

脂肪細胞移植治療応用に資する脂肪細胞多様性の単一細胞解析とエピジェネティクス制御を介した脂肪細胞機能調整法の開発

千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学

田中 知明

With the advent of single cell analysis, it has become possible to understand the characteristics of diverse cell populations and differences in molecular biological properties of individual cells in an integrated manner, which could not be captured by conventional bulk analysis. On the other hand, we have studied the mechanisms of adipocyte aging, functional and epigenetic regulation through bulk NGS analysis of human adipose tissue, with the aim of applying our findings to the development of innovative therapeutic methods for adipose transplantation. Indeed, we have also shown that fractionation of undifferentiated mesenchymal cells, including adipocyte progenitors, in adipose tissue by a ceiling culture method may lead to improved transplantation rates, and that differences in epigenetics including CpG DNA methylation and H3K4me3 in *PPARG* promoter have been shown to produce differences in cellular function and adipogenic differentiation potential. However, tissue-derived cell populations showed greater diversity than expected, limiting previous bulk analysis alone. Here, we performed FACS and single-cell RNA sequencing analysis (scRNA-seq) of human subcutaneous adipose tissue to investigate the cellular lineage diversity of and their molecular basis. FACS analysis identified $DPP4^+/CD34^+$ fractions, a progenitor marker of adipocytes, and that of the total number of adipocytes, 74.9% were detected. UMAP by scRNAseq classified adipose tissue into nine clusters. The $CD34^+/PDGFRA/B^+$ mesenchymal cell population, including adipocytes, was classified into four subclusters, one of which was the $DPP4^+$ adipocyte progenitor. Gene Ontology analysis with differentially expressed genes, specifically expressed in each cluster, demonstrated that the differences in each cluster characteristics were enriched while having commonality as mesenchymal cells. Thus, these results indicate that scRNA-seq using human adipose tissue can reveal the cellular diversity and molecular biological characteristics of subcutaneous adipose tissue-derived cells, and that detailed analysis of the diverse subclusters may detect the underlying molecular mechanisms that regulate differentiation induction efficiency.

1. 緒言

脂肪組織を含めて生体組織には多種多様な細胞が存在する。それらは、発生分化プロセスを通じて、異なる系譜と機能を持って組織や臓器を構築することで、生体を生命体たらしめている。また、細胞内外からのシグナルや環境変化に応答して、相互反応や細胞間コミュニケーションを介して生命活動を営む。「シングルセル解析」は、これまでの1細胞レベルでの解析を大きく飛び越えて、分子生物学的なオミクス研究を1細胞レベルで、かつ、多様な細胞集団の視点で統合的に捉えようとするものである。

一方、我々は脂肪移植の革新的治療法開発への応用を目指すため、ヒト脂肪組織のbulk NGS解析を通じて、脂肪細胞の老化や機能制御、エピジェネティクス制御機構の研究を推進してきた。そして、脂肪組織中の未分化な間葉系細胞 (adipocyte progenitorを含む) を天井培養法により分画したり、深層と浅層に分けることで、より脂肪分化能の高い細胞群を抽出し、脂肪細胞の移植率向上につながる可

能性を示してきた^{1,2)}。さらに、そのメカニズムとして、PPARG promoterにおけるCpGのDNAメチル化やH3K4me3などのエピジェネティクスの違いが細胞機能差と脂肪分化誘導能の差異を生み出していることを明らかにした^{1,2)}。しかしながら、天井培養の分画でも個々の細胞には大きな多様性が認められ、これまでのbulk RNA-seqやbulk ChIP-seqのNGS解析だけでは、分化効率・成熟度を飛躍的に向上させるには限界があった。そこで、本研究では、ヒト脂肪組織を用いたシングルセル解析 (single cell RNA-seq) を行い、皮下脂肪組織由来細胞の細胞起源と系譜の多様性とその分子基盤を明らかにすることとした。これらの知見を通して、従来の方法ではなしえなかった脂肪細胞移植治療の向上効果(分化能・生着)に資する新たな脂肪細胞機能調整法の開発に発展させることを目指す。

2. 方法

対象は、千葉大学医学部附属病院形成外科において、手術にて摘出したヒト腹部皮下脂肪組織検体(女性)。これまでの既報のプロトコール^{1,2)}を用いて、コラゲナーゼ処理を行いFACSによる細胞表面マーカーのプロファイリングを施行した。また、遠心分離後に、天井培養(ccdPA)を行い、分化誘導にてin vitroでの分化誘導のシステムを構築した。分化の評価はoil-redO染色を用いた。ヒト脂肪組織を用いたシングルセル解析の条件検討として、Chromium Controllerを用いて、scRNAseq解析を施行した。データ



Single cell analysis of adipocyte diversity for therapeutic application of adipocyte transplantation and development of methods to regulate adipocyte function through epigenetic regulation

Tomoaki Tanaka

Department of Molecular Diagnosis, Chiba University Graduate School of Medicine

解析は、R package Seurat2を用いた。

3. 結果

ヒト皮下脂肪組織を用いて、FACS解析を行った(図1)。CD45-の非血球細胞をgatingして、血管内皮はtriple positive (CD31+CD34+CD146+)を指標に、mural cellsはCD146 single positive (CD31-CD34-CD146+)、adipocyte progenitorはCD34 single positive (CD31-CD34+CD146-)で検出した。比較的最近用いられるようになった脂肪細胞のprogenitor markerであるDPP4が、CD34 single positive fractionのうち、74.9%に検出された。

次に、ヒト脂肪組織を用いたscRNA-seq解析を行った。約2万細胞の生存細胞を採取し、エマルジョン作成を施行した。今回、エマルジョンクログにより、解析対象細胞数の減少を生じた。ライブラリー作成を実施し、シーケンスした後に、

シングルセルのvalidationを行った。その結果、nFeature_RNA、nCount_RNA、percent mitochondriaは比較的良好な分布パターンを示した(図2A)。そこで、QC cutoff値を、 $200 < nFeature_RNA < 2500$ 、 $percent\ mitochondria < 4$ に設定し、合計1606細胞を解析細胞数とした。

UMAPによるクラスター分類では、9つのクラスターに分類された(図2B)。また、各種クラスターの発現変動遺伝子解析では、血管内皮マーカであるPECAM1(CD31)やCDH5、組織マクロファージマーカであるCD68やCD14・CD163、脂肪細胞を含む間葉系細胞のマーカであるCD34やPDGFRA・PDGFRBが検出された。そこで、Find all markerを用いて各クラスターに特異的に発現する遺伝子DEGs(differentially expressed genes)を抽出してHeat mapを作成した(図2C)。これらは、各クラスター特性を反映する遺伝子シグニチャーを示している。

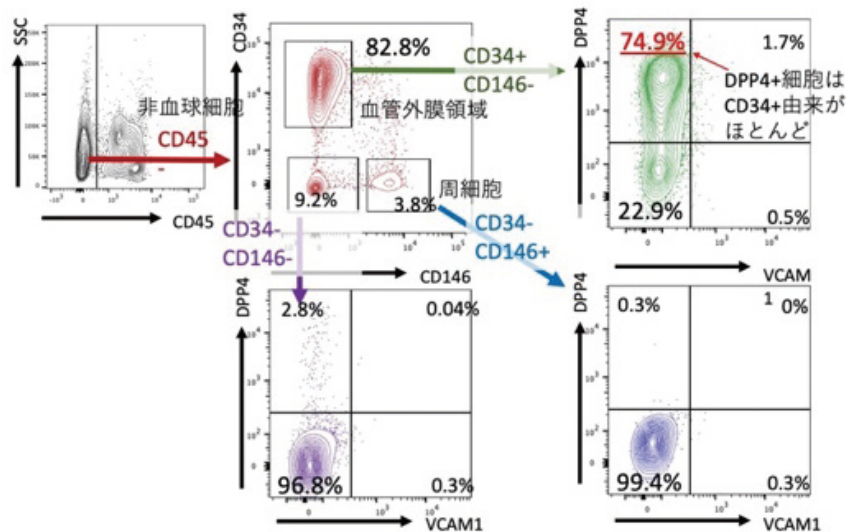


図1 ヒト脂肪組織のFACS解析

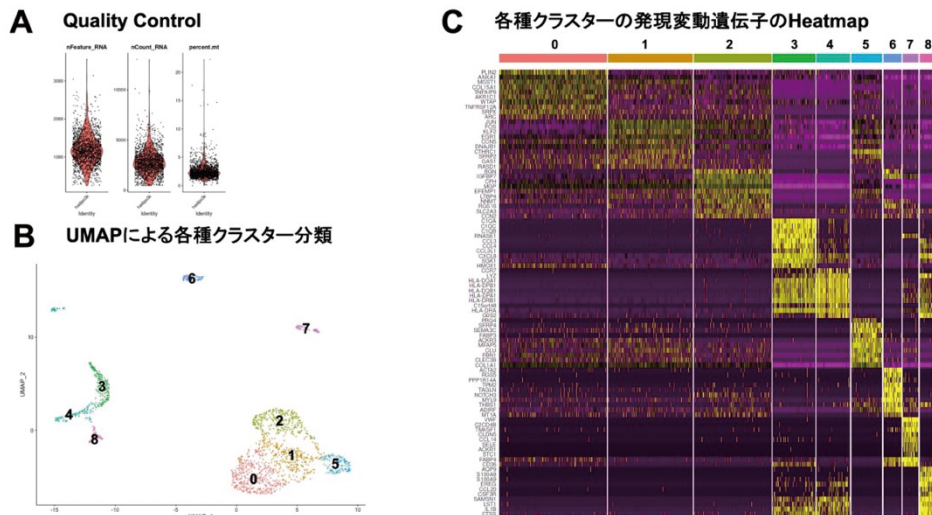


図2 ヒト脂肪組織のsingle cell RNA-seq解析

次に、各クラスターにおける細胞特異的マーカーがどのように分布しているかを確認する目的で、重要な細胞マーカー16遺伝子につき、Featured plotを作成した(図3)。その結果、各種クラスターの細胞種を同定した。具体的には、クラスター7は、*PECAM1* および *CDH5* が特異的に発現しており、血管内皮(Endothelial cell)クラスターと同定した(図3左上：青の円)。クラスター3, 4, 8は、*CD68* および *CD163* 陽性であり、マクロファージ(MΦ)のクラスターと同定した(図3下：緑の円)。クラスター0, 1, 2, 5は、間葉系細胞のマーカーである *PDGFRB* および *CD34* が発現しており、脂肪細胞を含むMesenchymal cellクラスターとアノテーションした(図3の2段目パネル：赤の円)。特に重要な結果として、比較的新たな脂肪細胞のprogenitor markerである *DPP4* は、Mesenchymal cellクラスター(クラスター0, 1, 2)に隣接するクラスター5に集約していることが判明した(図3の2段目右：赤矢印)。

そこで、これらのMesenchymal cellクラスター、特に *DPP4* を発現するprogenitor様の細胞特性を明らかにする目的で、各クラスターのDEGsのtop50遺伝子に対して、Gene Ontology解析を試行した(図4)。その結果、クラスター0は、collagen-containing extracellular matrix, endoplasmic reticulum lumen, collagen trimer, extracellular matrix structural constituentなどがエンリッチしていた。クラスター1は、response to reactive oxygen species, positive

regulation of miRNA transcription, , endoplasmic reticulum lumen, collagen trimerなどがエンリッチしていた。クラスター2の特性は、collagen-containing extracellular matrix, glycosaminoglycan binding, sulfur compound binding, extracellular matrix structural constituentがエンリッチしていた。これらの結果は、Mesenchymal cellクラスターの細胞種としての共通性を示すと同時に、それぞれのクラスター特性の違いを表している。特に、より未分化な *DPP4* 陽性であるクラスター5に関しては、cell adhesion mediated by integrin, microfibrilのGOがエンリッチしていた。

4. 考察

皮下脂肪組織から採取される細胞群を用いた脂肪移植は、組織増量のみならず血管新生促進や癒痕成熟を促し組織を再構築させる優れた方法として用いられる。しかしながら、脂肪移植治療の本質的な問題点として、生着率の低さや、血管新生能や基質分解能・脂肪分化能を十分に発揮できないことなど、即ち移植細胞の多面的機能を制御できない点が挙げられる。今回のヒト脂肪組織を用いた検討において、FACSおよびscRNAseq解析から、組織を構成する多様な細胞集団とその細胞種の特定を明確に行うことが可能となった。実際に、脂肪組織中の *CD34*・*PDGFRA/B* 陽性であるMesenchymal Cell集団が、シングルセル遺伝子プロ

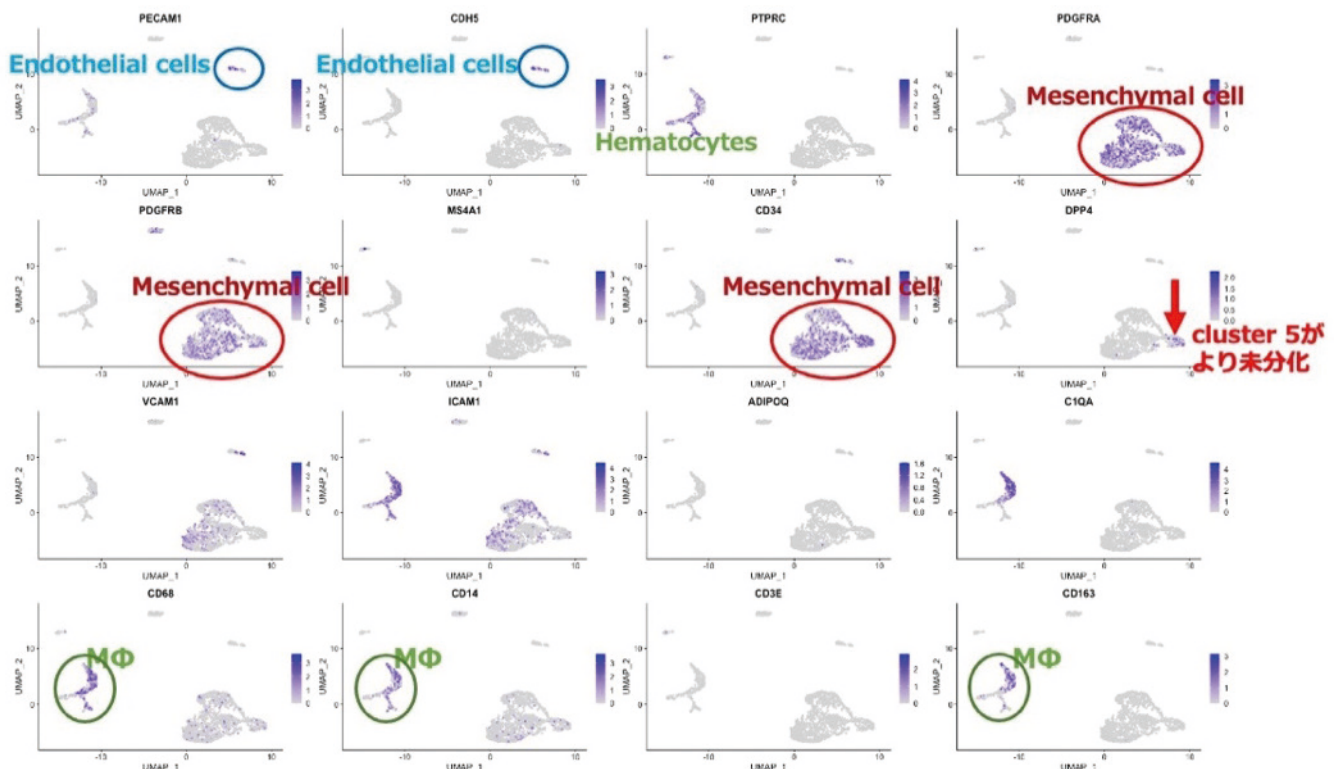


図3 ヒト脂肪組織scRNAseq解析における各種細胞マーカー発現

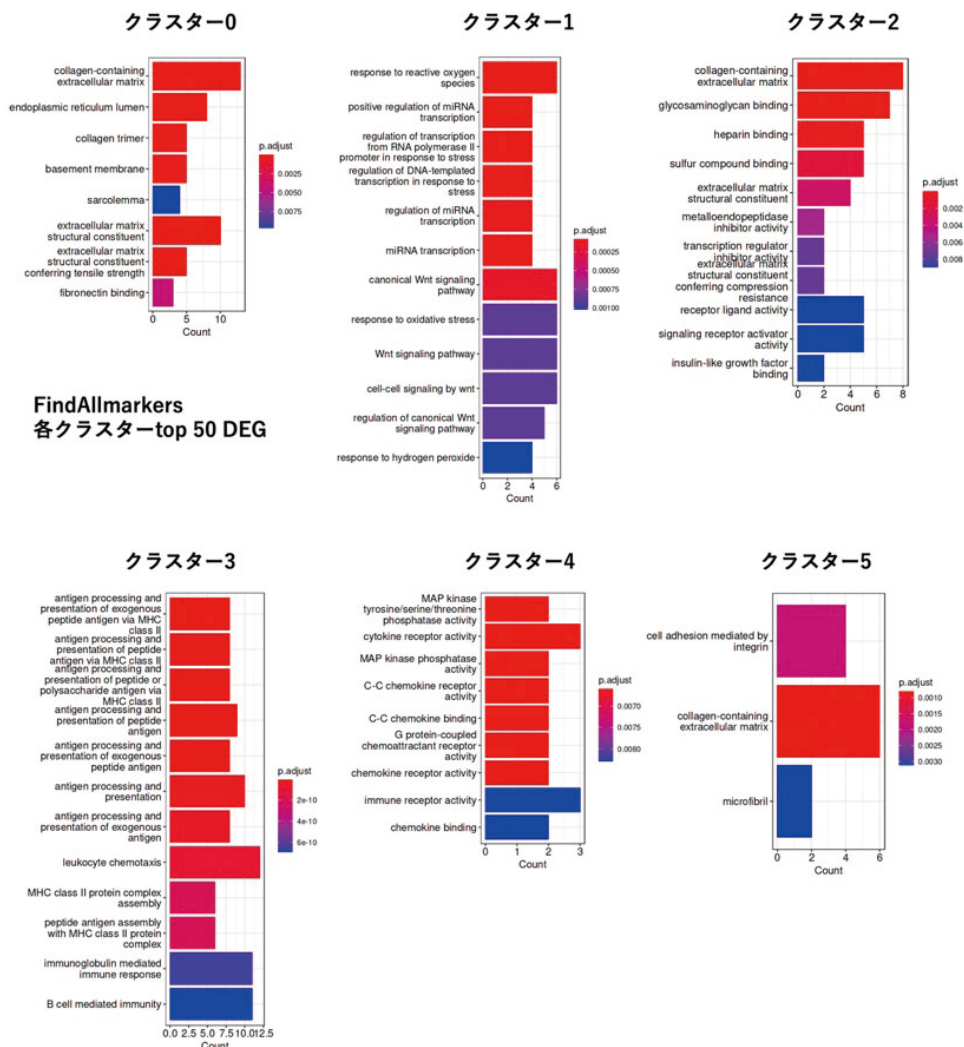


図4 GO解析を用いたMesenchymal cellクラスター特性

ファイルにより4つのサブクラスターに分類することができた。特に、adipocyte progenitorが明確に同定され、かつscRNAseqの解析基盤からその中でもDPP4+の特定のクラスターを特定できたことは、重要な結果と考えられる。最近の報告では、新規adipocyte progenitorマーカーであるDPP4発現群が多分化能を有すると規定している³⁾ものの、逆に脂肪分化効率が低いなど不確かな部分が多い。今後、幹細胞マーカーとされるCD34陽性細胞の中からDPP4陽性・陰性で分け、CD34陰性細胞と比較しながら、ChIP-sequenceとbulk ATACseqを用いてH3K4me3やH3K27me3などのエピジェネティックな状態の違いを評価することで、これらのサブクラスターごと脂肪分化能のpotencyがどのように異なるかを明らかにする必要がある。さらに、分化誘導後の脂肪定量評価とシングルセルマルチオーム解析(scRNA-seq+scATAC-seqの同時解析)を組み合わせることで、エピジェネティクスの違いがもたらすクラスターの違いをシングルセルレベルで明らかにすることができ、その結果分化効率を規定する重要なエピジェネテ

ィック領域を、シングルセル解析によるサブクラスターとして同定することができるであろう。これは、これまでのbulk解析では捉えることができなかった細胞分類であり、新たなメカニズムや治療標的の発見に繋げることができる。従って、創薬の視点からは細胞機能に直接働きかける治療標的として応用が期待できるので、研究成果はより効率的で質の高い「エピジェネティクス修飾制御による脂肪移植法開発」の基盤となることが期待できるであろう。

結論として、ヒト脂肪組織を用いたシングルセル解析(single cell RNA-seq)を行うことで、皮下脂肪組織由来細胞の細胞の多様性とその分子生物学的特性を明らかにすることができた。中でも、未分化なprogenitor様の細胞集団が含まれており、これらの多様なサブクラスターを詳細に解析することで、分化誘導効率を制御する分子基盤や分化誘導効率が低いメカニズムを検出するために役立つツールになることが明らかとなった。これらの研究成果と解析技術を基に、症例を積み重ねてさらに発展させることで、従来の方法ではなしえなかった脂肪細胞移植治療の向上効

果(分化能・生着)に資する新たな脂肪細胞機能調整法の開発につながるができる。さらに、ヒト脂肪組織の単一細胞解析データベースを構築することにより、脂肪細胞移植治療法において、いままでの懸案事項であった分化能および生着率増加を予測したり、評価することが可能となり、脂肪細胞移植治療法の生着率の術前診断やマーカー開発に応用することが期待できる。

(引用文献)

- 1) Adipose-Derived Stem Cells and Ceiling Culture-Derived Preadipocytes Cultured from Subcutaneous Fat Tissue Differ in Their Epigenetic Characteristics and Osteogenic Potential. Sasahara Y, Kubota Y, Kosaka K, Adachi N, Yamaji Y, Nagano H, Akita S, Kuroda M, Tanaka T, Bujo H, Mitsukawa N. *Plast Reconstr Surg.* 2019 Sep; 144 (3) : 644-655. doi: 10.1097/PRS.0000000000005913. PMID: 31461020
- 2) Epigenetic modifications underlie the differential adipogenic potential of preadipocytes derived from human subcutaneous fat tissue. Kubota Y, Nagano H, Kosaka K, Ogata H, Nakayama A, Yokoyama M, Murata K, Akita S, Kuriyama M, Furuyama N, Kuroda M, Tanaka T, Mitsukawa N. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2021 Sep 1;321 (3) : C596-C606. doi: 10.1152/ajpcell.00387.2020. Epub 2021 Jul 28.
- 3) Are Perivascular Adipocyte Progenitors Mural Cells or Adventitial Fibroblasts? Guimarães-Camboa N, Evans SM. *Cell Stem Cell.* 2017 May 4;20 (5) : 587-589. doi: 10.1016/j.stem.2017.04.010. PMID: 28475883