[受 賞]

ヒト脂肪組織由来幹細胞における FGF-2 の 脂肪分化に与える影響

覚道奈津子, 下間亜由子, 楠本 健司

(関西医科大学形成外科学講座)

Fibroblast Growth Factor-2 Stimulates Adipogenic Differentiation of Human Adipose-derived Stem Cells

Natsuko KAKUDO, Ayuko SHIMOTSUMA, Kenji KUSUMOTO

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kansai Medical University

緒 言

脂肪組織には、脂肪組織由来幹細胞 (ASCs: Adipose-derived Stem Cells) と呼ばれる体性幹細胞が含まれており、それらは、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋肉細胞、神経細胞等へと分化する能力を有する¹⁻³⁾。ヒト ASCs のほとんどは、形態的には線維芽細胞の特徴を有し、標準的な組織培養の条件で容易に増殖し、長期の培養でも安定している⁴⁾。これまで臨床においては、間葉系幹細胞の採取源として代表的なものは骨髄であった。それに対し脂肪組織は、形成外科手術の際の余剰組織として採取することが容易であり、局所麻酔下でも採取可能である。また骨髄採取に比較して脂肪組織採取は侵襲も少なく、採取後の疼痛も非常に少なく、ドナーサイトの変形・欠損も非常に少なくおこなえる。

一方、Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) は、別名 basic FGF と呼ばれ、ヘパリン結合増殖因子ファミリーに属する⁵⁾。現在までに、20 種以上の FGF が同定されており、細胞増殖・血管新生を促進し、初期の分化や発生プロセスに重要な役割を果たすことが明らかになっている⁶⁾。臨床において遺伝子組み換え FGF-2 製剤は既に臨床使用が認

可され、褥瘡、皮膚潰瘍治療に使用されている。骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs) に FGF-2 を添加すると、細胞増殖が促進し、脂肪細胞への分化を促進する⁷⁾。また、ASCs に FGF-2 を添加すると、骨への分化が阻害され⁸⁾、軟骨細胞への分化は促進する⁹⁾。しかし、ASCs の脂肪分化能に対する FGF-2 の効果に関する研究はこれまでに行われていない。

本研究では FGF-2 による ASCs の増殖と脂肪分化への効果とそのメカニズムについて検討をおこなった。ASCs の脂肪分化における増殖期、分化誘導期で FGF-2 を添加し、Oil red O 染色 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性の測定をおこない脂肪分化度を測定するとともに、脂肪分化特異的遺伝子の発現を Real-time RT-PCR を用いて検討した。

材料と方法

材料

FGF-2 は PeproTech, Ltd. (英国, ロンドン) から入手し、他の材料は特記したもの以外 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から入手した。細胞培養に関係するプラスチック類は、Becton-Dickinson (Franklin Lakes, NJ) から入手した。

ASCs 初代培養

形成外科手術で摘出した余剰組織からヒト腹部

本論文は、Biochem. Biophys. Res. Commun. 359: 239-244, 2007 に掲載された論文を和文により二次出版したものである。

図 1 (A) 実験群. (B) 初代培養第 1 日の ASCs. (C) FGF-2 を添加せずに 7 日間培養した ASCs. (D) FGF-2 (10 ng/ml) を添加し 7 日間培養した ASCs. (Bar, 100 μm).

皮下脂肪を採取した。Zuk らの方法で (ASCs) を調製した^{1,4)}。すなわち、脂肪組織を 20ml のリン酸緩衝食塩水 (PBS) (9.57 mM, pH 7.4) で十分に 3 回洗浄し、小片に切り分け、0.1% collagenase 溶液を添加し、37°C で 40 分間振とうさせて細胞を分散させた。DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% ペニシリンからなる基礎培地を加えた後、1,500 rpm で 3 分間遠心分離した。100 mm ナイロンメッシュで、未消化組織を除去した後、十分に基礎培地で洗浄のち、プラスチックシャーレにて 37°C, 5% CO₂ 下に細胞培養した。シャーレ底面に接着した ASCs を基礎培地中で 3 代培養し実験に供与した。本研究は関西医科大学の倫理委員会の承認 (倫理承認第 617 号) を得て行った。次に、24 ウェルプレートに 1,000 cells/cm² の密度で ASCs を播種し、細胞の増殖期、分化期に FGF-2 を添加した (図 1)。すなわち、増殖期には 10 ng/ml FGF-2 を添加した、あるいは添加しない基礎培地にてコンフルエンスに到達するまで 2-3 日毎に培地交換を行い、分化期には FGF-2 の存在下、あるいは非存在下で、脂肪分化培地にて細胞を 14 日間分化させた (図 1)。脂肪細胞分化誘導には、それぞれ最終濃度が 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1 mM dexamethasone, 10 mM insulin, 200 mM indomethacin となるように分化誘導物質を基礎培地に添加し、これを脂肪分化誘導培地として用いた^{1,4)}。

Oil red O 染色

脂肪細胞分化誘導培地で ASCs を 14 日間培養したのち、PBS 溶解した 10% ホルムアルデヒド溶液中で 1 時間固定した。PBS で洗浄し、Oil red O 溶液 (Wako, Osaka, Japan) を用いて 2 時間染色し、その後、蒸留水で洗い流した¹⁰⁾。光学顕微鏡下で脂肪滴を観察した後、色素を 100% イソプロパノールに 15 分間溶解させた。溶液の吸光度を、Plate Readers (ARVO sx-1) (Perkin Elmer, Inc., MA, USA) を使って 500 nm で測定し脂肪分化度を測定した¹¹⁾。

総タンパク質量および GPDH 活性の測定

総タンパク質量は、BCATM Protein Assay Kit (PIERCE, Rockford, USA) を使用し測定した。GPDH 活性は、GPDH Activity Assay Kit (TAKARA BIO INC., Japan) を使用した。

RNA 抽出および cDNA 合成, Real-time RT-PCR

Total RNA を RNasy Mini Kit (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA) を用いて分離し、RNase-Free DNase Set (QIAGEN, Inc.) を使い、DNase 処理を行った。4 μg の Total RNA に対し、250 pmol のランダムプライマー、100 U の SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) を 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 40 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 1 mM DTT, ならびに 10 mM dNTPs を用いて逆転写を全容積 20 μl の反応系で実施した。Total RNA とランダムプライマーを混和したものを 70°C で 10 分間加熱し、その後直ちに氷上で冷却し、他の試薬を加えた。42°C で 50 分間、98°C で 5 分間加熱した後 cDNA を得た。

脂肪分化特異的遺伝子、Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPARγ, Hs00234592_m1), glucose transporter 4 (GLUT4, Hs00168966_m1), CCAAT enhancer-binding protein α (C/EBPα, Hs00269972_s1) ならびに内部標準遺伝子 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のプローブおよび TaqMan プローブを Applied Biosystems (TaqMan[®] Gene Expression Assays) から入手した。それぞれの TaqMan プローブをオリゴヌクレオチドの 5' 末端にある reporter dye (FAM) と、3' 末端にある quencher dye (TAMRA) で標識した。

標的 cDNA (PPARγ, GLUT4, C/EBPα) と内部

標準遺伝子 (GAPDH) の定量を, Real-time PCR Opticon 2 (MJ Japan, Tokyo, Japan) を使って実施した. データ収集と分析は, 装置付属のソフトウェアを用いて実施した. PCR は, 10–100 ng の全 RNA に相当する cDNA, 12.5 ml の 1×TaqMan Universal PCR Master Mix, 1.25 ml の 20×TaqMan Expression Assay 試薬を含む最終容積 25 μ l で実施した. サーマルサイクラーの設定条件は, 50 $^{\circ}$ C で 2 分間, 95 $^{\circ}$ C で 10 分間, 95 $^{\circ}$ C で 15 秒間, 60 $^{\circ}$ C で 1 分間を 50 サイクル実施した. comparative C_T データ解析法を用いてデータを解析した.

統計解析

Mann-Whitney U 検定を用いて, $p < 0.05$ を有意水準とし, グループ間を比較した. データは平均 $\pm$ S.D. で示した.

結 果

FGF-2 の添加による ASCs の形態変化

ASCs の脂肪細胞への分化に対する FGF-2 の効果を検討するため, 図 1A に示すグループ分けにて FGF-2 を添加した. すなわち, ASCs を基礎培地のみで培養し, 脂肪への分化誘導を行わない群 (Not induced), 分化誘導のみ行い, FGF-2 を添加しない群 (グループ 1), 増殖期にのみ FGF-2 を添加する群 (グループ 2), 分化期にのみ FGF-2 を添加する群 (グループ 3), 増殖期・分化期ともに FGF-2 を添加する群 (グループ 4) に分けた. 図 1 の白のボックスは基礎培地を示し, 黒のボックスは, 脂肪分化誘導培地を示す.

FGF-2 を添加, あるいは添加せずに 7 日間培養した ASCs の形態を位相差顕微鏡写真で観察したところ (図 1B, C, D), 初代培養された ASCs は, 初代培養第 1 日に, 線維芽細胞の外見を呈し (図 1B) FGF-2 を加えない Control 群と比較して, FGF-2 添加群は, 形態学的に細胞が小さく, 緊密で核は白く光っていた (図 1C, D).

ASCs の脂肪細胞分化に対する FGF-2 の効果

基礎培地のみで培養, すなわち脂肪細胞分化誘導を行わず, FGF-2 も添加せずに培養すると, 細胞内に脂肪滴は全く観察されなかった (図 2 “not induced”, 図 3B). さらに, 脂肪分化マーカーの一つである GPDH 活性は, 分化誘導物質が存在しな

図 2 分化期 14 日目の位相差顕微鏡像と Oil red O 染色. (Bar, 100 μ m).

い場合には, ほとんど認められなかった (図 3A).

実験群の Oil red O 染色では FGF-2 を添加しなかったグループ 1 の細胞に脂肪分化誘導培地で誘導したところ ASCs の細胞質内に脂肪滴をわずかにしか生じなかった (図 2, グループ 1). 一方, 増殖期で FGF-2 を添加したグループ 2 において, ASCs の脂肪分化度は促進していた (図 2, 3B). 分化期だけに FGF-2 を添加したグループ 3 は, グループ 1 と比較して脂肪分化度にほとんど差を認めなかった (図 2, 3B). 増殖期, 分化期に FGF-2 を添加したグループ 4 は, 脂肪分化が促進していた (図 2, 3B). 脂肪蓄積量, GPDH 活性も, 上記の結果に対応する結果となり, グループ 1 と比較しグループ 2, グループ 4 において有意に促進していた. とくにグループ 2 において GPDH 活性は, グループ 1 に比較しグループ 2 が 4 倍の活性値を示していた.

脂肪細胞特異遺伝子 PPAR γ と, 脂肪細胞分化の後期マーカーである GLUT4 の発現を, 分化第 14

図3 (A) 分化期 14 日目の GPDH 活性. (B) 分化期 14 日目の脂肪分化度. * $p < 0.05$. (C) (D) 分化期 14 日目の PPAR γ と GLUT4 の発現.

日に Real-time RT-PCR にて検討した. 脂肪分化誘導培地処理した細胞群では, 誘導しなかったグループと比較して, PPAR γ の発現レベルが 4 倍になり, さらに増殖期に FGF-2 を添加したグループ 2 では PPAR γ の発現レベルが 10.8 倍増加した (図 3C). グループ 1 と 2 での GLUT4 の発現レベルは, 分化誘導を行わなかった群のそれぞれ 28.2 倍と 155.1 倍であった (図 3D).

ASCs の増殖期の FGF-2 添加群, 未添加群における PPAR γ ・C/EBP α の発現

PPAR γ と C/EBP α の遺伝子発現を, FGF-2 を添加した場合と添加しなかった場合での, コン플エンスまでの増殖期にて検討した (図 4). FGF-2 を添加した細胞での PPAR γ の発現は, 増殖期に FGF-2 を添加しなかったグループと比較して著明に増加した. とりわけ, FGF-2 を培地に添加すると, 第 5 日の PPAR γ の発現が 4.9 倍増加した (図

4A). 対照的に, FGF-2 で処理した細胞での C/EBP α 遺伝子の発現レベルは, FGF-2 を添加しなかったグループと比較してほとんど変化しなかった (図 4B).

考 察

本研究では, ヒト ASCs の脂肪分化の制御における FGF-2 の作用機序の一部と, ヒト ASCs の脂肪細胞分化における新しい *in vitro* モデルでの重要な特性について明らかにした. PPAR γ と C/EBP α は, 脂肪分化の後期段階で発現し, 脂肪細胞遺伝子の発現を誘導し, インスリン感受性を高めることを通じて脂肪細胞分化を促進するのに中心的な役割を果たしている^{12,13}. 増殖期の基礎培地に FGF-2 を添加すると, ASCs の重要な脂肪分化マーカーの一つである PPAR γ の発現が上昇した. FGF-2 を増殖期に添加された ASCs は, 添加されていない ASCs と比較して, 脂肪細胞に分化する

図4 ASCsの増殖期の FGF-2 添加群 (10 ng/ml), 未添加群における PPAR γ (A)・C/EBP α の発現 (B)。

割合が有意に高かった。Oil red O 染色と GPDH 活性の測定結果は、これらの結果を支持していた。以上より、FGF-2 で増殖した ASCs は、脂肪分化能力が高いことを示した。

近年、ヒト ASCs の増殖と、脂肪細胞への分化能力に対して FGF-2 が作用することが報告されている。Inoue らは、FGF (≥ 10 ng/ml) を含む通常培地で培養した ASCs を、脂肪分化誘導を行うと、GPDH の活性が有意に上昇し、それらの増殖や分化は、Scaffold や FGF-2 濃度の影響を受けることを報告した¹⁴⁾。しかし、彼らの実験系では、Scaffold としてポリマーフィルムを用いており、細胞培養プレートには、タイプ I もしくはタイプ IV コラーゲン、ゼラチン、FGF-2 がコーティングされていたものであるため FGF-2 の効果を正確に反映させる実験系とは言いがたい。また、10 ng/ml 以上の濃度の FGF-2 を脂肪分化誘導培地に添加すると、GPDH 活性を抑制したという報告もある¹⁵⁾。本研究では、分化誘導前に FGF-2 で細胞を処理すると、ASCs の脂肪分化が促進されるが、脂肪分

化誘導培地に FGF-2 を添加した場合 (グループ 3) には、促進効果は認められなかった。このように、ASCs の細胞培養において、分化誘導前に FGF-2 を添加した場合にのみ ASCs の脂肪細胞分化が促進されることが初めて明らかになった。この結果は、FGF-2 添加のタイミングが脂肪分化促進において重要であることを示している。

一方、BMSCs の PPAR γ リガンド誘発性の脂肪細胞形成を FGF-2 が高めたことが報告されている⁷⁾。Neubauer ら⁷⁾は、BMSCs の PPAR γ 発現を誘導することで、FGF-2 は脂肪細胞分化に直接の作用を発揮していると報告した。本研究においては、ASCs の増殖期に FGF-2 を添加することで、分化に著明な増加を引き起こすことを示し、FGF-2 投与群の PPAR γ の発現レベルも FGF-2 非投与群と比較して高かった。これらのデータは、脂肪細胞への分化系譜へのコミットメントに FGF-2 が直接の効果を有していることを示すものと考えられる。Balb/3T3-L1 前駆脂肪細胞の脂肪分化誘導実験系のなかで、MEK/ERK シグナル伝達経路を活性化させることで、PPAR γ 遺伝子発現レベルを高めて脂肪細胞形成を促進することが明らかになっている¹⁶⁾。脂肪細胞系譜へのコミットメントに対する直接の作用において、FGF-2 が分化に関与する機序として、MEK/ERK を含む MAPK シグナル伝達経路が、脂肪分化に重要な役割を果たしており、そのなかでも FGF-2 は MEK/ERK 経路の強力な活性化因子であることが知られている⁶⁾。従って、今後の研究課題として、本研究における脂肪分化における PPAR γ 遺伝子発現レベルの上昇と MEK/ERK シグナル伝達経路の関与の検討が重要であると考えられた。

幹細胞の再生医療応用においては、少量のドナー組織から分化能を有する幹細胞を大量調製することが求められる。本研究では、分化誘導前に ASCs に FGF-2 を添加すると、最も強い脂肪細胞分化を誘導することが明らかになり、GPDH 活性および Oil red O 染色が促進した。FGF-2 添加に伴い PPAR γ 遺伝子の発現も経時的に上昇した。FGF-2 は、強力な増殖促進効果を有するだけでなく FGF-2 を用いて ASCs を増殖させると、ASCs の脂肪細胞分化も促進することが示唆された。このことにより、FGF-2 添加培地を用いて少量のドナー (脂肪組織) から脂肪への分化能を有する幹細胞 (ASCs)

を大量に調製することが可能であることが明らかになり、今後 ASCs を用いた脂肪組織の再生医療応用に有用であることが期待される。

謝 辞

本研究にあたり御助言頂いた京都工芸繊維大学大学院応用生物学部門細胞分子工学講座教授・竹谷茂先生に深謝します。本研究の一部は、2005 年関西医科大学が学内研究助成Fを受けて行なった。

本論文は、学位論文 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 359: 239–244, 2007) を基に、第 8 回関西医科大学医学会賞 (2009 年 3 月 6 日) に応募口演し、医学会奨励賞を受賞した際の発表要旨でもある。

文 献

- 1) P. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. Futrell, A. Katz, P. Benhaim, H. Lorenz, and M. Hedrick, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7 (2001) 211–28.
- 2) M. Hedrick, and E. Daniels, The use of adult stem cells in regenerative medicine. *Clin Plast Surg* 30 (2003) 499–505.
- 3) D. De Ugarte, K. Morizono, A. Elbarbary, Z. Alfonso, P. Zuk, M. Zhu, J. Drago, P. Ashjian, B. Thomas, P. Benhaim, I. Chen, J. Fraser, and M. Hedrick, Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174 (2003) 101–9.
- 4) P. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D. De Ugarte, J. Huang, H. Mizuno, Z. Alfonso, J. Fraser, P. Benhaim, and M. Hedrick, Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13 (2002) 4279–95.
- 5) D. Gospodarowicz, N. Ferrara, L. Schweigerer, and G. Neufeld, Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 8 (1987) 95–114.
- 6) C. Powers, S. McLeskey, and A. Wellstein, Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7 (2000) 165–97.
- 7) M. Neubauer, C. Fischbach, P. Bauer-Kreisel, E. Lieb, M. Hacker, J. Tessmar, M. Schulz, A. Goepferich, and T. Blunk, Basic fibroblast growth factor enhances PPAR-gamma ligand-induced adipogenesis of mesenchymal stem cells. *FEBS Lett* 577 (2004) 277–83.
- 8) N. Quarto, and M. Longaker, FGF-2 inhibits osteogenesis in mouse adipose tissue-derived stromal cells and sustains their proliferative and osteogenic potential state. *Tissue Eng* 12 (2006) 1405–18.
- 9) M. Chiou, Y. Xu, and M. Longaker, Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343 (2006) 644–52.
- 10) A. Sen, Y. Lea-Currie, D. Sujkowska, D. Franklin, W. Wilkison, Y. Halvorsen, and J. Gimble, Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem* 81 (2001) 312–9.
- 11) Y. Choi, S. Cha, Y. Lee, S. Kwon, C. Park, and M. Kim, Adipogenic differentiation of adipose tissue derived adult stem cells in nude mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 345 (2006) 631–7.
- 12) Z. Wu, E. Rosen, R. Brun, S. Hauser, G. Adelmant, A. Troy, C. McKeon, G. Darlington, and B. Spiegelman, Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 3 (1999) 151–8.
- 13) W. Yeh, Z. Cao, M. Classon, and S. McKnight, Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 9 (1995) 168–81.
- 14) S. Inoue, Y. Hori, Y. Hirano, T. Inamoto, and Y. Tabata, Effect of culture substrate and fibroblast growth factor addition on the proliferation and differentiation of human adipose stromal cells. *J Biomater Sci Polym Ed* 16 (2005) 57–77.
- 15) H. Hauner, K. Röhrig, and T. Petruschke, Effects of epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF) on human adipocyte development and function. *Eur J Clin Invest* 25 (1995) 90–6.
- 16) D. Prusty, B. Park, K. Davis, and S. Farmer, Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 277 (2002) 46226–32.