

エネルギー代謝に紐づいた生理的応答、作用機構に関する分子細胞生物学研究



東京大学大学院農学生命科学研究科 高橋 裕

はじめに

細胞内のエネルギー代謝は生体の恒常性維持にとって必要不可欠であり、巧妙に制御されている。糖尿病などの代謝性疾患の多くは糖・脂質などのエネルギー代謝の異常と密接に関連しており、その解明は新たな疾患予防、治療法の開発につながることが期待される。著者は、これまでに生理機能が高い細胞を中心とした実験材料や研究手法を活用し、エネルギー代謝に関わる生体内の現象について分子細胞生物学的観点からの研究を行ってきた。本要旨では、脂肪細胞における分化および脂肪滴形成における分子機構の解明、高度に生理的な培養モデルであるオルガノイドの基盤技術開発とそれを用いた糖・脂質代謝などの生理機能の解析に関する研究概要を紹介する。

1. 転写調節を介した脂肪細胞分化、脂肪滴形成の分子機構

脂肪細胞分化は前駆脂肪細胞がホルモンによる刺激を受け、様々な転写因子カスケードの活性化により進行する。脂肪細胞分化、脂肪滴形成の制御は、肥満を始めとする生活習慣病の治療、予防に繋がることが想定され、その分子機構の解明は重要である。著者らは脂肪細胞分化のマスター・レギュレーターである Peroxisome proliferator-activated receptor (γ) の転写活性抑制因子として、小胞体ストレス誘導分子 Tribbles homolog 3 を同定した¹⁾。また、動脈硬化の進展に関与する Apolipoprotein CIII の発現が脂肪細胞分化過程において核内受容体 Retinoid X receptor α によって転写制御されること²⁾、脂肪滴局在タンパク質 Perilipin 5 の発現は株化細胞である 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化過程では誘導されないが、胚性線維芽細胞や初代前駆脂肪細胞の分化過程で大きく誘導され、PPAR γ による制御を受けること³⁾を示した。さらに、小胞体からゴルジ体に輸送後、切断を受けて活性化する脂肪酸合成酵素群の転写調節因子 Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1 に着目した。SREBP-1 の活性化は脂肪細胞分化シグナルとは独立して脂肪滴形成により誘導され、活性化した SREBP-1 は脂肪滴形成をさらに促進するという、脂肪細胞内のエネルギー蓄積における正のフィードバック調節機構の存在を見出した(図1)⁴⁾。また、生体がエネルギーを必

要とする際には、脂肪細胞は蓄えた脂質を分解して放出するという役割を果たす。著者らは、脂肪滴局在タンパク質 Perilipin 2 に着目し、脂質分解誘導時にタンパク質分解が抑制され、脂質分解を促進するという Perilipin 2 の生理機能を明らかにした⁵⁾。

2. ヒトオルガノイドの培養技術開発と生理機能解析

生体内の環境とは異なり、プラスチック容器表面の二次元環境で行われる従来の細胞培養は、細胞間相互作用の喪失を伴い、細胞機能に影響を与える可能性がある。そこで培養方法を二次元から三次元に変えたときの細胞生理機能の変化を解析した。細胞は、薬物代謝酵素の発現が初代肝細胞に近いとされる HepaRG 細胞を用いた。また、培養環境のみの差異を比較するため、特殊な試薬や器材を用いず、液滴中で重力により細胞を集積させるハンギングドロップ法を三次元培養法として採用した。その結果、三次元培養により肝細胞マーカーや肝機能に重要な糖・脂質の代謝に関わる遺伝子群の発現が誘導された⁶⁾。本研究から三次元培養の有用性が示されたと考え、著者はさらに生理的な培養モデルであるオルガノイドに着目した。

2-1. 小腸オルガノイド

オルガノイドは臓器・組織特異的幹細胞と幹細胞から分化した細胞が自己組織化する三次元構造体である。臓器様の構造や性質を示し、動物移植により機能的な臓器を形成するため、高度に生理的なモデルであると見なされている。特にヒトオルガノイドは、動物実験の代替としてだけではなく、ヒトバイオロジー解明のための新しい実験材料となることが期待される。

著者はまず、栄養素の吸収、代謝の場である小腸に着目した。ただし、ヒト小腸オルガノイドの培養には様々な増殖因子や三次元培養を行うための細胞外基質を含むゲルが必要となり、すべて市販品を用いた場合には 24 ウェルプレート 1 枚分の培養で約 20 万円もの高額な費用が必要となる。また、小腸オルガノイドは内側が管腔側に相当する細胞極性を示す細胞塊であるため、管腔側からの栄養素吸収を評価できない、従来の遺伝子導入法を適用できないといった技術的な障壁が存在していた。筆者らは、株化細胞であるマウス L 細胞に、ヒト小腸オルガノイドの増殖因子である Wnt3a, R-spondin1, Noggin をレンチウイルス発現系により同時かつ適切なバランスで安定発現させ、その培養上清をオルガノイドの培地として用いることで、培養コストを 1/10 以下に下げる方法を確立した⁷⁾。本技術をさらに発展させ、上記細胞にさらに Hepatocyte growth factor (HGF) を安定発現させた細胞の培養上清を培地として用い、さらにマトリゲルからより安価な I 型コラーゲンゲルに変えることで、オルガノイドの培養コストを当初の 1/100 以下にまで低減させることに成功した⁸⁾。本法を活用することで、ヒト小腸オルガノイドの日常的な使用が可能となった。さらに、三次元状態のオルガノイドを敢えて二次元培養することで管腔側を露出させ、管腔側から

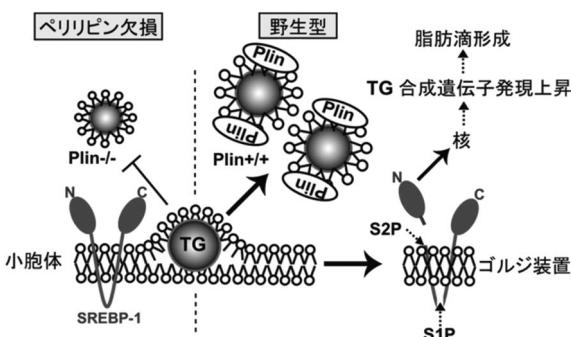


図1 SREBP-1活性化を介した脂肪滴形成の促進機構

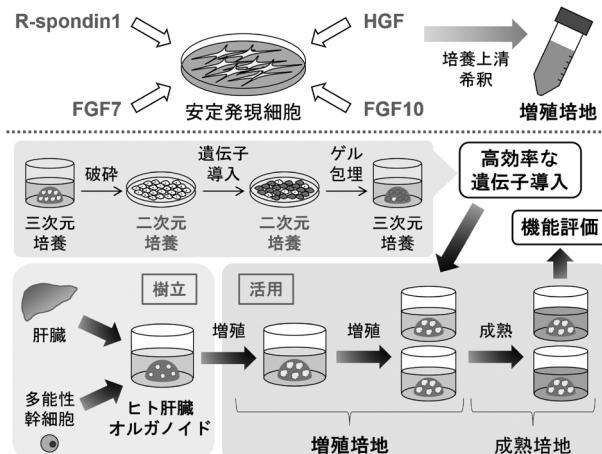


図2 ヒト肝臓オルガノイドを扱うための基盤技術

の刺激が可能となる単層培養方法を確立した⁹⁾。単層化した小腸上皮細胞は従来の細胞株と同様に扱うことができるため、従来の方法で遺伝子導入後、三次元培養に戻すことで結果としてオルガノイドに対して高効率に遺伝子導入することも可能である。本上皮細胞は三次元状態のオルガノイドと同様の性質を示すこと¹⁰⁾、さらに従来のヒト小腸上皮モデルであるCaco-2細胞では評価できない、糖・脂質代謝機能を示すこと¹¹⁾が示された。

2-2. 肝臓オルガノイド

ヒト小腸オルガノイドで培った経験を基にして、著者らは小腸上皮と同様に糖・脂質を中心としたエネルギー代謝が盛んな肝臓に着目し、ヒト肝臓オルガノイドを用いた研究に着手した。まず、ヒト肝臓オルガノイドの培養に必要なR-spondin1, HGF, Fibroblast growth factor (FGF) 7, FGF10を安定発現するL細胞を樹立し、その培養上清を用いることでオルガノイドの培養コストの大幅な削減に成功した¹²⁾。ただし、肝臓オルガノイドは増殖期においては細胞の代謝機能が低いことが判明したため、増殖因子を除いた成熟培地に切り替えることで様々な肝細胞機能を高める方法を確立した。さらに、小腸オルガノイドと同じく、一過的な二次元培養を介して肝臓オルガノイドに対して高効率に遺伝子導入する方法も確立した。また、肝臓オルガノイドは、実験動物や株化肝細胞では再現困難な、生理的な超低密度リポタンパク質の分泌能を持つことを示した。このように、ヒト肝臓オルガノイドを用いて生理的な肝細胞機能を評価するための技術基盤を構築した(図2)。

おわりに

これまで多くの食品・栄養科学研究では、動物実験の結果をヒトに外挿することでヒト体内の生理現象、機能を予測するというアプローチが採られてきた。しかし近年、食品系企業においては動物福祉の観点から動物実験が基本的に禁止されるなど、従来型の研究アプローチからの転換が迫られている。特に著者が取り組んできたオルガノイドは、ヒトバイオロジーを解明するための新しい実験材料として、食品科学研究において今後広く活用されていくことが見込まれる。

(引用文献)

- 1) Takahashi, Y., et al. TRB3 suppresses adipocyte differentiation by negatively regulating PPARgamma transcriptional activity. *J Lipid Res* 49: 880-892. (2008)
- 2) Takahashi, Y., et al. ApoC-III gene expression is sharply increased during adipogenesis and is augmented by retinoid X receptor (RXR) agonists. *FEBS Lett* 582: 493-497. (2009)
- 3) Takahashi, Y., et al. The gene expression of the myocardial lipid droplet protein is highly regulated by PPARgamma in adipocytes differentiated from MEFs or SVCs. *Biochem Biophys Res Commun* 399: 209-214. (2010)
- 4) Takahashi, Y., et al. Perilipin-mediated lipid droplet formation in adipocytes promotes sterol regulatory element-binding protein-1 processing and triacylglyceride accumulation. *PLoS One* 8: e64605. (2013)
- 5) Takahashi, Y., et al. Perilipin2 plays a positive role in adipocytes during lipolysis by escaping proteasomal degradation. *Sci Rep* 6: 20975. (2016)
- 6) Takahashi, Y., et al. 3D spheroid cultures improve the metabolic gene expression profiles of HepaRG cells. *Biosci Rep* 35: e00208. (2015)
- 7) Takahashi, Y., et al. A refined culture system for human induced pluripotent stem cell-derived intestinal epithelial organoids. *Stem Cell Rep* 10: 314-328. (2018)
- 8) Takahashi, Y., et al. Drug cytotoxicity screening using human intestinal organoids propagated with extensive cost-reduction strategies. *Sci Rep* 13: 5407. (2023)
- 9) Takahashi, Y., et al. Reciprocal inflammatory signaling between intestinal epithelial cells and adipocytes in the absence of immune cells. *EBioMedicine* 23: 34-45. (2017)
- 10) Takahashi, Y., et al. Comparison of gene expression and activation of transcription factors in organoid-derived monolayer intestinal epithelial cells and organoids. *Biosci Biotechnol Biochem* 85: 2137-2144. (2021)
- 11) Takahashi, Y., et al. Organoid-derived intestinal epithelial cells are a suitable model for preclinical toxicology and pharmacokinetic studies. *iScience* 25: 104542. (2022)
- 12) Kuboyama-Sasaki, A., et al. Establishment of a cell culture platform for human liver organoids and its application for lipid metabolism research. *Biotechnol J* 19: e2300365. (2024)

謝 辞 本研究は、主に東京大学大学院農学生命科学研究所応用生命科学専攻食品生化学研究室、および東京大学医科学研究所炎症免疫学分野(当時)にて行われたものです。大学4年生の研究室配属時から博士課程修了時までの指導教員であり、私が企業研究員からアカデミア研究者として転身するための貴重な機会をいただき、また本賞へのご推薦をいただきました。東京大学名誉教授佐藤隆一郎先生に心から感謝申し上げます。佐藤隆一郎先生には、研究者としての基礎(いかに適切な比較対照を設定するかが重要、という教えは今も肝に銘じています)を叩きこんでいただいただけではなく、現在も日々の研究のご指導、ご鞭撻をいただいている。また、私が企業からの出向研究員として受け入れていただき、オルガノイド研究を現在の専門分野の一つとして確立するための希有な機会をいただきました。東京大学名誉教授(現千葉大学卓越教授)清野宏先生に厚く御礼申し上げます。清野宏先生には、社会実装へと発展させる基礎研究の在り方、進め方を間近で学ばせていただけではなく、世界超一流研究者との交流の機会を何度もいただきました。和歌山県立医科大学教授佐藤慎太郎先生、千葉大学准教授倉島洋介先生には私が企業に所属していた頃より現在に至るまで様々なご助言をいただき、深く感謝致します。本研究は、その他にも、東京大学教授山内祥生先生、お茶の水大学准教授清水誠先生などの多くの先生方、日本たばこ産業株式会社をはじめ共同研究を賜った民間企業の方々、現在私が所属する食品生化学研究室のメンバー、卒業生によってご支援、ご尽力をいただきました。この場を借りまして深謝申し上げます。