

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15350

研究課題名(和文)ケミカル・ダイレクト・リプログラミングに基づく代謝疾患の再生治療

研究課題名(英文)Regeneration therapy of metabolic diseases based on chemical direct reprogramming of somatic cells

研究代表者

岸田 綱郎(Kishida, Tsunao)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00370205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病の患者から褐色脂肪細胞を作出して自家移植できれば、新しい細胞治療を提供できる可能性が考えられる。最近我々は、線維芽細胞にC/EBP- とc-myc遺伝子を導入し、褐色脂肪細胞に直接コンヴェーとさせることに成功した。得られた褐色脂肪細胞はUCP1の発現が高く、極めて高機能であり、糖尿病マウスに移植するとインスリン抵抗性等を著明に改善した。そこで、さらに安全性が高い誘導法を確立することが期待される。本研究では、ヒト線維芽細胞に褐色脂肪細胞様のフェノタイプを誘導する化合物を探索した。その結果、遺伝子導入に換えて小分子化合物を用いて、ヒト褐色脂肪細胞を線維芽細胞から誘導することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Transplantation of autologous brown adipocytes into diabetic patients may become a valid therapeutic intervention against diabetes mellitus. Recently we succeeded in directly converting fibroblasts into brown adipocytes by transducing genes encoding C/EBP- and c-myc. These brown adipocytes robustly expressed UCP1, showed high metabolic activity, and ameliorated insulin resistance and other metabolic aberration after transplantation into diabetic mice. Based on these findings, we tried to establish a safer procedure to convert fibroblasts into brown adipocytes.

We explored chemical compounds that induce brown adipocyte-like phenotypes in human fibroblasts. As results, we have found some compounds that enable direct conversion of human fibroblasts into brown adipocytes without gene transduction. These compounds may be useful for a novel cell therapy against diabetes mellitus.

研究分野：代謝学

キーワード：褐色脂肪細胞 代謝疾患

1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪細胞は、白色脂肪細胞とは逆に、脂肪酸を酸化分解したエネルギーを熱として散逸する細胞であり、マウス等では肥満や耐糖能異常に抑制的に働く。ヒト成人での褐色脂肪細胞が存在することは、2009年に初めて証明され、まだ未解明の部分が多いが、興味深いことに高度の肥満、脂質異常症、糖尿病の患者ではほとんど活性が認められない (Saito et al, Diabetes, 2009)。そこで、糖尿病の患者から褐色脂肪細胞を作出して自家移植できれば、全く新しい細胞治療を提供できる可能性が考えられる。

一方、少数の既知因子を遺伝子導入することで、体細胞の運命転換が可能であることをiPS細胞研究が示して以来、リプログラミング技術を用いた様々な細胞種の創出が可能になりつつある。最近、我々はヒトの褐色脂肪細胞を、線維芽細胞から直接誘導することに成功した(ダイレクト・リプログラミング) (Kishida et al., Stem Cell Rep. 2015)。すなわち、ヒト線維芽細胞にC/EBP-とc-mycの2つの遺伝子を導入すると、UCP1の発現が極めて高く、酸素消費量やグルコース取り込み等が高い代謝制御能を示す、褐色脂肪細胞が得られた(図1)。この誘導の過程では、iPS細胞様の細胞の出現は認められなかった。C/EBP-とc-mycの一過性の発現によっても褐色脂肪細胞は誘導され、その褐色脂肪細胞としてのフェノタイプは両外来遺伝子の発現を無くしても維持されたことから、本法はヒト線維芽細胞から褐色脂肪細胞への直接のリプログラミングであることが強く示唆された。直接誘導褐色脂肪細胞(dBA)を糖尿病マウスに移植すると、in vivoでも糖脂質代謝を制御し糖尿病を抑制できた。すなわち、体重増加と空腹時血糖の上昇が抑制され、インスリン抵抗性と耐糖能が改善し、脂質異常症が是正された(図2)。このような高機能な褐色脂肪細胞の誘導は、これまで報告がない。

しかし現状では、dBAは遺伝子導入を行うことによって誘導しているので、一部に腫瘍化する細胞が含まれることを否定しにくい。移植医療に用いるには、より安全性が高い誘導法の確立が望まれる。そこでこの技術に基づき、遺伝子導入に換えて小分子化合物を用いて、機能的かつ安全な、ヒト褐色脂肪細胞を線維芽細胞から誘導する技術を開発することを想起した。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子導入に換えて小分子化合物で、ヒト線維芽細胞から褐色脂肪細胞へのダイレクト・リプログラミングを達成する技術を確立する。得られた細胞の性状と機能を確認する。

本技術は我々の独創的な革新技术である。小分子化合物で代替する点も独創性が高く、実用化に近づき意義が大きい。

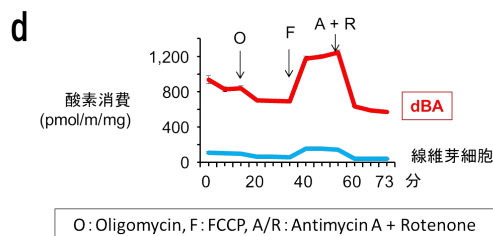
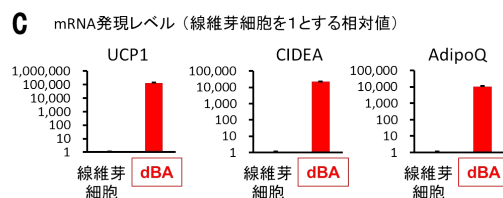
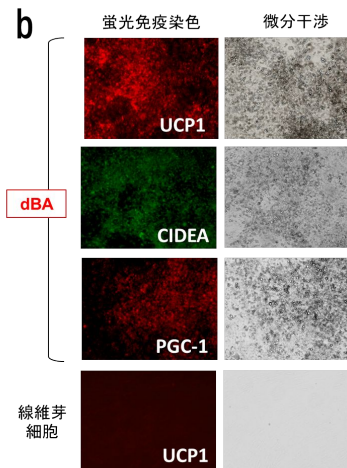
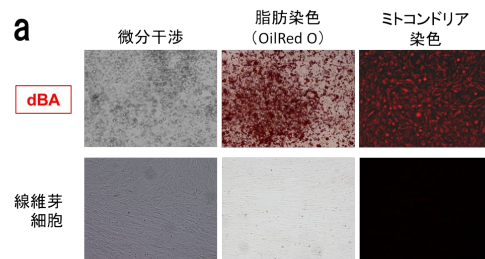


図1 ダイレクト・リプログラミングで誘導した、ヒト褐色脂肪細胞。ヒト線維芽細胞にC/EBP-βとc-myc遺伝子を導入すると、80%以上の細胞が、多房性脂肪滴とミトコンドリアを多数有する褐色脂肪細胞(dBA)にコンヴァートした(a)。dBAは、褐色脂肪細胞特異的の遺伝子群を強発現し(b、c)、高いUncoupling呼吸能を有する(d)。

本研究の成果は、糖尿病に対する新しい再生医療をもたらす可能性がある。糖尿病に対しては、褐色脂肪細胞はインスリン産生細胞とは異なる機構で抑制するので、将来的には両細胞の併用でさらに効果的な治療法を創出できる可能性がある。

3. 研究の方法

線維芽細胞からiPS細胞の誘導や、iPS細胞から心筋細胞への誘導に関しては、それらが可能な小分子化合物がすでに見出されており (Minami 他, Cell Rep, 2012; Pingping

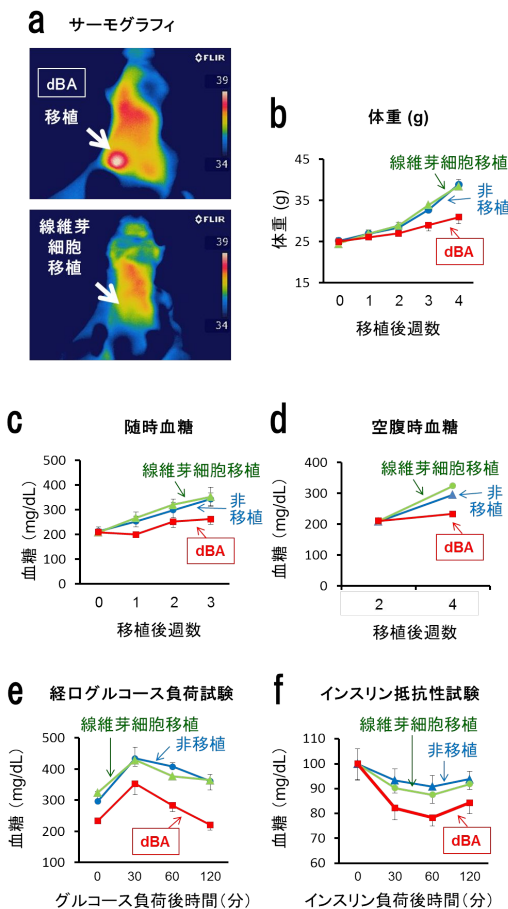


図2 褐色脂肪細胞は糖尿病を抑制する
 マウス線維芽細胞から誘導した dBA をマウスに皮下移植すると、寒冷刺激後に移植部局所で熱を発生した (a)。糖尿病マウス KK-Ay に移植すると、体重と血糖上昇が有意に抑制され (b-d)、耐糖能とインスリン抵抗性が著明に改善した (e-f)。

他, Science, 2013)、化合物を直接細胞に添加することで、エピジェネティックなフェノタイプコンバージョン誘導能をスクリーニングできるという方法論の有効性は証明されている。そこで図 1、2 の我々の技術に基づいて、褐色脂肪細胞の誘導活性を有する化合物を探索した。具体的には、Rosiglitazone と T3 を添加した培地に種々の化合物を添加し、この培地中で正常ヒト線維芽細胞を培養した、細胞内の脂肪滴の蓄積を Bodipy で染色し、その形態と定量を行った。その後さらに UCP1 の発現等を解析し、種々の褐色脂肪細胞マーカーの発現も評価した。

4. 研究成果

組換え DNA 実験、動物実験については、京都府立医科大学における所定の倫理審査を経て、認可を受けた上で行った。

その結果、ヒト線維芽細胞に褐色脂肪細胞様のフェノタイプを誘導する化合物を見出すことに成功した。すなわち、化合物 X、Y、Z を添加して培養した細胞は、いずれも

Rosiglitazone と T3 のみを添加した培地で培養した細胞に比して、著明に脂肪滴を蓄積し、UCP1 を高発現していた (data not shown)。また、これらの細胞には他の褐色脂肪細胞特異的マーカーの発現も誘導されていた。したがって、遺伝子導入に換えて、ヒト線維芽細胞から褐色脂肪細胞にフェノタイプ・コンバージョンさせる小分子化合物を見出すことに成功したと考えられる (論文投稿準備中)。

本研究の成果は、移植後の癌化の危険性が低い高機能な褐色脂肪細胞を、患者から低侵襲に採取できる線維芽細胞から誘導する技術を提供することにより、糖尿病に対する安全で効果的な、新しい再生医療の手段をもたらす可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Generation of directly converted human osteoblasts that are free of exogenous gene and xenogenic protein

K. Yamamoto, Y. Sato, K. Honjo, H. Ichioka, F. Oseko, Y. Sowa, T. Yamamoto, N. Kanamura, T. Kishida, O. Mazda

J Cell Biochem. 2016 Mar 18. doi: 10.1002/jcb.25546. [Epub ahead of print]

PMID: 26990860 (査読あり)

Reprogrammed Functional Brown Adipocytes Ameliorate Insulin Resistance and Dyslipidemia in Diet-Induced Obesity and Type 2 Diabetes.

Kishida T, Ejima A, Yamamoto K, Tanaka S, Yamamoto T, Mazda O.

Stem Cell Rep. 2015 Oct 13;5(4):569-81.

doi: 10.1016/j.stemcr.2015.08.007.

Epub 2015 Sep 10. PMID: 26365511 (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 特願 2015-157697

発明者: 山本健太、岸田綱郎、山本俊郎、松田修

権利者: 京都府公立大学法人

種類: 特許出願

番号: 特願 2015-157697

出願年月日: 平成 27 年 (2015 年) 8 月 7 日

国内外の別: 国内

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/microbiol/research/project_2.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者 岸田 綱郎

(Kishida Tsunao)

京都府立医科大学医学(系)研究科(研究院) 准教授

研究者番号：00370205

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 川人 豊

(Kawahito Yutaka)

京都府立医科大学医学(系)研究科(研究院) 准教授

研究者番号：50336731

連携研究者 松田 修

(Mazda Osam)

京都府立医科大学医学(系)研究科(研究院) 教授

研究者番号：00271164

キーワード

褐色脂肪細胞、糖尿病