

機関番号： 24303  
研究種目： 挑戦的萌芽研究  
研究期間： 2011-2011  
課題番号： 23659471  
研究課題名（和文）：褐色脂肪細胞 lineage における転写因子ネットワーク制御  
研究課題名（英文）： Network regulation of brown adipocyte lineages  
研究代表者  
松田 修 (MAZDA OSAM)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号： 00271164

研究成果の概要（和文）：褐色脂肪細胞は、脂肪酸を酸化分解してそのエネルギーを熱として放出する細胞であり、エネルギー出納と代謝調節に関与する。また内臓型肥満、耐糖能異常と脂質代謝異常の是正に極めて重要な意味を持つ。本研究では、線維芽細胞等の体細胞を、褐色脂肪細胞にダイレクト・リプログラミングさせる技術を開発することを目的とした。本研究ではまず、褐色脂肪細胞から mRNA を調整し、DNA マイクロアレイ解析を行って（1）褐色脂肪細胞に発現する転写因子を、DNA マイクロアレイにて解析した。続いて、（2）それらの転写因子、およびさまざまな転写因子を、種々の組み合わせで、レトロウイルスベクターを用いてマウス胎仔由来線維芽細胞に導入した。種々の培養条件下で分化誘導し、細胞をキャラクタライズした。その結果、（1）褐色脂肪細胞に発現する、複数の興味深い遺伝子を複数見出した。（2）これらの遺伝子のある特定の組み合わせで導入した際に、多房性の脂肪滴と豊富なミトコンドリアを有し、褐色脂肪細胞に特徴的な遺伝子群を発現する褐色脂肪細胞がマウス胎仔由来線維芽細胞から誘導された。一方で、別の組み合わせでは、典型的な白色脂肪細胞が褐色脂肪細胞よりも高頻度に出現した。これらの結果から、体細胞から既知の因子の遺伝子導入により褐色脂肪細胞のダイレクト・リプログラミングできることが分かったため、現在その条件を最適化し、また分化誘導のメカニズムの解析を進めている。本研究の成果は、褐色脂肪細胞の分化機構の解明につながるのみならず、希少な褐色脂肪細胞を無尽蔵に作出しそのキャラクタライゼーション等に行う上で重要な意義を持つ。さらに将来、メタボリック症候群等に対する新しい再生医療を提供できる可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）： Brown adipocytes dissipates fat energy as heat and plays crucial roles in energy expenditure and thermogenesis. They are also involved in regulation of visceral obesity and insulin resistance. The present study aims at devising novel technology to directly reprogram somatic cells such as fibroblasts into brown adipocytes. First, mRNA was obtained from brown adipocytes that had been established from iPS cells and subjected to DNA microarray technology to find out some genes that may have important roles in brown adipocyte lineages. Second, some of the genes identified as above were introduced into fibroblasts that were subsequently cultured under various conditions. Transfection of a particular combination of the genes resulted in generation of cells with multilocular lipid droplet and abundant mitochondria. Some other combinations of genes resulted in more efficient generation of such cells. Characterization of the cells strongly suggested typical features of the brown adipocytes. Interestingly, some different combination of genes induced white adipocytes-like cells more efficiently than brown adipocyte-like cells. These results strongly suggest direct reprogramming of fibroblasts into

brown adipocytes by defined factors. We are thus currently analyzing optimal condition of the direct reprogramming as well as molecular mechanisms of the cell fate decision. The present study may contribute not only to the elucidation of differentiation of brown adipocytes but also to technology to generate and characterize brown adipocytes. Such technology may potentially provide novel regenerative medicine to control metabolic syndrome in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪細胞は、ミトコンドリアの内膜に特異的に発現する蛋白、UCP1が、酸化リン酸化を脱共役させることによって、白色脂肪細胞とは逆に、脂肪酸を酸化分解してそのエネルギーを熱として放出する細胞である。

ヒトでは褐色脂肪細胞の数と機能に大きな個人差があり、BMIと空腹時血糖に逆相関する。やせ型のヒトでは多く、肥満、糖尿病、高脂血症の患者ではほとんど存在しない。マウスやラットの研究とも考え合わせると、褐色脂肪細胞は、内臓型肥満、耐糖能異常と脂質代謝異常の是正に極めて重要な意味を持つ。もし、肥満患者由来の褐色脂肪細胞を多数調整でき、それを患者に移植することができるならば、メタボリック症候群等が制御できる可能性がある。

一方で、2006年にマウス、2007年にヒトで作られたiPS細胞は、線維芽細胞など種々の細胞に少数の既知の転写因子の遺伝子を導入することで、細胞のエピジェネティックなプログラミングが初期化され（リプログラミング）胚性幹（ES）細胞様の多能性幹細胞に脱分化したものである。あらゆる組織細胞に分化できることから、さまざまな

疾患の再生医療に応用が期待されており、また薬剤の開発や副作用の解析などにも利用されつつある。

iPS細胞はまた、転写因子のネットワークを人為的に操作することで、細胞の運命を変えられることを示した。

2010年に、心筋細胞に特異的な3つの転写因子の遺伝子を、心臓や皮膚の線維芽細胞に導入すると、それらの細胞がiPS細胞を経ることなく、直接、心筋に分化する（ダイレクト・リプログラミング）ことが報告された。

2. 研究の目的

褐色脂肪細胞の研究は、最近数年間で大きな進展があった。褐色脂肪細胞の一部の分化経路が報告されたのが2008年、ヒト成人に褐色脂肪細胞が存在することが発見されたのが2009年であり、今後爆発的に研究が進められると考えられる。我々は、iPS細胞から褐色脂肪細胞を分化誘導することに、マウスのみならずヒトでも成功した。生きたヒトの褐色脂肪細胞は、これまで実際上研究目的ではavailableでなかったため、我々はたいへん国際的競争力が高い位置にいる。本研究ではこれを生かして、線維芽細胞や白色脂肪細胞を、褐色脂肪細胞にダイレクト・リプ

ログラミングする技術を開発する。このような試みはこれまで全くなく、本研究はたいへんユニークなものと言える。

本研究が成果を収めれば、肥満患者由来の褐色脂肪細胞を多数作成し、それを患者に自家移植することで耐糖能異常、脂質代謝異常、内蔵型肥満等を制御できる可能性がある。

### 3. 研究の方法

褐色脂肪細胞研究の爆発的な進展と、本研究のチャレンジ性を考慮し、本研究は1年間で完了する予定で開始し、そのために1名の連携研究者と5名の研究協力者を含むグループで、緊密に連携協力して推進した。

本研究ではまず、iPS細胞由来褐色脂肪細胞からmRNAを調整し、DNAマイクロアレイ解析を行って、褐色脂肪細胞に特異的ないしは特徴的に発現する転写因子等遺伝子群を同定した。続いて、これらの中から、体細胞から褐色脂肪細胞へのダイレクト・リプログラミングに有用と考えられる遺伝子を選び、これらの遺伝子を含む種々の遺伝子の群から、いくつかの遺伝子をさまざまな組み合わせで体細胞に導入した。その後種々の培養条件下で培養することにより、褐色脂肪細胞へのダイレクト・リプログラミングを試みた。細胞のキャラクタリゼーションは、倒立顕微鏡観察、OilRed O染色、免疫染色、Real time RT-PCR等にて行った。

学術的観点からの研究組織の必要性・妥当性及び研究目的との関連性について述べると、本研究では幹細胞培養、褐色脂肪細胞の分化誘導、DNAマイクロアレイ解析、遺伝子導入、バイオインフォマティクスの解析、分子生物学的解析など、多岐にわたる実験が含まれるため、それぞれに精通する研究者を含む研究組織を構築し、本研究はこの組織の有機的で緊密な連携を通じ

て遂行した。

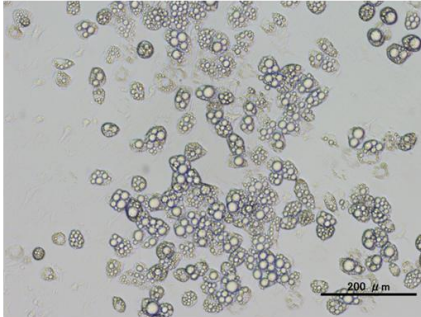
ボランティアから、口腔粘膜細胞を採取して本実験に用いること、および、腹部皮下より吸引採取した脂肪組織から白色脂肪細胞を分離して本実験に用いることに関しては、適正なインフォームドコンセント、連結不可能匿名化を行った個人情報管理を含めて、京都府立医科大学の所定の倫理審査を経て、認可を受けてから行う予定であった（腹部皮下脂肪の吸引採取は、京都府立医科大学附属病院でルーチンに行われている）。しかし、結果的に培養ヒト正常細胞を用いて予想以上の成果を得ることができたので、ボランティアからの細胞の採取とその利用は今回のプロジェクトでは行っていない。

また遺伝子の増幅、クローン化、細胞への導入等については、京都府立医科大学の所定の組換えDNA実験の認可を受けてから行った。

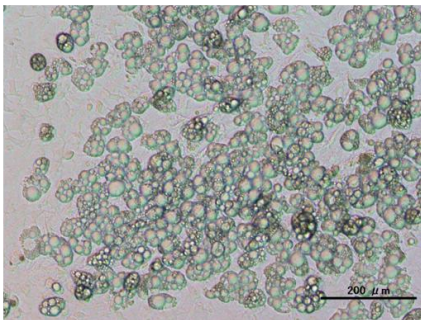
### 4. 研究成果

DNAマイクロアレイ解析の結果、興味深い転写因子やその他の遺伝子が見出された (data not shown)。そこでいくつかの因子の遺伝子を組み合わせることで線維芽細胞等に導入し、その後種々の条件で培養した。その結果、特定の因子の遺伝子導入により、多房性の脂肪滴と豊富なミトコンドリアを有する、褐色脂肪細胞様の形態を呈する細胞が得られた (図A)。遺伝子の組み合わせを換えることで、誘導効率を向上することができた (図B)。得られた細胞は、Real time RT-PCRによる遺伝子発現プロファイル等の解析により、典型的な褐色脂肪細胞の性質を有することが分かった (data not shown)。一方、別の遺伝子の組み合わせを導入することで、白色脂肪細胞様の細胞が褐色脂肪細胞よりも高頻度に出現した (data not shown)。

# A



# B



これらの結果から、既知の因子の遺伝子導入により、体細胞から褐色脂肪細胞にダイレクト・リプログラミングできることが分かった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yamamoto K, Yamamoto T, Ichioka H, Akamatsu Y, Oseko F, Mazda O, Imanishi J, Kanamura N, Kita M. Effects of mechanical stress on cytokine production in mandible-derived osteoblasts. *Oral Dis.* 17 (7): 712-719, 2011. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01832.x. Epub 2011 Jul 20. PMID: 21771211.
- ② Fujita S, Arai Y, Nakagawa S, Takahashi KA, Terauchi R, Inoue A, Tonomura H, Hiraoka N, Inoue H, Tsuchida S, Mazda O, Kubo T. Combined microwave irradiation and intraarticular glutamine administration-induced HSP70 expression therapy prevents cartilage degradation in a rat osteoarthritis model. *J Orthop Res.* 30 (3): 401-407, 2012. doi: 10.1002/jor.21535. Epub 2011

Aug 18. PMID:21853458.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 松田 修. 非ウイルス的手段による iPS 誘導法の確立. 独立行政法人科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業さきがけ研究「iPS 細胞と生命機能」研究領域研究成果報告会. 2012 年 1 月 13 日、東京.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
(出願準備中)

- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松田 修 (MAZDA OSAM)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号: 0 0 2 7 1 1 6 4

### (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・医学研究科・准教授

研究者番号: 5 0 3 3 6 7 3 1