文 献 30
基幹論文 48

Tsurumachi N, Akita D, Kano K, Matsumoto T, Toriumi T, Kazama T, Oki Y, Tamura Y, Tonogi M, Isokawa K, Shimizu N and Honda M, Journal of Tissue Engineering PartC: Methods, 2015 (in press)

概 要

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コンセントのもと、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 cm² のフラスコに 1.0×10⁴ 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。

なお、本論文は原著論文 Tsurumachi N, Akita D, Kano K, Matsumoto T, Toriumi T, Kazama T, Oki Y, Tamura Y, Tonogi M, Isokawa K, Shimizu N and Honda M, Small buccal fat pad cells have high osteogenic differentiation potential. *Journal of Tissue Engineering PartC: Methods*, 2015 (in press) を基幹論文とし、これに酵素処理濃度の検討に関する実験データを新たに加えることによって総括したものである。

緒 言

成熟脂肪細胞は脂肪組織中に最も豊富に存在する細胞である。脂肪組織から調製した成熟脂肪細胞は、脂肪細胞が本来もつ浮遊性という特性を生かした天井培養法によって未分化な細胞へと脱分化し、線維芽細胞様の形態をした脂肪滴を含まない細胞へと変化する^{1, 2)}。この脱分化脂肪細胞（以下、DFAT 細胞）は高い増殖能を有する他に³⁾、脂肪細胞^{3, 4)}、骨芽細胞^{3, 4)}、軟骨細胞³⁾、骨格筋細胞⁵⁾、平滑筋細胞^{6, 7)}、心筋細胞⁸⁾、血管内皮細胞^{9, 10)}および神経系の細胞¹¹⁾への多分化能を示し、間葉系幹細胞に類似した特性を持つことが知られている。

脂肪組織由来間葉系幹細胞（以下、ASC）は、間葉系幹細胞のひとつであるが、酵素処理後の脂肪組織から調製された間質血管細胞分画（Stromal Vascular Fraction 以下、SVF）から得られる。ASC に比較して、DFAT 細胞は高い幹細胞特性を有し、Kono ら¹²⁾は、ある一定量のネコの脂肪組織から得られる DFAT 細胞は ASC に比較して約 5 倍以上の細胞数であることを報告した。また、Matsumoto ら³⁾は ASC が 1 継代目において、単球マーカーの CD11b 陽性細胞が 13.3%、白血球共通抗原の CD45 陽性細胞が 12.8%であるのに対し、DFAT 細胞ではこれらの細胞表面マーカーの発現が見られなかったことを報告した。これ

は ASC と DFAT 細胞の調製方法の違いにあり，DFAT 細胞は脂肪組織を酵素処理後に，遠心分離によって遠沈管上部に浮遊した細胞から天井培養法により調製されるが，ASC は同じく遠心分離後に遠沈管底部に沈降した SVF 分画を付着培養することで調製する。この遠心分離によって採取された浮遊細胞は 98%以上成熟脂肪細胞であるため，DFAT 細胞は ASC に比較して異種細胞の混入がなく，より均一な集団であると報告された³⁾。

成熟脂肪細胞の直径は 60-110 μm と言われている¹³⁾が，近年天井培養法を用いた成熟脂肪細胞に関する研究で，20 μm 以下の小さい成熟脂肪細胞が増殖能を有することが報告された¹⁴⁾。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はまだ明らかとなっていない。

一方，口腔内には頬脂肪体とよばれる限局性の脂肪組織が存在する。解剖学的には咬筋と頬筋の間のくぼみに存在し，下顎枝と頬骨弓の間を上行し¹⁵⁾，機能的には咀嚼と吸引に間接的に関与している組織である。この頬脂肪体は歯科医師が行う口腔領域の小手術で採取可能であり，顎変形症手術時には過剰な脂肪組織としてしばしば切除される¹⁶⁾。近年，頬脂肪体から採取した ASC^{17, 18)} および DFAT 細胞¹⁹⁾が，骨組織と歯周組織再生に有用であることが報告され^{18, 20)}，頬脂肪体は組織再生のための移植細胞供給源として期待されている。

本研究では、頬脂肪体から成熟脂肪細胞を調製し、浮遊した成熟脂肪細胞を直径により 2 つのグループに分取した。その後、両細胞分画から脱分化した DFAT 細胞の細胞数と細胞特性および脱分化効率を比較検討した。

材料および方法

1. 細胞培養

本実験に使用した頬脂肪体は、日本大学歯学部歯科病院歯科口腔外科にて上顎 Le fort I 型骨切り術および下顎枝矢状分割術 (SSRO) を行った顎変形症 5 名の患者 (第 1 表) から採取した。なお、日本大学歯学部倫理委員会規定に基づき、患者には手術の際に採取した脂肪組織が本研究に用いられることを事前に説明し同意を得ている (倫許番号: 2008-8)。

採取した約 5-10 g の頬脂肪体を細切後、Matsumoto ら³⁾ の報告に従い、今まで広く用いられている 0.1% コラゲナーゼ溶液 (Sigma-Aldrich, pH 7.4) にて 37°C で 1 時間酵素処理を行った。酵素処理後、セルストレーナー (BD Falcon) を通し、700 rpm にて 1 分間遠心分離を行い、遠沈管上部に浮遊する成熟脂肪細胞を分画した。得られた成熟脂肪細胞を 20% Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich) と 1% Penicillin-streptomycin (Wako) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) で満たした 12.5 cm² フラスコに播種した。成熟脂肪細胞群は培地内にて反転させ 5% CO₂, 37°C の条件下で 7 日間の天井培養を行いフラスコの天井部分に接着させた (第 1 図)。7 日後にフラスコを再度反転し、培地交換を行った。その際

にフラスコ底面に出現した細胞を初代 DFAT 細胞とし、その後 4 日毎に培地交換を行い、80%コンフルエントまで培養した。その後、1% trypsin / EDTA 溶液で細胞をフラスコから剥がし、PBS (-) で洗浄後、継代培養を行った。なお、実験には 1 継代目のものを使用した。

2. 脂肪細胞の大きさの測定

頬脂肪体から調製した浮遊細胞分画中に含まれる細胞の大きさを測定するため、浮遊細胞 (1×10^4 個) を 1.0 ml の DMEM 培地に懸濁し、懸濁液中に含まれる細胞の直径を Coulter Counter Multisizer 3 (Beckman Coulter) を用いて測定した。

3. Nile Red 蛍光染色

調製した成熟脂肪細胞を、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 (Small adipocytes; S-adipocytes) と直径 40-100 μm (Large adipocytes; L-adipocytes) の 2 種類の大きさに分画した。両細胞が細胞質内に脂肪滴を持つ成熟脂肪細胞であることを確認するため、Nile Red (Lonza) で脂肪滴を、Hoechst33342 (Sigma-Aldrich) で核を染色した。それぞれ室温で 20 分蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡 (KEYENCE) によって鏡検した。さらに、浮遊細胞中の成熟脂肪細胞の割合を解析するため、フローサイト

メーター (BD FACS Aria) で蛍光標識された細胞の割合を調べた。データは Flow Jo software (Tree Star) で分析した。

4. DFAT 細胞へ脱分化した細胞数の経日的測定

成熟脂肪細胞の大きさが DFAT 細胞への脱分化効率に影響を与えるか検討するため、S-adipocytes および L-adipocytes をそれぞれ 1×10^4 個ずつフラスコに播種した。天井培養 6, 10, 14 および 21 日後に出現した DFAT 細胞 (Small-DFAT ; S-DFAT 細胞および Large-DFAT ; L-DFAT 細胞) 数を Countess™ automated cell counter (Invitrogen) を用いて測定した。

5. フローサイトメトリー解析

細胞の表現型を解析するために、DFAT 細胞を蛍光抗体法で標識し、フローサイトメーター (FACS Calibur) で標識された細胞の割合を調べた²¹⁻²³)。蛍光抗体は、骨髄系細胞のマーカーである PE-CD13, 白血球のマーカーである FITC-CD45, 間葉系の幹細胞のマーカーである FITC-CD44, PE-CD73, APC-CD90, APC-CD105, PE-CD146, PE-CD271, FITC-STRO1 を用いた。死細胞を分析から除外するために、細胞混濁液に Propidium Iodide (PI) を添加した。データは Flow Jo software で分析した。

6. RNA 抽出と RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)

S-DFAT 細胞および L-DFAT 細胞から TRI Reagent (Cosmo Bio) を用いて total RNA を抽出後, ReverTra Ace qPCR-RT Kit (Toyobo) を用いて mRNA から cDNA を合成した。PCR は Thermal cycler (Takara thermal cycler dice, Takara Bio Inc.) を使用し, アニーリングを 58°C (GAPDH, KLF4, OCT3/4, SOX2, RUNX2, PPAR γ 2, SOX9) または 62°C (c-MYC) で 30 秒, エクステンション反応を 72°C で 60 秒とし, 35 サイクル繰り返した。得られた PCR 産物は 2.0%アガロースゲル電気泳動によって可視化した。実験に使用したプライマーの種類と配列を第 2 表に示す。

7. Primer Array

合成した cDNA と SYBR Premix EX Taq II (Takara) を混合し, リアルタイム PCR 反応プレートに分注後, human primer set (Takara) からそれぞれのプライマーをプレートに添加した。その後遺伝子の増幅を C1000TM Thermal cycler (Bio Rad) で行った。primer set は間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells ; MSCs) および生殖細胞に関する遺伝子 88 個と 8 個のハウスキーパー遺伝子を含んでおり, データ解析は primer-array analysis tool version 2.0 (Takara) を用いて行った。

8. コロニー形成能

S-DFAT 細胞群と L-DFAT 細胞群をそれぞれ 6 well プレートに 100 個/well で播種し，増殖培地で 10 日間培養した。10%中性緩衝ホルマリン液で固定後，0.05%トルイジン青（Sigma-Aldrich）で染色し，コロニー数を位相差顕微鏡下によってカウントした。50 細胞以上の細胞凝集を 1 コロニーとした。

9. 細胞増殖能

細胞増殖能を比較するために，S-DFAT 細胞と L-DFAT 細胞をそれぞれ 6 well プレートに 1×10^3 個/well で播種し，増殖培地で培養を行った。播種後 3，5，7，10 および 14 日目に，各ウェルに 100 μ l の増殖培地と 10 μ l の Cell-Counting Kit-8 溶液（Dojindo）を添加し，5% CO₂，37°C の条件下で 1 時間呈色反応を行った。その後，マイクロプレートリーダー（680 microplate reader, Bio RAD）を用いて 450nm の吸光度を測定した²²⁾。

10. 細胞周期解析

S-DFAT 細胞と L-DFAT 細胞を 1×10^5 個ずつ 100 mm ディッシュに播種し，増殖培地で 3 日間培養後，Click-iT™ EdU Flow Cytometry Assay Kits（Molecular Probes）を用いて染色した^{22, 23)}。培養液中に 10 mM EdU（5-ethynyl-2'-deoxyuridine）を加えて 1 時間後に細胞を固定した。EdU で標識された細胞を Blue™ azide で 30 分間染色後，フローサイトメーター

(BD FACS Aria) にて EdU 染色された細胞と各分裂期 (S 期, G2+M 期, G1 期) に存在する細胞の割合を調べた。データは Flow Jo software で分析した。

11. 分化誘導実験

1) 骨芽細胞分化能

S-DFAT 細胞と L-DFAT 細胞をそれぞれ 12 well プレートに 1×10^4 個/well で播種し, 細胞が 80%コンフルエント時に増殖培地または骨芽細胞誘導培地に交換し 21 日間培養した。誘導培地には, 増殖培地に 100 nM デキサメタゾン, 10 mM β -グリセロリン酸 (Sigma Aldrich), 50 mM アスコルビン (Wako) が含まれたものを使用した。培地は 3 日毎に交換した。培養 3, 5, 7, 10 および 14 日目のタンパク質量をもとにアルカリホスファターゼ (以下, ALP) 活性値を測定した。タンパク質量の定量は BCA protein Assay Reagent Kit (Thermo Scientific) を用いた。検量線作成のための BSA 希釈系列と共に, 各培養日数の細胞抽出液を 96 穴プレートに 25 μ l ずつ分注した。各穴に, BCA protein Assay Reagent Kit の混合液を加え, 37°C で 30 分静置した。その後マイクロプレートリーダーにより 562nm の吸光度を測定した。ALP 活性値の測定では, 各細

胞抽出液中に含まれるタンパク質量が 10 μg になるように上清を採取し 96 穴プレートに分注した。次に、*p*-nitrophenyl phosphatase タブレットを Tris-buffer に溶解し、各穴に 200 μl ずつ追加した。その後、室温で 30 分、遮光下で静置し、405nm の吸光度を測定した。また、培養 0, 7, 14 および 21 日目の石灰化 nodule 形成をアリザリン赤染色で評価した。カルシウム沈着量の定量は培養 0, 7, 14 および 21 日後に上清を除去し、300 μl の 0.5/M HCl を添加して石灰化物を溶解させた後、Calcium E-Test kit (Wako) を用いて行った。

2) 脂肪細胞分化能

S-DFAT 細胞と L-DFAT 細胞をそれぞれ 12 well プレートに 1×10^4 個/well で播種し、細胞が 80%コンフルエント時に増殖培地または脂肪細胞誘導培地に交換し、21 日間培養した。誘導培地は、増殖培地に 1 mM デキサメタゾン、170 nM インスリン (GIBCO)、0.5 mM isobutylmethylxanthine (Sigma-Aldrich) が含まれたものを使用した。培地は 3 日毎に交換した。培養 0, 7, 14 および 21 日目にオイルレッド O 染色液で染色後、位相差顕微鏡下で脂肪滴の有無を観察した^{24, 25)}。また、全細胞中で 1 個以上の脂肪滴を持つ細胞の割合を測定した。

12. 酵素処理濃度条件の検討

脂肪組織から成熟脂肪細胞分画を調製する際の酵素処理条件を検討するため、種々のコラゲナーゼ濃度（0.01%、0.02%、0.05%、0.1%および0.5%）で酵素処理を行い、酵素処理後に得られた脂肪細胞の直径を測定した。

13. 統計解析

結果は平均値と標準偏差で示した。2群間の比較には、Student's *t* 検定を用いた。有意水準は $P < 0.05$ とした。

成 績

1. 脂肪細胞の大きさ

脂肪細胞の直径を測定し、直径 40 μm 未満, 40-59 μm , 60-79 μm , 80-99 μm , 100-130 μm ごとの細胞数を比較検討した (第 2 図)。今まで, Hong ら¹³⁾や Engfelt ら²⁶⁾の研究によると成熟脂肪細胞の直径は 60-79 μm と報告されているが, 本研究では直径 40 μm 未満の細胞数は直径 60-79 μm の細胞数に比較して 5 倍以上多かった。そこで, 大きさの異なる成熟脂肪細胞を直径 40 μm 未満の S-adipocytes および直径 40-100 μm の L-adipocytes の 2 つのグループに分画した。Nile Red を用いて蛍光染色を行うと, 両細胞共に単房性の脂肪滴を有する成熟脂肪細胞であることが確認できた (第 3 図 A および B)。フローサイトメトリーを用いて両細胞中の成熟脂肪細胞の割合を解析した結果, S-adipocytes についても 100%の細胞が Nile Red 陽性を示し, 成熟脂肪細胞であることが明らかとなった (第 3 図 C)。脂肪細胞の大きさと検体患者の年齢の相関についても検討を行った結果, 20 歳代, 30 歳代および 40 歳代で頬脂肪体に含まれる成熟脂肪細胞の大きさの分布はほぼ同等であった (第 3 表)。

2. DFAT 細胞の調製

本研究では 5 症例全ての頬脂肪体からそれぞれ得た S-adipocytes および L-adipocytes が DFAT 細胞へ脱分化することを示した。実際には、天井培養 3 日目までに、フラスコの天井面に浮遊した成熟脂肪細胞が接着した (第 4 図 A)。天井培養 5 日目には天井面に線維芽細胞様の形態をした S-および L-DFAT 細胞が出現した (第 4 図 B)。そして天井培養 7 日目にフラスコを反転するとコロニーを形成した DFAT 細胞が観察できた (第 4 図 C)。

3. DFAT 細胞への脱分化効率

天井培養開始 6 日目における S-および L-DFAT 細胞数はそれぞれ 5.0×10^4 個および 3.0×10^4 個であり、S-DFAT 細胞が L-DFAT 細胞に比較して有意に多かった。10 日目および 14 日目においても同様の傾向を示し、S-adipocytes から S-DFAT 細胞への脱分化効率は L-adipocytes から L-DFAT 細胞へのものよりも有意に高かった (第 5 図)。

4. S-DFAT 細胞と L-DFAT 細胞特性の比較解析

1) 表面抗原のフローサイトメトリー解析

細胞の表面抗原の発現を解析した (第 4 表)。MSCs に共通のマーカーである CD13, CD44, CD73, CD90 および CD105 は S-および L-DFAT

細胞共に 80%以上の細胞が陽性を示した。CD146 陽性細胞率は S-DFAT 細胞の方が L-DFAT 細胞に比較して高かった。

2) 遺伝子発現解析

RT-PCR の結果より, 両細胞共に未分化マーカーである c-MYC, KLF4, OCT3/4, RUNX2, PPAR γ 2 および SOX9 の遺伝子発現を認めたが, SOX2 の遺伝子発現は認めなかった (第 6 図)。

Primer Array の結果より, CCL2, LAMC1 および GATA6 の遺伝子発現は S-DFAT 細胞の方が L-DFAT 細胞に比較して高く, 一方で前駆脂肪細胞マーカーの DCN, 神経幹細胞マーカーの NES および wnt シグナル阻害タンパクの SFRP2 の遺伝子発現は S-DFAT 細胞が L-DFAT 細胞に比較して低かった (第 5 表)。

3) コロニー形成能, 細胞増殖能および細胞周期

S-および L-DFAT 細胞のコロニー形成能, 細胞増殖能 (第 7 図) および細胞周期 (第 6 表) に有意な差は認めなかった。

4) 骨芽細胞への分化能

骨芽細胞誘導培地を用いた実験から, 培養開始 3, 5, 7 および 14 日目における ALP 活性は S-DFAT 細胞の方が L-DFAT 細胞に比較して有

意に高い値を示した（第 8 図 A）。また培養 7 日目において，S-DFAT 細胞では L-DFAT 細胞と比較してアリザリン赤陽性の石灰化 *nodule* が顕著に観察され（第 8 図 B），石灰化 *nodule* 中のカルシウム沈着量も S-DFAT 細胞の方が有意に高値を示した（ $P < 0.05$ ）（第 8 図 C）。

5) 脂肪細胞への分化能

S-および L-DFAT 細胞を脂肪細胞誘導培地で培養したところ，両細胞共に培養開始 7 日目からオイルレッド O 陽性の脂肪滴を細胞質に有した細胞が観察できた。その後，脂肪滴を持つ細胞が培養 14 日，21 日と経日的に増加したが，S-DFAT 細胞と L-DFAT 細胞の間には有意な差は認められなかった（第 9 図 A および B）。

5. 酵素処理濃度と成熟脂肪細胞数の検討

各種コラゲナーゼ濃度（0.01%，0.02%，0.05%，0.1%および 0.5%）にて酵素処理後に調製した成熟脂肪細胞の直径とその細胞数を測定した（第 10 図）。その結果，0.02%で酵素処理後に調製された脂肪細胞分画には直径 60 μm 未満の成熟脂肪細胞が有意に多く存在し，特に直径 40 μm 未満の S-adipocytes は他の濃度に比較して約 5 倍以上の細胞数であった。

考 察

脂肪組織から酵素処理後に調製した成熟脂肪細胞を天井培養法によって培養を行うと、一度終末分化した脂肪細胞が再び間葉系幹細胞に類似した性質をもつ DFAT 細胞へと脱分化する³⁾。この DFAT 細胞は、再生医療における新たなドナー細胞として注目され、今まで様々な研究が行われている。成熟脂肪細胞の直径は一般的に 60-110 μm と報告されているが¹³⁾、近年 20 μm 未満の成熟脂肪細胞の存在も報告されている¹⁴⁾。しかし、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は不明な点が多い。本研究では、脂肪細胞の大きさに注目し、脂肪細胞を直径 40 μm 未満 (S-adipocytes) と、直径 40-100 μm (L-adipocytes) に分画し、両成熟脂肪細胞からそれぞれ脱分化した S-DFAT 細胞と L-DFAT 細胞の細胞数と細胞特性、さらに DFAT 細胞への脱分化効率について比較検討を行った²⁷⁾。

まず、遠心分離後に得られた浮遊細胞中に含まれる成熟脂肪細胞の割合を調べた結果、S-および L-adipocytes 共に 98%以上の浮遊細胞が Nile Red 染色に陽性を示す単房性の成熟脂肪細胞であることが示された^{28,29)}。次に、得られた成熟脂肪細胞の大きさの解析を行った結果、脂肪組織中に含まれる S-adipocytes の数は L-adipocytes に比較して有意に多かった。成熟脂肪細胞の大きさは、直

径 50-100 μm ²⁷⁾あるいは直径 96-120 μm ³⁰⁾であると報告されているが、これらは主に皮下脂肪から調製した成熟脂肪細胞の大きさを計測しており、また検体患者の年齢も 40 代³⁰⁾および 50 代²⁷⁾とされている。本研究では 20-40 代の患者の頬脂肪体から脂肪組織を採取しその脂肪細胞の大きさを測定した。その結果、患者の年齢に関わらず脂肪細胞の大きさの分布はほぼ同様の傾向を示した(第 3 表)。このことから成熟脂肪細胞の大きさの違いは患者の年齢および採取部位に関係している可能性が示唆された。今後、同一患者の頬脂肪体と皮下脂肪組織から採取した脂肪細胞の大きさの分布に関して比較検討する必要がある。

脂肪細胞の大きさと DFAT 細胞への脱分化効率を比較検討した結果、S-adipocytes は L-adipocytes に比較してより多くの細胞が DFAT 細胞へと脱分化したことが示された(第 5 図)。近年、Kajita ら¹⁴⁾により直径 20 μm 以下の小脂肪細胞が増殖能をもつことが報告されたが、今回の研究から成熟脂肪細胞の大きさが DFAT 細胞への脱分化に密接に関係していることが示唆された。

さらに、S-DFAT 細胞と L-DFAT 細胞のもつ細胞特性について比較検討を行った。コロニー形成能に関しては両者の間に有意な差はみられなかったが、CD146 陽性細胞の割合は S-DFAT 細胞の方が L-DFAT 細胞に比較して高い値を示した^{3,31)}。CD146 はヒト歯根膜から間葉系幹細胞を分取する際に最も一般的

に用いられる細胞表面マーカーであるが³²⁾、DFAT 細胞は CD146 は発現しないという報告もある³³⁾。一方で、Shen ら³⁴⁾は DFAT 細胞に CD146 が発現していることを報告しているが、初代培養時や天井培養 7 日目では発現が検出できないこともあり³⁵⁾、DFAT 細胞における CD146 の発現については現在も確立した見解は得られていない。本研究で、S-DFAT 細胞が L-DFAT 細胞よりも CD146 陽性細胞数が多いことが明らかになったが、おそらく DFAT 細胞の由来、培養条件、そして継代数が CD146 の発現にとって大きな影響をもたらすと考えられ、L-DFAT 細胞よりも S-DFAT 細胞の方が間葉系幹細胞の特性を強く保持していると推測できる。

遺伝子発現解析より、S-および L-DFAT 細胞共に c-MYC, KLF4, OCT3/4 発現を認め、SOX2 遺伝子発現は検出できなかった。ES 細胞としての表現型の維持はホメオドメインタンパク質である OCT3/4 や NANOG, SOX2 などの転写因子により調製されている³⁶⁾。しかしながら、乳歯歯髄由来間葉系幹細胞においても SOX2 の発現が検出できないことから²³⁾、間葉系幹細胞のマーカーとしての SOX2 の発現は必ずしも必須ではないようである。一方、本研究での Primer Array の結果から、S-DFAT 細胞と L-DFAT 細胞で異なる間葉系幹細胞のマーカーの発現が検出されるという興味ある結果が得られた (第 5 表)。おそらく

S-adipocytes と L-adipocytes の表現型の違いが、分化度の異なる DFAT 細胞を非対称分裂の結果として誘導したと考えられるが、この点を明らかにするために成熟脂肪細胞から DFAT 細胞への脱分化過程における詳しい分子メカニズムについて検討する必要がある。

分化能の比較解析より、S-DFAT 細胞は骨芽細胞および脂肪細胞分化能を有し、さらに S-DFAT 細胞は L-DFAT 細胞に比較して高い骨芽細胞分化能を有していることが示された。過去の研究において歯根膜細胞および骨髄細胞由来の MSCs はどちらも CD146 陽性細胞の発現が高く、CD146 陰性細胞に比較して、高い骨芽細胞分化能を示したことから、CD146 陽性細胞の発現が強いと骨芽細胞への分化能が高いことが考えられる^{37, 38)}。本研究においても、S-DFAT 細胞は L-DFAT 細胞に比較して CD146 陽性細胞の割合が高く、CD146 陽性細胞の発現と骨芽細胞分化能との相関が示された。また、頬脂肪体から調製した ASC と DFAT 細胞では、DFAT 細胞が ASC に比較して骨芽細胞分化能が高いことが示されたが¹⁹⁾、本研究では S-DFAT 細胞は L-DFAT 細胞に比較して高い骨芽細胞分化能を示した。これらの結果は、S-DFAT 細胞が L-DFAT 細胞や ASC に比較して骨組織の再生に有用な細胞であることを示している。

一方、今まで脂肪組織から DFAT 細胞を調製する際、Matsumoto ら³⁾の報告

に準じて 0.1%のコラゲナーゼ濃度が最も広く用いられていた。しかし，本研究において S-adipocytes を多く得られる至適酵素処理濃度の再検討を行った結果（第 10 図），0.02%が他の濃度に比較して直径 40 μm 未満の S-adipocytes を有意に多数分離できることを示した。よって，骨組織および歯周組織の再生を目的とした DFAT 細胞供給のためには，頬脂肪体組織を 0.02%で酵素処理することが有用と考えられた。

結 論

成熟脂肪細胞の大きさと DFAT 細胞への脱分化の関係性を明らかにするため、
頬脂肪体から調製した成熟脂肪細胞を直径 40 μm 未満 (S-adipocytes) と直径
40-100 μm (L-adipocytes) に分画し、それぞれの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した。

その結果、以下の結論を得た。

1. 頬脂肪体から調製した成熟脂肪細胞には S-adipocytes が高い割合で存在す
ることが明らかとなった。
2. S-および L-adipocytes から共に DFAT 細胞への脱分化を誘導できたが、脱分
化効率には S-adipocytes の方が L-adipocytes よりも高い傾向を示した。
3. S-DFAT 細胞は L-DFAT 細胞に比較して CD146 陽性細胞の割合が多く、高
い ALP 活性と石灰化物形成能を持った骨芽細胞へ分化することが明らかと
なった。
4. 0.02% のコラゲナーゼ濃度にて酵素処理を行うことで、効率良く
S-adipocytes を分離することができた。

以上のことから、頬脂肪体から分離した直径 40 μm 未満の成熟脂肪細胞から
脱分化した DFAT 細胞は骨芽細胞への分化能が高く、骨の再生に有用であるこ

とが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、格別なるご指導を賜りました日本大学歯学部歯科矯正学講座の清水典佳教授に心より感謝申し上げます。

本研究をご指導およびご校閲賜りました愛知学院大学歯学部口腔解剖学講座の本田雅規教授に謹んで深く感謝申し上げます。

また、本研究を通じ多大なるご協力と助言を賜りました本学部解剖学第Ⅱ講座の鳥海拓助教、本学部歯科補綴学第Ⅱ講座の秋田大輔助教を始め、歯科矯正学講座また解剖学第Ⅱ講座の皆様感謝いたします。

本研究は、平成 26 年度大学院歯学研究費(学生研究費)、平成 24, 25 年度科学研究費補助金基盤研究 (B) (研究代表者：本田雅規、課題番号 21390528)、平成 26, 27 年度科学研究費補助金基盤研究 (C) (研究代表者：清水典佳、課題番号 26463101) および平成 27 年度日本大学総合歯学研究所研究費(一般研究 A) (研究代表者：清水典佳)の助成により行われた。

文 献

1. Sugihara, H., Yonemitsu, N., Miyabara, S., and Toda, S., Proliferation of unilocular fat cells in the primary culture. *J Lipid Res* **28**, 1038-1045, 1987.
2. Sugihara, H., Yonemitsu, N., Miyabara, S., and Yun, K., Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation* **31**, 42-49, 1986.
3. 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* **215**, 210-222, 2008.
4. Akita, D., Morokuma, M., Saito, Y., Yamanaka, K., Akiyama, Y., Sato, M., Mashimo, T., Toriumi, T., Arai, Y., Kaneko, T., Tsukimura, N., Isokawa, K., Ishigami, T., and Honda, M. J., Periodontal tissue regeneration by transplantation of rat adipose-derived stromal cells in combination with PLGA-based solid scaffolds. *Biomed Res* **35**, 91-103, 2014.
5. Kazama, T., Fujie, M., Endo, T., and Kano, K., Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can transdifferentiate into skeletal myocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 780-785, 2008.
6. Obinata, D., Matsumoto, T., Ikado, Y., Sakuma, T., Kano, K., Fukuda, N., Yamaguchi, K., Mugishima, H., and Takahashi, S., Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells improves urethral sphincter contractility in a rat model. *Int J Urol* **18**, 827-834, 2011.
7. 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* **182**, 355-365, 2009.
8. 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* **47**, 565-575, 2009.
9. Planat-Benard, V., Silvestre, J. S., Cousin, B., Andre, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., Clergue, M., Manneville, C., Saillan-Barreau, C., Duriez, M.,

- Tedgui, A., Levy, B., Penicaud, L., and Casteilla, L., Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* **109**, 656-663, 2004.
10. Poloni, A., Maurizi, G., Anastasi, S., Mondini, E., Mattiucci, D., Discepoli, G., Tiberi, F., Mancini, S., Partelli, S., Maurizi, A., Cinti, S., Olivieri, A., and Leoni, P., Plasticity of human dedifferentiated adipocytes toward endothelial cells. *Exp Hematol* **43**, 137-146, 2015.
 11. Poloni, A., Maurizi, G., Leoni, P., Serrani, F., Mancini, S., Frontini, A., Zingaretti, M. C., Siquini, W., Sarzani, R., and Cinti, S., Human dedifferentiated adipocytes show similar properties to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **30**, 965-974, 2012.
 12. Kono, S., Kazama, T., Kano, K., Harada, K., Uechi, M., and Matsumoto, T., Phenotypic and functional properties of feline dedifferentiated fat cells and adipose-derived stem cells. *Vet J* **199**, 88-96, 2014.
 13. Hong, S. J., Park, E., Xu, W., Jia, S., Galiano, R. D., and Mustoe, T. A., Response of human mature adipocytes to hypoxia-reoxygenation. *Cytherapy* **16**, 1656-1665, 2014.
 14. Kajita, K., Mori, I., Hanamoto, T., Ikeda, T., Fujioka, K., Yamauchi, M., Okada, H., Usui, T., Takahashi, N., Kitada, Y., Taguchi, K., Kajita, T., Uno, Y., Morita, H., and Ishizuka, T., Pioglitazone enhances small-sized adipocyte proliferation in subcutaneous adipose tissue. *Endocr J* **59**, 1107-1114, 2012.
 15. Abad-Gallegos, M., Figueiredo, R., Rodriguez-Baeza, A., and Gay-Escoda, C., Use of Bichat's buccal fat pad for the sealing of orosinus communications. A presentation of 8 cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **16**, e215-219, 2011.
 16. Meyer, E., Liebenberg, S. J., and Fagan, J. J., Buccal fat pad - a simple, underutilised flap. *S Afr J Surg* **50**, 47-49, 2012.
 17. Farre-Guasch, E., Marti-Page, C., Hernandez-Alfaro, F., Klein-Nulend, J., and Casals, N., Buccal fat pad, an oral access source of human adipose stem cells with potential for osteochondral tissue engineering: an in vitro study. *Tissue Eng Part C Methods* **16**, 1083-1094, 2010.
 18. Shiraishi, T., Sumita, Y., Wakamastu, Y., Nagai, K., and Asahina, I., Formation of engineered bone with adipose stromal cells from buccal fat pad. *J Dent Res* **91**, 592-597, 2012.

19. Kishimoto, N., Momota, Y., Hashimoto, Y., Tatsumi, S., Ando, K., Omasa, T., and Kotani, J., The osteoblastic differentiation ability of human dedifferentiated fat cells is higher than that of adipose stem cells from the buccal fat pad. *Clin Oral Investig* **18**, 1893-1901, 2014.
20. Broccaioli, E., Niada, S., Rasperini, G., Ferreira, L. M., Arrigoni, E., Yenagi, V., and Brini, A. T., Mesenchymal stem cells from bichat's fat pad: In Vitro comparison with adipose-derived stem cells from subcutaneous tissue. *Biores Open Access* **2**, 107-117, 2013.
21. Saito, Y., Watanabe, E., Mayahara, K., Watanabe, N., Morokuma, M., Isokawa, K., Shimizu, N., and Honda, M. J., CD146/MCAM surface marker for identifying human periodontal ligament- derived mesenchymal stem cells. *Journal of Hard Tissue Biology* **22**, 115-128, 2013.
22. Sato, M., Toriumi, T., Watanabe, N., Watanabe, E., Akita, D., Mashimo, T., Akiyama, Y., Isokawa, K., Shirakawa, T., and Honda, M. J., Characterization of mesenchymal progenitor cells in crown and root pulp from human mesiodentes. *Oral Dis* **21**, e86-97, 2015.
23. Toriumi, T., Takayama, N., Murakami, M., Sato, M., Yuguchi, M., Yamazaki, Y., Eto, K., Otsu, M., Nakauchi, H., Shirakawa, T., Isokawa, K., and Honda, M. J., Characterization of mesenchymal progenitor cells in the crown and root pulp of primary teeth. *Biomed Res* **36**, 31-45, 2015.
24. Honda, M. J., Imaizumi, M., Tsuchiya, S., and Morsczeck, C., Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci* **52**, 541-552, 2010.
25. Mikami, Y., Ishii, Y., Watanabe, N., Shirakawa, T., Suzuki, S., Irie, S., Isokawa, K., and Honda, M. J., CD271/p75(NTR) inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. *Stem Cells Dev* **20**, 901-913, 2011.
26. Engfeldt, P., Arner, P., and Ostman, J., Influence of adipocyte isolation by collagenase on phosphodiesterase activity and lipolysis in man. *J Lipid Res* **21**, 443-448, 1980.
27. Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., and Hauner, H., Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 1023-1033, 2007.
28. Gao, Q., Zhao, L., Song, Z., and Yang, G., Expression pattern of embryonic

- stem cell markers in DFAT cells and ADSCs. *Mol Biol Rep* **39**, 5791-5804, 2012.
29. Jumabay, M., Zhang, R., Yao, Y., Goldhaber, J. I., and Bostrom, K. I., Spontaneously beating cardiomyocytes derived from white mature adipocytes. *Cardiovasc Res* **85**, 17-27, 2010.
 30. Petaja, E. M., Sevastianova, K., Hakkarainen, A., Orho-Melander, M., Lundbom, N., and Yki-Jarvinen, H., Adipocyte size is associated with NAFLD independent of obesity, fat distribution, and PNPLA3 genotype. *Obesity (Silver Spring)* **21**, 1174-1179, 2013.
 31. Kou, L., Lu, X. W., Wu, M. K., Wang, H., Zhang, Y. J., Sato, S., and Shen, J. F., The phenotype and tissue-specific nature of multipotent cells derived from human mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **444**, 543-548, 2014.
 32. Kemoun, P., Gronthos, S., Snead, M. L., Rue, J., Courtois, B., Vaysse, F., Salles, J. P., and Brunel, G., The role of cell surface markers and enamel matrix derivatives on human periodontal ligament mesenchymal progenitor responses in vitro. *Biomaterials* **32**, 7375-7388, 2011.
 33. Tallone, T., Realini, C., Bohmler, A., Kornfeld, C., Vassalli, G., Moccetti, T., Bardelli, S., and Soldati, G., Adult human adipose tissue contains several types of multipotent cells. *J Cardiovasc Transl Res* **4**, 200-210, 2011.
 34. Shen, J. F., Sugawara, A., Yamashita, J., Ogura, H., and Sato, S., Dedifferentiated fat cells: an alternative source of adult multipotent cells from the adipose tissues. *Int J Oral Sci* **3**, 117-124, 2011.
 35. Jumabay, M., Abdmaulen, R., Ly, A., Cubberly, M. R., Shahmirian, L. J., Heydarkhan-Hagvall, S., Dumesic, D. A., Yao, Y., and Bostrom, K. I., Pluripotent stem cells derived from mouse and human white mature adipocytes. *Stem Cells Transl Med* **3**, 161-171, 2014.
 36. Chambers, I. and Tomlinson, S. R., The transcriptional foundation of pluripotency. *Development* **136**, 2311-2322, 2009.
 37. Ulrich, C., Abruzzese, T., Maerz, J. K., Ruh, M., Amend, B., Benz, K., Rolauffs, B., Abele, H., Hart, M. L., and Aicher, W. K., Human placenta-derived CD146-positive mesenchymal stromal cells display a distinct osteogenic differentiation potential. *Stem Cells Dev* **24**, 1558-1569, 2015.
 38. Zhu, W., Tan, Y., Qiu, Q., Li, X., Huang, Z., Fu, Y., and Liang, M., Comparison

of the properties of human CD146+ and CD146- periodontal ligament cells in response to stimulation with tumour necrosis factor alpha. Arch Oral Biol **58**, 1791-1803, 2013.

第 1 表 被検者

Case	Age (y, m)	Sex	Surgery	Amount (g)
1	29, 9	F	Le fort I, SSRO	10.5
2	42, 1	M	Le fort I, SSRO	8.5
3	38, 5	M	Le fort I, SSRO	5.3
4	21, 11	M	Le fort I, SSRO	5.0
5	21, 3	F	Le fort I, SSRO	7.5

第 2 表 RT-PCR 法で用いたプライマーの種類と配列

Primers	Primer sequence	Size (bp)	Accession No.
c-MYC	F 5'-GCG TCC TGG GAA GGG AGA TCC GGA GC-3'	328	NM_002467
	R 5'-TTG AGG GGC ATC GTC GCG GGA GGC TG-3'		
KLF4	F 5'-ACG ATC GTG GCC CCG GAA AAG GAC C-3'	397	NM_004235
	R 5'-TGA TTG TAG TGC TTT CTG GCT GGG CTC C-3'		
OCT3/4	F 5'-GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG-3'	144	NM_002701
	R 5'-CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC-3'		
SOX2	F 5'-GGG AAA TGG GAG GGG TGC AAA AGA GG-3'	151	NM_003106
	R 5'-TTG CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG TG-3'		
PPAR γ 2	F 5'-TCA GGT TTG GGC GGA TGC-3'	147	NM_015863.4
	R 5'-TCA GCG GGA AGG ACT TTA TGT ATG-3'		
RUNX2	F 5'-CCC TGA ACT CTG CAC CAA GT-3'	128	NM_001015051.3
	R 5'-CGT CAT CTG GCT CAG GTA GG-3'		
SOX9	F 5'-AGC GAA CGC ACA TCA AGA C-3'	85	NM_00346.3
	R 5'-CTG TAG GCG ATC TGT TGG GG-3'		
GAPDH	F 5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3'	138	NM_002046.3
	R 5'-TGG TGA AGA CGC CAG TGG A-3'		

第3表 被検者年齢と各大きさの脂肪細胞の割合 (%)

Case	Age (y,m)	-39 μm	40-59 μm	60-79 μm	80-99 μm	100-130 μm
1	29,9	73	9	14	4	1
2	42,1	84	7	7	2	0
5	21,3	63	6	22	5	0
Average	31,4	73	8	14	4	1

第4表 表面抗原の陽性率 (%)

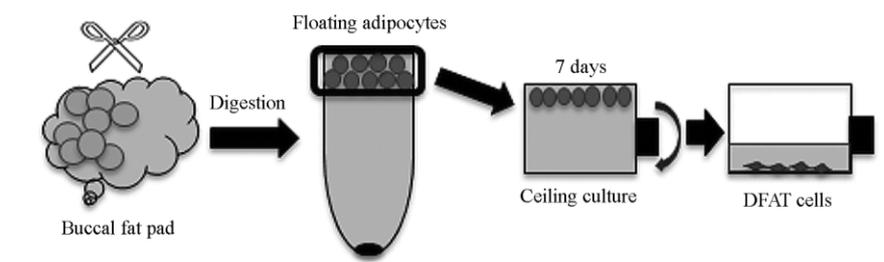
Case		CD13	CD44	CD45	CD73	CD90	CD105	CD146	CD271	STRO-1
3	S-DFAT (%)	98.9	95.1	0.24	93.9	82.0	98.4	15.5	0	0.05
	L-DFAT (%)	99.9	92.0	0.02	95.3	88.5	98.9	8.56	0.03	0.01
4	S-DFAT (%)	98.8	99.8	0.10	99.4	92.7	97.7	36.5	0.01	0.02
	L-DFAT (%)	98.5	99.0	0	97.5	93.8	96.2	27.0	0.01	0

第5表 Primer Array 解析

<i>Symbol</i>	<i>Name</i>	<i>Relative expression</i>	
		<i>L-DFAT</i>	<i>S-DFAT</i>
CCL2	<i>Homo sapiens</i> chemokine (c-Cmotif) ligand 2	1.00	1.65
LAMC1	<i>Homo sapiens</i> laminin, gamma1	1.00	1.73
GATA6	<i>Homo sapiens</i> GATA binding protein 6	1.00	2.00
DCN	<i>Homo sapiens</i> decorin, transcript variant A2	1.00	0.39
NES	<i>Homo sapiens</i> nestin	1.00	0.43
SFRP2	<i>Homo sapiens</i> secreted frizzled-related protein 2	1.00	0.42

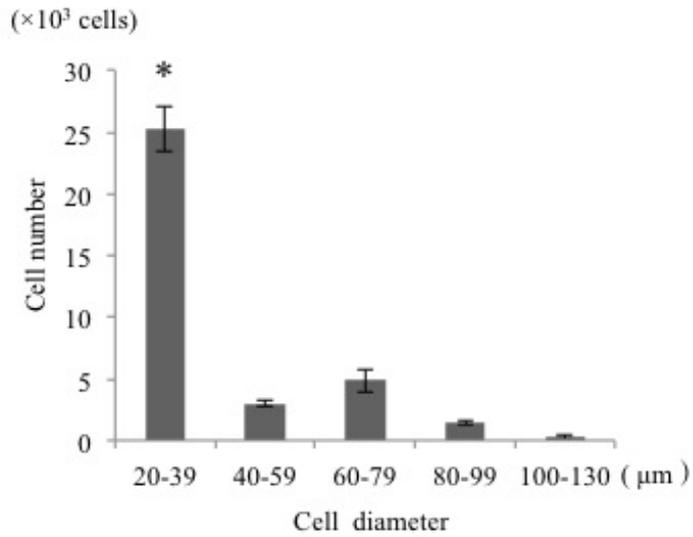
第 6 表 細胞周期

Case	S (%)		G2+M (%)		G1 (%)	
	S-DFAT	L-DFAT	S-DFAT	L-DFAT	S-DFAT	L-DFAT
1	6.84	6.42	7.45	7.21	79.7	79.3
2	3.53	3.05	13.2	12.6	79.4	79.3
3	1.06	1.02	4.32	4.41	91.2	92.5
4	1.16	1.35	3.52	5.25	91.4	89.1



第1図 天井培養

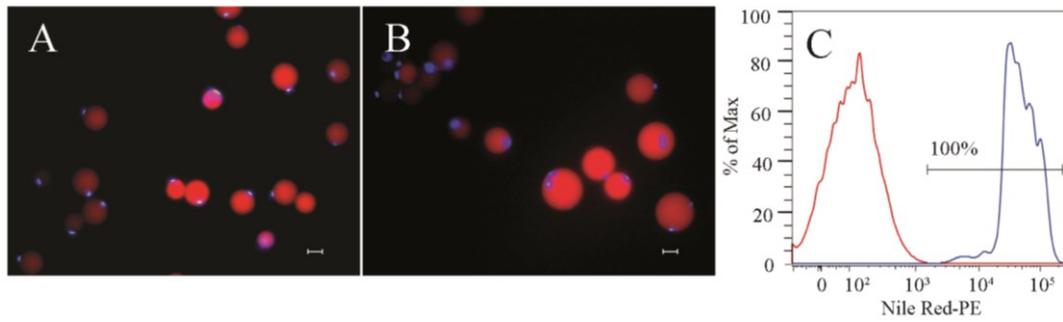
頬脂肪体を細切後、0.1%のコラゲナーゼ溶液で酵素処理を行い、遠心分離後に遠沈管上部に成熟脂肪細胞が浮遊した。成熟脂肪細胞分画を20%FBS添加のDMEM培地中に播種し、37°C および5% CO₂存在下で7日間天井培養を行った。7日後にフラスコを反転し、通法通り細胞培養を行った。



第2図 脂肪細胞の直径サイズの分布

コールターカウンターを用いて 1.0 ml の細胞懸濁液中の浮遊細胞の直径

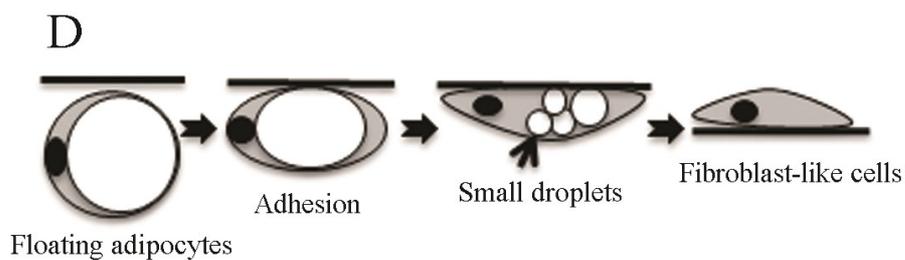
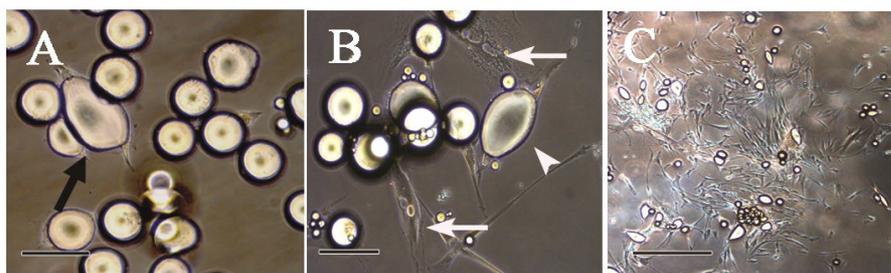
(20-130 μm) を測定した。40 μm 未満 (S-adipocytes) の細胞数が他の大きさに比較して有意に多かった (n = 3)。* $p < 0.05$



第3図 Nile Red 蛍光染色

A, B : Nile Red および Hoechst33342 (blue) を用いて S-adipocytes (A) および L-adipocytes (B) の免疫蛍光染色を行った結果、両細胞分画共に Nile Red 陽性を示す単房性の脂肪細胞であることが示された。スケールバー：40 μm

C : フローサイトメーター解析により、S-adipocytes は 100% の細胞が Nile Red 陽性を示す脂肪細胞であった。



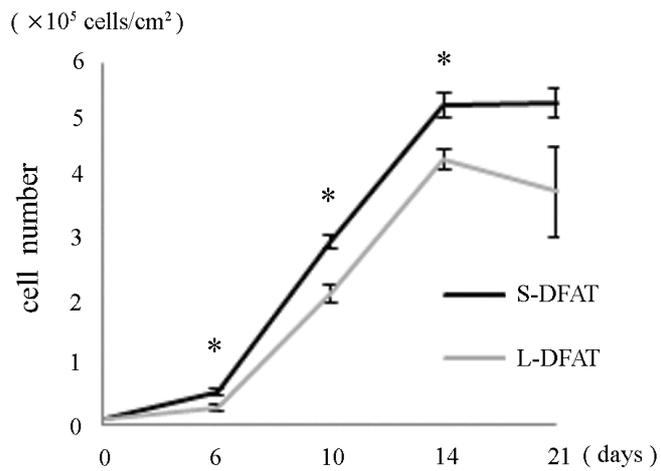
第4図 成熟脂肪細胞から DFAT 細胞への脱分化過程における細胞形態の変化

A：天井培養 3 日目，フラスコ天井面に接着した単胞性の脂肪細胞から細胞突起（黒矢印）が出現しているのが確認された。スケールバー：100 μm

B：天井培養 5 日目，線維芽細胞様の形態をした DFAT 細胞（白矢印）が出現したが，単胞性の脂肪細胞（白矢頭）も観察された。スケールバー：100 μm

C：天井培養 7 日目，DFAT 細胞がコロニーを形成しているのが確認された。スケールバー：500 μm

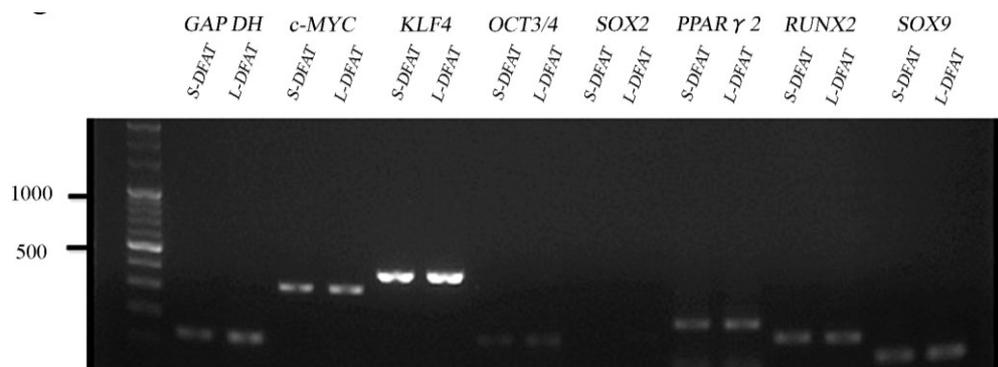
D：脱分化過程における脂肪細胞の形態変化を模式図に示す。



第 5 図 成熟脂肪細胞から出現した DFAT 細胞数の比較

S-および L-adipocytes をそれぞれ 1.0×10^4 個ずつフラスコに播種し, 培養開始 6, 10, 14 および 21 日目の DFAT 細胞数を測定し比較した。

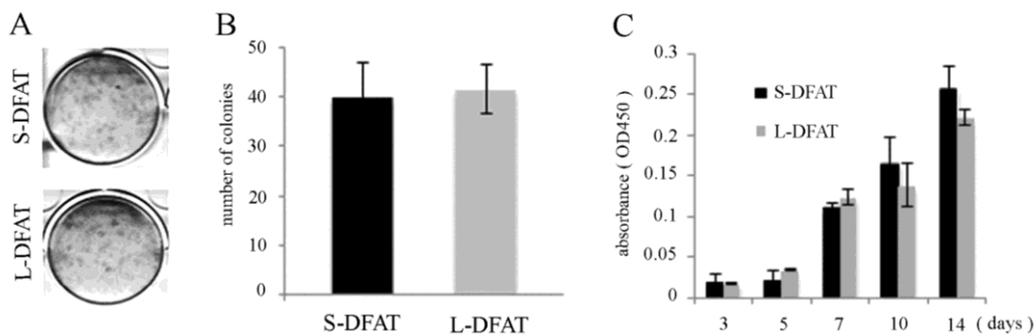
培養 6, 10, 14 日目において S-DFAT 細胞が L-DFAT 細胞に比較して有意に多かった ($n = 4$)。* $p < 0.05$



第 6 図 RT-PCR 解析

S-およびL-DFAT細胞共に幹細胞のマーカであるc-MYC, KLF4およびOCT3/4の遺伝子発現, また, 脂肪細胞, 骨芽細胞, 軟骨細胞の転写因子であるPPAR γ 2, RUNX2, SOX9の遺伝子発現を認めたが, SOX2の遺伝子発現は認めなかった(n = 4)。

代表例 1 例を示す。



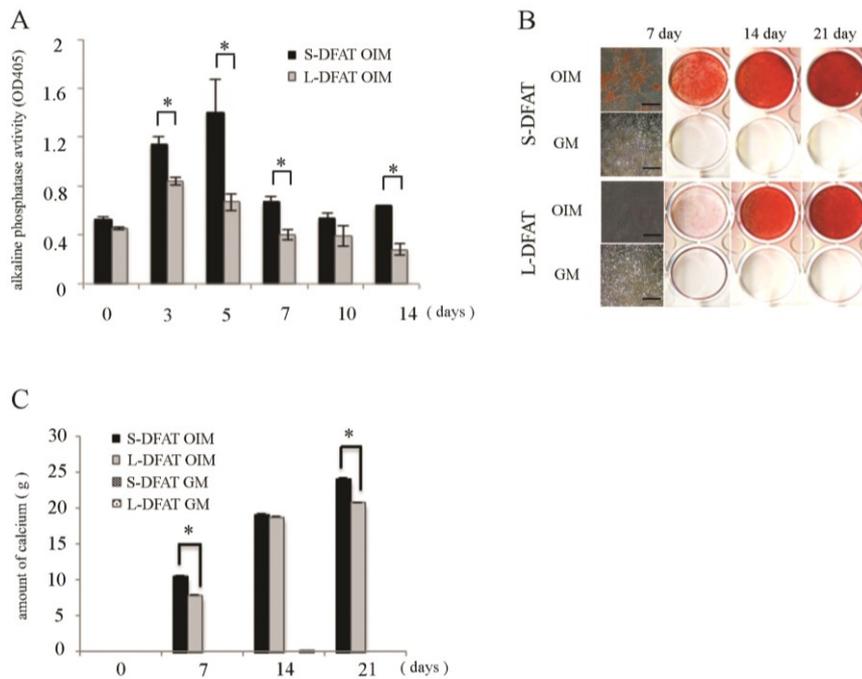
第 7 図 コロニー形成能および細胞増殖能

A : 細胞播種 10 日後, 10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し, トルイジン青染色によりコロニー染色を行った (n = 4)。代表例 1 例を示す。

B : コロニー数を位相差顕微鏡下にて計測し, 50 細胞以上の細胞凝集を 1 コロニーとした (n = 4)。

C : 細胞播種後の 3, 5, 7, 10 および 14 日目における細胞数を WST-8 kit を用いて測定し, 比較検討した (n = 4)。

両細胞群のコロニー形成能, 細胞増殖能に有意な差は認めなかった。



第 8 図 骨芽細胞分化能

A : ALP 活性

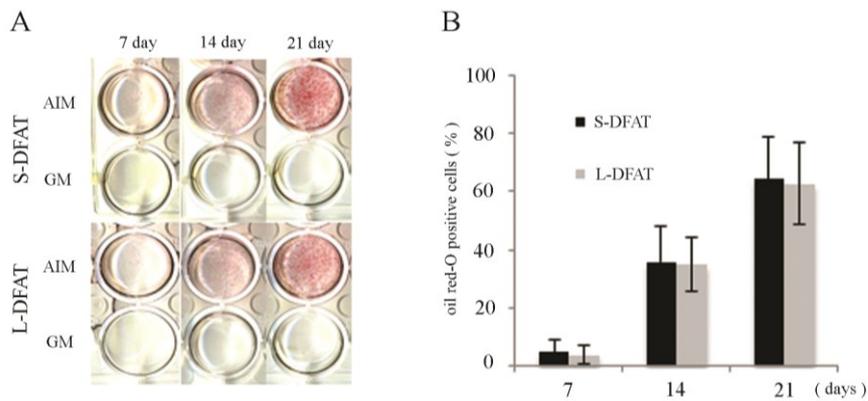
骨芽細胞誘導開始 3 日目から S-DFAT 細胞は L-DFAT 細胞に比較して有意に高い活性を示した (n = 5)。* $p < 0.05$

B : アリザリン赤染色

骨芽細胞誘導開始 7 日目に S-DFAT 細胞は L-DFAT 細胞に比較して顕著な石灰化 nodule が認められた (n = 5)。代表例 1 例を示す。

C : カルシウム定量試験

骨芽細胞誘導開始 7 および 21 日目のカルシウム沈着量は S-DFAT 細胞が L-DFAT 細胞に比較して有意に高値を示した (n = 5)。* $p < 0.05$



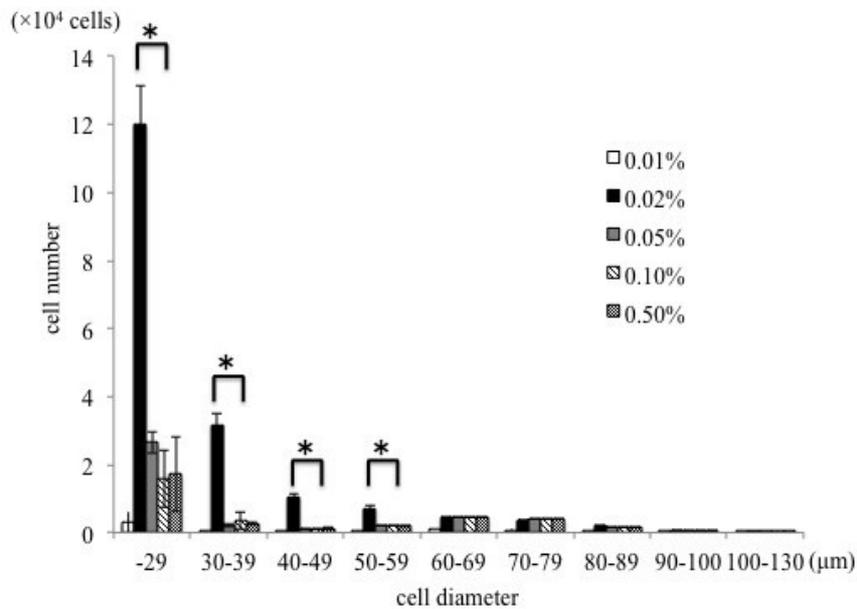
第9図 脂肪細胞分化能

A：オイルレッドO染色

S-DFAT細胞およびL-DFAT細胞は共に脂肪誘導開始7日目からオイルレッドO染色に陽性を示す細胞を認め、14日目および21日目と染色程度は同等であった。

B：脂肪滴を有する細胞数の比較

オイルレッドO染色陽性細胞の割合は、S-DFAT細胞では脂肪細胞誘導開始7日目に5.3%、21日目には65.0%であり、L-DFAT細胞では脂肪細胞誘導開始7日目に5.5%、21日目には63.0%と両細胞群間に有意な差は認めなかった。



第 10 図 酵素処理濃度と脂肪細胞の大きさおよび細胞数の分布

5 種類の酵素処理濃度（0.01%，0.02%，0.05%，0.1%，0.5%）により酵素処理後，得られた成熟脂肪細胞数および細胞の直径をコールターカウンターにて測定した。0.02%では他の濃度に比較して 60 μm 未満の細胞数が有意に多かった。特に，40 μm 未満の細胞数は，他の濃度に比較して約 5 倍以上の細胞数を獲得した。* $p < 0.05$ (0.02% vs 0.1%)

基幹論文

Tsurumachi Niina, Akita Daisuke, Kano Koichiro, Matsumoto Taro, Toriumi Taku, Kazama Tomohiko, Oki Yoshinao, Tamura Yoko, Tonogi Morio, Isokawa Keitaro, Shimizu Noriyoshi and Honda Masaki (2015)

Small buccal fat pad cells have high osteogenic differentiation potential. Tissue Engineering Part C: Methods, in press