

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17990

研究課題名(和文) 褐色脂肪細胞の化学誘導技術を用いた糖尿病細胞治療法の開発

研究課題名(英文) Novel cell therapy for diabetes with chemically-induced brown adipocytes

研究代表者

小谷 晋一郎 (Kotani, Shin-ichiro)

京都府立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：30783964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪細胞は余剰エネルギーを熱として散逸し、糖脂質代謝や体温調節を司るが、糖尿病患者ではほとんど消失している。糖尿病患者の体細胞を褐色脂肪細胞に転換して自家移植できれば、新しい再生治療法を開発できる可能性がある。我々はヒト線維芽細胞を、小分子化合物を添加した培地で培養し、褐色脂肪細胞に直接転換する方法を見出した。本法で作出される細胞は褐色脂肪細胞フェノタイプを示すとともに、外来遺伝子を含まず造腫瘍性がないまたは低い等の利点を有するが、その機能と転換メカニズムは未解明である。本研究において、我々はこれらの解析を行い、作出した細胞の褐色脂肪細胞機能と直接転換機序についての新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに我々の研究室では、遺伝子導入を用いて線維芽細胞を褐色脂肪細胞に直接転換させる技術も開発し、得られた細胞を糖尿病モデルマウスに移植するとインスリン抵抗性と脂質異常症を改善できることを報告したが、本技術で作出される褐色脂肪細胞は、機能的であるとともに、遺伝子を導入せずに小分子化合物を添加して培養するだけで短期間に調製できるため、再生医療への応用においてより有用であると考えられる。本研究でこの細胞の機能的特性を解析したことにより、その可能性がさらに高まった。また、コンヴァージョン機構の解析によって、褐色脂肪細胞への直接転換機序解明に近づいた。

研究成果の概要(英文)：Brown adipocytes control carbohydrate and lipid metabolism as well as regulation of body temperature by dissipating excess energy as heat. In diabetic patients, their functions are almost lost. If brown adipocytes can be induced from somatic cells of the patients and transplanted back into them, such a strategy could be a novel and effective regeneration therapy. Recently, we have found a new method to directly convert human dermal fibroblasts into brown adipocytes by culturing with a small molecular compound. The converted cells strongly expressed brown adipocyte-specific genes and proteins. In addition, they are free from any exogenous genes and did not show tumorigenicity in mice so far tested. But their functions as brown adipocytes have not been fully characterized, and the mechanism of conversion remains to be clarified. In this study, we analyzed the functions of the directly converted brown adipocytes and explored the mechanism of direct conversion.

研究分野：免疫学

キーワード：糖尿病 移植・再生医療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

線維芽細胞等の体細胞に、特定の細胞への分化に関わる転写因子の遺伝子を導入することにより、これらの細胞へと直接的にコンヴァートさせることが可能である(ダイレクト・リプログラミング、あるいはダイレクト・コンバージョン)。これまでに我々の研究室では、レトロウイルスベクターを用いてヒト線維芽細胞に C/EBP と c-Myc の2つの遺伝子を導入して誘導培養することにより、褐色脂肪細胞へと直接的にコンヴァートできることを見出した。さらに、線維芽細胞からダイレクト・コンバージョンさせた褐色脂肪細胞を糖尿病モデルマウスに移植すると、インスリン抵抗性と脂質異常症を抑制できることを明らかにした(Stem Cell Reports 2015)。しかしながら、このような遺伝子導入法によって作出される細胞の染色体にはウイルスベクターの配列が組込まれるため、癌遺伝子の活性化によって細胞が癌化するというリスクを否定することはできない。そこで我々は、遺伝子導入を行わずに褐色脂肪細胞へとコンバージョンさせる方法を探索した結果、さらに近年、ヒト線維芽細胞を、特定の単一種の小分子化合物を添加した培地で誘導培養するだけで褐色脂肪細胞フェノタイプを示す細胞(chemically induced brown adipocytes: cBA)に転換させることに成功した。cBAは褐色脂肪細胞特異的遺伝子群ならびにタンパク質群(CIDEA, KCNK3, UCP-1等)を高発現しており、多房性脂肪滴とミトコンドリアに富む褐色脂肪細胞様の性状を有する細胞であり、また、その誘導期間において NANOG 遺伝子の発現上昇はみられず、この細胞を免疫不全マウスに移植して経時的に観察を行ったところ、移植部位の腫瘍化はみられなかった(平成28~29年度研究活動スタート支援:褐色脂肪細胞の化学誘導技術の開発と糖尿病の再生治療)。ヒト線維芽細胞は患者から低侵襲に採取して拡大培養することが容易であり、また、本法では遺伝子導入を行わないことに加えて、ES細胞や iPS 細胞のような幹細胞の状態を経由することなく褐色脂肪細胞へと直接転換すると考えられるため、未分化の幹細胞が混入して癌化するというリスクはない。したがって、このようにして作出される褐色脂肪細胞は、細胞移植に応用する上でより安全であり、理想的な細胞であると考えられる。しかしながら、cBAの褐色脂肪細胞としての機能と線維芽細胞から褐色脂肪細胞フェノタイプへの転換機序については未解明である。そこで、本研究では、本法によって作出したcBAの褐色脂肪細胞機能を評価するとともに、ダイレクト・コンバージョンのメカニズムを明らかにすることによって、新しい糖尿病再生治療法を開発するための基盤の確立を行う。

### 2. 研究の目的

褐色脂肪細胞は余剰エネルギーを熱として散逸することにより、糖脂質代謝や体温調節の機能を果たしているが、糖尿病患者ではほとんど消失している。そこで、糖尿病患者の体細胞を採取し、褐色脂肪細胞へと転換させて自家移植することができれば、新しい糖尿病再生治療法を開発できる可能性がある。これまでに我々の研究室では、線維芽細胞に遺伝子を導入することによって褐色脂肪細胞にダイレクト・コンバージョンさせることに成功し、この褐色脂肪細胞を糖尿病モデルマウスに移植すると、インスリン抵抗性と脂質異常症を改善できることを明らかにした。さらに近年、ヒト線維芽細胞を、特定の単一種の小分子化合物を添加した培地で培養するだけで、褐色脂肪細胞フェノタイプを示す細胞(cBA)へとコンバージョンさせる方法を見出した。cBAは褐色脂肪細胞特異的遺伝子およびタンパク質群を高発現しているが、褐色脂肪細胞としての機能とその転換メカニズムについては未解明である。

本研究では、cBAの褐色脂肪細胞機能の解析と転換メカニズムの検討を行ってその性状を詳細に調べ、本技術の糖尿病の細胞移植治療への応用を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト線維芽細胞から直接転換した褐色脂肪細胞(cBA)の機能解析

##### インスリン応答性の評価

ヒト線維芽細胞を、特定の単一種の小分子化合物を添加した褐色脂肪細胞誘導培地で一定期間培養してcBAを調製した。非誘導細胞とcBAにインスリンを添加した後、2-デオキシグルコースを添加して一定時間培養した。細胞を破碎した後、酵素サイクリング法を用いて細胞内2-デオキシグルコースを定量し、添加群/非添加群のグルコース取込み量の比較を行った。

##### アドレナリン受容体アゴニスト応答性の評価

非誘導細胞とcBAにフォルスコリンあるいはイソプロテレノールを添加して一定時間培養した。これらの細胞からRNAを抽出し、real time RT-PCR法を用いて添加群/非添加群のUCP-1遺伝子発現の比較を行った。

##### 代謝能の評価

非誘導細胞とcBAに、フラックスアナライザーを用いてオリゴマイシン・FCCP・ロテノン/アンチマイシンを順次添加し、経時的に酸素消費速度ならびに細胞外酸性化速度の測定を行った。また、オリゴマイシン添加後とロテノン/アンチマイシン添加後の酸素消費速度の差からプロトンリーク値を算出した。

#### (2) cBAへのコンバージョンメカニズムの解析

不死化遺伝子を導入したヒト線維芽細胞に、種々の遺伝子に対する gRNA および CAS9 遺伝子を導入してクローニングすることにより、それぞれをノックアウトした線維芽細胞を作製した。これらの細胞を、種々の阻害剤を添加した褐色脂肪細胞誘導培地で培養し、RNA を抽出した後、real time RT-PCR 法を用いて脂肪細胞/褐色脂肪細胞関連遺伝子群の発現比較を行った。続いて、正常ヒト線維芽細胞を、特定の小分子化合物と種々の阻害剤を共添加した褐色脂肪細胞誘導培地で培養し、同様に遺伝子発現比較を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト線維芽細胞から直接転換した褐色脂肪細胞 (cBA) の機能解析

###### インスリン応答性の評価

非誘導細胞、cBA におけるインスリン添加/非添加群のグルコース取込み量の多重比較を行った結果、インスリン添加によって cBA のグルコース取込み量は有意に上昇することがわかった。

###### アドレナリン受容体アゴニスト応答性の評価

非誘導細胞、cBA におけるフォルスコリンあるいはイソプロテレノールの添加/非添加群における UCP-1 遺伝子発現の多重比較を行った結果、それぞれの添加によって cBA の UCP-1 遺伝子発現は有意に上昇することがわかった。

###### 代謝能の評価

非誘導細胞、cBA における、FCCP 添加後の酸素消費速度を比較した結果、cBA は非誘導細胞よりも有意に大きい酸素消費速度をもつことがわかった。さらに、それぞれの細胞のプロトンリーク値を比較した結果、cBA は非誘導細胞よりも有意に大きい値を示した。

これらの結果から、本法によって作出した cBA は、インスリン応答性、交感神経刺激応答性、より高いミトコンドリア呼吸能を有しており、また、脱共役によるエネルギー散逸を行う可能性があり、褐色脂肪細胞として機能する可能性が示された。

##### (2) cBA へのコンバージョンメカニズムの解析

各遺伝子をノックアウトした線維芽細胞を、通常培地および褐色脂肪細胞誘導培地で培養し、遺伝子発現を比較した結果、特定の遺伝子ノックアウト群において脂肪細胞関連遺伝子の発現は有意に上昇することがわかった。また、特定の阻害剤を添加した褐色脂肪細胞誘導培地で培養すると、非添加群と比べて有意に上昇することがわかった。また、特定の小分子化合物と種々の異なる阻害剤を共添加した褐色脂肪細胞誘導培地で培養した正常ヒト線維芽細胞と、非誘導細胞の脂肪細胞/褐色脂肪細胞関連遺伝子発現を多重比較した結果、特定の阻害剤を共添加した群において、有意な遺伝子発現の変化がみられた。これらの結果から、本法におけるヒト線維芽細胞から脂肪細胞への直接転換機序の一部が明らかとなった。

以上の結果から、本法によって作出した cBA およびその直接転換機序についての重要な知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	松田 修  (Mazda Osam)		
研究協力者	岸田 綱郎  (Kishida Tsunao)		
研究協力者	扇谷 えり子  (Ohgitani Eriko)		

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