

称号及び氏名	博士（獣医学）	穴山 久志
学位授与の日付	平成28年2月29日	
論文名	<b>Studies on Distribution and Differentiation of Adipose Progenitor Cells in Rat Adipose Tissue</b> (ラット脂肪組織における前駆脂肪細胞の局在と分化に関する研究)	
論文審査委員	主査	山手 丈至
	副査	稲葉 俊夫
	副査	笹井 和美

## 論文要旨

### はじめに

肥満は生活習慣病の一つとされ、代謝面から肥満が心臓病など多くの疾患の元凶になることが知られており、製薬企業にとっては、重要な創薬ターゲットとなっている。

一般的に、肥満とは脂肪組織量が増すこと、すなわち脂肪細胞の面から言えば、脂肪細胞の数及び大きさが増すことである。脂肪細胞の増数の元となる未分化脂肪細胞（前駆脂肪細胞）については、いくつかの説が提唱されてきたが、多数の研究にも関わらず、前駆脂肪細胞の局在と分化については、未だ不明な点が多く残されている。

本研究において、第1章では、皮下脂肪組織の*in vitro*での適切な評価系を確立することを目的に、正常ラット由来脂肪組織の器官培養を試みた。その結果、脂肪組織のスライス標本を器官培養の状態でMillicell-CM上で界面培養する新たな方法を確立することができた。この培養系を用いて、前駆脂肪細胞の局在と脂肪細胞への分化特性を解析した。続いて、第2章では、肥満のモデル動物であるWistar fattyラットの皮下脂肪組織について、第1章で得られた成績を基に、脂肪細胞の特性と分化能について検討した。さらに、第3章においては、第1章で確立した*in vitro*での器官培養法を用いて、薬物による脂肪分化抑制効果について検討した。

## 第1章 脂肪組織器官培養系の確立と正常ラットでの前駆脂肪細胞の局在と分化に関する研究

### 第1節 脂肪組織器官培養系の確立

脂肪組織の培養系として、神経組織の器官培養手法として報告されているスライス組織をインキュベータ内の空気と培養液の境界面で培養する方法（界面培養）を試みた。ラットの皮下白色脂肪組織を摘出後、tissue chopperを用いて、脂肪組織スライス標本を作製した。スライス標本はMillicell-CM上に静置し、通常培地にて最大5日間培養した。5日間培養後においても、脂肪組織内の血管構造や脂肪組織の形態は良く保持されており、蛍光染色及び共焦点レーザー顕微鏡により、脂肪組織の立体的な構造を観察することができた。

### 第2節 脂肪分化刺激による前駆脂肪細胞からの脂肪細胞分化とその局在の解明

上記の器官培養系を用いて、ラットの脂肪組織スライスを、insulin、dexamethasone及び3-isobutyl-1-methylxanthineを含む脂肪分化培地にて培養した。その結果、培養開始1日後から、成熟脂肪細胞間あるいは血管周囲に、大小の脂肪滴を有する多胞性脂肪細胞が出現し、5日後まで経時的に数及び程度ともに増加した。Ki-67（増殖マーカー）の免疫染色を実施したところ、これらの多胞性脂肪細胞は陰性であった。共焦点レーザー顕微鏡により、成熟脂肪細胞表面及び血管周囲を取り囲むように存在する間葉系細胞が、多胞性脂肪細胞に分化したことが分かった。この間葉系細胞は、fibronectin陽性の細胞外基質に埋没して存在し、さらに初期の脂肪細胞分化マーカーであるC/EBP- $\beta$ を発現していた。また、前駆脂肪細胞の存在部位に一致して、間葉系幹細胞マーカー（CD105）に陽性の細胞が増加しており、脂肪組織内の細胞外基質中に存在する間葉系幹細胞が、脂肪分化刺激により脂肪細胞へと分化することが示唆された。

## 第2章 肥満モデル動物Wistar fattyラットにおける前駆脂肪細胞の局在と分化に関する研究

第1章の正常ラット脂肪組織を用いた器官培養での知見に関して、*in vivo*モデルへの外挿性の確認として、肥満糖尿病状態のWistar fattyラット及び対照（非肥満）である同週齢のWistar leanラットの皮下脂肪組織を採取し、詳細な形態学的解析を行った。

### 第1節 肥満モデル動物の皮下脂肪組織の形態学的特徴

Wistar fattyラットの脂肪組織では、成熟脂肪細胞間あるいは血管周囲に、大小の脂肪滴を有する多胞性脂肪細胞が多数存在していた。その組織学的特徴は、第1章で述べた脂肪分化培養を行ったスライス標本での3次元の組織像と一致しており、スライス培養標本での間葉系細胞から脂肪細胞への分化誘導と、*in vivo*肥満モデルとの組織学的な類似性が示された。

また、Wistar fattyラットの脂肪組織では、CD68を発現するマクロファージを主体とした炎症性細胞が成熟脂肪細胞を取り囲む像（crown-like structure）が確認された。この変化は、ヒトの肥満状態の脂肪組織で特徴的に認められる所見とされており、マクロファージの存在と肥満増悪の関連性が示された。

## 第2節 肥満モデル動物の脂肪組織における前駆脂肪細胞の局在と分化

上記のように、病理組織学的な観点からWistar fattyラットが肥満モデルとして有用であることが確認されたことから、引き続いて前駆脂肪細胞の局在及びその分化の検討を行った。

Wistar fattyラットの脂肪組織において、成熟脂肪細胞表面及び血管周囲の細胞外基質間に多数の間葉系細胞が存在し、多くが小型の脂肪滴を有すること、同部位にはCD105陽性細胞が多数存在することが確認された。

以上より、*in vitro*での研究で明らかとなった知見が*in vivo*肥満モデルでも確認され、脂肪組織の細胞外基質内に存在する間葉系細胞の前駆脂肪細胞としての役割、そしてCD105陽性の間葉系幹細胞が、これら前駆脂肪細胞の前段階として関与していることが*in vitro*及び*in vivo*の両研究において示された。

## 第3章 脂肪組織器官培養系における前駆脂肪細胞の分化に対する塩化リチウム (GSK-3β 阻害薬) の効果

GSK-3βは、細胞質内β-cateninのリン酸化に働き、その活性を負に制御していることから、その阻害薬は未分化間葉系細胞の脂肪細胞への分化を抑制すると考えられる。第1章で確立した脂肪組織器官培養系を用いて、GSK-3β阻害薬である塩化リチウムを脂肪分化培地に添加し、その影響について評価した。その結果、脂肪分化刺激による多胞性脂肪細胞の増加が、塩化リチウム添加により抑制された。また、間葉系細胞からの脂肪細胞分化の抑制は、C/EBP-βの発現低下によっても確認された。一方、CD105陽性の間葉系幹細胞の増は、塩化リチウム添加により抑制されず、今回の実験条件下においては、塩化リチウムは脂肪細胞分化の後期での抑制作用が顕著であることが示された。

以上より、脂肪組織内の細胞外基質中に存在する間葉系幹細胞からの脂肪細胞分化にはWnt/β-cateninシグナルが関与していること、また、確立した器官培養系が、その評価に有用であることが示された。

### まとめ

脂肪代謝の制御に係る創薬に向けた一つの評価法としての器官培養系の確立を試み、その手法による脂肪細胞の分化様式について多角的に検討し、以下の成果を得た。

1. スライス標本を用いたラット脂肪組織の器官培養系の確立に初めて成功した。
2. この培養系で、脂肪分化刺激により、大小の脂肪滴を有する多胞性脂肪細胞が脂肪組織内に新たに出現し、その元となる細胞は、成熟脂肪細胞表面あるいは血管周囲の細胞外基質に埋没した間葉系細胞であり、その細胞からの脂肪細胞分化の過程では、CD105に陽性を示す間葉系幹細胞が増加することが分かった。
3. 肥満糖尿病モデル動物であるWistar fattyラットの脂肪では、ヒトの肥満患者でみられる特徴的な組織像が確認され、Wistar fattyラットが、肥満及びその関連疾患の有用なモデルとなることが示された。
4. Wistar fattyラットの脂肪組織では、上記の*in vitro*での研究で認められた間葉系幹細胞からの脂肪細胞分化が確認され、肥満の成り立ちへの関与が示唆された。

5. **GSK-3 $\beta$**  阻害薬である塩化リチウムの脂肪組織器官培養への添加により、脂肪細胞分化には **Wnt/ $\beta$ -catenin** シグナルが関与していることが示され、肥満の治療薬開発への寄与の可能性及び脂肪組織器官培養系の評価上の有用性が示唆された。

## 審査結果の要旨

肥満症は生活習慣病の一つとされ、また代謝面から肥満症が心臓病など多くの疾患の元凶になることが知られている。製薬企業にとっては、抗肥満症薬は重要な創薬ターゲットとなっている。肥満症の状態とは、一般的に、脂肪組織量が増すこと、すなわち脂肪細胞の数及び大きさが増すことであるが、脂肪細胞の増数の元となる前駆脂肪細胞の局在と分化については、未だ不明な点が多く残されている。本研究では、新たに確立した脂肪組織のスライス標本の培養系を用いた前駆脂肪細胞の局在と脂肪細胞への分化特性の解析、肥満モデル動物の皮下脂肪組織を用いた前駆脂肪細胞の局在に関する組織学的な検討、さらに、確立したスライス標本培養系を用いた薬物による脂肪分化抑制効果についての検証を行っている。

第1章では、脂肪組織の新たな培養系の手法として、スライス組織標本をインキュベータ内の空気と培養液の境界面で培養する方法を試みている。すなわち、ラットの皮下白色脂肪組織を摘出後、脂肪組織スライス標本を作製し、その後スライス標本は**Millicell-CM**上に静置し、通常培地にて最大**5**日間培養することに成功している。**5**日間培養後においても、脂肪組織内の血管構造や脂肪組織の形態は良く保持されており、脂肪組織の立体的な構造を観察することができた。この確立したラットの脂肪組織スライス標本を用いて、**insulin**、**dexamethasone**及び**3-isobutyl-1-methylxanthine**を含む脂肪分化培地を添加することで、脂肪細胞の分化過程を観察している。その結果、成熟脂肪細胞間あるいは血管周囲に、大小の脂肪滴を有する多胞性脂肪細胞が出現すること、そして共焦点レーザー顕微鏡での観察により、成熟脂肪細胞表面及び血管周囲を取り囲むように存在する間葉系細胞が、多胞性脂肪細胞に分化することを示した。この間葉系細胞は、細胞外基質であるフィブロネクチンに埋没して存在し、さらに初期の脂肪細胞分化マーカーである**C/EBP- $\beta$** を発現すること、また前駆脂肪細胞の存在部位に一致して、間葉系幹細胞マーカー (**CD105**)を発現する細胞が増加することをみいだしている。すなわち、脂肪組織内の細胞外基質中に存在する間葉系幹細胞が、脂肪分化刺激により脂肪細胞へと分化することを明らかにしている。

第2章では、第1章で観察された知見の***in vivo***モデルへの外挿性の確認として、肥満糖尿病状態の**Wistar fatty**ラットの皮下脂肪組織を採取し、詳細な形態学的解析を行っている。**Wistar fatty**ラットの脂肪組織では、成熟脂肪細胞間あるいは血管周囲に、大小の脂肪滴

を有する多数の多胞性脂肪細胞が存在していた。その組織学的特徴は、第1章で述べた脂肪分化培養を行ったスライス標本での3次元の組織像と一致しており、スライス培養標本での間葉系細胞から脂肪細胞への分化誘導と、*in vivo*肥満モデルとの組織学的な類似性が示された。また、**Wistar fatty**ラットの脂肪組織において、**CD68**を発現するマクロファージを主体とした炎症性細胞が成熟脂肪細胞を取り囲む像 (**crown-like structure**) を確認している。この変化は、ヒトの肥満状態の脂肪組織で特徴的に認められる所見とされており、マクロファージの存在と肥満増悪の関連性が、この肥満ラットにおいても示された。さらに、**Wistar fatty**ラットの脂肪組織において、成熟脂肪細胞表面及び血管周囲の細胞外基質間に多数の間葉系細胞が存在し、多くが小型の脂肪滴を有すること、また同部位には**CD105**発現細胞が多数存在することを明らかにしている。すなわち、血管周囲の間葉系細胞から脂肪細胞が分化誘導されることを示した。

第3章では、第1章で確立したスライス標本の培養系を用いた脂肪細胞分化抑制実験を試みている。**GSK-3β**は、細胞質内**β-catenin**のリン酸化に働き、その活性を負に制御していることから、その阻害薬は未分化間葉系細胞の脂肪細胞への分化を抑制すると考えられる。ラット脂肪組織のスライス標本培養系に、**GSK-3β**阻害薬である塩化リチウムを脂肪分化培地とともに添加し、その影響について評価したところ、脂肪分化刺激による多胞性脂肪細胞の増加は塩化リチウム添加により抑制されるが、一方、**CD105**発現の間葉系幹細胞の増加は抑制されないことを示した。すなわち、塩化リチウムは脂肪細胞分化の後期で抑制作用を有する可能性を示した。この研究では、また、脂肪組織のスライス標本培養系が、脂肪細胞分化の*in vitro*での評価に有用であることを明らかにしている。

本研究は、新たに確立した脂肪組織のスライス標本培養系を用いて、肥満症で重要である脂肪細胞増数の源となる前駆脂肪細胞が、成熟脂肪細胞表面あるいは血管周囲の細胞外基質に存在する間葉系細胞であることを明らかにしている。この成果は、獣医学・医学における肥満症の治療薬開発における基礎研究の新たな展開に資するものであり、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。