

平成23年 5月16日現在

機関番号：10101  
 研究種目：新学術領域研究  
 研究期間：2008 ～ 2010  
 課題番号：20200064  
 研究課題名（和文） 幹細胞標的化 miRNA の非侵襲的送達による褐色脂肪細胞の生体内分化誘導法の創製  
 研究課題名（英文） In vivo induction of brown adipocyte differentiation by noninvasive delivery of miRNAs into stem cell  
 研究代表者  
 梶本 和昭 (KAJIMOTO KAZUAKI)  
 北海道大学・大学院薬学研究院・特任准教授  
 研究者番号：10416216

## 研究成果の概要（和文）：

皮下脂肪組織中の幹細胞 (ASC) が褐色脂肪細胞様に分化する過程で多数の特徴的な miRNA が発現することを見いだした。しかし、その後の解析から、これらの miRNA は ASC の分化とは異なるプロセスに関与していることが示唆された。また、ラットの皮下脂肪から ASC を多量に含む細胞画分を分離してマウスに免疫することにより、ASC を特異的に認識する新規モノクローナル抗体を取得することに成功した。さらに、イオントフォレシスをを用いた機能性核酸の非侵襲的経皮送達技術を確立し、in vivo で siRNA やオリゴ DNA を皮内に送達して、内因性遺伝子の発現抑制や経皮免疫の賦活化に成功した。本研究により、ASC の分化制御には miRNA 以外に未知の因子が関与していることが明らかとなり、我々が構築した抗体や機能性核酸の導入技術を利用することで、より詳細な解析が可能になると考えられる。

## 研究成果の概要（英文）：

It was found that a lot of miRNAs were up-regulated when the subcutaneous adipose-derived stem cells (ASC) differentiated into brown-like adipocytes. Although these miRNAs may be involved in modulating ASC function, up-modulations of these miRNAs did not appear to affect ASC differentiation. In addition, we succeeded to obtain the novel monoclonal antibodies specifically responsible to ASC. Furthermore, we also applied the iontophoresis to noninvasive transdermal delivery of functional nucleic acids, and succeeded the silencing of the endogenous gene expression and activation of immune response in vivo. According to this study, it was suggested that ASC differentiation into brown-like adipocyte might be regulated by not only miRNAs but also unknown factors. Thus, the ASC specific antibodies and the delivery technology established by this study were helpful for the further investigation to clarify the molecular mechanisms of ASC function.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 8,300,000  | 2,490,000 | 10,790,000 |
| 2009年度 | 7,900,000  | 2,370,000 | 10,270,000 |
| 2010年度 | 7,900,000  | 2,370,000 | 10,270,000 |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 24,100,000 | 7,230,000 | 31,330,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：(1) 褐色脂肪細胞、(2) miRNA、(3) 発生・分化 (4) マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

皮下や内臓脂肪を構成する白色脂肪細胞がレプチン (Nature 372, 1994) やアディポネクチン (Biochem Biophys Res Commun 257, 1999) 等の様々な生理活性物質を分泌して生体機能を調節する内分泌器官として機能することが明らかとなった 90 年代後半以降、白色脂肪細胞の機能と生活習慣病の発症に関する研究が世界中で展開されている。また、幹細胞を用いた再生医療研究において、皮下白色脂肪組織中には多能性幹細胞が多数存在し、白色脂肪細胞だけでなく骨芽細胞や筋芽細胞などへ分化できることが報告されている (J. Dermatol. Sci. 48, 2007)。さらに、幹細胞の骨芽細胞への分化が miRNA と呼ばれる機能性 RNA によって制御されていることも報告され (Biochem Biophys Res Commun. 368, 2008)、脂肪組織由来幹細胞 (ASC) と miRNA の再生医療への応用が期待されている。一方、生体内で唯一、脂肪を積極的に燃焼して熱産生を行う褐色脂肪細胞の機能は、疾患予防の観点からも重要と考えられるにも関わらず、モデル細胞系や幹細胞からの分化誘導法が確立されていないために、白色脂肪細胞ほど精力的な解析が行われていなかった。

我々は、これまでの研究でラットの褐色脂肪組織から未分化細胞を単離して褐色脂肪細胞へ分化させる初代培養系を確立しており、機能制御メカニズムを分子レベルで解明するための研究を進めてきた。その中で、皮下白色脂肪組織中に多能性幹細胞 (ASC) が多数存在することに着目し、これを単離して初代培養を行った結果、褐色脂肪細胞のマーカー遺伝子 (UCP1) を発現する細胞に分化・成熟させることに成功していた。これまで褐色及び白色脂肪細胞は共通の間葉系幹細胞から分化・成熟すると考えられているが、詳細な分子機構は未だ解明されていない。幹細胞の骨芽細胞への分化経路に miRNA が関与するとの報告から、褐色あるいは白色脂肪細胞への分化運命決定にも miRNA が関与している可能性が高く、そのメカニズムを解明することにより、miRNA を利用して ASC の分化をコントロールすることが可能になるのではないかと考えられた。

## 2. 研究の目的

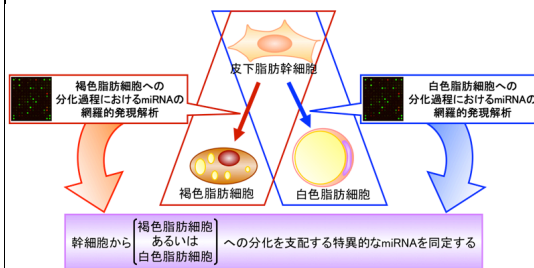
上記の背景より、本研究では、主として miRNA による脂肪組織由来多能性幹細胞 (ASC) の分化制御機構の解明、皮下脂肪幹細胞への標的化機能素子の創製、および機能性核酸の非侵襲的経皮送達技術の開発、の三つのハードルをクリアすることを

目的とし、miRNA を利用した ASC の分化誘導法の創製につなげることを目指して研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) ASC が褐色脂肪細胞様に分化する際の miRNA 発現の網羅的解析と機能評価

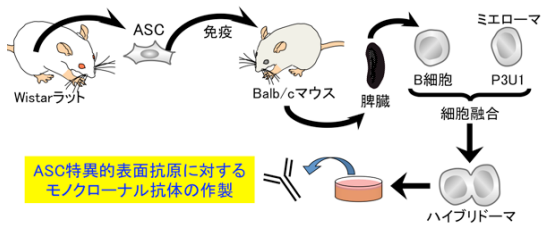
ASC が褐色脂肪細胞と類似した状態に分化する過程を制御する miRNA が存在するとの作業仮説に基づき、これを同定するための検討を行った。ラットの皮下脂肪組織から ASC を多量に含む細胞画分を分離し、褐色脂肪細胞様あるいは白色脂肪細胞へ分化する 2通りの培養条件で培養し、未分化から完全に分化するまでの各段階における miRNA の発現プロファイルをマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。



さらに、ASC が褐色脂肪細胞様に分化する際に特徴的に発現する miRNA を ASC 培養細胞に導入し、細胞分化に与える影響を解析した。

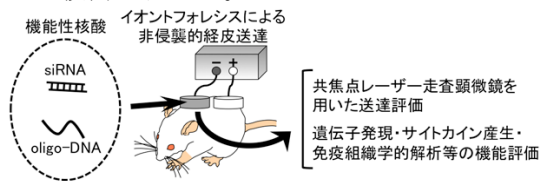
### (2) ASC を特異的に認識する新規モノクローナル抗体の構築

皮下脂肪組織中に ASC が多量に含まれており、骨髄間葉系幹細胞と類似した性質を有することは知られていたが、ASC を直接認識して可視化する技術やこれを標的として薬物を選択的に送達する手法は確立されていない。そこで、この問題を克服するために、皮下脂肪組織中の ASC を特異的に認識するモノクローナル抗体の構築を試みた。可能な限り効率よく抗体を取得するために、ラットの皮下脂肪組織の間質・血管画分から磁気ビーズ標識抗体を用いて血管内皮細胞および白血球を除去した後、マウスに免疫 (2 週間毎に 3 回免疫) し、脾臓 B 細胞とミエローマ細胞 (P3U1) の細胞融合を行い、抗体産生能を有するハイブリドーマをクローニングした。得られたモノクローナル抗体を用いて、ASC を含む間質・血管細胞画分の初代培養細胞あるいは、皮下脂肪組織に対する反応性を免疫染色法により評価し、ASC を特異的に認識する抗体を取得した。



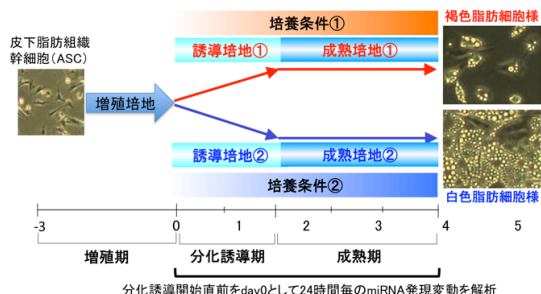
### (3) イオントフォレシスを用いた機能性核酸の非侵襲的経皮送達技術の確立と in vivo 機能評価

siRNA や miRNA に代表される機能性核酸は、その配列特異的あるいは標的特異的な作用から次世代の医薬として期待されているが、これらを実際に医療応用へつなげるためには、標的部位へ効率よく送達する技術の開発が必要不可欠である。我々は、患者の QOL を考慮した非侵襲的な薬物投与方法として、イオントフォレシスと呼ばれる微弱電流を利用した経皮的薬物吸収促進法に着目した。これまでにイオントフォレシスを in vivo における経皮核酸デリバリーに応用し、その疾患治療法としての可能性について検討した報告はほとんどなされていなかったため、この点に重点を置いた検討を行った。



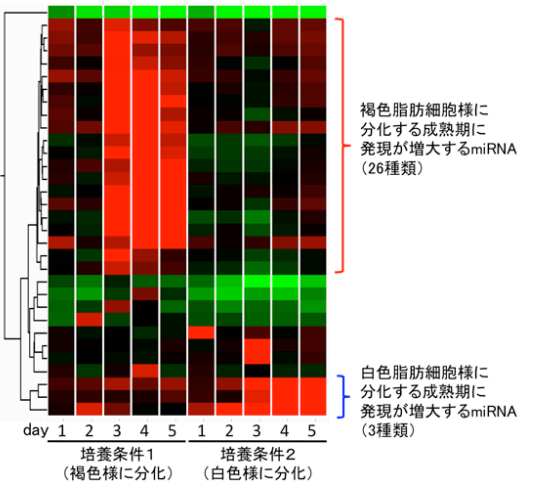
## 4. 研究成果

### (1) ASC が褐色脂肪細胞様に分化する際の miRNA 発現の網羅的解析と機能評価



ラットの皮下脂肪組織から ASC を含む細胞画分を分離して初代培養を行い、80~90% confluent まで増殖用培地で維持し、その後褐色脂肪細胞様あるいは白色脂肪細胞様に分化する 2 通りの条件で培養を行った。分化誘導培地に交換する直前を day0 として、24 時間毎の細胞から total RNA を抽出・精製し、完全に成熟する day5 までのサンプルについて miRNA の発現プロファイルをマイクロアレイを用いて網羅

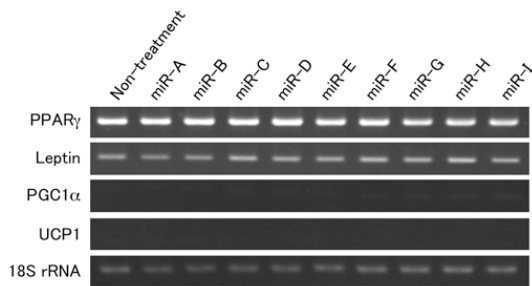
的に解析した。Day0 における miRNA の発現プロファイルを用いて day1~day5 までの発現データを標準化し、2 通りの培養条件間で発現プロファイルの比較を行った。day1~day5 までのいずれかの時点で発現レベルに 3 倍以上の差があった miRNA を抽出した結果、32 種類の miRNA が見いだされた。



検討開始当初、ASC が培養条件によって褐色脂肪細胞様あるいは白色脂肪細胞様のいずれかに運命分岐する段階は、分化過程の初期にあるのではないかと予想していたが、解析の結果、miRNA の発現プロファイルに大きな差が現れるのは、細胞が脂肪滴を蓄積し始める day3 以降の成熟期であることが明らかとなった。中でも、褐色脂肪細胞様に分化する際に発現が顕著に増大する miRNA が 26 種類存在し、白色脂肪細胞様に分化する場合と比較して、よりダイナミックな変化が生じることが明らかとなった。

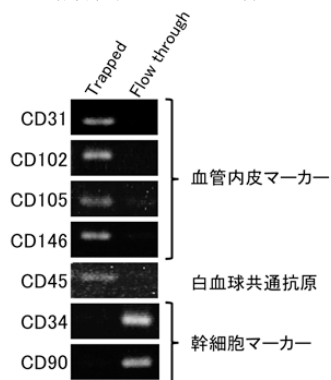
そこで次に、これら 26 種類の miRNA の中でも発現レベルが高い、あるいは上昇率が大きい 9 種類の miRNA に着目し、白色脂肪細胞様に分化する条件で培養している ASC に導入した場合に、細胞の分化がどのような影響を受けるかについて検討を行った。その結果、いずれの miRNA を導入した場合でも、通常の白色脂肪細胞様の分化と全く同様に、白色脂肪細胞のマーカである Leptin 遺伝子の発現が認められ、褐色脂肪細胞のマーカである Ucp1 遺伝子の発現は全く認められなかった。miRNA を導入する時期や作用濃度、培地組成を変えたり、あるいは 9 種類全ての miRNA を同時に導入した場合でも全く同様の結果となった。

以上の結果から、これらの miRNA は ASC が褐色脂肪細胞様に分化する際の運命決定には寄与しておらず、他の何らかのプロセスに関与していることが示唆された。

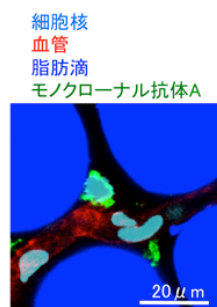


## (2) ASC を特異的に認識する新規モノクローナル抗体の構築

ラット皮下脂肪組織から ASC を含む間質・血管画分を調製し、血管内皮マーカーである CD31 および白血球共通抗原である CD45 に対する磁気ビーズ標識抗体を利用して間質・血管画分からこれらの細胞を可能な限り除去するための検討を行い、回収された細胞画分では血管内皮マーカーおよび白血球マーカーはいずれも検出されず、幹細胞マーカーが検出されることが判明し、比較的簡便な方法で間質・血管画分から ASC を濃縮することに成功した。



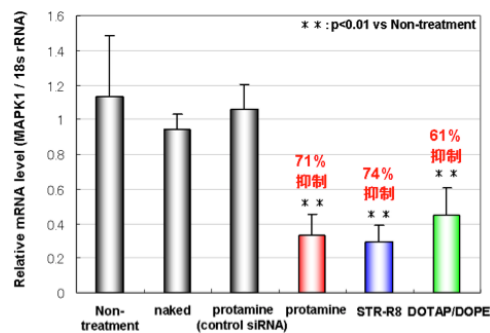
次に、この細胞画分をマウスに免疫（2週間毎に3回）し、通常の方法にて脾臓B細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行った後、限界希釈法にてクローニングを行った。各ウェルの培養上清中の抗体をドットプロット法で検出することにより抗体を産生するクローンを29種類取得した。各モノクローナル抗体のアイソタイプを決定したところ、非常に興味深いことにIgG1が2種類、IgG2aが1種類、IgMが26種類と得られた抗体のほとんどがIgMであった。さらに、得られた抗体が皮下脂肪組織中の



ASC を特異的に認識するか否かについて蛍光免疫染色による生組織イメージングにて評価した結果、血管や成熟脂肪細胞には全く反応せず、間質に存在する細胞に対して極めて選択的に反応する抗体を取得することに成功した。

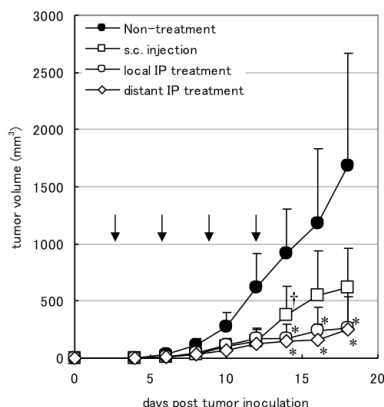
## (3) イオントフォレシスを用いた機能性核酸の非侵襲的経皮送達技術の確立と in vivo 機能評価

我々は、これまでの検討で、負電荷を有する siRNA をナノ粒子とすることで、イオントフォレシスによる経皮送達効率が飛躍的に向上することを明らかとしている。そこで、siRNA ナノ粒子をイオントフォレシスにより経皮投与することで、内因性遺伝子の発現抑制が可能か否かについて検討を行った。生体内のほぼ全ての細胞で安定に発現することが知られている MAPK-1 遺伝子を標的遺伝子のモデルとして選択し、これに対する siRNA を用いて遺伝子発現を抑制可能か否か検討した。その結果、MAPK-1 に対する siRNA を単独でイオントフォレシスした場合には、未処理および Negative Control siRNA 投与群とほぼ同レベルで、遺伝子発現抑制効果はほとんど見られなかったのに対し、siRNA ナノ粒子をイオントフォレシスした場合には、MAPK-1 mRNA の発現が約 60~70% 程度抑制されることが明らかとなり、その差は統計的にも有意であった。



さらに、siRNA 以外の機能性核酸についても経皮デリバリーによる機能発現が可能か否かについて検討を行うため、自然免疫を賦活化する機能を有する CpG オリゴ DNA を用いた検討を行った。まず、蛍光標識した CpG オリゴ DNA がイオントフォレシスによって経皮送達可能であることを確認した後、自然免疫が賦活化されるか否かを皮下に移植したメラノーマ細胞の増殖が抑制されるかどうかで評価した。

その結果、CpG オリゴ DNA の投与部位に関わらず、移植したメラノーマ細胞の増殖は顕著に抑制され、機能性核酸がその機能を保持したまま経皮投与可能であることが明らかとなった。



以上、本研究により、皮下脂肪組織中の幹細胞 (ASC) の褐色脂肪細胞への分化制御には miRNA 以外に未知の因子が関与していることが示唆され、我々が最終目標とする ASC の分化を人為的に制御して肥満を予防する「再生予防医療」の実現には、より詳細な分子機序の解明が必要と考えられる。そのための解析ツールとして、我々が構築した ASC を特異的に認識するモノクローナル抗体や機能性核酸の導入技術は極めて有用であり、今後もこの挑戦を継続したいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Kigasawa K, Kajimoto K, Nakamura T, Hama S, Kanamura K, Harashima H, Kogure K. Noninvasive and efficient transdermal delivery of CpG-oligodeoxynucleotide for cancer immunotherapy. *J Control Release*. (2011) 150: 256-265. 査読有
2. 小暮健太朗, 氣賀澤郁, 濱 進, 梶本和昭. “イオントフォレシスによる高分子医薬の皮内送達” *薬剤学*. 2011, 71(2): 94-98. 査読有
3. Kajimoto K, Yamamoto M, Watanabe M, Kigasawa K, Kanamura K, Harashima H, Kogure K. “Noninvasive and persistent transfollicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis” *Int J Pharm*. (2010) 403: 57-65. 査読有
4. 小暮健太朗, 濱 進, 氣賀澤郁, 梶本和昭. “イオントフォレシスによる高分子の皮膚透過” *生物物理* (2010) 50(4): 188-189. 査読有
5. Kigasawa K, Kajimoto K, Hama S, Saito A, Kanamura K, Kogure K. “Noninvasive delivery of siRNA into the epidermis by iontophoresis using an atopic dermatitis-like

model rat.” *Int J Pharm*. (2010) 383, 157-160. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. Kogure K, Kigasawa K, Hama S, Kanamura K, Kajimoto K. “Suppression of Tumor Growth by Transdermal Delivery of Oligonucleotides via Iontophoresis.” *The 37th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society*, Jul 12, 2010. (Portland, USA)
2. 梶本和昭 “網羅的遺伝子発現解析から分かる褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞の分化と起源” *日本薬学会北海道支部第 134 回例会 総説講演*, 2010 年 5 月 8 日 (札幌)
3. 梶本和昭, 白澤北斗, 小暮健太朗, 片岡正俊, 篠原康雄 “網羅的遺伝子発現解析に基づく脂肪細胞の多様性の解析.” *日本薬学会第 130 年会*, 2010 年 3 月 30 日 (岡山)
4. Kogure K, Kigasawa K, Kanamura K, Kajimoto K. “Noninvasive and effective transdermal delivery of siRNA by iontophoresis.” *Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium*, Nov 4, 2009. (Fukuoka, Japan)
5. Kogure K, Kigasawa K, Kanamura K, Kajimoto K. “Efficient and noninvasive transdermal delivery of siRNA by iontophoresis.” *The 36th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society*, Jul 22, 2009. (Copenhagen, Denmark)
6. 氣賀澤郁, 梶本和昭, 斎藤顕宜, 金村聖志, 小暮健太朗 “イオントフォレシスによるナノ粒子化 siRNA 皮内送達システムの構築.” *日本薬学会 129 年会*, 2009 年 3 月 28 日 (京都)
7. 梶本和昭 “ペプチドで肥満予防～経皮デリバリーの新たな可能性～” *TIMS/MANA Joint Seminar*, 2009 年 1 月 29 日 (筑波)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶本 和昭 (KAJIMOTO KAZUAKI)

北海道大学・大学院薬学研究院・特任准教授

研究者番号：10416216

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

片岡 正俊 (KATAOKA MASATOSHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工

学研究部門・研究グループ長  
研究者番号：20224438

田淵 圭章 (TABUCHI YOSHIAKI)  
富山大学・生命科学先端研究センター・准  
教授  
研究者番号：20322109

篠原 康雄 (SHINOHARA YASUO)  
徳島大学・疾患ゲノム研究センター・教授  
研究者番号：60226157

小暮 健太郎 (KOGURE KENTARO)  
京都薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：70262540