

マウスとイヌの脂肪由来幹細胞 (Adipose-derived stem cells:
ADSC) の機能的亜集団に関する基礎的研究

伊藤 晴倫

2018

目次

序論	7
第一章 フローサイトメトリー法を用いたマウスとイヌの ADSC における細胞内リン酸化タンパクの発現解析	
要約	11
諸論	12
材料と方法	12
• マウスとイヌの ADSC の採取および培養	
• 形態学的評価	
• 免疫染色	
• フローサイトメトリーによる細胞内リン酸化タンパクの発現解析	
結果	17
• マウスとイヌの ADSC の脂肪、骨、軟骨分化誘導と各種免疫染色	
• マウスとイヌの ADSC における細胞内リン酸化タンパクの発現解析	
考察	18
図および表	20
• 表 1. フローサイトメトリーに用いた各種抗体	
• 図 1. マウスとイヌの ADSC の形態学的評価と免疫染色による脂肪、骨、軟骨分化誘導の評価	
• 図 2. フローサイトメトリーによる細胞内リン酸化タンパクの発現	
第二章 ALDH 活性を用いたイヌ ADSC の機能的亜集団の解析	

要約	27
諸論	28
材料と方法	29
<ul style="list-style-type: none"> • ADSC の採取と培養 • 脂肪と骨分化誘導 • 形態学的評価 • 細胞増殖能の評価 • フローサイトメトリー法による ALDH 活性の解析とセルソーティング • 蛍光免疫染色 • イメージングサイトメトリー法 • 統計解析 	
結果	32
<ul style="list-style-type: none"> • イヌ ADSC における ALDH 活性の解析 • 各亜集団の形態学的評価と、増殖率の比較 • 各亜集団の脂肪と骨への分化誘導と各種免疫染色 • 各亜集団の脂肪と骨への分化効率の比較 	
考察	33
図および表	35
<ul style="list-style-type: none"> • 図 1. ALDH 活性によるイヌ ADSC の亜集団の同定 • 図 2. 各亜集団の形態学的評価 • 図 3. 各亜集団の増殖率の比較 	

- 図 4. 各亜集団の脂肪と骨への分化誘導と各種免疫染色
- 図 5. 各亜集団の脂肪と骨への分化効率の比較

第三章 ALDH 活性を用いたマウス ADSC の機能的亜集団の解析

要約	46
諸論	47
材料と方法	47
• ADSC の採取と培養	
• 脂肪と骨分化誘導	
• 細胞増殖能の評価	
• フローサイトメトリー法による ALDH 活性の解析とセルソーティング	
• 蛍光免疫染色	
• 分化誘導効率の比較解析	
• マイクロアレイ解析	
• 統計解析	
結果	49
• マウス ADSC における ALDH 活性の解析	
• 各亜集団の増殖率の比較	
• 各亜集団の脂肪と骨への分化誘導と各種免疫染色	
• 各亜集団の脂肪と骨への分化効率の比較	
• マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子解析	
考察	50

図および表	52
-------------	----

- 図 1. ALDH 活性によるマウス ADSC の亜集団の同定
- 図 2. 各亜集団の増殖率の比較
- 図 3. 各亜集団の脂肪と骨への分化誘導と各種免疫染色
- 図 4. 各亜集団の脂肪と骨への分化効率の比較
- 図 5. マイクロアレイ解析による亜集団間の網羅的遺伝子発現解析

第四章 シスチントランスポーター (xCT) を用いたイヌ ADSC の機能的亜集団の解析

要約	63
----------	----

諸論	64
----------	----

材料と方法	65
-------------	----

- ADSC の採取と培養
- 脂肪と骨分化誘導
- 軟骨分化誘導
- フローサイトメトリー法による xCT の発現解析とセルソーティング
- 蛍光免疫染色
- リアルタイム PCR
- 統計解析

結果	67
----------	----

- イヌ ADSC における xCT の発現解析
- xCT 陽性集団と陰性集団における幹細胞マーカーの発現量の解析
- 脂肪分化誘導と脂肪分化マーカーの比較

- 骨分化誘導と骨分化マーカーの比較

- 軟骨分化誘導と軟骨分化マーカーの比較

考察 69

図および表 72

- 表 1. 使用したプライマー

- 図 1. xCT によるイヌ ADSC の亜集団の同定

- 図 2. 脂肪分化誘導と脂肪分化マーカーの比較

- 図 3. 骨分化誘導と骨分化マーカーの比較

- 図 4. 軟骨分化誘導と軟骨分化マーカーの比較

総合考察 85

謝辞 88

参考文献 89

序論

幹細胞とは、自己複製能と多分化能を有する細胞と定義されている [56]。生体における幹細胞の役割は、個体の発生から造血や組織修復など、生体の維持に重要な役割を有するほか、がんの発生や抗がん剤耐性などにもがん幹細胞が関与していることが明らかとなっており [12,57,64,66,68]、幹細胞に関する研究は多岐にわたっている。また、近年の基礎的研究においては、胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cells、以下 ESC) や、人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cells、以下 iPSC) などの分化全能性を有する細胞の樹立や培養に関する研究も盛んに行われている。ESC は初期胚の内部細胞塊より樹立され、培養条件下において分化全能性を有した状態での増殖が可能である [37]。また、iPSC とは、生体より採取した成熟細胞に Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc の 4 つの遺伝子の導入を行うことによって ESC に類似した分化全能性を人工的に獲得する細胞のことであり [60]、いずれにおいても創薬や再生医療への応用が期待されている。一方で、生体には造血を担う造血幹細胞や腸上皮細胞の供給を担う腸管幹細胞などの様々な幹細胞が存在し、組織に細胞を供給していることが知られている [13,66]。これらは成体幹細胞 (Adult Stem cells、以下 ASC) と呼ばれている。ASC のうち、中胚葉系組織を由来とする幹細胞の総称を間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells、以下 MSC) と呼ぶ [5]。MSC は脂肪、骨、軟骨などの間葉系組織への多分化能を有することが知られている [9]。ASC は ESC や iPSC などと比較して分化能に制限はあるものの、臨床試験に用いる場合に多くの利点が存在する。例えばヒト ESC は、子宮に移植すれば胎児として発生する受精卵を、発生途中で破壊して採取する細胞であるため、倫理的問題が解決されていないが、自己由来の体性幹細胞ならば倫理的問題は生じづらい。また、iPSC は遺伝子導入による癌化の危険性が指摘されているが [41]、ASC にはそのようなリスクは少ないと考えられている。

脂肪由来幹細胞 (Adipose-derived Stem/stromal Cells、以下 ADSC) は、間葉系幹細胞に属する幹細胞で、脂肪組織に存在し、脂肪細胞の前駆細胞として機能している。近年の研究において、脂肪、骨、軟骨、血管などに分化する多分化能が発見され [72]、以来、多くの研究がなされている。MSC に関する研究の多くは骨髄間質細胞より採取される骨髄由来間葉系幹細胞 (Bone Marrow Stem Cells、以下 BMSC) を対象に行われていることが多いが、ADSC は BMSC と比較して低侵襲かつ大量に分離可能であり、採取した組織における体積あたりの幹細胞数は BMSC と比較して多いという報告もあり、より臨床応用しやすい細胞であると考えられている [71]。現在、人医療における ADSC を用いた臨床試験は、虚血性心疾患、乳癌手術後の乳房再建、脊髄損傷、肝硬変、腎疾患、開腹手術後の難治性皮膚瘻、クローン病における難治性皮膚瘻、痔瘻など、様々な疾患に対して行われている [33]。しかしながら、症例間で一定の治療効果が得られないなどのばらつきや操作の煩雑さ、費用対効果等の課題などがあり、未だ保険適用を含めた臨床応用に至っていないのが現状であるため、より有用で実現可能な再生医療確立へ向けた研究が必要とされている。一方、獣医領域における ADSC を用いた再生医療は未だに研究段階である場合が多く、特に小動物医療における ADSC を用いた再生医療に関する臨床的なエビデンスデータは皆無に等しい。しかし、人医領域における ADSC を用いた再生医療に関する研究や、臨床試験などの発展を背景に、イヌやネコの難治性疾患に対して ADSC を用いた再生医療によって治療を行う試みが行われては始めている。小動物医療においては、脊髄損傷や変形性関節症などの難治性疾患に適応される場合が多い [15]。しかし、獣医領域においては ADSC に関する基礎的データが少なく、実際に症例に投与する場合の客観的な妥当性が低いという問題点があるため、獣医領域における ADSC に関する基礎的データの蓄積は急務であると言える。

しかしながら、小動物医療において ADSC を用いる利点は多い。例えば、人医療と同様に、イヌやネコに対して ESC や iPSC を用いる際の倫理的問題や、癌化のリスクに関する問題は未だに解決されていないため、臨床応用へのハードルは高い。また、これらの細胞の培養には遺伝子導入技術などの特殊な手技を要するため、仮に上記の問題が解決されたとしても、大学の付属動物病院などの限られた施設でしか行うことができないと考えられる。一方で、ADSC の培養は比較的簡便であるため、細胞培養や取り扱いに関する厳密なスタッフへの指導やガイドラインの遵守などを徹底することで、細胞のコンタミネーションなどの事故のリスクを抑え、より多くの獣医師が ADSC を用いた再生医療を安全に行うことができると考えられる。また、本邦における愛玩動物は主に小型犬やネコであり、BMSC の供給源である骨髄液の採取は限られる場合が多い。対して、ADSC は皮下脂肪より採取されるため、より豊富な細胞数を確保できると考えられる。

近年、ADSC が均質な細胞集団ではない可能性が示唆されており、これまでにいくつかの表面抗原マーカーによって、ADSC に含まれる複数の機能や、異なる分化能を有する亜集団が同定されてきた。例えば、マウスの ADSC 中の CD90 陽性集団は血管に分化しやすく、陰性集団は脂肪分化しやすいことが報告されているほか [59]、CD90 陽性集団は陰性集団と比較して iPS 細胞への導入効率が高いことが報告されている [26]。その他にも、CD105 陰性の ADSC は骨に分化しやすいことや [28]、CD73 陽性の ADSC は心筋細胞へ分化しやすいことなどが報告されている [30]。これらの基礎的研究を背景に、ADSC の亜集団を各種難治性疾患に用いることで、より効率的な再生医療の樹立を目指した研究が行われている。しかしながら CD90 や CD73 は、ADSC の分化や機能における役割が明確ではない。また、過去の報告においても、これらの表面抗原マーカーの機能に着目した報告は認められておらず、機能的亜集団を同定するマーカーと多分化能や分化効率の関連性に関

しては不明な点が多い。さらに、獣医領域における ADSC の機能的亜集団に関する報告は皆無である。

本研究では、細胞の分化や増殖、幹細胞性の維持など、細胞の機能に関与するとされる種々のマーカーを用いて、マウスとイヌの ADSC における機能的亜集団の探索を行なった。具体的には、第一章ではマウスとイヌの ADSC の細胞内リン酸化タンパクの発現を網羅的に解析した。第二章と第三章ではアルデヒド脱水素酵素 (Aldehyde Dehydrogenase、以下 ALDH) 活性をマーカーとして用い、マウスとイヌの ADSC に含まれる機能的亜集団の探索を行い、マウスの ADSC に関してはマイクロアレイ解析を行い、ALDH 活性と関連する遺伝子発現を網羅的に解析した。第四章では、癌幹細胞において細胞内抗酸化機能に寄与しているとされるシスチントランスポーターをマーカーに、イヌの ADSC における機能的亜集団の探索を行った。

第一章 フローサイトメトリー法を用いたマウスとイヌの ADSC における細胞内リン酸化タンパクの発現解析

要約

本研究では、マウスとイヌの ADSC に対して、細胞内リン酸化タンパクの網羅的発現解析を、フローサイトメトリー法を用いて行なった。ADSC は臨床的に健康な実験ビーグルと C57BL/6 マウスより採取し、それぞれ脂肪、骨、軟骨分化誘導を行った。さらに、過去の報告で細胞の分化や幹細胞性の維持に関与していると報告されている 13 種類の細胞内リン酸化に関連するマーカーに関してフローサイトメトリー法を用いて解析を行った。結果として、各種免疫染色により、マウスとイヌの ADSC の脂肪、骨、軟骨分化能が認められた。さらに、培養条件下においてマウスとイヌの ADSC は β -catenin と Akt のリン酸化に類似性が認められた。対して、Stat ファミリータンパク質のリン酸化には違いが認められた。以上のことから、マウスとイヌの ADSC は、どちらも脂肪、骨、軟骨分化能を有するが、未分化な状態における ADSC の幹細胞性の維持機構はマウスとイヌで異なる可能性が考えられた。

諸論

ADSC は人医療や獣医療における有用なソースとして期待されており、近年の基礎的研究によりマウスやヒトの ADSC における表面抗原の発現に関する報告は数多く認められ、CD34、CD44、CD90 などのマーカーが ADSC を同定するマーカーとして報告されている [27]。しかしながら、これらの表面抗原マーカーが細胞の分化や幹細胞性の維持に機能的に関与しているかは解明されていない。対して、細胞内タンパクのリン酸化は細胞の分化、増殖、移動、接着などに関与していることが知られており、マウスにおける研究においても、ADSC の脂肪、骨、軟骨分化におけるいくつかの細胞内シグナルの活性化が報告されている。しかしながら、これらの研究は分化前と分化後の比較を行っているものが多く、未分化な状態の ADSC に対して網羅的に細胞内タンパクのリン酸化を解析した報告は認められない。獣医領域においても、イヌにおける ADSC の多分化能に関する報告は認められるものの、詳細なメカニズムに関しては明らかになっていない。

本研究では、マウスとイヌの ADSC に対して細胞内リン酸化タンパクに関する網羅的解析を行い、マウスとイヌにおける発現の違いを比較解析した。

材料と方法

• マウスとイヌの ADSC の採取および培養

皮下脂肪組織は臨床的に健康な 2 頭の実験ビーグル (9.3kg、8 歳のメスと、9.0kg、6 歳のオス) と、4~6 週令の C57BL/6J マウス (KYUDO. CO., LTD, Saga, Japan) より採取した。イヌとマウスの ADSC の採取は、過去の報告に従って行った [38]。実験ビーグルより皮下脂肪組織を採取する際は、7mg/kg のプロポフォールを用いて導入し (1 % Propofol injection, Intervet, Tokyo, Japan)、酸素と 1.3%濃度のイソフルランによって維持した (Isoflurane, DS Pharma Animal Health Co., Osaka, Japan)。鎮痛には 20 μ g/kg のブプレノルフ

インと (Lepetan® Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan)、 0.2 mg/kg のメロキシカムを用いた (Metacam® Boehringer Ingelheim, Tokyo, Japan)。

採取した脂肪組織は Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (Wako, Osaka, Japan) を用いて洗浄し、細切したのちに high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Wako) に 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、 penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100 µg/ml) [PSM], amphotericin B (0.25 µg/ml) (100×Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) と collagenase type I (1.0 mg/ml) (Sigma-Aldrich) を加えた培地にて 37.5°C で 1 時間振盪した。その後、100-µm nylon mesh (EASYstrainer, 100 µm; Greiner Bio-one Japan, Tokyo, Japan) を用いてフィルタリングを行なったのち、FACS buffer (30 ml DPBS supplemented with 1% FBS and 1 mM EDTA·3Na [Wako]) に懸濁し、1,800 rpm で 5 分間遠心した。その後、ペレットを再懸濁し、プレート上で単層培養を行い、コンタミネーションなどが無いことを確認したのち、80~90%コンフルエントになった時点で trypsin 0.25% EDTA (Stem cell technologies, Canada) を用いて継代した。この作業を 4 継代まで行った。

ADSC の脂肪、骨、軟骨分化能を検討するため、分化誘導キットを用いて、プロトコルに従って分化誘導を行った (Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)。分化誘導方法は、まず α -MEM Basal Medium と D-MEM/F-12 Basal Medium を作成し、 α -MEM Basal Medium は α -MEM (MEM α with L-Glutamine and Phenol Red, Wako, Osaka, Japan) 90ml に 10 ml (10%) の FBS と、1ml の抗生物質-抗真菌剤混合溶液を加えた。D-MEM/F-12 Basal Medium は D-MEM/F-12 (D-MEM/Ham's F-12 with L-Glutamine and Phenol Red, Wako, Osaka, Japan) 49ml、ITS Supplement (インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸、牛血清アルブミン、リノール酸含有) 0.5ml と 0.5ml の抗生物質-抗真菌剤混合溶液を混合した。

脂肪分化誘導培地は、 α -MEM Basal Medium 5 ml に対し 50 μ l の Adipogenic Supplement (ハイドロコルチゾン、イソブチルメチルキサンチン、インドメタシン含有)を加え、Adipogenic differentiation medium とした。3.7 x 10⁵ cells/5 mL の α MEM Basal Medium に懸濁した ADSC を 24well プレートに 0.5 ml ずつまき、100 %コンフルエントとなるまで α MEM Basal Medium で単層培養した。その後 Adipogenic differentiation medium に培地を交換し、3~4 日おきに培地を交換しながら 37 °C、5 % CO₂ 存在下で 15 日間培養した。

骨分化誘導は、5 mL の α MEM Basal Medium に対し 250 μ L の Mouse/Rat Osteogenic Supplement (アスコルビン酸 2 リン酸、 β -グリセロ 2 リン酸、ヒト組み替え BMP-2) を加え、Osteogenic differentiation medium とした。7.4 x 10⁴ cells/5 mL の α MEM Basal Medium に懸濁した ADSC を 24well プレートに 0.5 ml ずつまき、50~70 %コンフルエントとなるまで α MEM Basal Medium で単層培養した。その後 Osteogenic differentiation medium に培地を交換し、2~3 日おきに培地を交換しながら 37 °C、5 % CO₂ 存在下で 15 日間培養した。

軟骨分化誘導は、2.5mL の D-MEM/F-12 Basal Medium に対し 25 μ L の Chondrogenic Supplement (デキサメタゾン、アスコルビン 2 リン酸、ピロリジン-2-カルボン酸、ピルピジン酸、ヒト組み替え TGF- β 3 含有)を加え、Chondrogenic Differentiation Medium とした。2.5 x 10⁵ cells の ADSC を 1 ml の D-MEM/F-12 Basal Medium に再懸濁し、1,800 rpm、15 °C で 5 分間遠心し、上清をアスピレートした。その後、0.5 ml の Chondrogenic Differentiation Medium を用い再懸濁し、1,800 rpm、15 °C で 5 分間遠心した。そのままペレットが崩れないようにインキュベーターにおき、キャップを緩めて空気の循環が起こるようにし、上清を 2~3 日おきに交換しながら 37 °C、5 % CO₂ 存在下で 17 日間培養した。

- 形態学的評価

培養細胞の形態学的評価はオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000; Keyence, Osaka, Japan) を用いて行った。

- 免疫染色

脂肪分化を同定するために、細胞を 10 µg/ml のヤギ抗マウス fatty acid-binding protein (FABP) 4 抗体を含んだ DPBS を用いて 1 時間インキュベートしたのち、phycoerythrin (PE)-conjugated secondary antibody (rabbit F(ab')₂ anti-goat IgG H&L (PE), pre-adsorbed; Abcam® Japan, Tokyo, Japan) を用いて 1 時間インキュベートした。DPBS を用いて洗浄したのち、5 µg/ml の Hoechst 33342 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いて核の染色を行なった。陰性対象として、一次抗体を含まない DPBS を用いて染色を行なった。観察はオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000) を用いて行った。

骨分化を同定するために、細胞を 10 µg/ml のヤギ抗マウス osteopontin 抗体を含んだ DPBS を用いて 1 時間インキュベートしたのち、phycoerythrin (PE)-conjugated secondary antibody を用いて 1 時間インキュベートした。DPBS を用いて洗浄したのち、Hoechst 33342 を用いて核の染色を行なった。陰性対象として、一次抗体を含まない DPBS を用いて染色を行なった。観察はオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000) を用いて行った。

軟骨分化を同定するために、固定した組織を凍結組織包埋剤 (Embedding Medium for Frozen Tissue Specimens to ensure Optimal Cutting Temperature (O.C.T.); Sakura Finetek USA, Torrance, CA, USA) を用いて包埋し、クライオスタット (CM 1950; Leica, Melbourne, Australia) を用いて 5~10 µm に細切し、切片をスライドに静置した。その後、スライドを 10 µg/ml のヒツジ抗マウス collagen II 抗体を含んだ DPBS を用いて 1 時間インキュベートしたのち、PE-conjugated donkey anti-sheep secondary antibody (Donkey F(ab')₂ Anti-Sheep IgG H&L (Phycoerythrin) preadsorbed; Abcam®) を用いて 1 時間インキュベートした。DPBS を用いて洗浄したのち、Hoechst 33342 を用いて核の染色を行なった。陰性対象として、一

次抗体を含まない DPBS を用いて染色を行なった。観察はオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000) を用いて行った。

- フローサイトメトリーによる細胞内リン酸化タンパクの発現解析

ディッシュ中でコンフルエントとなった ADSC を顕微鏡でバクテリアやカビなどのコンタミネーションがないかを観察した後、ピペットで培養容器内の培地をアスピレートし、PBS で細胞を洗い、1 mL/50 cm² のトリプシンを加え、細胞表面にトリプシンを満遍なく浸漬させた後 37 °C で 5 分間インキュベートした。顕微鏡で細胞を観察し、細胞が浮き上がってきているのを確認した後、10 ml の FACS Buffer で細胞を再懸濁させトリプシンを不活性化した。その後 1,800 rpm、15 °C で 5 分間遠心し、上清をアスピレートした後、20 ml の FACS Buffer に再懸濁した。10 µl の懸濁液と 10 µl のトリパンブルー (Trypan Blue, NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) を混合し、ビルケルチュルク血球計算版を用い、生細胞数をカウントした。その後 1,800 rpm、15 °C で 5 分間遠心し、 1×10^5 cells/100 µl (以下 1test) になるように FACS Buffer で再懸濁し、4 本のエッペンチューブ (INA・OPTIKA, Osaka, Japan) に分注し、2 µl/test の抗 CD13/32 抗体 (FcX Blocker, biolegend, San Diego, CA, USA) を加え、氷上で 5 分間インキュベートし、免疫グロブリンの Fc 受容体への蛍光抗体の非特異結合をブロックした。その後、1 µl/test の死細胞染色試薬 (Zombie NIR™, Biolegend, San Diego, CA, USA) を加え、室温で 20 分間インキュベートして死細胞をフローサイトメトリーで除去できるようにした。その後 1 ml の FACS Buffer を加え、1,800 rpm、15 °C で 5 分間遠心し、再度 100 µl の FACS Buffer に再懸濁した。その後、IC fixation buffer (Affymetrix Japan, Tokyo, Japan) を加えて振盪を行ったのち、蒸留水を用いて 10 倍に希釈した Permeabilization buffer (Affymetrix Japan) を用いて洗浄を行い、易透化を行った。その後、表 1 に示した抗体を用いて染色を行った。

全ての抗体は BD Biosciences (Tokyo, Japan) より購入した。染色した細胞はフローサイトメーター (Accuri C6; BD biosciences, NJ, USA) を用いて発現の解析を行い、データの解析は FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA) を用いて行い、isotype と比較して細胞の 10%以上が陽性の場合に発現ありと判断した。

結果

- マウスとイヌの ADSC の脂肪、骨、軟骨分化誘導と各種免疫染色

4 回継代を行なったマウスとイヌの ADSC を、位相差顕微鏡を用いて観察したところ、紡錘形の細胞形態を有していた (図 1. a、b)。

脂肪、骨、軟骨分化能を評価するため、マウスとイヌの ADSC をそれぞれの分化誘導培地を用いて *in vitro* での分化誘導を行った。その後、脂肪分化誘導を行った細胞は抗 FABP4 抗体を用いて免疫染色を行い、細胞質基質に脂肪滴を蓄積した脂肪細胞への分化が観察された (図 1. c、d)。骨分化誘導を行った細胞は抗 Osteopontin 抗体を用いて免疫染色を行い、細胞質内に顆粒を含む骨細胞への分化が観察された (図 1. e、f)。軟骨分化誘導を行った細胞は抗 Collagen II 抗体を用いて免疫染色を行い、細胞間に軟骨基質を含む軟骨細胞への分化が観察された (図 1. g、h)。

- マウスとイヌの ADSC における細胞内リン酸化タンパクの発現解析

細胞内タンパクのリン酸化を解析するために、 β -catenin、 β -catenin (pS45)、Akt (pT308)、Akt (pS473)、CD140b (pY1009)、Stat1 (pY701)、Stat3 (pY705)、Stat4 (pY693)、Stat5 (pY694)、Stat6 (pY641)、p38 MAPK (pT180/pY182)、Smad2 (pS465/pS467)/Smad3 (pS423/pS425)、ERK1/2 (pT202/pY204) の発現を、それぞれの特異的抗体とフローサイトメーターを用いて解析を行った。マウスの ADSC においては、 β -catenin、 β -catenin (pS45)、

Akt (pS473)、Stat4 (pY693) と Stat5 (pY694) の発現が認められた。イヌの ADSC においては β -catenin、 β -catenin (pS45)、Akt (pS473) と Stat4 (pY693) の発現が認められた (図 2)。

考察

本研究では、マウスとイヌの ADSC において脂肪、骨、軟骨への多分化能を有することを確認した。また、未分化な状態のマウスとイヌの ADSC は β -catenin、 β -catenin (pS45)、Akt (pS473) と Stat4 (pY693) の発現が認められ、Stat5 (pY694) の発現がマウスの ADSC でのみ認められた。

過去の報告では、WNT/ β -catenin シグナルの活性化が脂肪分化を抑制することがマウスとヒトの研究で分かっている。例えば、Wnt1 の過剰発現または Glycogen Synthase Kinase 3-b (GSK3b) のリン酸化阻害による β -catenin の変異は古典的経路の活性化を介して 3T3-L1 脂肪前駆細胞 (マウス胎児線維芽細胞の一種で、代謝性疾患の研究に広く用いられている) の脂肪分化を抑制することが分かっている [48]。その他の報告として、薬理的な GSK3b の阻害剤は脂肪分化を抑制すると報告されている [4]。しかしながら、WNT/ β -catenin とイヌの ADSC の関連に関する報告は認められない。本研究において、マウスやヒトと同様にイヌの ADSC においても WNT/ β -catenin シグナルが ADSC の脂肪分化の抑制に寄与している可能性が示唆された。

Protein kinase B としても知られている Akt は、セリン/スレオニン特異的タンパクキナーゼとして働いており、グルコース代謝、アポトーシス、細胞増殖、転写や細胞遊走などに関与している [34]。本研究では、Akt (pS473) の発現がマウスとイヌの ADSC でみとめられた。過去の報告では、mTOR 経路によって Akt の Ser473 がリン酸化されることが分かっている [40,52]。イヌの ADSC に関する報告としては、Akt の発現に関する報告は認められたが、そのリン酸化に関する報告は認められなかった [43]。また、マウスにおける

ADSC と Akt に関する報告に関しては、ErbB2 活性の抑制による Akt のリン酸化が細胞質内の脂質の蓄積を亢進すると報告されている他 [11]、マウスの 3T3-L1 細胞において、Akt の阻害薬が脂肪分化を抑制することが報告されている [70]。そのほか、Akt のリン酸化は褐色脂肪細胞への分化に必須であることや、PI3K の抑制がマウスにおける脂肪分化の抑制を制御していることが報告されている [18]。

本研究では、マウスの ADSC において Stat4 と Stat5 のリン酸化を認め、イヌの ADSC において Stat4 のみのリン酸化を認めた。過去の報告では mRNA レベルでの Stat4 の発現がマウスの ADSC において確認されているが [2]、タンパク質レベルでの Stat タンパクの発現に関する報告は皆無である。このことから、マウスとイヌにおける Stat4 と Stat5 の発現に関する報告は本研究が初となり、今後はこれらの機能を解析する必要がある。

人医療においては ADSC を用いた様々な臨床研究が行われているが、イヌの ADSC に関する基礎的研究は少なく、臨床試験を行う場合のエビデンスの乏しさが問題となっている。ADSC の表面抗原や遺伝子発現に関する網羅的研究はヒトやマウスに関していくつか報告されているが、細胞内リン酸化タンパクに関する網羅的検討は行われていない。本研究では、いくつかのリン酸化タンパクの発現が未分化なマウスとイヌの ADSC で認められたが、これらのタンパクのうち、ADSC の幹細胞性に寄与しているタンパクの同定には至らなかった。今後は、幹細胞性に寄与する細胞内シグナルに関するさらなる研究を行う必要があると思われるが、本研究はその基礎となる重要な情報を提供するかもしれない。

図および表

表 1. フローサイトメトリーに用いた各種抗体

TABLE 1: Antibodies used in this study

Target molecule	Abbreviation	Species Isotype	Label	Company	Clone	Dilution
Phosphorylated Human β -Catenin (pS45) Peptide	β -catenin (pS45)	Mouse (BALB/c) IgG1, κ	Alexa Fluor® 647	BD Biosciences	K63-363	1:50
Mouse β -Catenin aa. 571-781	β -catenin	Mouse IgG1	Alexa Fluor® 488	BD Biosciences	14/Beta-catenin	1:200
Phosphorylated Human Akt1 (pT308) Peptide	Akt (pT308)	Mouse IgG1, κ	Phycoerythrin	BD Biosciences	J1-223.371	1:50
Phosphorylated Human Akt1 (pS473) Peptide	Akt (pS473)	Mouse (BALB/c) IgG1, κ	Alexa Fluor® 647	BD Biosciences	M89-61	1:50
Phosphorylated Human PDGFR β (pY1009) Peptide	CD140b	Mouse IgG2b, κ	Phycoerythrin	BD Biosciences	J25-602	1:50
Phosphorylated Human Stat1 (pY701) Peptide	Stat1	Mouse IgG2a	Alexa Fluor® 488	BD Biosciences	4a	1:50
Phosphorylated Human Stat3 (pY705) Peptide	Stat3	Mouse IgG2a, κ	Phycoerythrin	BD Biosciences	4/P-STAT3	1:50
Phosphorylated Human Stat4 (pY693) Peptide	Stat4	Mouse IgG2b, κ	Alexa Fluor® 647	BD Biosciences	38/p-Stat4	1:50
Phosphorylated Human Stat5 (pY694) Peptide	Stat5	Mouse IgG1, κ	Alexa Fluor® 488	BD Biosciences	47/Stat5 (pY694)	1:50
Phosphorylated Human Stat6 (pY641) Peptide	Stat6	Mouse IgG1, κ	Phycoerythrin	BD Biosciences	J71-773.58,11	1:50
Phosphorylated Human p38 MAPK (pT180/pY182) Peptide	p38 MAPK	Mouse IgG1, κ	Phycoerythrin	BD Biosciences	36/p38 (pT180/pY182)	1:50
Phosphorylated Human Smad2 (pS465/pS467)/Smad3 (pS423/pS425) Peptide	Smad2/3	Mouse IgG1, κ	Alexa Fluor® 647	BD Biosciences	O72-670	1:200
Phosphorylated Rat ERK1 (pT202/pY204) Peptide	ERK1/2	Mouse IgG1	Alexa Fluor® 488	BD Biosciences	20A	1:50

図 1. マウスとイヌの ADSC の形態学的評価と免疫染色による脂肪、骨、軟骨分化誘導の評価

未分化なマウスとイヌの ADSC は紡錘形の細胞形態を有していた (a, b)。蛍光免疫染色法を用いて FABP4 (c, d)、Osteopontin (e, f) と Collagen II (g, h) の発現を検討し、それぞれ脂肪分化 (c, d)、骨分化 (e, f)、軟骨分化 (g, h) を示している。核は Hoechst 33342 を用いて染色を行なっている。Scale bar: 100 μ m

M-ADSC

C-ADSC

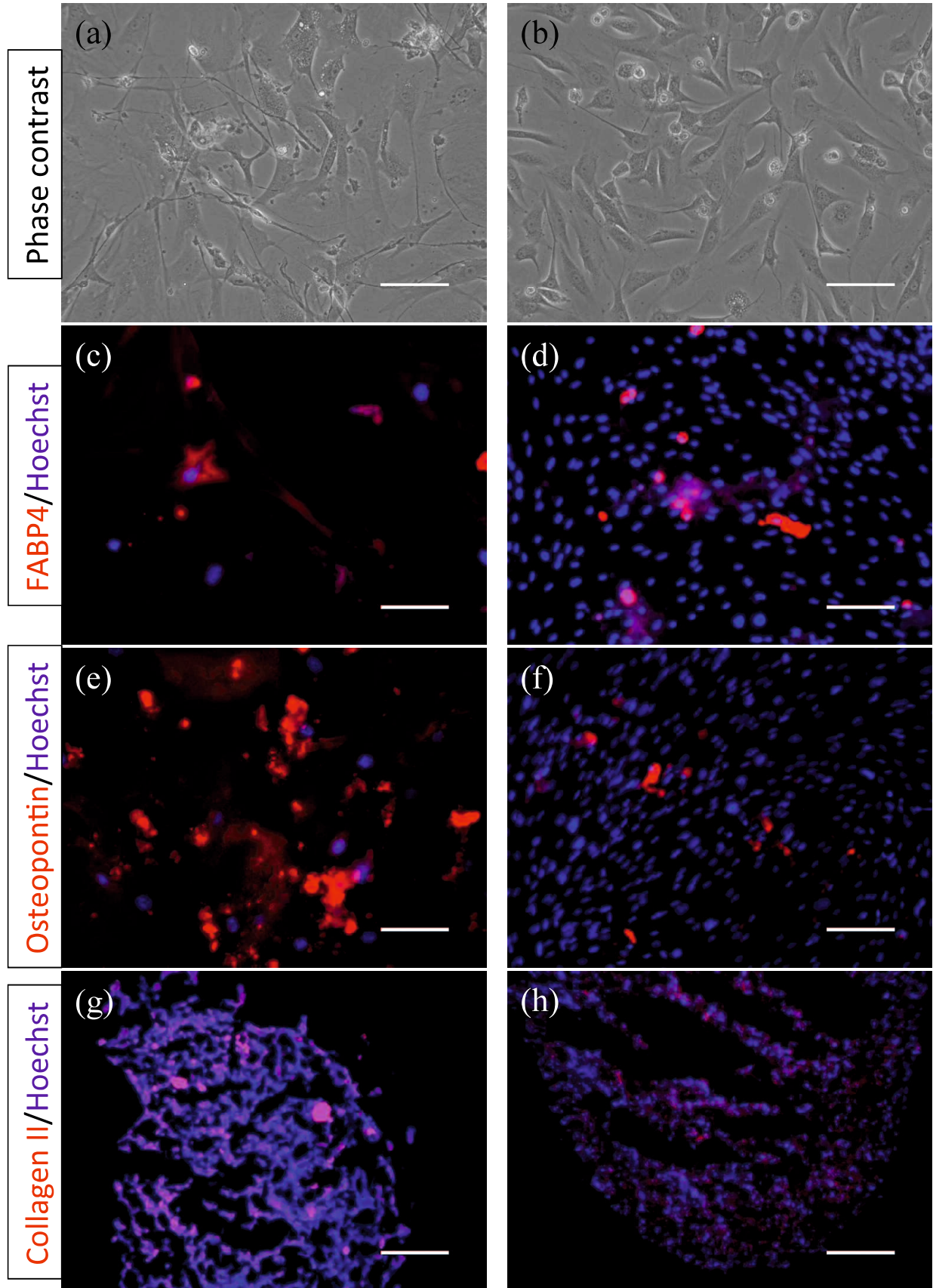
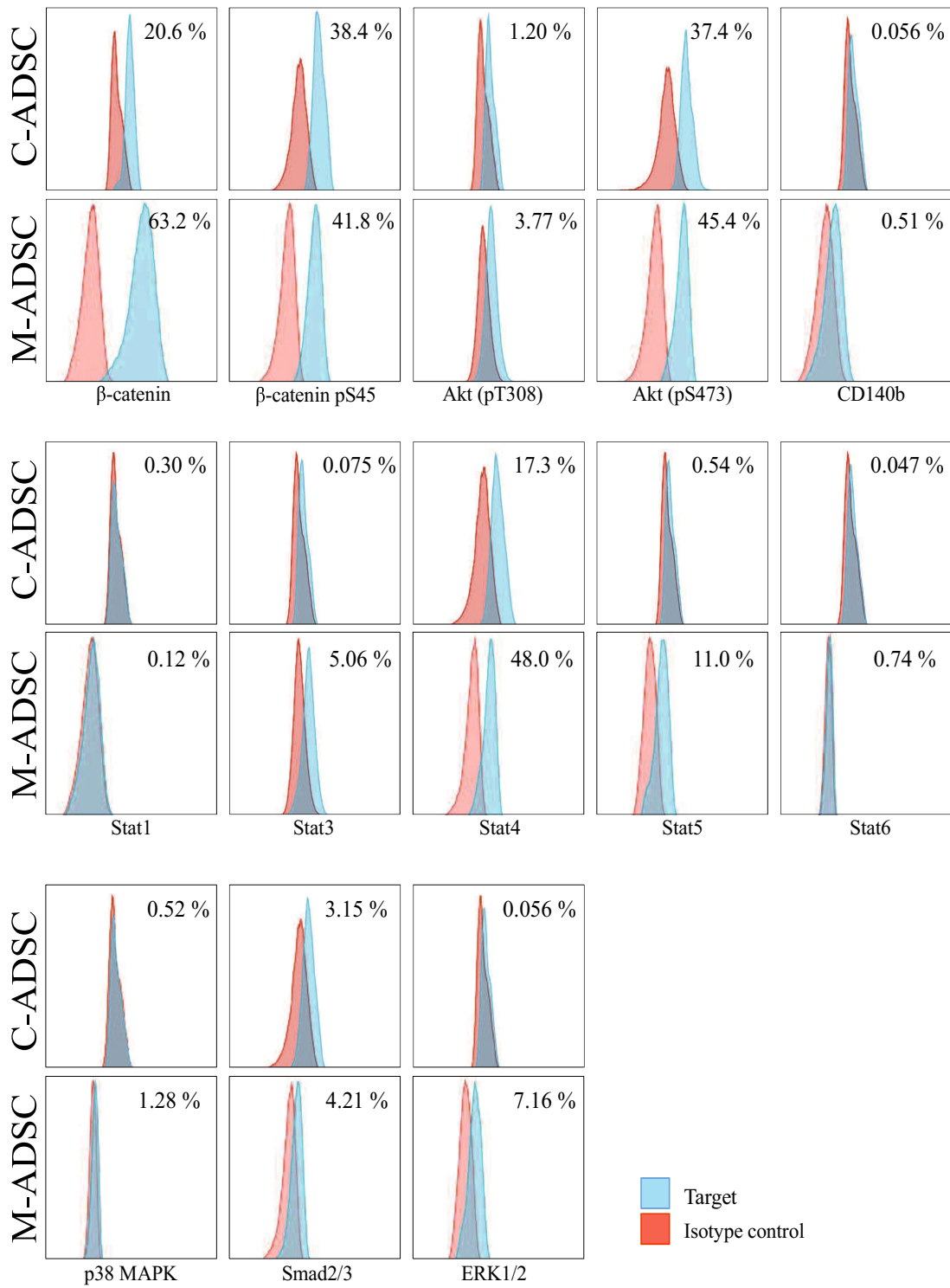


図 2. フローサイトメトリーによる細胞内リン酸化タンパクの発現

赤色の波形は Isotype control、青色の波形は各種のタンパクの発現を示しており、 β -catenin、 β -catenin (pS45)、Akt (pT308)、Akt (pS473)、CD140b (pY1009)、Stat1 (pY701)、Stat3 (pY705)、Stat4 (pY693)、Stat5 (pY694)、Stat6 (pY641)、p38 MAPK (pT180/pY182)、Smad2 (pS465/pS467)/Smad3 (pS423/pS425)、ERK1/2 (pT202/pY204) の発現を、それぞれの特異的抗体とフローサイトメーターを用いて解析を行った。マウスの ADSC においては、 β -catenin、 β -catenin (pS45)、Akt (pS473)、Stat4 (pY693) と Stat5 (pY694) の発現が認められた。イヌの ADSC においては β -catenin、 β -catenin (pS45)、Akt (pS473) と Stat4 (pY693) の発現が認められた。右上にそれぞれの陽性率を示している。



第二章 ALDH 活性を用いたイヌ ADSC の機能的亜集団の解析

要約

本研究では、造血幹細胞やがん幹細胞を同定するマーカーとして広く用いられている ALDH 活性をマーカーに、イヌの ADSC における機能的亜集団の同定と、その脂肪と骨への分化能の差異を解析した。結果として、培養条件下でのイヌ ADSC のうちおよそ 20%が ALDH 陽性であったが、ソーティングを行った ALDH 陽性集団と陰性集団には形態や増殖率に違いは認められなかった。さらに、ALDH 陽性集団と陰性集団に対して脂肪と骨に対する分化誘導と免疫染色を行ったところ、いずれも脂肪と骨への分化能が確認されたが、その分化効率は ALDH 陰性集団と比較して陽性集団の方がより高かった。以上のことから、イヌ ADSC には ALDH 活性の高い亜集団が存在し、これらは脂肪と骨への分化能の高い集団であった。本研究はイヌの ADSC における機能的亜集団を同定した初めての報告である。

諸論

第1章の結果より、マウスとイヌのADSCにおいて、 β -catenin と Akt のリン酸化が認められた。 β -catenin と Akt のリン酸化と MSC に関する報告は限られているが、Li らによって、腫瘍細胞による IL-1 の刺激を受けた MSC は PGE2 の分泌を促進し、 β -catenin と Akt のリン酸化を促進することが報告されている。さらに、PGE2 の刺激を受けた腫瘍細胞は ALDH1 の発現が上昇することが確認されている [29]。また、MSC はマクロファージの刺激を受けて PGE2 を分泌することが知られている [46]。これらのことから、幹細胞マーカーである ALDH はイヌの ADSC においても発現が認められる可能性があると考えた。

ALDH は細胞内酵素で、アルデヒドの酸化を触媒している [36]。ALDH はヒトでは 19 種類のスーパーファミリーが知られており [36]、高い ALDH 活性は、造血幹細胞やがん幹細胞などを同定するマーカーとして知られている [3,25]。アルデヒドは様々な代謝経路によって生合成され、主に膜脂質の過酸化によって生成されるが、その他にもアミノ酸、炭水化物、神経伝達物質の異化によっても生成される [35]。アルデヒドは生理学的に視覚、神経伝達や胎生発育などに重要な役割を有することが明らかとなっているが、ほとんどの場合は細胞障害性に働き、細胞内において解毒されるべきものである [36]。

ALDH 活性はその特性から、幹細胞において発現が認められるマーカーの一つとして知られており、特に癌幹細胞分野における研究が盛んに行われている。また、ASC においても ALDH 活性の高い細胞は高い幹細胞性を有することが知られており、特に、骨髄中の ALDH 活性の高い細胞集団は造血幹細胞を多く含むことが知られている [25]。MSC における ALDH 活性に関する報告は限られているが、ヒトの ADSC は ALDH 活性によって二集団に分けられることが報告されている [17]。さらに、ヒトの BMSC における ALDH 陽性集団は陰性集団と比較して骨分化能が高いことが報告されており [10]、ALDH 活性は MSC を用いた再生医療における新たな機能的マーカーとして注目されている。対して、

獣医療における ALDH 活性をマーカーとした幹細胞の同定に関する報告は限られており、メラノーマや乳腺腫瘍の細胞株における癌幹細胞を同定した報告を認めるのみである [50,67]。本研究では、イヌの ADSC における ALDH 活性をフローサイトメトリー法によって解析した。さらに、その分化効率の比較解析を行なった。

材料と方法

- ADSC の採取と培養

第一章に記載した方法で行った。

- 脂肪と骨分化誘導

セルソーター (SH800, Sony, Tokyo, Japan) を用いて分取した ADSC に対して、脂肪と骨分化能を評価するために各種分化誘導を行った。分化誘導方法は第一章に記載した方法で行った。

- 形態学的評価

第一章に記載した方法で行った。

- 細胞増殖能の評価

セルソーターを用いて ADSC を ALDH の高い集団と低い集団に分取し、それぞれの細胞集団における細胞増殖率を WST-8 (Cell Counting Kit-8, Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて求めた。細胞を 96-well プレートに 1500 個/well になるように播種し、播種後 12、24、48、72 時間後にそれぞれ解析を行った。それぞれの時点において、100 μ l の培地に対して

10 μ l の CCK-8 solution を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間培養を行った。その後、450 nm における吸光度を microplate spectrophotometer (Epoch, Biotek Japan, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

- フローサイトメトリー法による ALDH 活性の解析とセルソーティング

ディッシュ中でコンフルエントとなった ADSC を顕微鏡でバクテリアやカビなどのコンタミネーションがないかを観察した後、ピペットで培養容器内の培地をアスピレートし、PBS で細胞を洗い、1 mL/50 cm² のトリプシンを加え、細胞表面にトリプシンを満遍なく浸漬させた後 37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした。顕微鏡で細胞を観察し、細胞が浮き上がってきているのを確認した後、10 ml の FACS Buffer で細胞を再懸濁させトリプシンを不活性化した。その後 1,800 rpm、15 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、上清をアスピレートした後、20 ml の FACS Buffer に再懸濁した。10 μ l の懸濁液と 10 μ l のトリパンブルー (Trypan Blue, NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) を混合し、ビルケルチュルク血球計算版を用い、生細胞数をカウントした。その後 1,800 rpm、15 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、1test になるように FACS Buffer で再懸濁した後にエッペンチューブ (INA・OPTIKA, Osaka, Japan) に分注し、2 μ l/test の抗 CD13/32 抗体 (FcX Blocker) を加え、氷上で 5 分間インキュベートし、免疫グロブリンの Fc 受容体への蛍光抗体の非特異結合をブロックした。その後 1 μ l/test の死細胞染色試薬 (Zombie NIRTM) を加え、室温で 20 分間インキュベートして死細胞をフローサイトメトリーで除去できるようにした。その後 1 ml の FACS Buffer を加え、1,800 rpm、15 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、再度 100 μ l の FACS Buffer に再懸濁した。

ALDH 活性は、ALDH 測定キット (ALDEFLOUR, Stem Cell Technologies, Tokyo, Japan) を用いて製造元の指示に従って解析を行った。キットを室温に戻し、上記の方法で準備した懸濁液に 1 ml の Assay buffer を加えた Test チューブと、5 μ l のジエチルアミノベンズアルデヒド (以下 DEAB) を加えた Control チューブを用意し、Test チューブに 5 μ l の

Activated ALDEFLOUR Reagent を加え、すぐに Test チューブから Control チューブに 500 μ l の懸濁液を加えた。暗所、室温で 40 分間インキュベートし、1,800 rpm、15 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、上清をアスピレートした後、500 μ l の Assay buffer を加え、再懸濁した。その後セルストレイナーに通し、フローサイトメーター (AccuriTM C6) を用いて ALDH 活性を検出した。セルソーティングはセルソーター (SH800, Sony, Tokyo, Japan) を用いて行った。データ解析は FlowJo software (Tree Star) を用いて行った。

- 蛍光免疫染色

第一章に記載した方法で行った。

- イメージングサイトメトリー法

イメージング解析は IN cell analyzer 2200 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) を用いて行なった。1 ウェルあたり 9 視野を撮影し、Hoechst 33342 のチャンネルは 16.7 ms/30% のゲインで行い、フィコエリスリンのチャンネルは 2000 ms/50% のゲインで行なった。画像解析は Workstation 3.4 (for INcell 1000) を用いて行なった。

- 統計解析

統計解析は Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いて行い、結果は平均値 \pm 標準誤差で表示した。多重比較法は independent t test を用いて行い、p-value<0.05 で有意差ありと判定した。

結果

- イヌ ADSC における ALDH 活性の解析

イヌ ADSC における亜集団を同定するため、フローサイトメトリー法による ALDH 活性の解析を行なったところ、イヌ ADSC のうち、おおよそ 20%の細胞集団が ALDH 陽性集団として認められた (図 1)。

- 各亜集団の形態学的評価と、増殖率の比較

ソーティングを行い、ALDH 陽性集団と陰性集団に分取したイヌ ADSC を、それぞれ通常の培養条件下で 24 時間培養を行ったところ、ウェルへの生着が認められた。ALDH 陽性集団と陰性集団はそれぞれ形態学的な差異は認められなかった (図 2)。さらに、細胞増殖活性を ALDH 陽性集団と陰性集団で比較したところ、2 群間の増殖率に有意差は認められなかった (図 3)。

- 各亜集団の脂肪と骨への分化誘導と各種免疫染色

ソーティングを行なった ALDH 陽性集団と陰性集団に対して、脂肪と骨への分化能を評価するため、分化誘導培地を用いて *in vitro* での分化誘導を行った。15 日間の培養を行なった後、脂肪分化誘導を行った細胞は抗 FABP4 抗体を用いて免疫染色を行い、細胞質基質に脂肪滴を蓄積した脂肪細胞への分化が ALDH 陽性集団と陰性集団のいずれにおいても観察された。骨分化誘導を行った細胞は抗 Osteopontin 抗体を用いて免疫染色を行い、細胞質内に顆粒を含む骨細胞への分化が ALDH 陽性集団と陰性集団のいずれにおいても観察された (図 4)。

- 各亜集団の脂肪と骨への分化効率の比較

脂肪と骨への分化誘導を行なった ALDH 陽性集団と陰性集団のそれぞれに対し、脂肪と骨への分化効率の比較を、イメージングサイトメーターを用いた蛍光免疫染色の陽性面積率によって比較した。すると、脂肪分化効率と骨分化効率のいずれにおいても、ALDH 陽性集団が陰性集団と比較して有意に陽性面積率が高かった (図 5)。

考察

本研究において、イヌの ADSC のうちおおよそ 20%の ALDH 陽性集団が認められた。さらに、ソーティングを行なった ALDH 陽性集団と陰性集団はそれぞれ脂肪と骨への分化能を有していたが、その分化効率はいずれも ALDH 陽性集団の方が陰性集団と比較して高かった。以上のことから、イヌ ADSC に含まれる ALDH 陽性集団は、脂肪と骨への分化効率の高い集団であるということが示唆された。

過去の報告では、ALDH2 の活性化が PPAR γ の活性化を介してマウス ADSC の脂肪分化能を活性化することが明らかとなっている他 [69]、ヒトの BMSC は ALDH 活性によって 2 集団に分取され、ALDH 陽性集団は骨分化能が高いことが示唆されている [10]。本研究における ADSC を含めたイヌの MSC における ALDH 活性に関する報告は本研究が初である。また、イヌ ADSC の機能的亜集団を同定した報告は過去に認められない。

ADSC は脂肪組織より採取されることから、臨床応用に使いやすい細胞であると考えられており、様々な臨床試験に用いられている。しかしながら、ADSC を用いた幹細胞医療には臨床的に治療効果が一定ではないという大きな問題が存在する。例えば、人医領域における痔瘻に対する瘻孔充填術における ADSC の有効性に関しては、臨床的に有用であったという報告と、有用ではなかったという異なる報告が存在する [20-22]。本研究においては、ALDH 活性によって ADSC に含まれる脂肪と骨への分化能の高い機能的亜集団

を同定することができた。このことは、ALDH 活性によって同定される ADSC の機能的亜集団は、臨床応用において、より治療効果が高く、安定した成績をもたらす可能性がある。また、ADSC は脂肪と骨のみならず、軟骨、心筋、血管内皮など、様々な細胞に分化することが知られている [6,39,72]。今後は、ADSC の機能的亜集団を同定する新たなマーカーや、新しい分化能、機能的亜集団を用いた ADSC の臨床的な治療効果の検討などを行っていく必要があると考えられる。

図および表

図 1. ALDH 活性によるイヌ ADSC の亜集団の同定

ALDH 阻害薬である DEAB を添加して解析を行った細胞をコントロールとした (B)。イヌ ADSC はコントロールと比較して 20%程度の ALDH 陽性細胞集団を認めた (A)。

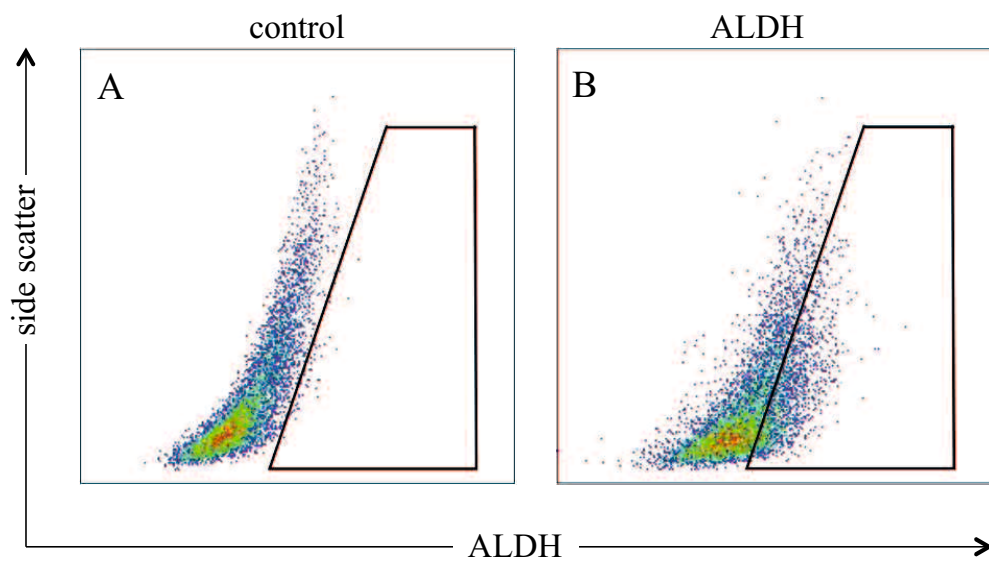
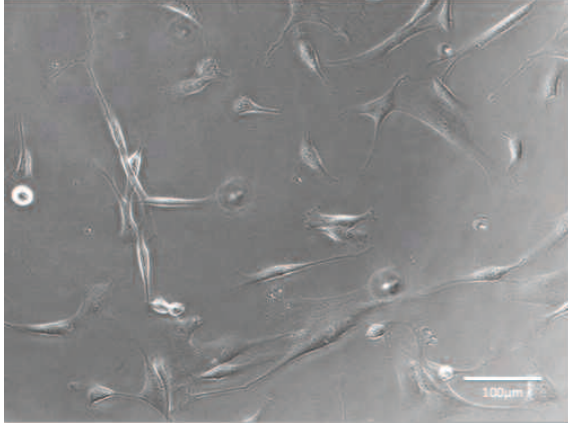


図 2. 各亜集団の形態学的評価

ソーティングを行なった ALDH 陽性集団と陰性集団を 24 時間培養し、位相差顕微鏡を用いて形態観察を行ったところ、類似した紡錘形の細胞形態が認められた。Scale bar: 100 μ m.

ALDH^{Hi}



ALDH^{Lo}

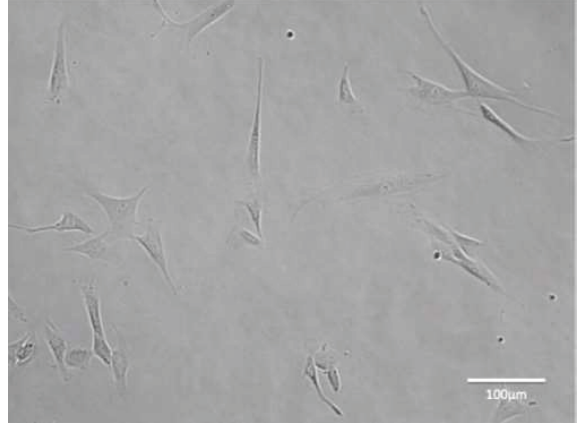


図 3. 各亜集団の増殖率の比較

細胞増殖活性を ALDH 陽性集団と陰性集団で比較したところ、2 群間の増殖率に有意な差は認められなかった。Values are expressed as mean \pm standard error (n=6). ns, not significant.

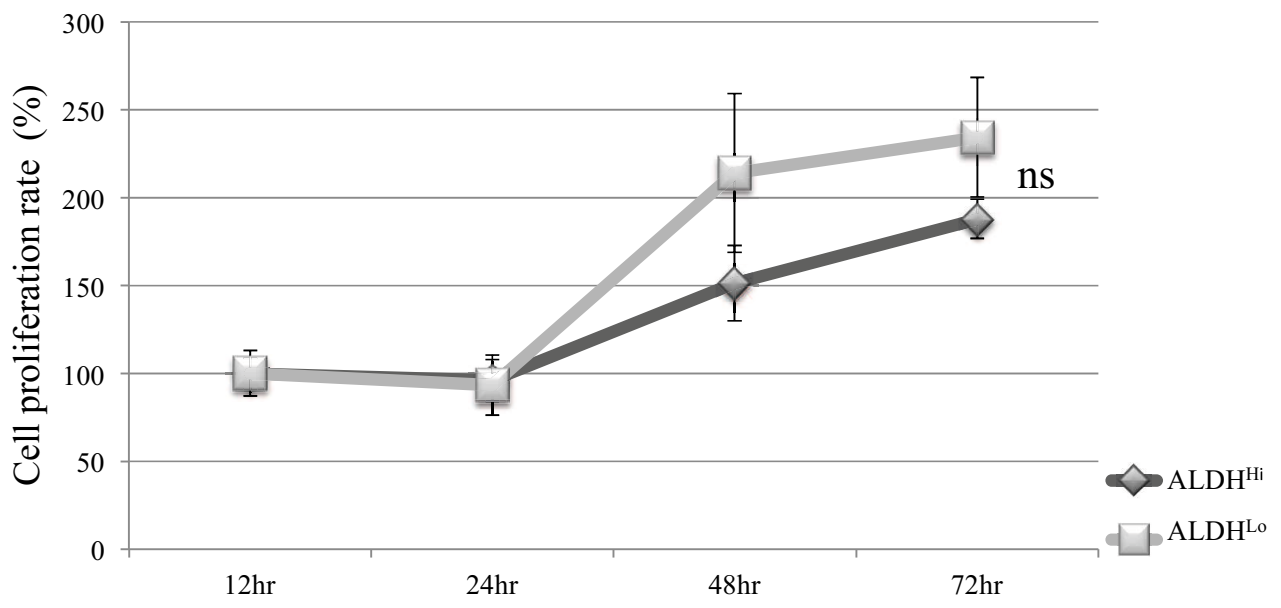


図 4. 各亜集団の脂肪と骨への分化誘導と各種免疫染色

イヌ ADSC の ALDH 陽性集団と陰性集団における脂肪と骨分化能を免疫染色によって評価した。脂肪分化を FABP4 (A, B)、骨分化を Osteopontin (C, D) を用いて解析したところ、ALDH 陽性集団と陰性集団のいずれも FABP4 (A, B) と Osteopontin (C, D) の発現を認めた (赤色)。核は Hoechst 33342 を用いて染色した (青色)。Scale bar: 100 μ m.

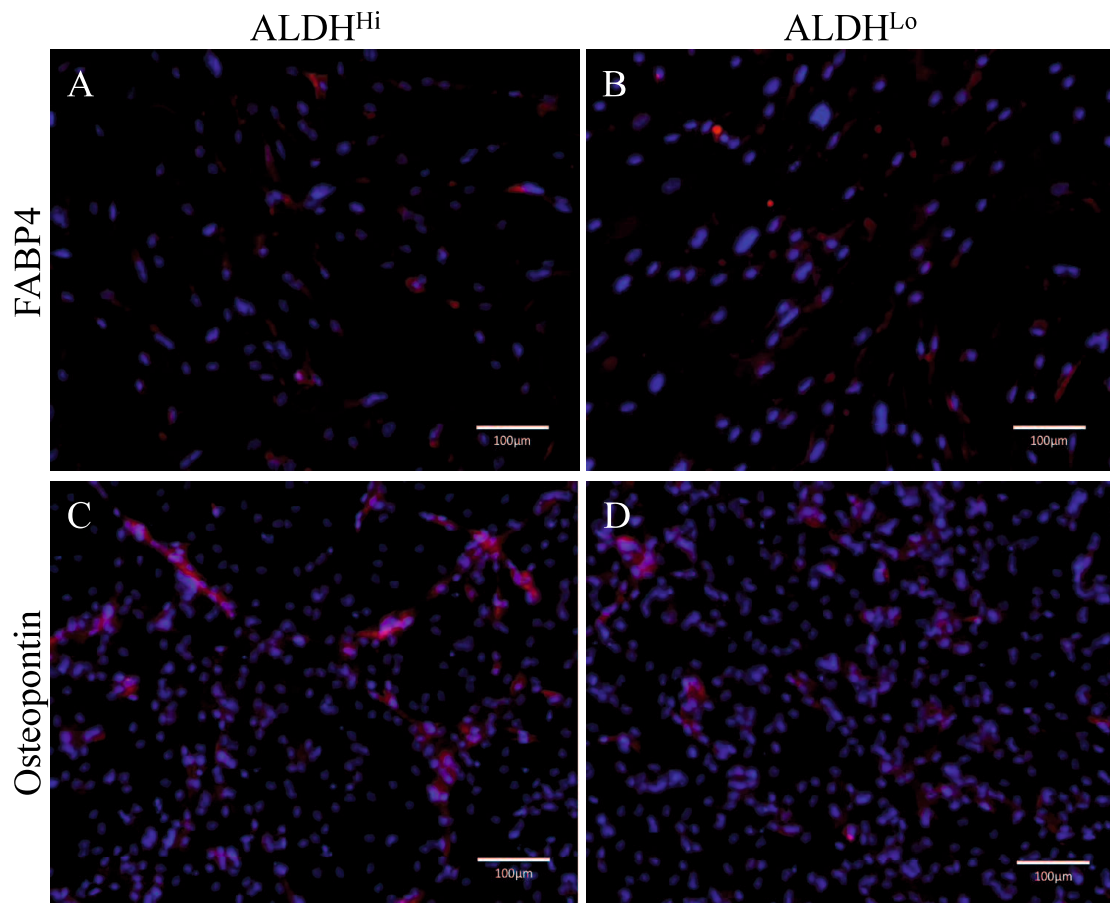
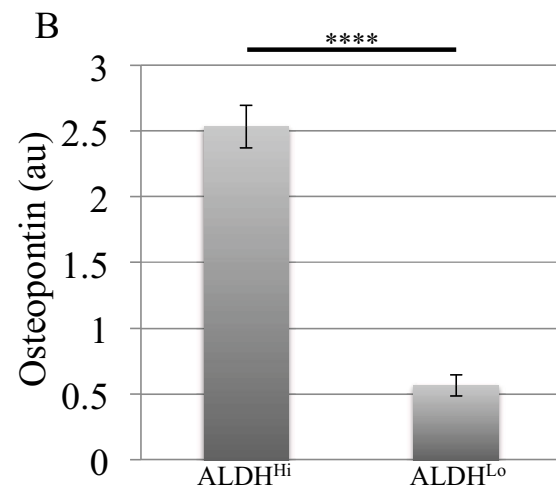
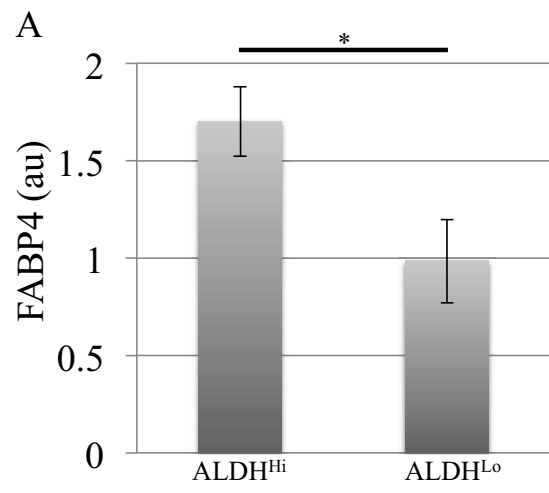


図 5. 各垂集団の脂肪と骨への分化効率の比較

脂肪と骨への分化誘導を行った ALDH 陽性集団と陰性集団のそれぞれに対して、定量的な免疫染色陽性面積率の比較を行った。それぞれの核染色面積に対する FABP4 と Osteopontin の面積を、イメージングサイトメーターを用いて定量解析を行ったところ、FABP4 と Osteopontin のいずれにおいても ALDH 陽性集団の方が陰性集団と比較して有意に高い面積率であった (A、B)。Values are expressed as mean \pm standard error (n=5). *P<0.05, ****P<0.0001; au, arbitrary unit.



第三章 ALDH 活性を用いたマウス ADSC の機能的亜集団の解析

要約

本研究では、造血幹細胞やがん幹細胞を同定するマーカーとして広く用いられている ALDH 活性をマーカーに、マウスの ADSC における機能的亜集団の同定を試みた。結果として、培養条件下でのマウス ADSC のうちおよそ 15%が ALDH 陽性であったが、ソーティングを行った ALDH 陽性集団と陰性集団には増殖率に違いは認められなかった。さらに、ALDH 陽性集団と陰性集団に対して脂肪と骨に対する分化誘導と免疫染色を行ったところ、いずれも脂肪と骨への分化能が確認されたが、その分化効率は ALDH 陰性集団と比較して陽性集団の方がより高かった。さらに、網羅的遺伝子発現解析によって、ALDH 陰性集団と陽性集団における遺伝子発現の網羅的解析を行ったところ、ALDH 陰性集団と比較して陽性集団においてリボソーム生合成に関与する遺伝子セットの発現上昇が認められた。以上のことから、マウス ADSC には ALDH 活性の高い亜集団が存在し、これらは脂肪と骨への分化能の高い機能的亜集団であった。さらに、マウス ADSC における幹細胞性にはリボソームが関与している可能性が示唆された。

諸論

第二章において、イヌ ADSC は ALDH 活性によって陽性集団と陰性集団に分取され、陽性集団は陰性集団と比較して脂肪と骨分化能の高い細胞集団であった。

マウスにおいて、ALDH はアルデヒドの酸化を触媒する酵素群で、20 種類のスーパーファミリーが知られている [36]。高い ALDH 活性は、造血幹細胞やがん幹細胞などを同定するマーカーとして知られている [3]。しかしながら、ADSC と ALDH に関する報告は少なく、ヒト ADSC において高い ALDH 活性を持つ集団が報告されている他 [17]、第二章にてイヌ ADSC においても同様に高い ALDH 活性を持つ集団が認められたが、マウスの ADSC における ALDH 活性に関する報告は認められない。さらに、ALDH 活性が ADSC の幹細胞性や多分化能に与える影響については明らかとなっていない。そこで本研究では、マウス ADSC における ALDH 活性による亜集団の同定をフローサイトメトリー法によって行い、その分化効率の差を解析した。さらに、ALDH 陽性集団と陰性集団の転写プロファイルを網羅的遺伝子発現解析によって行った。

材料と方法

- ADSC の採取と培養

第一章に記載した方法で行った。

- 脂肪と骨分化誘導

第一章に記載した方法で行った。

- 細胞増殖能の評価

第二章に記載した方法で行った。

- フローサイトメトリー法による ALDH 活性の解析とセルソーティング

第二章に記載した方法で行った。

- 蛍光免疫染色

第一章に記載した方法で行った。

- 分化誘導効率の比較解析

脂肪と骨への分化誘導を行なった ALDH 陽性集団と陰性集団に対して各種免疫染色を行い、その蛍光強度の定量化を行なった。具体的には、蛍光顕微鏡によって 1 ウェルあたり 10 視野をランダムに撮影し、これを 3 ウェルに対して行なった。数値は、1 視野における蛍光免疫染色陽性面積をヘキスト 33342 の陽性面積で割り、任意単位とした。解析は付属のソフトウェアを用いて行なった。

- マイクロアレイ解析

供与 total RNA を NanoDrop (ND-2000) による吸光度測定を行い RNA 濃度と RNA 量を算出した。また、Agilent Bioanalyzer を用いて、エレクトロフェログラム (電気泳動像) 及び RIN 値 (RNA Integrity Number) を測定した。各検体について Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color (Agilent technologies) を使用して推奨プロトコルに従い、100 ng の total RNA を用いて、in vitro transcription 反応により Cyanine3 標識 cRNA の合成を行った。cRNA の精製を行った後、吸光度測定により cRNA 量の測定および Cyanine3 取り込み効率を算出した。0.6 µg の Cyanine3 標識 cRNA を用いて断片化を行った後、Agilent SurePrint G3 Mouse GE 8×60K マイクロアレイに 65 °C, 17 時間のハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションに続いて洗浄を行い、専用スキャナー (Agilent

Technologies) にて画像を取得した。Agilent Feature Extraction ソフトウェアにより画像を数値化し、Raw データ (テキストファイル) を作成した。Raw データをもとに、平均値を 2500 に合わせたグローバルノーマライゼーションを行い、アノテーション情報、KEGG Pathway 情報を付加したファイルを作成した。

- 統計解析

統計解析は Prism 4.0 (GraphPad Software) を用いて行い、結果は平均値±標準誤差で表示した。二群の比較は independent t test を用いて行い、多重比較解析は one-way analysis of variance (ANOVA) を用いて行った。p-value<0.05 で有意差ありと判定した。

結果

- マウス ADSC における ALDH 活性の解析

マウス ADSC における亜集団を同定するため、フローサイトメトリー法による ALDH 活性の解析を行なったところ、マウス ADSC のうち、おおよそ 15% の細胞集団が ALDH 陽性集団として認められた (図 1)。

- 各亜集団における増殖率の比較

ALDH 陽性集団と陰性集団に分取したマウス ADSC の細胞増殖活性を ALDH 陽性集団と陰性集団で比較したところ、2 群間の増殖率に有意な差は認められなかった (図 2)。

- 各亜集団の脂肪と骨への分化誘導と各種免疫染色

ソーティングを行なった ALDH 陽性集団と陰性集団に対して、脂肪と骨への分化能を評価するため、分化誘導培地を用いて in vitro での分化誘導を行った。15 日間の培養を行

なった後、脂肪分化誘導を行った細胞は抗 FABP4 抗体を用いて免疫染色を行い、細胞質基質に脂肪滴を蓄積した脂肪細胞への分化が ALDH 陽性集団と陰性集団のいずれにおいても観察された。骨分化誘導を行った細胞は抗 Osteopontin 抗体を用いて免疫染色を行い、細胞質内に顆粒を含む骨細胞への分化が ALDH 陽性集団と陰性集団のいずれにおいても観察された (図 3)。

- 各亜集団の脂肪と骨への分化効率の比較

脂肪と骨への分化誘導を行なった ALDH 陽性集団と陰性集団のそれぞれに対し、脂肪と骨への分化効率の比較を、蛍光顕微鏡を用いた蛍光免疫染色の陽性面積率によって比較した。すると、脂肪分化効率と骨分化効率のいずれにおいても、ALDH 陽性集団が陰性集団と比較して有意に陽性面積率が高かった (図 4)。

- マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子解析

ALDH 活性によってソーティングを行なったマウスの ADSC に対して、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) によって既知の遺伝子セットの発現の有無を解析したところ、ALDH 陽性集団は陰性集団と比較してリボソーム形成に関与する遺伝子セットの発現の上昇が認められた (図 5)。

考察

MSC は CD29、CD73、CD90 や CD105 などの発現が陽性であり、CD45 や CD56 などの発現が陰性であると言われている [62]。特に ADSC は、CD34 や CD44 が陽性であると言われている [27,45]。近年、CD90 や CD105 などのマーカーは採取した ADSC のすべての細胞に発現せず、少数の亜集団に発現していることが分かっており、これらは ADSC

が不均一な細胞集団であることを示唆している [26,59]。本研究では、マウスの ADSC において ALDH 活性の高い亜集団を同定した。高い ALDH 活性は、造血幹細胞やがん幹細胞を同定するマーカーとして報告されている [3]。しかしながら、MSC に関しては ALDH と分化能に関する報告は少ない。Estes らはヒトの ADSC に ALDH 活性の高い集団が存在することが報告されているが、その分化能の差異に関する報告は認められない [17]。本研究では、培養条件下におけるマウスの ADSC におおよそ 15%程度の ALDH 陽性集団を認めた。加えて、脂肪と骨への分化誘導を ALDH 陽性集団と陰性集団に対して行なったところ、ALDH 陽性集団は陰性集団と比較して高い脂肪分化能と骨分化能を認めた。本研究は、マウスの ADSC において ALDH 活性を認め、その亜集団が高い脂肪と骨への分化能を有することを明らかにした初めての報告である。

リボソーム生合成と幹細胞の関連に関する報告は少ない。近年の研究で、ショウジョウバエの発生において、リボソーム生合成を抑制した状態では正常な生殖幹細胞の分化が認められないという報告が認められ、これまで幹細胞の維持に関与すると示されていたメカニズムとは異なる機構が存在する可能性が示唆された [51]。また、造血幹細胞において、RUNX1 の発現低下が、造血幹細胞の増殖や活性に加えて、リボソーム生合成能の低下を伴うことが報告され、リボソームと幹細胞性の関連が示唆されている [8]。MSC とリボソームに関しては、60S リボソームは MSC の骨分化に重要な役割を持つことが示唆されている [31]。今回、GSEA によって ALDH 陽性集団は陰性集団と比較してリボソーム関連遺伝子の発現が活性化していることが明らかとなった。このことは、高い ALDH 活性が脂肪と骨分化能の上昇に寄与する機序として、リボソーム生合成の差が関与している可能性が示唆された。

図および表

図 1. ALDH 活性によるマウス ADSC の亜集団の同定

ALDH 阻害薬である DEAB を添加して解析を行った細胞をコントロールとした (A)。マウス ADSC はコントロールと比較して 15%程度の ALDH 陽性細胞集団を認めた (B)。

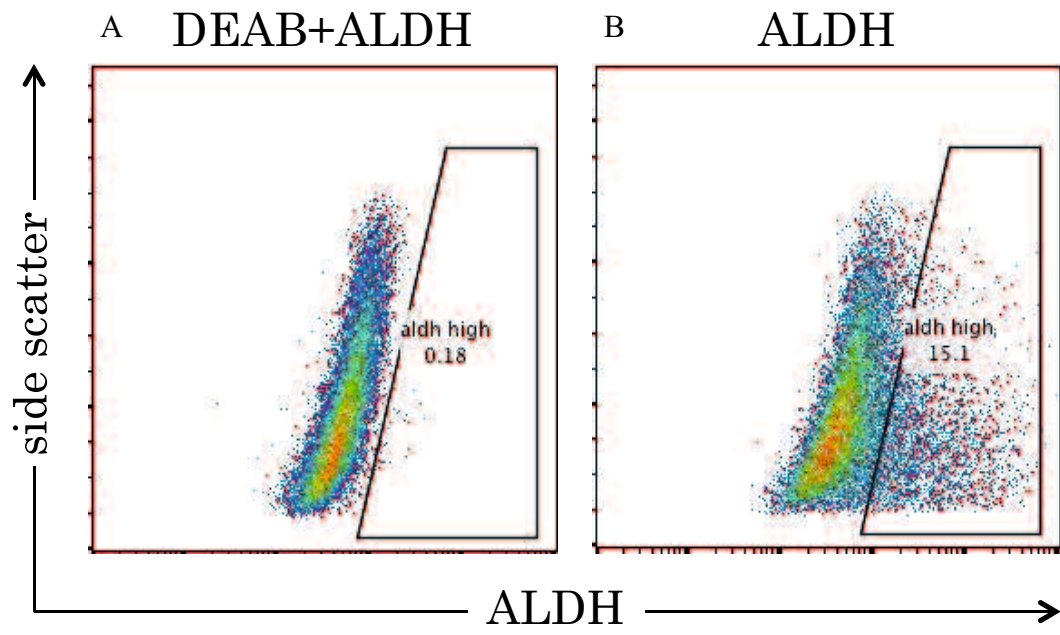


図 2. 各亜集団の増殖率の比較

細胞増殖活性を ALDH 陽性集団と陰性集団で比較したところ、2 群間の増殖率に有意な差は認められなかった。ns, not significant.

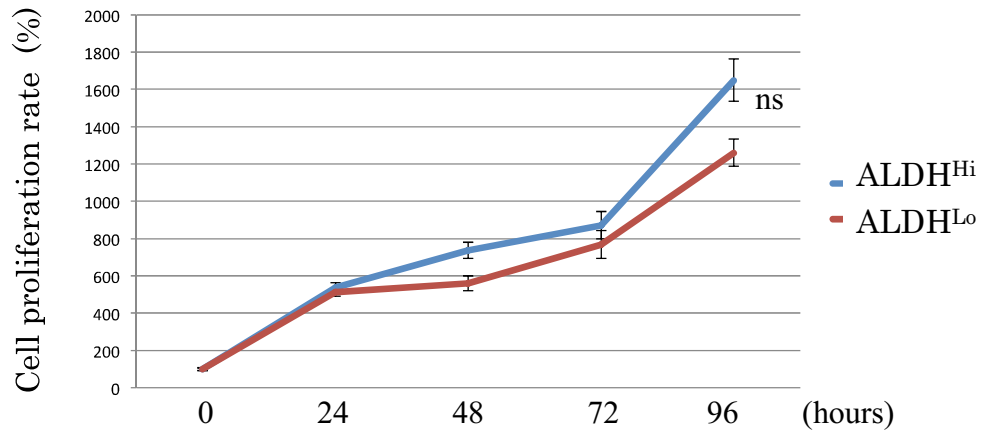


図 3. 各亜集団の脂肪と骨への分化誘導と各種免疫染色

マウス ADSC の ALDH 陽性集団と陰性集団における脂肪と骨分化能を免疫染色によって評価した。脂肪分化を FABP4 (A, B)、骨分化を Osteopontin (C, D) を用いて解析したところ、ALDH 陽性集団と陰性集団のいずれも FABP4 (A, B) と Osteopontin (C, D) の発現を認めた (赤色)。核は Hoechst 33342 を用いて染色した (青色)。Scale bar: 100 μ m.

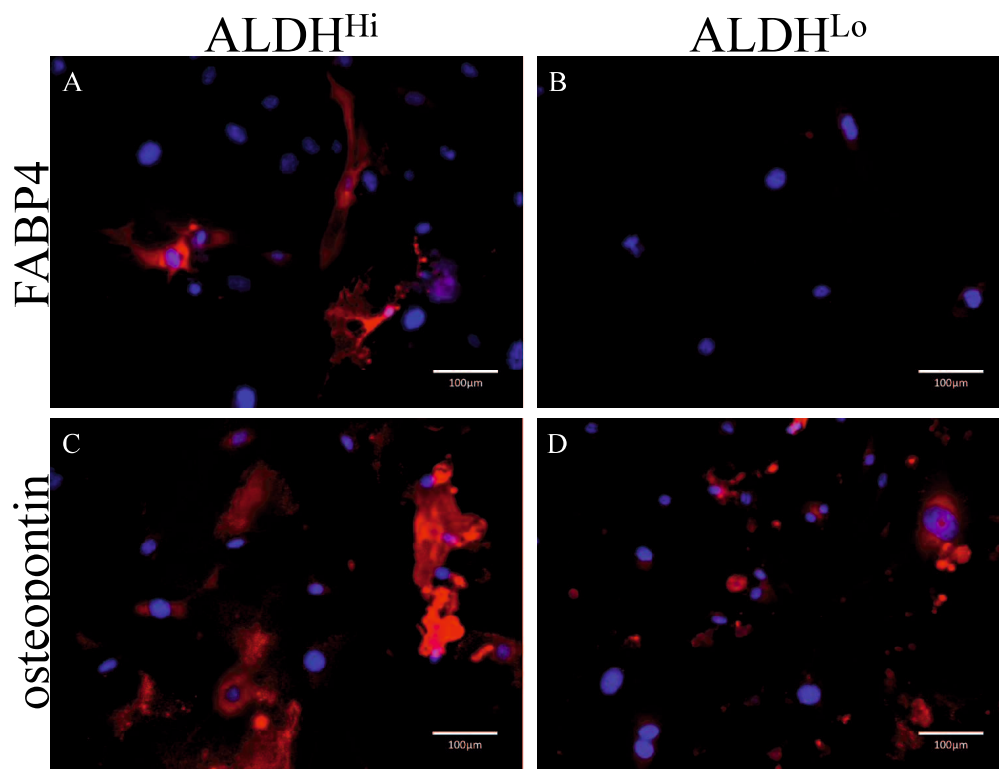


図 4. 各亜集団の脂肪と骨への分化効率の比較

脂肪と骨への分化誘導を行った ALDH 陽性集団と陰性集団のそれぞれに対して、定量的な免疫染色陽性面積率の比較を行った。それぞれの核染色面積に対する FABP4 と Osteopontin の面積を、イメージングサイトメーターを用いて定量解析を行ったところ、FABP4 と Osteopontin のいずれにおいても ALDH 陽性集団の方が陰性集団と比較して有意に高い面積率であった (A、B)。Values are expressed as mean \pm standard error (n=5). *P<0.05, ****P<0.0001; au, arbitrary unit.

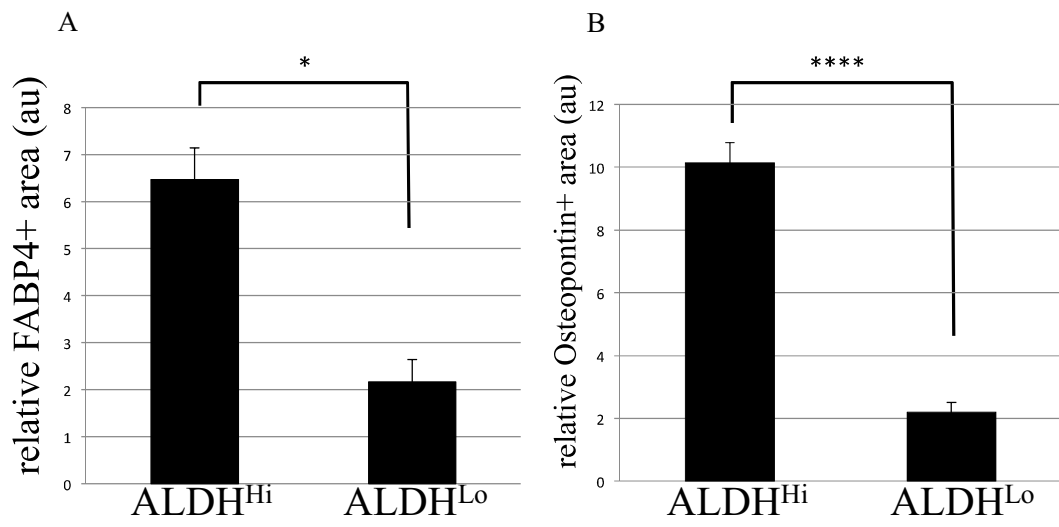
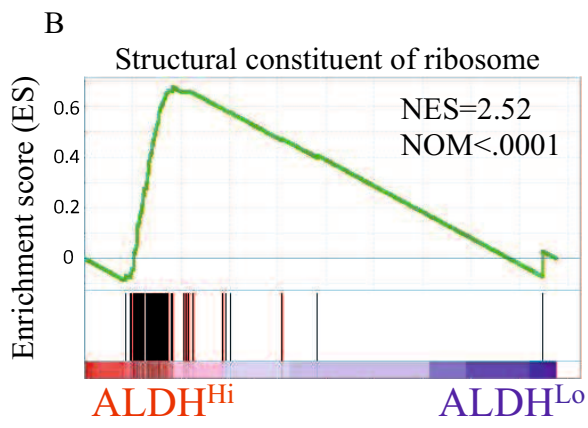
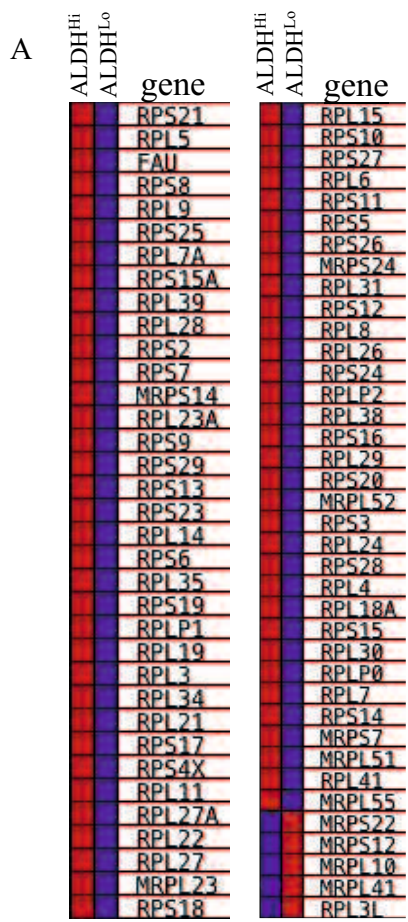


図 5. マイクロアレイ解析による亜集団間の網羅的遺伝子発現解析

ALDH 陽性集団と陰性集団間におけるリボソーム生合成に関与するターゲット因子群の発現を示したヒートマップ (A) と、Gene set enrichment analysis による発現量の解析 (B)。

Normalized enrichment score (NES)、nominal (NOM) と P 値を示した。



Higher expression

Lower expression

第四章 シスチントランスポーター (xCT) を用いたイヌ ADSC の機能的亜集団の解析

要約

本研究では、シスチントランスポーター (xCT) をマーカーとして、イヌ ADSC における機能的亜集団の探索を行った。xCT は CD44 と結合し、シスチンの取り込みを活性化して細胞内でのグルタチオンの産生を促進し、酸化ストレスへの抵抗性を獲得していることが明らかとなっており、これらは胃がんや大腸がんにおけるがん幹細胞のマーカーとして知られている。フローサイトメトリー法を用いて、イヌの ADSC における xCT の発現を解析したところ、CD44 陽性集団に少数の CT 陽性集団が認められた。さらに、xCT 陽性集団は幹細胞マーカー遺伝子の発現量や、脂肪分化誘導を行った時の脂肪分化マーカーの発現量が陰性集団と比較して有意に高かったが、骨分化マーカーに関しては xCT 陰性集団の方が有意に高かった。以上のことから、xCT はイヌ ADSC における機能的亜集団を同定するマーカーであることが明らかとなった。さらに、xCT は脂肪分化を促進し、骨分化を抑制するマーカーである可能性が示唆された。

諸論

表面抗原マーカーの一つである CD44 は、乳癌、前立腺癌や大腸癌などに存在する癌幹細胞を同定するマーカーとして広く用いられている [1,14,16]。近年、Ishimoto らにより、胃癌における幹細胞群に発現する CD44 のヴァリアントアイソフォーム (CD44v) の一つがシスチントランスポーターのサブユニット (xCT) と結合し、シスチンの取り込みを活性化して細胞内でのグルタチオンの産生を促進し、酸化ストレスへの抵抗性を獲得していることが明らかにされた [23]。本報告は、癌幹細胞を同定する表面抗原マーカーが、幹細胞性を保つ抗酸化機能を有することを明らかにした初めての報告である。さらに、近年の研究で既存薬であるスルファサラジンが xCT を特異的に阻害することが分かっており [32]、癌幹細胞研究分野では大規模臨床試験が行われている [54,55]。

xCT と MSC の関係に関する報告は限られているが、マウスの BMSC を用いた研究で、環境中のグルタミンが xCT に作用し、骨芽細胞への分化を抑制することが分かっている [61]。しかし、xCT が MSC における機能的亜集団を同定するマーカーであるかどうかは分かっていない

CD44 は癌幹細胞マーカーであるとともに、ADSC に特異的なマーカーとして、マウス、ヒト、イヌの ADSC に関する多くの論文で用いられている [49,58,65]。しかし、いずれの報告においても ADSC における CD44 の機能は明らかになっていない。さらに ADSC における xCT の発現に関する報告は認められていない。

本研究は、イヌの ADSC における CD44 と xCT の発現を確認し、その亜集団における脂肪、骨、軟骨分化能を検討した。

材料と方法

ADSC の採取と培養

第一章に記載した方法で行った。

脂肪と骨分化誘導

第一章に記載した方法で行った。

軟骨分化誘導

軟骨分化誘導は、2.5mL の D-MEM/F-12 Basal Medium に対し 25 μ L の Chondrogenic Supplement (デキサメタゾン、アスコルビン 2 リン酸、ピロリジン-2-カルボン酸、ピルピン酸、ヒト組み替え TGF- β 3 含有) を加え、Chondrogenic Differentiation Medium とした。7.4 x 10⁴ cells/5 mL の α MEM Basal Medium に懸濁した ADSC を 24well プレートに 0.5 ml ずつまき、50~70%コンフルエントとなるまで α MEM Basal Medium で単層培養した。その後 Chondrogenic Differentiation Medium に培地を交換し、2~3 日おきに培地を交換しながら 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 存在下で 17 日間培養した。

フローサイトメトリー法による xCT の発現解析とセルソーティング

ディッシュ中でコンフルエントとなった ADSC を顕微鏡でバクテリアやカビなどのコンタミネーションがないかを観察した後、ピペットで培養容器内の培地をアスピレートし、PBS で細胞を洗い、1 mL/50 cm² のトリプシンを加え、細胞表面にトリプシンを満遍なく浸漬させた後 37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした。顕微鏡で細胞を観察し、細胞が浮き上がってきているのを確認した後、10 ml の FACS Buffer で細胞を再懸濁させトリプシンを不活性化した。その後 1,800 rpm、15 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、上清をアスピレートした

後、20 ml の FACS Buffer に再懸濁した。10 μ l の懸濁液と 10 μ l のトリパンブルー(Trypan Blue) を混合し、ビルケルチュルク血球計算版を用い、生細胞数をカウントした。その後 1,800 rpm、15 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、 1×10^5 cells/100 μ l (以下 1test) になるように FACS Buffer で再懸濁、4 本のエッペンチューブ (INA・OPTIKA) に分注し、2 μ l/test の抗 CD13/32 抗体 (FcX Blocker, biolegend, San Diego, CA, USA) を加え、氷上で 5 分間インキュベートし、免疫グロブリンの Fc 受容体への蛍光抗体の非特異結合をブロックした。その後 1 μ l/test の死細胞染色試薬 (Zombie NIRTM, BioLegend, San Diego, CA, USA) を加え、室温で 20 分間インキュベートして死細胞をフローサイトメトリーで除去できるようにした。その後 1 ml の FACS Buffer を加え、1,800 rpm、15 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、再度 100 μ l の FACS Buffer に再懸濁した。その後、規定量の抗 CD44 抗体 (FITC anti-mouse/human CD44 antibody, BioLegend, San Diego, CA, USA) を加え、氷上で 60 分間インキュベートした、その後 1 ml の FACS Buffer を加え、1,800 rpm、15 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、再度 100 μ l の FACS Buffer に再懸濁したのち、規定量の抗 xCT 抗体 (xCT antibody PE, Biorbyt, U.K) を加え、氷上で 60 分間インキュベートした。その後 1 ml の FACS Buffer を加え、1,800 rpm、15 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、再度 100 μ l の FACS Buffer に再懸濁したのち、フローサイトメーター (AccuriTM C6) を用いて CD44 と xCT の発現を検出した。データ解析は FlowJo software (Tree Star) を用いて行った。

蛍光免疫染色

第一章に記載した方法で行った

リアルタイム PCR

RNA 抽出キット (RNeasy Mini Kit, QIAGEN, Germany) を用いて ADSC の総 RNA を抽出し、RNA を cDNA 合成キット (ReverTra Ace qPCR RT Kit, TOYOBO CO., LTD, Japan) を用

いて逆転写した。合成された cDNA を SYBR Premix Ex Taq II (TAKARA Bio) を用いて RT-qPCR を行なった。RT-qPCR は熱変性 (95°C、15 秒間)、アニーリング (60°C、30 秒間)、伸張 (72°C、30 秒間) を 45 サイクルまで行なった。各発現量は HPRT1 により基準化し、比較した相対地は comparative Ct (2⁻(Δ Ct-Cc)) method を用いて表した。使用したプライマーは表 1 にまとめた。

統計解析

統計解析は Prism 4.0 (GraphPad Software) を用いて行い、結果は平均値±標準誤差で表示した。二群間の比較は independent t test を用いて行い、p-value<0.05 で有意差ありと判定した。

結果

イヌ ADSC における xCT の発現解析

イヌの皮下脂肪より採取、培養した ADSC に対して、抗 CD44 抗体と抗 xCT 抗体による二重染色を行い、その発現をフローサイトメトリー法にて解析した。すると、CD44 陽性集団のうち 5%程度の xCT 陽性集団を認めた。

xCT 陽性集団と陰性集団における幹細胞マーカーの発現量の解析

フローサイトメトリー法によって明らかとなった CD44 と xCT の共陽性集団を xCT+、CD44 陽性 xCT 陰性集団を xCT-とし、セルソーターを用いて分取した。その後、RT-qPCR によって各種幹細胞マーカーの発現を解析したところ、いずれのマーカーにおいても xCT+における発現量が有意に高かった。

脂肪分化誘導と脂肪分化マーカーの比較

ソーティングを行なった xCT+と xCT-に対して、脂肪分化能を評価するため、分化誘導培地を用いて *in vitro* での分化誘導を行った。15 日間の培養を行なった後、脂肪分化誘導を行った細胞は抗 FABP4 抗体を用いて免疫染色を行い、細胞質基質に脂肪滴を蓄積した脂肪細胞への分化が xCT+と xCT-のいずれの集団においても観察された。さらに、RT-qPCR によって脂肪分化マーカーの発現量を比較解析したところ、xCT+における発現量は、xCT-と比較して有意に高かった。

骨分化誘導と骨分化マーカーの比較

ソーティングを行なった xCT+と xCT-に対して、骨分化能を評価するため、分化誘導培地を用いて *in vitro* での分化誘導を行った。15 日間の培養を行なった後、骨分化誘導を行った細胞を抗 Osteopontin 抗体によって免疫染色を行い、細胞質内に顆粒を含む骨細胞への分化が xCT+と xCT-のいずれの集団においても観察された。また、蛍光強度は xCT-の方が高かった。さらに、RT-qPCR によって骨分化マーカーの発現量を比較解析したところ、xCT-における発現量は、xCT+と比較して有意に高かった。

軟骨分化誘導と軟骨分化マーカーの比較

ソーティングを行なった xCT+と xCT-に対して、軟骨分化能を評価するため、分化誘導培地を用いて *in vitro* での分化誘導を行った。17 日間の培養を行なった後、軟骨分化誘導を行った細胞を抗 Collagen II 抗体によって免疫染色を行い、その発現が xCT+と xCT-のいずれの集団においても観察されたが、細胞の形態には差異が認められた。具体的には、xCT+においては円形で扁平化した細胞質を認め、xCT-では紡錘形の細胞形態を認めた。さらに、RT-qPCR によって軟骨分化マーカーの発現量を比較解析したところ、COL2A1 の発現量には有意差が認められなかったものの、ACAN の xCT-における発現量は、xCT+と比較して有意に高かった。

考察

本研究において、培養条件下におけるイヌの ADSC は CD44 の発現を認めた。さらに、そのうち約 5%程度の細胞集団は xCT 陽性であり、フローサイトメトリー法によって明瞭に 2 集団に分取することができた。過去の報告では、ウエスタンブロット法を用いてマウスの ADSC と [24]、MC3T3-E1 細胞における xCT の発現を検出した報告が認められるが [63]、イヌの ADSC における報告は本研究が初の報告となる。また、過去のいずれの報告においても、xCT をマーカーとして亜集団の同定を行なった報告は認められず、本研究は、マウスやヒトなどを含めて ADSC ならびにその他の MSC における xCT をマーカーとした機能的亜集団の同定を行なった初の報告となる。ADSC における xCT が有する役割については明らかとなっていないが、xCT の生理学的な機能としては、シスチンの取り込みの活性化による細胞内の還元型グルタチオン (GSH) 生成の促進と、それに伴う細胞内酸化ストレスに対する抵抗性の亢進であると報告されており [53]、細胞内 GSH は NF- κ B、熱変性タンパク質や AP-1 などの種々の細胞内転写因子の S-グルタチオン化によって酸化ストレスに対する抵抗性を獲得している [19]。本研究において、イヌ ADSC における xCT の機能について検討はしていないため、今後のさらなる検討が必要と思われる。

本研究において、xCT+は xCT-と比較して脂肪分化効率の高い細胞集団であった。xCT と MSC の脂肪分化に関する報告は少なく、マウスの BMSC における xCT の発現を shRNA によって抑制した時に脂肪分化マーカーである PPAR γ の発現が抑制されるという報告が認められ [24]、本研究の結果を支持するものとなっているが、Takarada-Iemata らによると、C3H10T1/2 細胞 (マウス間葉系幹細胞株) への還元型グルタチオンの処置は骨分化能を上昇させるが、脂肪分化能への影響は認められないと報告されており [61]、本研究の結果と一致しないため、今後の課題としては xCT が脂肪分化へ与える分子生物学的影響について検討する必要がある。また、xCT の生理的機能として細胞内の還元型グルタチ

オン生合成による酸化ストレス抵抗性に関与していることが示唆されることはすでに述べたが、脂肪分化と酸化ストレスに関する研究は多数報告されており、脂肪分化の過程で過酸化水素に対する抵抗性が上昇することが知られている [42]。

本研究において、xCT-は xCT+と比較して骨分化効率の高い細胞集団であった。過去の研究における xCT と MSC の骨分化能の関連に関する報告は限られているが、Uno らの報告によると、xCT の発現遺伝子導入を行ったマウス胎児由来線維芽細胞 (MC3T3-E1) は、RUNX2 の発現と骨芽細胞への分化が抑制されたと報告されている [63]。その他、近年の報告では、マウスの BMSC における xCT の発現を shRNA によって抑制した時に、BMP2/4 などの骨分化マーカーの上昇を認めたと報告されている [24]。これらの研究結果は、本研究の結果を支持するものであり、xCT は骨分化を抑制するマーカーであると考えられる。

本研究において、軟骨分化誘導を行った時の xCT+は xCT-と比較して円形で扁平化した細胞質を認め、ACAN の発現量は有意に低かった。MSC の軟骨分化と xCT に関連する報告は皆無であり、今後の検討が必要である。

本研究において、イヌ ADSC における xCT の発現が新たに認められた。さらに、培養条件下のイヌ ADSC は xCT の発現によって 2 集団に分取することができた。また、xCT 陽性集団は脂肪分化しやすい集団であり、陰性集団は骨分化しやすい集団であった。xCT はシスチンの取り込みを活性化して細胞内でのグルタチオンの産生を促進し、酸化ストレスへの抵抗性を獲得している機能的マーカーである。癌幹細胞分野における近年の研究で、癌幹細胞が xCT によって細胞内酸化ストレスに対する抵抗性を獲得していることが明らかとなり、癌治療の新たなターゲットとして注目を集めている [23]。実際に、本研究においてもイヌ ADSC における xCT+は種々の幹細胞マーカーの発現が上昇しているが、興味深いことに、xCT+はいずれの分化能も高い集団というわけではなく、むしろ xCT の

発現は骨分化能に関しては抑制的に働くことが明らかとなった。今後は、xCT が骨分化を抑制する分子生物学的機構の解明が必要である。

既存薬であるサラゾスルファピリジンは人医療においてクローン病による潰瘍性大腸炎やリュウマチ性関節炎の治療に古くから用いられており [44,47]、獣医療においても大腸炎などの治療に用いる [7]。近年、サラゾスルファピリジンが xCT を特異的に阻害することが明らかとなり [32]、癌幹細胞特異的治療薬として注目されている。実際に末期の CD44 陽性胃癌患者への第 1 相臨床試験が行われており、安全性と有効性が示唆されている [54,55]。過去の報告において、マウス MSC における *in vitro* でのサラゾスルファピリジン処置は xCT の抑制と骨分化能の上昇が認められており [24]、イヌ ADSC においても同様の結果が得られる可能性が高い。以上のことから、骨癒合不全などの難治性骨疾患に対して ADSC とサラゾスルファピリジンを併用することによって、より効率的な骨再生医療を行うことができるかもしれない。

図および表

表 1. 使用したプライマー

Table 1. Primers used in real-time PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Sox2	GTGAGCGCCCTGCAGTACAA	GCGAGTAGGACATGCTGTAGGTG
Klf4	GATGTGACCCACACTGCCAGA	TGTTGGGAACCTGACCATGATTGTA
c-Myc	GATCTCCTCCGGAGAGTGGAAC	CACCGAGTCGTAGTCGAGGTCAT
FABP4	GATGAAGTTACTGCGGATGACAGAA	CCTGTACCAGGCACCTCCATCTA
PPAR γ	GGACCCGATGGTTCGAGATTA	CGGCATTCAATTGCCATGAG
BMP1	TGGAGCGCACTGATGAGGAC	CTCATGGACAACAATGCCGAAC
SPP1	TCCCCACTGACATTCCAGCAAC	GGACCTCAGTCCATAAGCCACAC
COL2A	AGGGCAACAGCAGGTTACATA	TGTCCACACCAAATTCCTGCTC
Aggrecan	CCTGAATGACAGGACCATCGAA	CGTGCCAGATCATCACCACA
HPRT1	GGAGCATAATCCAAAGATGGTCAA	TCAGGTTTATAGCCAACACTTCGAG

図 1. xCT によるイヌ ADSC の亜集団の同定

イヌ ADSC に対して、抗 CD44 抗体と抗 xCT 抗体による二重染色を行い、その発現をフローサイトメトリー法にて解析した。すると、CD44 陽性集団のうち 5%程度の xCT 陽性集団を認めた。

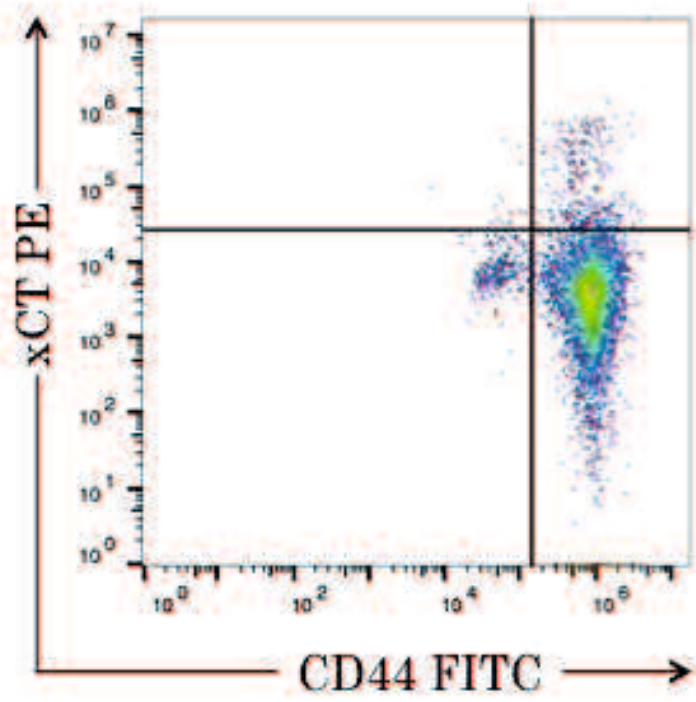


図 2. 幹細胞マーカーの発現の比較

ソーティングを行なった xCT+と xCT-に対して、RT-qPCR によって幹細胞マーカーの発現の定量と比較解析を行なったところ、いずれのマーカーにおいても xCT+の方が有意に高い発現を認めた。Values are expressed as mean \pm standard error (n=6). *P<0.05.

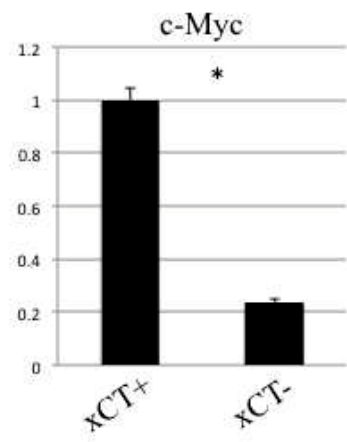
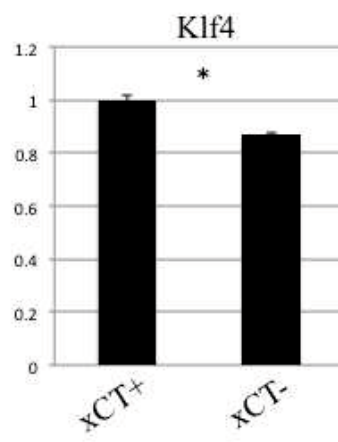
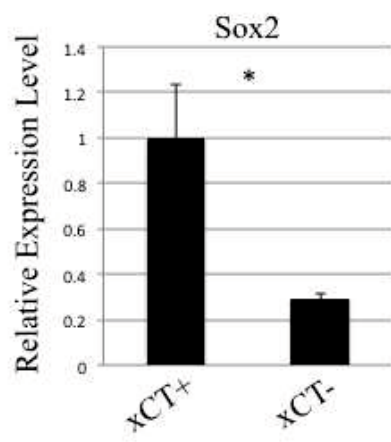


図 3. 脂肪分化誘導と脂肪分化マーカーの比較

ソーティングと脂肪分化誘導を行った xCT+ と xCT- のそれぞれに対して、抗 FABP4 抗体を用いた蛍光免疫染色を行ったところ、細胞質基質に脂肪滴を蓄積した脂肪細胞への分化が xCT+ と xCT- のいずれの集団においても観察された (A、B)。また、ソーティングと脂肪分化誘導を行った xCT+ と xCT- のそれぞれに対して、RT-qPCR による脂肪分化マーカーの発現の定量と比較解析を行なったところ、xCT+ は xCT- と比較して有意に高い脂肪分化マーカーの発現の上昇が認められた (C、D)。Values are expressed as mean \pm standard error (n=6). *P<0.05. Scale bar: 100 μ m.

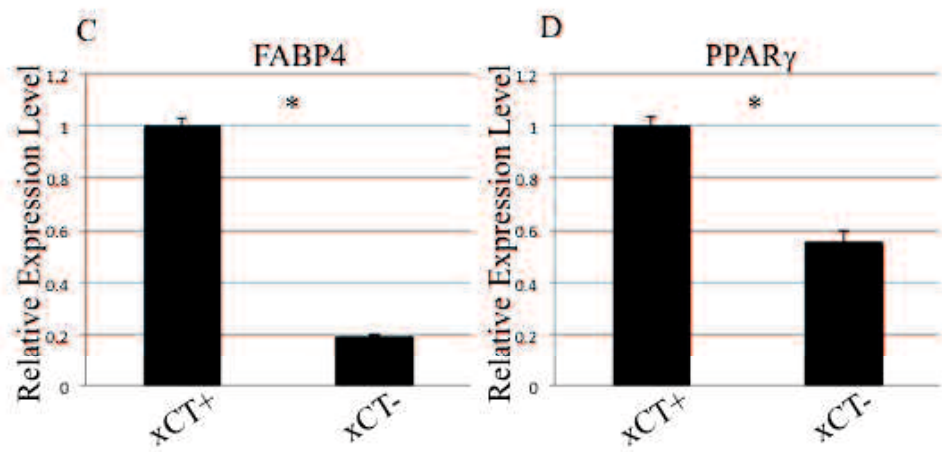
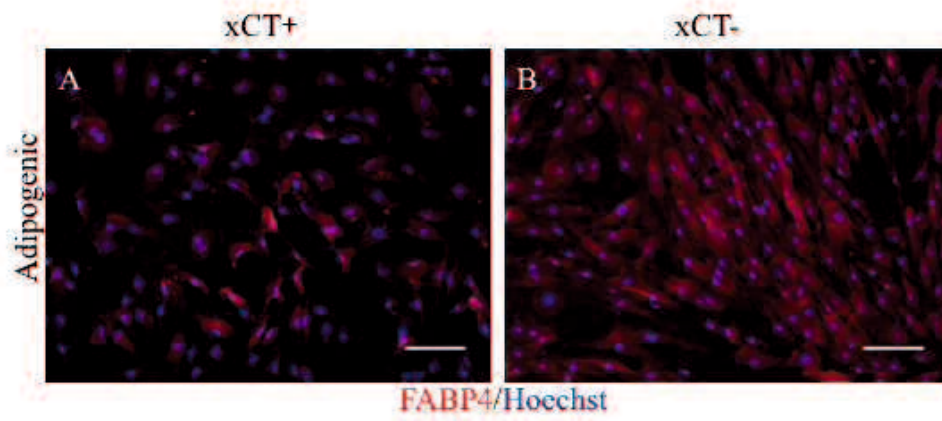


図 4. 骨分化誘導と骨分化マーカーの比較

ソーティングと骨分化誘導を行った xCT+ と xCT- のそれぞれに対して、抗 Osteopontin 抗体を用いた蛍光免疫染色を行ったところ、xCT+ と xCT- のいずれの集団においても蛍光が観察されたが、その蛍光強度は xCT- の方が高かった (A、B)。また、ソーティングと脂肪分化誘導を行った xCT+ と xCT- のそれぞれに対して、RT-qPCR による骨分化マーカーの発現の定量と比較解析を行なったところ、xCT- は xCT+ と比較して有意に高い骨分化マーカーの発現の上昇が認められた (C、D)。Values are expressed as mean \pm standard error (n=6). *P<0.05. Scale bar: 100 μ m.

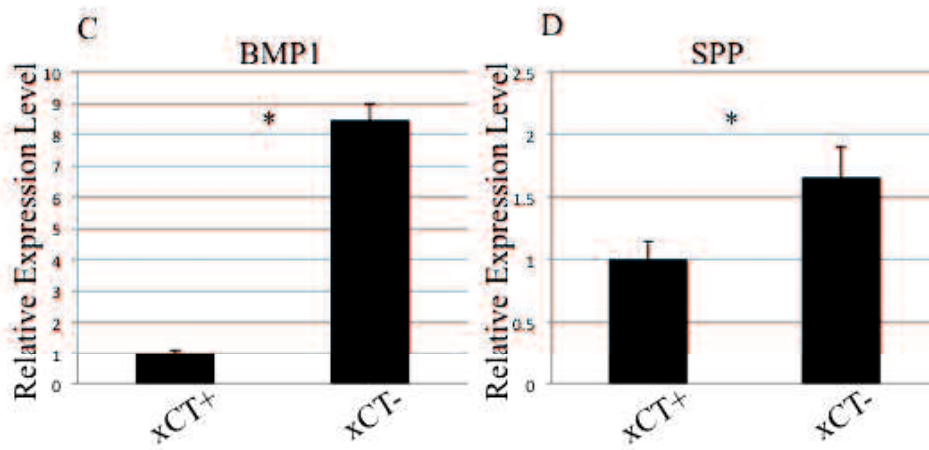
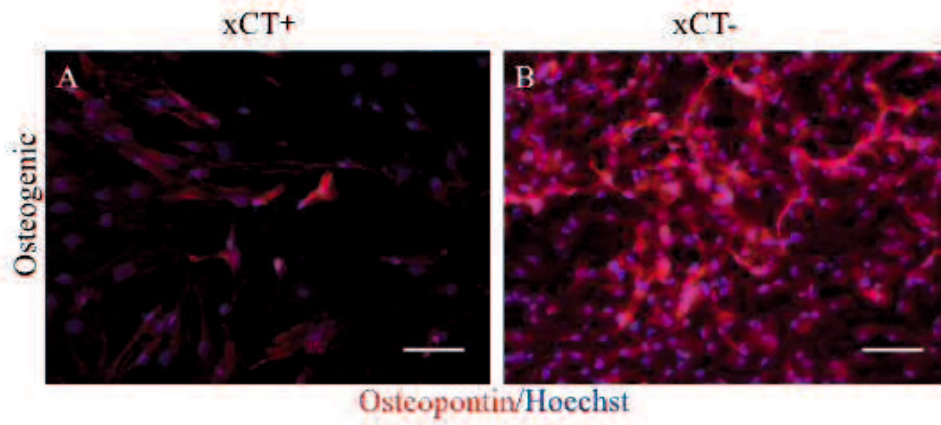
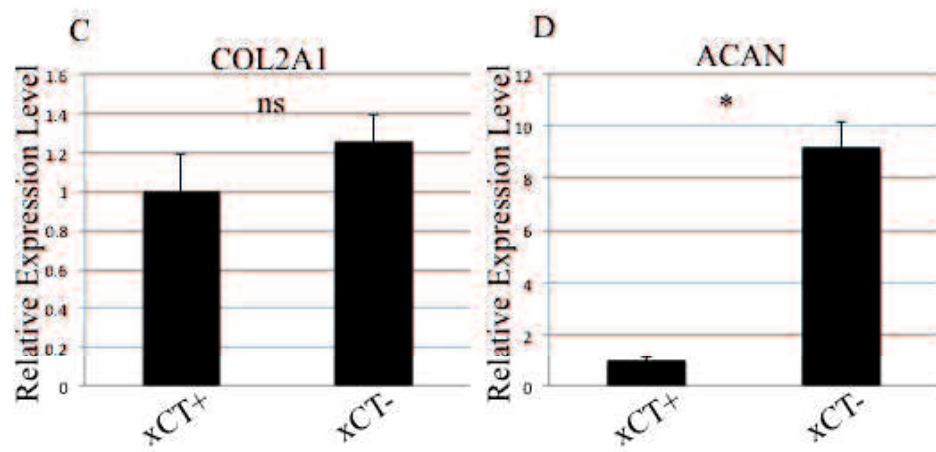
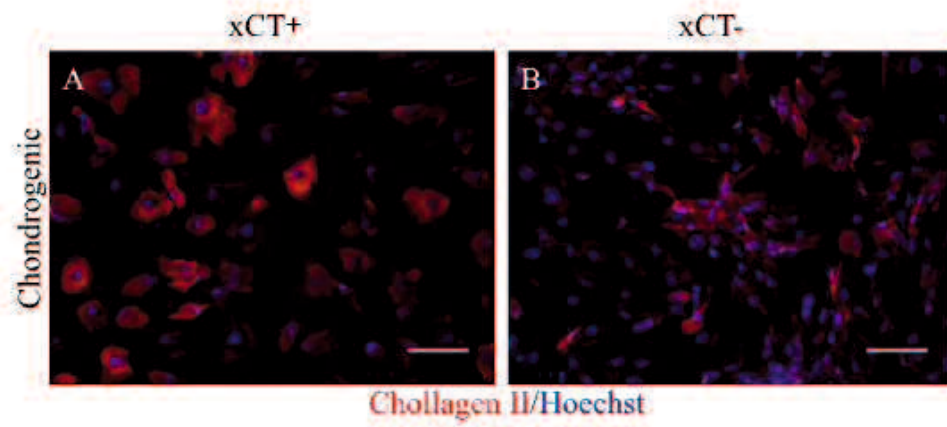


図 5. 軟骨分化誘導と軟骨分化マーカーの比較

ソーティングと軟骨分化誘導を行った xCT+ と xCT- のそれぞれに対して、抗 Collagen II 抗体を用いた蛍光免疫染色を行ったところ、xCT+ と xCT- のいずれの集団においても蛍光が観察されたが、その形態には差異が認められた (A、B)。また、ソーティングと軟骨分化誘導を行った xCT+ と xCT- のそれぞれに対して、RT-qPCR による軟骨分化マーカーの発現の定量と比較解析を行なったところ、COL2A1 の発現に有意差は認められなかったものの、xCT- は xCT+ と比較して有意に高い ACAN の発現の上昇が認められた (C、D)。

Values are expressed as mean \pm standard error (n=6). *P<0.05. Scale bar: 100 μ m.



総合考察

本論文では、マウスとイヌの ADSC における様々な幹細胞に関連するマーカーの発現と、それらによって分離される機能的亜集団の性状解析を行なった。本論文の第一章では、未分化なマウスとイヌの ADSC に対して、細胞内リン酸化タンパクの発現を網羅的に解析した。マーカーとして Wnt、PI3K/Akt、JAK/Stat などの細胞増殖や分化制御などに関与するシグナル経路に関与すると報告されているものをターゲットとした。結果として、Wnt と PI3K/Akt の、幹細胞性を維持すると過去に報告されている経路は、マウス ADSC とイヌ ADSC のいずれにおいても活性化されていることが示唆された。これらの結果から、培養条件下におけるマウスとイヌの ADSC の幹細胞性の維持には同様の経路が関与していると考えられた。しかし、フローサイトメトリー解析の結果から、これらのシグナル経路の活性化は、培養条件下の細胞集団において均一な状態であると考えられた。

第二章と第三章ではマウスとイヌの ADSC に対して、造血幹細胞や癌幹細胞のマーカーとして広く用いられている ALDH 活性の解析を行った。ALDH はアルデヒドの酸化を触媒している酵素群であり、これらの活性が高い細胞群は、細胞障害性に働くアルデヒドを速やかに解毒することで、幹細胞性を維持していると考えられている [36]。本研究においてもマウスとイヌの ADSC において ALDH 活性の高い細胞集団が認められ、これらは脂肪と骨への分化効率の高い細胞集団であった。また、マウス ADSC において ALDH 陽性集団と陰性集団に対してマイクロアレイ解析を用いて遺伝子発現を網羅的に解析したところ、ALDH 陽性集団においてリボソーム生合成に関与する遺伝子群の発現が高い傾向が認められた。近年の報告でリボソームの生合成は個体発生や造血幹細胞の機能維持と関連していると言われており [8,51]、幹細胞性の維持に関与していることが示唆されつつある。今後の研究ではリボソームが ADSC の分化効率に与える詳細なメカニズムに関して検討を行っていく必要があると思われる。第四章では、第一章から第三章の結果を踏ま

え、細胞内ストレスに対する防御機構が ADSC の機能的亜集団と関与している可能性が高いと考え、癌幹細胞における酸化ストレス抵抗性に寄与しているとされている xCT に着目した。xCT は CD44 のヴァリアントアイソフォームと結合し、シスチンの取り込みを活性化することで細胞内のグルタチオンの生成を亢進し、酸化ストレス抵抗性を獲得している [23]。対して、ADSC に関しては、CD44 は特異的マーカーとして広く用いられているものの、xCT の発現に関する報告は 1 報のみである [24]。この報告では、マウスとヒトの ADSC を材料としていること、CD44 との関連性に関するデータは認められないこと、xCT の発現をウエスタンブロット法によって解析しており、亜集団の同定はされていないことなどから、第四章ではイヌの ADSC における xCT の発現に関して、フローサイトメトリー法を用いて解析した。結果として、CD44 陽性のイヌ ADSC には、少数の xCT 陽性集団が認められた。また、xCT+ は脂肪分化能が高く、骨分化能が低い細胞集団であった。このことから、xCT は、ADSC の脂肪分化を促進する可能性が示唆された。また、xCT- は骨への高い分化能を有していた。過去の報告では、xCT をノックダウンした ADSC は骨分化効率の上昇が認められるとされており [24]、本研究の結果と類似する結果となっている。

本研究では、細胞へのストレスに対する防御機構に関与するマーカーに着目して ADSC の機能的亜集団の同定を行い、ALDH と xCT という、細胞内ストレスに対する抵抗性に関与するマーカーを用いて機能的亜集団の同定を行うことができた。いずれのマーカーにおいても癌幹細胞や造血幹細胞を同定するマーカーとして知られており、ADSC においても類似する機能を有すると考えられる。また、xCT に対する特異的阻害薬であるスルファサラジンなどの癌幹細胞をターゲットとした薬は、ADSC の疾患特異的な分化誘導を行うことができる可能性があり、今後の ADSC を用いた幹細胞治療の新たな手法を確立するかもしれない。

ADSC の機能的亜集団に関する基礎的研究は近年注目を集めているが、特にイヌの ADSC における機能的亜集団に関する報告は少なく、本研究における報告が初であることから、今後の獣医領域における ADSC を用いた再生医療に関する有用な基礎的知見の一つとなると考えられる。獣医領域における ADSC の臨床応用はエビデンスが乏しく、また、使用できる施設も限られている。しかし、脂肪組織から豊富に採取できる ADSC は、特に体格が小さい犬種の多い本邦での有用性が高いと考えられる。また、今回発見されたいずれのマーカーにおいても、骨分化に関する差異が認められた。本邦における小型犬の飼育率は高く、特にチワワやトイ・プードルといったトイ種は人気が高く、飼育頭数を増やしている。これらの犬種は先天的に骨密度が低く、特に若齢期の橈尺骨骨折を起こすことが多い。さらに、骨周囲の軟部組織量が少ないことや、サイズの問題などから、術後の骨癒合不全などの合併症のリスクが高いと言われている。本研究で明らかとなった ADSC の機能的亜集団に関する研究は、これらの難治性の骨疾患に対して有用である可能性が高く、今後の臨床応用に向けた基礎的研究を行っていく必要があると感じられた。

謝辞

本研究および論文を製作するにあたり、多大な御指導と御高閲を賜りました山口大学共同獣医学部 獣医外科学教室の田浦保穂教授に深謝いたします。また、実験の計画から論文の製作に至るまで、懇切なる研究の御指導と御助言をいただきました鳥取大学共同獣医学科 獣医画像診断学教室の柄武志准教授、山口大学共同獣医学部 伴侶動物医療分野の板本和仁准教授に謹んで深謝いたします。

さらに、本研究に関して、御指導・御協力頂きました山口大学共同獣医学部 獣医外科学教室の谷健二教授、同獣医放射線学教室の中市統三教授、井芹俊恵助教、同伴侶動物医療分野の原口友也助教、西川晋平助教に深く感謝致します。

本研究活動を行うにあたり、御協力・御援助頂きました先輩や後輩の皆様、暖かく見守ってくれた妻や、支えて頂いた全ての方々に心から感謝致します。

最後に、本研究で犠牲となった多くの動物たちに深く感謝するとともに、その霊が鎮められるように心からお祈りいたします。

参考文献リスト

1. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. and Clarke, M. F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3983-3988.
2. Asano, K., Yoshimura, S. and Nakane, A. 2015. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Attenuate Staphylococcal Enterotoxin A-Induced Toxic Shock. *Infect Immun* 83: 3490-3496.
3. Balber, A. E. 2011. Concise review: aldehyde dehydrogenase bright stem and progenitor cell populations from normal tissues: characteristics, activities, and emerging uses in regenerative medicine. *Stem Cells* 29: 570-575.
4. Bennett, C. N., Ross, S. E., Longo, K. A., Bajnok, L., Hemati, N., Johnson, K. W., Harrison, S. D. and MacDougald, O. A. 2002. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem* 277: 30998-31004.
5. Bianco, P., Cao, X., Frenette, P. S., Mao, J. J., Robey, P. G., Simmons, P. J. and Wang, C. Y. 2013. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature medicine* 19: 35-42.
6. Brzoska, M., Geiger, H., Gauer, S. and Baer, P. 2005. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 142-150.
7. Bush, B. M. 1986. Treatment of canine colitis. *The Veterinary record* 119: 162.

8. Cai, X., Gao, L., Teng, L., Ge, J., Oo, Z. M., Kumar, A. R., Gilliland, D. G., Mason, P. J., Tan, K. and Speck, N. A. 2015. Runx1 Deficiency Decreases Ribosome Biogenesis and Confers Stress Resistance to Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell* 17: 165-177.
9. Caplan, A. I. 2005. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 11: 1198-1211.
10. Capoccia, B. J., Robson, D. L., Levac, K. D., Maxwell, D. J., Hohm, S. A., Neelamkavil, M. J., Bell, G. I., Xenocostas, A., Link, D. C., Piwnica-Worms, D., Nolte, J. A. and Hess, D. A. 2009. Revascularization of ischemic limbs after transplantation of human bone marrow cells with high aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* 113: 5340-5351.
11. Cervelli, V., Scioli, M. G., Gentile, P., Doldo, E., Bonanno, E., Spagnoli, L. G. and Orlandi, A. 2012. Platelet-rich plasma greatly potentiates insulin-induced adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells through a serine/threonine kinase Akt-dependent mechanism and promotes clinical fat graft maintenance. *Stem Cells Transl Med* 1: 206-220.
12. Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L. and Wahl, G. M. 2006. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research* 66: 9339-9344.
13. Clevers, H. 2013. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell* 154: 274-284.
14. Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J. and Maitland, N. J. 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research* 65: 10946-10951.

15. Cuervo, B., Rubio, M., Sopena, J., Dominguez, J. M., Vilar, J., Morales, M., Cugat, R. and Carrillo, J. M. 2014. Hip osteoarthritis in dogs: a randomized study using mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors. *Int J Mol Sci* 15: 13437-13460.
16. Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I. K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E. H., Simeone, D. M., Shelton, A. A., Parmiani, G., Castelli, C. and Clarke, M. F. 2007. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10158-10163.
17. Estes, B. T., Wu, A. W., Storms, R. W. and Guilak, F. 2006. Extended passaging, but not aldehyde dehydrogenase activity, increases the chondrogenic potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 209: 987-995.
18. Fasshauer, M., Klein, J., Kriauciunas, K. M., Ueki, K., Benito, M. and Kahn, C. R. 2001. Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes. *Mol Cell Biol* 21: 319-329.
19. Fratelli, M., Goodwin, L. O., Orom, U. A., Lombardi, S., Tonelli, R., Mengozzi, M. and Ghezzi, P. 2005. Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13998-14003.
20. Garcia-Olmo, D., Garcia-Arranz, M., Herreros, D., Pascual, I., Peiro, C. and Rodriguez-Montes, J. A. 2005. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Diseases of the colon and rectum* 48: 1416-1423.

21. Garcia-Olmo, D., Herreros, D., Pascual, I., Pascual, J. A., Del-Valle, E., Zorrilla, J., De-La-Quintana, P., Garcia-Arranz, M. and Pascual, M. 2009. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Diseases of the colon and rectum* 52: 79-86.
22. Herreros, M. D., Garcia-Arranz, M., Guadalajara, H., De-La-Quintana, P. and Garcia-Olmo, D. 2012. Autologous expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex cryptoglandular perianal fistulas: a phase III randomized clinical trial (FATT 1: fistula Advanced Therapy Trial 1) and long-term evaluation. *Diseases of the colon and rectum* 55: 762-772.
23. Ishimoto, T., Nagano, O., Yae, T., Tamada, M., Motohara, T., Oshima, H., Oshima, M., Ikeda, T., Asaba, R., Yagi, H., Masuko, T., Shimizu, T., Ishikawa, T., Kai, K., Takahashi, E., Imamura, Y., Baba, Y., Ohmura, M., Suematsu, M., Baba, H. and Saya, H. 2011. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell* 19: 387-400.
24. Jin, C., Zhang, P., Zhang, M., Zhang, X., Lv, L., Liu, H., Liu, Y. and Zhou, Y. 2017. Inhibition of SLC7A11 by Sulfasalazine Enhances Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Modulating BMP2/4 Expression and Suppresses Bone Loss in Ovariectomized Mice. *Journal of Bone and Mineral Research* 32: 508-521.
25. Jones, R. J., Barber, J. P., Vala, M. S., Collector, M. I., Kaufmann, S. H., Ludeman, S. M., Colvin, O. M. and Hilton, J. 1995. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood* 85: 2742-2746.

26. Kawamoto, K., Konno, M., Nagano, H., Nishikawa, S., Tomimaru, Y., Akita, H., Hama, N., Wada, H., Kobayashi, S., Eguchi, H., Tanemura, M., Ito, T., Doki, Y., Mori, M. and Ishii, H. 2013. CD90- (Thy-1-) high selection enhances reprogramming capacity of murine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Dis Markers* 35: 573-579.
27. Kuroda, Y. and Dezawa, M. 2014. Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent muse cells, in basic research and regenerative medicine. *Anat Rec (Hoboken)* 297: 98-110.
28. Leyva-Leyva, M., Barrera, L., Lopez-Camarillo, C., Arriaga-Pizano, L., Orozco-Hoyuela, G., Carrillo-Casas, E. M., Calderon-Perez, J., Lopez-Diaz, A., Hernandez-Aguilar, F., Gonzalez-Ramirez, R., Kawa, S., Chimal-Monroy, J. and Fuentes-Mera, L. 2013. Characterization of mesenchymal stem cell subpopulations from human amniotic membrane with dissimilar osteoblastic potential. *Stem Cells Dev* 22: 1275-1287.
29. Li, J. and Zhou, B. P. 2011. Activation of beta-catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. *BMC cancer* 11: 49.
30. Li, Q., Qi, L. J., Guo, Z. K., Li, H., Zuo, H. B. and Li, N. N. 2013. CD73+ adipose-derived mesenchymal stem cells possess higher potential to differentiate into cardiomyocytes in vitro. *Journal of molecular histology* 44: 411-422.
31. Lin, Y. M., Wu, C. C., Chang, Y. C., Wu, C. H., Ho, H. L., Hu, J. W., Chang, R. C., Wang, C. T. and Ouyang, P. 2016. Target disruption of ribosomal protein pNO40 accelerates aging and

impairs osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 469: 903-910.

32. Lo, M., Wang, Y. Z. and Gout, P. W. 2008. The x(c)- cystine/glutamate antiporter: a potential target for therapy of cancer and other diseases. *J Cell Physiol* 215: 593-602.
33. Locke, M., Feisst, V. and Dunbar, P. R. 2011. Concise review: human adipose-derived stem cells: separating promise from clinical need. *Stem Cells* 29: 404-411.
34. Manning, B. D. and Cantley, L. C. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129: 1261-1274.
35. Marcato, P., Dean, C. A., Giacomantonio, C. A. and Lee, P. W. 2011. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle* 10: 1378-1384.
36. Marchitti, S. A., Brocker, C., Stagos, D. and Vasiliou, V. 2008. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 4: 697-720.
37. Martin, G. R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7634-7638.
38. Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., Yanagawa, B., Tanaka, K., Hao, H., Ishino, K., Ishida, H., Shimizu, T., Kangawa, K., Sano, S., Okano, T., Kitamura, S. and Mori, H. 2006. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nature medicine* 12: 459-465.

39. Mizuno, H., Zuk, P. A., Zhu, M., Lorenz, H. P., Benhaim, P. and Hedrick, M. H. 2002. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg* 109: 199-209; discussion 210-191.
40. Nakayama, M., Inoue, T., Naito, M., Nakayama, K. and Ohara, N. 2015. Attenuation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by *Porphyromonas gingivalis* gingipains RgpA, RgpB, and Kgp. *J Biol Chem* 290: 5190-5202.
41. Okita, K., Ichisaka, T. and Yamanaka, S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313-317.
42. Okuno, Y., Matsuda, M., Kobayashi, H., Morita, K., Suzuki, E., Fukuhara, A., Komuro, R., Shimabukuro, M. and Shimomura, I. 2008. Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPARgamma-responsive region. *Biochem Biophys Res Commun* 366: 698-704.
43. Park, S. S., Lee, Y. J., Han, H. J. and Kweon, O. K. 2011. Role of laminin-111 in neurotrophin-3 production of canine adipose-derived stem cells: involvement of Akt, mTOR, and p70S6K. *J Cell Physiol* 226: 3251-3260.
44. Peppercorn, M. A. 1984. Sulfasalazine. Pharmacology, clinical use, toxicity, and related new drug development. *Annals of internal medicine* 101: 377-386.
45. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.

46. Prockop, D. J. and Oh, J. Y. 2012. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther* 20: 14-20.
47. Rains, C. P., Noble, S. and Faulds, D. 1995. Sulfasalazine. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drugs* 50: 137-156.
48. Ross, S. E., Hemati, N., Longo, K. A., Bennett, C. N., Lucas, P. C., Erickson, R. L. and MacDougald, O. A. 2000. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289: 950-953.
49. Russell, K. A., Chow, N. H., Dukoff, D., Gibson, T. W., LaMarre, J., Betts, D. H. and Koch, T. G. 2016. Characterization and Immunomodulatory Effects of Canine Adipose Tissue- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS One* 11: e0167442.
50. Saeki, K., Watanabe, M., Michishita, M., Tsuboi, M., Sugano, S., Yoshitake, R., Murai, K., Tanaka, Y., Ong, S. M., Saito, T., Matsumoto, K., Fujita, N., Nishimura, R. and Nakagawa, T. 2015. Phenotypic screening of a library of compounds against metastatic and non-metastatic clones of a canine mammary gland tumour cell line. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 205: 288-296.
51. Sanchez, C. G., Teixeira, F. K., Czech, B., Preall, J. B., Zamparini, A. L., Seifert, J. R., Malone, C. D., Hannon, G. J. and Lehmann, R. 2016. Regulation of Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis Controls Germline Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell* 18: 276-290.
52. Sapkota, G. P., Cummings, L., Newell, F. S., Armstrong, C., Bain, J., Frodin, M., Grauert, M., Hoffmann, M., Schnapp, G., Steegmaier, M., Cohen, P. and Alessi, D. R. 2007. BI-D1870 is a

specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo. The

Biochemical journal 401: 29-38.

53. Sato, H., Shiiya, A., Kimata, M., Maebara, K., Tamba, M., Sakakura, Y., Makino, N., Sugiyama, F., Yagami, K., Moriguchi, T., Takahashi, S. and Bannai, S. 2005. Redox imbalance in cystine/glutamate transporter-deficient mice. *J Biol Chem* 280: 37423-37429.
54. Shitara, K., Doi, T., Nagano, O., Fukutani, M., Hasegawa, H., Nomura, S., Sato, A., Kuwata, T., Asai, K., Einaga, Y., Tsuchihashi, K., Suina, K., Maeda, Y., Saya, H. and Ohtsu, A. 2017. Phase 1 study of sulfasalazine and cisplatin for patients with CD44v-positive gastric cancer refractory to cisplatin (EPOC1407). *Gastric Cancer* 20: 1004-1009.
55. Shitara, K., Doi, T., Nagano, O., Imamura, C. K., Ozeki, T., Ishii, Y., Tsuchihashi, K., Takahashi, S., Nakajima, T. E., Hironaka, S., Fukutani, M., Hasegawa, H., Nomura, S., Sato, A., Einaga, Y., Kuwata, T., Saya, H. and Ohtsu, A. 2017. Dose-escalation study for the targeting of CD44v(+) cancer stem cells by sulfasalazine in patients with advanced gastric cancer (EPOC1205). *Gastric Cancer* 20: 341-349.
56. Siminovitch, L., McCulloch, E. A. and Till, J. E. 1963. THE DISTRIBUTION OF COLONY-FORMING CELLS AMONG SPLEEN COLONIES. *Journal of cellular and comparative physiology* 62: 327-336.
57. Solanas, G. and Benitah, S. A. 2013. Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14: 737-748.

58. Taha, M. F. and Hedayati, V. 2010. Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue & cell* 42: 211-216.
59. Takahashi, H., Haraguchi, N., Nishikawa, S., Miyazaki, S., Suzuki, Y., Mizushima, T., Nishimura, J., Takemasa, I., Yamamoto, H., Mimori, K., Ishii, H., Doki, Y. and Mori, M. 2012. Biological and clinical availability of adipose-derived stem cells for pelvic dead space repair. *Stem Cells Transl Med* 1: 803-810.
60. Takahashi, K. and Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
61. Takarada-Iemata, M., Takarada, T., Nakamura, Y., Nakatani, E., Hori, O. and Yoneda, Y. 2011. Glutamate preferentially suppresses osteoblastogenesis than adipogenesis through the cystine/glutamate antiporter in mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 226: 652-665.
62. Troyer, D. L. and Weiss, M. L. 2008. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 26: 591-599.
63. Uno, K., Takarada, T., Takarada-Iemata, M., Nakamura, Y., Fujita, H., Hinoi, E. and Yoneda, Y. 2011. Negative regulation of osteoblastogenesis through downregulation of runt-related transcription factor-2 in osteoblastic MC3T3-E1 cells with stable overexpression of the cystine/glutamate antiporter xCT subunit. *J Cell Physiol* 226: 2953-2964.
64. Visvader, J. E. and Lindeman, G. J. 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews. Cancer* 8: 755-768.

65. Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W. and Ho, A. D. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 33: 1402-1416.
66. Wang, L. D. and Wagers, A. J. 2011. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12: 643-655.
67. Wilson-Robles, H. M., Daly, M., Pfent, C. and Sheppard, S. 2015. Identification and evaluation of putative tumour-initiating cells in canine malignant melanoma cell lines. *Veterinary and comparative oncology* 13: 60-69.
68. Young, R. A. 2011. Control of the embryonic stem cell state. *Cell* 144: 940-954.
69. Yu, Y. H., Liao, P. R., Guo, C. J., Chen, C. H., Mochly-Rosen, D. and Chuang, L. M. 2016. PKC-ALDH2 Pathway Plays a Novel Role in Adipocyte Differentiation. *PLoS One* 11: e0161993.
70. Zhang, H. H., Huang, J., Duvel, K., Boback, B., Wu, S., Squillace, R. M., Wu, C. L. and Manning, B. D. 2009. Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. *PLoS One* 4: e6189.
71. Zhu, Y., Liu, T., Song, K., Fan, X., Ma, X. and Cui, Z. 2008. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct* 26: 664-675.

72. Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P. and Hedrick, M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-228.