

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790949

研究課題名(和文) 低分子化合物スクリーニングに基づくマウスES細胞からの膵細胞分化誘導法の効率化

研究課題名(英文) Small compounds promote differentiation of functional insulin producing cells

研究代表者

坂野 大介 (Sakano, Daisuke)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：40571039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1200の低分子化合物の中からVMAT2阻害剤にマウスES細胞から膵細胞を分化誘導する効果が高める効果があることを見つけました。VMAT2は細胞内小胞に存在するモノアミン量を調節する因子です。そして、膵細胞が糖濃度に応じてインスリンを分泌する能力を促進する化合物も見つけました。これらの2種類の化合物を併用して分化湯堂を行い、糖尿病モデルマウスへ移植したところ正常な血糖値に回復しました。今後、この研究で得られた情報をもとにヒトiPS細胞からの膵細胞の分化誘導を進め、将来的な臨床応用に貢献できるよう研究を進めます。

研究成果の概要(英文)：Despite numerous efforts, it is still difficult to efficiently produce mature insulin-secreting beta cell from ES cells. Here, we focused on the late stages of the differentiation and performed a cell-based screening of chemical compound library. We identified reserpine as a small molecule that inhibits vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2)-mediated secretion of monoamine that promoted differentiation of Pdx1-positive progenitors into insulin-expressing cells. Our analyses suggest that one of the VMAT2-controlled monoamines, dopamine, serotonin and histamine negatively regulates beta cell differentiation. Exogenous addition of a cell-permeable cAMP analogue dBu-cAMP canceled these inhibitory effects on beta cell differentiation and synergized with VMAT2 inhibition. The ES cell derived beta cells showed glucose-sensitive insulin secretion ability, and reverse d hyperglycemia upon engraftment into AKITA diabetic mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：ES・iPS細胞 膵細胞 インスリン 糖尿病 低分子化合物 モノアミン

## 1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病は膵細胞が破壊されることで血糖値を下げるために必要なインスリンが産生されないことが原因である。治療には膵臓や膵島の移植治療が効果的だが、ドナー不足が妨げとなっている。胚性幹(ES)細胞から膵細胞への分化機構の解明と分化細胞の移植治療への応用が可能となれば、多能性幹細胞を用いた再生医療の実現化に近づくと考えた。

### 1) 哺乳類の膵臓の発生

受精卵から細胞が中内胚葉に分化し、胚性内胚葉、膵前駆細胞、内分泌前駆細胞を経て細胞へ分化する。ES細胞から細胞を誘導する研究も盛んに行われており、ヒトES細胞でも成長増殖因子の段階的な添加によって細胞まで分化することが報告されている(D'Amour et al., 2006)。しかし分化効率が低く、インスリン分泌能も生体内の膵細胞には遠く及ばない。問題点を改良し再生医療に応用するため、生体内での細胞の分化機構の解明が必要である。

### 2) 我々のこれまでの研究

マウスES細胞をM15支持細胞上で培養し、成長増殖因子を添加することで30%のES細胞がPdx1陽性の膵前駆細胞に分化することを報告した(Shiraki et al., 2008)。

M15細胞との共培養の効果は、M15が供給する細胞外マトリクスであり成長増殖因子の添加によって分化がさらに促進されることがわかった。

この細胞外マトリクスは人工基底膜(sBM)を使用することで代用できることを明らかにした(Higuchi et al., 2010)。0.01%程度の細胞をインスリン産生細胞に分化させることに成功した。ES細胞から内胚葉系譜への分化誘導には細胞基底膜構造など足場となる3次元構造が必要と考えた。

我々はM15やsBMに代わる細胞分化の足場として合成基材を用い、インスリン産生細胞(細胞)に分化させることに成功している。ばらつきを最小限に抑え、安定的かつ大量に低分子化合物をスクリーニングできる系を確立した。

低分子化合物の大規模スクリーニングによる分化を促進する薬剤を探索した。その結果、血圧降下作用、鎮静作用、精神安定作用をもつアルカロイドの一種であるレセルピンがもっとも高いインスリン産生細胞への分化の誘導効果を示した。レセルピンはPdx1陽性細胞の比率を変化させることなく、濃度に依存的にPdx1陽性かつインスリン陽性の細胞の割合を増加させた。また、レセルピンと同じく小胞モノアミン輸送体のひとつであるVMAT2(vesicular monoamine transporter 2)の阻害剤として知られるテトラベナジンも、レセ

ルピンと同様の効果を示した。

## 2. 研究の目的

1)膵前駆細胞から細胞への分化機構の解明  
過去の細胞の分化研究では、膵前駆細胞から細胞の分化過程でどのような分子が働いているのかいまだ不明な点が多い。我々が明らかにしたVMAT2はこれまでに膵臓分化との関連について報告されていない分子である。VMAT2の阻害がどのようなメカニズムによって膵細胞への分化を促進したのか詳細に解析する必要がある。

### 2) ES細胞由来の膵細胞の機能評価

試験管内で分化誘導された膵細胞が糖濃度に応じてインスリンを分泌できることと移植されたのちに生体内で機能するのかを調べることで将来的な移植治療への可能性を探った。方法としては、糖尿病モデルマウスの腎皮膜下へのES由来の分化細胞の移植実験によって細胞の機能評価を行った。

## 3. 研究の方法

### 1) 低分子化合物を用いたマウスES細胞からの細胞誘導の効率化

本研究においては膵前駆細胞および細胞のマーカー遺伝子であるPdx1がGFPで標識されるES細胞株Pdx1/GFPを用いる。培養は96穴の細胞培養用ディッシュを用いる。申請者は細胞培養の手法として既に記載したように安定的にInsulin産生細胞が分化する培養条件を見出している。

この場合、分化効率は細胞全体の0.01%程度であると予想される。この培養条件では、数種の成長因子を添加した3種類の培地を連続的に供することでES細胞が胚性内胚葉、膵前駆細胞、分化させる。培養開始11日目(d11)にPdx1陽性の膵前駆細胞となりGFPの蛍光が観察できる。したがってGFP蛍光が各サンプル間で均一になっていることを確認した後、d11から1日毎に培地を交換する。同時に培地中には新たに低分子化合物を添加する。そして、d16に抗Insulinマウス抗体および抗Pdx1ウサギ抗体により免疫染色を試みた。この場合、両方の抗体により染色された細胞が膵細胞であると判断する。全体の細胞数はDAPIにより核を染色することによりカウントし、全体の細胞数に占める膵細胞の割合を算出した。

### 2)膵細胞の成熟化

インスリン産生細胞の誘導効率を上昇させる以外に細胞の成熟化を促進する低分子化合物について探索する。細胞の成熟度はインスリンの分泌能力を指標に判断した。その際、培地中に放出されるCペプチドをELISA法によって定量する。以上のように細胞の誘導

と成熟化を促進する化合物は複数見つかることが予想される。その場合、ケミカルライブラリーの機能分類において異なる作用を持つ化合物を複数組み合わせることによってさらに高効率、高成熟度の細胞を得た。

#### 4. 研究成果

##### 1) VMAT2 は膵臓 細胞への分化を抑制する

小胞モノアミン輸送体である VMAT2 は膵臓細胞への分化に関しどのような役割があるかを調べる目的で、VMAT2 をノックダウンした ES 細胞株を樹立した。この ES 細胞株はレセルピンやテトラベナジンを添加したときと同じくインスリン産生細胞への分化を促進し、ノックダウンの効率が高いほど分化の促進効果は高かった。したがって、VMAT2 が小胞へモノアミンを取り込む機能は膵臓細胞の分化に抑制的な効果をもつものと推察した。

一般的に、モノアミンは細胞において VMAT2 により小胞に取り込まれないときにはモノアミンオキシダーゼにより分解される。膵臓のランゲルハンス島にはモノアミンオキシダーゼ B が発現している。ES 細胞からの分化の過程において、細胞質におけるモノアミンの量を増加させるためモノアミンオキシダーゼ B の阻害剤を添加したところ、分化するインスリン産生細胞の数が減少した。また、この作用はレセルピンを同時に添加することでレスキューされた。そして、モノアミンであるドーパミン、セロトニン、ヒスタミンを培養 11 日目から培養 17 日目にかけて添加した場合も、モノアミンオキシダーゼ B の阻害と同様にインスリン産生細胞への分化が抑制された。この結果に対し、ドーパミン合成酵素の阻害剤、セロトニン合成酵素の阻害剤、ヒスタミン合成酵素の阻害剤によりインスリン産生細胞の数は増加した。これらの結果から、細胞において VMAT2 により小胞に取り込まれるモノアミンは膵臓細胞への分化を抑制的に制御していることが推定された。

##### 2) VMAT2 の機能の阻害は内分泌前駆細胞を増加させる

テトラベナジンを培養 11 日目から培養 17 日目まで作用させて VMAT2 を阻害すると、膵臓の細胞系譜への分化におけるマーカー遺伝子である *Ngn3* 遺伝子、*Nkx6.1* 遺伝子、*Ins1* 遺伝子の発現が培養 15 日目から培養 17 日目において明らかに上昇した。テトラベナジンの効果のある時期を特定するため、*Ngn3* 遺伝子のプロモーター下において GFP の発現するマウスの ES 細胞を用いて実験したところ、テトラベナジンは分化 11 日目から分化 13 日目において作用して *Ngn3* 陽性の膵臓前駆細胞を増加させることがわかった。すなわち、VMAT2 の阻害は膵臓前駆細胞が *Ngn3* 陽性の内

分泌前駆細胞へと分化する過程を促進することがわかった。また、分化の過程において *Ngn3* 陽性細胞の数が増加することについて、*Ngn3* 陽性細胞それ自体の複製はほとんど起こっておらず、*Ngn3* 陽性細胞への分化の促進がそのおもな原因であると考えられた。

これら ES 細胞からの分化の過程においてみられる VMAT2 の阻害にともなう分化の促進効果は、実際の膵臓の発生においても共通するのかが調べるため、胎生 12.5 日の膵臓の原基をマウスの胎仔から取り出し培養した。実験の結果、テトラベナジンにより、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵臓ポリペプチドなど、内分泌ホルモンの発現がすべて上昇した。これらの結果は、ES 細胞からの分化の実験においてテトラベナジンにより VMAT2 の機能を阻害すると内分泌前駆細胞の数が増加したことと一致した (図 1)。

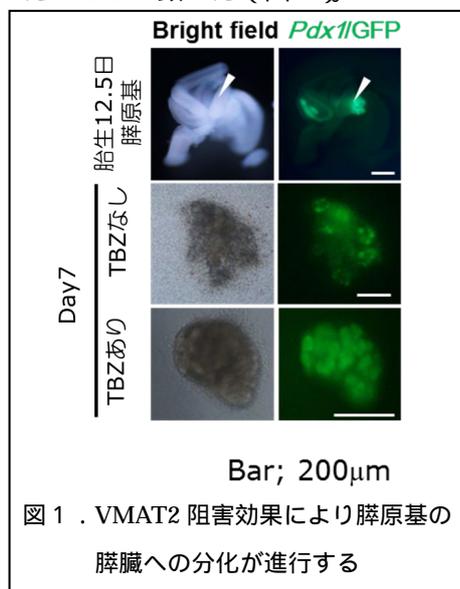


図 1 . VMAT2 阻害効果により膵原基の膵臓への分化が進行する

##### 3) VMAT2 の阻害と cAMP の添加は相乗効果を示す

モノアミンであるドーパミン、セロトニン、ヒスタミンは、すべて G タンパク質共役受容体に結合し cAMP の合成を制御することが知られている。今回のスクリーニングにおいても細胞膜透過型の cAMP 類似体であるジブチリル cAMP がヒットし、ジブチリル cAMP とテトラベナジンはそれぞれ単独でインスリン産生細胞への分化を促進した。そして、両者を同時に添加すると、インスリン産生細胞の数の増加に対しては相加的に、インスリンの mRNA レベルでの発現の上昇に対しては相乗的に、促進効果を示した (図 2)。

成体の膵臓のランゲルハンス島では、cAMP はプロテインキナーゼ A に対し依存性および非依存性の機構によりインスリンの分泌を制御していることが知られている。この研究ではおもにジブチリル cAMP を用いたが、これはどちらの機構も活性化させるので、プロテイン

キナーゼ A 非依存性の経路のみを活性化させる 8CPT-cAMP の効果を調べた。すると、8CPT-cAMP の添加によりインスリン陽性細胞の数は増加しなかった。したがって、cAMP によるインスリン産生細胞の数の増加はプロテインキナーゼ A 依存性の機構を介するものと推定された。

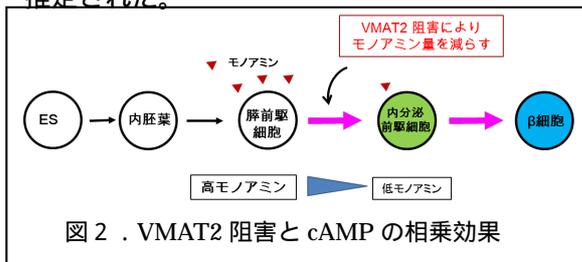


図2 . VMAT2 阻害と cAMP の相乗効果

テトラペナジンおよびジブチリル cAMP により誘導されたインスリン産生細胞を評価するため免疫染色を行った。インスリン陽性細胞は *Pdx1* 遺伝子、*Nkx2.2* 遺伝子、*Nkx6.1* 遺伝子、*MafA* 遺伝子など、膵臓細胞が成熟の過程において発現するマーカー遺伝子を発現していた。さらに、今回の分化培養系により DBA 陽性を示す膵管細胞の分化は誘導されたが、アミラーゼ陽性を示す外分泌細胞の分化はみられなかった。しかも、低分子化合物の添加により分化する細胞の性質に違いはみられなかった。ほかの内分泌ホルモンについても染色を行ったところ、インスリン陽性細胞のうち約 90% がグルカゴン、ソマトスタチン、膵臓ポリペプチドのうちいくつかを同時に産生していた。このような複数のホルモンを産生するインスリン産生細胞がつくられたことは、最近、ヒトの ES 細胞の分化の過程においても報告されている。

これらのインスリン産生細胞はインスリンを分泌することができるだろうか。分化したインスリン産生細胞のインスリン合成能や分泌能に関して、細胞の含有するインスリンの量および分泌されたインスリンの量を測定するため、インスリン C ペプチドに対する ELISA 法を用いた。また、*Pdx1* は膵臓前駆細胞において発現し、内分泌前駆細胞においてはいったん発現が低下し、膵臓細胞になるとふたたび発現が上昇する。そして、17 日間にわたり培養するとほとんどの *Pdx1* 陽性細胞はインスリン陽性との二重陽性を示したことから、*Pdx1* 陽性細胞をフローサイトメトリーにより分取したところ、テトラペナジンおよびジブチリル cAMP の添加により、全体の約 10% の細胞が *Pdx1* 陽性を示す膵臓細胞として回収された。ELISA 法による測定の結果、テトラペナジンの添加によりインスリン C ペプチドの含量はマウスのランゲルハンス島の 60% に相当していた。しかし、テトラペナジンの添加はグルコースに依存性のインスリン分泌には影響しなかった。一方、ジブチリル cAMP

を添加することによりインスリンの分泌がみられた。これらの結果は、cAMP によりインスリン産生細胞の成熟が進行しグルコースに依存性のインスリン分泌能を獲得したことを示唆した。インスリン分泌能をもつ細胞はマウスのランゲルハンス島の 40% 程度であったが、先行研究と比較して成熟度はかなり高いものと考えられた。一方で、ジブチリル cAMP によりインスリンの分泌が亢進することは一般的に知られており、分泌されたインスリン自体がさらなる分化の促進に寄与することが想像できた。そこで、培養 11 日目から培養 17 日目にかけて培地に含まれるインスリンの濃度を变化させる実験を行った。通常の培養では培地に 10 nM のインスリンが含まれるが、16 nM のインスリンがもっとも分化の効率が高く、それ以上の濃度では濃度に依存的に分化が抑制される傾向にあった。

#### 4) ES 細胞に由来するインスリン産生細胞の移植は糖尿病モデルマウスの血糖値を低下させる

ES 細胞から分化を誘導した膵臓細胞が生体において機能するのかどうか調べるため、糖尿病モデルマウスである AKIAT マウスへと移植した。テトラペナジンおよび cAMP により分化を誘導した細胞を腎臓の被膜の下へ移植したところ、移植ののち 6 週間をかけ血糖値は低下した。また、移植する細胞が多いほど血糖値の降下の速度は速いことがわかった。一方で、これら低分子化合物を用いずに分化させたときにも、インスリン産生細胞を移植することによりゆっくりではあったが血糖値の改善効果がみられた。この結果は、今回の分化培養系では、未熟な膵臓細胞、あるいは、分化の途上で細胞系譜として膵臓細胞へとむかっている細胞が培養 2 週間の時点では多く含まれていることを示唆した。それらの細胞は生体において分化および成熟することにより血糖値を改善したものと想定された (図 3)。

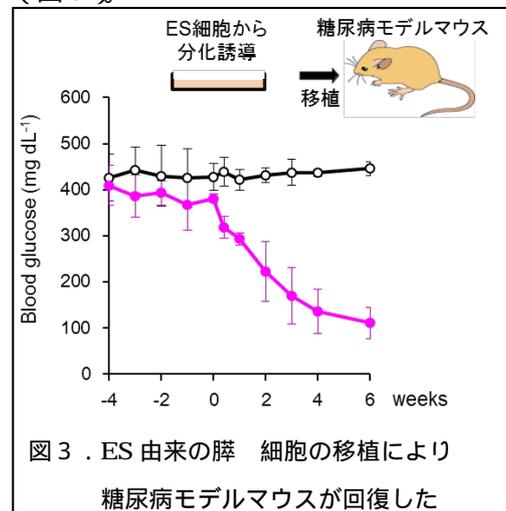


図3 . ES 由来の膵細胞の移植により糖尿病モデルマウスが回復した

## 5. 研究成果の位置づけとインパクト

小胞モノアミン輸送体である VMAT2 に関するこれまでの研究は、おもにニューロンを用いて進められてきた。ニューロン終末における神経伝達物質としてモノアミンが使用されていることは一般的に知られているのに対し、膵臓においてモノアミンのはたす役割にはいまだ不明な点が多く、これにかかわる VMAT2 の機能に関しては同じく知られていなかった。筆者らは、この研究をとおし、VMAT2 がモノアミンを介し膵臓において内分泌細胞の分化を制御していることを新たに。先行研究ではモノアミンのうちドーパミンやヒスタミンがインスリンの産生や分泌を阻害することが知られている。これに対し、モノアミンのうちセロトニンは妊娠期において膵臓細胞の複製やグルコース応答性を制御する機能のあることが報告されている。しかし、発生期におけるモノアミンの役割に関してこれまでよくわかっていなかった。今回の実験では、複数あるモノアミンのなかでもドーパミンの含量がもっとも大きな値を示していたが、すべてのモノアミンが膵臓細胞への分化に対し抑制的にかかわっているという結果も得られたことから、生体においてモノアミンによるシグナル伝達は複雑な分子機構により膵臓の分化を制御していることが考えられ、今後、これらを詳細に解析していく必要がある。

また、ES 細胞に由来する多くのインスリン陽性細胞は複数の内分泌ホルモンを同時に発現していた。しかし、糖尿病モデルマウスへの移植したのちの組織片を解析したところ、インスリンのみに陽性を示す細胞が多く観察された。この移植前と移植後の細胞の変化については不明であるが、移植ののち2週間から急激に血糖値が低下したことから考えると、生体において膵臓細胞の成熟が急速に進んだことが推察された。マウスの発生の初期にはインスリン陽性かつグルカゴン陽性を示す細胞が“first transition”の時期に一時的に現われるが、この細胞は最終的には成熟した膵臓細胞にはならず発生の過程において失われる。これらの細胞は膵臓細胞が発現する成熟化マーカーを発現しない。これに対し、膵臓細胞から膵臓細胞への分化転換が起こるときにもインスリン陽性かつグルカゴン陽性を示す細胞のみられることが報告されているが、この細胞は成熟化マーカーを発現するので、今回、分化の誘導された細胞は分化転換のときにみられる細胞に近いのかもしれない。このように、細胞が直接に分化転換してしまう現象は、最近になり報告されている、ヒトの ES 細胞に由来するインスリン産生細胞の移植の場合にもみられるようである。ヒトの ES 細胞の場合は、今回の研究と同じく複数のホルモンを産生するインスリン産生細胞

ができるのだが、マウスへ移植するとすべてのインスリン産生細胞はインスリン産生能力を失いグルカゴン陽性の膵臓細胞へと変わってしまう。このようなポリホルモンの産生細胞の正体について、種の違いによるものなのか、あるいは、分化方法の違いによるものなのかは不明である。

これまでに述べてきたように、この研究では、膵臓の分化、とくに内分泌前駆細胞への分化の誘導の過程において小胞モノアミン輸送体のひとつ VMAT2 による抑制作用のあることを発見した。また、cAMP が膵臓細胞の成熟を促進し、VMAT2 の阻害と相乗的に分化を促進することもわかった。糖尿病モデルマウスを用いた移植実験が一定の効果を示したことから、これらの知見をもとに、ヒトの iPS 細胞を用いた移植治療にむけ研究の進むことが期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Sakano D, Shiraki N, Kikawa K, Yamazoe T, Kataoka M, Umeda K, Araki K, Mao D, Matsumoto S, Nakagata N, Andersson O, Stainier D, Endo F, Kume K, Uesugi M and Kume S. VMAT2 identified as a regulator of late-stage beta cell differentiation. *Nature Chem. Biol.*, 査読あり, 10(2):141-8. 2014

[学会発表](計 2 件)

1. Sakano D, Shiraki N, Kikawa K, Yamazoe T, Kataoka M, Umeda K, Araki K, Mao D, Matsumoto S, Nakagata N, Andersson O, Stainier D, Endo F, Kume K, Uesugi M and Kume S. VMAT2 identified as a regulator of late-stage  $\beta$ -cell differentiation. ISSCR 11<sup>th</sup> annual meeting, Boston, USA. 2013.6.12-15

2. Sakano D, Shiraki N, Kikawa K, Kataoka M, Nagura T, Choi S, Endo F, Kume K, Uesugi M and Kume S. Small compounds promote differentiation from pancreatic progenitor to endocrine cells MBSJ, Fukuoka, 2012.12.3-6

[図書](計 2 件)

1. 坂野大介・桑昭苑『発生・分化・再生と代謝関連臓器』「多能性幹細胞から膵臓細胞への分化」『内分泌・糖尿病・代謝内科』24(5)、544-549、2013 (科学評論社)

2. 坂野 大介、白木 伸明、桑 昭苑、内分泌・  
糖尿病・代謝内科 特集 発生・分化・再生  
と代謝関連臓器 多能性幹細胞から膵 細  
胞への分化、第 35 巻第 2 号 P101-106  
(2012)

〔その他〕  
ホームページ等  
ES 細胞から成体と同等の能力を持つ膵臓の  
細胞を作製～糖尿病の治療へ新たな光明～  
[http://www.kumamoto-u.ac.jp/daigakujouhou/kouhou/pressrelease/2013\\_file/release131216.pdf#search='%E8%86%B5%CE%B2%E7%B4%B0%E8%83%9E%E3%81%AE%E5%88%86%E5%8C%96%E3%82%92+%E5%B0%8F%E8%83%9E%E4%BD%93'](http://www.kumamoto-u.ac.jp/daigakujouhou/kouhou/pressrelease/2013_file/release131216.pdf#search='%E8%86%B5%CE%B2%E7%B4%B0%E8%83%9E%E3%81%AE%E5%88%86%E5%8C%96%E3%82%92+%E5%B0%8F%E8%83%9E%E4%BD%93')

膵β細胞の分化を小胞型モノアミントランス  
ポーター VMAT2が制御することを発見  
[http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpre  
ss/np67.html](http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np67.html)

ES細胞から成熟膵 細胞を作製～糖尿病の  
治療を目指して～  
[http://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/sei  
mei/20131216](http://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei/20131216)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

坂野 大介 (SAKAN0, Daisuke)  
熊本大学・発生医学研究所・助教  
研究者番号：40571039