

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

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791031

研究課題名（和文） ヒト iPS 細胞を用いた脂肪萎縮症の成因の解明と細胞治療法の開発

研究課題名（英文） **Elucidation of Pathogenesis and Development of a Cell Therapy in Lipodystrophy Using Human iPS Cells**

研究代表者

野口 倫生 (NOGUCHI MICHIO)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：00432394

研究成果の概要（和文）：

脂肪萎縮症患者から皮膚組織を採取し、皮膚線維芽細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 因子のレトロウイルスを用いて疾患特異的 iPS 細胞を作製した。先天性全身性脂肪萎縮症患者 5 例と後天性脂肪萎縮症患者 2 例と家族性部分性脂肪萎縮症患者 1 例から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、一部の疾患 iPS 細胞の脂肪細胞分化能を検討した。さらに新規細胞治療法の開発を目指し、自身らが開発したヒト iPS 細胞からの脂肪細胞分化誘導法を用いて、ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞をヌードマウス皮下に移植を行い、組織学的解析と遺伝子発現解析から少なくとも 4 週間は生着しうることを確認した。

研究成果の概要（英文）：

Patient-specific iPS cells were generated from human dermal fibroblasts of 8 lipodystrophic patients by retroviruses containing human Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc. These patients included 5 patients with congenital generalized lipodystrophy, 1 patient with familial partial lipodystrophy and 2 patients with acquired lipodystrophy. Adipogenic differentiation properties of several patient-specific iPS cell lines were investigated. After in vitro adipogenic differentiation, differentiated human iPS cells were transplanted into the subcutaneous area of nude mice. The study demonstrated that adipocytes derived from human iPS cells can survive and maintain the differentiated properties in vivo for at least 4 weeks after transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：脂肪萎縮症、ヒト iPS 細胞、疾患特異的 iPS 細胞、細胞移植

1. 研究開始当初の背景

脂肪萎縮症は脂肪組織の欠如に起因する疾患であり、高度のインスリン抵抗性、著明な糖脂質代謝異常などを伴う難治性糖尿病を呈する。脂肪萎縮症には遺伝子異常による先天性脂肪萎縮症と自己免疫やウイルス感染などに起因する後天性脂肪萎縮症がある。脂肪萎縮症では脂肪組織の欠失により脂肪細胞由来ホルモンであるレプチンなどのアディポサイトカインが欠乏する。申請者の研究室では、脂肪萎縮症モデルマウスである A-ZIP/F1 マウスと当研究室で開発したレプチン過剰発現トランスジェニック skinny マウス (*J Clin Invest* 2000, *Diabetes* 1999, *Diabetes* 1999) の交配によりレプチンによる糖脂質代謝異常の著明な改善効果を報告した (*Diabetes* 2001)。その成果を踏まえ、レプチンのトランスレーショナルリサーチとして 10 症例の脂肪萎縮症患者にレプチン補充治療を試み、糖脂質代謝の劇的な改善を報告している (*N Engl J Med* 2004, *J Clin End Metab* 2007)。しかし、脂肪萎縮症の病因の本態は脂肪細胞の欠如であり、脂肪細胞の細胞治療法の開発が根本的な治療法として期待される。

また 2007 年 11 月京都大学山中教授らは成人皮膚線維芽細胞に 4 つの転写因子をレトロウイルスで導入することでヒト ES 細胞とほぼ同等の分化・増殖能を持ち合わせるヒト iPS 細胞の樹立に成功した (*Cell* 2007)。ES 細胞における樹立に関する倫理上の課題や拒絶反応については iPS 細胞を用いることで回避されることから、ヒト iPS 細胞を用いた再生医療や疾患研究が大きな注目を集めている。さらに申請者らはヒト iPS 細胞から脂肪細胞の分化誘導に世界に先駆けて成功した (*FEBS Lett* 2009)。

2. 研究の目的

疾患特異的 iPS 細胞の作製により脂肪萎縮症の病因・病態の解明 (疾患研究) とヒト iPS 細胞を用いた脂肪萎縮症に対する細胞治療法の開発 (再生医療) を目指す。疾患研究と再生医療の互いの研究成果は相乗効果をもたらし、オーダーメイド医療としての患者 iPS 細胞を用いた脂肪萎縮症の細胞治療法の実現が加速されると期待される。

3. 研究の方法

(1) 脂肪萎縮症患者からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立 と脂肪細胞分化能の検討

①皮膚線維芽細胞の採取

②iPS 細胞の樹立

③iPS 細胞の characterization

未分化性の維持、多分化能の検証

④脂肪細胞分化誘導実験

(2) ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞の移植

①ヒト iPS 細胞の脂肪細胞分化誘導

②ヌードマウス皮下への細胞移植

③組織学的検討及び遺伝子発現解析

4. 研究成果

(1) 脂肪萎縮症患者からの疾患特異的 iPS 細胞作製：京都大学医学研究科・医学部医の倫理委員会からの承認 (第 824 番) を得て、京都大学 iPS 細胞研究所と連携し脂肪萎縮症患者から皮膚組織を採取し Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 因子のレトロウイルスを用いて疾患特異的 iPS 細胞を作製した。先天性脂肪萎縮症患者 5 例と後天性脂肪萎縮症患者 2 例と部分性脂肪萎縮症患者 1 例から疾患特異的 iPS 細胞を樹立している。未分化遺伝子の発現解析と in vitro 及び in vivo での三胚葉系への分化能の検証を行い、ヒト ES 細胞に匹敵する多能性幹細胞であることを検証した。さらに SEIPIN 及び LMNA 遺伝子異常

を有する疾患特異的 iPS 細胞で脂肪蓄積、脂肪細胞関連遺伝子発現等に関して健常者由来 iPS 細胞との比較検討を行った。

(2) ヒト iPS 細胞を脂肪細胞分化誘導後、Matrigel に懸濁し、ヌードマウス背部皮下へ移植した。組織学的解析により移植後 1~4 週において脂肪細胞様細胞の生着が認められた。また脂肪細胞様細胞の増殖活性はほぼ認められず、脂肪細胞面積の定量的解析では 2 週で頂値を示した。さらに移植後 1~4 週の移植細胞において PPAR γ 2, Leptin などの脂肪細胞関連遺伝子の発現が認められた。また iPS・ES 細胞の細胞株による生着の効率の差が認められた。本研究においてヒト iPS・ES 細胞由来脂肪細胞が脂肪細胞機能を備え、移植後少なくとも 4 週間は生着することが明らかとなった。この分化誘導及び細胞移植系は疾患 iPS 細胞の in vitro, in vivo における病態解析に有用であり、さらに細胞治療への応用が期待される。

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 1 件)

J. Fujikura, K. Nakao, M. Sone, M. Noguchi, E. Mori, M. Naito, D. Taura, M. Harada-Shiba, I. Kishimoto, A. Watanabe, I. Asaka, K. Hosoda, K. Nakao. Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation. *Diabetologia*. 55:1689-98, 2012

[学会発表] (計 12 件)

1) M. Noguchi, 他. In Vitro Differentiation and Transplantation of Human Pluripotent Stem Cell-derived Adipocytes, Obesity 2012 International Symposium for the Study of Obesity, 2012 年 10 月 14 日, 京都市

2) 野口倫生, 他. ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞の分化誘導と細胞移植, 第 33 回日本肥満学会, 2012 年 10 月 12 日, 京都市

3) 松原正樹, 野口倫生, 他. LMNA 遺伝子異常を伴った家族性部分性脂肪萎縮症患者由来 iPS 細胞の脂肪細胞分化の検討, 第 33 回日本肥満学会, 2012 年 10 月 12 日, 京都市

4) 野口倫生, 他. ヒト多能性幹細胞由来前駆脂肪細胞の単離 -細胞表面マーカーの探索-, 第 33 回日本肥満学会, 2012 年 10 月 11 日, 京都市

5) M. Noguchi et al., Differentiation and survival of adipocyte-like cells derived from human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells, 19th European Congress on Obesity (ECO2012), 2012 年 05 月 09 日, Lyon (France)

6) 松原正樹, 野口倫生, 他. LMNA 遺伝子異常を伴った家族性部分性脂肪萎縮症患者由来 iPS 細胞の脂肪細胞分化の検討, 第 85 回日本内分泌学会学術総会, 2012 年 04 月 21 日, 名古屋市

7) 野口倫生, 他. ヒト iPS 細胞由来の脂肪細胞の脂肪細胞機能解析と細胞移植(プレナリーセッション), 第 109 回日本内科学会, 2012 年 04 月 14 日, 京都市

8) 森栄作, 野口倫生, 他. 脂肪萎縮症に対する脂肪組織移植治療に関する検討, 第 109 回日本内科学会, 2012 年 04 月 14 日, 京都市

9) 野口倫生, 他. ヒト iPS 細胞由来の脂肪細胞の脂肪細胞機能解析と細胞移植, 第 109 回日本内科学会, 2012 年 04 月 14 日, 京都市

10) 中根舞子, 野口倫生, 他. ヒト iPS/ES 細胞由来脂肪細胞の機能解析, 第 32 回日本肥満学会学術集会, 2011 年 9 月 24 日, 淡路市

11) 野口倫生, その他. ヒト iPS 細胞を用いた脂肪細胞治療法の開発, 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011 年 5 月 19 日, 札

幌市

12) 野口倫生, その他. ヒト iPS 細胞を用いた脂肪萎縮症の細胞治療法の開発, 第 84 回日本内分泌学会学術総会, 2011 年 4 月 23 日, 神戸市

〔図書〕(計 1 件)

1) M. Noguchi et al., Springer Science+Business Media LLC, Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells: Lineage-Specific Differentiation Protocols, 2011, 351-358

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 倫生 (NOGUCHI MICHIO)
京都大学・医学研究科・医員
研究者番号：00432394

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：