

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, IL-6, SCF, Flt-3L, 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, IL-6, SCF, Flt-3L, 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UCP1を初めPGC1A, 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, PAX3/7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。

まず、ヒト ES/iPS 細胞から作製した褐色脂肪細胞 (brown adipocyte; BA) (以下、ヒト BA) をリンガー液で 16 時間培養して得られた上清を用いて諸検討が実施できるよう実験条件を決定した。これにより血清や血清代替物を含まない「夾雑物の極めて少ないクリアな上清」を出発材料として用いることができ、以後の精製作業を有利に進めることができた。そして、上記の方法で調製したヒト BA 上清をマウスに投与すると、翌日の経口ブドウ糖負荷試験にて空腹時血糖値低下、ブドウ糖負荷 30 分後血糖値低下と血中インスリン値の上昇が観察されたことから、ヒト BA 上清は「インスリン分泌促進因子」と「インスリン感受性亢進因子」の両方を含んでいることが確認された (in vivo 試験)。

#### ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞から誘導した褐色脂肪細胞の造血支持能

我々の培養系においては、造血因子を含むサイトカインカクテルがヒト ES/iPS 細胞から褐色脂肪細胞を誘導することを明らかにした。また、造血の場である骨髄には脂肪細胞が多数存在して、骨髄の造血微小環境において何らかの役割を發揮している可能性が指摘されている。そこで我々は、今回の系において分化誘導されたヒト ES/iPS 細胞由来の褐色脂肪細胞が造血を支持するストローマ細胞として機能するか否かを検討した。まず、ヒト造血前駆細胞 (臍帯血中の CD34 陽性細胞) をヒト ES/iPS 細胞由来の褐色脂肪細胞とともに共培養して造血細胞が増加するか否かを NOG マウスの in vivo の系を駆使して検討した。その結果、マウス体内でのキメラ率は、共培養によって有意に増加することを観察した。さらに我々は、ヒト ES/iPS 細胞由来の褐色脂肪細胞が、IL-3、GM-CSF、G-CSF などの白血球を増加させる造血因子を産生していることも確認した。このような現象の生体内での普遍性に関してマウスの in vivo の系によって確認するために、5-FU による骨髄抑制の系に対するイソプロテレノールの造血促進効果を検討した。その結果、イソプロテレノール添加によりマウスの骨髄における白血球系の造血が促進されることが明らかとなった。そこでさらに、ヒトでの骨髄中の褐色脂肪細胞の存在の可能性を探るために、ヒト骨髄単核球における PRDM16、UCP1 の発現を PCR にて検討し、発現を確認することができた。以上のデータを総合すると、ヒト骨髄中にも褐色脂肪細胞が存在して造血微小環境を形成して、ストローマ細胞として貢献していることが示唆される。

#### ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞から作成した褐色脂肪細胞の保存、輸送

我々は、ヒト ES 細胞ならびにヒト iPS 細胞から褐色脂肪細胞分化誘導を分化誘導することに成功した。手法は、前半の浮遊培養、後半の接着培養からなる 2 段階培養法で、全過程を通じて無フィーダー無血清である (2 段階褐色脂肪細胞分化誘導技術)。分化培養開始後 10-14 日間で細胞質に微細な脂肪滴を有する細胞が誘導され、褐色脂肪細胞の代表的なマーカーである PRDM16、UCP-1 の発現が陰性対照のヒト白色脂肪細胞とは異なり顕著に確認された。UCP-1 のミトコンドリア局在確認が行われると同時に、そのような細胞の陽性率が 90-95%と、極めて純度の高い高効率な分化誘導であると判明した。

次に、民間企業との共同研究により、我々の作成した褐色脂肪細胞の保存、輸送に関わる検討を行った。常温での輸送はヒト i P S 細胞由来褐色脂肪細胞の生存性を顕著に低下させることが判明したため、4℃での細胞保存用に開発された冬眠剤 (Hibernate®-A, Life Technologies) の使用につき検討した。具体的には、我々が開発した2段階褐色脂肪細胞分化誘導培養技術における第1ステップで作製される細胞凝集体を冬眠剤に懸濁し1.5 ml チューブ内で4℃にて2日間保存した後、第2ステップ (i. e. 分化培地を用いて3日間CO2 インキュベータで培養する) を実施した。結果、通常に分化誘導した場合と同様に褐色脂肪細胞分化が達成された。即ち、殆どの細胞凝集体が培養皿に接着して生存し、かつほぼ全ての細胞において褐色脂肪細胞に特徴的な多胞性脂肪滴が観察された。また定量的PCRでは、褐色脂肪細胞に特徴的なマーカーであるUCP1およびPRDM16のメッセージが通常に分化誘導した場合と同等またはそれ以上に発現していることが確認された。

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, IL-6, SCF, Flt-3L, BMP4), and the second step is an adherent culture in the presence of similar cytokines (VEGFA, IL-6, SCF, Flt-3L, 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

Researchers には、分担研究者を記載する。

In the initial experiment, we prepared conditioned medium without serum of BA induced from human ES/iPS cells. By using conditioned medium described above, we observed improvement of oral glucose tolerance test in mice administered the conditioned medium, and the results suggested the presence of both insulin secretion stimulating factor and insulin-sensitivity promoting factor in the conditioned medium.

To confirm that our differentiation technique correctly reproduced classical BA development via myoblastic differentiation, the expression of a series of developmental markers was examined. Myoblastic MYF5 expression was transiently upregulated during the initial floating culture step of differentiation. Moreover, the expression of a paraxial mesoderm marker, platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  (PDGFRA) was upregulated. By contrast, the levels of immature mesenchymal stem cell marker, NG2 and PDGFRB, as well as a lateral plate mesoderm marker, VEGFR2 were reduced. The precedence of myoblastic differentiation was further confirmed by the transient induction of PAX3/7, which are involved in myogenic commitment. Thus, our method correctly mimics the classical BA development but not a white adipocyte pathway via immature mesenchymal stem cell differentiation. We further evaluated the detailed role of each hematopoietin. The absence of any one of the components of hematopoietic cytokines lowered the quality of BA differentiation, reducing cellular viability and/or percentages of multilocular lipid-containing cells. Gene expression studies further showed that VEGF was required for PRDM16 expression, whereas SCF, IL-6, or Flt-3L was required for subsequent UCP1 expression. Surprisingly, depletion of either SCF, IL-6, or Flt-3L paradoxically induced the expression of a white adipocyte marker, phosphoserine aminotransferase 1 (PSAT1), and a lateral plate mesoderm marker, VEGFR2. Thus, the hematopoietic cytokine is essential for the differentiation of human pluripotent stem cells into classical BA, and the omission of any of the hematopoietic cytokine components results in white adipocyte lineage commitment.

To examine possible hematopoiesis-stimulating activity of BA induced from human ES/iPS cells, human umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells were cultured on BA layers for 1 week in the absence of any recombinant hematopoietic cytokines. Then, floating cells were subjected to intrabone marrow transplantation (IBM-T) into alymphocytic NOG mice, and after 8 weeks, splenic chimerisms were measured to assess the expansion of CFU-S. For a control, CD34<sup>+</sup> cells were directly transplanted without culturing on BA layers. Splenic chimerisms were significantly higher in BA-cocultured CD34<sup>+</sup>-transplanted mice than in mice with direct transplantation. Moreover, percentages of human CD33-positive myeloid cells were larger in cocultured CD34<sup>+</sup>-transplanted mice, while no significant changes in B lymphocyte percentages were observed. These findings indicate that BA serves as a stroma for human umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells, promoting their expansion/differentiation and homing to the spleen. We also examined the expression of hematopoietic cytokines involved in the expansion and differentiation of committed hematopoietic progenitor cells. Various hematopoietin genes including thrombopoietin (TPO), IL-6, IL-3, GM-CSF, G-CSF, and erythropoietin (EPO) were expressed in BA. Moreover, the

expression levels of the hematopoietin genes in BA were upregulated by isoproterenol treatments, further supporting the notion that BA serves as stromal for committed hematopoietic progenitor cells. To evaluate in vivo relevance, we examined whether isoproterenol treatment could enhance the recovery from antitumor agent-induced myelo-suppression by enhancing the expansion/differentiation of MPCs. Mice were treated with 5-fluorouracile (5-FU), and bone marrow cells were collected and analyzed over time. As reported by others, 5-FU-treated mice were at the nadir at day 3, when a decline in total enucleated cell number as well as a reduction in early myeloid cells were observed. Although total cell number and the percentages of immature myeloid cell fraction and were eventually upregulated at day 7 as a sign of a recovery from myelo-suppression, the mice still suffered from a shortage of mature myeloid cells. By contrast, isoproterenol-treated mice showed higher enucleated cell number significantly larger mature myeloid cell fraction percentages.

We established feeder-free and serum-free two-step culture method for highly efficient production of 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 several hematopoietic cytokines, and the second step is an adherent culture in the presence of similar cytokines. We then performed several experiments regarding the storage and transportation of BA in cooperation with a company. In the initial experiment, we tested the ability of cell storage agent (Hibernate®-A, Life Technologies) to maintain viability of BA, because we observed that transportation of BA at room-temperature profoundly reduce the viability of BA. After incubating first step spheres in the agent (Hibernate®-A, Life Technologies) for 2 days at 4°C, second step differentiation culture was successfully performed, and the almost all cell in the sphere adhered to the culture plates and the differentiated cells showed multi-ocular lipid droplets with sufficient induction BA marker genes such as UCP1 and PDRM16.

## 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.  $\beta$ 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 $\beta$ 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

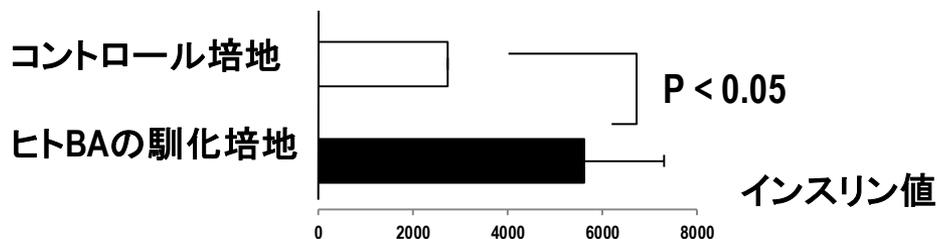
糖代謝改善効果に関し、陽性群(ヒトES由来BA、ヒトiPS由来BA) *versus* 陰性群(ヒト白色脂肪細胞、ヒトBRITE細胞)でマイクロアレイを行い、褐色脂肪組織に特徴的な8遺伝子(分泌蛋白コード)を抽出した。

### 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。

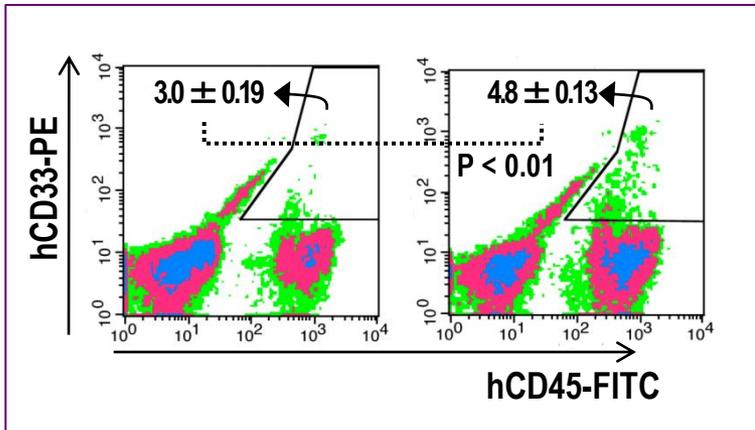
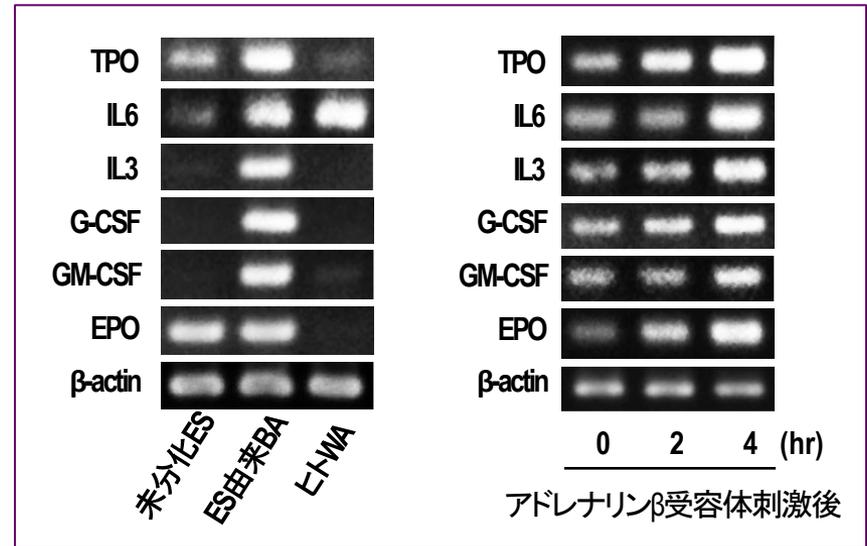
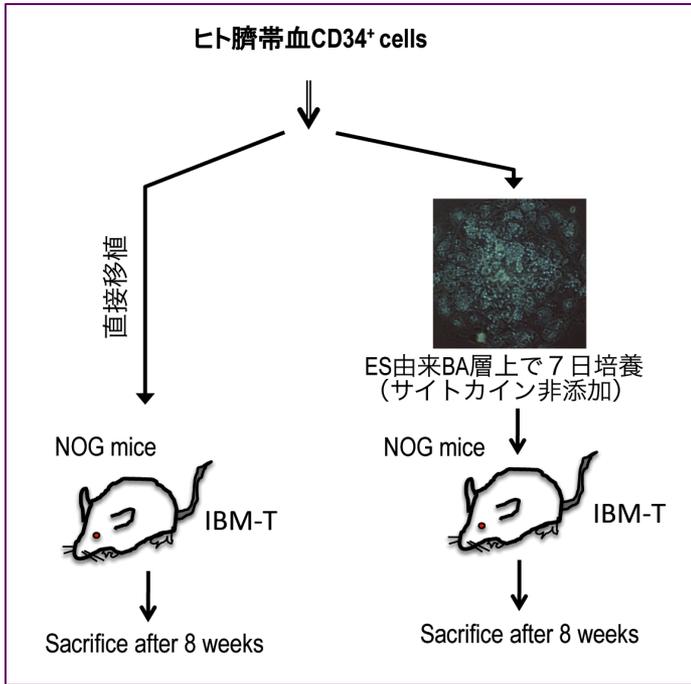
## 課題

# 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

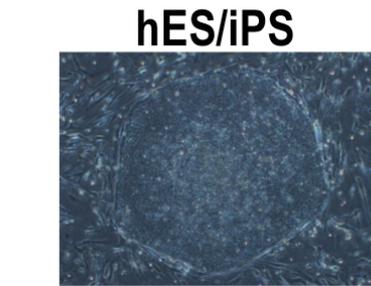


マウス膵β細胞(MIN-6株)におけるブドウ糖濃度依存性インスリン分泌能は「ヒトBA馴化培地」の添加により亢進した。責任分子の同定に向けて研究が進行中であるが、これからの論文発表と特許出願を控えて、その具体的な内容の公表は一切控えたい。

# ヒトES細胞由来の褐色脂肪細胞の造血支持能と造血因子産生

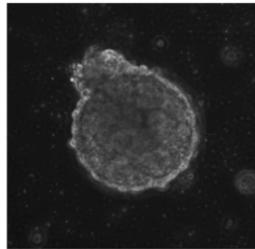


●ヒトES細胞由来の褐色脂肪細胞の輸送・販売  
 sphereの段階での**冷蔵**保存 → 再培養



浮遊培養  
(8日間)

細胞凝集体



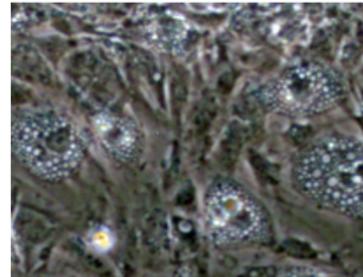
4°Cでの細胞保存用に  
 開発された製品  
 (Hibernate®-A, Life  
 Technologies)

この状態で国内  
 輸送が可能!!



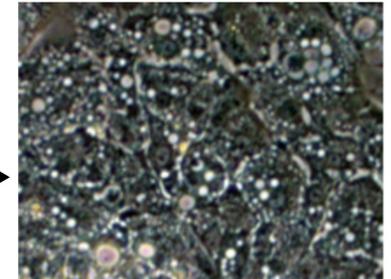
4°C保存(冬眠剤)  
 2日間  
 1.5ml チューブ

接着培養(3日)

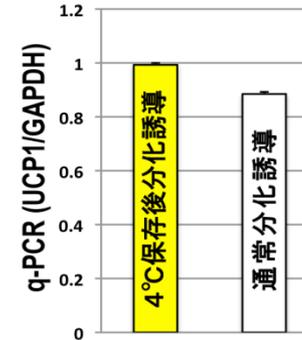


接着培養(3日)

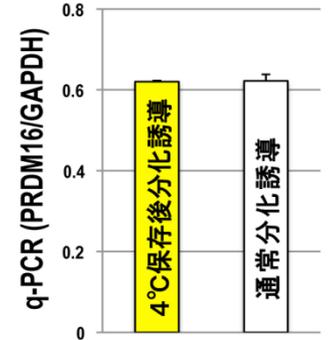
BAに特徴的な多胞性脂肪滴  
 がほぼ全細胞で検出される



UCP1



PRDM16



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、3T3-L1細胞とラット膵β細胞株 INS-1細胞とを用いた *in vitro* のモデル系を構築した。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、まずトランスウェルを用いた両者の共培養系の構築を目指したが、INS-1細胞が培地組成にきわめて sensitive であるため維持できなかった。そこで 3T3L1細胞を、常法に従い *in vitro* で分化させる系を用いて、分化前、分化後の細胞の培養上清 (以下、それぞれ「Pre CM」、「Day 8 CM」) を回収し、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。特に後者の「Day 8 CM」は、肥満やメタボリックシンドローム等でみられる膵β細胞障害 (いわゆる脂肪毒性) のモデルとなるのではないかと予想していた。

「Day 8 CM」曝露により、予想通りグルコース反応性インスリン分泌は有意に低下した。一方、コントロールとして考えていた「Pre CM」曝露により、グルコース反応性インスリン分泌は予想に反して著明に上昇した。それぞれの CM 中の活性成分の性質を、熱処理やプロテアーゼ処理などを用いて検討したところ、「Pre CM」中の活性はこれらの処理で消失したため恐らくタンパク成分であり「Day 8 CM」中のインスリン分泌抑制活性は消失しなかったため、脂質を含む非タンパク性成分と考えられた。

「Pre CM」中の活性成分を同定するために、分化前後の 3T3L1細胞を用いてマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現比較を行い、分化前に発現の高い遺伝子のなかから、分泌タンパクに注目し、有望な候補分子を得ている。またインスリン分泌促進のメカニズムを探るために、「Pre CM」曝露前後の INS-1細胞の網羅的遺伝子発現解析を行ったが、古典的なグルコース依存性インスリン分泌に関わる分子に変化はみとめなかった。

「Day 8 CM」のインスリン分泌障害を惹起する因子の本体を探るために、メタボローム解析も行ったが、さまざまな分子の濃度に変化がみとめられたものの、まだ本体解明には至っていない。一方、インスリン分泌障害のメカニズムを探るために、マイクロアレイ (Affymetrix GeneChip システム) を用いて、「Day 8 CM」曝露前後の INS-1細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、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 protein 1) 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 *in vitro* 実験、モデルマウスを用いた *in vivo* の実験から、

- 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) 「Day 8 CM」によるインスリン分泌抑制作用はNecab1の発現抑制により軽減するため、少なくとも一部はNecab1の発現増加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) マウス膵では膵島、主に $\beta$ 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 $\beta$ 細胞の機能が低下してゆく時期に一致して一過性に発現上昇がみられること

などが明らかになった。

現在、こうした脂肪組織（及び前駆脂肪細胞）由来で膵 $\beta$ 細胞に影響を及ぼす成分の本体の探索を継続しているが、「Day 8 CM」によるインスリン分泌抑制作用やNecab1発現増加について、膵 $\beta$ 細胞に発現するグルコルチコイド受容体が寄与している可能性が見出され、この点からも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組織（WAT）由来の生理活性物質及びその膵 $\beta$ 細胞への影響を探索することは、それ自体肥満や糖尿病との関連で興味深いのが、さらに褐色脂肪組織（BAT）由来のインスリン分泌促進因子と調節機能や病歴における意義を比較検討する上で、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
「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
Feeder-free and serum-free production of hepatocytes, cholangiocytes, and their proliferating progenitors from human pluripotent stem cells: application to liver-specific functional and cytotoxic assays.	Nakamura N, Saeki K, Mitsumoto M, Matsuyama S, Nishio M, Saeki K, Hasegawa M, Miyagawa Y, Ohkita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Yuo A	Cell Reprogram	14:171-185	2012

研究発表及び特許取得報告について

Production of functional classical brown adipocytes from human pluripotent stem cells using specific hemopoietin cocktail without gene transfer.	Nishio M, Yoneshiro T, Nakahara M, Suzuki S, Saeki K, Hasegawa M, Kawai Y, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Tobe K, Yuo A, Kubota K, Saito M, Saeki K	Cell Metab	16:394-406	2012
ヒトES/iPS細胞からの褐色脂肪細胞分化誘導.	西尾美和子, 佐伯久美子	医学のあゆみ	242(12):930-936	2012
Association of adulthood weight gain with circulating adipokine and insulin resistance in the Japanese population.	Kimura Y, Pham NM, Yasuda K, Nanri A, Kurotani K, Kuwahara K, Akter S, Sato M, Hayabuchi H, Mizoue T.	Eur J Clin Nutr	69(4)	2015

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Dual roles for endothelial cells in arteriosclerosis development: unexpected impacts of human iPS-derived endothelial cells on ischemic disease control.	Saeki K, Nishio M, Nakahara M, Yuo A	The 8th Annual Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell	Busan, Korea	2015年3月
Regulator of G-protein signaling (RGS-5)による血管内皮細胞の品質管理に寄与するキナーゼの同定。	中原正子、西尾美和子、湯尾 明、佐伯久美子	第14回日本再生医療学会総会	横浜	2015年3月
血管内皮細胞による血管平滑筋増殖抑制の機序：動脈狭窄症の新規治療開発に向けて。	西尾美和子、中原正子、湯尾 明、佐伯久美子	第14回日本再生医療学会総会	横浜	2015年3月
動脈狭窄の新規治療開発に向けた新しい細胞モデル系の開発。	西尾美和子、中原正子、湯尾 明、佐伯久美子	日本内分泌学会第32回内分泌代謝学サマーセミナー	山梨	2014年7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	東京国際フォーラム	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

研究発表及び特許取得報告について

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（Y I A）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	Benzone 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
血管内皮細胞による血管平滑筋増殖抑制の機序：動脈狭窄症の新規治療開発に向けて。	中原正子、西尾美和子、佐伯晃一、長谷川護、湯尾 明、佐伯久美子	第11回日本再生医療学会総会	横浜	2012年6月
ヒト多能性幹細胞からの機能的褐色脂肪細胞の作製。	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55回日本糖尿病学会年次学術集会	横浜	2012年5月
「脂肪細胞培養上清によるグルコルチコイド受容体を介した膵β細胞機能変化」	宇田川陽秀、舟橋伸昭、平本正樹、川口美穂、西村渉、南茂隆生、安田和基	第58回日本糖尿病学会年次学術集会	下関	2015年5月
「前駆・成熟脂肪細胞由来液性因子による膵β細胞機能変化」	宇田川陽秀、平本正樹、舟橋伸昭、川口美穂、西村渉、南茂隆生、安田和基	第35回日本肥満学会	宮崎	2014年10月
「脂肪細胞由来液性因子による新規インスリン分泌調節因子の発現誘導と膵β細胞機能変化」	宇田川陽秀、平本正樹、舟橋伸昭、川口美穂、南茂隆生、西村渉、安田和基	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	2014年5月

研究発表及び特許取得報告について

「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

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
肥満を防ぐ細胞 iPSから作製	佐伯久美子	日本経済新聞		2012年7月10日
iPSから「やせる細胞」 脂肪燃焼機能メタボ改善に期待	佐伯久美子	産経新聞		2012年10月16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
多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞、多能性幹細胞由来細胞凝集物と、その製造方法及び細胞療法、内科療法	特許出願 PCT/JP2012/61212	独立行政法人国立国際医療研究センター、ダイナベック株式会社	2012年4月26日	国際
霊長類動物胚性幹細胞の培養及び継代方法、並びにその分化誘導方法	特許第5067949号	独立行政法人国立国際医療研究センター、田辺三菱製薬株式会社	2012年8月24日	国内

※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。