

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08533

研究課題名(和文) ヒト褐色脂肪細胞特異的モノクローナル抗体が認識する抗原分子の同定

研究課題名(英文) Identification of the antigen molecule that is recognized by a human brown adipocyte-specific monoclonal antibody

研究代表者

佐伯 久美子 (Saeki, Kumiko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：80322717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪組織(BAT)は代謝改善作用を持つ熱産生型脂肪で、加齢、肥満、糖尿病で減少する。代謝症候群にはBAT不全症と呼ぶべき亜群が存在することが想定されるが、この点を明らかにするためには簡便で安全なヒト生体BAT測定技術が必要となる。現行の核医学的検査を用いた方法は手間、コスト、安全性の観点から課題が残されている。本研究では、汎用性の高いヒト生体BAT測定技術開発に向けて「ヒトBAT血清マーカー」を同定べく、代表者が作製した『ヒト胚性幹細胞由来BAT特異的モノクローナル抗体』が認識する抗原分子の同定を試みた。今後は本研究成果を血清マーカーを用いたヒトBAT測定技術開発に向けて展開していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的に肥満者が増加しているが、コロナ禍では運動不足やストレスにより肥満者の増加は加速している。健康寿命延伸と医療費削減のために肥満予防は重要課題である。エネルギー消費型脂肪である褐色脂肪組織(BAT)は、食事に起因する肥満や中年太りへの抑制効果を発揮ことが知られており、肥満・代謝症候群にはBAT不全症が相当数含まれていると想定される。本研究により採血検査で簡便にヒト生体BAT量が測定できるようになれば健康診断でのBAT評価が可能となり、BAT不全症に対してより早く介入することができる。また採血検査という簡便性から肥満者が多い途上国への技術移転も容易であり、世界の肥満対策にも大きく貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Brown adipose tissue (BAT) enhances energy expenditure via heat production. It also secretes various metabolism-improving factors, thus contributing to obesity prevention. Since the amounts of BAs decrease with age, obesity and diabetes in humans, it has been suggested that there is a subgroup of "BAT failure" in metabolic syndrome. To advance our understanding of human BATs, a feasible technique to measure BAT amounts in a living body is required. To overcome labor, cost and safety issues that the current technique has, we tried to obtain a serum marker for human BAT by identifying the antigen molecule that is recognized by "BA-specific monoclonal antibody raised against human embryonic stem cell-derived brown adipocytes (hBA)", which does not cross-react with other human tissues. By purifying the target molecule from hBA lysates, we obtained information regarding the candidate for the antigen molecule. We are currently investigating the "hBA-specific modification" of this molecule.

研究分野：代謝および内分泌学

キーワード：褐色脂肪細胞 肥満 糖尿病 代謝

## 1. 研究開始当初の背景

世界的に肥満者が増加しており、先進国だけでなく途上国でも深刻な社会問題となっている。肥満予防は健康寿命延伸と医療費削減のための重要課題であるが、これまでに様々な方策がとられてきたにも関わらずまだ十分な成果は得られていない。近年、健康的に無理なく痩身を目指すという観点から褐色脂肪組織(BAT)が注目されている。BATは熱産生型脂肪として小型冬眠動物で発見されたが、ヒト成体にも存在することが示されている。過食に伴う肥満や中年太りに対する抑制効果を持つことも報告されている。BATは加齢、肥満、糖尿病などの病態で減少することから、肥満や代謝症候群の中には「BAT不全症」と呼ぶべき病態が含まれていることが想定される。ヒト生体BAT量を簡便に測定することができれば、発症前、発症時、治療介入後のBAT量を時系列で評価することができる。得られた結果は「BAT不全症」の疫学や病態解析に有用な情報を提供するとともに、肥満や代謝症候群の「疾患層別化」にも役立つ。

現行のBAT測定技術は、CT検査と<sup>18</sup>F-FDG-PET検査とを組み合わせた検査(以下、PET-CT検査)を用いるため、高額医療機器を用いることによるコストの問題や、放射線被曝に伴う健康リスクの問題がある。また検査前に2時間の寒冷刺激を負荷する必要があるため手間の問題もある。さらに測定結果は季節の影響を大きく受けるため、治療的介入の後に正確な時系列データを取得していくことが困難となる。このように現行のヒトBAT測定技術は、コスト・手間・安全性・データ安定性の観点から課題が残されている。

これらの問題を克服するために、本研究では「ヒトBAT血清マーカー」を得ることを目的として検討を行なった。ヒトBAT血清マーカーを同定してその高感度検出系を構築することができれば採血検査でBAT量を評価することが可能となり、健康診断等でルーチンにBAT量測定を行うことができるようになる。この目的のために本研究では、代表者が開発した「ヒト多能性幹細胞の褐色脂肪細胞(brown adipocyte; BA)誘導技術」を用いて作製したヒト胚性幹細胞由来BA(以下、ヒトBA)を免疫原として用いて作製した「ヒト胚性幹細胞由来BA特異的モノクローナル抗体」が認識する抗原分子の同定を行なった。本抗体は、ヒト組織アレイにおいて他の組織とは交叉反応しないことを確認しており「ヒトBAT特異性が高い分子」であると考えられる。さらに当該分子の約半数は細胞外に分泌されていること、また各種ペプチダーゼを消化されることから「分泌型ペプチド」であることを確認している。さらに、SDS-PAGEでは見かけの分子量10kDa付近にあるブロードなバンドとして検出されることから「高度な修飾」を受けていること、また本抗体はIgM型であることから長鎖糖修飾を受けていることなどが想定される。ゲノムプロジェクトが終了して新規遺伝子の同定が難しい中、今後は「組織特異的修飾」に着目した研究が「組織特異的マーカーの探索」において重要になるが、本抗体が認識する抗原はまさにそのような分子であると考えられる。

以上、世界的な喫緊課題となっている肥満の予防と治療介入に向けて、高汎用性ヒトBAT測定技術の開発に向けた「ヒトBAT血清マーカー」を同定することの意義は大きい。

## 2. 研究の目的

現行のBAT測定技術が抱える課題を克服し、一般的な健康診断でも実施可能な汎用性の高いヒトBAT測定技術の開発に向けて「ヒトBATの血清マーカー」を提供すべく、代表者が作製したヒトBA特異的モノクローナル抗体が認識する抗原分子を同定する。

この分子は分泌タンパクであり、白色脂肪細胞やベージュ細胞はもちろん、BA以外のヒト細胞では発現しないことを確認しており、ヒト生体に存在するBATの総量を反映する優れた血清マーカーとなることが示唆される。但し、血清中にごく僅かに存在する抗原分子を正確に定量するためには、もう1種類の別エピトープを認識する抗体が必要となる。その理由は、同一分子に対する異なるエピトープを標的とした2種類の抗体があれば、サンドイッチELISA法や蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を適用することでより高感度かつ高特異度の定量が可能となるからである。このような抗体を得るためには抗原分子の詳しい構造の同定は必須である。

以上、本研究では、高汎用性BAT測定技術開発を目指して「ヒトBA特異的モノクローナル抗体」が認識する抗原分子(ペプチド骨格および修飾構造)を同定する。

## 3. 研究の方法

本研究では「ヒトBA特異的モノクローナル抗体」が認識する抗原分子の同定作業を、以下の2つの戦略で実施した。

1つめは、ヒトBA溶解液を調製し、疎水カラム・ゲル濾過カラム・イオン交換カラムなど、複数種のカラムを用いた高速液体カラムクロマトグラフィー(HPLC)にて純化する方法である。具体的には、各々カラムに関してウェスタンブロット法で抗原分子が存在する分画を特定したうえで、複数種のカラムによる分画操作を直列に実施して目的分子を純化する。十分量の純化サ

ンプルが調製されたら SDS-PAGE でさらに分離し、クマシー染色により目的バンドを可視したうえで、該当部分を切り出したゲル破片からタンパク成分を溶出して質量分析機で解析する。得られた結果をタンパク質データベースで検索することで、抗原分子のペプチド骨格構造が同定される。

もう1つは、免疫沈降を適用した方法である。上述のように、代表者が作製したヒト BA 特異的モノクローナル抗体は IgM 型であるため、免疫沈降法を適用した純化は困難である。そこで、免疫グロブリン重鎖を IgG 型に変更したモノクローナル抗体を遺伝子組換え技術により作製する。この IgG 型抗体を用いてヒト BA 溶解液から抗原分子を沈降させ、十分量の抗原分子が回収されたら質量分析機を用いた解析で抗原分子のペプチド骨格を同定する。ただし前項でも述べたように、抗原分子のヒト BAT 特異性は修飾により賦与されていることが想定されるため、IgG 型化抗体を用いた免疫沈降による純化では十分に純度の高いサンプルを得ることは困難となることも予想される。このため、第一の戦略を優先して本研究を実施した。

#### 4. 研究成果

まずパイロットスタディとして、少量のヒト BA 溶解液を用いて、ゲル濾過カラム、イオン交換カラム、疎水カラムの各々に関して目的分子が濃縮される画分を独立に決定した。次に、中等量のヒト BA 溶解液を用いて、これらのカラムを用いた分画操作を直列に実施した際に目的分子が効果的に純化できる条件を決定した。次に、大量のヒト BA 溶解液を用いて純化作業を繰り返して実施することで純化サンプルの大量調製を行なった。得られたサンプルは SDS-PAGE でさらに分離し、クマシー染色で目的バンドを目視しながら該当する箇所を切り出した。このゲル破片は文部科学省の先端研究基礎基盤事業で支援されている臨床質量分析共用プラットフォームに委託して質量分析機による解析を行ったが、ここで予想外の結果に直面した。クマシー染色で十分量のサンプルが得られていたにも関わらず、質量分析機での解析ではペプチドシグナルは全く検出されなかったのである。このような結果が得られた原因を調べたところ、目的分子は SDS-PAGE から全く溶出されていなかったことが判明した。SDS-PAGE からのタンパク溶出条件を変えても状況は変わらず、このような例はまだ経験がないとのことであった。以上、当該分子はタンパクとしては「極めて特異な性質」を持つことが偶然にも明らかとなった。

そこで、SDS-PAGE での分離作業を行わずに、カラムクロマトグラフィのみで精製したサンプルを用いて質量分析機を用いた解析を行なった。結果、SDS-PAGE による精製ステップがなくなったことでサンプル純度が低下したため、質量分析機を用いた解析では多数（～数十）の候補がヒットした。これらの中から最も可能性の高い候補を選定するため、独立に3ロットの精製サンプルを調製し、それらに共通にヒットする候補が得られるか調べた。結果、3ロットで共通にヒットした候補として Fatty Acid Binding Protein 5 (FABP5) が得られた。しかしながら、マウスの遺伝子発現データベースからは FABP5 の遺伝子発現様式に BAT 特異性はないこと、また抗原分子は 10kDa 以下であり FABP5 の分子量（15kDa）とは合わないことから、抗原分子は少なくとも通常フォームの FABP5 ではないことが予想された。実際、ヒト BAT 特異的抗体はリコンビナント FABP5 を認識しないことが確認された。しかし、このことは抗原分子が FABP5 とは無関係なタンパクであるということを示すものでは必ずしもなく、ヒト BAT では FABP5 は特異的修飾（脂質付加、糖付加、切断等）を受けている可能性が除外できない。

この可能性を検証するために、第2の戦略を開始した。即ち、IgM 型ヒト BA 特異的モノクローナル抗体を IgG 型に改変した抗体を遺伝子組換え技術により作製した。前述のように、抗原分子のヒト BAT 特異性は修飾により賦与されていることを想定しており、IgG 型化抗体は特異度も感度も低下することを予想していたが、結果はその通りであった。すなわち、IgG 型抗体を用いたウェスタンブロットでは目的分子のバンドの検出性が顕著に低下する一方で、複数の非特異的バンドが検出された。それでも IgG 型抗体は目的分子を沈降することが確認できたため、大量のヒト BA 溶解液を調製して大量純化サンプルを得るべくヒト ES 細胞の大量培養を開始した。残念ながらコロナ禍の影響を受け、大量ヒト ES 細胞からの BA 分化誘導ステップは中断せざるを得ない状況となった。

コロナ禍が開けた現在、順次、上記の実験を再開している。今後は、大量ヒト BA 溶解液を用いて IgG 型抗体による免疫沈降サンプルの質量分析機を用いた解析を進めるとともに、FABP5 のヒト BAT 特異的修飾の可能性について検討を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yudasaka M, Okamatsu-Ogura Y, Tanaka T, Saeki K, Kataura H.	4. 巻 54
2. 論文標題 Cold-induced Conversion of Connective Tissue Skeleton in Brown Adipose Tissues.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 131-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.21-00030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Oka Masako, Kobayashi Norihiko, Matsumura Kazunori, Nishio Miwako, Nakano Kenta, Okamura Tadashi, Okochi Hitoshi, Minamisawa Tamiko, Shiba Kiyotaka, Saeki Kumiko	4. 巻 9
2. 論文標題 New Role for Growth/Differentiation Factor 15 in the Survival of Transplanted Brown Adipose Tissues in Cooperation with Interleukin-6	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1365 ~ 1365
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9061365	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishio Miwako, Saeki Kumiko	4. 巻 9
2. 論文標題 The Remaining Mysteries about Brown Adipose Tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2449 ~ 2449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9112449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Oka M, Kobayashi N, Matsumura K, Nishio M, Saeki K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Exogenous Cytokine-Free Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Classical Brown Adipocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 373
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells8040373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yudasaka M, Yomogida Y, Zhang M, Tanaka T, Nakahara M, Kobayashi N, Okamatsu-Ogura Y, Machida K, Ishihara K, Saeki K, Kataura H.	4. 巻 27
2. 論文標題 Fasting-dependent Vascular Permeability Enhancement in Brown Adipose Tissues Evidenced by Using Carbon Nanotubes as Fluorescent Probes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-32758-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐伯 久美子
2. 発表標題 1型糖尿病モデルマウスを用いたタークペプチドの前臨床試験
3. 学会等名 サイエンスフォーラム2020オンライン - 根治に向けてのカウントダウン 6 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masako Oka, Kazunori Matsumura, Kumiko Saeki
2. 発表標題 A human brown adipocyte-specific monoclonal antibody for an evaluation of brown adipose tissue mass in humans
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡雅子
2. 発表標題 ES細胞由来褐色脂肪細胞特異的モノクローナル抗体の作製と抗原分子の同定
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 褐色脂肪細胞上清、その調製法、及び、使用	発明者 佐伯 久美子、小林徳彦、岡雅子、松村和典、西尾美和子、そ	権利者 国立研究開発法人国立国際医療研究センター、
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-152727	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------