

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12669

研究課題名（和文）平滑筋様細胞から誘導される新規なヒトベージュ細胞モデルの確立

研究課題名（英文）Establishment of a novel model for human beige adipocytes converted from smooth muscle-like cells

研究代表者

武田 行正（Takeda, Yukimasa）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：4073552

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト成人では、褐色化（Browning）と呼ばれる現象を介して脂肪組織内で誘導されるベージュ細胞が、脂肪や糖を活発に消費し熱を産生することにより、肥満や生活習慣病の予防に重要な役割を果たしている。本研究では、初代皮膚線維芽細胞から誘導されるヒト褐色脂肪細胞モデルciBAを用いて、その誘導メカニズムの解析から、生体内に類似の褐色脂肪細胞が誘導されることを検証した。そしてciBAを用いて、低分子化合物や食品成分を新たに評価することで、体内で褐色化を促進する可能性のある新規な因子を複数発見し、これらの褐色化における効果と作用機序について詳細に解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、ヒト皮膚線維芽細胞から誘導される褐色脂肪細胞ciBAが、生体内に類似の前駆細胞から誘導されることが示唆され、誘導メカニズムの一端が明らかとなったことで、より信頼性の高い細胞モデルとなった。そして、このciBAを用いて代表的な食品成分や種々の低分子化合物を新たに評価したことで、褐色化を促進する可能性のある新規な化合物を複数発見し、その効果と作用機序について学術論文として報告した。これらの研究成果を通して、普段の食事やサプリメントから、体内の褐色脂肪細胞を増加させることによる、長期的かつ健康的な肥満および生活習慣病の予防へつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In adult humans, beige adipocytes, which are induced in adipose tissue through a phenomenon called browning, are a potential therapeutic target for preventing obesity and related metabolic diseases by consuming circulating blood glucose and fatty acids. In this study, we used ciBAs, a model of human brown adipocytes converted from primary dermal fibroblasts, and verified that ciBAs are functional brown adipocytes similar to those in vivo by analyzing the conversion mechanism. We newly evaluated small molecules and dietary compounds using ciBAs, and discovered multiple new factors that have the potential to promote browning in the body. In this study, their effects and mechanisms of action on browning were analyzed in detail.

研究分野：細胞生物学

キーワード：褐色脂肪細胞 肥満 生活習慣病 ダイレクトリプログラミング 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪（ベージュ）細胞は、中性脂肪を蓄える通常の白色脂肪細胞とは異なり、脂肪を分解しミトコンドリアで熱を産生するための脂肪細胞である。ベージュ細胞は、特定の前駆細胞から分化するか、あるいは一度ベージュ細胞に分化した後、白色化（Whitening）した脂肪細胞が再び褐色化（Browning）することにより発生すると考えられている。ヒトベージュ細胞は、頸部や鎖骨上部の脂肪組織中に散在しているため、ベージュ細胞のみを一定量単離することや、容易に変動する褐色化の状態を体外で維持することは困難である。そのため、特にヒトにおける発生メカニズムや褐色化の誘導因子は多くの部分が不明確である。体内で褐色化を促進し褐色脂肪細胞を増加させることによる、肥満や生活習慣病の予防に注目が集まっているが、適切なヒト細胞モデルがないため、有効な褐色化因子の評価がほとんどなされていない。

最近、遺伝的な操作を駆使したマウスの研究により、脂肪組織から脂肪細胞を除いた間質血管細胞群（SVF: stromal vascular fraction）に平滑筋様の遺伝子発現を持った細胞集団が存在し、これがベージュ前駆細胞であることが明らかとなった。ヒトでも、平滑筋様の遺伝子発現する細胞から褐色脂肪細胞が誘導される可能性はあるが明らかとなっていない。これまで、間葉系幹細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞から、褐色脂肪細胞の特徴を持った脂肪細胞が報告されているが、褐色化の程度が低いことが多い。平滑筋様の遺伝子発現を持った細胞から誘導される脂肪細胞は、より生体内に近く実用化可能なヒト褐色脂肪細胞モデルとなる可能性がある。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまで、遺伝子の導入を行わず、無血清培地と低分子化合物を使用したダイレクトリプログラミングにより、ヒト線維芽細胞から低分子化合物誘導性褐色脂肪（ベージュ）細胞 ciBA（chemical compound-induced brown/beige adipocyte）の誘導を報告した（図1、Takeda Y. *et al.*, *Sci. Rep.*, 2020）。線維芽細胞から誘導された ciBA は、間葉系幹細胞から誘導される従来の脂肪細胞と比較し、褐色脂肪細胞の熱産生に中心的な役割をする脱共役タンパク質（UCP1: Uncoupling protein 1）を一貫して高く発現していることから、より褐色化の程度が高い可能性が示唆された（Takeda Y. *et al.*, *Sci. Rep.*, 2021）。そして、ciBA の網羅的な遺伝子発現解析（RNA-Seq）から、線維芽細胞では間葉系幹細胞より、平滑筋様の遺伝子発現が高いことが判明した。そこで本研究では、線維芽細胞中の平滑筋様細胞に注目し、ciBA の誘導メカニズムの解析から、生体内に類似の褐色脂肪細胞が誘導されるか検証することを目的の一つとした。

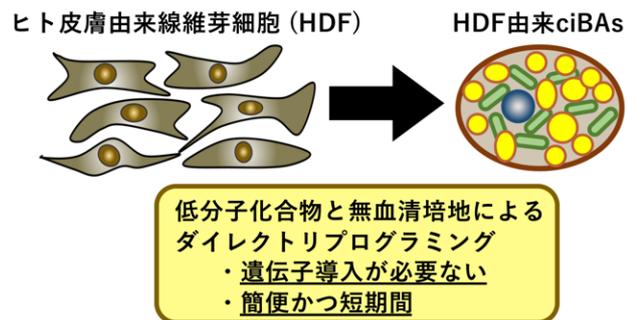


図1 ヒト皮膚線維芽細胞から誘導される褐色脂肪細胞モデル ciBA

ciBA が、平滑筋様の遺伝子発現を持つ細胞集団から誘導される場合、生体内の細胞に類似の信頼性の高いヒト褐色脂肪細胞モデルとなりうる。この ciBA を用いて、既に安全性の確認されている食品成分やシグナル伝達経路などを制御する低分子化合物から、褐色化を促進する新規な化合物を新たに評価・同定することを二つ目の目的とした。これにより最終的に、普段の食事やサプリメントから、体内でベージュ細胞を増加・維持することによる、長期的かつ安全な肥満や生活習慣病の予防を目指す。また本研究の成果から、複数のドナーに由来する皮膚線維芽細胞から ciBA を誘導することにより、褐色脂肪細胞を標的としたより効果的な褐色化因子の選択や副作用の解析といった個別化医療の応用にも道が開けると考えられる。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず ciBA の誘導とヒト線維芽細胞における平滑筋様の遺伝子発現を持った細胞集団との関連性を解析する（実験1）。そして、一細胞遺伝子発現解析（scRNA-Seq 解析）を実施し、ヒト線維芽細胞における平滑筋様の遺伝子発現を持った細胞集団の存在を明らかとする（実験2）。次に、平滑筋様細胞から誘導される ciBA を用いて、食品成分および種々の低分子化合物から褐色化を促進する化合物を探索する（実験3）。そして、これらの化合物が、ciBA における一連の褐色化に与える効果と作用機序を解析する（実験4）。

#### (1) ヒト線維芽細胞に局在する平滑筋様細胞と ciBA 誘導との関連性の解析

一般的に線維芽細胞は、TGF $\beta$ シグナル経路などを介し、平滑筋様の遺伝子発現を有する筋線維芽細胞 (Myofibroblasts) が局在するヘテロな細胞集団であることが知られている。このような情報と共に、これまでの研究から判明している、ciBA の誘導効率を増加させる無血清培地の成分 (デキサメタゾン、T3 ホルモンなど) や rosiglitazone などの低分子化合物が、線維芽細胞の平滑筋様細胞の分布をどう変化させるのか、その代表的なマーカーである平滑筋 $\alpha$ アクチン ( $\alpha$ SMA) とその遺伝子である *Acta2* の発現に注目して解析する。

#### (2) 一細胞遺伝子発現解析 (scRNA-Seq 解析) による平滑筋様の細胞集団の同定

上記の解析に加えて、ヒト皮膚線維芽細胞に対し一細胞遺伝子発現解析 (scRNA-Seq 解析) を実施し、平滑筋様の細胞集団の存在とその特徴的な遺伝子発現について解析を行う。具体的には、ciBA に誘導後の細胞集団 (RoFB+) とコントロールとなる未誘導の線維芽細胞 (RoFB-) に対し、それぞれ scRNA-Seq 解析を実施する。scRNA-Seq 解析から得られた結果は、Seurat や Monocle などの R パッケージ解析ソフトを用いて、それぞれのサブpopulation に特異的な遺伝子発現を明らかとする。また、疑似時系列解析による平滑筋様の細胞集団の推移動態の予測を行う。

#### (3) ciBA を用いた褐色化因子の探索

ヒト皮膚線維芽細胞から ciBA を誘導中あるいは誘導後に、食品成分あるいは低分子化合物を濃度を変えて 1 種類ずつ添加し、ciBA の誘導効率と褐色化の変化を定量する。褐色化と誘導効率の評価は、褐色脂肪細胞のマーカー遺伝子である *UCP1* と、脂肪細胞全般に発現する *FABP4* の発現量をリアルタイム PCR によって定量し、これらの発現量の比 (*UCP1/FABP4*) を指標として行う。

解析する食品成分および低分子化合物は、既に安全性の確認されている基本的な食品栄養素、機能性食品成分、ビタミン類、漢方薬やハーブに含まれる代表的な成分となる。また、研究室で保有しているシグナル伝達経路を制御する化合物や核内受容体のリガンドなどを含め、最終的に 150 種類から 250 種類程度となるように小規模なスクリーニングを行う。ciBA の誘導には全て無血清培地を用いて行い、通常血清に含まれる多くの成分についてもそれが存在しない状態で、個々の成分について正確な解析が可能となる。

#### (4) 低分子化合物および食品成分が ciBA の褐色化に与える作用とメカニズムの解析

実験 3 から判明した褐色化に効果のある食品成分および低分子化合物の候補が ciBA の遺伝子発現、糖・脂肪代謝、ミトコンドリアに与える影響をそれぞれ解析する。具体的には、遺伝子発現は褐色脂肪細胞に特異的な熱産性遺伝子や化合物の標的となる転写因子が標的とする遺伝子、そして重要な化合物に関しては網羅的な遺伝子発現解析 (RNA-Seq 解析) を実施し、その作用機序について遺伝子発現の観点から解明する。また、細胞外フラックスアナライザーを用いて、ミトコンドリアの酸素消費量および細胞外酸性化速度の測定を行う。これにより、UCP1 が担う脱共役した酸素消費量 (プロトンリーク)、共役した酸素消費量 (ATP 産生)、基本酸素消費量、最大酸素消費量を定量的に解析可能となる。また、これらの褐色化因子が標的とする転写因子やシグナル伝達経路を調べ、ヒト褐色化の新規な分子機構の解明を試みる。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト線維芽細胞に局在する平滑筋様細胞と ciBA 誘導との関連性の解析

初代皮膚線維芽細胞から ciBA に誘導後の細胞集団 (RoFB+) とコントロールとなる未誘導の線維芽細胞 (RoFB-) に対し、それぞれ一細胞遺伝子発現解析 (scRNA-Seq 解析) を実施し、平滑筋様の遺伝子発現を持った細胞集団が存在することを特定することができた。scRNA-Seq の結果を、Seurat や Monocle による解析ソフトを用いて解析し、平滑筋様の細胞集団に特徴的な遺伝子発現や、この細胞集団の推移動態を明らかとした。そして、この細胞集団を単離するために必要な、細胞表面の分子マーカーの候補が複数判明した。以上の結果から、ciBA の誘導メカニズムの一端として、平滑筋様の細胞集団との関連性が明らかとなり、ciBA が生体内に類似の褐色脂肪細胞モデルとして機能することが強く示唆された。

### (2) ciBA を用いた褐色化因子の探索と褐色化に与える作用メカニズムの解析

代表的な食品成分、研究室で保有しているシグナル伝達経路を制御する化合物や核内受容体のリガンドなどを用いて小規模なスクリーニングを行った。その結果、ciBAの褐色化を制御する新規な食品成分や生理活性ペプチドなどを複数発見することができた。これらのciBAに対する遺伝子発現や糖・脂肪代謝への作用を解析した結果、効果が強く、新規な作用機序を持つ可能性ある化合物がいくつか明らかとなった。この中で、さらに優先順位の高いものについて、論文として報告するため、濃度依存性や再現性を含め詳細に解析を行った。特に、カプサイシンの褐色脂肪細胞に対する効果は、これまで交感神経系の活性化により間接的に作用すると考えられてきたが、今回その受容体であるTRPV1を介して直接的にciBAの褐色化を亢進することが明らかとなった (Takeda Y., et al., *Sci. Rep.*, 2022)。また、代表的な遊離脂肪酸 (パルミチン酸やオレイン酸など) が、共通して濃度依存的にUCP1の発現抑制効果を示した (Takeda Y., et al., *Cells*, 2022)。これは、生体内で観察される肥満の状態を反映した褐色脂肪細胞の抑制モデルとなる可能性が考えられた (Takeda Y., et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2023)。

### (3) カプサイシンの直接的な褐色化効果の解明

カプサイシンを加えてciBAを培養したところ、ミトコンドリアで熱産性を担う脱共役タンパク質Uncoupling protein 1 (UCP1)の発現量が大きく増加した (図2)。また、カプサイシンによってミトコンドリアの量が増えており、これに対応してミトコンドリアによる酸素消費量および細胞の糖代謝が活性化した。カプサイシンとは別のTRPV1受容体のアゴニストであるNonivamideを投与すると、同様にUCP1の発現が活性化された。一方、アンタゴニストであるCapsazepineやAMG9810を投与するとカプサイシンによるUCP1の発現活性化が大きく抑制された。網羅的な遺伝子発現解析 (RNA-Seq 解析) から、脂肪酸生合成およびβ酸化、TCAサイクル、解糖系に中心的な役割をする一連の遺伝子について発現増加が観察された。また、褐色脂肪細胞に特徴的な、中性脂肪の分解により放出されるグリセロールの再取り込み、いわゆるグリセロールリサイクリングがカプサイシンによって活性化した。このように、これまで交感神経系を介して間接的に作用すると考えられてきたカプサイシンがciBAに直接作用し、一連の褐色化が亢進することを明らかにした (図3)。また、ciBAが少なくともTRPV1受容体を標的とした、食品成分や低分子化合物のスクリーニングに有用であることが提案された。

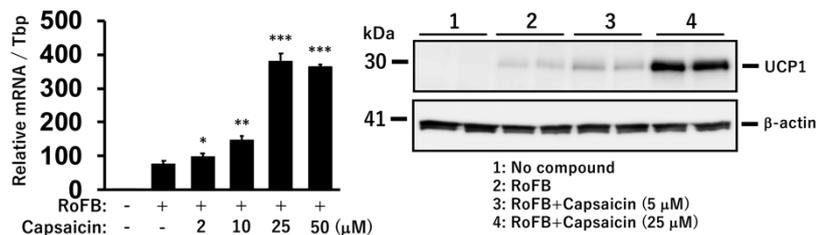


図2 カプサイシンによるUCP1の発現活性化 (Takeda Y., et al., *Sci. Rep.*, 2022 より引用)

カプサイシンによる一連の褐色化効果

↑ UCP1の発現	↑ 酸素消費量
↑ 誘導効率	↑ 糖代謝
↑ ミトコンドリア生合成	↑ 脂肪酸代謝関連遺伝子
↑ グリセロール Recycling	↑ 糖代謝関連遺伝子

図3 カプサイシンによる一連の褐色化効果

### (4) 肥満の状態を反映した遊離脂肪酸による褐色化の制御機構の解明

肥満の人では、褐色脂肪細胞の量と活性が低下し、反対に痩身の人では増加することが統計的に明らかとなっている。そこでciBAを用いて、その原因を解析するため、肥満の状態を無血清培地中の遊離脂肪酸の量に反映させてciBAを培養した。その結果、脂肪酸の増加とともにUCP1の発現量が大きく減少し、反対に脂肪酸フリーの条件ではUCP1の発現量は大きく増加した (図4)。このようなUCP1の発現量の変化は、細胞内の中性脂肪の蓄積量や、その生合成の律速酵素であるGlycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)の活性と相関があった。また、

代表的な遊離脂肪酸としてパルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸を用いて試したが、い

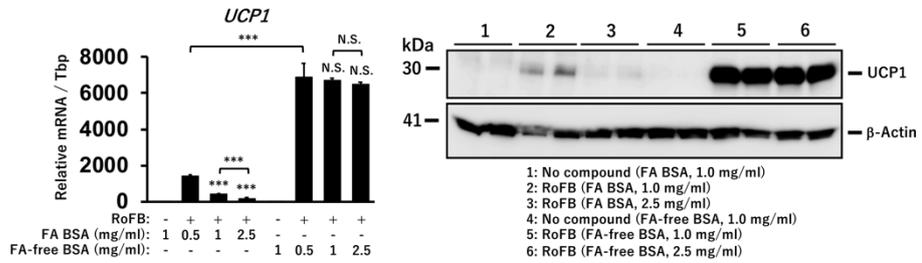


図4 脂肪酸結合型 BSA と脂肪酸フリーBSA を用いて培養された ciBA における UCP1 の発現比較 (Takeda Y., *Cells*, 2022 より引用)

ずれも UCP1 の発現を減少させその種類には依存しなかった。反対に、脂肪酸の燃焼を補助するカルニチンを継続的に投与したところ、細胞内の中性脂肪の減少が起こり UCP1 の発現量が増加した。網羅的な遺伝子発現解析から、脂肪酸フリーの状態では活性化される遺伝子、カルニチンにより活性化される遺伝子、そして脂肪酸の供給により減少する遺伝子をそれぞれ比較した。その結果、脂肪酸の供給と枯渇による UCP1 の発現制御は、一連の脂肪酸代謝遺伝子とともに生じており、特に、脂肪酸合成に重要な *FASN*、*SREBP1*、*ACLY* といった遺伝子と同様な転写制御を受けていることが示唆された。脂肪酸が枯渇した状態では UCP1 の発現増加に反して、ミトコンドリアにおける膜電位とプロトンリーク (熱産性に相当) の量が減少しており、反対に脂肪酸が豊富な状態では UCP1 の発現抑制とは反対に、膜電位とプロトンリークが増加した。この現象から、ミトコンドリアが高エネルギー状態にある時は、過剰な熱産性を抑制するため

UCP1 の発現は抑制され、一方、低エネルギー状態では、UCP1 による熱産性を維持するため、その発現が活性化されるという転写のフィードバック機構が働いていることが提案された (図 5)。

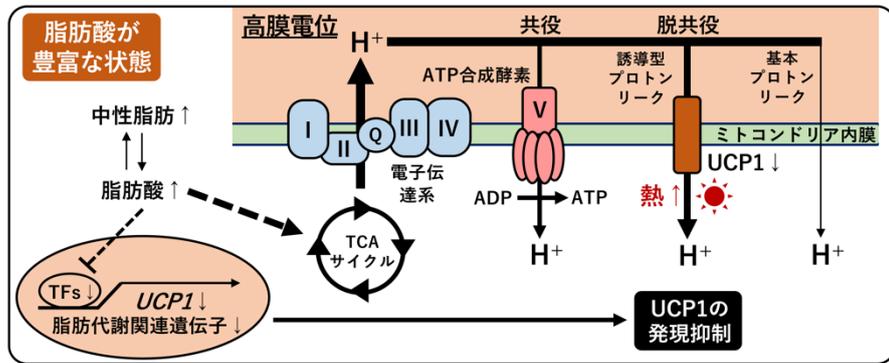


図5 脂肪酸が豊富な状態における高いミトコンドリア膜電位と UCP1 の転写フィードバック抑制機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takeda Y., Harada Y., Yoshikawa T., and Dai P	4. 巻 24
2. 論文標題 Mitochondrial energy metabolism in the regulation of brown fats and human metabolic diseases.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 1352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24021352.	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 Takeda Y. and Dai P	4. 巻 11
2. 論文標題 Chronic Fatty Acid Depletion Induces Uncoupling Protein 1 (UCP1) Expression to Coordinate Mitochondrial Inducible Proton Leak in a Human-Brown-Adipocyte Model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11132038.	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 Takeda Yukimasa, Dai Ping	4. 巻 12
2. 論文標題 Capsaicin directly promotes adipocyte browning in the chemical compound-induced brown adipocytes converted from human dermal fibroblasts.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6612
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10644-8	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9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武田行正
2. 発表標題 シンポジウム：1PS-15 肥満を反映した遊離脂肪酸によるヒト褐色脂肪細胞の恒常的熱産生機構の解明
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武田行正
2. 発表標題 肥満による脱共役タンパク質UCP1の発現フィードバック制御
3. 学会等名 第44回日本肥満学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武田行正
2. 発表標題 ヒトベージュ細胞モデルを用いた褐色化因子の同定
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田行正
2. 発表標題 概日リズムと糖・脂肪代謝、褐色脂肪細胞と食品成分
3. 学会等名 福井県立大学生物資源学科セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田行正
2. 発表標題 カプサイシンによるヒト褐色脂肪細胞モデルの褐色化
3. 学会等名 第43回日本肥満学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田行正
2. 発表標題 ワークショップ：1AW-08-2 Capsaicinによる褐色化効果の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田行正
2. 発表標題 新規ヒトベージュ細胞モデルによる褐色化因子の同定
3. 学会等名 第33回小野医学研究財団研究成果発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田行正
2. 発表標題 非遺伝子導入型細胞運命変換によるヒト線維芽細胞から機能的な褐色脂肪細胞の誘導
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田行正
2. 発表標題 無血清培地を用いた低分子化合物誘導性褐色脂肪細胞ciBAの誘導とそのキャラクタリゼーション
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 武田行正、戴平	4. 発行年 2023年
2. 出版社 株式会社ニューサイエンス社	5. 総ページ数 56
3. 書名 Medical Science Digest 最先端医療の今「ヒト褐色脂肪細胞モデルを用いたUCP1の発現制御機構の解明」	

1. 著者名 武田行正、戴平	4. 発行年 2023年
2. 出版社 株式会社北隆館	5. 総ページ数 86
3. 書名 Precision Medicine 研究者の最新動向「ヒト褐色脂肪細胞を用いた褐色化機構の解明」	

1. 著者名 武田行正、戴平	4. 発行年 2022年
2. 出版社 株式会社北隆館	5. 総ページ数 92
3. 書名 Bio Clinica BIOLOGY TOPICS 「ヒト皮膚線維芽細胞から誘導される褐色脂肪細胞とその応用」	

1. 著者名 武田行正、戴平	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社ニューサイエンス社	5. 総ページ数 62
3. 書名 Medical Science Digest 最先端医療の今「低分子化合物によるヒト褐色脂肪細胞のダイレトリプログラミング」	

1. 著者名 武田行正、戴平	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社北隆館	5. 総ページ数 96
3. 書名 Precision Medicine 研究者の最新動向「ヒト褐色脂肪細胞のケミカルダイレクトリプログラミング」	

〔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

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