

課題番号 : 24指105

研究課題名 : ヒトES/iPS細胞由来褐色脂肪細胞を活用した新規代謝疾患治療薬の開発

主任研究者名 : 佐伯 久美子

分担研究者名 : 安田 和基

キーワード : ヒトES細胞、ヒトiPS細胞、褐色脂肪細胞

研究成果 :

ヒトES/iPS細胞の造血細胞分化誘導に関する研究過程で偶然にも、造血性サイトカインカクテルを用いた2段階培養を適用することで高純度に褐色脂肪細胞(BA)が作製できることを発見した。具体的には、ヒトES/iPS細胞をVEGFA, IL6, KITLG, FLT3LG, BMP4からなるサイトカインカクテル存在下で浮遊培養することで細胞凝集体を作製し、続いてこれをVEGFA, IL6, KITLG, FLT3LG, BMP7からなるサイトカインカクテル存在下で接着培養すると、全行程10日ほどで純粋なBAが得られる。なお培養系は無フィーダーであり、異種動物血清も用いない。電子顕微鏡ではクリスタが梯子状に並ぶ大きなミトコンドリアが多数認められ、脂肪滴と接して存在する様子も観察される。またPRDM16やUCPIを初めPGCIA, CIDEA, ELOVL3などのBA選択的遺伝子群、PPARG, ADIPOQなどのBA/白色脂肪細胞(WA)共通遺伝子群の発現を認めるが、PSAT1, EDNRAなどのWA選択的遺伝子群の発現は認めない。さらに分化誘導過程で一過性にMYF5等の筋芽細胞マーカー遺伝子の誘導が認められた。以上より、筆者らの開発した技術は「ヒトES/iPS細胞からの筋芽細胞分化を介したclassical BAの作製技術」であることが解る。なおBMP7のBA分化誘導への寄与については報告があるが、造血性サイトカインの重要性を示したのは筆者らが初めてであり、SCF, Flt-3L, IL6, VEGFのどの1つを除去してもBA分化誘導の質は顕著に低下する。次に、ヒトES/iPS由来classical BA(以下、「ヒトBA」と略)の機能評価を行った。交感神経刺激応答性を調べるためにβ3アドレナリン受容体特異的アゴニストCL316,243を添加し、ミトコンドリア呼吸能を酸素消費速度(oxygen consumption rate; OCR)により計測した。結果、CL316,243刺激に応じてヒトBAのOCR値は約2倍に増大したが、ヒト間葉系幹細胞から標準法で作製したWA(以下、「ヒトWA」と略)や未分化ヒトES/iPS細胞ではOCR値は変化しなかった。次に、交感神経刺激に依存した熱産生能を評価した。マウスの皮下にヒトBAを移植し16時間後にβアドレナリン受容体特異的アゴニストisoproterenolを投与して体表温度を赤外線カメラで測定した。結果、ヒトBAを移植したマウスでのみ移植部で皮膚温上昇が確認された。以上、筆者らが作製したヒトBAは、「交感神経刺激に応答して酸素消費速度と熱産生能が増大する機能的BA」であることが示された。続いて、脂質代謝および糖代謝への影響を調べた。褐色脂肪細胞が脂質代謝を向上することはマウスの研究で示されているが、ヒトES/iPS由来BAを移植したマウスでも空腹時血中中性脂肪値の低下と、経口オリーブ油負荷試験での耐脂能向上が確認された。なおヒトWAを移植したマウスでも耐脂能は向上したことから、脂質代謝改善作用は脂肪細胞全般が持つ機能であると考えられる。一方、糖代謝への影響については興味深い知見を得た。ヒトBA移植では空腹時血糖値が低下したが、ヒトWA移植では空腹時血糖値は低下せずHOMA-IR値が増加していたことから、耐糖能障害が示唆された。実際、経口ブドウ糖負荷試験(oral glucose tolerance test; OGTT)では、ヒトBA移植マウスは全時点で血糖値は低下したが、ヒトWA移植マウスでは30分血糖値が顕著に上昇した。なおヒトWA移植で惹起される耐糖能障害は、ヒトBAを同時に移植することで防止できることが判明した。以上のような画期的な研究成果を、Cell Metabに発表して、マスコミなどを通じての社会への発信も行い、学会賞なども受賞した。さらに、以上のような作用の分子機構の解析と創薬を目指して、BAから分泌される代謝改善因子の存在の可能性も明らかにして、その精製・単離を目指して研究を推進中であるが、特許出願を控えて、その具体的な内容については記載を控えたい。

Subject No. : 2 4 指 1 0 5

Title : Development of new drugs for metabolic disorders using human brown adipocytes induced from human ES/iPS cells

Researchers : Kazuki Yasuda

Key word : human ES/iPS cells, brown adipocytes, drug discovery

Abstract :

We established feeder-free and serum-free two-step culture method for highly efficient production of brown adipocytes (BA) during the study for hematopoietic differentiation induction of human ES/iPS cells. First step is a sphere-making floating culture in the presence of cytokines (VEGFA, IL6, KITLG, FLT3LG, BMP4), and the second step is an adherent culture in the presence of similar cytokines (VEGFA, IL6, KITLG, FLT3LG, BMP7). Human BA induced from human ES/iPS cells by our novel two-step system showed typical morphology of this kind of cells under the both light and electron microscopy, and express BA-specific genes such as PRDM16, UCP1, PGC1A, CIDEA and ELOVL3, adipocyte-specific genes such as PPARG and ADIPOQ, but not white adipocyte (WA)-specific genes such as PSAT1 and EDNRA. During the differentiation process, cells in our culture system express myoblast specific gene MYF5, suggesting human BA produced by our method are classical BA induced via myoblastic pathway.

Human BA produced by our method were highly functional effector cells. Upon stimulation with β -adrenergic agonist, mitochondrial respiration determined by oxygen consumption rate (OCR) of human BA was markedly enhanced, whereas OCR of undifferentiated human ES/iPS cells and WA was not enhanced. We also evaluated skin temperature of mice transplanted with human cells by using infrared camera, and observed β -adrenergic stimulation-dependent elevation of skin temperature of mice transplanted with human BA. Thus, human BA showed adrenergic stimulation-dependent oxygen consumption and heat production.

Then, we evaluated the effect of human BA on the metabolism of lipid and glucose. Transplantation of human BA into the mice lowered the plasma concentration of triacylglycerol although this effect was also observed in human WA. In regard to the glucose metabolism, different effects of the transplantation were observed between BA versus WA. BA lowered the fasting blood glucose concentration whereas WA did not. BA improved glucose tolerance whereas WA worsened that, and in addition, BA cancelled the unfavorable effect of WA on glucose tolerance. Thus, BA could exert several favorable effects on lipid and glucose metabolism as compared with WA.

These exciting findings were published in the top international journal (Cell Metab), and were reported by the press. In addition, the first author of the published paper (Cell Metab) was awarded with the prize of the society.

Based upon this system established, we obtained the evidence for soluble factor(s) secreted from BA to induce metabolic improvement, leading to the understanding of the molecular mechanism of BA function and the drug discovery for various metabolic disorders.

24指105「ヒトES/iPS細胞由来褐色脂肪細胞を活用した新規代謝疾患治療薬の開発」

主任研究者: 独立行政法人国立国際医療研究センター研究所疾患制御研究部室長 佐伯 久美子

ヒトiPS・ES細胞からの褐色脂肪細胞分化誘導法

用いたヒトES・iPS細胞

ヒトES細胞 KhES-1(京都大学再生医科学研究所)

ヒトiPS細胞 当研究部でセンダイウイルスベクターで樹立した株

分化誘導プロトコール(造血系のサイトカインを用いた無フィーダー・無血清・2段階培養)

step 1: sphere形成(浮遊培養)、step 2: 接着平面培養(ゼラチンコート皿)

ヒトiPS・ES 細胞由来の 褐色脂肪細胞 の特徴

1. 顕微鏡で多数の多胞性脂肪滴、電顕で多数のクリステが梯子状に並ぶ大きなミトコンドリア
2. PRDM16やUCP1を初めPGC1A, CIDEA, ELOVL3などのBA選択的遺伝子群の発現
3. 分化誘導過程で一過性にMYF5等の筋芽細胞マーカー遺伝子の誘導
4. β 3アドレナリン受容体アゴニストによる酸素消費速度の増加(ミトコンドリア呼吸能)
5. 移植したマウスの移植部での β 3アドレナリン受容体アゴニストによる皮膚温上昇
6. 移植したマウスの空腹時および経口オリーブ油負荷試験での血中中性脂肪値の低下
7. 移植したマウスでの血糖値の低下、ヒトWA移植で惹起される耐糖能障害の改善

これまでの 成果

- 論文発表(Nishio et al. Cell Metab 16:394-406, 2012.)
- 特許出願(PCT/JP2012/61212)
- 新聞発表(日本経済新聞、産経新聞)
- 学会賞受賞(日本肥満学会YIA受賞)
- 学会(日本再生医療学会、日本糖尿病学会、日本肥満学会、日本分子生物学会、他)での発表多数

課題

ヒトES/iPS由来褐色脂肪細胞が分泌する**インスリン感受性亢進因子**の同定

【進捗データ】

糖代謝改善効果に関し、陽性群(ヒトES由来BA、ヒトiPS由来BA) *versus* 陰性群(ヒト白色脂肪細胞、ヒトBRITE細胞)でマイクロアレイを行い、褐色脂肪組織に特徴的な**8遺伝子(分泌蛋白コード)**を抽出した。

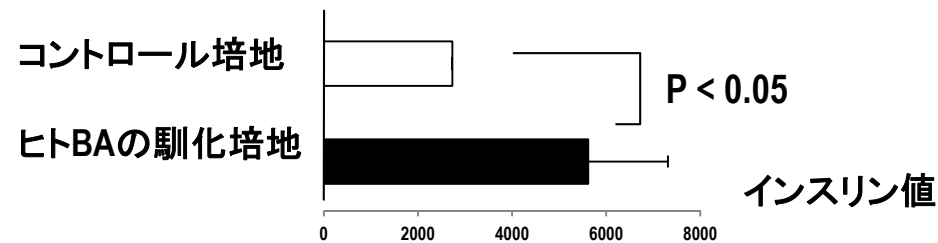
具体的手順:

陽性群で高発現する遺伝子4640個→分泌蛋白コード遺伝子334個→マウス個体でも「褐色脂肪組織>白色脂肪組織」の発現を示した遺伝子25個→マウス全臓器で比較して褐色脂肪組織での発現が特に顕著であった遺伝子8個。

課題

ヒトES/iPS由来褐色脂肪細胞が分泌する**インスリン分泌促進因子**の同定

【進捗データ】 図1



マウス膵β細胞(MIN-6株)におけるブドウ糖濃度依存性インスリン分泌能は「ヒトBA馴化培地」の添加により亢進した(**インスリン分泌促進因子の存在証拠データの取得**)。責任分子の同定に向けて研究が進行中であるが、特許出願を控えて、その内容の公表は一切控えたい。

課題番号 : 24指105
研究課題名 : ヒトES/iPS細胞由来褐色脂肪細胞を活用した新規代謝疾患治療薬の開発
主任研究者名 : 佐伯久美子
分担研究者名 : 安田和基 (分担研究課題: 「褐色脂肪細胞、膵β細胞などを用いた新規代謝制御分子機能の探索」)

キーワード : 脂肪細胞、膵β細胞、クロストーク

研究成果 :

生体において、褐色・白色脂肪組織 (BAT・WAT) は、それぞれエネルギーの消費・蓄積に重要な働きを担うが、それ以外に様々な臓器連関の中心に位置することが知られている。主任研究者らにより、褐色脂肪細胞由来の生理活性物質の検討が行われているが、本分担研究では、それを補う形で脂肪細胞-膵β細胞の相互作用の一環として、液性の活性物質による新たなクロストークを解明するために、白色脂肪細胞から分泌され、膵β細胞の機能に影響を与える分子の解析を行った。

マウス 3T3L1 細胞は、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化・機能の研究に最も汎用される系であるが、常法に従い *in vitro* で分化させる系を用いて、この分化前 (Pre) 及び分化後 (8日目: Day8) の培養上清をラット膵β細胞株 INS-1 細胞の培地に添加して 24 時間培養した後、バッチインキュベーション法によりインスリン分泌アッセイを行ったところ、それぞれグルコース反応性インスリン分泌を増加・減少させた。培養上清の熱変性などの検討から、「Pre」由来のインスリン分泌促進分子はタンパク性であり、「Day8」由来のインスリン分泌抑制因子は非タンパク性であることが推定された。

さらに「Day8」由来の培養上で添加後、INS-1 細胞で発現が上昇する分子をマイクロアレイにて検討した結果、インスリン分泌抑制に関与する新規因子の候補として、Necab1 (N-terminal EF-hand calcium binding protein1) を同定した。Necab1 は、EF-hand 構造をもち、神経終末では synaptotagmin と相互作用することが知られているため、exocytosis による分泌経路に関与する候補分子と考えられるが、その機能の詳細は明らかでなく、脳以外の発現についてもこれまで報告がなかった。過剰発現系や siRNA を用いた実験、モデルマウスを用いた実験から

- 1) INS-1 細胞において Necab1 の発現を増加・減少させると、インスリン分泌はそれぞれ減少、増加すること
- 2) Day8 によるインスリン分泌制御作用の少なくとも一部は Necab1 の発現抑制により転減するため Necab1 を介すると考えられるが、Necab1 非依存的な経路も存在すること
- 3) 過剰発現された Necab1 は培地中に一部「分泌」されること
- 4) 膵では膵島、主にβ細胞で発現すること
- 5) 肥満糖尿病モデル *db/db* マウスでは、膵β細胞の機能が低下してゆく時期に一致して一過性に高発現がみられること

などが明らかになった。現在、さらに詳細な機能解析や発現調節の検討を行っている。

このように白色脂肪由来の生理活性物質及びその膵β細胞への影響を探索することは、BA 由来のインスリン分泌促進因子との意義の比較をする上で、重要な情報となると考えられる。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：24指105

研究課題名：ヒトES/iPS細胞由来褐色脂肪細胞を活用した新規代謝疾患治療薬の開発

主任研究者名：佐伯 久美子

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
ヒト多能性幹細胞からの褐色脂肪細胞の作製	佐伯久美子	医学のあゆみ	250巻9号	2014
Methods of Adipose Tissue Biology Part A (Chapter 10)	Nishio M, Saeki K	Methods in Enzymology	Vol. 537	2014
脂肪細胞---疾患病態における意義	佐伯久美子	医学のあゆみ	3000号記念特集号	2014
ヒト多能性幹細胞から褐色脂肪細胞への分化誘導	佐伯久美子	ホルモンと臨床	平成26年6月号	2014
ヒトiPS/ES細胞から樹立した褐色脂肪細胞の機能	佐伯久美子	The Lipid	2014年1月号	2014
iPS細胞からの褐色脂肪細胞の分化誘導	佐伯久美子	Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2014	平成26年1月25日発行	2014
ヒトiPS細胞からの褐色脂肪細胞の作製	西尾美和子、佐伯久美子	細胞工学	2013年7月号	2013
ヒトiPS細胞/ES細胞から褐色脂肪細胞を作る	佐伯久美子	目からウロコのヘルス・サイエンスシリーズ	第1巻「ここまでわかった 燃える褐色脂肪の不思議」	2013
骨の髄から温まる：骨髄の褐色脂肪細胞	佐伯久美子	目からウロコのヘルス・サイエンスシリーズ	第1巻「ここまでわかった 燃える褐色脂肪の不思議」	2013
ヒト多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞	佐伯久美子	糖尿病学2013	2013年5月10日発行	2013

研究発表及び特許取得報告について

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Human ES/iPS-derived cells provide a breakthrough technology by creating innovative cell models for biomedical research	Saeki K	Therapeutics Discovery Symposium Asia on Small RNAs to Stem Cells and Epigenetic Reprogramming ASIA-2013	東京大学山上会館	2013年11月
PMA SK法によるヒト褐色脂肪細胞分化誘導過程における転写制御ネットワーク解析	西尾美和子、中原正子、佐伯晃一、長谷川護、湯尾 明、佐伯久美子	第34回日本肥満学会	東京大学山上会館	2013年10月
ヒト多能性幹細胞からの褐色脂肪細胞作成：基礎研究および臨床応用ツールとしての可能性	佐伯久美子	第56回日本糖尿病学会年次学術集会	熊本	2013年5月
前駆・成熟脂肪細胞からの分泌因子が引き起こす膵β細胞機能変化	宇田川陽秀、平本正樹、川口美穂、衛藤弘城、西村渉、南茂隆生、安田和基	第56回日本糖尿病学会年次学術集会	熊本	2013年5月
前駆・成熟脂肪細胞からの分泌因子が引き起こす膵β細胞機能変化	宇田川陽秀	第7回Diabetes Research Forum in Tokyo	東京	2013年4月
ヒト多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞の造血ストロマ機能の評価	佐伯久美子、西尾美和子、中原正子、米代武司、佐伯晃一、長谷川護、阿久津英憲、梅澤明弘、安田和基、戸辺一之、窪田和雄、斉藤昌之、湯尾 明	第12回日本再生医療学会総会	横浜	2013年3月
ヒト多能性幹細胞からの機能的褐色脂肪細胞の分化誘導	佐伯晃一、長谷川護、西尾美和子、湯尾 明、佐伯久美子	第35回日本分子生物学会年会	福岡	2012年12月
ヒトES/iPS細胞からの機能的褐色脂肪細胞の分化誘導	西尾美和子、中原正子、戸辺一之、斉藤昌之、湯尾 明、佐伯久美子	第33回日本肥満学会（若手研究奨励賞（YIA）講演）	京都	2012年10月
ヒト多能性幹細胞（hESC/hiPSC）からの機能的褐色脂肪細胞の作製	佐伯久美子	第33回日本肥満学会（シンポジウム）	京都	2012年10月
Production of functional classical brown adipocyte from human pluripotent stem cells using a special differentiation cocktail without genetic manipulation	Saeki K, Nishio M, Nakahara M, Saeki K, Hasegawa M, Yuo A	Benzene Symposium	Copenhagen, Denmark	2012年8月
Brown adipocyte differentiation of human pluripotent stem cells without genetic manipulation	Nishio M, Nakahara M, Saeki K, Hasegawa M, Yuo A, Saeki K	The 10th Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research	横浜	2012年6月

研究発表及び特許取得報告について

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。