

研究報告書

「ヒト生体ホメオスタシス維持の安定化および攪乱に寄与する新規生理活性物質の同定」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 9 月～平成 28 年 3 月

研究者: 佐伯久美子

1. 研究のねらい

ヒト生体の恒常性維持機構の解析においては、1)ヒト検体が入手できない(希少性・コスト・倫理的問題・医学的問題・安全性)、2)ヒト検体は入手できるが機能変性を生じるため研究に使用できない、3)適切な動物モデルがない、などの理由から研究が遅れている領域がある。これらの問題に対して、無限増殖能と多能性分化能を持つ「ヒト多能性幹細胞」から高品質な細胞を作製して研究を行うことは極めて有用である。本課題では、日本人の健康寿命の延長に向けた治療開発の重要性が高い「虚血疾患」と「糖代謝異常」を対象に、病態を「恒常性維持機構の破綻」という立場から理解すべく「血管内皮細胞」と「褐色脂肪細胞」に注目して研究を行う。心筋梗塞などの虚血疾患は動脈狭窄を原因として発症するが「動脈の恒常性維持」における内皮細胞の役割は示されていない。ヒト検体から調製した「初代培養内皮」を用いた従来の研究では、内皮が平滑筋の増殖を促進する(動脈狭窄を助長する)という、臨床経験と矛盾する知見が報告されていた。ヒト検体からの調製過程で受ける様々なストレス(剥離等の物理的ストレス、酵素処理等の化学的ストレスなど)により細胞機能は変調するため「ヒト生体の恒常性維持機構」を正しく理解できない。一方、ヒト多能性幹細胞から作製した「フレッシュな内皮細胞」を用いれば正しい理解を得ることができる。また肥満/代謝異常の治療開発に向けて「燃える脂肪」として注目される「褐色脂肪細胞」もヒト検体は入手できない。量が少なく(希少性)、採取による肥満/代謝異常の発症リスクの増大も懸念される(医学的問題)。また検出には PET-CT という高額機器を要し(コスト)、放射線被爆も伴うことから(安全性)、褐色脂肪を検出しやすい多い若年層への実施に議論がある(倫理的問題)。さらに蛋白分解酵素や RNA 分解酵素を高発現するため、動物検体を用いても蛋白/遺伝子発現を正しく解析することは困難である。このため肥満防止や代謝向上の効果が報告されているにも関わらず「代謝の恒常性維持」における褐色脂肪細胞の役割は解明されていない。脂肪燃焼によるカロリー消費が関係すると考えられたきたが、否定的な見解が蓄積している。ヒト多能性幹細胞から作製した「高品質な褐色脂肪細胞」を用いた研究を実施することで褐色脂肪細胞の役割を正しく理解し、さらに新規な創薬標的を同定することも可能となる。

2. 研究成果

(1) 概要

虚血性疾患の病態生理を理解するために「血管構造の恒常性維持」における血管内皮細胞の役割を解析した。血管は内膜・中膜・外膜から成り、内膜は血管内腔面を覆う一層の内皮細胞から、中膜は平滑筋細胞から、外膜は線維芽細胞から構成される。血管が傷害されると平滑筋細胞が内膜へ遊走し増殖する。結果、内膜は肥厚して血管は狭窄する。即ち、血管狭窄の実態は平滑筋細胞の過剰増殖である。血管狭窄は内皮が変性/脱落する状況で見られるため、臨床的には内皮は平滑筋の増殖を抑制すると考えられる。しかし、ヒト検体から調製

した初代培養内皮細胞を用いた実験は、内皮が平滑筋の増殖を促進することを示していた。これは臨床知見とは相容れず、初代培養内皮細胞を用いた研究は「血管構造の恒常性維持」の解析に適さないと考えられる。そこで「ヒト多能性幹細胞」から内皮を作製して解析したところ、フレッシュな内皮は平滑筋の増殖を抑制するが、老化や酸化ストレスにより変性した内皮は平滑筋の増殖を促進した。即ち、内皮には「平滑筋増殖抑制型(善玉)」と「平滑筋増殖促進型(悪玉)」の2種類のものがあることが判明した。また血管傷害モデルマウスへの移植実験から、前者は傷害血管の狭窄を阻止し、後者は狭窄を増悪することが確認された。さらに内皮の形質差を決める分子を探索し、内皮の悪玉化を起す責任遺伝子として Regulator of G-protein signaling 5 (RGS5)を同定し、RGS5 の下流で p38 MAPK が内皮の品質管理に関与することを明らかにした。また肥満・糖代謝異常の病態を理解するため「代謝の恒常性維持」における褐色脂肪細胞の役割を解析した。褐色脂肪細胞はヒト検体が入手できず、動物からも品質を維持した状態で回収することは困難である。そこで、ヒト多能性幹細胞から褐色脂肪細胞を作製して解析した。結果、褐色脂肪細胞は熱産生とは独立に、可溶性因子(ホルモン)を介して糖代謝を改善していることが判明した。この因子は既知のどのホルモンとも分子量が異なり「新規ホルモン」であることが示された。またヒト多能性幹細胞の褐色脂肪分化初期過程での遺伝子発現制御機序を解析した。網羅的遺伝子転写速度解析という新技術を適用することで「転写速度の振動」に着目した独自の解析法を編み出すことで、褐色脂肪分化に関わる新規パスウェイを同定することに成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A「血管狭窄への影響から見た内皮細胞の品質評価の基盤技術の確立」

ヒト血管平滑筋細胞と様々なヒト血管内皮細胞を共培養し、内皮細胞が平滑筋細胞の増殖に与える影響を定量的に評価した。結果、ヒト初代培養血管内皮細胞は、由来する組織の種類に関わらず、平滑筋細胞の増殖を促進した(悪玉内皮)。一方、ヒト ES 細胞から作製した内皮細胞は、ES 細胞の株に関わらず、作製直後のフレッシュな状態では平滑筋細胞の増殖を抑制したが(善玉内皮)、継代を重ねたり酸化ストレスに暴露された後では平滑筋細胞の増殖を促進した(悪玉内皮)。またヒト iPS 細胞から作製した内皮細胞では、株により異なる結果が得られた。レトロウイルスベクターを用いて樹立したヒト iPS 細胞は、ES 細胞と同様の結果を示す株と、作製直後から悪玉の形質を示す株とがあった。一方、センダイウイルスベクターを用いて樹立したヒト iPS 細胞は、作製直後はもちろん、継代を重ねても酸化ストレスへの暴露後も善玉性がよく維持された。このような iPS 細胞の株による違いは、外来遺伝子の染色体挿入の有無に基づくゲノムストレスの差異を反映していると考えられる。即ち、樹立時にゲノムストレスに暴露された iPS 細胞(レトロウイルスベクターで樹立)に由来する内皮は悪玉にシフトし、ゲノムストレスを受けずに樹立された iPS 細胞(センダイウイルスベクターで樹立)に由来する内皮は善玉にシフトする、と考えられる。さらに善玉内皮群と悪玉内皮群で網羅的遺伝子発現解析(マイクロアレイ)を実施し、悪玉群に選択的に発現している遺伝子として Regulator of G-protein signaling 5 (RGS5)を同定した。かつ遺伝子導入実験およびノックダウン実験から RGS5 が「悪玉化遺伝子」であることを確認した(論文1)。さらに蛋白キナーゼの体系的活性測定(proteomic kinase assay)ならびに特異的阻害剤を用いた実験から、p38 MAPK が RGS5 下流で内皮の品質管理(善玉/悪玉)に関わることを見いだした(論文2)。そして内皮分類に

関する新しい概念(善玉/悪玉)の妥当性を検証するために、傷害を与えたマウス大腿動脈にヒト iPS 由来内皮(善玉, 悪玉)を移植して動脈狭窄の進行状況を追跡した結果、善玉内皮を移植した大腿動脈は狭窄が阻止されたが、悪玉内皮を移植した大腿動脈は狭窄が増悪した(図1)(論文3)。以上、ヒト血管内皮細胞の品質管理における新規指標として「RGS5 遺伝子発現レベルに基づいた善玉内皮(血管狭窄防止性)と悪玉内皮(血管狭窄増悪性)の分類」に関する基盤技術を確立した(特許1)。

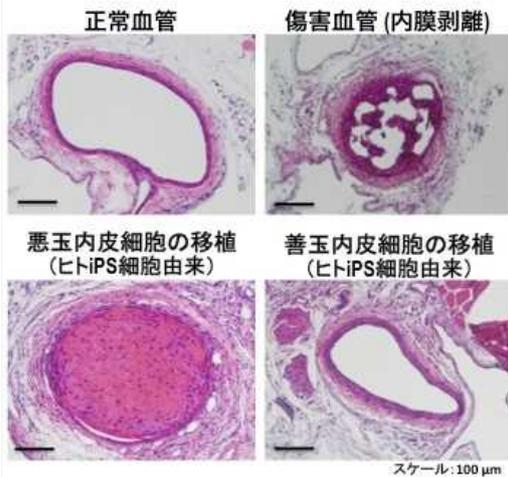


図1 善玉内皮による血管狭窄の防止

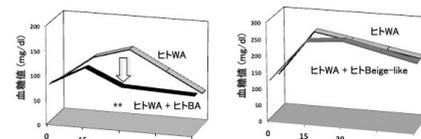


図2 ヒト褐色脂肪細胞の糖代謝改善効果

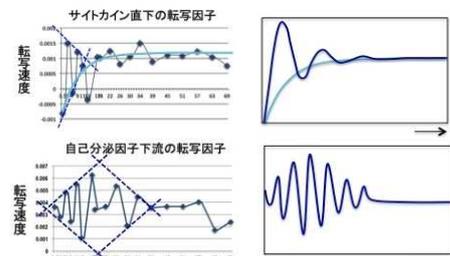


図3 褐色脂肪分化過程の転写速度解析

研究テーマ B「ヒト褐色脂肪細胞の糖代謝向上効果の解析技術の開発」

ヒト多能性幹細胞から作製した褐色脂肪細胞(以下、ヒト褐色脂肪細胞)を移植したマウスは、翌日には早々に糖代謝が改善する(Nishio et al., Cell Metab 2012)。これは従来の考え(褐色脂肪細胞は熱産生に伴うカロリー消費による体重減少を介して糖代謝が改善するという考え)を覆す所見であり、糖代謝改善は褐色脂肪細胞が産生する液性因子(ホルモン)を介する作用であることが強く示唆される。このような早い時間経過で糖代謝が改善されることはそれまで知られていなかったが、それは「高品質の褐色脂肪細胞」を得る手段がなかったことに起因する。糖代謝改善と熱産生が独立の現象であることは、ヒト白色脂肪細胞(以下、ヒトWA)を汎用の処理により熱産生能を賦与した細胞(ヒト beige-like)を移植しても、ヒト褐色脂肪細胞(ヒト BA)で見られたような糖代謝改善効果は認められなかったことから支持される(図2)。さらにヒト BA の培養上清(BA-Sup)をマウスに投与すると糖代謝が改善したことから、ヒト BA は糖代謝改善性ホルモンを分泌することが明らかとなった。このホルモンの分子量は既知の糖代謝改善性ホルモンのどれとも異なっていたことから新規分子であることを確認し、現在、当該分子を純化中である。

研究テーマ C「ヒト褐色脂肪細胞初期発生過程の遺伝子発現制御システムの解析技術の開発」

それまで解析が全くなされてこなかった「ヒト BA の初期発生過程」を理解するため、ヒト ES/iPS 細胞からの BA 分化誘導過程において経時的(~72 時間後)に網羅的遺伝子発現解析(マイクロアレイ)を実施した。また、特定の時点にて actinomycin-D 処理により転写を停止させた細胞で経時的(~8時間)にマイクロアレイを行うことで、各メッセージの半減期を算出し

た。これらの2つの解析結果を組み合わせることで各遺伝子の転写速度を計算した(網羅的遺伝子転写速度解析)。結果、分化培地に添加されているサイトカインの直下で機能する転写因子をコードする遺伝子群の転写速度は、初期時間帯(～14時間)において減衰振動を示すことを見いだした(図3)。BA分化過程では、サイトカイン刺激により直下で機能する転写因子は活性化されて核内に移行して転写を促進した後で分解される。BA分化誘導過程では培地に添加されたサイトカインからのシグナルは常にオンの状態になっているため、分解された分を補充するためには転写因子をコードする遺伝子群の転写が一過性に促進されることとなる。このようなフィードバックシステムが機能することで当該遺伝子群の転写速度に減衰振動が見られると考えると、上記の現象を理解することができる。この考えをさらに発展させると、ヒトES/iPS細胞が分化過程で分泌する因子(autocrine factor)をコードする遺伝子の転写速度には、減衰振動の前に増幅型振動を起すことが想定される。そこで転写速度に増幅減衰型の振動が見られる遺伝子を探索したところ、ヒトBA初期分化誘導過程で機能する「新規なautocrine factor」を同定するができた。

3. 今後の展開

研究テーマA「血管狭窄への影響から見た内皮細胞の品質評価の基盤技術の確立」

血管内皮細胞の悪玉化を引き起こす「RGS5-p38 MAPK signaling axis」の全貌を解明し、血管内皮細胞の悪玉化を阻止する効果のある薬剤を開発する。現在、RGS5-p38 MAPK シグナルの下流で悪玉化に寄与するエフェクター分子を同定しつつある。今後は、当該エフェクター分子の悪玉化への関与を実証したうえで、これを標的とした創薬研究を展開する。現在、Crispr/Cas9 システムを駆使し、薬剤スクリーニングに有効な「遺伝子改変ヒトiPS細胞株」の樹立に向けて基礎検討を進めている。「悪玉化エフェクター分子」の阻害薬が開発されると、日本人死因の上位を占める虚血疾患の予防と治療が大きく発展することが期待される。

研究テーマB「ヒト褐色脂肪細胞の糖代謝向上効果の解析技術の開発」

今後は、ヒトES/iPS細胞から作製した褐色脂肪細胞の培養上清(BA-Sup)中に存在する糖代謝改善因子を純化し、質量分析装置や核磁気共鳴の技術を駆使して当該分子の構造を決定する。これにより「糖代謝改善作用のある新規ホルモン」が同定されるが、必要に応じて構造活性相関解析を行うことで最も有効に作用するホルモン誘導体の作製も行う。将来的には、これらの分子に関して、糖代謝異常(インスリン抵抗性、2型糖尿病)の新規治療薬としての有効性を評価すべく臨床治験を実施する計画である(phase I～III)。

研究テーマC「ヒト褐色脂肪細胞初期発生過程の遺伝子発現制御システムの解析技術の開発」

網羅的転写速度解析という新技术を適用することで、ヒトES/iPS細胞のBA分化初期過程で機能する新規な autocrine factor を同定することに成功した。現在、この因子をコードする遺伝子を欠損するヒトiPS細胞株を樹立中であり、今後は同株を用いて当該因子の機能につき解析を進めていく計画である。また本技術を適用して、ヒト褐色脂肪細胞発生過程の全貌を明らかにするとともに、同技術を他分野に応用することで様々なヒト組織(肝臓、膵臓、脳など)の発生過程の解析を行い、多様な疾患に対してそれぞれ新しい創薬標的分子を同定していく計画である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

■血管内皮細胞の研究に関して:

ヒト血管内皮細胞の品質管理に関する新しい概念(善玉/悪玉)を提唱し、その分子基盤として”RGS5-p38 signaling axis”を同定し、さらに生体における妥当性(in vivo relevance)を移植実験により証明した。それまで誰も知らなかった『善玉内皮』の存在を「ヒト iPS 細胞の分化誘導技術」に立脚した研究により世界で初めて見だし、かつ生体から採取することができない「稀少」かつ「高価値」の細胞を研究対象として取り扱うことを可能にした本研究は、ヒトにおける生体恒常性維持機構の理解に大きく貢献するものとなった。本研究期間内に当初の計画は達成され、新規の研究費を獲得を通じて研究を継続・展開する基盤も整えることができた。現在、世界的に注目されている「疾患特異的マイクロ RNA 解析」の立場に立脚して、内皮の悪玉化を惹起するマイクロ RNA の同定を進めているが、興味深いことにこのマイクロ RNA は内皮の悪玉化のみならず、生活習慣病の様々な病態を再現できることが示唆され、生活習慣病を「生体恒常性維持機構の破綻」として理解することの妥当性を支持するものとなった。今後は、本研究の成果をもとに、基礎研究のみならず創薬研究の展開も睨んで研究を発展させる所存である。

■褐色脂肪細胞の研究に関して:

「ヒト ES/iPS 細胞の高効率褐色脂肪細胞分化誘導技術」の開発に立脚して、それまで誰も知らなかった「ヒト褐色脂肪細胞が分泌する糖代謝改善ホルモン群」の存在を提示した本研究は、21世紀の国民病とも言われる糖代謝異常の病態把握ならびに創薬研究の発展に貢献するものとなった。今後は上記ホルモンの分子構造を同定して創薬研究を展開する計画である。また本研究では、それまで不可能であった「ヒト褐色脂肪細胞発生過程」を解析するための新技術として「網羅的転写速度解析に立脚した転写速度振動遺伝子の抽出による遺伝子発現制御解析技術」を開発した。これにより褐色脂肪分化に寄与する新規サイトカインの同定にも成功した。このように「独自の培養技術」と「独自の解析技術」の開発に基づき、それまで研究ツールがないための研究が遅れていた、しかしヒト生体の恒常性維持機構の理解とその破綻による疾病の病態解明に重要である「ヒト褐色脂肪細胞」に関する諸解析を可能とした本研究の意義は高く、今後は21世紀の国民病である糖代謝異常の治療開発に向けて研究を展開する所存である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題は、日本人の健康寿命の延長に向けた治療開発の重要性が高い「虚血性疾患」と「糖代謝異常」を対象に、病態を「恒常性維持機構の破綻」という立場から理解すべく「血管内皮細胞」と「褐色脂肪細胞」に注目してヒト多能性幹細胞を用いて研究を行った。その結果、内皮には「平滑筋増殖抑制型(善玉)」と「平滑筋増殖促進型(悪玉)」の2種類のものがあり、前者は傷害血管の狭窄を阻止し、後者は狭窄を増悪することが確認された。さらに内皮の形質差を決める分子を探索し、内皮の悪玉化を生じる責任遺伝子として Regulator of G-protein signaling 5 (RGS5)を同定し、RGS5 の下流で p38 MAPK が内皮

の品質管理に関与することを明らかにした。また、褐色脂肪細胞は熱産生とは独立に、新規の可溶性生理活性物質を介して糖代謝を改善していることが判明し、網羅的遺伝子転写速度解析という新技術を適用することで「転写速度の振動」に着目した独自の解析法を編み出すことで、褐色脂肪細胞分化に関わる新規パスウェイを同定することに成功した。このように、血管内皮細胞の形質差を生み出す新たな分子機序の解明、褐色脂肪細胞の分化に関わる新たな分子機序の解明により、それぞれが関わる疾患に対する治療薬開発の基礎情報の取得に成功した。

研究費は、計画通りの予算で研究を実施することができた。

本研究者は、さきがけ研究により、国際シンポジウムでの講演も多数行っており、原著論文も含め、総説等の執筆も増えており、今後の活躍が十分に期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Nishio M, Nakahara M, Sato C, Saeki K, Akutsu H, Umezawa A, Tobe K, Yasuda K, Yuo A, Saeki K. New categorization of human vascular endothelial cells by pro- versus anti-proliferative phenotypes. World J Transl Med 4: 88-100, 2015.
2. Nakahara M, Nishio M, Saeki K, You A, Saeki K. p38 MAPK regulates type-I versus type-II phenotyping of human vascular endothelial cells. World J Transl Med 4: 101-112, 2015.
3. Nishio M, Nakahara M, Saeki K, Fujiu K, Iwata H, Manabe I, Yuo A, Saeki K. Pro- versus anti-stenotic capacities of type-I versus type-II human iPS-derived endothelial cells. World J Transl Med 4: 113-122, 2015.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1件

1.

発 明 者: 佐伯久美子、湯尾明、西尾美和子、佐伯晃一、長谷川護、
発明の名称: 血管平滑筋細胞の増殖を抑制する血管内皮細胞の検出方法
出 願 人: 独立行政法人国立国際医療研究センター、ディナベック株式会社
出 願 日: 2013/5/31
出 願 番 号: 特願 2013-115325

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【国際シンポジウムでの講演】

- 1.Saeki K. "Dual Roles for Endothelial Cells in Arteriosclerosis Development: Unexpected Impacts of Human iPS-derived Endothelial Cells on Ischemic Disease Control". BIT's 8th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells 2015. Mar 20, 2015, Busan, Korea.
- 2.Saeki K. Human ES/iPS-derived cells provide a breakthrough technology by creating innovative cell models for biomedical research. Therapeutics Discovery Symposium Asia - 2013, Nov 25-26, 2013, Tokyo, Japan

3. Kumiko Saeki. "Production of Functional Brown Adipocytes from Human Pluripotent Stem Cells." Epigenomics, Sequencing & SNiPs-2013 Meetings (Harvard University) Jul 10-11, 2013, Boston. USA

【英文総説】

1. Nishio M, Saeki K. Differentiation of human pluripotent stem cells into highly functional classical brown adipocytes. *Methods Enzymol.* 2014; 537: 177-197.
2. Nishio M, Nakahara M, You A, Saeki K. Human pluripotent stem cells: towards therapeutic development for the treatment of lifestyle diseases (Review). *World Journal of Stem Cells*: in press

【プレスリリース】

1. ヒトiPS細胞から「やせる細胞」産経新聞 2012年10月16日号
2. 「NCGMなど、ヒトES/iPS細胞の90%以上を機能性褐色脂肪細胞に分化誘導、遺伝子導入は不要」日経バイオテク 2012年11月5日号