

ヒト ES/iPS 細胞からの高機能褐色脂肪細胞の作製

西尾 美和子, 佐伯 久美子

1. はじめに

脂肪組織には、エネルギー蓄積に関わる白色脂肪組織 (white adipose tissue: WAT) とエネルギー燃焼に関わる褐色脂肪組織 (brown adipose tissue: BAT) がある。WAT は皮下や内臓に広く分布しており、これを構成する白色脂肪細胞 (white adipocyte: WA) は間葉系幹細胞に由来すると考えられている。一方、BAT は肩甲骨間 (新生児) や頸部・腋窩・腎門など特定の部位に局限して存在し、これを構成する褐色脂肪細胞 (brown adipocyte: BA) は骨格筋細胞との共通前駆細胞である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示されている。BAT が褐色に見えるのは、BAT 内に密に発達する毛細血管の存在に加えて、BA がミトコンドリアを豊富に含有することが関係する。

BA のミトコンドリア内膜には、熱産生に寄与する uncoupling protein 1 (UCP1) と呼ばれるプロトンチャンネルが存在する。すなわち、電子伝達系が形成するミトコンドリア内膜をはさむプロトン勾配は UCP1 によりキャンセルされ、ATP 合成に使われるべき化学エネルギーは熱エネルギーとして放出される。UCP1 は通常環境では閉じているが、交感神経刺激に伴う脂肪分解 (lipolysis) で産生される遊離脂肪酸によりアロステリック制御を受けてチャンネルが開くと考えられている。UCP1 欠損マウスは寒冷耐性が顕著に低下することから、震えを伴わない体熱産生 (non-shivering thermogenesis) における BAT の重要性が示されている。特に、小型冬眠動物における冬眠覚醒後の急激な non-shivering thermogenesis に BAT は必須であり、古くより小型動物を用いて BAT 研究が進められてきた。一方、長い間、ヒトを含む大型哺乳類動物では胎児～新生児 (仔) 以外には BAT は存在しないと思われていた。しかし 2009

年に、核医学検査 (PET-CT 検査) および組織学検査からヒト成人に BAT が存在することを示す報告が相次いで出された¹⁻⁴⁾。またその後の臨床研究から肥満度や血糖値と BAT 量との相関が示され、メタボリック症候群における新規治療標的組織として BAT が大いに注目されることとなった。

しかし、ヒト生体から機能を損なわずに十分量の BAT を入手することは、技術的および倫理的な問題によりきわめて困難である。すなわち、BAT の存在部位の同定には PET-CT という高額医療機器が必要であること、PET-CT 検査は放射線被曝を伴うため BAT 検出率が高い若年齢層 (20 代前後) に実施するには課題があること、BAT 摘出により将来的なメタボリック症候群の発症リスクの増大も懸念されることなどから、少なくとも日本ではヒト BAT の検体入手することはきわめて困難な現状である。また、BA の維持培養の技術も未完成であることに加え、凍結保存の現行技術は確立されていないこと、さらに公開データベースによる遺伝子発現プロファイルでは BAT は RNase1 (膵・前立腺に続いて第 3 位) や chymotrypsin-like peptidase などの種々のペプチダーゼ群 (膵に続いて第 2 位) を高発現していることなどから、高品質のヒト BA 検体を安定に確保することはたとえ日本以外の海外であってもほぼ不可能であると思われる。このため、メタボリック症候群の新規な治療標的組織として注目されながら、使いやすい研究ツールが存在せず、BAT に注目した創薬研究は遅れていた。この問題を解決すべく、筆者らは 2012 年に、ヒト ES/iPS 細胞から高機能性 BA を高効率に作製する技術を開発した⁵⁾。

本稿では、BAT に関して総括的に解説するとともに、筆者らが開発した BA 作製法の詳細につき説明する。さらに今後の BA 研究展開ならびに臨床応用の可能性について述べる。

2. 褐色脂肪細胞 (BA) の生理的役割

BA の形態学的な特徴として、クリステの発達した大型ミトコンドリアが細胞質全体に多数存在すること、細胞核は丸く細胞の中心付近に存在すること、多数の小型脂肪滴 (多胞性脂肪滴) を含有すること、などがあげられる。また多胞性脂肪滴とミトコンドリアとが接して存在するよう

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 (〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1)

Production of Functional Classical Brown Adipocytes from Human Pluripotent Stem Cells

Miwako Nishio and Kumiko Saeki (Department of Disease Control, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870445

© 2015 公益社団法人日本生化学会

すもしばしば観察されるが、これは脂肪を燃焼して熱産生を行う「燃える脂肪細胞」として理に適った構造である。一方、WAは大型の単胞性脂肪滴を含有し、細胞核は圧排されて辺縁部に存在し、小型のミトコンドリアが核膜や細胞膜の近傍で観察される。

BAの生理的役割に関する最初の報告は「BA除去マウス」(注:UCP1遺伝子プロモーター制御下でジフテリア毒素が発現する仕掛けがなされたトランスジェニックマウス)を用いた研究に関してである⁶⁾。「BA除去マウス」は、熱産生に障害があるだけでなく、生後16日目から観察される高度な肥満⁶⁾、高脂血症⁷⁾、糖代謝異常⁷⁾、重篤なレプチン抵抗性⁸⁾などを呈することが報告され、BATが「肥満防止」「代謝能向上」「レプチン感受性維持」に重要な組織であることが示された。しかし、このマウスはトランスジェニックマウスであったために系統の維持が不安定となり、また時代がトランスジェニックマウスからノックアウトマウスに移行したことから、現在ではこのマウスを用いた研究はなされていない。これに代わって「UCP1ノックアウトマウス(UCP1 KOマウス)」が作製されたが、「UCP1 KOマウス」は寒冷不耐性を示したものの、予想外にも通常の飼育環境(20°C)では肥満を呈さなかった⁹⁾。このためBATの抗肥満効果について疑問も提示されたが、その後の詳細な研究により、UCP1 KOマウスはthermoneutralな環境(注:29~30°Cという飼育環境下の寒冷ストレスがまったくない状況)では肥満を呈すること、かつ食事誘発性熱産生(食後の体温上昇)が欠如すること、さらに高脂肪食負荷により肥満が助長されること、が示された¹⁰⁾。現代社会における人間の生活は、マウスにおけるthermoneutralな環境での生活に近い面もあるように思われ、上記の研究結果によりメタボリック症候群の治療標的としてのBATの重要は再認識されることとなった。その後、2013年にはマウスBATの同系個体への移植実験により、BATが肥満防止とインスリン抵抗性改善に寄与することの直接証拠が提示された¹¹⁾。

一方、ヒトに関する研究としては、がん検診等におけるPET-CTデータを用いた疫学研究からBAT量と肥満度および血糖値が逆相関することが報告されていた(前述)、さらに健常人ボランティアの参加による臨床研究から、BAT量が中年太りと逆相関すること¹²⁾、食後熱産生量と正相関すること¹³⁾が示された。これにより「ヒトBAT」のメタボリック症候群の治療標的組織としての重要性はさらに支持された。一方、BAT量と血糖値が逆相関することから、ヒトBAが糖代謝改善作用を持つ可能性が示唆されていたが(上述)直接的な証拠はまだ得られていなかった。2012年に筆者らは「ヒト多能性幹細胞から作製したBA」を用いたマウス移植実験によりその証拠を初めて提示した

(後述)⁵⁾。なお2012年には、Cowanのグループが3種類の転写因子の導入によりヒトES/iPS細胞からBA類似細胞を作製したが¹⁴⁾、糖代謝改善作用については調べられていなかった。また、翌2013年にはマウスBATの同系マウスへの移植実験により、マウスBATの糖代謝改善作用が検証されている(前述)¹¹⁾。

3. ヒトES/iPS細胞からの褐色脂肪細胞(BA)の作製

筆者らは、ヒトES/iPS細胞の血球分化誘導に関する研究過程で、血球が産生される領域(図1A, 赤く盛り上がって見える領域)の周囲には、必ず「多胞性脂肪滴を含有する脂肪細胞からなる層」が広がっていることに気づいた。一般に、WAは造血を抑制するといわれているが¹⁵⁾、1977年に報告された骨髓長期培養に関する論文においてcolony-forming unit-spleenと呼ばれる造血前駆細胞を支持するストロマ細胞が報告されている¹⁶⁾。この細胞の形態は「多数の小さな脂肪滴と、その上に載る長大なミトコンドリア」と記載されており、BAとしての特徴に合致するものと思われた。そこで、ヒトES/iPS細胞の血球分化過程で産生された脂肪細胞はBAであろうと予想し、これまでBAを単離する際に用いられてきた技術を基に試行錯誤を行うことで最終的に「ヒトES/iPS細胞から高純度にBAを作製する条件」を決定することができた(図1B)。

作製されたBAは、脂肪染色(Oil Red O染色およびBODIPY®染色)での多胞性脂肪滴の存在、電子顕微鏡下でのクリステの発達した豊富なミトコンドリアの存在(図1C)、などBAに特徴的な微細構造が確認された。またBAの発生および分化を規定する転写共役因子PRDM16とともにUCP1の発現も確認された(図1D)。その他、PGC1A、CIDEA、ELOVL3などのBATマーカー、PPARGやADIPOQなどのBAT/WAT共通マーカーの発現も確認された。また分化誘導過程では筋芽細胞マーカーであるMYF5(図1E)やPAX3/7が一過性に誘導されることも確認された(図1E)。以上より、筆者らの方法は、BATの発生過程を正しく再現した「BA分化誘導系」であることが示された。

次に、ヒトES/iPS由来BA(以下「ヒトBA」)の機能評価を行った。まず交感神経刺激への応答性を調べるために、 β 3アドレナリン受容体特異的アゴニストCL316,243を添加して、酸素消費速度(oxygen consumption rate: OCR)の測定によりミトコンドリア呼吸能を評価した。結果、CL316,243刺激に応じてOCR値が約2倍に増大したが、ヒト間葉系幹細胞から作製したWA(以下「ヒトWA」と略)やヒト未分化ES/iPS細胞ではOCR値は変化しなかった(図2A)。次に*in vivo*における熱産生能を評価した。すなわち、マウスの皮下(臀部)にヒトBAを移植し、翌日 β アドレナリン受容体アゴニストであるイソプロテレノー

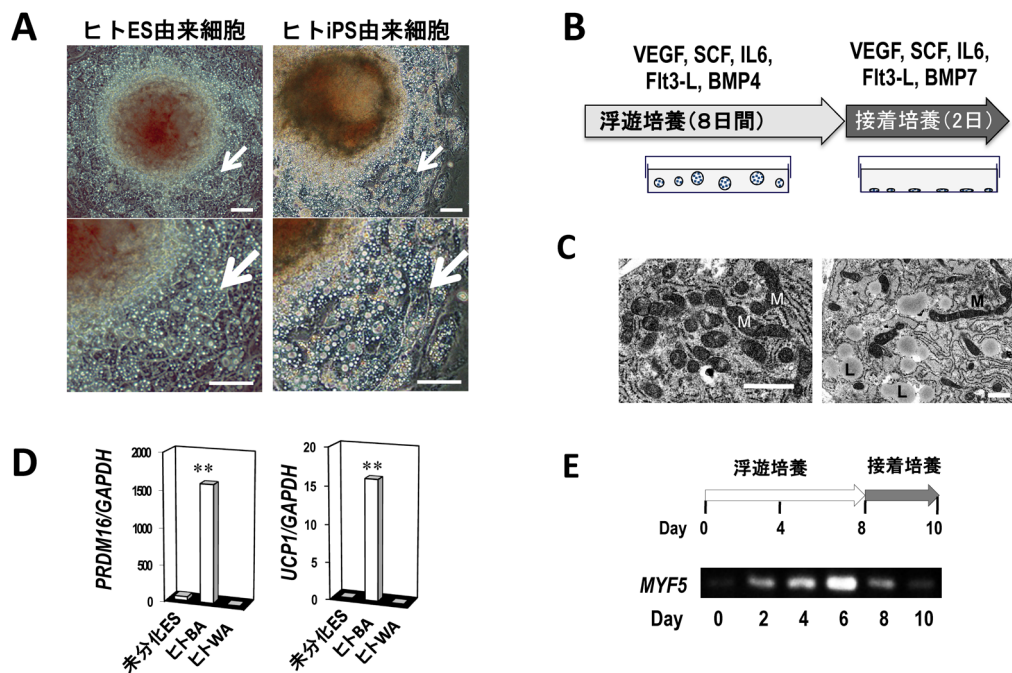


図1 ヒトES/iPS細胞の血球分化誘導過程に出現する脂肪細胞

(A)赤くみえる部分は血球産生領域で、その周囲には全周性に「多胞性脂肪滴を含有する脂肪細胞」からなる層が広がる(矢印)。Scale=100 μ m。 (B)BA分化誘導手順。 (C)ヒトES/iPS由来BAの電子顕微鏡写真 (M=ミトコンドリア, L=脂肪滴)。 (D)PRDM16(左)とUCP1(右)のmRNA発現量の定量。 ** $P<0.01$ 。 (E)BA分化過程におけるMYF5のmRNAの発現。

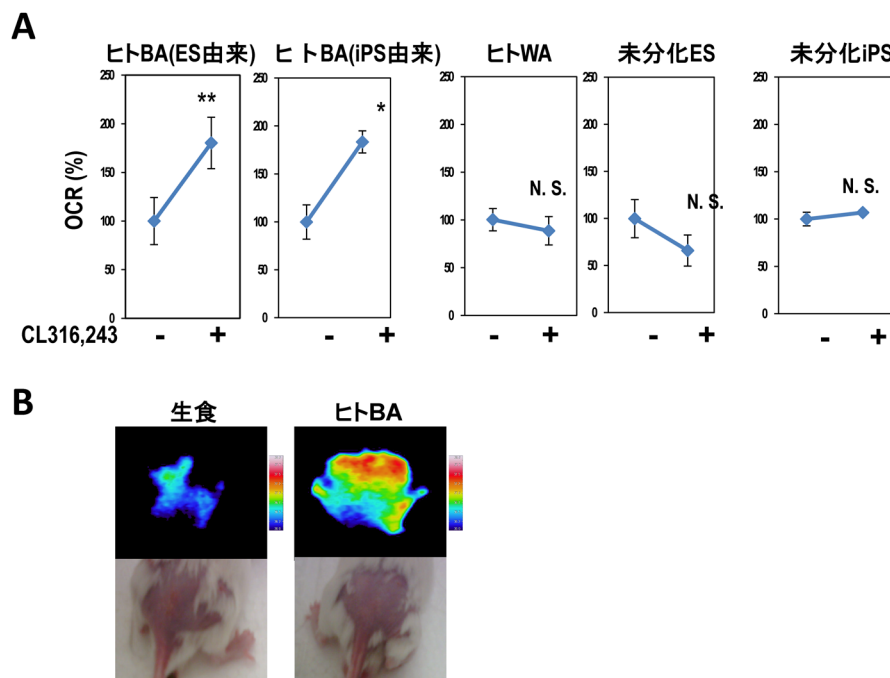


図2 ヒトES/iPS由来BAの交感神経刺激応答性

(A)ヒトES/iPS由来BAをアドレナリン β 3受容体特異的アゴニストであるCL316,243で刺激し、4時間後の酸素消費速度(OCR)を測定した。ヒトES/iPS由来BAでは有意にOCR値が上昇したが(刺激前を100%とする)、ヒトWAや未分化ES/iPS細胞ではOCRは変化しなかった(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)。 (B)ヒトES由来BAをマウスに移植(臀部皮下)し、アドレナリン β 受容体アゴニストであるイソプロテレノールを投与して4時間後に赤外線カメラで皮膚温を測定した。ヒトBA移植群では移植部の皮膚温が上昇したが(右)、生食投与群(左)や未分化細胞の移植群では皮膚温は上昇しなかった。ヒトiPS由来BAでも同様の結果であった。なお皮膚温を正しく測定するためあらかじめ(3日前)移植部は脱毛してある。

ルを投与して体表面温度を赤外線カメラで測定した。結果、ヒトBA移植マウスは移植部の皮膚温が上昇することが確認された(図2B)。

以上、筆者らの方法で作製したヒトBAは、交感神経刺激に応答してミトコンドリア呼吸と熱産生能が増大する「機能的なBA」であることが証明された。

4. ヒトES/iPS細胞由来BAの代謝改善効果

次に、代謝改善効果について評価を行った。BAが脂質代謝を改善することはマウスの研究から示されていたが¹⁷⁾、ヒト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(図3A)、経口オリーブ油負荷試験での耐脂能の向上が確認された(図3B)。なお、ヒトWA移植マウスでも耐脂能は改善されたことから(図3A)、脂質代謝の改善は脂肪細胞全般が持つ機能であると考えられた。一方、糖代謝に関してはBAとWAで異なる影響が観察された。ヒトBA移植マウスでは空腹時血糖値が低下したが、ヒトWA移植マウスでは空腹時血糖値に変化は認めなかった(図3C)。またインスリン抵抗性の指標であるHOMA-IR値[空腹時血中インスリン濃度($\mu\text{U/mL}$) \times 空腹時血糖値(mg/dl)/405]はヒトWA移植マウスで増加しており(図3D)、耐糖能障害が惹起されていることが示唆された。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が低下したのに対し、ヒトWA移植マウスは30分後の血糖値が顕著に上昇した(図3E)。さらにヒト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されたことから(図3F)、肥満(=WA増加状況)による耐糖能障害に対してヒトBAが治療効果を発揮することが示唆された。

5. おわりに

メタボリック症候群の予防のためにはエネルギー収支バランスを適切に図ることが肝要であるが、食餌療法や運動療法の効果が得られにくいケースもある。特に食餌療法後のリバウンド時に生じるレプチン抵抗性の問題など、新規な治療開発に向けて研究すべき課題は残されている。BATはエネルギーバランスを負に傾けるだけでなく、糖/脂質代謝改善に積極的に寄与し、かつレプチン感受性維持にも必須である。筆者らの開発した技術によりBATを標的とした創薬研究が加速し、より効果的なメタボリック症候群の新規治療法が開発されることが期待される。

謝辞

本研究成果は、(独)国立国際医療研究センター研究所・

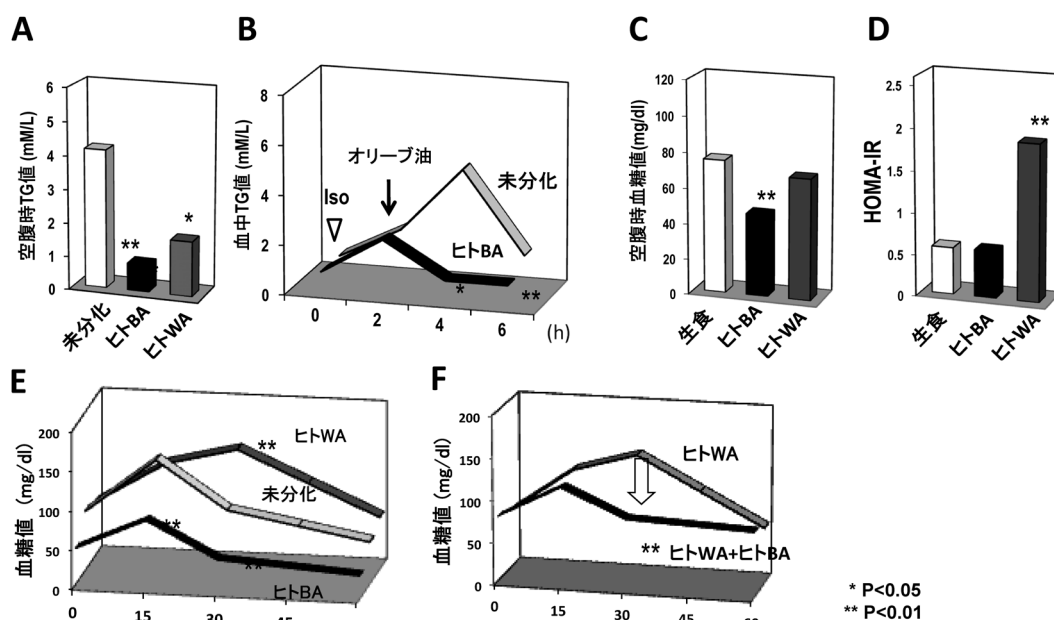


図3 ヒトES/iPS由来BAによる脂質/糖代謝の改善

(A)未分化細胞、ヒトBA、ヒトWAをマウスに移植し、16時間の絶食後にアドレナリン β 受容体アゴニストであるイソプロテレノールを投与して2時間後に血中の中性脂肪(TG)値を測定した。(B)(A)と同様にして移植後にイソプロテレノール(Iso)を投与し、2時間後にオリーブ油を経口投与して経時的に血中TG値を測定した。(C, D)前記と同様にして移植後にイソプロテレノールを投与し、4時間後に血糖値(C)およびインスリン値を測定し、HOMA-IR値を計算した(D)。(E, F)前記と同様にして移植後にイソプロテレノールを投与し、4時間後にブドウ糖を経口投与した後に経時的に血糖値を測定した。

湯尾明部長をはじめとする疾患制御研究部のメンバーによりなされました。すべての共同研究者の皆様には深く感謝いたします。

文 献

- 1) van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., & Teule, G.J. (2009) *N. Engl. J. Med.*, **360**, 1500–1508.
- 2) Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.H., Doria, A., Kolodny, G.M., & Kahn, C.R. (2009) *N. Engl. J. Med.*, **360**, 1509–1517.
- 3) Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.J., Enerbäck, S., & Nuutila, P. (2009) *N. Engl. J. Med.*, **360**, 1518–1525.
- 4) Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y., & Tsujisaki, M. (2009) *Diabetes*, **58**, 1526–1531.
- 5) Nishio, M., Yoneshiro, T., Nakahara, M., Suzuki, S., Saeki, K., Hasegawa, M., Kawai, Y., Akutsu, H., Umezawa, A., Yasuda, K., Tobe, K., You, A., Kubota, K., Saito, M., & Saeki, K. (2012) *Cell Metab.*, **16**, 394–406.
- 6) Lowell, B.B., S-Susulic, V., Hamann, A., Lawitts, J.A., Himms-Hagen, J., Boyer, B.B., Kozak, L.P., & Flier, J.S. (1993) *Nature*, **366**, 740–742.
- 7) Hamann, A., Flier, J.S., & Lowell, B.B. (1996) *Endocrinology*, **137**, 21–29.
- 8) Mantzoros, C.S., Frederich, R.C., Qu, D., Lowell, B.B., Maratos-Flier, E., & Flier, J.S. (1998) *Diabetes*, **47**, 230–238.
- 9) Enerbäck, S., Jacobsson, A., Simpson, E.M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M.E., & Kozak, L.P. (1997) *Nature*, **387**, 90–94.
- 10) Feldmann, H.M., Golozoubova, V., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2009) *Cell Metab.*, **9**, 203–209.
- 11) Stanford, K.I., Middelbeek, R.J., Townsend, K.L., An, D., Nygaard, E.B., Hitchcox, K.M., Markan, K.R., Nakano, K., Hirshman, M.F., Tseng, Y.H., & Goodyear, L.J. (2013) *J. Clin. Invest.*, **123**, 215–223.
- 12) Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., Okamatsu-Ogura, Y., Kameya, T., Kawai, Y., Miyagawa, M., Tsujisaki, M., & Saito, M. (2011) *Obesity (Silver Spring)*, **19**, 1755–1760.
- 13) Lee, P., Smith, S., Linderman, J., Courville, A.B., Brychta, R.J., Dieckmann, W., Werner, C.D., Chen, K.Y., & Celi, F.S. (2014) *Diabetes*, **63**, 3686–3698.
- 14) Ahfeldt, T., Schinzel, R.T., Lee, Y.K., Hendrickson, D., Kaplan, A., Lum, D.H., Camahort, R., Xia, F., Shay, J., Rhee, E.P., Clish, C.B., Deo, R.C., Shen, T., Lau, F.H., Cowley, A., Mowrer, G., Al-Siddiqi, H., Nahrendorf, M., Musunuru, K., Gerszten, R.E., Rinn, J.L., & Cowan, C.A. (2012) *Nat. Cell Biol.*, **14**, 209–219.
- 15) Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P.L., Hauschka, P.V., Fahey, F., & Daley, G.Q. (2009) *Nature*, **460**, 259–263.
- 16) Dexter, T.M., Allen, T.D., & Lajtha, L.G. (1977) *J. Cell. Physiol.*, **91**, 335–344.
- 17) Bartelt, A., Bruns, O.T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Weller, H., Waurisch, C., Eychemüller, A., Gordts, P.L., Rinninger, F., Bruegelmann, K., Freund, B., Nielsen, P., Merkel, M., & Heeren, J. (2011) *Nat. Med.*, **17**, 200–205.

著者寸描

●西尾 美和子（にしお みわこ）

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。博士（保健学）。

■略歴 2004年東京医科歯科大学保健衛生学科卒業。06～08年ギーセン大学（ドイツ）留学。10年東京医科歯科大学大学院博士課程修了。10～13年国立国際医療研究センター研究所研究員。14年より上級研究員。

■研究テーマと抱負 糖尿病・代謝疾患などの生活習慣病の研究を軸に、ヒトES/iPS細胞を使用した再生医療技術を駆使して、臨床応用に繋がるような研究を目指していきたい。

■ウェブサイト <http://www.rincgm.jp/individual/lab04/>

■趣味 食道楽。スポーツ（ボート、マラソン、早歩き）。

●佐伯 久美子（さえき くみこ）

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。博士（医学）。

■略歴 1988年東京大学医学部医学科卒。88～90年研修医。90～91年東京大学医科学研究所研究員。91～95年東京大学医学系大学院（博士号取得）。95～97年国立国際医療センター研究員。97～99年科学技術特別研究員。99～2010年国立国際医療研究センター研究所室長。10年より頭記。

■研究テーマと抱負 再生医学研究技術を適用して新規な研究ツールを創成し、様々な分野における研究の発展に貢献する。

■ウェブサイト <http://www.rincgm.jp/individual/lab04/>

■趣味 ピアノ・バイオリン。