

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670452

研究課題名(和文)ケミカル・ダイレクト・リプログラミングに基づく代謝疾患の再生治療

研究課題名(英文)Regenerative therapy for metabolic diseases based on chemical direct reprogramming

研究代表者

松田 修(Osam, Mazda)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00271164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪細胞は、余剰エネルギーを熱として散逸する細胞である。我々は、線維芽細胞から褐色脂肪細胞を直接誘導することに成功した。この成果を基に、本研究では小分子化合物でヒト線維芽細胞から褐色脂肪細胞へのダイレクト・リプログラミングを達成する技術を確立することを目的とした。高感度高スループットのスクリーニング系を構築して化合物ライブラリーをスクリーニングした結果、目的とした化合物の候補を複数見出した。本研究の成果は、褐色脂肪細胞の分化機構の解明に貢献するのみならず、糖尿病やメタボリック症候群の新規再生医療に繋がる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Brown adipocytes (BAs) expend energy as heat. Recently we succeeded in directly inducing human brown adipocytes from the fibroblasts. Here we aimed at establishing a direct reprogramming procedure to obtain brown adipocytes from fibroblasts by means of small chemical compounds. We established a high-sensitivity and high-throughput screening system and screened a chemical library. As result we found some candidates that satisfied screening criteria. The present study may contribute to understanding of differentiation of brown adipocytes, while it may also lead to novel regenerative therapy for metabolic diseases.

研究分野：再生医学

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、白色脂肪細胞とは逆に、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り、マウス等では肥満や耐糖能異常に抑制的に働く。ヒト成人に褐色脂肪細胞が存在することは、2009年に初めて証明され (Saito et al, Diabetes, 2009) ヒトの褐色脂肪細胞にはまだ未解明の部分が多い。興味深いことに、高度の肥満、脂質異常症、糖尿病の患者ではほとんど活性が認められない。そこで、糖尿病の患者から褐色脂肪細胞を作出して自家移植できれば、新しい細胞治療を提供できると考えられる。

少数の既知因子を遺伝子導入することで、体細胞の運命転換が可能であることを、iPS細胞の研究が示して以来、リプログラミング技術を用いて様々な細胞種を創生することが可能になりつつある。我々は最近、線維芽細胞から褐色脂肪細胞を、直接誘導することに成功した(ダイレクト・リプログラミング) (図1)。我々の方法では、高機能、高品質な褐色脂肪細胞を、短期間の培養で高い効率で、線維芽細胞から誘導することが可能である。

さらに、マウスの線維芽細胞から誘導した褐色脂肪細胞を糖尿病マウスに移植すると、糖尿病を抑制できることを見出した。褐色脂肪細胞による糖尿病の抑制は、これまで報告されていない。したがって本技術は、糖尿病に対する新しい再生医療をもたらす可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子導入に換えて小分子化合物で、ヒト線維芽細胞から褐色脂肪細胞へのダイレクト・リプログラミングを達成する技術を確認することを目的とした。本技術は我々の独創的な革新技术であり、小分子化合物で誘導する点も独創性が高く、実用化に近づき意義が大きい。糖尿病の再生医療としては、インスリン産生細胞を移植する手法があるが、褐色脂肪細胞はインスリン産生細胞とは異なる機構で糖尿病を制御するので、将来的には両細胞の併用でさらに効果的な治療法を創出できる可能性も考えられる。また、本研究でヒットする化合物は、これらの因子

自身に相同性があるためその機能を直接ミミックするよりは、むしろ細胞分化の制御に関与する何らかの重要なパスウェイに作用する分子が見出されるであろうと予想される。したがって、本研究で見出された化合物の作用を解析することで、新しい切り口から褐色脂肪細胞の分化と細胞運命転換の機構を解明することが可能となるであろう。

3. 研究の方法

化合物ライブラリーの、簡便、迅速、安価な測定法を確立し、スクリーニング系として用いた。8,800分子種の化合物ライブラリーを、この高スループットのスクリーニング系を用いてスクリーニングした。

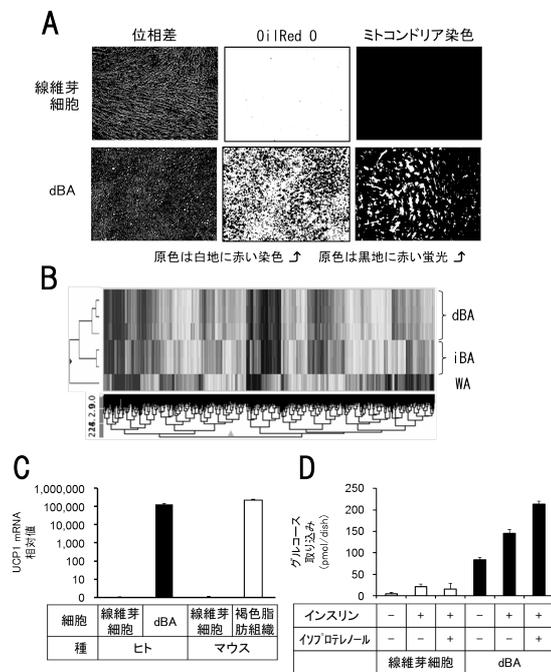


図1 ヒト線維芽細胞から誘導した褐色脂肪細胞 (dBA) .

A) 線維芽細胞の約90%が、多房性脂肪滴とミトコンドリアに富む褐色脂肪細胞に転換する (倍率 x 40) . B) 網羅的遺伝子発現解析. 褐色脂肪細胞と極めて類似で、白色脂肪 (WA) とは異なる. C) 褐色脂肪組織と同程度にUCP1を強発現する. D) グルコースを多量に取り込み、その活性はインスリンとβアドレナリン刺激でさらに上昇する.

4. 研究成果

図2 Aのように第1列(○)を陽性コントロールとし、他の列()にはウェルごとに異なる小分子化合物等を添加したプレートを100枚作成した。培養した。代表的な1枚のプレートの結果を図2 Bに示す。この図2 Bのプレートでは、加えた88分子種のうち、1分子種がヒットした(矢印)。このように、100枚のプレートから複数の候補化合物を見出した。

これらの候補化合物については、誘導した細胞のキャラクタリゼーションを進め、とくに有望な化合物を見出せれば、合成展開を行ってより効果の高い化合物の開発につながる予定である。

ダイレクト・リプログラミングの研究では、軟骨細胞や心筋細胞が先行しているが、まだ小分子化合物で成功したという報告はほとんどない。本研究は、ケミカル・ダイレクト・

リプログラミングを実用化し、今後さまざまなヒトの組織細胞を小分子化合物で誘導する端緒になるものと期待できる。

本研究の結果は、褐色脂肪細胞の分化誘導の分子メカニズム、ひいては細胞の運命決定のエピジェネティック機構の解明等に大きく貢献することが期待される。さらには、患者自身の体細胞から誘導した褐色脂肪細胞を用いて、糖尿病や高度肥満、メタボリック症候群等に対する再生医療に応用できる可能性がある。得られたヒト褐色脂肪細胞を用いることにより、これら疾患を対象とした創薬研究等にも大きく貢献するであろう。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

- (1) 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. *Nanomedicine*. 2014 Aug;10(6):1165-74. 査読有 doi: 10.1016/j.nano.2014.03.018
- (2) 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. *J Orthop Res*. 2014 Aug;32(8):975-80. 査読有 doi: 10.1002/jor.22623
- (3) Cycloamylose-nanogel drug delivery system-mediated intratumor silencing of the vascular endothelial growth factor regulates neovascularization in tumor microenvironment. Fujii H, Shin-Ya M, Takeda S, Hashimoto Y, Mukai SA, Sawada S, Adachi T, Akiyoshi K*, Miki T, Mazda O. *Cancer Sci*. 2014 Dec;105(12):1616-25. 査読有 doi: 10.1111/cas.12547
- (4) Inhibition of osteoclastogenesis by osteoblast-like cells genetically engineered to produce interleukin-10. Fujioka K, Kishida T, Ejima A, Yamamoto K, Fujii W, Murakami K, Seno

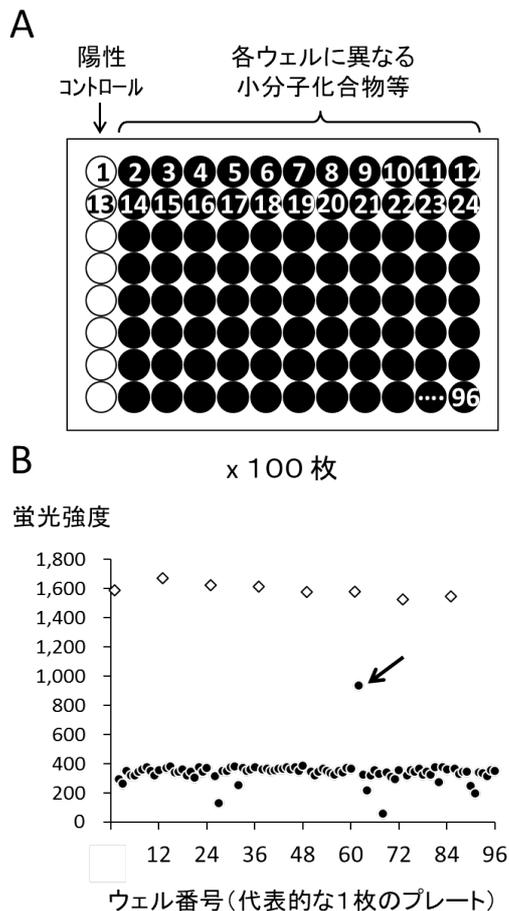


図2 スクリーニングの方法と結果
A)スクリーニング法
B)代表的な1枚のプレートの結果.

T, Yamamoto A, Kohno M, Oda R, Yamamoto T, Fujiwara H, Kawahito Y, Mazda O. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Jan 16;456(3):785-91. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.040

- (5) Direct conversion of human fibroblasts into functional osteoblasts by defined factors. Yamamoto K, Kishida T, Sato Y, Nishioka K, Ejima A, Fujiwara H, Kubo T, Yamamoto T, Kanamura N & Mazda O. Proc Natl Acad Sci USA. 2015 May 12;112(19):6152-7. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1420713112

[学会発表](計2件)

- (1) Direct reprogramming of functional human osteoblasts for periodontal tissue regeneration. Yamamoto K, Yamamoto T, Kishida T, Mazda O, Kanamura N. International Association for Dental Research. 2015年3月12日, Boston, MS, USA
- (2) Directly reprogrammed osteoblasts engineered to produce interleukin-10 significantly suppress osteoclastogenesis. Fujioka K, T. Kishida, Y. Kukida, H. Nagahara, W. Fujii, K. Murakami, T. Seno, A. Yamamoto, M. Kohno, Osam Mazda, Y. Kawahito. EULAR 2014

[産業財産権]

出願状況(計0件)

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

松田 修 (MAZDA OSAM)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号: 00271164

(2)連携研究者

川人 豊 (KAWAHITO UTAKA)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 50336731

(3)研究協力者

岸田 綱郎 (KISHIDA TSUNAO)

京都府立医科大学・准教授

研究者番号: 00370205

扇谷 えり子 (OHGITANI ERIKO)

同・助教

研究者番号: 80300820

渡邊 映理 (WATANABE ERI)

同・助教

研究者番号: 20433253

新屋 政春 (SHIN-YA MASAHARU)

同・プロジェクト研究員

研究者番号: 10405277

秋吉 一成 (KIYOSHI KAZUNARI)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号: 90201285

北畠 康司 (KITABATAKE YASUJI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 80506494