

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07122

研究課題名(和文) 褐色脂肪細胞の化学誘導技術の開発と糖尿病の再生治療

研究課題名(英文) Chemical induction of brown adipocytes and regeneration therapy for diabetes

研究代表者

小谷 晋一郎 (Kotani, Shin-ichiro)

京都府立医科大学・医学部・プロジェクト研究員

研究者番号：30783964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪細胞は余剰エネルギーを熱として散逸し、糖脂質代謝や体温調節を司るが、糖尿病患者ではほぼ消失している。糖尿病患者の体細胞から褐色脂肪細胞を作出して自家移植できれば、新しい原理に基づく再生医療を提供できる可能性がある。我々は、ヒト線維芽細胞を特定の小分子化合物を添加して培養し、褐色脂肪細胞を誘導する技術を開発した。本技術は遺伝子を導入しない等の多くの利点があるが、未解明の点が多い。本研究では、誘導技術の最適化、作出した細胞の遺伝子発現とフェノタイプの解析、生体内生着性と造腫瘍性の評価を行った。その結果、作出した細胞の性状、再生医療への応用における重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Brown adipocytes control carbohydrate and lipid metabolism as well as body temperature by dispersing excess energy and producing heat. Diabetic patients have lost most of the function of brown adipocytes. If brown adipocytes can be induced from somatic cells of diabetic patients and transplanted back into them, such a strategy can be a novel regeneration therapy. Recently we succeeded in developing a new method to convert human dermal fibroblasts into brown adipocytes by culturing them with a small molecular compound. This method has great advantages, particularly because the cells have not been transduced with any exogenous gene, but characterization of the resultant brown adipocytes has not been achieved in detail. In this study, we optimize the inducing method, analyze the gene expression and phenotypes of the brown adipocytes, and transplant the brown adipocytes to estimate viability as well as tumorigenicity of the cells in vivo.

研究分野：免疫学

キーワード：糖尿病 移植・再生医療

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞、肝細胞、軟骨細胞等の分化に重要な役割を果たす転写因子の遺伝子を、線維芽細胞に導入して培養することにより、線維芽細胞をこれらの細胞に直接 (iPS 細胞を経ずに) コンヴァートさせることが可能である (ダイレクト・リプログラミング、またはダイレクト・コンバージョン)。我々の研究室では、ヒト線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて C/EBP β と c-Myc の 2 つの遺伝子を導入すると、褐色脂肪細胞に直接コンヴァートできることを報告した (Stem Cell Reports 2015)。そのコンバージョンの効率は 90% 以上であった。さらに、この遺伝子導入によって誘導した褐色脂肪細胞 (cBA) を糖尿病マウスに移植すると、UCP1 依存的に、インスリン抵抗性と脂質異常症を著明に抑制した。ヒト線維芽細胞は、患者から低侵襲に採取して培養することができる。さらにこの直接転換の途上では iPS 細胞を経由しないので、移植細胞に混入しているごく少数の iPS 細胞が移植後に癌化するという危険性がない。したがって、糖尿病の再生治療にこの細胞が有用であると期待できる。

しかしながら、この方法ではレトロウイルスベクターの配列が染色体上の任意の位置に組み込まれるので、がん遺伝子の活性化によって、cBA が癌化する可能性は否定できない。遺伝子を導入せずに線維芽細胞を褐色脂肪細胞に直接転換することができれば、移植治療用の細胞として理想的である。そこで我々は、線維芽細胞に遺伝子を導入する代わりに、小分子化合物を添加して培養することによって褐色脂肪細胞にコンヴァートする方法を着想し、このような小分子化合物を探索した。その結果、小分子化合物を培地中に加えてヒト線維芽細胞を培養すると、UCP-1 と CIDEA を高発現する褐色脂肪細胞にコンヴァートすることができることを見出した (投稿準備中)。

そこで本研究では、この技術をさらに向上させ、得られた細胞のキャラクターと糖尿病に対する効果を確認することで、糖尿病に対する新しい再生医療に発展させるための基盤を確立する。

2. 研究の目的

褐色脂肪細胞 (brown adipocyte : BA) は余剰エネルギーを熱として散逸し、糖脂質代謝や体温調節を司るが、糖尿病患者ではほぼ消失している。そこで、糖尿病の患者の体細胞から褐色脂肪細胞を作出して自家移植できれば、新しい原理に基づく再生療法を提供できる可能性がある。我々の研究室では、線維芽細胞に 2 つの遺伝子を導入して褐色脂肪細胞にコンヴァートすることに成功したが、この遺伝子導入によって誘導した褐色脂肪細胞 (g-BA) を糖尿病マウスに移植すると、インスリン抵抗性と脂質異常症が著明に改善することを見出した。さらに、線維芽細胞

に特定の小分子化合物を添加して培養するだけで、褐色脂肪細胞を誘導する技術を開発した。この化合物によって誘導した褐色脂肪細胞 (cBA) は、遺伝子を導入しないので多くの利点があるが、開発したばかりでありまだ未解明の点が多い。

そこで本研究では、この誘導法の最適化、得られた細胞の生体内外での機能解析等を行って、新しい糖尿病再生治療への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) ヒト由来皮膚線維芽細胞の褐色脂肪細胞への最適誘導培養条件の検討

ヒト由来皮膚線維芽細胞を、通常培地、褐色脂肪細胞誘導培地、および、褐色脂肪細胞誘導培地に小分子化合物を種々の濃度、および期間添加した培地で培養した。これらの細胞から RNA を抽出し、real time RT-PCR 法により褐色脂肪細胞特異的遺伝子の mRNA 発現を評価した。

(2) 遺伝子発現解析

上記 (1) で決定した培養条件をもとに培養した細胞から RNA を抽出し、real time RT-PCR 法により褐色脂肪細胞特異的遺伝子の mRNA 発現を評価した。

(3) フェノタイプ解析

上記 (1) で決定した培養条件をもとに培養した細胞を免疫染色法により、褐色脂肪細胞特異的タンパク質の発現、ならびにミトコンドリアおよび脂肪滴の蓄積を評価した。

(4) 生体内生着性の評価

ウイルスベクターを用いて GFP 遺伝子を導入したヒト由来皮膚線維芽細胞を、小分子化合物を添加した誘導培地で一定期間培養した後、免疫不全マウスに移植した。移植後、1 か月目にグラフト部位を摘出して HE 染色法および蛍光観察により生着性を評価した。

(5) 造腫瘍性の評価

小分子化合物を添加した誘導培地で一定期間培養したヒト由来皮膚線維芽細胞および HeLa 細胞を、免疫不全マウスに移植した後、経時的に移植部位の体積を計測した。

(6) 異なる細胞種からのコンバージョンの評価

ヒト正常上表皮角化細胞、臍帯静脈内皮細胞、および末梢血単核球を、小分子化合物を添加した誘導培地、あるいは血球培養用培地に同様の各成分を添加した培地で一定期間培養した後、RNA を抽出して real time RT-PCR 法により褐色脂肪細胞特異的遺伝子の mRNA 発現を評価した。

(7) コンバージョンメカニズムの検討

上記 (1) で決定した培養条件をもとに培養した細胞から経時的に RNA を抽出し、real time RT-PCR 法により NANOG の mRNA 発現を評価した。さらに、褐色脂肪細胞への分化に関与すると考えられる転写因子を RNAi 法によりノックダウンし、本培養法における転換効率への影響を評価した。

4. 研究成果

【 】本培養法における褐色脂肪細胞誘導培養法の確立

種々の条件で培養したヒト由来皮膚線維芽細胞の褐色脂肪細胞特異的遺伝子の mRNA 発現を評価した結果から、最適誘導培養条件を決定した。本培養条件において培養した線維芽細胞は褐色脂肪細胞特異的遺伝子群 (CIDEA、KCNK3、および UCP-1 等) を高発現する褐色脂肪細胞様の細胞にコンヴァートした。また、免疫染色の結果から、本培養法は多房性脂肪滴およびミトコンドリアに富んだ細胞への転換を促進することが明らかとなった。これらの結果から、本法によって作出された細胞は褐色脂肪細胞様の性状を有することが示された。上記線維芽細胞のドナーとは年齢、性別、採取部位等の異なるドナーから得られたヒト由来皮膚線維芽細胞を同様に誘導培養した結果、採取された細胞の由来によって誘導効率が異なることが分かった。

【 】作出した細胞の生体生着性および造腫瘍性の評価

本培養法を用いて一定期間誘導培養した GFP 遺伝子導入線維芽細胞を免疫不全マウスに移植を行い、1 か月後に摘出した結果、移植細胞の生着が認められた。また、同様に一定期間誘導培養した線維芽細胞を免疫不全マウスに移植後、53 日目まで観察した結果、移植細胞の腫瘍化は見られなかった。これらの結果から、本法において作出する細胞は生体内生着性を有するとともに、造腫瘍性を持たず、再生医療における細胞移植に応用できる可能性が示された。

【 】コンヴァージョン効率およびメカニズムの評価

本培養法を用いて、ヒト正常表皮角化細胞、臍帯静脈内皮細胞、および末梢血単核球を誘導培養し、褐色脂肪細胞特異的遺伝子の mRNA 発現を線維芽細胞のものと比較した結果、本法によるコンヴァージョンは細胞によって効率等が異なる可能性が示唆された。また、本培養法で培養した細胞における多能性マーカー NANOG 遺伝子の mRNA 発現を評価した結果、どの時点においても発現の上昇は認められなかった。これらの結果から、本培養法におけるコンヴァージョンは多能性幹細胞を経由しないことが示された。

以上のように、本法によって作出した褐色脂肪細胞の性状、および再生医療における細胞移植への応用にとっての重要な知見が得られた。

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)

Direct phenotypic conversion of human

fibroblasts into functional osteoblasts triggered by a blockade of the transforming growth factor- signal
Kenta Y, Tsunao K, Kei N, Yoshiki S, Shin-ichiro K, Yuta N, Toshiro Y, Narisato K, Osam M

Sci Rep. 2018 May 31;8(1):8463

査読有

doi: 10.1038/s41598-018-26745-2

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

なし

取得状況(計 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 晋一郎 (KOTANI SHIN-ICHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・プロジェクト研究員

研究者番号: 30783964

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

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

岸田 綱郎 (KISHIDA TSUNAO)

同・准教授

研究者番号: 00370205

扇谷 えり子 (OHGITANI ERIKO)

同・講師

研究者番号: 80300820

山本 健太 (YAMAMOTO KENTA)

同・助教

研究者番号：00636160