

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591318

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームに対する分子標的療法の開発

研究課題名(英文)Toward novel molecular targeting strategies for the metabolic syndrome

研究代表者

岸田 綱郎(Kishida, Tsunao)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00370205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪細胞は、げっ歯類等では脂肪酸を酸化分解したエネルギーを熱として散逸する細胞として知られるが、ヒトでは機能性で培養可能な褐色脂肪細胞がほとんどavailableでなかったため、未解明の点が多い。我々は、ヒトおよびマウスの褐色脂肪細胞を誘導する新しい技術を開発した。そこで本研究では、我々の技術で樹立した褐色脂肪細胞の遺伝子発現パターン、エピジェネティックマーク、代謝制御能とその制御、誘導の分子機構等の解析を行った。本研究の結果、メタボリック症候群等に対する新しい分子標的治療とそのための標的分子の探索につながる数々の知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：In rodents and other animals, brown adipocytes contribute to energy expenditure and heat production, but brown adipocytes of humans have not been characterized in detail, mainly because functional human brown adipocytes that can be propagated in culture have not been available for experimental use so far. We recently established novel procedures to induce human and murine brown adipocytes. In this study we examined gene expression profiles, epigenetic states, and metabolic activities of the brown adipocytes, while we also analyzed regulation of their activities and molecular mechanisms of their induction. The present findings have important implication to novel molecular targeting therapy against metabolic syndromes.

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：糖脂質代謝

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪細胞は、げっ歯類等では背部皮下等に局在し、ミトコンドリア内膜に局在するUCP1たんぱく質の機能を主として介することで、脂肪酸を酸化分解したエネルギーを熱として散逸する細胞である。3アドレナリン刺激により、褐色脂肪細胞はUCP1発現を増強し、また脂肪分解と熱産生能が増加する。UCP1ノックアウトマウスのフェノタイプ解析などから、肥満やII型糖尿病の病態にも重要な意義を有することが知られている。

一方ヒトにおいては、褐色脂肪細胞は新生児でのみ機能し、成人では機能的に存在しないと考えられてきたが、2009年になってその存在が証明された（Saito et al, Diabetes, 2009）。げっ歯類とは異なり、ヒト成人では褐色脂肪組織は鎖骨上部、大動脈周囲、腎周囲等に認められる。しかも老化に伴い、ヒト褐色脂肪細胞は数と機能が低下する。さらに肥満者やII型糖尿病患者では、褐色脂肪の機能が著しく低いか認められないことが知られるようになった。これらの知見から、褐色脂肪細胞を誘導し、あるいは活性化することができれば、また活性のある褐色脂肪細胞を試験管内で誘導し移植することができれば、メタボリック症候群やII型糖尿病等の糖・脂質・エネルギー代謝異常を是正する新しい治療手段を提供できる可能性がある。しかしながら、ヒトの褐色脂肪細胞は、機能性で培養可能な細胞が事実上availableでなかったため、このような研究はほとんど進んでいない。

我々は最近、ヒトおよびマウスの褐色脂肪細胞を誘導する新しい技術を開発した。すなわち、ヒトiPS細胞、あるいは体細胞に種々の遺伝子を導入することで、細胞のエピジェネティックステートのリプログラミングを起こし、機能的な褐色脂肪細胞に誘導できることを見出した。そこで本研究では、この技術で得られた褐色脂肪細胞の性状と機能、機能の制御メカニズム、誘導の分子機構等の解析を行うことで、メタボリック症候群等に対する分子標的治療のための標的分子の探索等に繋げることを目的とした。

本研究の成果は、未解明な点が多いヒト褐色脂肪細胞の分化機構、生理機能、病態における役割等の解明等に極めて有用であるのみならず、メタボリック症候群やII型糖尿病に対する制御技術の確立、新しい分子標的治療のための標的分子の発見、それらにもとづく分子標的療法や再生医療の創生に結びつくものと期待できる。

2. 研究の目的

我々が最近開発した、褐色脂肪細胞を誘導する技術を基盤として、褐色脂肪細胞の性状と機能、機能制御のメカニズム、誘導の分子機構等の解析を行い、メタボリック症候群等に対する分子標的治療のための標的分子の探索に資すること。

3. 研究の方法

- (1) 細胞と遺伝子導入。ヒト由来正常細胞を用いた。種々の転写因子等の遺伝子をくみこんだ様々なウイルス性および非ウイルス性ベクターを構築した。これらを上記の細胞に導入後、種々の条件で培養した。
- (2) 脂肪滴の可視化 脂肪染色にて行った。
- (3) 遺伝子発現解析 細胞からRNAを抽出し、real time RT-PCR解析とDNAマイクロアレイ解析にて行った。またたんぱく質発現は免疫染色とウェスタンブロットにて解析した。
- (4) ミトコンドリアの解析。ミトコンドリア染色にてミトコンドリアを可視化した。またミトコンドリアDNAのreal time PCRによる定量を行った。
- (5) 代謝能解析。細胞のグルコース取り込みと酸素消費量を解析した。また細胞をLeptin、Isoproterenol、Insulin等で刺激し応答を解析した。
- (7) エピゲノム解析。バイサルファイト法にてDNA CpGメチレーションを解析した。
- (8) 生体内機能解析。マウスに移植して行った。
- (9) 小分子化合物の影響の解析。種々の化合物を細胞培養中に加えて脂肪染色等にて解析した。

4. 研究成果

ヒトとマウスの iPS 細胞と体細胞から誘導した褐色脂肪細胞は、褐色脂肪細胞特異的な遺伝子群を強発現し、多数のミトコンドリアと多房性脂肪滴を有していた。アドレナリン刺激に対する応答等、典型的な褐色脂肪細胞としての機能を示した。DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析とバイサルファイト法による DNA CpG メチレーション解析でも褐色脂肪細胞としての性状が確認された。マウスに同種移植した実験では生体内において機能を発揮することが認められた。これらのことから、褐色脂肪細胞の活性化の手法、また細胞移植（再生医療）アプローチによって肥満や糖尿病をコントロールする可能性が明らかになった。

一方、種々の小分子化合物を培養に添加したところ、ヒト褐色脂肪細胞の誘導に寄与する可能性のある小分子化合物の候補を見出した。この候補化合物をリード化合物として合成展開し、あるいはこれらの化合物をミミックするペプチドを構築することにより、さらに優れた褐色脂肪細胞の分化誘導系を構築できる可能性がある。また、これらの化合物やペプチドの標的分子を探索することで、褐色脂肪細胞の誘導メカニズムのさらなる解明につながるであろう。

以上のように、ヒト褐色脂肪細胞の分化メカニズム、機能とその制御、活性化について多くの新しい知見が得られ、その成果はメタボリックシンドローム、糖尿病、脂質異常症等に対する新しい分子標的療法に応用できるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- (1) HIF-1 α -induced HSP70 regulates anabolic responses in articular chondrocytes under hypoxic conditions. Tsuchida S, Arai Y, Takahashi KA, Kishida T, Terauchi R, Honjo K, Nakagawa S, Inoue H, Ikoma K, Ueshima K, Matsuki T, Mazda O, Kubo T. 査読有 J Orthop Res. 2014 Mar 28. doi: 10.1002/jor.22623. [Epub ahead of print] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24677016>
- (2) Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer. Kami D, Kitani T, Kishida T, Mazda O, Toyoda M, Tomitaka A, Ota S, Ishii R, Takemura Y, Watanabe M, Umezawa A, Gojo S. 査読有 Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine (in press) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24709330>
- (3) Mild electrical stimulation with heat stimulation increase heat shock protein 70 in articular chondrocyte. Hiraoka N, Kishida T, et al. 査読有 J Orthop Res. 31 (6): 894-900, 2013. doi: 10.1002/jor.22307.
- (4) Myostatin acts as an autocrine/paracrine negative regulator in myoblast differentiation from human induced pluripotent stem cells. Gao F, Kishida T, et al. 査読有 Biochem. Biophys. Res. Commun. 431 (2): 309-314, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.105.
- (5) Silencing the expression of connexin 43 decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis. Tsuchida S, Kishida T, et al. 査読有 J Orthop Res, 31 (4): 525-530, 2013. doi: 10.1002/jor.22263.
- (6) Sonoporation-mediated transduction of siRNA ameliorated experimental arthritis using 3 MHz pulsed ultrasound. Inoue H, Arai Y, Kishida T, Shin-Ya, M, Terauchi R, Nakagawa S, Saito M, Tsuchida, S, Inoue A, Shirai T, Fujiwara H, Mazda O, Kubo T. 査読有 Ultrasonics. 2014 Mar;54(3):874-81. doi: 10.1016/j.ultras.2013.10.021. Epub 2013 Nov 11.
- (7) High Pressure Treatment under Subfreezing Temperature Results in Drastic Inactivation of Enveloped and Non-enveloped Viruses Kishida T, Cui FD, Ohgitani E, Gao F, Hayakawa K, Mazda O. 査読有 Biotechnol Lett. 2013 Aug;35(8):1297-301. doi:

10.1007/s10529-013-1204-8. Epub 2013 Apr 23.

- (8) Lansoprazole Inhibits Nitric Oxide and Prostaglandin E(2) Production in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. Nakagawa S, Arai Y*, Kishida T, Hiraoka N, Tsuchida S, Inoue H, Sakai R, Mazda O, Kubo T. 査読有 Inflammation. 2012 Jun;35(3):1062-8. PMID:22134422 [PubMed - in process]
- (9) IL-21 Reduces Immediate Hypersensitivity Reactions in Mouse Skin by Suppressing Mast Cell Activation or IgE Production. Tamagawa-Mineoka R*, Kishida T, Mazda O, Katoh N. 査読有 J Invest Dermatol. 2011 Jul;131(7):1513-20. doi: 10.1038/jid.2011.73. Epub 2011 Mar 24.

[学会発表](計6件)

- (1) Effect of mechanical stress on the hypertrophic differentiation related gene expression in cultured chondrocytes. Inoue H, Arai Y, Terauchi R, Nakagawa S, Saito M, Hiraoka N, Tsuchida S, Matsuki T, Mazda Osam, Kubo T. 16th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International, 2013.4.18-21, Philadelphia, USA.
- (2) The roles of heat shock protein 70 on chondrocyte. Matsuki T, Arai Y, Tsuchida S, Terauchi R, Inoue H, Nakagawa S, Inoue A, Mazda O, Kubo T. 16th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International, 2013.4.18-21, Philadelphia, USA.
- (3) Sonoporation-mediated transduction of siRNA targeting TNF alpha ameliorated experimental arthritis. Inoue H, Arai Y, Nakagawa S, Saito M, Tsuchida S, Inoue A, Matsuki T, Morihara T, Shirai T, Mazda, O, Kubo T. 60th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2014年3月17日~18日, New Orleans, Louisiana, USA
- (4) Femoral perfusion after

- electromagnetic fields stimulation to the steroid-induced osteonecrosis model. A. Ikegami, K. Ueshima, K. Ikoma, M. Fujioka, M. Saito, S. Hayashi, M. Ishida, M. Kuribayashi, O. Mazda and T. Kubo. 2014. 3.15-18. ORS 60th Annual Meeting; New Orleans, LA
- (5) Evaluation of femoral perfusion in a rabbit model of steroid-induced osteonecrosis with a high magnetic field MRI system. S. Hayashi, M. Fujioka, K. Ikoma, M. Saito, K. Ueshima, M. Ishida, M. Kuribayashi, A. Ikegami, O. Mazda and T. Kubo. 60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2014. 3.15-18; New Orleans, Louisiana, USA
- (6) Anti-inflammatory effects of lansoprazole by suppressing ROS production in murine macrophage RAW 264.7 cells. S. Ichimaru, S. Nakagawa, Y. Arai, S. Tsuchida, H. Inoue, T. Matsuki, Y. Mikami, T. Ikeda, R. Oda, O. Mazda, T. Kubo. 2014年3月16日. 2014 Orthopaedic Research Society Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸田 綱郎 (KISHIDA, Tsunao)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：00370205

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中村 直登 (NAKAMURA, Naoto)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：50347449

田村 裕 (TAMURA, Yutaka)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：50263174