

# 吸引脂肪組織を利用した脱分化脂肪細胞の調製法と機能解析

Preparation method and functional analysis of dedifferentiated fat cell using  
liposuctioned fat tissue

風間智彦<sup>1)</sup>, 山元智衣<sup>1)</sup>, 長岡悠紀<sup>1)</sup>, 萩倉一博<sup>1)</sup>, 加野浩一郎<sup>2)</sup>, 相川佳之<sup>3)</sup>, 松本太郎<sup>1)</sup>  
Tomohiko KAZAMA<sup>1)</sup>, Chii YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Yuki NAGAOKA<sup>1)</sup>,  
Kazuhiro HAGIKURA<sup>1)</sup>, Koichiro KANO<sup>2)</sup>, Yoshiyuki AIKAWA<sup>3)</sup>,  
Taro MATSUMOTO<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野, <sup>2)</sup>日本大学生物資源科学部応用生物科学科, <sup>3)</sup>湘南美容クリニック

## 【要旨】

我々は成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞(DFAT)が間葉系幹細胞(MSC)に類似した多能性を示すことを報告してきた。今回、ヒト吸引脂肪サンプルを用いて DFAT を調製し、調製に必要な至適組織量、細胞純度、造腫瘍性の有無などについて検討を行った。2ml の吸引脂肪組織から平均 $2 \times 10^6$ 個の成熟脂肪細胞が単離され、少量の吸引脂肪組織量で大量に成熟脂肪細胞を得られることを示した。調製された DFAT の FACS 解析では、P0~P3まで MSC 陽性マーカーの陽性率は90%以上であった。また、陰性マーカーの陽性率は0.1%未満であり、同一サンプルから調製した脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)に比べて低い傾向を示した。多分化能解析にて、調製された DFAT は、脂肪、骨、軟骨への多分化能を示すことを明らかにした。また軟寒天コロニー形成試験や NOG マウス造腫瘍試験を行った結果、DFAT は造腫瘍性を認めなかった。以上の結果より、吸引脂肪組織から高純度の多分化能を有する DFAT を大量調製できることが明らかにした。また、調製された DFAT は造腫瘍性を示さなかったことから、DFAT は低侵襲性で安全性が高い細胞治療を可能とする細胞源として期待できる。

## 【背景および目的】

我々は、成熟脂肪細胞を天井培養することにより得られる DFAT が、高い増殖能と MSC と類似する多分化能を示すことをこれまで明らかにしてきた<sup>1),2)</sup>。通常、成熟脂肪細胞の由来となる皮下脂肪組織は、結合組織や神経、血管を豊富に含んだ状態の組織である。そのため、皮下脂肪組織をハサミで細切し酵素処理にて消化し、成熟脂肪細胞を単離する。単離した成熟脂肪細胞を、培地で満たしたフラスコで培養するとフラスコ天井面に集まり、ここで徐々に接着性を獲得していき、培養約1週間後で DFAT のコロニーが得られる。我々は、成熟脂肪細胞のより簡便な単離方法を模索し、痩身法などで行なわれる脂肪吸引にて採取される吸引脂肪組織に着目し、吸引脂肪組織を DFAT の細胞源として用いることが可能か検討した。脂肪吸引による脂肪組織採取の利点は、採取に伴う皮膚切開が3~4 mm 径と小さく、低侵襲な手術で採取可能である。また、吸引前にチュメセント液を脂肪組織へ注入することで、組織が膨潤し、成熟脂肪細胞の単離が容易になることである。

これまで我々は、吸引脂肪組織より単離した成熟脂肪細胞と臨床グレードである調製試薬を用いて DFAT が調製可能であることを明らかにしてきた。本研究の目的として、臨床応用可能なヒト吸引脂肪組織を用いた DFAT 調製方法を確立化し、吸引脂肪組織の必要最小量、細胞特性

解析、造腫瘍性の有無などについて検討を行なった。

### 【方法】

湘南美容クリニックにてインフォームドコンセントの得られた患者より吸引脂肪組織の提供を受け、DFAT 調製に用いた。天井培養過程で単離された成熟脂肪細胞層 5  $\mu$ l 中の成熟脂肪細胞数を計測した。同一ヒト吸引脂肪組織より調整した DFAT ならびに ASC の P0~P3 を対象に、MSC 陽性マーカー(CD73, CD90, CD105)ならびに陰性マーカー(CD31, CD45, HLA-DR)の陽性率をフローサイトメトリーにて計測した。また、各種分化誘導培地にて脂肪細胞、骨細胞そして軟骨細胞への分化誘導を行ない、多分化能解析を行なった。DFAT の足場非依存性増殖能をみるため、軟寒天コロニー形成試験を実施した。DFAT を含めた各種細胞と 0.2%アガー含有専用培地をそれぞれ混合し、96 穴マイクロプレートに播種し、14 日間培養後、コロニー数を計測した。NOG マウス皮下移植による造腫瘍性試験では、DFAT と陰性対照である ASC を、オスの NOG マウスの右側腹部皮下に1頭当たり  $1 \times 10^7$  個移植した。評価項目は、①体重測定②皮下腫瘍の有無③ヘマトキシリン・エオジン染色により腫瘍性変化の有無を、ビメンチン染色によりヒト由来細胞の有無を評価した。

### 【結果】

吸引脂肪組織はコラゲナーゼ溶液による酵素処理のみにて組織消化が可能であり、容易に成熟脂肪細胞の単離が可能であった。単離された成熟脂肪細胞を用いて天井培養すると、培養4日後に成熟脂肪細胞はフラスコ天井面に接着し、培養 10 日後には成熟脂肪細胞より非対称性に分裂した DFAT がコロニーを形成した(図1)。成熟脂肪細胞層 5  $\mu$ l 中の細胞直径 15  $\mu$ m 以上の成熟脂肪細胞数を計測した結果、約 5,000 個存在した。次に、細胞表面抗原の解析結果は、DFAT ならびに ASC の MSC 陽性マーカーの陽性率は 90%以上であった。また、DFAT の MSC 陰性マーカーの陽性率は 0.1%以下であったが、ASC では初代培養にて陰性マーカーの陽性率が DFAT に比べて高い傾向にあった。多分化能解析において、脂肪細胞ならびに骨細胞への分化誘導 3 週間後にオイルレッドO染色陽性、アルカリフォスファターゼ染色陽性かつアルザリンレッドS染色陽性細胞を認め、ペレット培養 3 週間後において軟骨ペレット細胞塊を形成すること明らかにし、多分化能を有することを明らかにした(図2)。軟寒天コロニー形成試験では、コロニーが観察された陽性対照とは対照的に、陰性対照と同様に DFAT を播種したいずれのウェルにおいてもコロニーは観察されなかった。NOG マウス皮下移植による造腫瘍性試験では、体重は DFAT ならびに ASC 両群とも増加傾向にあり、一般状態にも異常は認められなかった。皮下腫瘍の有無については、移植 1-2 週後は全ての個体において移植細胞の残存と思われる皮下腫瘍が確認されたが、その後段階的に減数し、観察期間終了時には全個体において腫瘍は認めなかった。また、両群ともに全ての個体で抗ヒトビメンチン抗体陽性細胞が確認されたが、腫瘍性変化は認めなかった。

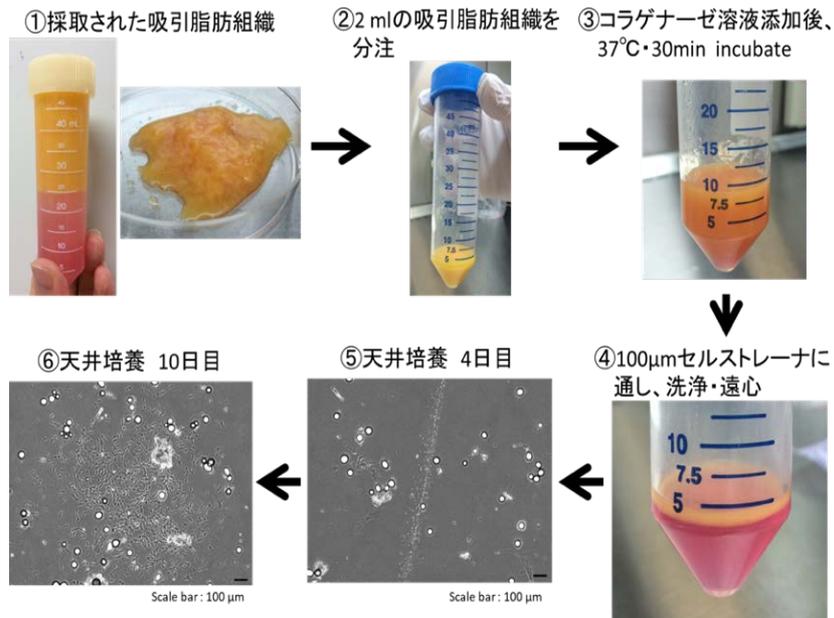


図1. ヒト吸引脂肪組織由来 DFAT の調整工程

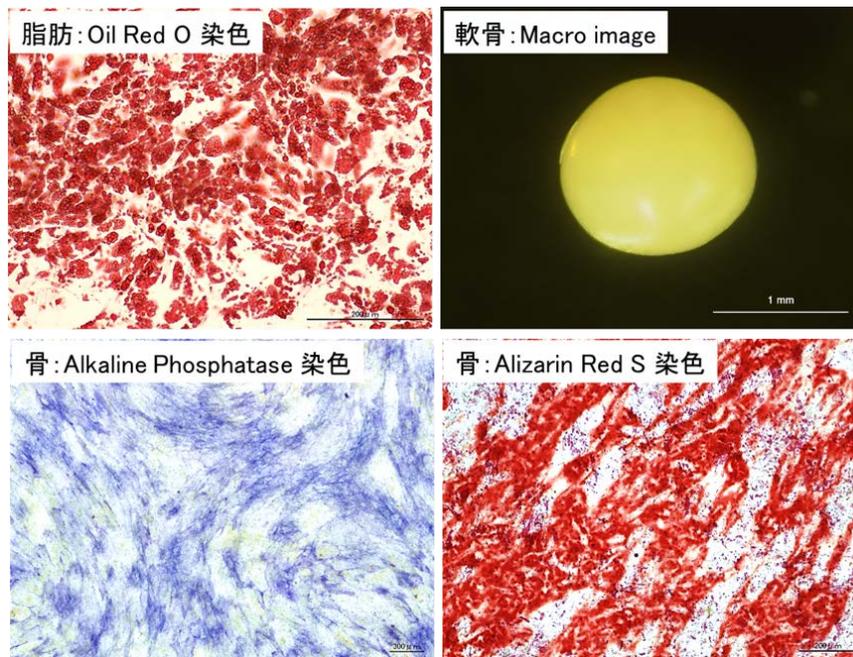


図2. ヒト吸引脂肪組織より調整した DFAT の多分化能解析

### 【考察】

本研究では、吸引脂肪組織はコラゲナーゼ溶液による酵素処理のみにて組織消化が可能であり、ハサミでの組織細切を行なうことなく容易に成熟脂肪細胞の単離が可能であった。成熟脂肪細胞層 5 μl 中の細胞直径 15 μm 以上の成熟脂肪細胞数を計測すると約 5,000 個存在しており、成熟脂肪細胞層 2 ml に換算すると成熟脂肪細胞が約  $2 \times 10^6$  個得られる計算となり、初代培養に用いる 12.5 cm<sup>2</sup> フラスコに換算して 40 枚分にもなることから、少量の吸引脂肪組織で大量に DFAT を調整可能であることを示している。ヒト吸引脂肪組織より調整された DFAT の性能解析した結果、MSC 陽性マーカーの陽性率が 90% 以上であり、MSC 陰性マーカーの陽性率は 0.1% 以下であった。そして、対照区である ASC では初代培養における陰性マーカーの陽性率が DFAT に比べて高い傾向にあり、DFAT は ASC と比較して純度が高く調整できることを示した。また、多分化能解析においてもヒト吸引脂肪組織より調整された DFAT は脂肪細胞、骨細胞

そして軟骨細胞へ分化誘導可能であった。これらの性能解析の結果は、これまで皮下脂肪組織より調整された DFAT と同様に、国際細胞治療学会 (International Society for Cellular Therapy : ISCT) で定義されているヒト MSC の基準を満たすものであった<sup>3)</sup>。再生医療・幹細胞技術の産業化においては、臨床応用に向けて効果・安全性をともに担保した有用な幹細胞の供給が待たれている。ヒト細胞加工製品の安全性指標としては、特に腫瘍原性に関する安全性評価が重要であり、造腫瘍性否定試験の実施が求められている。そこでヒト吸引脂肪組織より調整された DFAT の臨床応用に向けた重要課題である造腫瘍性について評価するため軟寒天コロニー形成試験ならびに NOG マウス皮下移植による造腫瘍性試験を行なった結果、足場非依存性のコロニー形成能を有さず、DFAT 移植に伴う腫瘍性変化を認めなかったことから、ヒト吸引脂肪組織より調整された DFAT に造腫瘍性はないと判定した。今後ヒト吸引脂肪組織より調整された DFAT を用いた前臨床試験を行い、有効性や安全性を検証することが望まれる。

### 【結語】

約2 mlという少量の吸引脂肪組織から高純度かつ多分化能を有するDFATを大量調製できることが明らかとなった。また、ヒト吸引脂肪組織より調製されたDFATは造腫瘍性を認めず、安全に移植できることが示唆された。DFATは低侵襲性で安全性が高い細胞治療を可能とする細胞源として期待できると考える。

### 【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, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol.* 2008; **215**: 210-222.
- 3) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; **8**: 315-317.