

課題番号 : 27指1202 (3年研究2年目)
研究課題名 : ヒトES/iPS細胞由来褐色脂肪細胞を活用した糖尿病を標的とした新規予防/治療法の開発
主任研究者名 : 佐伯久美子、小林徳彦
分担研究者名 :
キーワード : エネルギー・糖質代謝異常、脂質代謝異常、医薬品探索、再生医学、細胞分化
研究成果 :

世界の肥満人口は増加傾向にあり、10年後には世界の成人の約20%が肥満になると推定されている。特に、中国・インド・ブラジルなどの新興国における肥満者数の増加は著しく、大きな社会問題となっている。肥満は糖尿病の発症を助長するだけでなく、死因の上位を占める諸疾患(脳血管障害、虚血性心疾患、悪性新生物等)のリスクを上昇させることから、その対策は急務となっている。すなわち、肥満および糖尿病の新規予防・治療開発は、日本人の健康寿命の延伸のみならず、世界の人の健康と福祉に大きく貢献するものであり、国際保健と生活習慣病対策を2大ミッションとする当センターの最重要課題である。

近年、高い熱産生能を持つ「褐色脂肪組織(Brown Adipose Tissue; BAT)」が世界的に注目されている。当初は、BATは脂肪燃焼によるカロリー消費を介して肥満防止に寄与すると考えられていたが、熱産生とは独立の作用により糖代謝を改善していることが文献的考察から提唱されている(Reviewed by Kobayashi et al., Med Res Arch 4: No 7, 2016)。すなわち「肥満防止」としての位置付けだけでなく「糖尿病の予防/治療開発」の観点からBATの生理的意義が見直されている。さらに最近では、BATと同等の熱産生能を持つと言われるベージュ細胞(注:慢性寒冷環境において白色脂肪組織中に出現する、白色脂肪細胞とBAの中間的形態を示す脂肪細胞)に関して、従来とは異なる概念が提唱されている。これまでベージュ細胞はカロリー消費を促進して糖代謝を改善する可能性が想定されていたが、マウスを持続的温暖環境(thermoneutrality)で飼育するとBATが機能変性してベージュ細胞マーカーを発現するようになることが示され、ベージュ細胞はBAのダウングレード体として考えるべきであるという考えが提唱されている。我々も、ベージュ細胞は熱産生能に必要なUCP1遺伝子高発現している、BAで観察される「移植翌日の糖代謝改善作用(熱産生を介さない耐糖能向上作用)」を欠如することを見出している(佐伯久美子、糖尿病学2013)。以上、BATは熱産生によるカロリー消費とは独立の機序で糖代謝改善作用を発揮していると考えられる。しかしその実態は不明である。研究が遅れていた理由は、解析に必要な「高品質な褐色脂肪細胞(Brown Adipocyte; BA)」が入手困難であるためである(注:ヒト検体は倫理的問題から入手不能であり、マウス検体も採取後は速やかに機能変性を起こす)。我々はこの問題を克服すべく、無限増殖能と多能性分化能を持つヒト多能性幹細胞(胚性幹(ES)細胞、iPS細胞)から高機能性BAを高純度に作製する技術を開発した(Nishio et al, Cell Metabolism 16, 394-406, 2012; 国際特許:日本・米国・豪州で査定発行済み)。これにより、それまで不可能であったヒトBAの発生過程、糖代謝改善作用の分子機序を解析することが可能となった。

本研究では、我々が開発した「ヒトES/iPS細胞からのBA作製技術」を駆使して、ヒトBAの糖代謝改善作用の分子基盤を明らかにする。これまでに我々は、ヒトBAの培養上清(BA-SUP)には糖代謝改善作用を持つ複数の新規可溶性因子が存在することを見出しており、本研究ではこれらの因子を純化して分子構造を決定する。本年度の成果として、複数種のカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(High performance liquid chromatography: HPLC)により、これらの因子の半精製物を得ることに成功している。今後はHPLCによる純化作業をさらに進め、1年以内に目的因子の分子構造を同定する。また本研究では、未踏襲領域として残されている「ヒトBAの初期発生過程」の制御機構を解明し、糖尿病治療薬の開発を目指した新規創薬標的分子を同定する。本年度の成果として、BA前駆体として知られる筋芽細胞への分化段階(Day6)よりも早い分化段階(< Day 3)で誘導される遺伝子Xを同定している。さらに遺伝子Xのノックアウトマウスを作製して糖代謝を解析したところ、高脂肪食負荷に依存してインスリン分泌不全を伴う高度耐糖能障害を発症することを見出した。今後は、遺伝子Xノックアウトマウスの耐糖能障害がBAT機能不全によるものであることを実証するとともに、BA-SUPから同定した糖代謝改善因子の投与による耐糖能障害の改善の有無につき検証する。

Subject No. : 27-Shitei-1202 (the second year of a three-year project)
Title : Development of preventives/therapeutics for glucose metabolic disorder unitizing human ES/iPS cell-derived brown adipocytes.

Researchers : Kumiko SAEKI, M. D., Ph. D., Norihiko KOBAYASHI, Ph. D

Key word : energy/glucose metabolic disorder, lipid metabolic disorder, search of new pharmaceuticals, regenerative medicine, cell differentiation,

Abstract : The population of obese subjects in the world is becoming increasing larger. It is estimated that about 20 % of adult humans will suffer from obesity in 10 years if this tendency continues. Especially, the increase in the incidence of obesity is dramatic in emerging nations such as China, India and Brazil, where the issue of obesity has become a very serious social problem. Since obesity promotes the development of diabetes and other life-threatening diseases including cancers, cerebrovascular diseases, ischemic heart diseases and pneumonia, control of obesity is an urgent task for the health and welfare in the world. Particularly, to develop new therapies for the management of diabetes and also to make a significant contribution to global health is the two major missions of National Center for Global Health and Medicine (NCGM).

Recent years, brown adipose tissues (BAT), which are known to have exceedingly high capacities for heat production, have been attracting an increasing attention in the world. Although it is generally considered that BAT contributes to prevention of obesity by calorie consumption *via* fat burning, the mechanism of how BAT improves glucose metabolism is not well understood. Since there is a considerable discrepancy in the severity of obesity and glucose intolerance between *ucp1* knockout mice and BAT-depleted mice, it has long been hypothesized that BAT would contribute to obesity prevention and glucose metabolism improvement in a thermogenesis-independent manner. Nevertheless, the difficulty in obtaining high-quality BA specimens had been an impediment to the performance of detailed BAT studies. We have overcome the hurdle by establishing a method for a directed differentiation of human pluripotent stem cells into functional brown adipocytes (BA) without gene transfer (Nishio et al, Cell Metabolism 16: 394-406, 2012). Applying this method, we showed that transplantation of human pluripotent stem cell-derived BA (human BA) improved glucose metabolism of the human white adipocytes (human WA)-transplanted mice as early as the following day of transplantation. The promptness of the effect of transplanted human BA suggests that BA improves glucose by other mechanisms than a secondly consequence of body weight loss due to augmented calorie consumption.

Currently, we are trying to elucidate the molecular basis for the prompt curative effects of human BA on glucose metabolism disorders. We are also trying to elucidate the transcriptional network system involved in the regulation of early-phase BA differentiation by applying a new method of an integrated transcription velocity analysis. As an achievement of the current year, we determined a key gene for early-phase BA differentiation, whose knockout mice underwent severe glucose metabolism disorders under high fat diet. We will continue our study to identity the crucial effector molecules for BA-induced improvement of glucose metabolism.

【27指1202】

「ヒトES/iPS細胞由来褐色脂肪細胞を活用した糖尿病を標的とした新規予防/治療法の開発」

主任研究者:

国立研究開発法人 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
同上級研究員 小林 徳彦

【要約】

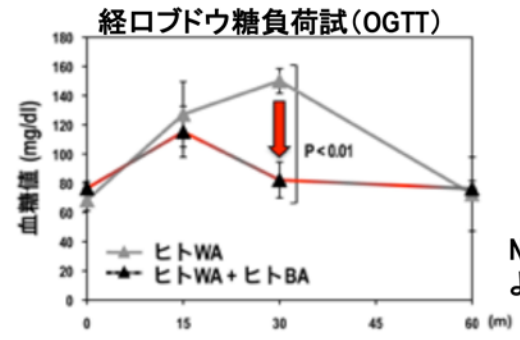
糖尿病は単独でも日本人死因10位であるが、死因の上位を占める疾患群(悪性新生物・脳血管障害・虚血性心疾患・肺炎)のリスクを増大させるため健康に与える影響は深刻である。近年「燃える脂肪」として褐色脂肪細胞(BA)が注目されているが、我々は「ヒト多能性幹細胞のBA分化誘導技術」(Nishio et al, Cell Metabolism 16, 394-406, 2012)を開発し、この技術を駆使してBAが熱産生作用とは独立に糖代謝改善作用を発揮することを見出した。本研究では「BAによる糖代謝改善の分子基盤」を明らかにするとともに、未踏襲領域として残されている「BA初期分化過程を制御する分子機序」を解明することで糖尿病の新規予防/治療法の開発に取り組む。

H28年度の
外部発表

- 原著論文(Yudasaka M et al. Sci Report 7: 44760).
- 英文総説(Kobayashi N et al. Med Res Arch Vol 4, No 7, 2016)
- 学会口演: 第37回日本肥満学会シンポジウム(小林ら)、第39回日本分子生物学会シンポジウム(小林ら)

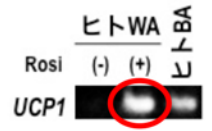
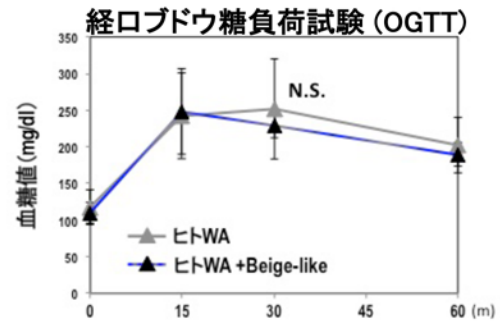
課題1 ヒトBAの糖代謝改善作用の分子基盤の解明

ヒトBAの移植 (16時間後)



Nishio et al., Cell Metab 2012
より改変転載

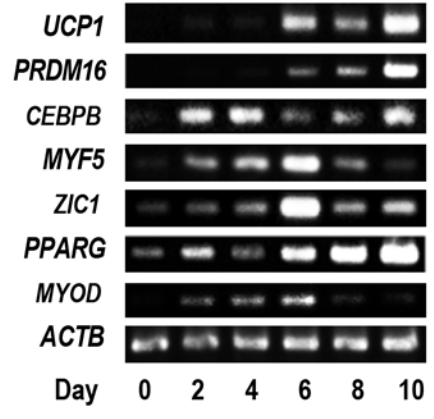
ヒトBeigeの移植 (16時間後)



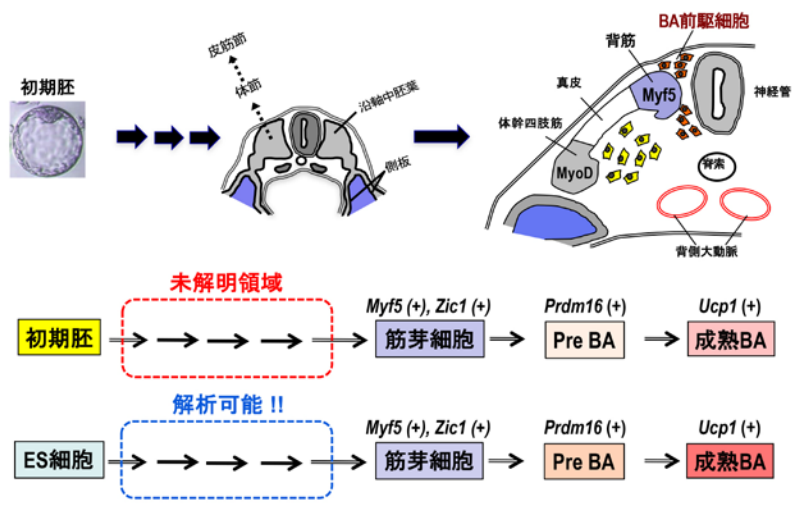
ヒトBeigeは、ヒトWAをPPARGアゴニストで1週間処理してUCP1を誘導したもの。(佐伯、糖尿病学2013より改変転載)

ヒト多能性幹細胞由来BA(ヒトBA)はヒト白色脂肪細胞(ヒトWA)移植に伴う耐糖能悪化を阻止する(左)。一方、BAと同等の熱産能を持つとされるBeige細胞(UCP1陽性)はヒトWA移植に伴う耐糖能悪化を阻止することができない(右)。このように、ヒトBAは熱産生とは独立に糖代謝を改善しており、それは可溶性因子を介した作用であることが示唆される。本研究ではこの因子を同定することを目標としている。

課題2 ヒトBA初期分化過程の解析 (Day 0 ~ Day 3)



(Nishio et al., Cell Metab 2012より)



マウス研究からBAは筋芽細胞(注: ES細胞か)なお分化誘導系ではDay 6に相当)に由来することが解っているが、それ以前の発生過程は不明である。本研究では『網羅的転写速度解析』の技術を駆使して、ヒトBAの初期分化過程の分子基盤を解明し糖尿病治療の新規創薬標的分子を同定する。本年度は「分化初期(< Day 3)に発現が誘導される遺伝子」を同定した。またこの遺伝子のノックアウトマウスは高脂肪食負荷により糖尿病を発症することを見出した。本モデルは「BAT機能不全に起因する2型糖尿病」の病態解析の優れたツールと考えられる。今後は本マウスにおけるBAT機能を詳細に解析をする計画である。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 27指1202

研究課題名： ヒトES/iPS細胞由来褐色脂肪細胞を活用した糖尿病を標的とした新規予防/治療法の開発

主任研究者名：小林徳彦

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Near-infrared photoluminescent carbon nanotubes for imaging of brown fat	Masako Yudasaka, Yohei Yomogida, Minfang Zhang, Takeshi Tanaka, Masako Nakahara, Norihiro Kobayashi, Yuko Okamatsu-Ogura, Ken Machida, Kazuhiko Ishihara, Kumiko Saeki & Hiromichi Kataura	Scientific Reports	7:44760 DOI: 10.1038/srep44 760	2017
Could “brown adipose tissue failure” be a cause of metabolic syndrome?	Kobayashi N, Nakahara M, Oka M, Saeki K	Med Res Arch	Vol 4, No 7	2016
Human pluripotent stem cells: Towards therapeutic development for the treatment of lifestyle diseases.	Miwako Nishio, Masako Nakahara, Akira Yuo, Kumiko Saeki	World J Stem Cells	8:56-61	2016
HIF-1 α in myeloid cells promotes adipose tissue remodeling toward insulin resistance.	Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A, Kado T, Okabe K, Yamamoto S, Aminuddin A, Senda S, Tsuneyama K, Ikutani M, Watanabe Y, Igarashi Y, Nagai Y, Takatsu K, Koizumi K, Imura J, Goda N, Sasahara M, Matsumoto M, Saeki K, Nakagawa T, Fujisaka S, Usui I, Tobe K	Diabetes	65(12):3649- 3659	2016
褐色脂肪細胞の再生	佐伯久美子	BIO Clinica	第31巻	2016

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
血管内皮細胞の品質管理におけるmicroRNAの関与.	中原正子、小林徳彦、 岡 雅子、湯尾 明、 佐伯久美子	第16回日本再生医療学 会総会	仙台	2017年3月
ヒト多能性幹細胞からの褐色脂肪細胞分化誘導.	小林徳彦 西尾美和子 湯尾 明 佐伯久美子	第39回日本分子生物学 会年会	横浜	2016年11月
ヒト褐色脂肪細胞特異的モノクローナル抗体の作製：メ タボリック症候群の新規治療開発に向けて.	小林徳彦、西尾美和 子、佐伯久美子	第37回日本肥満学会	東京	2016年10月

研究発表及び特許取得報告について

SeVベクターを用いた褐色脂肪細胞の細胞内温度測定.	佐伯晃一、川口実太郎、佐伯久美子、湯尾明、井上誠	第39回日本分子生物学会年会	横浜	2016年11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
該当なし				

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)		(佐伯久美子、湯尾明、西尾美和子、川崎正子、佐伯晃一、長谷川護)	(2012/4/26)	(PCT出願後、日本・オーストラリア・中国・欧州・米国への移行手続き中)

※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。