

間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 由来成熟脂肪細胞を利用した
脱分化脂肪細胞株の樹立

(要 約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
病理系病態代謝学専攻

結城 百合子

修了年 2024 年

指導教員 榎島 誠

(主論文の要約)

概要

脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell : DFAT) は、生体脂肪組織由来から単離された成熟脂肪細胞を天井培養と呼ばれる方法で培養して脱分化させた細胞¹であり、間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell : MSC) 同様の細胞増殖活性があり²、脂肪細胞・骨細胞・軟骨細胞・筋細胞・神経細胞・血管内被細胞等多様な細胞への多分化能を有していると示されている。DFAT は患者自身の脂肪細胞から単離した細胞であるため拒絶反応等のリスクを回避でき、組織採取も比較的低侵襲かつ簡便に行えるため高い汎用性が期待できる等の利点があり、再生医療に有効な材料として臨床応用が期待されている。しかし DFAT の脱分化ならびに分化誘導の分子生物学的メカニズムについては未だ不明点も多い。DFAT の基礎研究にあたり、ヒト DFAT 作製には生体から脂肪組織を採取する必要があるため、マウスの脂肪細胞は脱分化効率が低いため十分な量の DFAT 獲得が困難であるという問題がある。

本研究では、マウス由来 MSC 株 C3H10T1/2 を利用した DFAT 基礎研究実験モデルの構築を目的とした。多分化能を有する MSC 株であり¹⁷⁻²²、近年再生工学の基礎研究に広く利用されている²³⁻²⁵ことから、C3H10T1/2 細胞の利用を検討した。まず C3H10T1/2 細胞を成熟脂肪細胞に分化させ (以下、C3H10T1/2 脂肪細胞と表記)、その C3H10T1/2 脂肪細胞の脱分化能を、次に脱分化させた細胞 (以下、DFAT 様細胞と表記) の分化誘導能を評価した。

主な実験方法

RIKEN CELL BANK より購入した C3H10T1/2 細胞を継代培養 (最大 20 代まで) し、実験に利用した。脂肪分化誘導培地にて分化誘導後、脂肪滴を多数認める成熟脂肪細胞 (C3H10T1/2 脂肪細胞) の形成を認めた。この細胞を従来の DFAT 作製手順と同様に、コラゲナーゼ処理により細胞培養ディッシュから剥離して、内部を培地で満量にした培養フラスコに移した後、天地逆転させた状態で天井培養を開始した。天井培養開始 2 日後にフラスコ上面への脂肪細胞の付着を認めた。その後、天地を戻して培養を継続したところ、経時的にフラスコ内の脂肪滴を有する細胞が減少し、一方で油滴を持たない紡錘形形態を呈する細胞が増殖したことを観察した。この DFAT と類似している線維芽細胞様の細胞 (DFAT 様細胞) を継代し、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への分化誘導能を評価した。

脂肪細胞への分化は、細胞内脂肪滴を Oil Red O 染色により観察することで評価した。また骨芽細胞へ分化誘導した細胞については、リン酸カルシウム沈着を Alizarin Red S 染色により観察することで評価した。さらに、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞へ分化誘導した細胞において、それぞれに特徴的な遺伝子マーカーの発現量を RT-qPCR 法により定量した。なお、分化誘導を行う際に、同時系列で親細胞株 C3H10T1/2 についても同様の実験を行い、天井培養して得られた DFAT 様細胞と比較した。また C3H10T1/2 脂肪細胞を 1 つずつ単離して作製したクローンについて、脂肪ならびに骨分化誘導を行い、他細胞混入等による影響を排除した条件下での分化誘導能について検討した。

実験結果

C3H10T1/2 細胞を脂肪分化誘導させた結果、開始 14 日目で類円形かつ脂肪滴を有する脂肪細胞の形成を認めた。また脂肪細胞に特有な遺伝子マーカー (*Pparg2*, *Adipoq*, *Fabp4*) 発現の経時的な増加を認めた。この C3H10T1/2 脂肪細胞を回収して天井培養を行った結果、培養開始 2 日目でフラスコ上面に細胞の付着を観察した。このとき小さな脂肪滴のみ有する細胞を認めたことから、すでに一部の細胞において脱分化が開始していると判断し、同時点で天地を戻して培地交換ならびに培養継続した。天井培養開始後 5 日目にはフラスコ内で脂肪滴を有さない線維芽細胞様形態を呈する DFAT 様細胞の出現を顕著に認め、7 日目では脂肪細胞より優勢になった。継代後も DFAT 様細胞は増殖を続けた。なお、天井培養で上面に付着した細胞の内、98.5%が Bodipy 陽性脂肪滴を有する細胞であった。

次に、C3H10T1/2 脂肪細胞の脱分化で作製した DFAT 様細胞について、脂肪細胞、骨芽細胞ならびに軟骨細胞への分化誘導実験をそれぞれの分化誘導培地を用いて行った。その結果、脂肪細胞分化誘導培地培養下では Oil Red O 染色陽性細胞が、骨芽細胞分化誘導培地培養下では Alizarin Red S 染色陽性細胞が出現し、脂肪細胞及び骨芽細胞にそれぞれに分化誘導することができた。また遺伝子解析の結果、脂肪細胞、骨芽細胞ならびに軟骨細胞にそれぞれ特有なマーカー遺伝子 (脂肪細胞：*Pparg2*, *Adipoq*, *Fabp4*, 骨芽細胞：*Osteocalcin (Ocn)*, *Ostrix (Osx)*, *Osteopontin (Opn)*、軟骨細胞：*Sox9*, *collagen 2a1 (Col2a1)*、*Aggrecan (Acan)*) の発現の上昇を認めた。それぞれの分化誘導における DFAT 様細胞の遺伝子発現パターンは C3H10T1/2 細胞親株のものとは若干異なっていたが、類似の傾向であった。

単一の C3H10T1/2 脂肪細胞から作製した DFAT 様細胞のクローンについて、脂肪ならびに骨分化誘導を行ったところ、それぞれに特徴的な遺伝子マーカーの発現上昇を認めた。ただし、それらの遺伝子発現パターンにおいて、それぞれのクローンによる差異を認めた。

考察

本研究において、C3H10T1/2 細胞を脂肪分化誘導培地にて分化させた C3H10T1/2 脂肪細胞を天井培養することによって DFAT 様細胞を作製できること、およびその DFAT 様細胞が脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞へ分化誘導できることが明らかになり、DFAT 実験モデルとして有用と考えられた。C3H10T1/2 脂肪細胞由来 DFAT 様細胞を脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞に分化誘導させた際に誘導される遺伝子の発現パターンは、C3H10T1/2 細胞親株のものとは若干の相違があったが類似していた。単一化した C3H10T1/2 脂肪細胞からも DFAT 様細胞のクローンを作製でき、脂肪ならびに骨分化誘導による分化誘導を認める結果を得た。得られた DFAT 様細胞は、脂肪細胞に分化した細胞が脱分化したものであり、未分化 C3H10T1/2 細胞の混入ではないことを示している。DFAT 様細胞のクローンによって分化の程度に差があった。親株サブクロンのゲノムやエピゲノムなどの相違や脱分化過程での修飾の影響が考えられる。これらのクローンは、脱分化および分化誘導の分子メカニズムの解明に応用できると考えられる。

今後は、DFAT 様細胞及び分化した細胞の細胞表面マーカーの解析、今回行った 3 系統以外の細胞への分化能についての解析を検討している。遺伝子工学的に C3H10T1/2 細胞の遺伝子を改変させることにより、脱分化及び分化誘導の詳細な分子メカニズムの解明が可能となる。

まとめ

マウス間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 を脂肪分化誘導培地にて成熟脂肪細胞に分化させ、その細胞を天井培養することで、DFAT 様細胞を作製した。作製した DFAT 様細胞は、生体脂肪細胞由来の DFAT と同様に継代培養することができ、脂肪・骨芽・軟骨細胞への分化誘導が可能であった。C3H10T1/2 細胞を用いた DFAT 実験系は、DFAT の基礎研究に有用であり、脱分化及び分化誘導の分子メカニズムについての研究発展へ繋がることを期待できる。

(参考文献)

1. Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, Kano K. A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, 321, 967-974.
2. Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol.* 2008, 215, 210-222.
3. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011, 20, 5-14.
4. Watanabe H, Goto S, Kato R, Komiyama S, Nagaoka Y, Kazama T, Yamamoto C, Li Y, Konuma N, Hagikura K, Matsumoto T. The neovascularization effect of dedifferentiated fat cells. *Sci Rep.* 2020, 9211.
5. Fujisaki S, Kajiya H, Yanagi T, Maeshiba M, Kakura K, Kido H, Ohno J. Enhancement of jaw bone regeneration via ERK1/2 activation using dedifferentiated fat cells. *Cytotherapy.* 2021, 23, 608-616.
6. Kazama T, Fujie M, Endo T, Kano K. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can transdifferentiate into skeletal myocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008, 377, 780-785.
7. Jumabay M, Abdmaulen R, Urs S, Heydarkhan-Hagvall S, Chazenbalk GD, Jordan MC, Roos KP, Yao Y, Boström KI. Endothelial differentiation in multipotent cells derived from mouse and human white mature adipocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2012, 53, 790-800.
8. Utsunomiya K, Maruyama T, Shimizu S, Matsumoto T, Endo M, Kobayashi H, Kano K, Abe M, Fukuda N. Implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated antineutrophil cytoplasmic antibody glomerulonephritis by immunosuppression and increases in tumor necrosis factor-stimulated gene-6. *Stem Cell Res Ther.* 2022, 13,319.
9. Maruyama T, Fukuda N, Matsumoto T, Kano K, Endo M, Kazama M, Kazama T, Ikeda J, Matsuda H, Ueno T, Abe M, Okada K, Soma M, Matsumoto K, Kawachi H. Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated monoclonal antibody 1-22-3-induced glomerulonephritis by immunosuppression with increases in TNF-stimulated gene 6. *Stem Cell Res Ther.* 2015, 6, 80.
10. Ishioka S, Hosokawa T, Ikeda T, Konuma N, Kaneda H, Ohashi K, Furuya T, Masuko T, Taniguchi H, Kano K, Koshinaga T, Matsumoto T. Therapeutic potential of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells for inflammatory bowel disease. *Pediatr Surg Int.* 2020, 36, 799-807.

11. Kakudo T, Kishimoto N, Matsuyama T, Momota Y. Functional recovery by application of human dedifferentiated fat cells on cerebral infarction mice model. *Cytotechnology*. 2018, 70, 949-959.
12. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006, 126, 663-676.
13. Kaufmann KB, Büning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med*. 2013, 5, 1642-1661.
14. Shirakawa T, Suzuki I. Approach to Neurotoxicity using Human iPSC Neurons: Consortium for Safety Assessment using Human iPS Cells. *Curr Pharm Biotechnol*. 2020, 21, 780-786.
15. Okita K. iPS cells for transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011, 16, 96-100.
16. Reznikoff, K. A., Brankow, D. W. & Heidelberger, C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res*. 1973, 33, 3231-3238.
17. Zehentner BK, Leser U, Burtscher H. BMP-2 and sonic hedgehog have contrary effects on adipocyte-like differentiation of C3H10T1/2 cells. *DNA Cell Biol*. 2000, 19, 275-281.
18. Denker AE, Haas AR, Nicoll SB, Tuan RS. Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. *Differentiation*. 1999, 64, 67-76.
19. Mie M, Ohgushi H, Yanagida Y, Haruyama T, Kobatake E, Aizawa M. Osteogenesis coordinated in C3H10T1/2 cells by adipogenesis-dependent BMP-2 expression system. *Tissue Eng*. 2000, 6, 9-18
20. Yutzey KE, Rhodes SJ, Konieczny SF. Differential trans activation associated with the muscle regulatory factors MyoD1, myogenin, and MRF4. *Mol Cell Biol*. 1990, 10, 3934-3944.
21. Zhu D, Kang Q, Huang PY, He TC, Xie P. Neurogenesis-related genes expression profiling of mouse fibroblastic stem cells induced by Wnt signaling. *Neurol Res*. 2009, 31, 200-203.
22. Wang H, Li M, Lin PH, Yao Q, Chen C. Fluid shear stress regulates the expression of TGF-beta1 and its signaling molecules in mouse embryo mesenchymal progenitor cells. *J Surg Res*. 2008, 150, 266-270.
23. Kumlin M, Lindberg K, Haldosen LA, Felländer-Tsai L, Li Y. Growth Differentiation Factor 7 promotes multiple-lineage differentiation in tenogenic cultures of mesenchymal stem cells. *Injury*. 2022, 53, 4165-4168.

24. Wang M, Li H, Yang Y, Yuan K, Zhou F, Liu H, Zhou Q, Yang S, Tang T. A 3D-bioprinted scaffold with doxycycline-controlled BMP2-expressing cells for inducing bone regeneration and inhibiting bacterial infection. *Bioact Mater.* 2020, 6, 1318-1329.
25. Kremen TJ, Bez M, Sheyn D, Ben-David S, Da X, Tawackoli W, Wagner S, Gazit D, Pelled G. In Vivo Imaging of Exogenous Progenitor Cells in Tendon Regeneration via Superparamagnetic Iron Oxide Particles. *Am J Sports Med.* 2019, 47, 2737-2744.
26. Ong WK, Chakraborty S, Sugii S. Adipose Tissue: Understanding the Heterogeneity of Stem Cells for Regenerative Medicine. *Biomolecules.* 2021, 11, 918.
27. Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, Krampera M, Leblanc K, Martin I, Nolta J, Phinney DG, Sensebe L. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature Cytotherapy, 2019, 21, 1019-1024.
28. Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Yagi K, Okazaki Y, Inoue S. Estrogen-related receptor alpha modulates the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007, 358, 813-818.
29. Shimazaki T, Noro N, Hagikura K, Matsumoto T, Yoshida-Noro C. Quantitative Analysis of Factors Regulating Angiogenesis for Stem Cell Therapy. *Biology.* 2021, ,10, 1212.
30. Nobusue H, Endo T, Kano K. Establishment of a preadipocyte cell line derived from mature adipocytes of GFP transgenic mice and formation of adipose tissue. *Cell Tissue Res.* 2008, 332, 435-446.
31. Takabatake, K, Matsubara, M, Yamachika, E, Fujita, Y, Arimura, Y, Nakatsuji, K, Nakano, K, Nagatsuka, H, Iida, S. Comparing the Osteogenic Potential and Bone Regeneration Capacities of Dedifferentiated Fat Cells and Adipose-Derived Stem Cells In Vitro and In Vivo: Application of DFAT Cells Isolated by a Mesh Method. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 12392.
32. Wang QA, Song A, Chen W, Schwalie PC, Zhang F, Vishvanath L, Jiang L, Ye R, Shao M, Tao C, Gupta RK, Deplancke B, Scherer PE. Reversible Dedifferentiation of Mature White Adipocytes into Preadipocyte-like Precursors during Lactation. *Cell Metab.* 2018, 28, 282-288.
33. Zhang Z, Shao M, Hepler C, Zi Z, Zhao S, An YA, Zhu Y, Ghaben AL, Wang MY, Li N, Onodera T, Joffin N, Crewe C, Zhu Q, Vishvanath L, Kumar A, Xing C, Wang QA, Gautron L, Deng Y, Gordillo R, Kruglikov I, Kusminski CM, Gupta RK, Scherer PE. Dermal adipose tissue has high plasticity and undergoes reversible dedifferentiation in mice. *J Clin Invest.* 2019, 129, 5327-5342.

34. Sun L, Zhang X, Wu S, Liu Y, Guerrero-Juarez CF, Liu W, Huang J, Yao Q, Yin M, Li J, Ramos R, Liao Y, Wu R, Xia T, Zhang X, Yang Y, Li F, Heng S, Zhang W, Yang M, Tzeng CM, Ji C, Plikus MV, Gallo RL, Zhang LJ. Dynamic interplay between IL-1 and WNT pathways in regulating dermal adipocyte lineage cells during skin development and wound regeneration. *Cell Rep.* 2023, 42, 112647
35. Yao L, Jeong S, Kwon HR, Olson LE. Regulation of adipocyte dedifferentiation at the skin wound edge. bioRxiv. 2023, (reprint).