

**【要約】**

Human adipocytes from the subcutaneous superficial layer have greater adipogenic potential and lower *PPARG* DNA methylation levels than deep layer adipocytes

(ヒト皮下浅層由来の脂肪細胞は深層より脂肪分化能が高く、  
*PPARG* の DNA メチル化レベルは深層より低い)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：佐藤兼重教授)

小坂 健太郎

皮下組織は浅層脂肪組織 (Superficial Adipose Tissue : SAT) と深層脂肪組織 (Deep Adipose Tissue : DAT) の二層構造を持つことが知られている。線維性の膜構造である浅筋膜が皮下組織を二層に分けている。この二層構造は特に腹部や背部で容易に認識できる。SAT は厚い線維性隔膜と立体的な脂肪小葉を有するのに対し、DAT は薄い隔膜と平坦な脂肪小葉を持っている。過去の報告では、SAT は外圧から内部を保護しており、DAT は外力に対して皮膚を伸ばす、もしくは滑らせる機能があるとされている。しかし、SAT と DAT の細胞機能の違いに関してはあまり知られていない。われわれはその違いをヒト培養脂肪前駆細胞を用いて分析した。

## [方法]

健康で非肥満体型の日本人女性を被験者とし、乳房再建手術中に腹部皮弁の余剰部位から脂肪組織を採取した。インフォームドコンセントを行い、すべての研究はヘルシンキ宣言のガイドラインに沿って施行した。

### 顕微鏡的分析

採取した皮下組織全層のサンプルに染色を施し顕微鏡的分析を行った。fatty acid binding protein-4 (FABP4) 免疫組織化学染色像から SAT と DAT の脂肪細胞 1 個あたりの平均面積を算出し比較した。

### 初代培養と脂肪分化

Kuroda らの報告にしたがって、SAT と DAT それぞれの脂肪組織から天井培養由来増殖脂肪細胞 (ccdPAs) と間質血管分画 (SVF) 由来前駆細胞 (脂肪幹細胞、ASCs) を抽出した。これら 4 系統の細胞を培養しコンフルエントを確認したら脂肪分化培地に切り替え、さらに 14 日間培養した。分化した細胞を Oil Red O と BODIPY で染色し、1 視野あたりのそれぞれの総脂肪滴面積を算出した。

### 脂肪分化マーカー

分化誘導を施した 4 系統の細胞から、脂肪分化関連遺伝子およびタンパクの発現を比較した。定量的 RT-PCR 法にて peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG)、CCAAT/enhancer binding protein delta (CEBPD)、Leptin (LEP) の mRNA 発現を比較した。またウエスタンブロット法にて PPAR- $\gamma$  タンパクの発現、ELISA 法にて Leptin タンパクの発現を比較した。

### 部分的分化誘導刺激

SAT と DAT から抽出した ccdPAs に部分的な分化誘導刺激を行いその反応を比較した。通常分化培地を含む重要な 3 要素 : インスリン、3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、デキサメタゾンのうちそれぞれ 1 つを欠く 3 種類の培地で上記と同様に分化誘導を行い、RT-PCR 法にて PPARG、CEBPD、LEP の mRNA 発現レベルを測定した。

### DNA メチル化

SAT と DAT から抽出した ccdPAs を 14 日間培養した後、細胞から DNA を抽出し Human Methylation 450 BeadChip array にてゲノム網羅的にメチル化レベルを解析した。その中から、UCSC Genome Browser に記された PPARG、CEBPD、LEP のプロモーター領域における各 CpG アイランドのメチル化率を抽出し、サンプル間で比較した。

### 統計学的分析

結果は平均値±標準偏差として表した。統計学的手法は Student T 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## [結果]

### 非肥満体では SAT の脂肪細胞は DAT より大きい

顕微鏡的分析により、HE 染色像にてヒト皮下組織の二層構造を認めた。非肥満体において SAT は DAT よりも厚かった。浅筋膜は多重構造で、膠原繊維から成っていることが確認された。FABP4 染色像では  $1 \text{ mm}^2$  あたりの脂肪細胞数は SAT の方が有意に少なかった ( $1134 \pm 68$  vs.  $1280 \pm 44 / \text{mm}^2$ )。すなわち SAT の方が大きな脂肪細胞を有することが確認された ( $8741 \pm 416$  vs.  $7732 \pm 213 \mu\text{m}^2$ )。SAT と DAT には解剖学的差異のみならず、細胞レベルでも違いがあることが示された。

### SAT 由来の細胞は DAT 由来よりも高い脂肪分化能を有する

7 日間の天井培養で得られた ccdPAs は、ASCs に類似した形態的特徴を示した。すなわち脂肪滴を有しない繊維芽細胞様構造である。われわれは過去に ccdPAs が ASCs と比較し高い脂肪分化能を有することを報告した。分化誘導を行った 4 系統の細胞に Oil Red O 染色および BODIPY 染色を行った。1 視野あたりの総染色面積を算出し比較した結果、SAT 由来の ccdPAs および ASCs は DAT 由来より有意に高度な脂肪分化能を有することが示唆された。

### 部分的脂肪分化誘導に対する感受性の違い

われわれは、SAT および DAT 由来の ccdPAs に部分的脂肪分化誘導を施し感受性の違いを検討した。脂肪分化培地を構成する 3 要素のうち、インスリンの欠損した培地では、PPARG の mRNA 発現に有意差はなかったが、CEBPD の発現量は SAT 由来の ccdPAs が有意に低く、LEP の発現は SAT 由来が有意に高度だった。IBMX の欠損状態では、PPARG と LEP の発現レベルは SAT 由来が有意に高かったが、CEBPD は SAT 由来の方が有意に低く発現していた。デキサメタゾンを欠いた状態では、PPARG の発現は SAT 由来がより高度で、LEP の mRNA 発現はともに検知されなかった。

### SAT 由来の ccdPAs はより高度に PPAR- $\gamma$ を発現する

PPAR- $\gamma$  は脂肪分化のマスターレギュレーターとされている。脂肪分化誘導を施した SAT 由来の ccdPAs における PPARG の mRNA 発現および PPAR- $\gamma$  タンパクの発現は、DAT 由来の ccdPAs より有意に高度だった。Leptin タンパクの発現も同様の結果であったが、CEBPD の mRNA 発現量は、SAT 由来 ccdPAs の方が有意に低かった。

### SAT 由来の ccdPAs では PPARG の CpG アイランドにおけるメチル化率が低い

最近の報告では、エピジェネティック修飾が細胞の分化を定める重要な役割を担っており、プロモーター領域における DNA メチル化が遺伝子発現の抑制と関連していることが示唆されている。PPARG 遺伝子におけるほぼすべて (9/11) の CpG アイランドで、SAT 由来の ccdPAs は DAT 由来より平均メチル化率が低かった。そのうち 2 箇所 (cg04748988, cg18887186) では統計学的に有意差を認めた。一方 CEBPD 遺伝子における 2 箇所の CpG アイランド (cg18923221, cg22280940) においては、SAT 由来の方が有意にメチル化率が高かった。LEP 遺伝子の CpG アイランドでは、SAT 由来と DAT 由来の細胞でメチル化率に有意差を認めるものはなかった。

## [考察]

本研究で、非肥満体型女性ではSATがDATより解剖学的に厚いことが示された。形成外科領域では、肥満体型でDATがより豊富なことから脂肪吸引は主にDATに対して行われる。過去の報告では肥満の悪化に伴いDATの割合が増加してSATは減少するとされており、これを裏付けている。またわれわれはSATにおける脂肪細胞の大きさがDATより大きいことを示した。これは過去の他の報告と同様である。Marinouらは、肥満体ではSATとDATの脂肪細胞の大きさは同等であるが、非肥満体型ではDATの方が小さいと報告している。さらにWanらは、SATとDATにおける細胞の大きさの違いは体幹だけでなく顔面にも存在するとしている。本研究の結果は*in vitro*での脂肪分化能と、*in vivo*での細胞の大きさとの関連性を示唆している。SATがより高度な脂肪分化能を有しているというわれわれの研究結果は、SATとDATの細胞の大きさの違いを説明する一つとなり得る。

SATとDATの細胞機能の違いは、脂肪移植において大変重要である。脂肪移植は組織増量の手法として用いられてきたが、現在その用途はさらに幅広いものとなっている。創傷治癒や癩痕の改善、そして近年は遺伝子治療の媒体として用いられ、注目されている。われわれは過去に、PPAR- $\gamma$ の発現が移植脂肪組織の定着および成熟に重要であることと報告した。Shimizuらは、高度な脂肪分化能は悪性転化における感受性を低下させると報告している。本研究の結果は、脂肪移植のドナーとしてはSATがより望ましいことを示唆している。

エピジェネティックコントロールは細胞分化において重要である。本研究の結果では、脂肪分化のマスターレギュレーターとされるPPARGのCpGアイランドにおけるメチル化率が、SAT由来の細胞でより低かった。この結果は、脂肪組織の成熟がPPARGのメチル化に制御されているとした過去の動物実験での報告と合致する。対照的に、SAT由来の細胞において脂肪分化関連遺伝子であるCEBPDのメチル化率がDAT由来よりも有意に高かった。CEBP- $\delta$ は、CEBP- $\beta$ と協調してPPARGの発現を誘導するとされる。しかし過去の報告では、CEBPD欠損マウスが正常なPPAR- $\gamma$ の発現と脂肪分化を示しており、CEBP- $\delta$ は脂肪分化に必ずしも必要でないとされている。またLEPのDNAメチル化率はSAT、DATの細胞間で有意差がなかったが、Leptinタンパクの分泌は前者が有意に高度であった。これはSATにおけるPPAR- $\gamma$ の高度な発現が脂肪細胞をより成熟させ、Leptinをより多く分泌するためと推察される。こうしたSATとDATのDNAメチル化率の違いがいつ、そしてなぜ起こるのかをさらなる研究により解明する必要がある。

## [結語]

本研究により、SATの脂肪細胞がDATより大きいことが確認された。またSAT由来の初代培養脂肪前駆細胞がDAT由来のものより高い脂肪分化能を有しており、これはSATにおいてPPARGのDNAメチル化率が低いことに起因していると示唆された。これら結果はSATとDATの物理的機能の差異に根拠を与えるものである。