

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2012 年度
 課題番号：24659444
 研究課題名（和文） 細胞コンテナとモデル動物によるヒト iPS 細胞由来脂肪細胞の細胞治療の研究
 研究課題名（英文） Cell therapy of adipocytes derived from human iPS cells using cell containers and animal disease models
 研究代表者
 細田 公則 (HOSODA KIMINORI)
 京都大学・医学研究科・教授
 研究者番号：40271598

研究成果の概要（和文）：

ヒト iPS/ES 細胞由来脂肪細胞の詳細な脂肪細胞機能評価とヌードマウスへの細胞移植による生着及び維持に関する検討を行った。本研究においてヒト iPS・ES 細胞由来脂肪細胞が脂肪分解などの脂肪細胞機能を備え、移植後少なくとも 4 週間は生着することが明らかとなった。この分化誘導及び細胞移植系は疾患 iPS 細胞の in vitro, in vivo における病態解析に有用であり、さらに将来的な細胞治療への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the function of adipocyte derived from human iPS and ES cells and the survival and maintenance of these cells after transplantation into nude mice. The adipocytes derived from human iPS and ES cells showed adipocyte function such as lipolysis, and survived at least 4 weeks after the transplantation. The adipogenic differentiation and transplantation system in vitro and in vivo is expected to be useful in the study of pathophysiology and to be applied for future cell therapy.

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	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：

キーワード：脂肪細胞, iPS 細胞, 脂肪萎縮症, 細胞治療, ヌードマウス

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞は多くのアディポカインを分泌する。代表者の細田はアディポカインの一つのレプチンの作用の解明を行い (Nature Genet. 1996; Nature Med.1997; Diabetes1997)、現在、京大探索医療センター「レプチン・脂肪細胞プロジェクト」のプロジェクトリダーとして全身性脂肪萎縮症に対するレプチン・脂肪細胞治療の臨床応用の責任者である。

全身性脂肪萎縮症は先天性または後天性の脂肪細胞の欠如に起因する。全身性脂肪萎縮症は高血糖、高インスリン血症、脂質異常症、脂肪臨床所見が認められるので、全身性脂肪

萎縮症は肥満症研究の成因解明、治療法開発のモデルとして注目される。

申請者らは、レプチンが脂肪萎縮症マウス及びヒト全身性脂肪萎縮症の高血糖、脂質異常症に有効であることを報告してきた (Diabetes2001; N. Engl. J. Med. 2004; J Clin Endocrinol. Metab. 2007)。しかしレプチン注射は根治療法ではなく、根治療法として脂肪細胞治療が必要である。最近申請者は脂肪萎縮症マウスに対して体重の 3.5%の脂肪萎縮症組織の移植で代謝異常の改善を明らかにした。申請者は世界で最初にヒト iPS 細胞の脂肪細胞への分化に成功した (FEBS Lett. 2009)(2 頁図 4)。後天性全身性脂肪萎縮

症患者 iPS 細胞に由来する脂肪細胞は患者自身には自己であり、正常に脂肪細胞に分化するので患者自身に移植して、脂肪細胞治療することは可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、後天性脂肪萎縮症の脂肪細胞治療の開発を目指して、後天性脂肪萎縮症患者 iPS 細胞から FACS で沿軸中胚葉系細胞の分画を用いて脂肪細胞を分化誘導し、得られた脂肪細胞を細胞コンテナに封入して、独自に開発した脂肪萎縮症ヌードマウスへ移植して、代謝異常の変化を解析して、iPS 細胞由来脂肪細胞の脂肪細胞治療を最適化することである。

3. 研究の方法

準備状況 脂肪萎縮症マウスに対する体重の 3.5%に相当する脂肪組織移植の 16 週後の検討で、脂肪肝、高血糖の改善(4 頁図 9, 10)を観察し、高インスリン血症、脂質異常症の改善も認めた(データは呈示していない)。以下に、平成 24 年度の計画・方法を記す。

1) 後天性脂肪萎縮症患者からの iPS 細胞樹立のための皮膚生検

担当の海老原(京大レプチン脂肪細胞プロジェクト)は全国の脂肪萎縮症患者を解析し(J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004)、follow 中で、iPS 細胞樹立のために既に 2 例の後天性脂肪萎縮症からの皮膚生検を終えており、今後も新患からの皮膚生検を予定している。

2) 後天性脂肪萎縮症患者からの iPS 細胞の樹立

担当の高橋(京大 iPS 細胞研究所)はマウス、ヒトの iPS 細胞の樹立を世界で最初に報告した(Cell 2006; Cell 2007)。高橋は後天性脂肪萎縮症患者の iPS 細胞 2 例を樹立中であり、また本研究の iPS 細胞全般に関与している。

3-1) FACS による PDGFR α +VEGFR2-の沿軸中胚葉系細胞の分画

担当の桜井(京大 iPS 細胞研究所)は ES/iPS 細胞からの中胚葉分化を解明しているが(Stem Cells 2008, Stem Cells 2006)、現在、特にヒト iPS 細胞からの分化について検討を進めている。その成果に基づいて、本研究の脂肪細胞の分化誘導は新規な方法として、FACS により PDGFR α +VEGFR2-の沿軸中胚葉系細胞の分画を用いて行う予定であり、効率良く十分に機能的に分化した脂肪細胞を得ることが期待される。

3-2) FACS による分画全般

担当の山下(京大再生研)は ES/iPS 細胞からの中胚葉の VEGFR2 による FACS の専門家であり(Nature 2000; Blood 2003; Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003; Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; Circulation 2007,

Blood 2009; J Cell Biol 2010)、本研究でも PDGFR α +VEGFR2-及び未分化細胞の除去の目的で TRA-1-1 も用いて、FACS による分画全般に關与する予定である。

3-3) ヒト iPS 細胞からの脂肪細胞分化の最適化

担当の野口(京大内分泌代謝内科)は脂肪細胞分化の専門家であり(J Biol Chem 2007)、もう一人の担当の曾根は VEGFR2 を用いたヒト ES/iPS 細胞からの中胚葉分化の専門家であり(Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009)、両名で共同で世界で最初にヒト iPS 細胞からの脂肪細胞分化を報告した(FEBS Lett. 2009)。3-1)の桜井、3-2)の山下と連携して、脂肪細胞分化の最適化を行う。

4) 生理活性物質を分泌する細胞の細胞コンテナの準備と細胞の封入

担当の玄(京大再生医科学研究所ナノ再生医工学センター)は生体材料や人工臓器の開発などの専門家であり、現在、本研究を通じて、生理活性物質を分泌する細胞の細胞コンテナを作製中である。未分化な iPS 細胞は FACS により除去するが、微量混入した場合でも、細胞コンテナに封入することで、体内に拡がることを避けることができる。また、細胞コンテナの隔離膜は抗体を通過させないので、自己免疫反応による攻撃を避けることが可能である。他の細胞コンテナの長所として、持続的に局所に停留することが挙げられる。ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞を用いた細胞コンテナの移植部位としては腹腔内などが候補である。

5-1) 細胞治療のレシピエントモデルとしての脂肪萎縮症ヌードマウスの確立と維持

担当の中尾和貴(東大・神戸理研再生科学総合センター)は発生工学の専門家であり(J Clin Invest 2010; Dev Cell 2009; J Clin Invest 2008; Cell 2007; Science 2007)、脂肪萎縮症ヌードマウスの確立に成功しており、本研究でその系統化と維持を行う予定である。

5-2) 後天性脂肪萎縮症患者 iPS 細胞由来脂肪細胞の脂肪萎縮症ヌードマウスへの細胞コンテナによる移植と代謝異常の変化の解析

担当の野口は既にヒト iPS 細胞由来脂肪細胞のヌードマウスへの移植実験を積み重ねて、移植部位での脂肪細胞の生着を確認している。本研究では、4)で玄の作製した細胞コンテナを用いて、脂肪萎縮症ヌードマウスへ移植して、代謝異常の変化を解析する予定である。

6) 総括

代表者の細田は以上の計画の企画・立案・調整を行い、最終的に総括し、後天性脂肪萎縮症患者 iPS 細胞由来脂肪細胞の細胞コンテナを用いた脂肪細胞治療を最適化し、臨床応

用の基盤を完成する。

4. 研究成果

これまでに我々は in vitro でヒト iPS 細胞から脂肪細胞への分化誘導を示した (FEBS Lett. 2009)。今回、ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞の詳細な脂肪細胞機能評価と細胞移植による生着及び維持に関する検討を行った。

ヒト iPS・ES 細胞を胚様体形成を介して in vitro にて脂肪細胞への分化誘導を行った。ヒト iPS・ES 細胞由来細胞は脂肪蓄積及び脂肪細胞関連遺伝子の発現を認め、フォルスコリン誘導性の脂肪分解反応、インスリン応答性等の脂肪細胞機能を持つことが示された。続いて分化誘導後、 2×10^7 個の細胞をヌードマウス背部皮下へ移植した。対照として未分化 iPS 細胞の移植も行った。組織学的解析により移植後 1~4 週において脂肪細胞様細胞の生着が認められた。さらにヒト vimentin 抗体にてヒト細胞由来であることを示し、Oil Red O 染色で脂肪滴の染色が認められた。脂肪細胞面積の定量的解析では 2 週で頂値を示し、移植後の脂肪細胞様細胞の増殖活性はほぼ認められなかった。移植後 1~4 週の移植細胞において PPAR γ 2, Leptin などの脂肪細胞関連遺伝子の発現も認められた。ヒト iPS・ES 細胞由来細胞の細胞移植後の生着効率に関しては細胞株間で差が認められた。一方、未分化 iPS 細胞の移植においては移植後 1~4 週において neural tube 様の強い増殖活性を持つ神経外胚葉細胞が認められた。移植細胞における未分化細胞の残存は奇形種形成を引き起こす可能性が示唆される。

本研究においてヒト iPS・ES 細胞由来脂肪細胞が脂肪細胞機能を備え、移植後少なくとも 4 週間は生着することが明らかとなった。この分化誘導及び細胞移植系は疾患 iPS 細胞の in vitro, in vivo における病態解析に有用であり、さらに将来的な細胞治療への応用が期待される。

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 6 件)

- 1) Aotani D, Hosoda K(13 人中 11 番目), et al. Functional magnetic resonance imaging analysis of food-related brain activity in patients with lipodystrophy undergoing leptin-replacement therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 97(10):3663-71, 2012, 査読有, DOI: 10.1210/jc.2012-1872
- 2) Miyamoto L, Hosoda K(12 人中 11 番目), et al. Leptin activates hepatic 5' AMP-Activated Protein Kinase through sympathetic nervous system and α 1 adrenergic receptor: A

potential mechanism for improvement of fatty liver in lipodystrophy by leptin. *J Biol Chem.* 287(48):40441-7, 2012, 査読有, DOI: 10.1074/jbc.M112.384545

- 3) Bando M, Hosoda K(10 人中 6 番目), et al. Transgenic overexpression of intralipid ghrelin does not affect insulin secretion or glucose metabolism in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 302(4):E403-8, 2012, 査読有, DOI: 10.1152/ajpendo.00341.2011
- 4) Odori S, Hosoda K(12 人中 2 番目), et al. GPR119 expression in normal human tissues and islet cell tumors : evidence for its islet/gastrointestinal distribution, expression in pancreatic beta and alpha cells, and involvement in islet function. *Metabolism.* 62(1):70-8, 2012, 査読有, DOI: 10.1016/j.metabol.2012.06.010
- 5) Nakao YM, Hosoda K(11 人中 9 番目), et al. Intra-abdominal fat area is a predictor for new onset of individual components of metabolic syndrome: METabolic syndROME and abdominal Obesity (MERLOT study), *Ser B Phys Biol Sci.* 88(8):454-61, 査読有, DOI: なし
- 6) Fujikura J, Hosoda K(13 人中 11 番目), et al. Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation. *Diabetologia.* 55(6):1689-98, 2012, 査読有, DOI: 10.1007/s00125-012-2508-2

[学会発表] (計 2 件)

- 1) 富田努, 細田公則, 他. 新規のインスリン分泌促進因子 GPR40 の遺伝性肥満モデルの発現調節と機能的意義, 第 109 回日本内科学会, 2012 年 04 月 14 日, みやこめっせ (京都府)
- 2) 野口倫生, 細田公則, 他. ヒト iPS 細胞由来の脂肪細胞の脂肪細胞機能解析と細胞移植, 第 85 回日本内分泌学会学術総会, 2012 年 04 月 19 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細田 公則 (HOSODA KIMINORI)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：40271598

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高橋 和利 (TAKAHASHI KAZUTOSHI)
京都大学・iPS細胞研究所・講師
研究者番号：80432326

山下 潤 (YAMASHITA JUN)
京都大学・iPS細胞研究所・教授
研究者番号：50335288

中尾 和貴 (NAKAO KAZUKI)
東京大学・医学研究科・准教授
研究者番号：20217657

海老原 健 (EBIHARA KEN)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：70362514

曾根 正勝 (SONE MASAKATSU)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：40437207

櫻井 英俊 (SAKURAI HIDETOSHI)
京都大学・iPS細胞研究所・講師
研究者番号：80528754

野口 倫生 (NOGUCHI MICHIO)
京都大学・医学研究科・医員
研究者番号：00432394