

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12627

研究課題名（和文）アスコルビン酸によるケミカルダイレクトリプログラミング促進機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of promotion mechanism of chemical direct reprogramming by ascorbic acid

研究代表者

倉橋 敏裕（Kurahashi, Toshihiro）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：00596570

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アスコルビン酸（AsA）がマウス胎仔線維芽細胞の脂肪分化を促進することを見出した。これまでに、脂肪前駆細胞（3T3-L1など）の脂肪分化がAsAにより促進される報告があるが、マウス胎仔線維芽細胞の場合は異なるメカニズムで促進されている可能性が示唆された。

解析の結果、マウス胎仔線維芽細胞の場合では、より誘導初期でのAsAの作用が重要であり、その作用により脂肪分化誘導のマスター因子であるC/EBPとPPARの遺伝子発現が亢進していることを見出した。さらに、AsAはC/EBPとPPARの遺伝子発現を制御している因子のタンパク質レベルでの増加に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

古くから知られる栄養素の一つであるアスコルビン酸（AsA）は近年、iPS細胞作製時のリプログラミングを促進することや、DNAの脱メチル化を促進するなどの新たな機能が発見されている。一方で、AsAの生理作用は多岐にわたるために、一つの生物学的現象に対しても相反する報告がなされるなど、不明な点が多く残されている。本研究結果により、これまでにAsAとは関連付けられてこなかった因子のタンパク質レベルがAsAによって制御されていることが示唆されたことは学術的意義があると考えられる。今後より詳細な解析が必要であるとともに、異なる実験系やin vivoでの再現性を確認する必要がある。

研究成果の概要（英文）： We found that ascorbic acid (AsA) promotes adipogenesis of mouse embryonic fibroblasts (MEF). Although it has already been reported that AsA promotes adipogenesis of preadipocytes (3T3-L1), this study suggests that a different mechanism in MEF may promote adipogenesis. AsA appears to be more critical in the early stage of adipogenesis in MEF. Its action enhances gene expression of C/EBP and PPAR, which are master factors for adipogenesis. Furthermore, our data suggest that AsA contributes to the enhancement at the protein level of factors regulating C/EBP and PPAR gene expression.

研究分野：細胞再生医学

キーワード：細胞再生学 アスコルビン酸 ダイレクトリプログラミング 脂肪分化

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷などの、これまでには抜本的な治療法がなかった疾患に対して、治療や創薬等の面から再生医療の発展が期待されている。再生医療のリソースとして ES/iPS 細胞や組織幹細胞の利用が注目されているが、それぞれに問題点があるため、適材適所、多種多様なアプローチ・研究が必要と考えられる。

幹細胞を再生医療に応用する際の問題点を克服するために、近年ダイレクトリプログラミング法が注目されている。これは、ES/iPS 細胞のような未分化細胞を経由せずに、ある種の分化細胞を「直接」他の細胞種に変える方法である。しかし、この方法も外部から遺伝子を導入する場合、ゲノムへの予期せぬ傷害が懸念される。こうした幹細胞や既存のダイレクトリプログラミング法の問題を解決する目的で、所属研究室では、遺伝子導入を用いずに低分子化合物のみを用いて(ケミカルダイレクトリプログラミング法)、ヒト線維芽細胞から神経様細胞を直接分化誘導することに世界に先駆けて成功し報告した[Dai et al., J Clin Biochem Nutr, 2015]。また、同様の報告が異なる研究室からも相次いだ[Li et al., Cell Stem Cell, 2015. Hu et al., Cell Stem Cell, 2015]。

その後、所属研究室[Takeda et al., Sci Rep, 2017, 褐色脂肪細胞]や他の研究室[Cao et al., Science, 2016, 心筋細胞]から、神経細胞以外の細胞種へのケミカルダイレクトリプログラミング法の報告がなされ、その発展が期待されている。一方で、他の幹細胞研究に比べて、現時点では分化誘導可能な細胞種が限定的である。今後このケミカルダイレクトリプログラミング法をより発展させるためには、より安全・高効率な新規誘導法の開発と並行して、ケミカルダイレクトリプログラミングの根本原理、つまり、個々の化合物を細胞に投与した際に細胞内で何が起きて、どのようにリプログラミングがなされているのか?といった根本的な問題を明らかにする必要があると考えた。このことは、移植等の治療応用のみならず、創薬や個別化医療等にリプログラミングした細胞を利用する際、データ解釈や診断、副作用への対応等をするうえでも極めて重要であると考えた。

2. 研究の目的

そこで、本申請研究では「ケミカルダイレクトリプログラミングの分子機構の理解」のために有益な知見を得ることを目的とした。具体的には、アスコルビン酸(AsA)によるケミカルダイレクトリプログラミング促進機構の解明を試みた。

より普遍的で再現性のある解析結果を得るためには、シンプルかつ、これまでによく解析されている実験系を用いることが重要と考えた。そこで、古くから脂肪分化研究に用いられている実験系である MDI 法による脂肪分化誘導系に着目した。通常この実験系では、脂肪分化機構を研究する目的で脂肪前駆細胞(3T3-L1 細胞株など)を脂肪分化させる。一方で、ある因子の脂肪分化への関与が示唆された場合などは、その因子の遺伝子改変マウスから採取したマウス胎仔線維芽細胞(MEF)を同様の MDI 法で脂肪分化させ、その因子の脂肪分化における役割を示す方法がとられる。しかし、脂肪前駆細胞として樹立された 3T3-L1 細胞の分化効率(75%以上)に比べて MEF の分化効率は 5%以下と著しく低い(マウスの種や細胞の分離法による違いがあるとは思われる)。我々はこの「MEF の分化効率の低さ」に着目した。MEF の分化効率の低さは脂肪前駆細胞の場合と異なる脂肪細胞へのコミットメントが必要なためであり、そのステップを促進する物質を同定し、その作用機構を解明できれば、ケミカルダイレクトリプログラミングの分子機構の理解に有益な知見が得られると考えた。

そのような考えのもと、既存の培地添加物を数種類検討したところ、AsA が MEF の脂肪分化を促進することを見出した。そこで、その脂肪分化促進の作用機構解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) MDI 法による脂肪分化誘導系

脂肪分化誘導系として広く使われている。MDI 法 (IBMX、Dexamethasone、Insulin) を用いて MEF を脂肪分化させた。脂肪前駆細胞を分化させる場合に比べ MEF の場合は著しく分化効率が悪いことが知られている。本研究では再現性の観点から市販のフィーダー用 MEF を実験に用いた。

(2) AsA を投与するタイミングの検討

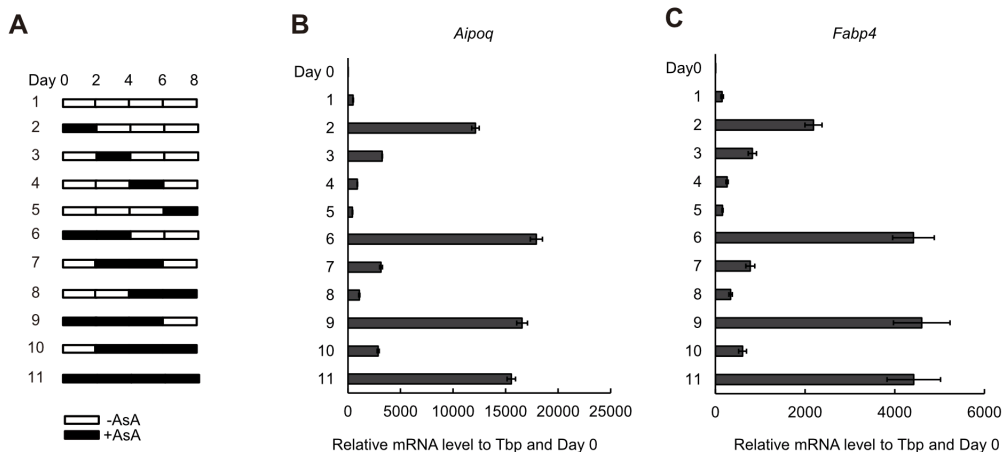
通常、MDI 法では誘導開始後 1 日おきに培地交換を行い、8~14 日で脂肪細胞が観察される。そこで、期間を【図1,A】のようにくぎって AsA を培地に含有させた場合の脂肪細胞への分化程度を脂肪分化マーカーである ADIPOQ と FABP4 の遺伝子発現を指標に評価した。

(3) 脂肪分化に重要な因子の遺伝子発現解析

上記解析により、脂肪分化誘導後2日間に AsA が作用することが重要であることが示唆されたので、誘導初期の2日間(48 時間)に絞って、脂肪分化のマスター因子である C/EBP β 、C/EBP δ 、C/EBP α 、PPAR γ の遺伝子発現を Real-time qPCR により測定した。

(4) 脂肪分化に重要なシグナル伝達因子、転写因子の解析

MDI 法に AsA を加えることにより活性化しているシグナル伝達経路を明らかにするために、C/EBP α や PPAR γ の遺伝子発現制御に関与していることが知られているシグナル伝達因子、転写因子の活性化状態を、各因子のリン酸化特異的抗体をも用いたウェスタンブロットングにより調べた。



【図1】(A)AsA を培地に加えるタイミングの模式図。Real-time qPCR による *Adipoq* 遺伝子の発現(B)と *Fabp4* 遺伝子の発現(C)解析結果。

4. 研究成果

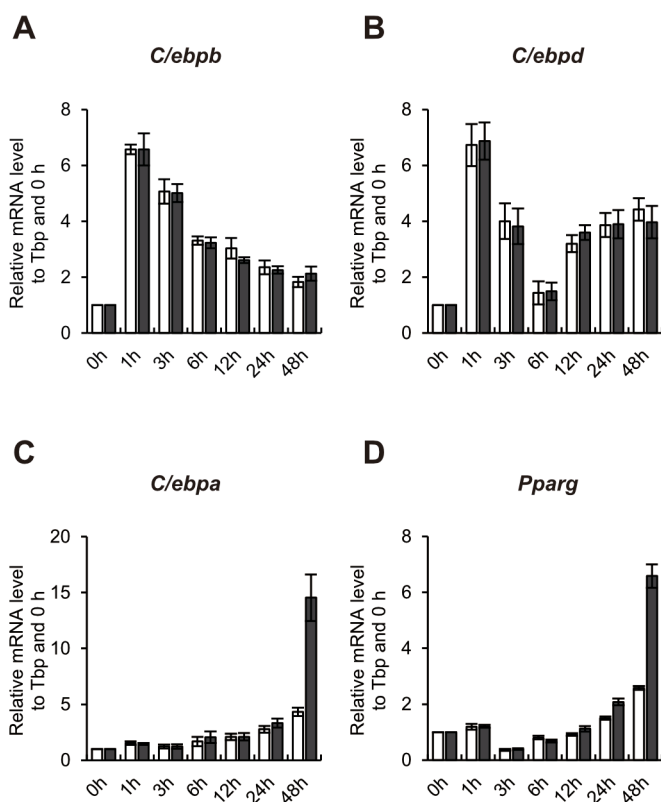
(1) マウス胎仔線維芽細胞の脂肪分化系においては、AsA は分化誘導初期に作用させることが重要である。

これまですでに、脂肪前駆細胞(3T3-L1 細胞など)における脂肪分化誘導系においては、AsA を添加することにより分化効率が上昇することが報告されている。その系における脂肪分化亢進のメカニズムは、AsA の添加によりコラーゲンの産生が上昇し、それにより誘導後 3 日

目以降の ERK シグナル伝達の減衰がおこり、その結果、脂肪分化特異的な因子の発現が上昇するということが説明されている。しかし、MEF を用いた本実験系では ERK シグナル伝達の減衰は見られなかった。そこで、本研究ではまず、MEF の脂肪分化誘導系では分化誘導のどの時点で AsA が存在することがより重要であるかを確かめた。指標としては脂肪分化マーカーである *Adipoq* と *Fabp4* の遺伝子発現を用いた。その結果、先行研究では解析されていない、誘導初期の 2 日間に AsA が培地中に存在することが脂肪分化誘導に最も重要であることが明らかになった【図1】。このことから、MEF では、脂肪前駆細胞における脂肪分化とは異なる分化段階における AsA の作用がより重要であることが示唆された。

(2) AsA を投与することにより脂肪分化のマスター因子である C/EBP α と PPAR γ の遺伝子発現上昇がみられた。

誘導初期の 2 日間 (48 時間) に絞って、脂肪分化のマスター因子である C/EBP β 、C/EBP δ 、C/EBP α 、PPAR γ の遺伝子発現を Real-time qPCR により解析した結果、C/EBP β と C/EBP δ の遺伝子発現は AsA の影響をうけなかったが、C/EBP α と PPAR γ の遺伝子発現が誘導開始後 48 時間で劇的に上昇した【図2】。



【図2】Real-time qPCR による脂肪分化マスター因子の遺伝子発現変化

(3) AsA を投与することにより C/EBP α や PPAR γ の遺伝子発現制御に関与する因子のタンパク質レベルの亢進がみられた。

C/EBP α や PPAR γ の遺伝子発現を制御していることが知られるシグナル伝達因子と関連した転写因子に関して解析した結果、AsA の投与によりタンパク質レベルが上昇する因子を見出した。現在、その転写因子と AsA の関係を解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 倉橋敏裕
2. 発表標題 アスコルビン酸による脂肪分化促進メカニズムの解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------