

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461347

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた脂肪萎縮症・肥満症の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy for lipodystrophy and obesity using human iPS cells

研究代表者

野口 倫生 (Noguchi, Michio)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：00432394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：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・維持することを明らかにした(Stem Cells Dev 2013)。脂肪萎縮症iPS細胞については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例から樹立を行った。BSCL2遺伝子異常を有する先天性脂肪萎縮症iPS細胞は脂肪細胞分化誘導により健康者由来のiPS細胞と比較し著明な脂肪蓄積の低下を認め、脂肪細胞関連遺伝子の発現低下を認めた。これらの疾患特異的iPS細胞は脂肪萎縮の病態を再現し、病態解明の有用なツールとなりうる事が明らかとなった(Metabolism 2016)。

研究成果の概要(英文)：Human iPS and ES cells have adipogenic potentials in vitro. Matrigel containing adipocyte-like cells derived from human iPS and ES cells was transplanted into the subcutaneous tissue of nude mice for 1-4 weeks. Histological analyses and gene expression analyses revealed the presence of adipocyte-like cells at 1-4 weeks. These cells can survive and maintain the differentiated properties of the adipocytes for at least 4 weeks after the transplantation. Then, iPS cells were generated from 5 patients with congenital generalized lipodystrophy, 2 patients with acquired generalized lipodystrophy and a patient with familial partial lipodystrophy. Among them, iPS cells from lipodystrophic patients with BSCL2 nonsense mutations (BSCL2-iPS cells) exhibited marked reduction of lipid droplet formation after adipogenic differentiation, compared with those from healthy subjects. BSCL2-iPS cells could provide valuable models with which to study the pathophysiology of lipodystrophy.

研究分野：糖尿病・内分泌

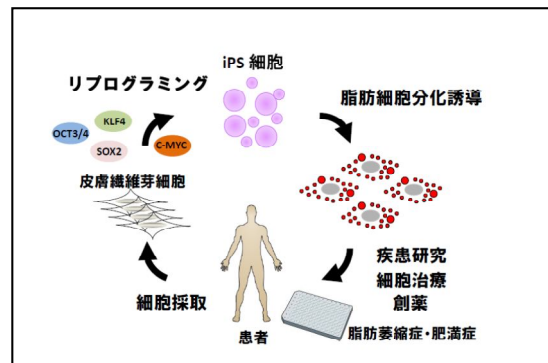
キーワード：ヒトiPS細胞 脂肪萎縮症 肥満症

1. 研究開始当初の背景

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細胞を用いた疾患研究や再生医療及び新規治療法の開発が大きな注目を集めている。申請者らはヒトiPS細胞由来脂肪細胞の分化誘導を報告し(*FEBS Lett* 2009)、この分化誘導系を用いて脂肪萎縮症及び肥満症の疾患研究や新規治療法の開発を目指す(図1)。その後、臨床応用を目指し、エピソードベクターを用いることで導入遺伝子が宿主ゲノムに取り込まれない次世代のiPS細胞も開発されている(*Nat. Methods* 2011)。

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ている。

一方、飽食と運動不足を背景として近年、欧米のみならず日本を含むアジア地域においても肥満患者の増加が認められる。肥満は糖尿病や高血圧、虚血性心疾患、脳梗塞などを引きおこし、整形外科疾患や悪性腫瘍との関連も報告されている。脂肪萎縮症の病態を解明することで脂肪蓄積を制御する分子機構を解明し、新たな脂肪萎縮症および肥満症の治療法の開発を目指す。



2. 研究の目的

(1) iPS細胞を用いた脂肪萎縮症の細胞治療法の開発

ヒトiPS細胞由来脂肪細胞は移植により生着し、維持されるかについてこれまで全く検討されていない。また申請者らはヒトiPS細胞由来脂肪細胞の全身性脂肪萎縮症への細胞治療のための動物モデルとして脂肪萎縮症と同様に高血糖、重度のインスリン抵抗性、高中性脂肪血症、脂肪肝を呈する脂肪萎縮症ヌードマウスを確立している。脂肪組織移植の基礎検討の結果では体重の4%の脂肪組織量で十分な脂肪萎縮症の代謝改善効果を認めている。まずヒトiPS細胞由来脂肪細胞の細胞移植法の開発を行い、続いて脂肪萎縮症の新規治療法としての有効性と安全性について検証する。

(2) 細胞系譜特異的な脂肪細胞分化誘導法の開発

申請者らはこれまで胚様体(EB)形成を介する分化誘導法にてヒトiPS細胞がヒトES細胞に相当する脂肪細胞への分化能をもつことを報告した(*FEBS Lett* 2009)。ヒトiPS細胞由来

脂肪細胞の機能解析及び細胞治療には脂肪細胞の純化と分化効率の改善が大きな課題である。脂肪細胞は発生学的には沿軸中胚葉由来と考えられているが一部には神経外胚葉由来とも考えられている。マウス等の発生学的知見をもとにFACSなどの技術を駆使した前駆脂肪細胞の単離法の開発を行う。

(3)脂肪萎縮症 iPS 細胞の脂肪細胞分化誘導

現在 8 例の脂肪萎縮症患者から疾患特異的 iPS 細胞を樹立している。遺伝子異常が明らかな iPS 細胞では原因遺伝子の機能解析を行い、遺伝子異常が原因ではないと考えられる後天性症例や一部の先天性症例でも脂肪細胞分化誘導を行う。脂肪萎縮の病態を解明することで脂肪萎縮症および肥満症の新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1)iPS 細胞を用いた脂肪萎縮症の細胞治療法の開発

ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞をヌードマウス背部皮下に移植し、生着、維持しうることについて検討する。複数の iPS 細胞と ES 細胞のクローンを用いて比較検討する。次に脂肪萎縮症と同様に高血糖、重度のインスリン抵抗性、高中性脂肪血症、脂肪肝を呈する脂肪萎縮症ヌードマウスに対する細胞移植による病態改善効果について検討する。

(2)細胞系譜特異的な脂肪細胞分化誘導法の開発

安全な細胞治療の実現や安定した脂肪細胞機能解析のためには分化誘導刺激後の残存する未分化細胞の除去と前駆脂肪細胞の単離などのプロセスが必要となる。発生学的には脂肪細胞は中胚葉・間葉系の細胞であり、その由来は沿軸中胚葉と考えられている。Flk1⁻, PDGFR⁺ の細胞集団はマウス ES 細胞においては沿軸中胚葉系由来細胞であることが示されており研究実績のある京都大学 iPS 細胞研究所櫻井らとの連携により脂肪細胞分化能を持つ iPS 細胞由来間葉系幹細胞の

単離を試みる。

(3)脂肪萎縮症 iPS 細胞の脂肪細胞分化誘導

現在 8 例の脂肪萎縮症患者から疾患特異的 iPS 細胞を樹立している。レトロウイルス法により樹立した iPS 細胞に対して脂肪細胞分化誘導を行い健常者由来の iPS 細胞との分化誘導効率の比較検討を行う。またレトロウイルス法と異なり導入遺伝子がゲノムに取り込まれないエピソードベクターを用いた iPS 細胞の樹立も行う。OCT3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, LIN28, shRNA p53 の 6 つの遺伝子をエレクトロポレーションにより導入する。レトロウイルス法ではリプログラミングに必要な遺伝子は一旦サイレンシングを受けた後に再活性化されることがあり造腫瘍性をもたらす一因とされているがエピソードベクター法ではその懸念がないと考えられる。臨床応用に向けより安全な iPS 細胞の樹立を目指す。

4. 研究成果

(1)iPS細胞を用いた脂肪萎縮症の細胞治療法の開発

申請者らはヒト iPS細胞由来脂肪細胞の脂肪細胞機能評価と細胞移植による生着及び維持に関する検討を行った。まずヒト iPS・ES細胞を胚様体形成を介して in vitroにて脂肪細胞への分化誘導を行った。ヒト iPS・ES細胞由来細胞は脂肪蓄積及び脂肪細胞関連遺伝子の発現を認め、脂肪分解反応、インスリン応答性等の脂肪細胞機能を持つことが示された。続いて分化誘導後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。移植後の脂肪細胞面積の定量的解析では2週で頂値を示し、脂肪細胞様細胞の増殖活性はほぼ認められなかった。移植後1~4週の移植細胞においてPPAR α , LEPTINなどの脂肪細胞関連遺伝子の発現が認められた。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・維持することを明ら

かにした(*Stem Cells Dev* 2013)。

(2)細胞系譜特異的な脂肪細胞分化誘導法の開発

申請者らはこれまでの報告(*Stem cells* 2007)をもとにヒトiPS・ES細胞由来間葉系前駆細胞を誘導した。ヒト間葉系幹細胞表面マーカーとして代表的なCD29, CD34, CD73, CD90, CD105, CD140a, CD166 について解析を行った。ヒト骨髄由来間葉系幹細胞ではCD73(86.1%), CD90(96.3%), CD105(97.4%)が高発現を認めた。一方でヒトiPS・ES細胞由来間葉系前駆細胞とヒト骨髄由来間葉系幹細胞と比較してCD90は同様に高発現(87.5%、73.3%)を示したが、CD73は低発現(33.2%、30.9%)であり、CD105は著しく低発現(1.8%、7.6%)であった。

分化能についてはヒトiPS・ES細胞由来間葉系前駆細胞は軟骨細胞分化能を有するものの脂肪細胞分化能に関しては効率が非常に低いという結果が得られた。次にヒトiPS細胞由来間葉系前駆細胞にエレクトロポレーション法で遺伝子導入を試みて脂肪細胞様細胞が得られることを確認した。しかし導入効率は低かった。今後、病態の治療法として考えた場合に遺伝子導入を介さない誘導法を最優先にする方針とし、高い脂肪細胞分化能を有する前駆細胞の単離を目指す。

(3)脂肪萎縮症iPS細胞の脂肪細胞分化誘導

全身性脂肪萎縮症は全身の脂肪組織の欠如により著明な高血糖、インスリン抵抗性、高中性脂肪血症、脂肪肝を呈する疾患であり生命予後不良な難治性疾患である。なかでもBSCL2 遺伝子異常を有する患者は最も重篤な臨床像を呈する。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(脂肪萎縮症iPS細胞)の樹立を行い、続いて脂肪萎縮症iPS細胞の脂肪細胞分化誘導を行った。2例のBSCL2 遺伝子異常を有する脂肪萎縮症iPS細胞は脂肪細胞分化誘導により健常者由

来のiPS細胞と比較し著明な脂肪蓄積の低下を認め、脂肪細胞関連遺伝子の発現低下を認めた。さらにBSCL2 遺伝子異常を有する脂肪萎縮症iPS細胞にBSCL2 遺伝子を過剰発現させると脂肪蓄積の低下が回復した。また脂肪滴関連分子のADRPとBSCL2 遺伝子がコードするSeipinの結合がSeipin 遺伝子異常において阻害されていることがメカニズムの一つである可能性が示唆される(*Metabolism* 2016)。さらに1例のBSCL2 遺伝子異常を有する患者由来iPS細胞を導入遺伝子がゲノムに取り込まれないエピゾーマルベクター法で作成し、解析を行ったところ上記2例と同様に脂肪細胞分化誘導で著明な脂肪蓄積の低下を認めた。BSCL2 遺伝子異常を有する脂肪萎縮症iPS細胞は脂肪萎縮の病態を再現し、病態解明の有用なツールとなりうることが明らかとなった。また後天性全身性脂肪萎縮症患者由来iPS細胞は脂肪細胞分化により脂肪の蓄積に関して健常者由来のiPS細胞と比較し有意な差を認めなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

- (1) N. Yamada-Goto, Y. Ochi, G. Katsuura, Y. Yamashita, K. Ebihara, M. Noguchi, J. Fujikura, D. Taura, M. Sone, K. Hosoda, P.E. Gottschall, K. Nakao. Neuronal cells derived from human induced pluripotent stem cells as a functional tool of melanocortin system. *Neuropeptides* 2017 April 7 pii: S0143-4179(16)30201-3 査読有
- (2) E. Mori, J. Fujikura, M. Noguchi, K. Nakao, M. Matsubara, M. Sone, D. Taura, T. Kusakabe, K. Ebihara, T. Tanaka, K. Hosoda, K. Takahashi, I. Asaka, N. Inagaki, K. Nakao Impaired adipogenic capacity in induced pluripotent stem cells from lipodystrophic patients with *BSCL2* mutations. *Metabolism* 65 543-56, 2016 査読有

(3) M. Noguchi, K. Hosoda, M. Nakane, E. Mori, K. Nakao, D. Taura, Y. Yamamoto, T. Kusakabe, M. Sone, H. Sakurai, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Nakao. In vitro characterization and engraftment of adipocytes derived from human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 22:2895-905, 2013
査読有

〔学会発表〕(計11件)

(1) 第31回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2017.2.10-11、はまぎんホールヴィアマーレ(横浜市) 野口倫生 中尾一和疾患特異的 iPS 細胞を用いた脂肪萎縮症の病態解明

(2) 第37回日本肥満学会、2016.10.7-8、東京ファッションタウン(東京都)

日下部徹、田中智洋、宮澤崇、青谷大介、野口倫生、阿部恵、海老原健、中尾一和

AGPAT2 遺伝子変異による脂肪萎縮症～我が国における先天性脂肪萎縮症の遺伝子解析

(3) 第37回日本肥満学会、2016.10.7-8、東京ファッションタウン(東京都)

野口倫生、日下部徹、泉諒太、中尾一和
セイピンノックアウトラットにおける脂肪萎縮の病態解明

(4) 第59回日本糖尿病学会年次学術集会、2016.5.19-21、国立京都国際会館(京都市)

松原正樹、神田一、今村博臣、井上真由美、野口倫生、細田公則、垣塚彰、中尾一和

ミトコンドリア A3243G 変異患者から樹立した疾患特異的 iPS 細胞の機能解析

(5) 第59回日本糖尿病学会年次学術集会、2016.5.19-21、国立京都国際会館(京都市)

森栄作、藤倉純二、中尾一泰、野口倫生、日下部徹、海老原健、田中孝之、浅香勲、細田公則、稲垣暢也、中尾一和

BSCL2遺伝子異常を有する先天性全身性脂肪萎縮症患者からの疾患特異的 iPS 細胞樹立と解析

(6) 第53回日本臨床分子医学会学術集会、2016.4.15-16、東京国際フォーラム(東京都)

松原正樹、神田一、今村博臣、井上真由美、野口倫生、細田公則、垣塚彰、中尾一和

ミトコンドリア A3243G 変異患者由来 iPS 細胞のミトコンドリア機能と応用

(7) 第36回日本肥満学会、2015.10.2-3、名古屋国際会議場(名古屋市)

森栄作、藤倉純二、中尾一泰、野口倫生、日下部徹、海老原健、田中孝之、浅香勲、細田公則、稲垣暢也、中尾一和

先天性脂肪萎縮症患者からの疾患特異的 iPS 細胞樹立と解析

(8) 第36回日本肥満学会、2015.10.2-3、名古屋国際会議場(名古屋市)

野口倫生、日下部徹、泉諒太、海老原健、中尾一和

脂肪組織形成における Seipin の生理的意義

(9) 第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014.5.22-24、大阪国際会議場(大阪市)

森栄作、藤倉純二、中尾一泰、野口倫生、日下部徹、海老原健、田中孝之、浅香勲、細田公則、稲垣暢也、中尾一和

先天性全身性脂肪萎縮症患者からの疾患特異的 iPS 細胞樹立と解析

(10) 第34回日本肥満学会、2013.10.11-12、東京国際フォーラム(東京都)

趙晃濟、南丈也、桑原宏一郎、日下部徹、野口倫生、酒井建、錦見俊雄、中川靖章、木下秀之、桑原佳宏、山田千夏、柴田純子、山田優子、中尾一泰、上嶋健治、保野慎治、細田公則、小池薫、中尾一和

SRF 転写活性化因子 MRTF-A の脂肪組織形成における意義

(11) 第31回内分泌代謝学サマーセミナー、2013.7.11-13、湯布院山水館 大分県

野口倫生、細田公則、中尾一和

ヒト iPS 細胞の脂肪細胞分化 -疾患の病態解明と再生医療実現化に向けて-

〔図書〕(計2件)

(1) 野口倫生 他 メディカルドゥ、遺伝子
医学 MOOK iPS 細胞を用いた難病研究 - 臨床
病態解明と創薬に向けた研究の最新知見
脂肪萎縮症、2015、170-174

(2) 野口倫生 他、日本臨床社 最新肥満症
学 基礎・臨床研究の最前線 ヒト多能性幹
細胞からの脂肪細胞分化誘導、2014、71-74

〔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・大学院医学研究科・特定講師
研究者番号：00432394

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

櫻井 英俊 (SAKURAI, Hidetoshi)
京都大学・iPS 細胞研究所・准教授
研究者番号：80528745
高橋 和利 (TAKAHASHI, Kazutoshi)
京都大学・iPS 細胞研究所・講師
研究者番号：80432326

海老原 健 (EBIHARA, Ken)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70362514

(4) 研究協力者