

令和元年6月24日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16395

研究課題名(和文)褐色脂肪と自律神経を繋げたOrgan-on-a-chipの開発

研究課題名(英文) Construction of an organ-on-a-chip connecting autonomic neurons to brown adipocytes

研究代表者

榑笥 博子(KUSHIGE, Hiroko)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・プロジェクト助教

研究者番号：90723065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では患者個々人の細胞を用い、生体メタボリズムを担う組織間ネットワークを生体外で再構成するOrgan(s)-on-a-chipの構築を目指している。そこで、私たちは褐色脂肪の直接分化やデバイス上での代謝測定に向けた網羅的解析を行った。さらに、家族性自律神経失調症の疾患iPS細胞株、疾患原因とされる点変異をゲノム編集技術により修復したiPS細胞株を樹立し、当研究室で確立した自律神経の分化誘導法を用いて誘導過程の変遷や神経制御を解析した。また、組織間ネットワーク解析のための基本デバイスを作製しており、代謝疾患発症メカニズムの解析や新規薬剤の有効性試験に向けたデバイス開発への発展が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のモデル動物を用いた生体内実験においては、複数組織にわたる神経シグナルやホルモン因子をリアルタイムに追跡することは困難であった。これに対して、生体外で患者個々人の組織間ネットワークを再構成することができれば、電気計測システムやバイオイメーキング手法、代謝アッセイなどの解析を適宜融合することで、その中心的な役割を果たす自律神経シグナルやホルモン因子などの動的なシグナルを複数組織においてリアルタイムかつ同時に計測することが可能となる。本研究では患者個々人の細胞を用いて自律神経を分化誘導し、複数の組織間ネットワークを解析するためのデバイス開発に向けた礎を築いた。

研究成果の概要(英文)：Microfluidic organ-on-a-chip (OOC) is an attractive in vitro platform designed to model the functional units of organs. Recently, we established a protocol for differentiation of autonomic neurons (ANs) from human iPS cells. Based on the technique, we aimed to construct OOCs for studying interactions between brown adipocytes and ANs generated from patients. In order to obtain valuable information for analyses on the chip, we performed genomics and metabolomics profiling in growing mouse brown adipose tissues. Furthermore, we established an iPS cell line derived from a patient with Familial dysautonomia (FD) and genome editing iPS cell lines which are repaired a point mutation of FD. By using these cell lines, we performed gene expression profiling during AN differentiation and investigated neuronal regulations of cardiac behaviors. In this study, we provided the basis of OOCs for understanding the pathogenic mechanisms of metabolic diseases and evaluating the efficacy of new drugs.

研究分野：幹細胞生物学、生体医工学

キーワード：Organ-on-a-chip 自律神経 褐色脂肪

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

内分泌・代謝の生理機能を担う脂肪は成人に最も多く存在する組織であるが、特に肥満下の白色脂肪はカロリー貯蔵庫となるため排除すべく嫌悪される。一方で、体内には大量のミトコンドリアを有し、熱産生を担う褐色脂肪が存在する。生体内でメタボリズム制御を担う褐色脂肪細胞からのホルモン分泌は、血中糖濃度などの液性因子のみならず自律神経支配によっても制御されていることが報告されており（Imai et al., *Science*, 2008; Zeng et al., *Cell*, 2015）、脂肪細胞の機能解析だけでは創薬を含めた医療応用は困難である。

近年、糖尿病・メタボリックシンドロームの治療法開発の手段としてヒト iPS 細胞から膵β細胞や褐色脂肪細胞を作製する分化誘導法の開発が進められつつあるとともに、初期化を介さない直接分化法が注目されている。エピゲノム情報が維持される直接分化法は、うつ病などの精神疾患や代謝疾患のような後天的疾患患者の細胞を真に再現できる利点があるとして期待されている。このように、再生医療研究は移植細胞の作製のみならず、個々人の遺伝的背景を反映した幹細胞を使用することで病態を細胞レベルから再現して詳細な発症メカニズムを解析することや病態細胞を用いて新規の薬剤スクリーニングを行うことなど、多方面に及ぶ医療応用が期待されている。

こうした背景に基づき、私たちはこれまでに直接分化法の検討を重ね、血管内皮前駆細胞の誘導に成功した。興味深いことに、発生系譜解析から褐色脂肪細胞の由来が血管内皮前駆細胞であることが報告され（Harms et al., *Nat Med*, 2013）、私たちは褐色脂肪前駆細胞の誘導に着目してきた。また、私たちの研究室では既に自律神経の分化誘導法を開発（特願 2015-112237）していることから、当研究室には分化誘導の知識や技術が蓄積されている。

2. 研究の目的

上述の背景より、本研究では患者個々人の細胞から褐色脂肪や自律神経を分化誘導し、生体内メタボリズム制御を担う組織間ネットワークを生体外で再現した Organ(s)-on-a-chip の構築を目指す。本研究は生体工学の融合的な研究に挑戦するものであり、生体外において組織間ネットワークを再構成することができれば、電気計測システムやバイオイメーキング手法を適宜融合することで、その中心的な役割を果たす自律神経シグナルやホルモン因子、細胞群の応答などの「動的シグナル」をリアルタイムかつ同時に計測することが可能となる。その先には糖尿病などの代謝疾患の発症メカニズムを解析するための実験ツール、新規薬剤・化合物の有効性試験のためのスクリーニングデバイスなど、基礎・応用研究の両面への発展が期待できる。

3. 研究の方法

（1）成長過程におけるマウス褐色脂肪の遺伝子発現および代謝の解析

本研究では患者個々人の組織間ネットワークを再構築した Organ(s)-on-a-chip の開発を目指していることから、ヒト線維芽細胞より褐色脂肪細胞を分化誘導する直接分化法に着目した。また、将来的には代謝疾患患者の細胞から褐色脂肪細胞を分化誘導し、デバイス上で代謝測定を行うことを想定している。そこで、まずは分化誘導や代謝測定の指標となるマーカー因子探索のため、胎児期から成体期までのマウス褐色脂肪を採取し、マイクロアレイ解析およびメタボローム解析を行った。さらに、代謝疾患の解析に向けて2型糖尿病モデル TSOD マウスを用いたメタボローム解析も行った。これらの解析により、褐色脂肪細胞の分化誘導やデバイス上での代謝測定に有益な基礎的データを蓄積した。

(2) 脂肪-神経の接続実験と新規デバイスの構築

デバイス上での組織間ネットワークの構築を検討するため、マウス白色/褐色脂肪細胞を採取し、市販のデバイス (AXIS Axon Isolation Device, AX500) 上で iPS 細胞から分化誘導した自律神経と接続させた。次に、複数組織の相互作用を解析することができるデバイスの構築を目指し、微細加工技術を用いて新規デザインのデバイスを作製した。デバイスの構成は、高さ $5\mu\text{m}$ の微小トンネル構造 (微小流路部) で結合した複数の培養部を有する培養チャンバーであり、生体適合性のあるシリコンゴム素材 PDMS を用いて作製した。高さ $5\mu\text{m}$ のトンネルを設けることで、神経細胞から伸展する軸索は通過できるが細胞体は通過できない構造となっており、標的細胞の神経制御を解析することができる。

(3) 疾患 iPS 細胞株、点変異修復株の樹立および心機能制御の解析

米国ソーク研究所 Juan Carlos Izpisua Belmonte 研究室との共同研究で、家族性自律神経失調症 (Familial dysautonomia, FD) 患者由来の線維芽細胞を初期化した iPS 細胞株 (FD-iPS 細胞株) の樹立を試みた。さらにゲノム編集技術により疾患原因とされる点変異を修復した FDGE-iPS 細胞株を作製するための検討を重ねた。これらの細胞株を用いた自律神経の分化誘導条件を検討し、qPCR や RNA-seq 解析による分化誘導過程の遺伝子発現解析を行った。当初の計画では、これらの細胞株から誘導した自律神経による褐色脂肪の制御を解析する予定であったが、まずは測定系が確立している心筋細胞を用いて神経制御を評価した。解析には iPS 細胞由来の心筋細胞株 (iCell 心筋細胞, Cellular Dynamics International) を用い、心筋接続した自律神経をニコチン添加により刺激した際の心筋の細胞外電位の変化を多点電極アレイ (multi-electrode array, MEA) により測定した。

4. 研究成果

(1) 成長過程におけるマウス褐色脂肪の遺伝子発現および代謝の解析

成長過程におけるマウス褐色脂肪の網羅的な遺伝子発現解析およびメタボローム解析を行ったところ、どちらも胎児期 (胎生 18.5 日目)、幼児期 (生後 4、10 日目)、離乳後の成体期 (生後 4、8 週目) の 3 つのクラスターに大別された (図 1)。マイクロアレイ解析の結果より、肩甲骨間に生涯にわたって褐色脂肪組織をもつマウスでは、活発に増殖を行うのは生後 2 週間であることが示唆され、前駆細胞の時期に強く発現する遺伝子群が明らかとなった。また、メタボローム解析の主成分分析より、上述の 3 つのクラスター (代謝変換) を特徴付ける PC1 の主成分はエネルギー代謝産物 (AMP、GMP)、グルタミン酸やアセチル CoA から合成される代謝産物 (N-Acetylglutamic acid)、交感神経伝達物質

(Noradrenaline) などが上位であることがわかった。また、PC2 の主成分は脂肪酸の代謝産物 (3-Hydroxybutyric acid)、脂肪酸 (Decanoic acid)、尿素回路、アミノ基や複数のアミノ酸の代謝産物 (Guanidoacetic acid)、グリセロリン脂質の代謝にかかる物質 (Diethanolamine) が上位であった。神経伝達物質であるノルアドレナリンやセロトニンが成体期に多く検出されており、自律神経により活発に熱産生制御が行われていると考えられた。現在、成長過程における 2 型糖尿病モデル TSOD

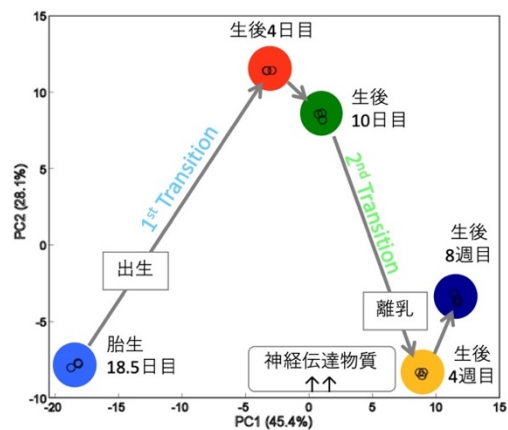


図1 主成分分析 (メタボローム解析)

マウスの褐色脂肪を用いたメタボローム解析を進めている段階である。今後は、遺伝子発現解析の結果を基に直接分化の検討を続けるとともに、デバイス上での細胞活性の評価にメタボローム解析のデータを応用していきたいと考えている。

(2) 脂肪-神経の接続実験と新規デバイスの構築

マウス白色/褐色脂肪細胞を採取し、市販のデバイス上で iPS 細胞から分化誘導した自律神経と共培養した。自律神経がデバイスのトンネル部分に軸索を伸張し、脂肪細胞と接続することを確認した(図2)。そこで、複数組織のネットワークを解析するためのデバイスを設計し、PDMSを用いて高さ $5\mu\text{m}$ の微小トンネル構造(微小流路部)で結合した複数の培養部を有する培養チャンバーを作製した(図3, 新規に設計したデバイス作製のためのガラスマスク)。この新規デバイスにより、交感神経および副交感神経制御を受ける標的細胞(図3左)や自律神経制御を受ける複数種の標的細胞(図3右)の細胞活性変動を解析できると考えている。今後は、測定系を搭載したデバイスを作製し、組織間の相互作用を解析していく予定である。

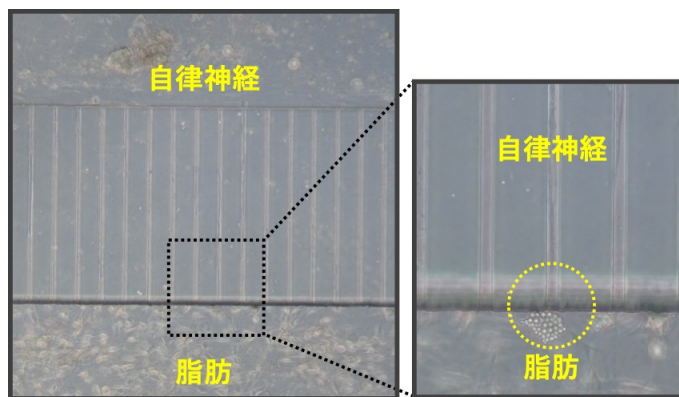


図2 デバイス内での脂肪と自律神経の接続実験

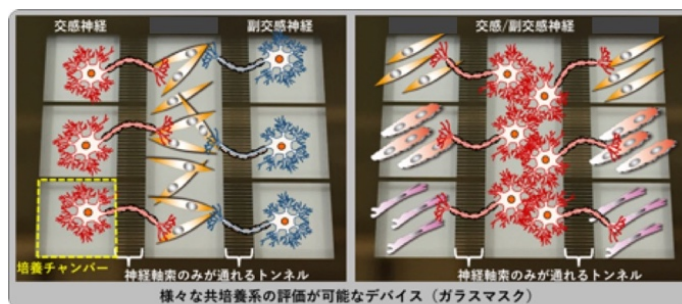


図3 新規設計デバイス

(3) 疾患 iPS 細胞株、点変異修復株の樹立および心機能制御の解析

FD 患者由来の線維芽細胞の初期化を行い、iPS 細胞株 (FD-iPS 細胞株) を樹立することができた。さらに、FD の疾患原因とされる点変異を修復するため、ゲノム編集技術を用いて点変異修復株 (FDGE-iPS 細胞株) を樹立した。次に、当研究室で確立した分化誘導法に基づき、これらの細胞株から胚様体 (Embryoid body, EB) 形成を経て自律神経の分化誘導を試みた(図4 上段)。その結果、FD-iPS 細胞株から分化誘導した自律神経前駆細胞は接着性が弱く、分化効率が低かった。一方、FDGE-iPS 細胞株ではこれらの回復がみられた。そこで、分化誘導過程の細胞集団を qPCR や RNA-seq 解析し、健常者由来の iPS、FD-iPS、FDGE-iPS 細胞株の比較解析を行ったところ、FD-iPS 細胞株は誘導過程の遺伝子発現パターンに顕著な差異がみられた。

さらに、これらの自律神経と心筋細胞を MEA チャンバー内で共培養し (図 4 下段)、ニコチン添加による神経刺激を行った際の心筋の細胞外電位の変化を解析したところ、心機能制御にも差異がみられたため、詳細な解析を進めている。

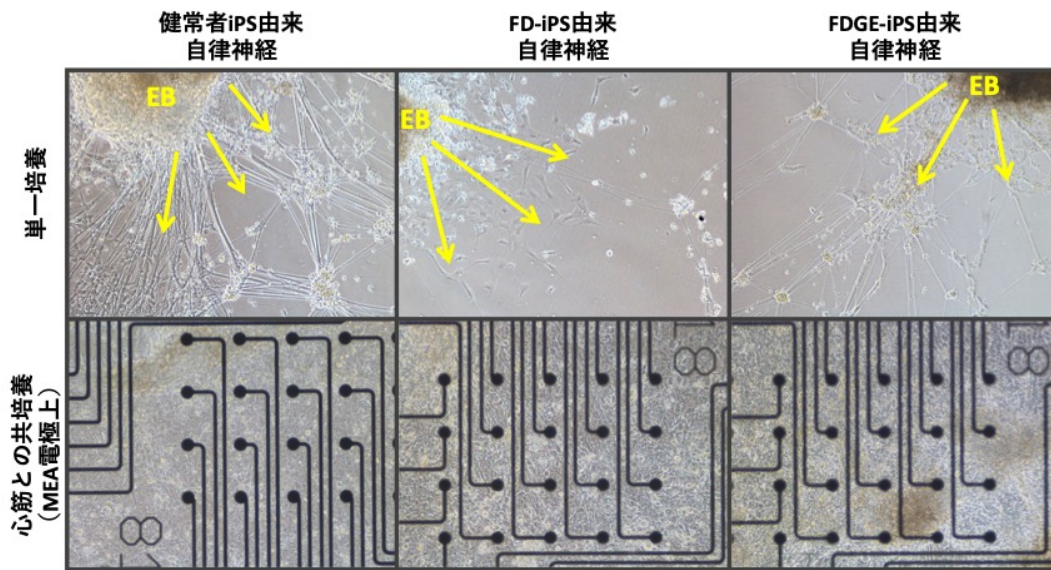


図4 疾患iPS、点変異修復iPS細胞株からの自律神経分化と心機能制御の解析

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ①高山雄三, 榎筒博子, 木田泰之,
自律神経系の再構築に迫る, 自律神経, 査読あり, 55, 2018, 192-195

[学会発表] (計1件)

- ①榎筒博子, 木田泰之,
マウス褐色脂肪の成長過程における代謝変換, 第4回発生における代謝を考える会, 2017

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

- 取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：高山 祐三

ローマ字氏名：(TAKAYAMA, Yuzo)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。