

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 20 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790884

研究課題名（和文）骨格筋由来成体幹細胞からの褐色脂肪細胞創出による肥満の予防法開発

研究課題名（英文）Induction of brown adipogenesis of muscle-derived stem cells

研究代表者

上住 聡芳 (UEZUMI AKIYOSHI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：60434594

研究成果の概要（和文）：成人において抗肥満効果を持つ褐色脂肪細胞の創出を狙った基礎研究を行った。成体骨格筋に由来する間葉系幹細胞が高い褐色脂肪分化能を持つことを示し、新生褐色脂肪細胞の供給源として有力であることを明らかにした。また、この間葉系幹細胞がヒト成人においてほとんど消失してしまう褐色脂肪組織とは異なる発生学的起源を持つこと、そして、実際ヒト成人骨格筋にも存在していることを突き止めた。さらに、間葉系幹細胞の分化効率を向上させるための遺伝子導入系を確立した。

研究成果の概要（英文）：Generation of new brown adipocytes in adult provides a new therapeutic strategy against obesity. We identified mesenchymal stem cells in adult skeletal muscle and showed that these cells possess high brown adipogenic differentiation potential. Muscle-derived mesenchymal stem cells have an independent developmental origin from a classic brown adipose tissue. We also identified these mesenchymal stem cells in adult human skeletal muscle. Finally, we established efficient gene transduction system that enables highly regulated gene expression in mesenchymal stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：褐色脂肪細胞、骨格筋、間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

肥満はインスリン抵抗性、糖尿病、高脂血症、高血圧を引き起こし、ひいては動脈硬化症のリスクを高めることから、メタボリックシンドローム病態において最上流に位置する構成要因と考えられており、公衆衛生上極めて重大な問題となっている。哺乳類には白色脂肪細胞以外に褐色脂肪細胞が存在する。

エネルギーの貯蔵を主たる生理的役割とする白色脂肪細胞とは対照的に、褐色脂肪細胞は脂肪酸を酸化分解して熱を産生することでエネルギーの消費・散逸を行う。褐色脂肪のエネルギー消費機能から抗肥満作用が期待され、実際多くの動物モデルにおいてその効果が示されている。褐色脂肪細胞はヒト成人にも存在するが極めて微量であるため、抗

肥満効果を期待するには、褐色脂肪組織の増量が望まれる。

褐色脂肪細胞の分化を制御する因子がしだいに明らかになってきている。中でも特に重要なのは、褐色脂肪細胞のマスター調節因子である PRDM16 である。PRDM16 以外に褐色脂肪細胞形成に重要な正の転写制御因子として PGC-1 $\alpha$ , Foxc2, PPAR $\gamma$ 、負の転写制御因子として pRB, p107, RIP140 等がある。

近年、複数の転写制御因子の導入によりエピジェネティックな情報が書き換えられ、細胞の運命がリプログラミングされることが明らかにされた。このリプログラミング効率は遺伝子を導入する細胞の状態に依存し、より未分化で細胞系譜上近縁な細胞程、効率が良い。

褐色脂肪組織の発生に関して進展があり、褐色脂肪は骨格筋と共通の前駆細胞から発生することが明らかとなってきた。研究代表者はこれまで骨格筋に内在する幹細胞の研究に従事してきた。骨格筋には骨格筋系譜幹細胞である筋衛星細胞が存在するが、研究代表者は筋衛星細胞とは異なり高い脂肪分化能を持った間葉系幹細胞が骨格筋組織に存在することを明らかにしている。細胞系譜上近縁な筋衛星細胞と未分化な骨格筋由来間葉系幹細胞は、新生褐色脂肪細胞の創出を行う上で有力な細胞供給源と考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 2 種類の骨格筋由来成体幹細胞、筋衛星細胞と間葉系幹細胞に関して、褐色脂肪分化能を精査し、どちらの幹細胞が褐色脂肪細胞の供給源として有力か決定する。

(2) 遺伝子改変マウスを用いてこれら 2 種類の幹細胞の細胞系譜追跡実験を行い、発生的起源の関係性を明らかにする。

(3) 褐色脂肪関連遺伝子導入による新生褐色脂肪細胞誘導効率向上に取り組む。

## 3. 研究の方法

(1) 骨格筋から 2 種類の成体幹細胞、筋衛星細胞と間葉系幹細胞をフローサイトメーターにより分取し、培養する。筋衛星細胞のマーカには SM/C-2.6 を、間葉系幹細胞のマーカには PDGFR $\alpha$  を使用する。脂肪分化誘導を行い、UCP-1 や PRDM16 といった褐色脂肪関連遺伝子の発現を調べることでより褐色脂肪分化を精査する。

(2) Cre-loxP システムを応用した遺伝子改変マウスを用いて細胞系譜追跡実験を行う。骨格筋系譜細胞の追跡に myf5-Cre マウスを、神経堤由来細胞の追跡に P0-Cre マウスを用

いる。Cre が作用すると YFP が発現し細胞が標識される R26R-YFP レポーターマウスを利用する。上記マウスを交配し、myf5-Cre/R26R-YFP マウスおよび P0-Cre/R26R-YFP マウスを作製する。それぞれのマウスの骨格筋から細胞を単離し、フローサイトメーターによって YFP の発現を調べることで発生的起源を明らかにする。

(3) GFP を発現するレンチウイルスベクターを作製し、骨格筋由来幹細胞へ感染させ、骨格筋由来幹細胞への効率の良い遺伝子導入条件を決定する。褐色脂肪関連遺伝子のクローニングを行い、レンチウイルスベクターに組み込む。それを用いて褐色脂肪関連遺伝子を導入し、褐色脂肪細胞誘導効率が向上するか調べる。

## 4. 研究成果

(1) 骨格筋由来の 2 種類の成体幹細胞、筋衛星細胞と間葉系幹細胞に脂肪分化誘導を行った。その結果、筋衛星細胞に比べ間葉系幹細胞は非常に効率の良い脂肪分化能を示した (図 1. A)。褐色脂肪関連遺伝子の発現を調べたところ、間葉系幹細胞において分化に伴い発現が増強していることが確認され、間葉系幹細胞の高い褐色脂肪分化能が示された (図 1. B)。重要なことに、褐色脂肪特異的遺伝子である PRDM16 と UCP-1 は間葉系幹細胞においてのみ発現が誘導されていた (図 1. B)。これらの結果から、褐色脂肪細胞の供給源としては間葉系幹細胞が有力であると結論付けられた。

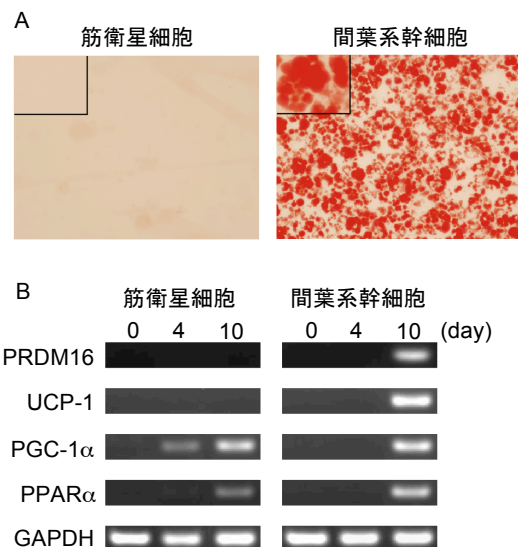


図1. 骨格筋由来幹細胞の褐色脂肪分化

(2) myf5-Cre マウスと R26R-YFP マウス、P0-Cre マウスと R26R-YFP マウスを交配し、

myf5-Cre/R26R-YFP マウスおよび P0-Cre/R26R-YFP マウスを作製した。それぞれのマウスの骨格筋から細胞を単離し、フローサイトメーターによって YFP の発現を調べた。その結果、myf5-Cre/R26R-YFP マウスにおいて骨格筋由来間葉系幹細胞は YFP で標識されることはなく、骨格筋系譜細胞とは発生学的に起源が異なることが明らかになった。一方、P0-Cre/R26R-YFP マウスにおいて骨格筋由来間葉系幹細胞は約 70% が YFP で標識されたことから、その大部分が発生学的に神経提に由来することが明らかになった (図 2)。

褐色脂肪組織は myf5-Cre マウスにより標識される細胞系譜から発生することが明らかになっているが、骨格筋由来間葉系幹細胞はそれとは異なり神経提に由来する。また、我々はヒト成人の骨格筋においても間葉系幹細胞の同定に成功している。褐色脂肪組織はヒト成人においてほとんど消失してしまうため、高い褐色脂肪分化能を持った間葉系幹細胞がそれとは異なる発生学的起源を持ち、実際ヒト成人骨格筋に存在していたことの臨床的意義は大きい。

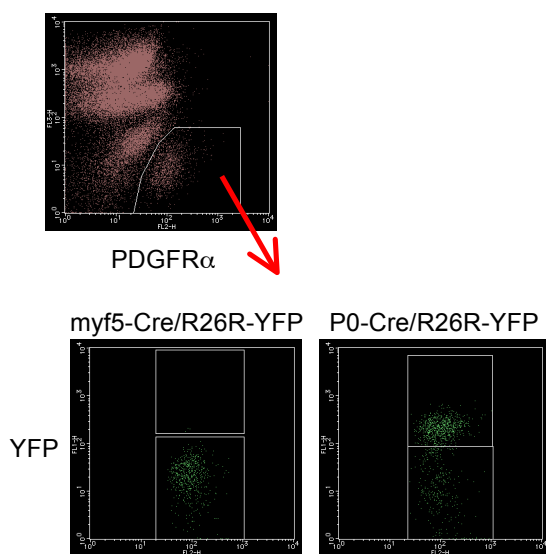


図2. 骨格筋由来幹細胞の細胞系譜追跡実験

(3) 間葉系幹細胞の褐色脂肪細胞への分化誘導効率を高めるために、褐色脂肪関連遺伝子の導入を試みた。まず、間葉系幹細胞へ遺伝子導入するためのレンチウイルスの実験系を立ち上げた。GFP を発現するレンチウイルスベクターを用いて、間葉系幹細胞への高効率な遺伝子導入条件を確立した。細胞の分化誘導効率を高めるためには導入遺伝子の発現をより厳密に制御することが望まれる。その目的で、Tet-on システムによる誘導型レ

ンチウイルスベクターを作製した。作製された誘導型レンチウイルスベクターは間葉系幹細胞への高い導入効率を示し、また、導入遺伝子の Dox による厳密な発現制御が可能であった (図 3)。さらに、PRDM16 をはじめとした褐色脂肪細胞形成を正に制御する転写因子をクローニングし、それを発現するレンチウイルスベクターを作製した。これらを利用し、褐色脂肪細胞への誘導効率向上を検討していく予定である。

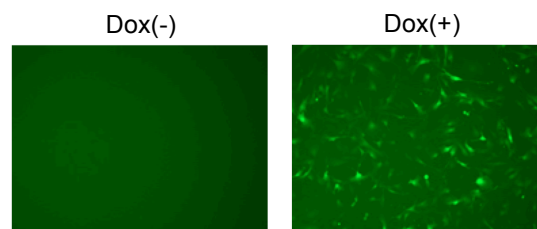


図3. レンチウイルスベクターによる骨格筋由来間葉系幹細胞への遺伝子導入

## 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 6 件)

- ① Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M, Yamaguchi M, Ogawa R, Milkov M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Tsuchida K, Yamamoto H, Fukada S., *Fibrosis and adipogenesis originate from common mesenchymal progenitor in skeletal muscle*. J. Cell Sci., 2011. 124(21): p. 3654-3664. (有)
- ② Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K., *Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle*. Nat. Cell Biol., 2010. 12(2): p. 143-152. (有)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Uezumi A., 「Roles for nonmyogenic mesenchymal progenitors in skeletal muscle regeneration.」 Keystone Symposia, 2012年3月14日, California, USA
- ② 上住 聡芳, 「Interaction between non-myogenic mesenchymal progenitors and muscle cells.」 第 34 回日本分子生物学会年会 ワークショップ, 2011年12月16日, 横浜
- ③ 上住 聡芳, 「骨格筋の脂肪化や線維化に寄与する間葉系前駆細胞の同定」 第 29 回日本骨代謝学会学術集会 シンポジウム, 2011年7月29日, 大阪

④上住 聡芳, 「骨格筋の脂肪変性のメカニズム」 第 11 回抗加齢医学会総会 シンポジウム, 2011 年 5 月 27 日, 京都

⑤ Uezumi A., 「Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle.」 Keystone Symposia, 2011 年 2 月 2 日, New Mexico, USA

⑥ Uezumi A., 「Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat formation in skeletal muscle.」 A joint meeting of Frontier in Myogenesis and Skeletal Muscle Stem and Satellite Cells, 2009 年 6 月 1 日, New York, USA

⑦ Uezumi A., 「Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat formation in skeletal muscle.」 第 7 回幹細胞シンポジウム, 2009 年 5 月 16 日, 東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/~nanbyou/nanbyou/Top.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上住 聡芳 (UEZUMI AKIYOSHI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号 : 60434594

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :