

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15222

研究課題名(和文)ケミカルダイレクトリプログラミングによるヒト線維芽細胞から褐色脂肪細胞誘導の試み

研究課題名(英文)Direct conversion of human fibroblasts to brown adipocytes by small chemical compounds

研究代表者

戴平(Dai, Ping)

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：20291924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：7種類の低分子化合物の組み合わせを詳細に検討した結果、複数のヒト皮膚由来線維芽細胞から最も効率が良く褐色脂肪細胞へダイレクトリプログラミングする低分子化合物の組み合わせを同定した。これにより生じる低分子化合物誘導性褐色脂肪細胞(cIBA: chemical compound-induced brown adipocyte)は、生体内の褐色脂肪細胞に特異的な遺伝子の発現、多量のミトコンドリアの局在、酸素消費量の増加、アドレナリン受容体作動薬による熱産生遺伝子の発現誘導などが確認された。このciBAは今後より安全な細胞移植治療や、創薬研究、個別化医療などに利用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Brown adipocytes maintain body temperature by burning lipid, which can prevent obese and diabetes by enhancing energy expenditure. Brown adipocytes are differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSCs) and directly converted from fibroblasts by virus vector-mediated expression of a specific set of transcription factors. In order to provide a safer approach to generate brown adipocytes, we developed chemical compound-based direct conversion from human dermal fibroblasts into brown adipocytes without any genetic manipulation. The chemical compound-induced brown adipocytes (ciBAs) exhibit expression of human brown adipocyte-specific genes including Ucp1, activation of thermogenic gene expression through adrenergic receptor, and increased oxygen consumption rates. Our findings might provide an easily accessible approach for generating human brown adipocytes from fibroblasts and offer therapeutic potential for the management of obesity, diabetes, and related metabolic disorders.

研究分野：再生医学

キーワード：ダイレクトリプログラミング 褐色脂肪細胞 細胞移植治療 再生医療 低分子化合物

1. 研究開始当初の背景

我々の研究室はこれまで、6種類の低分子化合物を用いてヒト線維芽細胞から神経細胞を誘導することに成功している。この現象は、ダイレクトリプログラミング (直接誘導法) と呼ばれ、3週間以内に神経細胞を80%以上という高い転換効率で誘導可能であった。低分子化合物のみによる直接誘導法は、遺伝子を導入する手法と比較して、癌化や感染のリスクが軽減されること、また実験操作が比較的簡便であることから、再現性よく行うことが可能であると期待される。しかしながら現在のところ、この低分子化合物のみを用いて直接誘導可能な細胞の種類はまだ限られており、新規な細胞種の作製が期待されている。

我々の研究室では、神経細胞の誘導に用いたこの6種類の化合物を様々に組み合わせたところ、神経細胞の他に脂肪滴を持った細胞が部分的に現れることを発見した。これらの細胞は、脂肪を染色する Oil-Red 陽性であり、また褐色脂肪細胞に特異的に発現する UCP1 陽性の細胞を含んでいた。しかしながらこれらの細胞が、実際に成熟した褐色脂肪細胞であるのか、また機能的にも同様のものであるのかは不明である。加えてこれらの細胞は、神経様細胞や他の脂肪様細胞と共存していた。

2. 研究の目的

本研究では、低分子化合物のみを用いてヒト線維芽細胞から褐色脂肪細胞のダイレクトリプログラミング (直接誘導法) を目指す (図1)。これは、そのつど誘導性万能細胞 (iPS細胞) を作製する必要がなく、また低分子化合物のみを用いることで、遺伝子を導入する手法と比較して、より簡便かつ安全に臨床応用可能な細胞が作製可能であると期待される。褐色脂肪細胞は、脂肪を分解し熱を産生するための脂肪細胞であり、ヒト成人においてもエネルギー代謝の亢進に重要であることが明らかとなっている。糖尿病や循環器疾患を引き起こす肥満の症状を改善するため、短期的なエネルギー摂取抑制型の治療ではなく、体内で褐色脂肪細胞を増加させることによるエネルギー消費亢進型の、長期的かつ安全な治療法の開発に期待が集まっている。

3. 研究の方法

本研究では、低分子化合物を用いてヒト線維芽細胞から褐色脂肪細胞へのダイレクトリプログラミング法の確立を目指す。このため、まず候補となる低分子化合物の組み合わせ、濃度、および培地の最適化を行う (①)。次に、誘導に成功した低分子化合物誘導性褐色脂肪細胞の遺伝子発現および機能を解析する (②)。将来的なヒトへの臨床応用を視野に、誘導した褐色マウスへの移植実験を行い、糖および脂質代謝の活性化を検証する (③)。最後に、

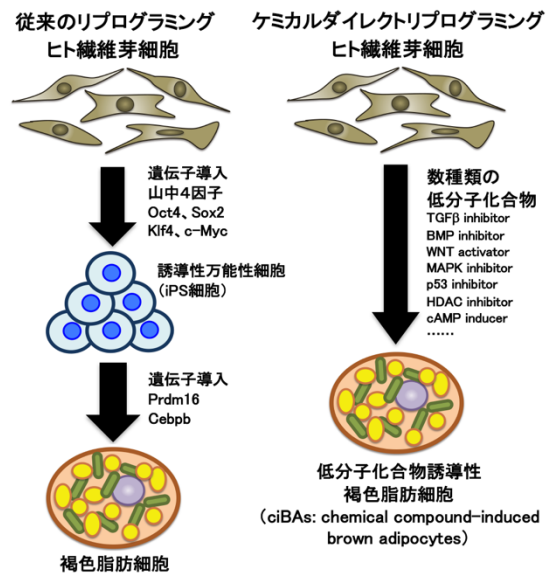


図1. 従来のリプログラミングを経た褐色脂肪細胞の誘導と遺伝子導入を行わないケミカルダイレクトリプログラミング

化合物による褐色脂肪細胞の誘導メカニズムについて明らかとするため、中間体として存在する可能性がある間葉系幹細胞に似た細胞を探索する (④)。

① 6種類の化合物を組み合わせたダイレクトリプログラミングの最適化

我々は、これまでに6種類の化合物 (SB-431542: TGFβ inhibitor、CHIR99021: GSK3β inhibitor、PD0325901: MEK Inhibitor、LDN-193189: BMP inhibitor、Pifithrin-α: P53 inhibitor、Forskolin: cAMP inducer) と神経細胞用培地を用いて、ヒト線維芽細胞から神経細胞へ高効率でダイレクトリプログラミングすることに成功した。そして、これら化合物の組み合わせによっては、褐色脂肪細胞に似た細胞が神経細胞とともに現れた。そこでより効率よく、機能的に成熟した褐色脂肪細胞を得るため、まず最適な化合物の組み合わせと培養培地について検討を行う。具体的には、6種類の化合物のうち1種類あるいは2種類の化合物を除いた全ての組み合わせについて評価する。培養培地には、インスリン、デキサメタゾン、甲状腺ホルモン、Rosiglitazone (PPARγアゴニスト) などを加えることによって脂肪細胞の培養・分化に適したものを複数検討する。最終的に化合物を除いた状態で、脂肪細胞のポピュレーションが最も高く、かつUCP1などの褐色脂肪細胞のマーカーの発現が高い条件を選択する。成熟した褐色脂肪細胞は、脂肪の分解による熱生産に必要なミトコンドリアを多く含むため、MitoTrackerなどのミトコンドリア特異的染色によってこれをさらに確認する。ヒト線維芽細胞は、初め年齢の異なる2種類の成人の

ものを使用する。

②誘導性褐色脂肪細胞のキャラクタリゼーション

上記の条件検討によって最適化し誘導された褐色脂肪細胞について、その遺伝子発現がどの程度、褐色脂肪細胞の特徴を有するのか明らかとするため、ヒト線維芽細胞およびヒト間葉系幹細胞細胞から分化させた白色脂肪細胞の遺伝子発現とそれぞれ比較する。これには、いくつかの褐色脂肪細胞に特異的に発現する遺伝子 (*Ucp1*, *Prdm16*, *Pgc1α*, *Cebpa*, *Cidea*, *Elovl3* など) および脂肪細胞の分化マーカー (*Adiponectin* や *Adipsin*) の発現をリアルタイム PCR およびウエスタンブロッティング・免疫染色により確認した後、DNA マイクロアレイ解析あるいは RNA-Seq 解析によってさらに詳しく調べる。

褐色脂肪細胞は、ミトコンドリア内で脂肪を分解して熱に換える (Thermogenesis) ため、ノルアドレナリン刺激による細胞中の cAMP 上昇に応答し、UCP1 をはじめとする種々の熱産生遺伝子 (Thermogenic genes) を発現することが知られている。そのため、アドレナリン受容体作動薬 Isoproterenol、あるいは cAMP の誘導剤である Forskolin を細胞に処置することで、これらの発現の上昇をリアルタイム PCR およびウエスタンブロッティング・免疫染色によって確認する。またこの時、細胞外フラックスアナライザーを用いて、ミトコンドリアによる酸素消費量 (OCR: Oxygen Consumption Rate) の増加を測定する。これらの実験では、化合物を加えていない培地によって並行して培養した線維芽細胞をコントロールとして行う。

③免疫不全ヌードマウスに移植した誘導性褐色脂肪細胞の機能解析

上記の実験で機能性の確認されたヒト誘導性褐色脂肪細胞 (約 1×10^6 個) を、免疫反応を抑制するため免疫不全 (胸腺欠損) ヌードマウス (7-10 週齢程度) あるいは重症免疫不全マウス (SCID マウス) の背部あるいは大腿部に皮下注射する。コントロールとして化合物を加えずに培養した線維芽細胞を注射したマウスを用いる。2~3 週間後、生着した褐色脂肪細胞による糖代謝の違いをグルコース耐性テストやインスリン耐性テストによって解析する。また、高脂肪食を与えたこれらのマウスに対し、体重の変化を測定し、肥満への耐性増加を検証する。

④間葉系幹細胞の同定および増殖の試み

最後に、化合物による褐色脂肪細胞の誘導メカニズムについて明らかとするため、生じている可能性がある間葉系幹細胞

(Mesenchymal stem cells) について、この細胞に特異的な膜タンパク質の一つ CD105 抗体を用いて染色する。染色が確認された場合、さらにこれが本当に間葉系幹細胞かどうか、他のマーカータンパク質を使ってさらに検証する。その後、この間葉系幹細胞を他の細胞種と分離するため、抗 CD105 抗体を用いて MACS (Magnetic-activated cell sorting) を行い、さらに専用の培地を用いて培養・増殖が可能か検討する。

4. 研究成果

初年度では当初の計画に基づき、基本となる 7 種類の化合物 (SB-431542, CHIR99021, PD0325901, LDN-193189, Pifithrin- α , Forskolin, Rosiglitazone) を組み合わせ、ダイレクトリプログラミングの最適化を行った。その結果、Pifithrin- α の代わりに Dorsomorphin を使用した組み合わせが、より効率よく褐色脂肪細胞を誘導することが判明した。また Wnt シグナル経路の活性化剤である CHIR99021 を除くことで、リプログラミングの効率が大きく促進することが判明した。これらの細胞の遺伝子発現をリアルタイム PCR によって解析したところ、脂肪を蓄えるために必要な遺伝子群だけでなく、同時に褐色脂肪細胞のマーカー遺伝子である *Ucp1* の発現が大きく誘導されていた (図 2)。次に、免疫染色によって UCP1 の発現と局在について解析したところ、誘導された脂肪様の細胞に強い染色が確認された (図 3)。また市販の MitoTracker を用いてミトコンドリアを染色したところ、これらの細胞では褐色脂肪細胞の特徴である多量のミトコンドリアが局在していることが判明した。低分子化合物の組み合わせを 3 週間インキュベーションした後、

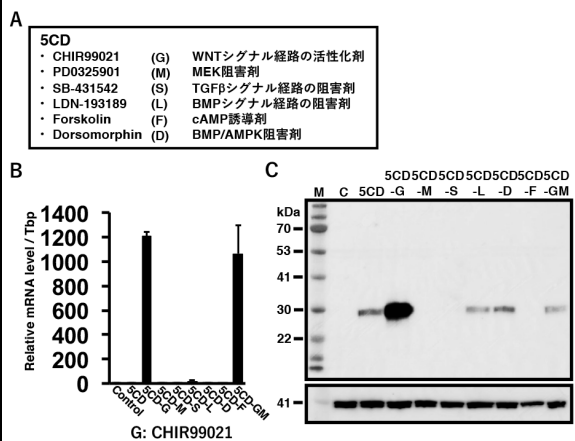


図 2. 低分子化合物によるヒト皮膚線維芽細胞から *Ucp1* 発現細胞への誘導

A. 低分子化合物 5CD の組み合わせ

B. 各化合物の組み合わせによる *Ucp1* mRNA の発現

C. ウエスタンブロッティングによる UCP1 タンパク質の検出 (下パネル: β -actin)

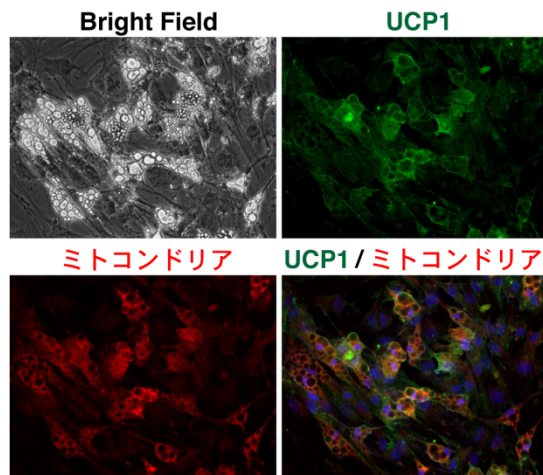


図3. 低分子化合物誘導性褐色脂肪細胞 ciBA の免疫染色

化合物を除いた脂肪細胞用の培地で1週間培養すると、細胞内に脂肪がさらに蓄積するとともに UCP1 の発現レベルの上昇が見られることからことから、褐色脂肪細胞の成熟化が確認された。そして1ヶ月以上化合物を除いて培養しても、線維芽細胞に戻ることなくその脂肪細胞様の形態と UCP1 の発現が維持されることより、ダイレクトリプログラミングによって誘導された褐色脂肪細胞が安定してその状態を維持していると考えられた。

次年度では、当初の計画に基づき ciBA の機能的な解析を行った。ciBA では、ミトコンドリアによる酸素消費量が有意に増加しており、また Proton Leak に相当する酸素消費量も増加していることから、これがミトコンドリアの内膜に局在する UCP1 によるものであることが示唆された(図4)。ciBA が、ノルアドレナリン刺激に応答し Ucp1 などの熱産生遺伝子の発現が誘導されるか調べるため、アドレナリン受容体作動薬 Isoproterenol あるいは cAMP の誘導剤である Forskolin を投与し Ucp1 の発現量を調べた。その結果、低濃度でも投与しても3時間で Ucp1 の発現活性化が見られたことから、ciBA には生体内の褐色脂肪細胞と同様な熱産生経路が備わっていることが示唆された(図5)。また、各低分子化合物が制御するシグナル伝達経路の下流に位置する転写

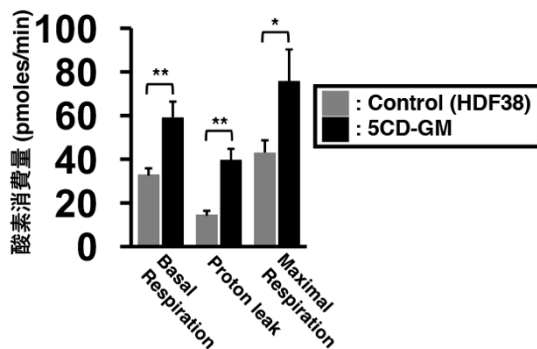


図4. 低分子化合物誘導性褐色脂肪細胞 ciBA における酸素消費量の増加

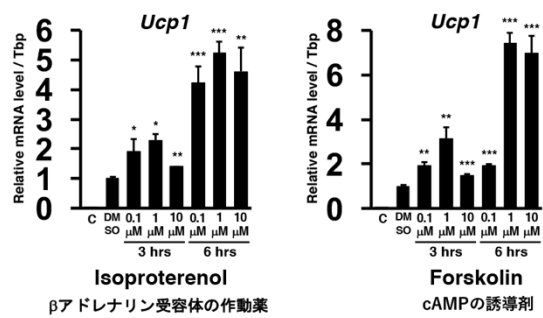


図5. 低分子化合物誘導性褐色脂肪細胞 ciBA におけるβアドレナリン受容体作動薬による熱産生遺伝子の活性化

因子および標的遺伝子に注目し、この直接誘導メカニズムについても考察を行った。本研究のような、遺伝子の導入の必要ない褐色脂肪細胞へのダイレクトリプログラミングは、安全性がより高いことが想定され、今後ヒトへの臨床応用を考える上で大きなメリットとなる。また、褐色脂肪細胞が体内で作られる仕組みの解明や、創薬研究、オーダーメイド医療などに利用されることなどが期待される。これらの研究結果は、投稿論文として英科学誌に発表された(5. 主な発表論文〔雑誌論文〕1 参照)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Takeda Y., Harada Y., Yoshikawa T., and Dai P.
Direct conversion of human fibroblasts to brown adipocytes by small chemical compounds.
Sci. Rep. (査読有), 7, 4304 (2017)

2. 戴平, 武田行正
低分子化合物を用いた再生医療用細胞のダイレクトリプログラミング
京都府立医科大学雑誌 (査読有), 127 巻, 1-12 頁 (2018)

3. Takeda Y., Harada Y., Yoshikawa T., and Dai P.
Chemical compound-based direct reprogramming for future clinical applications.
Biosci. Rep. (査読有), 38, BSR20171650 (2018)

〔学会発表〕(計3件)

1. 戴平
ヒト皮膚細胞より低分子化合物のみで種々の再生医療用細胞を誘導
第16回日本再生医療学会総会、2017年3月7-9日、仙台国際センター(仙台市)

2. 武田行正, 原田義規, 戴平
低分子化合物を用いたダイレクトリプログラミングによるヒト線維芽細胞から褐色脂肪細胞への直接誘導

第40回日本分子生物学会年会・2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017年12月6-9日、神戸ポートアイランド (神戸市)

3. 武田行正、原田義規、戴平

シグナル伝達経路制御によるヒト線維芽細胞から褐色脂肪細胞へのダイレトリプログラミング

第17回日本再生医療学会総会、2018年3月21-23日、パシフィコ横浜 (横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戴平 (Dai Ping)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・

細胞再生医学・准教授

研究者番号：20291924

(2) 研究分担者

武田 行正 (Takeda Yukimasa)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・

細胞再生医学・助教

研究者番号：40735552