

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461925

研究課題名(和文) ヒト由来褐色脂肪を用いた新規非アルコール性脂肪肝治療法の開発

研究課題名(英文) Novel treatment for non-alcoholic hepatitis inducing human brown adipose tissue

研究代表者

佐久間 康成 (SAKUMA, YASUNARU)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10296105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪は、余剰なエネルギー源となる脂肪成分を次々と熱に変換し、カロリー消費に関わっていることで知られている。われわれは褐色細胞腫の腫瘍周囲脂肪組織に褐色脂肪が多く存在することに注目し、該当する患者から採取した脂肪組織を分離培養し褐色細胞特異的に発現しているUCP1遺伝子陽性細胞を確認した。褐色脂肪細胞は未だ特異的な膜抗原が確認されていない。そこで、UCP-1特異的のアプタマーを用いて純度の高い褐色脂肪細胞の収集を行い、gene-tip解析を行った。結果、CD9、CD177、CD200：陽性、CD40、CD44、CD109：陰性であることまで明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Brown adipocytes play a central role in regulating metabolism and generating metabolic signals. They are also important to maintain metabolic homeostasis by adjusting energy expenditure. However, these cells are not yet well-understood and the tissue-specific presence of uncoupling protein 1 (UCP-1) is a promising lead to gain further understanding. Pheochromocytomas are known to have a tendency to grow into surrounding adipose tissue and become brown adipose tissue. We have successfully collected and cultured these cells from a patient with a pheochromocytoma. There is very little knowledge about Brown adipocytes except for the presence of UCP-1. We performed fluorescence-activated cell sorting combined with a UCP-1 specific aptamer. Cell surface makers were detected using gene-tip analysis and showed CD9, CD177, CD200: positive, and CD40, CD44, CD109: negative.

研究分野：膵島細胞移植

キーワード：褐色脂肪細胞 表面マーカー 細胞移植 褐色細胞腫

1. 研究開始当初の背景

生体肝移植ドナーや肝腫瘍を有する症例に対する肝切除術において、非アルコール性脂肪肝炎 (NAFLD) の存在は非常に大きな問題であり、その克服は急務である。近年 NAFLD をベースとした発癌患者は増加傾向にあり、我々外科医にとっても無視できない問題である。現在、肥満治療戦略として、世界中で褐色脂肪の活用が注目されており、我々は NAFLD や非アルコール性脂肪肝患者に対する治療への応用を模索した。

褐色細胞腫患者の副腎～腎臓周囲に PET 検査で強陽性を呈する細胞群が存在し、これらが褐色脂肪に置き換わっていることに着目してきた。我々は、科研費申請段階までに褐色細胞腫患者の腎周囲脂肪組織を分離し、褐色脂肪に特異的なマーカー UCP-1 を有する褐色脂肪の培養に成功した。そこで上記目標を達成すべく、我々が樹立したヒト由来褐色脂肪の細胞移植を通して、NAFLD 症例の脂肪肝が改善し、肝切除術後の肝機能改善効果について検討することを目的とした。

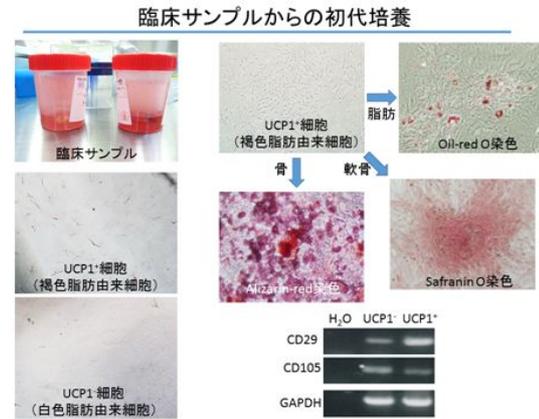
2. 研究の目的

ヒト由来褐色脂肪を用いた、脂肪肝の治療を以下の方法で検証した。またヒト由来褐色脂肪細胞のキャラクター自体が明らかとなっていないことから、同細胞のフェノタイプングを行うことを最終目標とした。



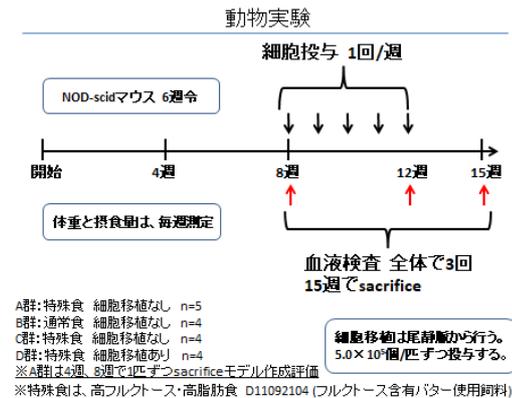
3. 研究の方法

まず臨床サンプルから初代培養を行った細胞群について、我々が樹立した細胞群の中に間違いなく褐色脂肪由来の細胞が含まれていることを再確認した。特に注目したのは、増殖した多くの細胞は間葉系幹細胞と形態が似ている点である。我々が以前より行っている培養方法により継代を行い、一部を分化誘導した結果、これら褐色脂肪細胞は間葉系幹細胞と同様に骨、軟骨、脂肪への分化が確認された。また、PCR 法により間葉系幹細胞の主要マーカーの一種である CD29、CD105 が陽性であることも判明した。これは褐色脂肪の発生がすべて解明されていないが興味深い結果と思われた。



NOD SCID マウスを用いて、以下の 2 群にて褐色脂肪の皮下移植を行う。

A 群：褐色脂肪移植群。NAFLD 誘導 SCID マウスの 4 週齢目に皮下に $5.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 個の褐色脂肪を移植。
 B 群：繊維芽細胞投与群 (Control) NAFLD 誘導 SCID マウスの 4 週齢目に皮下に $5.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 個の繊維芽細胞を移植する。15 週齢にて、60% 肝部分切除術を行い、週 1 回体重測定と、採血を行う。sacrifice の際に肝臓、膵臓、肺と血液を採取し、免疫染色や血液検査所見の推移から移植効果の検討を行う。脂肪肝や炎症所見を確認し、移植効果の検討を行う。



別の実験系において、褐色脂肪を含む間葉系幹細胞は上記細胞数にて、尾静脈からの細胞投与で肝虚血改善効果などを確認しており、同様のプロトコールで行うこととした。

我々の樹立した細胞群に対して網羅的遺伝子解析を行う。

UCP-1 特異的アプタマーを用いた、ヒト由来褐色脂肪の純化培養
 更なる純化のため、標的とした褐色脂肪アプタマー (SmartFlare, Millipore Corporation, MA, USA) を作成する。アプタマーと褐色脂肪群を培養し、

Flowcytometry (BD FACS Aria)を用いて褐色脂肪を純化する。さらに DNA マイクロアレイを用いたヒト由来褐色脂肪の遺伝子解析を行う。

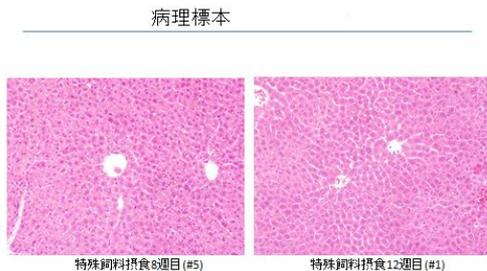
純化された褐色脂肪を DNA マイクロアレイ (Whole Human Genome DNA マイクロアレイ 4x44k v2, Agilent Technologies, USA) で網羅的遺伝子解析を行い、褐色脂肪の遺伝子的特徴を解析する。

プロテインチップ解析によるヒト由来褐色脂肪の表面マーカーの探索) 純化された褐色脂肪は BD Lyoplate™ Screening Panels (BD Bioscience, USA) を用いて、242 種類の表面マーカーの検索を行う。さらに、同定された抗体を用いて、マグネットビーズ(MACS 細胞分離)を用い、移植に向けた大量細胞分離の可能性を検討する。

4. 研究成果

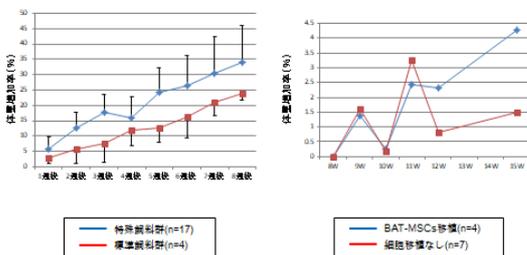
の結果は以下通りであった。

まず下図左のように、移植を行う第 8 週において特別食摂取(高コレステロール(2%)、40kcal%脂肪(Primex 30kcal%)、炭水化物40kcal%(フルクトース 20kcal%含有))により明らかな脂肪肝が誘導されていることを確認した。



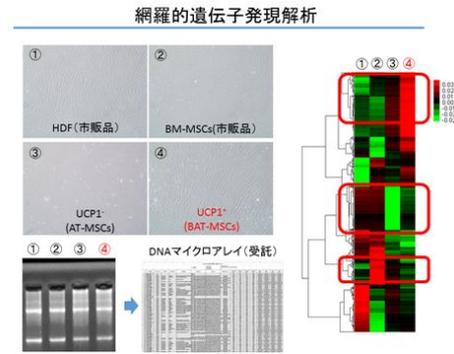
また下図左の様に特別食群では優位な体重増加がみられ、いわゆる食餌性肥満を呈していた。

モデル作製および細胞移植の結果(体重)



移植後の肝組織、体重は上図右の如くわずかに脂肪肝の改善傾向がみられたが、体重の増加を逆に認めるといった結果であった。

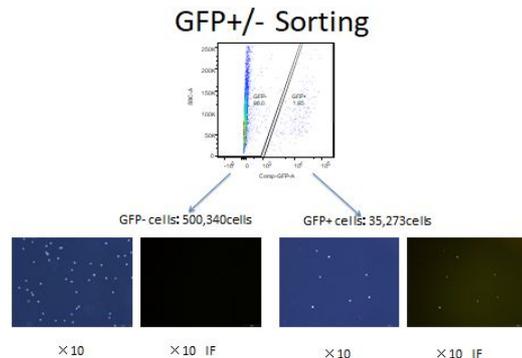
の実験結果は以下の通りであった。網羅的遺伝子検索の結果を下に添付する。



DNA マイクロアレイ解析データから、特異性の高い膜抗原の同定を行ったが UCP1 陽性細胞の純度が低いため (抗 UCP1 抗体を用いて確認) 有意な膜抗原を選抜することが困難であった。

そこで、の実験の結果から原因としては培養細胞の褐色脂肪細胞の純度が低いことが考えられた。

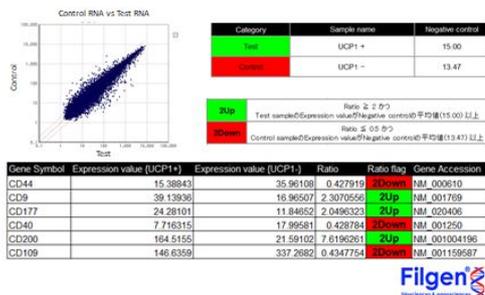
の結果を下に添付する。



まず UCP-1 特異的のアプタマー (SmartFlare RNA) を用い、GFP 陽性細胞 (UCP1 陽性細胞) を FACS sorting したものが下の結果である。

細胞数は少なくなったものの確実に GFP 陽性細胞が sorting された。この細胞群を再度培養して viability を上げてから再度網羅的遺伝子解析を行った。その結果が次図のものである。

褐色細胞腫由来UCP1陽性細胞株とUCP1陰性細胞株の遺伝子解析結果(CD抗原)



UCP1⁺細胞: CD9⁺, CD40⁺, CD44⁺, CD109⁺, CD177⁺, CD200⁺

上記結果より我々の入手した褐色細胞腫周囲の脂肪由来 UCP1 陽性細胞は少なくとも陽性: CD9, CD177, CD200
陰性: CD40, CD44, CD109

の結果を有していることが明らかとなった。上記が唯一の革新的結果と考えている。次に本マーカーで UCP1 陽性細胞が回収可能かどうかの検討を行っている。具体的には、新規褐色細胞腫の患者サンプルが入手できたので、初代培養を行った後、本マーカーを用いてヘテロな細胞集団から UCP1 陽性細胞をソーティングし、最も効率的かつ純度の高い UCP-1 陽性細胞が回収できる抗体の組み合わせを選抜する。そのデータを基に選抜した抗体を用い MACS 法により大量に UCP1 陽性細胞を回収するシステムを構築する。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

以下 URL に当該研究に関するオプトアウト掲載中

<https://www.jichi.ac.jp/usr/surg/content/files/information/optout10.pdf>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐久間 康成 (SAKUMA, Yasunaru)

自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10296105

(2)研究分担者

三木 厚 (MIKI, Atsushi)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20570378

安田 是和 (YASUDA, Yoshikazu)
自治医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 40158001

上本 伸二 (UEMOTO, Shinji)
自治医科大学・医学研究科・教授
研究者番号: 40252449

笠原 尚哉 (KASAHARA, Naoya)
自治医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 50382891

寺谷 工 (TERATANI, Takumi)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70373404