

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：ヒト iPS 細胞由来褐色脂肪細胞を用いた新規糖尿病治療薬の開発
2. 研究開発代表者：佐伯久美子（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）
3. 研究開発の成果：

糖尿病は日本人の健康寿命に深刻な影響を与えるため、その制圧は急務である。近年、高い熱産生能を発揮する「褐色脂肪細胞（Brown Adipocyte; BA）」が糖尿病の新規治療標的として注目されている。しかしヒト検体の入手は極めて困難であり創薬研究は遅れている。これに対して我々は「ヒト多能性幹細胞からの高効率な BA 作製技術」を開発してこの問題を克服した。さらにこの技術を用いた解析から、ヒト多能性幹細胞由来 BA（以下、ヒト BA）が糖代謝を向上する効果を持つ複数の因子を分泌していることを見いだした。本研究ではこれらの因子を同定するとともに、BA 選択的遺伝子の下流域にインジケーター遺伝子を挿入したヒト iPS 細胞株を樹立し、これを用いたハイスループットなアッセイにより低分子化合物ライブラリーから BA 分化促進薬をスクリーニングする。本研究により糖尿病の制圧に向けた新規治療薬が開発され、日本人の健康寿命延長と医療費・介護費の削減が期待される。

### （1）ヒト BA 由来糖代謝改善因子の同定に関する進捗：

少量のヒト BA 培養上清を用いて、複数種のカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分画化を行い、耐糖能を向上する効果を持つ因子群の粗精製を行った。同時に、ヒト BA 培養上清の大量調製に向けて、ヒト多能性幹細胞の無フィーダー培養による未分化維持につき検討を行った。一定期間の順化作業を行うことで、マウスのフィーダー細胞上で維持したヒト多能性幹細胞を無フィーダー培養系で維持することが可能となり、そこから従来法と遜色のない効率で BA 分化誘導が達成された。しかし、無フィーダー培養系での未分化維持を繰り返すと BA 分化誘導の効率と質が低下することが判明した。多方面からの検討を行った結果、無フィーダー培養系にある条件を賦与することでこの問題は解決に向かっており、ヒト BA 培養上清の大量調製に向けた準備は整いつつある。

### （2）BA 分化促進薬のスクリーニングに関する進捗：

BA に選択的に発現することが報告されている Zic family member 1 (ZIC1) 遺伝子の下流領域にインジケーター遺伝子（蛍光タンパク質等）を挿入したヒト iPS 細胞株を樹立すべく、Cas9 発現ベクター及びノックインベクターの構築に向けて検討した。Cas9 発現ベクターの構築にはセンダイウイルスベクター (Sendai virus vector; SeV) を用いた。まず基礎検討として GFP 発現ユニットを搭載したセンダイウイルスベクター (SeV-GFP ベクター) をヒト iPS 細胞に導入したところ、高効率（ほぼ 100%）に GFP タンパクが発現すること、細胞生存性は影響を受けないことが確認された。しかし、Cas9 発現ユニットを搭載したセンダイウイルスベクター (SeV-Cas9) を構築してヒト iPS 細胞に導入したところ、時間経過とともに細胞生存性が低下することが判明した。Cas9 タンパクの恒常的発現はヒト iPS 細胞を傷害することが示唆されたため、現在、温度感受性センダイウイルスベクターシステムを用いてベクターを構築し直すとともに、タンパク導入系の適用についても検討を進めている。ノックインベクターに関しては、ZIC1 タンパクの発現が影響されないよう stop codon よりも 3' 側を挿入箇所とし、かつ ZIC1 遺伝子の転写効率が影響を受けないよう転写調節ドメインを保存するようにベクター構造を決定した。現在、ノックインベクターの最終構築とヒト iPS 細胞への導入に向けて準備を進めている。