

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15111

研究課題名(和文) バイオ3Dプリンターを用いた人工褐色脂肪組織の構築

研究課題名(英文) Three-dimensional culture of reprogrammed brown adipocytes

研究代表者

松田 修 (Mazda, Osam)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00271164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は線維芽細胞から褐色脂肪細胞を直接誘導することに成功し、これを移植するとマウスの糖尿病が抑制できることを見出した。培養ディッシュ内で理想的な3次元構造を構成してから移植することができれば、生体内での生着と代謝調節機能等をさらに高められる可能性が考えられる。そこで誘導褐色脂肪細胞を用いた3次元の褐色脂肪組織を構築することを目的とした。種々の3D培養を行った結果、複数の細胞種の共培養によって特徴的なスフェロイドを形成し、UCP1を高発現すること等を見出した。本成果は、新しい組織工学的テクノロジーを用いた、糖尿病に対する新着想の再生医療をもたらす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We established a procedure to directly convert fibroblasts into brown adipocytes. We also found that transplantation of the brown adipocytes remarkably suppressed diabetes in mice. Three-dimensional culture of the brown adipocytes may further improve the viability and metabolic activity of the cells in vivo after transplantation. Then we aimed at forming 3D brown adipose tissue using the reprogrammed brown adipocytes. After various trials, we observed some characteristic structure by co-culturing different lineages of the cells. The present findings may implicate a novel tissue engineering procedure that may be useful for regenerative therapy for diabetes mellitus.

研究分野：再生医学

キーワード：糖尿病

1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪細胞は、白色脂肪細胞とは逆に、脂肪酸を酸化分解したエネルギーを熱として散逸する細胞であり、マウス等では肥満や耐糖能異常に抑制的に働く。ヒト成人での褐色脂肪細胞が存在することは、2009年に初めて証明され、まだ未解明の部分が多いが、興味深いことに高度の肥満、脂質異常症、糖尿病の患者ではほとんど活性が認められない (Saito et al, Diabetes, 2009)。そこで、糖尿病の患者から褐色脂肪細胞を作出して自家移植できれば、全く新しい細胞治療を提供できる可能性が考えられる。

一方、少数の既知因子を遺伝子導入することで、体細胞の運命転換が可能であることを iPS 細胞研究が示して以来、リプログラミング技術を用いた様々な細胞種の創出が可能になりつつある。最近、我々はヒトの褐色脂肪細胞を、線維芽細胞から直接誘導することに成功した (ダイレクト・リプログラミング) (Kishida et al., Stem Cell Rep. 2015)。すなわち、ヒト線維芽細胞に C/EBP- β と c-myc の2つの遺伝子を導入すると、UCP1 の発現が極めて高く、酸素消費量やグルコース取り込み等が高い代謝制御能を示す、褐色脂肪細胞が得られた (図1)。この誘導の過程では、iPS 細胞様の細胞の出現は認められなかった。C/EBP- β と c-myc の一過性の発現によっても褐色脂肪細胞は誘導され、その褐色脂肪細胞としてのフェノタイプは両外来遺伝子の発現を無くしても維持されたことから、本法はヒト線維芽細胞から褐色脂肪細胞への直接のリプログラミングであることが強く示唆された。直接誘導褐色脂肪細胞 (dBA) を糖尿病マウスに移植すると、in vivo でも糖脂質代謝を制御し糖尿病を抑制できた。すなわち、体重増加と空腹時血糖の上昇が抑制され、インスリン抵抗性と耐糖能が改善し、脂質異常症が是正された (図2)。このような高機能な褐色脂肪細胞の誘導は、これまで報告がない。

したがって、本技術は糖尿病に対する新しい再生医療をもたらす可能性がある。しかしながら、移植医療に用いるには、誘導褐色脂肪細胞に立体的な組織構築を形成せしめ、移植後の高い生存と機能維持を図ることが望ましい。

2. 研究の目的

本研究では、誘導ヒト褐色脂肪細胞から、バイオ3Dプリンター等の種々の3D培養法を用いて、豊富な vasculature を有する3次元人工褐色脂肪組織を構築し、移植後の生存期間、構造と機能を多角的に検証する。

本研究は、世界で唯一の高機能ヒト褐色脂肪細胞の誘導技術、また血管内皮細胞を含む共培養で3次元褐色脂肪組織の創生を目指す点において、本研究は極めて斬新で独創性が高い。本研究の成果は、組織の自己組織化に関する新知見をもたらし、また異なる複数の

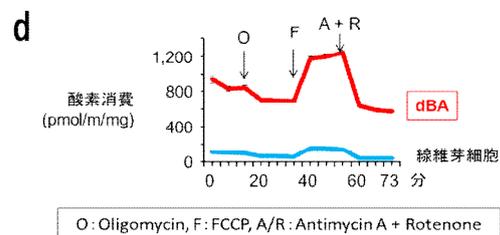
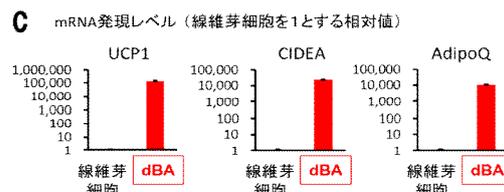
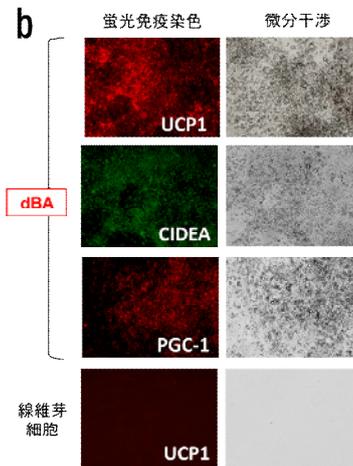
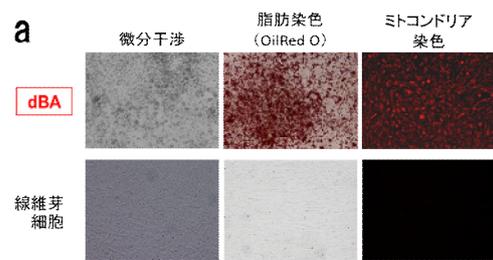


図1 ダイレクト・リプログラミングで誘導した、ヒト褐色脂肪細胞。ヒト線維芽細胞にC/EBP- β とc-myc遺伝子を導入すると、80%以上の細胞が、多房性脂肪滴とミトコンドリアを多数有する褐色脂肪細胞(dBA)にコンヴァートした(a)。dBAは、褐色脂肪細胞特異的の遺伝子群を強発現し(b、c)、高いUncoupling呼吸能を有する(d)。

細胞種を用いた3Dボトムアップ組織構築技術に有益な示唆を与えると考えられる。さらに、糖尿病に対する新しい再生医療を提唱する上で大きな意義がある。

3. 研究の方法

ヒト線維芽細胞に、C/EBP- β 、c-mycとEGFP遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入した。褐色脂肪細胞にコンヴァートさせる途上で一旦回収し、種々の3D培養を行った。その際、一部の群ではHUVECを共培養した。またコントロールとして、遺伝子導入を行っ

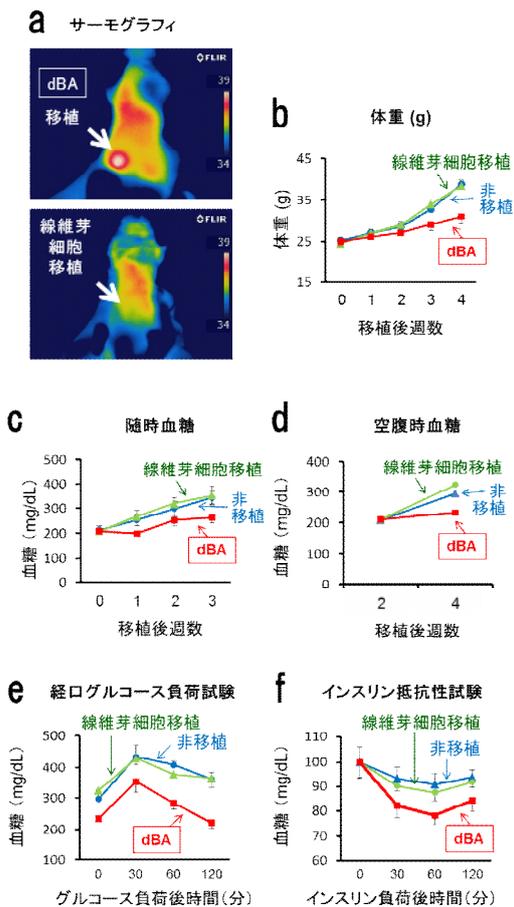


図2 褐色脂肪細胞は糖尿病を抑制する
マウス線維芽細胞から誘導した dBA をマウスに皮下移植すると、寒冷刺激後に移植部局所で熱を発生した (a)。糖尿病マウス KK-Ay に移植すると、体重と血糖上昇が有意に抑制され (b-d)、耐糖能とインスリン抵抗性が著明に改善した (e-f)。

ていない細胞も同様に培養した。3D 培養後種々の日数経過後に、以下の解析を行った。mRNA 発現は real time RT-PCR で定量的に解析した。UCP1 の発現は、抗 UCP1 抗体と Alexa546 標識 2 次抗体で免疫染色後、Keyence の蛍光顕微鏡にて解析した。細胞核を DAPI で染色し、同様に青色蛍光で観測した。EGFP の発現は、緑色蛍光で可視化した。spheroid が形成され、また高い UCP1 たんぱくの発現が見られる。

4. 研究成果

レトロウイルスベクターによる導入では、導入 3 日後に多くの細胞が導入遺伝子を発現していたが、その形態はまだ線維芽細胞様であった (図 3 a)。これらの細胞を回収し、種々の 3D 培養に用いた。一部の結果を図 3 b-d に示す。3D 培養を行った後、7 および 12 日後に RNA を抽出し、UCP1 mRNA の相対的発現レベルを real time RT-PCR にて定量した結果では、C/EBP- β 、c-myc と EGFP 遺伝子を導入後した細胞が、UCP1 の mRNA を

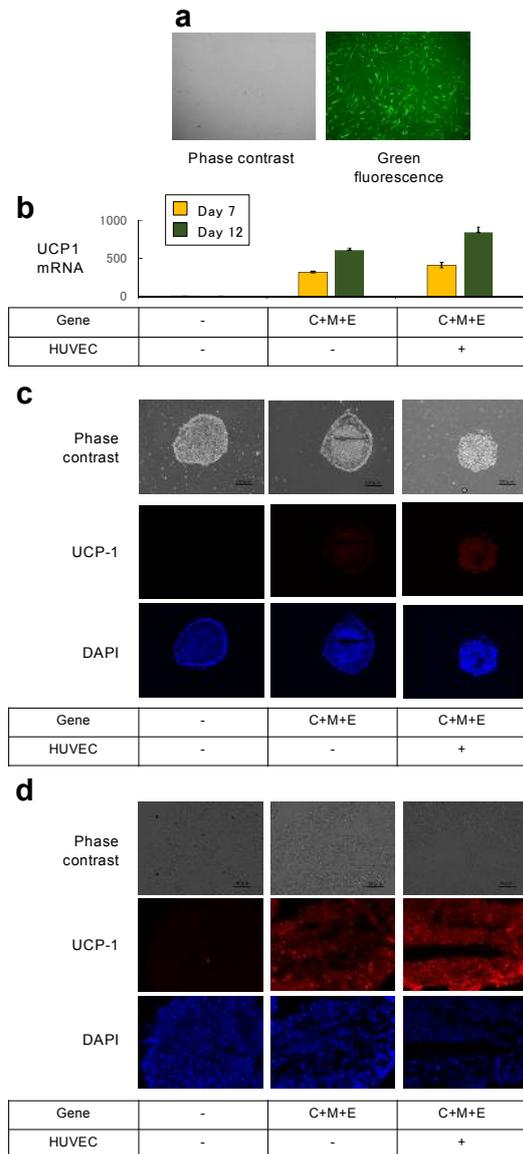


図3 dBAと血管内皮細胞を含む3D培養。

a) ヒト線維芽細胞に、C/EBP- β 、c-myc と EGFP 遺伝子を導入後、3 日後の細胞の位相差顕微鏡像と緑色蛍光顕微鏡像を示す。b) a) の細胞をトリプシナイズして回収後、3D 培養を行った。その際、HUVEC を共培養する群としない群を作成した。またコントロールとして、遺伝子導入を行っていない細胞も同様に培養した。3D 培養開始後 7 および 12 日後に RNA を抽出し、UCP1 mRNA の相対的発現レベルを real time RT-PCR にて定量した。C/EBP- β (C)、c-myc (M) と EGFP (E) 遺伝子を共導入後した細胞は、UCP1 の mRNA を高発現しており、HUVEC の共 3D 培養によってその発現はさらに高まった。c) と d) b) と同様の実験を行い、3D 培養開始後 7 日後 (c) または 12 日後 (d) に抗 UCP1 抗体による免疫染色と DAPI による核染色を行った。中倍率 (x100) (c) または高倍率 (x400) (d) の位相差顕微鏡像 (上)、赤色蛍光顕微鏡像 (UCP1; 中) と緑色蛍光顕微鏡像 (DAPI; 下) を示す。CM と EGFP 遺伝子を導入した線維芽細胞と HUVEC を共培養した群で、3D 培養の結果コンパクトな spheroid が形成され、また高い UCP1 たんぱくの発現が見られる。

高発現していた(図3 b)。HUVECの共培養によってその発現はさらに高まった。3D培養開始から7日後(図3 c)または12日後(図3 d)に抗UCP1抗体による免疫染色とDAPIによる核染色を行ったところ、CMとEGFP遺伝子を導入した線維芽細胞とHUVECを共培養した群で、3D培養の結果コンパクトなspheroidが形成されており(図3 c)、また高いUCP1たんぱく質の発現が見られた(図3 c-d)。

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1件)

Reprogrammed Functional Brown Adipocytes Ameliorate Insulin Resistance and Dyslipidemia in Diet-Induced Obesity and Type 2 Diabetes.

Kishida T, Ejima A, Yamamoto K, Tanaka S, Yamamoto T, Mazda O.

Stem Cell Rep. 2015 Oct 13;5(4):569-81.

doi: 10.1016/j.stemcr.2015.08.007. Epub

2015 Sep 10. PMID: 26365511 (査読あり)

[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]

ホームページ等

http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/microbiol/research/project_1.html

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(系)研究科(研究院)教授

研究者番号: 00271164

(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(系)研究科(研究院)准教授

研究者番号: 50336731

連携研究者

五條 理志 (Gojo Satoshi)

京都府立医科大学医学(系)研究科(研究院)教授

研究者番号: 90316745

連携研究者

岸田 綱郎 (Kishida Tsunao)

京都府立医科大学医学(系)研究科(研究院)准教授

研究者番号: 00370205