

課題番号 : 27指1202 (3年研究3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 : 小林徳彦

分担研究者名 : なし

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る。特に、新興国における肥満者数の増加は著しく、大きな社会問題ともなっている。肥満は糖代謝障害（インスリン抵抗性、2型糖尿病）の発症を助長する。世界における糖代謝障害（前糖尿病・糖尿病）の有病者は4億人を超えると推定されており、その制圧に向けた対策は世界的に緊急性の高い課題となっている。肥満であるだけでも腎機能障害の発症要因となるのが最近明らかになっているが、糖尿病を発症すると、腎障害の重症化とともに、糖尿病性網膜症による視覚障害、糖尿病性神経障害による知覚異常、を合併することで日常生活の質（Quality of daily life）は著しく低下する。さらに糖尿病は、死因の上位を占める疾患（脳血管障害、虚血性心疾患、悪性新生物、肺炎等）の発症リスクを上昇させるという問題もある。このように、肥満及び糖代謝障害の予防/治療法の開発は、日本および世界の健康寿命の延伸に向けた鍵となるものであり、国際保健と生活習慣病対策をミッションとする当センターの最重要課題でもある。

近年、前糖尿病（インスリン抵抗性）や糖尿病（インスリン分泌障害）の新たな治療標的として『褐色脂肪組織(Brown Adipose Tissue; BAT)』が注目されている。BATは小型冬眠動物で発見された熱産生性脂肪である。ヒトでの存在については議論が続いていたが、2009年にヒト成人におけるBATの存在が相次いで報告された。マウスでの研究から、BATには肥満防止と脂質/糖代謝亢進の作用があることが示されている。また、ヒトでの臨床研究からも、中年太り防止と血糖降下の作用があることが示唆されている。BATを構成する褐色脂肪細胞(Brown Adipocyte; BA)は多胞性脂肪滴と豊富なミトコンドリアが細胞質に存在し、一つ一つのBAに対して交感神経末端が接続している。また発生学的には骨格筋前駆細胞（筋芽細胞）に由来するなど、他の脂肪細胞にはない特徴を持つ。アドレナリン受容体からのシグナルによりBAが活性化されると、脂肪滴中の中性脂肪が分解され、産出された脂肪酸がミトコンドリア内膜の脱共役蛋白UCP1を開口させ、非共役呼吸を促進することで基質に蓄えられた化学エネルギーを熱エネルギーとして放出する。このようにしてBAは高い熱産生能を発揮する。しかし、BATの代謝改善作用の全てが熱産生能に依存するものではないことも示唆されている。BATを欠如するよう遺伝子改変したマウスは、生後早い段階からの高度肥満と、重度の糖代謝障害を発症するが、BATの熱産生能だけを欠如させたUCP1ノックアウトマウスは肥満も糖代謝障害も呈さない。このことから、BATの代謝改善作用の主体は熱産生以外の機能、すなわち「可溶性因子を介した作用」であることが示唆されてきた。同様のことはヒトでの研究からも示唆されている。ヒト成体のBAT量は50g - 100gであり、全身でのBATによる熱消費の総量は1日15 - 25キロカロリー程度と試算されている。深部体温と肥満度に相関がないことを報告した臨床研究もある。これらのことから、BATの肥満防止、糖代謝改善の作用は、熱産生とは独立の機能であるという考えが広まってきている。そして、BATが分泌する可溶性因子をBATokine(バトカイン)と総称し、その探索が世界的に推進されている。これまでにFGF21やIL6などのサイトカイン、12,13-diHOMEなどの脂質メディエータ、miRNA-99bなどのマイクロRNAがBATokineとして報告されているが、これらがどのような状況でどの程度の代謝改善に寄与しているのかは不明な点が残されており、BATokinesの実態は十分に解明されているとは言えない。

BATokineの探索に向けた研究が遅れている理由として「高品質なBAの安定的入手が極めて困難であること」が挙げられる。ヒト検体の入手は、以下のような理由によりほぼ不可能である。BATの体内分布は、事前に寒冷刺激(19℃、2時間)を負荷した後に核医学検査(¹⁸F-FDG-PET/CT検査)を施行することで可視化されるが、検出効率には季節差があること知られており、確実にBATを検出するためには冬季に検査を行う必要がある。また、BATが安定して検出されるのは20代前半以下の若年層であるが、若年ボランティアに放射線被曝のある検査を研究目的で施すことへの倫理的課題、BAT検体の

採取により将来的にメタボリック症候群の発症リスクが増大する危険性が除外できないという医学的課題がある。またマウス BAT は、種々の蛋白分解酵素(トリプシン系、キモトリプシン系)を高レベルに発現しており(組織発現量は膵臓に次いで第2位)、検体の採取後は速やかに機能変性を生じる。またヒト BAT もマウス BAT も、培養及び凍結保存のための技術はない。このように、BATokine 研究を推進するためには「良質の研究材料を安定的に入手する方策を確立すること」が前提となる。ここで我々は『ヒト多能性幹細胞から高機能性 BA を高純度で作製する技術』を開発してこの問題を克服している(Nishio et al, Cell Metabolism 16: 394-406, 2012; 国際特許出願: 日本・米国・濠州・中国で特許登録)。すなわち、それまで不可能であった BA の糖代謝改善作用の分子基盤、さらにはヒト BA の発生過程における遺伝子発現制御ネットワーク、を解析するためのツールは整えられている。

本研究では「ヒト多能性幹細胞から作製した BA (以下、ヒト BA)」を独自の研究ツールとして活用し、ヒト BA の糖代謝改善作用の分子基盤の解明に挑んだ。我々は、ヒト BA の培養上清 (BA-SUP) をマウスに皮下投与すると、16 時間の絶食後に測定した空腹時血糖値が有意に低下すること、同じく 16 時間の絶食後に施行した経口ブドウ糖負荷試験において、ブドウ糖負荷 15 分後の血清インスリン値が上昇すること、を見出した (インビボの作用)。またマウス膵β細胞に BA-SUP を添加するとブドウ糖濃度に関係なくインスリン分泌量が増大すること、この反応は緩徐な作用であったこと、またヒト及びマウスの骨格筋細胞に BA-SUP を添加するとグルコーストランスポータ遺伝子の発現が上昇し、かつブドウ糖取込み量も増大すること、さらに、マウス膵β細胞に BA-SUP を添加するとグルコーストランスポータ遺伝子の発現レベルが上昇すること、かつブドウ糖取込み量も増大すること、を見出した (インビトロの作用)。これらの結果からは、BA-SUP には、1) 膵β細胞のインスリン基礎分泌を促進する、2) 膵β細胞のグルコーストランスポータ遺伝子の発現を上昇させてインスリン初期分泌を促進する、3) 骨格筋のグルコーストランスポータ遺伝子の発現を上昇させてインスリン感受性を亢進させる、という、少なくとも 3 つの異なる作用があることが示唆され、BA-SUP には糖代謝改善作用を持つ新規可溶性因子が存在することが強く示唆された。そこで、これらの活性を担う因子の分子構造を決定すべく、それぞれの活性を示す因子の純化を試みている。今後は因子の構造を決定するとともに、その受容体の同定に向けて研究を展開する。これらの一連の因子が同定されると、前糖尿病におけるインスリン抵抗性の治療 (骨格筋細胞でのブドウ糖取込亢進)、初期糖尿病におけるインスリン初期分泌不全の治療 (膵β細胞のブドウ糖取込亢進)、後期糖尿病におけるインスリン基礎分泌不全の治療 (膵β細胞のインスリン分泌促進)、に向けたシーズが提供され、単独または既存の治療薬と組み合わせることで、新たな治療法が開発されることが期待される。

また本研究では、糖代謝障害の予防・治療開発のための新規創薬標的分子を同定すべく、未踏襲領域として残されている「ヒト BA の初期分化過程」で機能する遺伝子発現制御ネットワークの解明にも挑んだ。具体的には、BA 前駆体である筋芽細胞への分化段階 (Day 6) よりも早い段階 (< Day 3) で発現が誘導される遺伝子群を探索する目的で、BA の初期分化過程 (3 h - 72 h) における多時点 (2 時間 ~ 6 時間の間隔の合計 19 点) でマイクロアレイ解析を実施し、遺伝子発現の変動を追跡した。興味深いことに、Day3 (72 h) までは多能性幹細胞マーカーである NANOG, OCT4, SOX2 の発現は高値のまま維持されていたが、多数の遺伝子において発現量は大きく変化することが確認された。即ち、この段階ですでに BA へと向かう分化指向性は決定されていることが考えられた。なお、アレイに搭載されている 50737 個のプローブのうち、重複を除き、かつ蛋白をコードする遺伝子に絞った、合計 23,541 個のプローブのデータを用いて主成分分析を行ったところ、第 1 から第 3 までの 3 つの主成分を用いて全遺伝子変動の 90% 以上を説明できることが解り、我々の BA 分化誘導技術の分化指向性の高さが再確認された。驚くべきことに 12 h - 14h のわずかに 2 時間において遺伝子発現様式が劇的に変化することも判明した (図 1)。ヒト多能性幹細胞は未分化維持状態において、遺伝子のプロモータ領域におけるヒストン修飾を調べると、活性型 (開いたクロマチン) と非活性型 (閉じたクロマチン) の両方のマークが検出されることがよく経験される。このため、未分化多能性幹細胞では、蛋白発現を伴わないメッセンジャー RNA 発現が検出される、いわゆる leaky expression の状況がしばしば観察される。12h から 14h にかけての劇的な遺伝子発現変動は、このような両価的ヒストン修飾 (bivalent histone modification) による未分化多能性幹細胞の leaky expression をシャットオフし、高い指

向性を持って分化を誘導するための遺伝子発現制御系システムが稼働し始めたことを意味するものと考えて、現在、さらなる解析を進めている。興味深いことに、この時間帯において、ヒト多能性幹細胞の未分化維持に重要な WNT/beta-catenin シグナル軸を阻害するエピゲノム制御因子 X の発現が急峻に誘導されることを見出している。BA 分化の最も初期段階に生じる「高指向性 BA 分化誘導に向けた決定的な一撃」となるシグナルの同定に向けて、今後も解析を続行する計画である。

また、上記の多時点マイクロアレイ解析に加えて、分化誘導過程にあるサンプルを転写阻害剤であるアクチノマイシン D で処理した後に時間経過を追って実施したマイクロアレイ解析を行うことで、各遺伝子のメッセンジャーRNA の「半減期」を測定した。こうして得られたメッセンジャーRNA 半減期に関する網羅的解析と、上記の遺伝子発現量に関する網羅的解析のデータを統合して分析することで、「転写速度」に関する網羅的解析を行うことが可能となる。このような「網羅的転写速度解析データ」をもとに、BA 分化誘導過程で機能する新規なオート/パラクライン因子の探索を行った。具体的には、BA 分化誘導培地に添加しているサイトカインカクテルの直下で機能する転写因子群をコードする遺伝子の転写速度を調べ、遺伝子発現に劇的な変化が見られる 12 h より前の時間帯において転写速度に減衰振動が見られることを確認した (図 2)。この現象は、サイトカインの直下で機能する転写因子は、サイトカインシグナルによりリン酸化(活性化)されて核内に移行すると転写活性化後にユビキチンシステムで分解されること、この分解により減少する分を補うために当該転写因子をコードする遺伝子の転写が促進されること、というネガティブフィードバックシステムの存在により説明が可能である。もし、BA 分化誘導過程で多能性幹細胞自身が分泌するオート/パラクライン因子が機能しているとしたら、それをコードする遺伝子の転写速度は減衰振動の前に増幅振動が見られることが想定される。そこで、そのような転写速度の動態を示す遺伝子があるかどうか、そしてその遺伝子は分泌因子をコードするかを調べたところ、ある遺伝子 Y が同定された。実際、この遺伝子は BA 分化初期から急激に発現が誘導され、以後も発現は上昇を続け、成熟 BA となる発現は増加することが確認された。さらに、ゲノム編集技術により当該因子をコードする遺伝子を欠如したヒト多能性幹細胞株を樹立して BA 分化誘導への影響を調べたところ、BATokine として抗肥満と糖代謝改善作用が報告されているインターロイキン 6 (IL6) の発現誘導が攪乱されることが判明した。以上より、BA 分化初期過程で特異的に誘導される新規なオート/パラクライン因子として蛋白 Y を同定することに成功した。現在、当該因子のノックアウトマウスを作製して糖代謝異常の状況について解析中である。また今後は、IL6 ノックアウトマウス、両者のダブルノックアウトマウス、を用いて、BAT の糖代謝改善作用の分子基盤を解明すべくさらに解析を進めていく計画である。

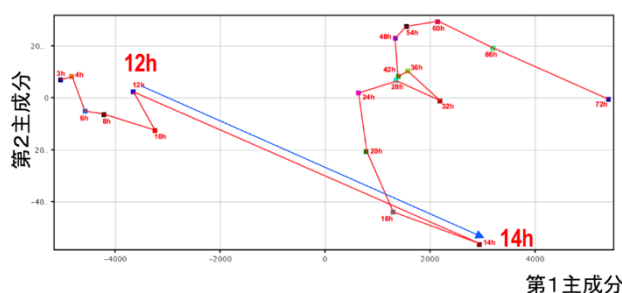


図1 ヒト多能性幹細胞の褐色脂肪分化初期過程の遺伝子発現変動
ヒト胚性幹細胞を褐色脂肪細胞分化誘導し、初期過程(3 hr - 72 hr)の19点のタイムポイントでマイクロアレイ解析を実施した。得られたデータを用いて主成分分析を行ったところ、12hr -14 hrの(青矢印)の短時間に遺伝子発現プロファイルが劇的に変化していることが解る。

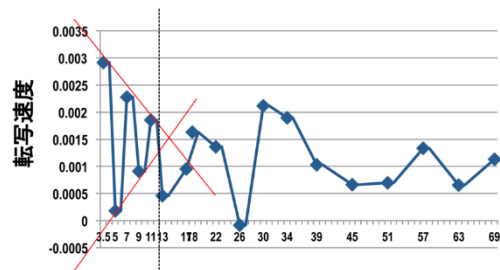


図2 分化培地に添加されているサイトカインの下流で機能する転写因子の転写速度動態
褐色脂肪細胞分化誘導培地に添加しているサイトカインの直下で機能することが知られる転写因子の転写速度動態のグラフである。遺伝子発現の劇的な変化(図1)が生じる12 hrよりも前の段階において典型的な減衰振動を認める。

Subject No. : 27-Shitei-1202 (the third year of a three-year project)

Title : Development of preventives/therapeutics for glucose metabolic disorder utilizing human ES/iPS cell-derived brown adipocytes.

Researchers : 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 increasingly 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, where the issue of obesity has become a very serious social problem. It is thought that more than 400 million are affected by glucose metabolism disorders including prediabetes and diabetes. Diabetes promotes renal disorders (diabetes nephropathy), visual disorders (diabetic retinopathy) and sensory disorders (diabetic neuropathy). All these diabetic complications severely lower the quality of daily life. Moreover, diabetes promotes the development of other life-threatening diseases such as cancers, cerebrovascular diseases, ischemic heart diseases and pneumonia. Therefore, control of obesity is an urgent task for the health and welfare in the world. Particularly, to develop new therapies to prevent/treat diabetes and to contribute to welfare of peoples in the world are the two major missions of the National Center for Global Health and Medicine (NCGM).

Recent years, brown adipose tissue (BAT) has been attracting an increasing attention as a new therapeutic target for the treatment of obesity and diabetes. BAT was originally discovered in small-sized hibernating mammals as a tissue responsible for rapid non-shivering thermogenesis during the breakage of hibernation. Murine studies have shown that BAT contributes to the prevention of obesity, the improvement of lipid and glucose metabolisms and the sensitization of leptin signaling at hypothalamus. Therefore, BAT has been considered as an important tissue that play roles to keep metabolism in a healthy state. After a long dispute over the presence of BAT in adult humans, four independent groups proved the existence of BAT in adult humans in 2009. Thereafter, clinical studies have shown an inverse correlation between the BAT volume and body mass index (BMI), which is an index for obesity, and an inverse correlation between the BAT volume and blood glucose level. Although detection rates of BAT markedly decrease with age, it is known that active BATs remain detectable in middle-aged subjects that have not gained significant body weights after twenties. Therefore, human BAT is considered as a promising target in drug discovery for metabolic disorders. Brown adipocytes (BA), which contain multiple lipid droplets and abundant mitochondria in the cytoplasm, exert high thermogenic activity via uncoupling respiration. However, it has been suggested that the metabolism-improving potential of BA does not fully depend on its thermogenic activity. It was shown that BAT-depleted mice suffered from morbid obesity and underwent severe diabetes. By contrast, UCP1 knockout mice did not show either obesity or diabetes under ordinary conditions. Therefore, it is suggested that BAT improves metabolism primarily via secreting factors, which are generally termed as BATokines. Up to now, several factors are reported as the candidates for BATokines including cytokines such as fibroblast growth factor 21 (FGF21) and interleukin-6 (IL6), lipid mediators

Researchers には、分担研究者を記載する。

such as 12,13-diHOME, and microRNA such as miRNA-99b. Nevertheless, there remain questions regarding the degrees of their contribution to the regulation of metabolism. One of the crucial reasons for the delay in understanding the whole picture of BATokines is the difficulty in stably acquiring high-quality BA samples. It is impossible to obtain human BAT samples from living body due to ethical reasons. Even in the studies using murine samples, the fragility of BAT due to high expressions of trypsin family proteases as well as chymotrypsin family proteases makes it considerably difficult to acquire high-quality BA samples. Moreover, there are no techniques for organ culture for BAT or making the frozen stocks of BAs. Accordingly, there had been no effective tools to perform systematic researches on BATokines. We have overcome this problem by establishing a technique to generate high-quality BA from human pluripotent stem cells (Nishio et al., Cell Metabolism 16: 394-406, 2012; Patent has been granted in Japan, USA, Australia and China).

We showed that subcutaneous injection of the supernatant of the human pluripotent stem cell-derived BA (BA-SUP) lowered the blood glucose levels in mice after 16-hour fasting. Moreover, these mice showed up-regulated blood insulin levels after 15 minutes from glucose loading in the oral glucose tolerance test. These findings indicate that BA-SUP has an ability to improve glucose metabolism and that the factors responsible for lowering fasting blood glucose levels and augmenting insulin secretion are stable at least for 16 hours in the living body. These *in vivo* findings were successfully reproduced in *in vitro* models, where an addition of BA-SUP increased insulin secretion in murine pancreatic beta cells and augmented glucose uptake in murine/human skeletal muscle cells and murine pancreatic beta cells. In the current study, we are trying to identify the molecular structures of these factors. Although we have not yet identified all these factors, we have found that our strategy to identify novel BATokines using BA-SUP is highly effective. We are planning to determine their structures and further identify their receptors in future.

In the current study, we also studied the gene expression regulatory network during an early phase of BA differentiation. Although it is known that BA originates from Myf5-positive/Zic1-positive myoblasts, the differentiation process earlier than the myoblastic phase remains elusive. We showed that our method for BA differentiation of human pluripotent stem cells properly reproduced *in vivo* BA developmental process via MYF5-positive/ZIC1-positive myoblasts (Nishio et al., 2012). Therefore, our method provides an effective tool to study gene expression regulatory system in an early phase of BA differentiation. Since myoblast phase corresponds to Day 6 in our BA differentiation system, we performed global gene expression analyses from Day 0 to Day3, during which the expression levels of immature pluripotent stem cell markers including Nanog, Oct4 and Sox remained at high levels. We performed multi-time point microarray (totally 19 time points) from 3 h to 72 h and found that gene expression profiles were dynamically changed during this early phase. The principal component analysis using the data of 23,541 probes, which correspond to total protein-coding mRNAs, indicate that more than 90 % of the total gene expression profiles were explained by the three principal components. Interestingly, the gene expression profile was drastically changed from 12 h to 14 h (Fig. 1). It is known that

immature pluripotent stem cells have bivalent epigenetic marks at promoter regions with both active (open chromatin) and repressive (close chromatin) histone modification. Therefore, the drastic change in the gene expression profile from 12 h to 14 h might be related to the transition from bivalent to monovalent histone marks as a preparation for an induction of a directed differentiation. We are now planning to identify the crucial events that trigger the drastic gene expression changes. We further performed integrated transcription velocity analysis. The multi-time point microarray data were further analyzed by combining them with the information about the half-life of each mRNA, which was calculated from the multi-time point microarray data of actinomycin D-treated cells. We found that the transcription velocity of the genes that code for the transcription factors that are working directly at the downstream of the cytokines that were added to differentiation medium showed waning oscillation (Fig. 2). This phenomenon can be explained as follows: The transcription factors are phosphorylated by the cytokines and translocated into nucleus and, after stimulating transcriptions, they are degraded by ubiquitin system and, to compensate the decrement by ubiquitin-mediated degradations, transcriptions of those transcription factor-coding gene are stimulated. This negative feedback system can induce waning oscillation. To identify novel autocrine/paracrine factors working in the early phase of BA differentiation, we searched for genes whose transcription velocity kinetics showed waxing oscillation before starting waning oscillation. By these criteria, we successfully identified a novel factor (factor X) that are involved in the sustained expression of IL6, which itself is a BATokine. We are currently assessing the glucose metabolism of gene X knockout mice and gene X and IL6 double knockout mice.

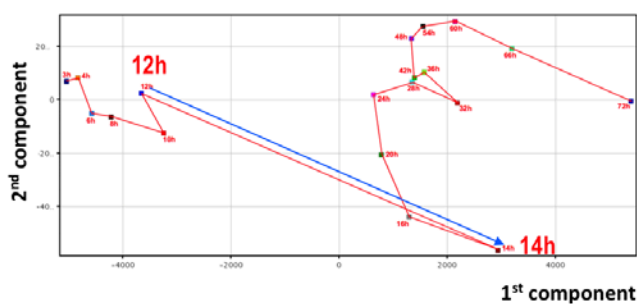


Fig. 1 Kinetics of the gene expression profile of human ES cells during an early phase of BA differentiation.

A principle component analysis was performed using the data of multi-time point microarrays (totally 19 time points) during an early phase (3 h – 72 h) of the differentiation of human ES cells into brown adipocytes. Note that the gene expression profile drastically changes during 12 h – 14h (blue arrow).

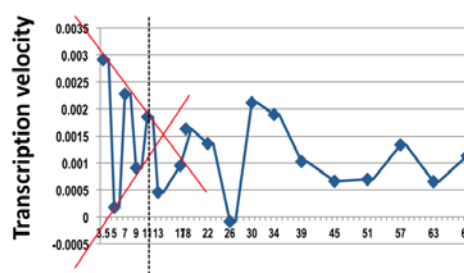


Fig. 2 Oscillation in the transcription velocity of the downstream effectors of the differentiation-inducing cytokines.

An example of the transcription velocity kinetics of a transcription factor working directly at the downstream of the cytokine added to the differentiation medium is shown. Before the time point 12 h, when the drastic change in gene expressions occurred (see Fig. 1), a typical waning oscillation was observed.

【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・上級研究員 小林 徳彦

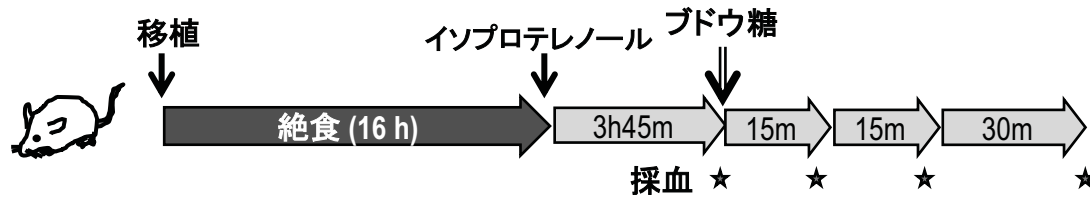
【要約】

世界の肥満人口は増加傾向にあり、肥満は糖代謝障害（インスリン抵抗性・2型糖尿病）の発症を助長する。世界の糖代謝障害の有病者は4億人を超えると推定されており、その制圧に向けた対策は世界的に緊急性の高い課題となっている。近年「燃える脂肪」「痩せる脂肪」として、高い熱産生能を持つ褐色脂肪細胞（brown adipocytes: BA）が世界的に注目されている。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、BAが熱産生能とは独立に糖代謝改善作用を発揮していることを見出した。

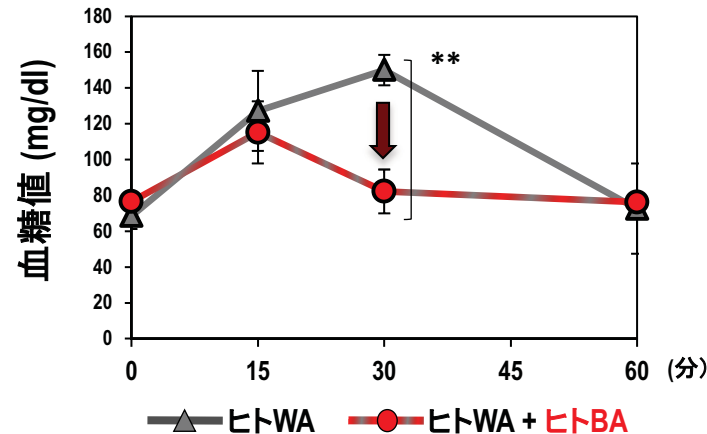
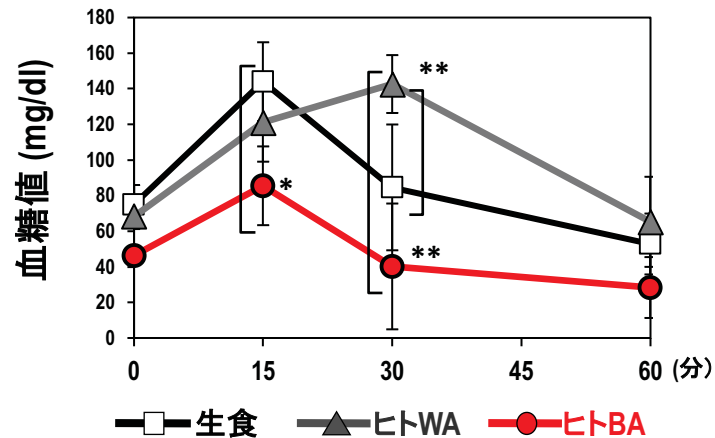
本研究では「BAによる糖代謝改善の分子基盤」の解明に向けて可溶性因子（BATokine）探索の観点から研究に取り組むとともに、未踏襲領域として残されている「BA分化初期過程を制御する遺伝子発現ネットワーク」を解析し、糖代謝障害の新たな予防/治療法の開発につなげる。

課題1

ヒト褐色脂肪細胞の糖代謝改善作用の分子基盤の解明



移植16時間後の経口ブドウ糖負荷試験



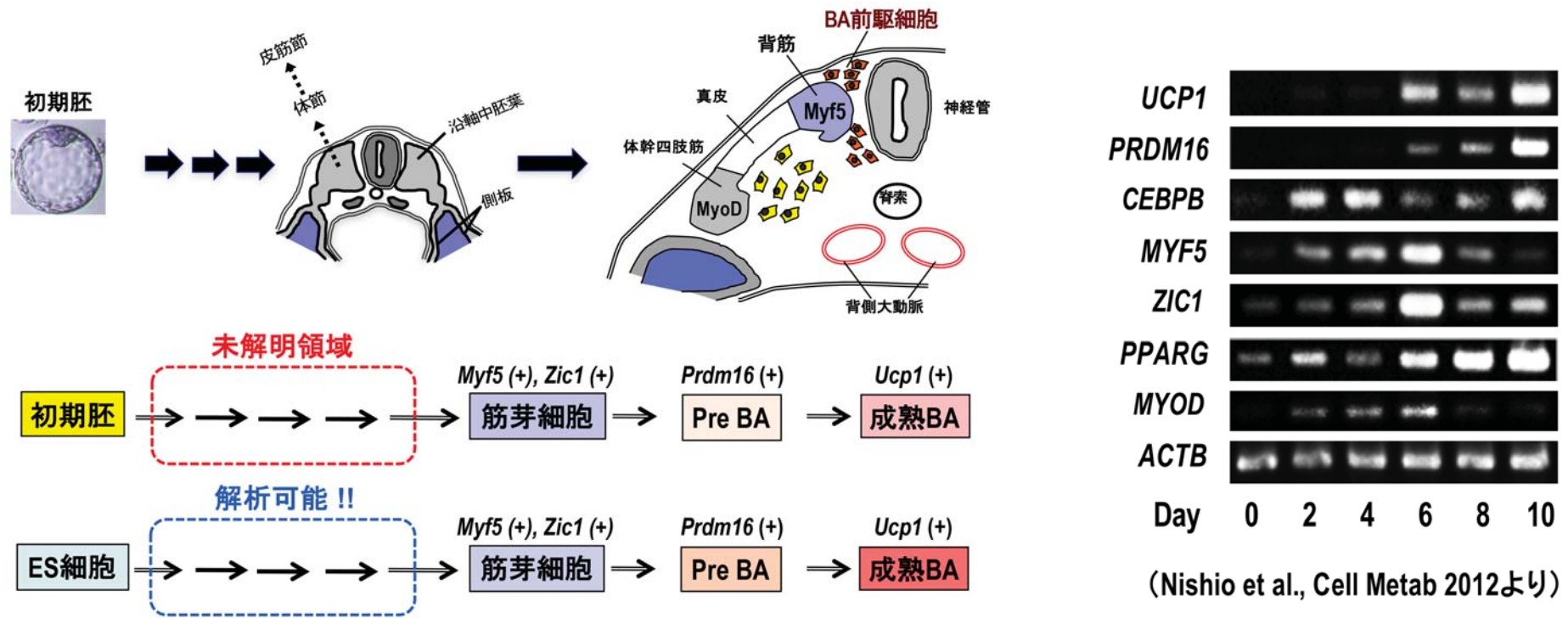
Nishio et al., Cell Metab 2012
より改変転載

左：ヒトES細胞から作製した褐色脂肪細胞(BA)、あるいはヒト間葉系幹細胞(市販)から汎用法で作製した白色脂肪細胞(WA)をマウスに皮下移植、または生食をマウスに皮下投与し、16時間の絶食後に経口ブドウ糖負荷試験を行った。ヒトBA移植したマウスでは耐糖能が向上している。わずか16時間で耐糖能が向上していることから、熱産生作用を介した痩せ(体重減少)による効果であることは考えにくく、可溶性因子の作用が示唆される。実際に、ヒトBAの培養上清をマウスに投与しても16時間の絶食後に測定した空腹時血糖は有意に低下した (data nota shown)。

右：ヒトWAの移植、またはヒトWAとヒトBAの同時移植、を行い、16時間の絶食後に経口ブドウ糖負荷試験を行った。ヒトBAは、ヒトWAによる耐糖能増悪を改善する作用があることが解る。

課題2

ヒト褐色脂肪分化初期過程における遺伝子発現制御系の解析

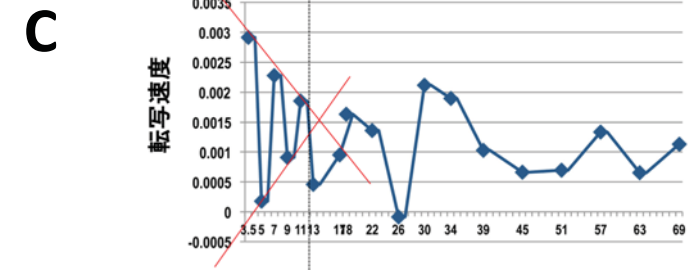
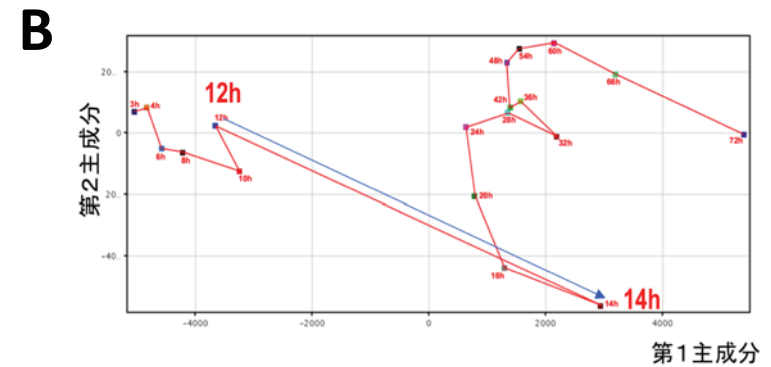
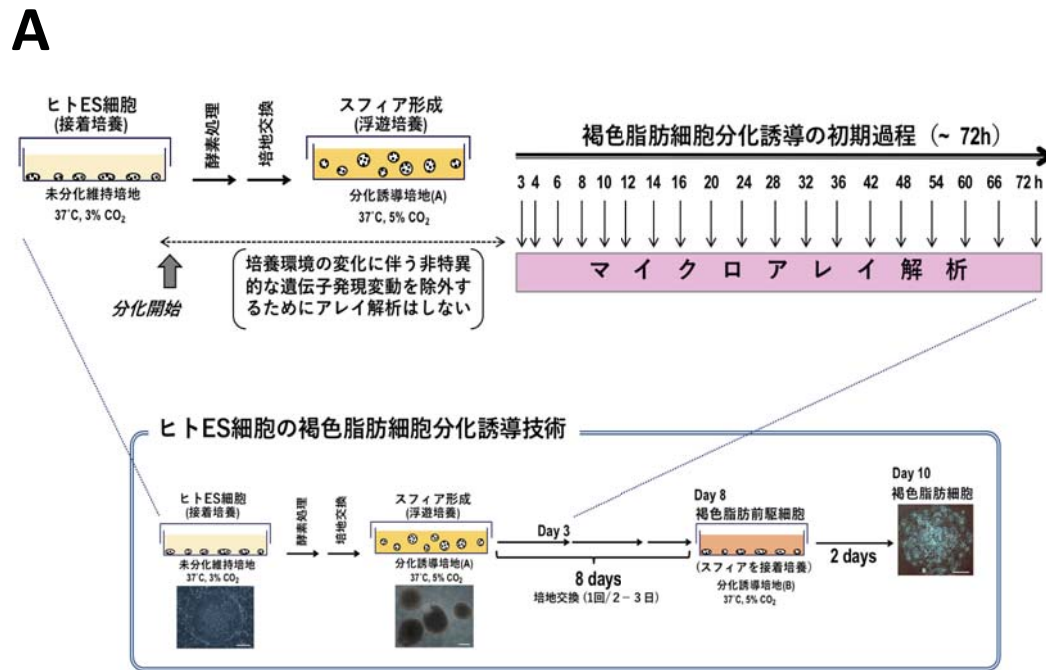


褐色脂肪細胞(BA)はMyf5陽性Zic1陽性の筋芽細胞に由来することが遺伝子改変マウスを用いた研究から証明されている。しかし、それ以前の分化過程(赤破線)に関しては有効な研究ツールがないために未解明のままである。我々はヒトES/iPS細胞のBA分化誘導系を開発しているが、マウスでの研究から得られた知見と同じく、BA分化過程において一過性にMYF5及びZIC1遺伝子が誘導されることを確認している(右図)。すなわち、我々の「ヒトES/iPS細胞のBA分化誘導系」を用いることで、これまで研究ツールがないため解析が遅れていた「BA初期分化過程の遺伝子発現制御システム」を解明するが可能となる(青破線)。

本研究では、ヒトES細胞のBA分化誘導過程における初期フェーズ(~ Day 3)における多時点で網羅的遺伝子発現解析を行い、未踏襲領域として残されているBA分化初期過程での遺伝子発現制御ネットワークを解明する。

課題2

ヒト褐色脂肪分化初期過程における遺伝子発現制御系の解析



A: ヒトES細胞のBA分化初期過程 (< Day 3)における多時点マイクロアレイ解析。B: 19点のtime pointsで得られたマイクロアレイ解析データの主成分分析。分化開始12hめと14hめの間で遺伝子発現様式に劇的な変動が生じていることが解る。C: Aのデータに加えて、各遺伝子の半減期データ (actinomycin処理後に時間経過を追って行ったマイクロアレイ解析より算出)を用いて、各遺伝子の転写速度を計算した。分化誘導培地に添加しているサイトカイン群(IL6, SCF, Flt3-L, VEGF, BMP4)の直下で機能する転写因子群 (STAT3, STAT5a, STAT5b, SMAD5) は、劇的遺伝子発現変動が生じるより前の時間帯において特徴的な減衰振動を呈することを見出した。これはサイトカイン直下で機能する転写因子がサイトカインシグナルによりリン酸化(活性化)されて核内移行及び転写活性化を行った後にユビキチンシステムにより分解されること、それに伴う減少分を補うために当該転写因子をコードする遺伝子の転写が促進される、というネガティブフィードバックシステムにより説明できる。

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
Additional attention to combination antiretroviral therapy-related lipodystrophy.	<u>Kobayashi N.</u> , Nakahara M, Oka M, <u>Saeki K.</u>	World J Virol.	6	2017年
CD206(+) M2like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors.	Nawaz A, Aminuddin A, Kado T, Takikawa A, Yamamoto S, Tsuneyama K, Igarashi Y, Ikutani M, Nishida Y, Nagai Y, Takatsu K, Imura J, Sasahara M, Okazaki Y, Ueki K, Okamura T, Tokuyama K, Ando A, Matsumoto M, Mori H, Nakagawa T, <u>Kobayashi N.</u> , <u>Saeki K.</u> , Usui I, Fujisaka S, Tobe K.	Nat Commun.	8	2017年
New Bio-Application of Near-Infrared Photoluminescent Carbon Nanotubes in Brown Fat Imaging Reflecting Heat Productivity	Yudasaka M, Yomogida Y, Zhang M, Tanaka T, Nakahara M, <u>Kobayashi N.</u> , Okamatsu-Ogura Y, Machida K, Ishihara K, <u>Saeki K.</u> , Kataura K.	Sci Rep	7	2017年
Do immune cells regulate mural cell behaviors in injured arteries?	Nakahara M, <u>Kobayashi N.</u> , Oka M, <u>Saeki K.</u>	Med Res Arch	5	2017年

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、 <u>小林徳彦</u> 、岡雅子、湯尾明、 <u>佐伯久美子</u>	第16回日本再生医療学会	仙台	2017年3月8日
ヒト多能性幹細胞（ES/iPS細胞）からの褐色脂肪細胞の作製	西尾美和子、中原正子、湯尾明、 <u>佐伯久美子</u>	第73回日本臨床検査医学会 関東・甲信越支部例会	仙台	2017年5月27日
"Near-Infrared Photoluminescent Carbon Nanotubes for Imaging of Brown Fat"	Yudasaka M, Yomogida Y, Zhang M, Tanaka T, Nakahara M, <u>Kobayashi N.</u> , Okamatsu-Ogura Y, Machida K, Ishihara K, <u>Saeki K.</u> , Kataura H	第53回 フラレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム	京都	2017年9月13日
「NHEJ/MMEJを介したゲノム編集による「簡易」で「時短」そして「高効率」な遺伝子改変ヒトES細胞株の樹立法」	<u>小林徳彦</u> 、湯尾明、 <u>佐伯久美子</u>	2017年度生命科学系学会合同年次大会	神戸	2017年12月6日

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
ヒト多能性幹細胞からの褐色脂肪細胞の作製—糖代謝異常の治療開発に向けて—	<u>佐伯久美子</u>	AdipoScience in Hiroshima 3rd (特別講演)	広島	2017年2月24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。

研究発表及び特許取得報告について

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5998405 (JP5998405B2)	国立研究開発法人 国立国際医療研究センター・株式会社ID ファーマ	2016年9月28日	日本
Pluripotent stem cell-derived brown adipocytes, pluripotent stem cell-derived cell aggregate, method for producing same, and cell therapy and medical therapy therefor	US9492485B2	国立研究開発法人 国立国際医療研究センター・株式会社ID ファーマ	2016年11月15日	米国
Pluripotent stem cell-derived brown adipocytes, pluripotent stem cell-derived cell aggregate, method for producing same, and cell therapy and medical therapy therefor	PCT/JP/2012/061212	国立研究開発法人 国立国際医療研究センター・株式会社ID ファーマ	2017年5月22日	濠州
源自多能干细胞的褐色脂肪细胞、源自多能干细胞的细胞凝聚物，其制造方法以及细胞疗法、内科疗法	CN103517982B	国立研究開発法人 国立国際医療研究センター・株式会社ID ファーマ	2018年2月6日	中国

※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