

令和元年6月27日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15624

研究課題名(和文) I型糖尿病根治を目指した膵細胞再生への直接変換系の再編成

研究課題名(英文) Direct conversion for pancreatic beta cell regeneration towards type 1 diabetes

研究代表者

松本 征仁 (Matsumoto, Masahito)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・客員准教授

研究者番号：90321819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、幹細胞を介さずダイレクトリプログラミング(直接変換)法によって高効率で体細胞から膵島様細胞の作製方法を確立すること、作製した膵島様細胞を糖尿病モデルマウスに移植し、血糖改善できることである。これまでに本研究において、レトロウイルスベクターを用いてマウス胎児線維芽細胞(MEF)等の体細胞から高効率でダイレクトリプログラミングにより膵島様細胞を作出すること、膵島様細胞をストレプトゾトシン(STZ)投与の1型糖尿病モデルマウスの腎皮膜下に移植したところ、血糖値の改善が有意に観察された。レトロウイルスベクターのみならず他の安全な方法で内性インスリンを発現誘導する方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により下記の学術的ならびに社会的意義が期待できると考えられる。1) 癌化の可能性が低く、安全性が担保される。2) 高血糖(インスリン依存性糖尿病)を改善する。3) 1型糖尿病患者が生涯を通じて15万回以上インスリン注射と血糖管理の負担から解放できる。4) 低血糖による昏睡の心配がなくなる。5) 創薬利用；本細胞を使い糖尿病治療薬候補物質のスクリーニングに利用する。6) 10歳未満の糖尿病患者では97%が1型糖尿病であるため、生涯を通じて10万回以上インスリン注射と血糖管理の負担から解放することができる。

研究成果の概要(英文)：The research purpose is to establish the protocol of making efficiently somatic cells-derived islet-like cells and to improve blood glucose level in type 1 diabetic model transplanted with the cells. We found that somatic cells such as mouse embryonic fibroblasts (MEF) can be efficiently reprogrammed to make islet-like clusters using retrovirus vector system, and transplantation of islet-like cells in the kidney capsule of type 1 diabetic mice administered with streptozotocin (STZ) ameliorated high blood glucose level. Novel protocols not only with retrovirus system but also other safety methods to induce endogenous insulin have established.

研究分野：分子生物学・再生医学

キーワード：分化転換 糖尿病 再生医学 体細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病は、自己免疫疾患によりインスリン産生細胞が破壊され、インスリンが欠乏すると高血糖状態が続き、腎症や失明などの合併症を引き起こす重篤な病気である。1型糖尿病の治療において、インスリン注射や膵島移植が広く行われているが、患者負担が大きいことやドナー不足・移植による拒絶応答など全ての患者に満足のいく治療を提供できないのが現状である。最近、幹細胞から膵細胞を作る新たな再生医療アプローチ法が期待されており、ヒト iPS 細胞やES細胞等の幹細胞から膵細胞への最新誘導プロトコルが報告され(Melton et al, 2014, Kiefer et al, 2014)、グルコース応答性を獲得した膵細胞の誘導効率が約38%に達し、糖尿病の再生医療の実現に向け見通しが立ってきたといえる。近年、カプセル化したブタ膵島を1型糖尿病患者に移植する臨床研究が行われており、糖尿病の再生医療の実用化の期待が高まっている。しかしながら、これらのアプローチ法は、癌化リスクの回避、膵細胞の分化機序が不明、免疫拒絶の回避、長期にわたる分化誘導が煩雑で莫大なコストを要することなどの深刻な課題が残されている。カプセル化技術においては、カプセル内の細胞への酸素・栄養因子の安定供給が必要であることが指摘され、膵島中心領域の細胞死を抑制し長期にわたる機能維持が課題となっている。以上のように、これらの問題を克服しない限り、全ての1型糖尿病患者およびインスリン依存性2型糖尿病患者の根治は困難であると考えられる。

膵細胞へのダイレクトリプログラミング(直接分化転換)について、アデノウイルスを用いて MafA, Pdx1, Neurog3(Ngn3)の3因子を膵外分泌細胞へ導入した結果、膵細胞へ誘導されることが示された(Meltonら, 2008)。当時、この3因子をあらゆる体細胞へ導入することにより、膵細胞を誘導できることが期待された。しかしながら、胎児線維芽細胞などの他の体細胞に3因子を導入しても内在性インスリンの発現は観察されなかった。即ちこのことは、既に報告された3因子による直接分化転換は、発生学的に膵細胞近位の膵外分泌細胞に限定されること、さらに他の体細胞から膵細胞への直接分化転換を誘導する因子が、3因子以外に存在することを示唆していると考えられた。

### 2. 研究の目的

研究代表者が提唱する仮説、膵細胞の分化転換因子が存在する可能性を検証し、新たな分化転換因子の同定に加えて、2重蛍光標識したマウス胎児線維芽細胞(dMEF)を用いて内在性インスリンが発現するとDsRed2を発現するため、dMEFを体細胞モデルと利用して、高い再現性を示すことが重要と考えた。

本課題では、線維芽細胞などの体細胞や iPS 細胞からインスリン産生細胞を含む膵島様細胞の作製方法を確立すること、ならびに再現性と長期培養による安全性の確認を行うことを目的としている。さらに、作製した膵島様細胞を1型糖尿病モデルマウスに移植し血糖改善の評価を行い、膵細胞への分化の分子機序を明らかにし、将来的に上記の課題を克服できるような糖尿病の再生医療の基盤技術の開発に繋がると考えられる。

### 3. 研究の方法

- マウス線維芽細胞・iPS細胞の培養 -

2重蛍光標識したマウス線維芽細胞(dMEF)をDMEM培地/10%仔牛血清(FBS)/ペニシリン・ストレプトマイシン含で培養した。ヒト iPS 細胞(246H1 クローン, 京都大学 CiRA 研究所の山中伸弥らより分与)はマイトマイシン処理 SNL76/7 フィーダー細胞上でDMEM/F12/20%ノックアウト血

清/0.1mM NEAA/0.1mM 2-メルカプトエタノール/50U/ml ペニシリン・50mg/ml ストレプトマイシン/5ng/ml bFGF 含有培地で培養した。

- レトロウイルスの作製 -

DMEM 培地で培養したパーケーシング細胞(Plat-E 細胞, 東京大学医科学研究所北村俊雄らより分与)へ pMX ベクターをトランスフェクションし、4 8~7 2 時間後にウイルス溶液を 0.45um フィルターで精製した。

< 導入 >

胎児線維芽細胞やさまざまな体細胞へレトロウイルスを感染させることにより、遺伝子を細胞に導入した。ポリブレン(最終濃度 8.0ug/ml)を含むウイルス溶液の添加後、3 7、5 % CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養した。一方、リポフェクション法でベクター-DNA をさまざまな細胞へ導入を行った。培養中は、2 日間又は 3 日間毎に培地交換を行った。

< 蛍光顕微鏡による分化誘導の観察 >

2 重蛍光標識マウス胎児線維芽細胞(dMEF)は内在性インスリンの発現により赤色蛍光タンパク質(DsRed2)を発現するため、レトロウイルス感染後 dMEF 由来のインスリン産生細胞の DsRed2 発現を蛍光顕微鏡(Zeiss Axiovert 200M とキーエンス BZ-X700)を用いて観察した。24 ウェルプレートに播種した dMEF 細胞の DsRed2 陽性の内在性インスリン産生細胞の定量はハイエンドイメージングシステム Thermo Fischer Scientific 社の Array Scan XT1(BGRFR\_386, BGFR\_549)を用いて行った。定量を行う 30 分前に Hoechst33342(Molecular Probes 社)で dMEF 細胞の核染色を行った。

< 定量 PCR 解析 >

GAPDH 遺伝子に対するインスリン遺伝子の相対発現量を調べた。

前記細胞を細胞溶解液に懸濁し、SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR、又は SV 96 Total RNA Isolation System、ReverTraAce qPCR RT Master Mix with gDNA Remover にて RNA 調製及び cDNA 合成を行った後、GeneAce SYBR qPCR Mix を用いて定量 PCR を行った。

#### 4 . 研究成果

研究代表者は、独自に樹立した膵内分泌前駆細胞(Tec3p 細胞)を用いて直接分化転換因子を同定した。興味深いことに、レトロウイルスベクターを用いてこの因子を導入した dMEF 細胞は導入後 2 日目に DsRed 陽性インスリン産生細胞へ分化転換することが示された。さらに、レトロウイルスベクターを用いてマウス胎児線維芽細胞(MEF)等の体細胞から高効率でダイレクトリプログラミングにより膵島様細胞を作出し、約 80%の高効率で誘導できること、ならびに高い再現性がある優れた技術であることが観察された。またヒト新生児および胎児線維芽細胞などの体細胞においても内在性のインスリンの発現を誘導することが確認され、マウスおよびヒト体細胞でリプログラミング誘導できることが見出された。膵島様細胞をストレプトゾトシン(STZ)投与の 1 型糖尿病モデルマウスの腎皮膜下に移植したところ、血糖値の改善が有意に観察された。レトロウイルスベクターのみならず他の安全な方法で内在性インスリンを発現誘導する方法を確立した。更に、RNA-Seq 解析と ChIP-Seq 解析による統合解析を行った結果、直接変換を裏付ける 細胞系統に関連した遺伝子発現が観察され、さらに直接変換に関連する複数の標的因子の候補因子群が同定された。

一方、膵細胞の分化の分子機序を解明することを目的として、膵内分泌前駆細胞から膵細胞への分化の分子機序について2重蛍光標識遺伝子改変マウスを用いて調べた結果、Nicotinamideが膵細胞の分化を促進することを見出した。興味深いことは、NicotinamideはSirt1を標的としてSirt1による内分泌前駆細胞から膵細胞への分化抑制を解除することによって、膵細胞の分化を促進することが明らかとなった。さらに、ヒト膵島を用いた解析の結果、CD133/6インテグリン陽性細胞集団の中に膵細胞へ効率良く分化する前駆細胞が存在することが示された。従って、Nicotinamideの利用、ならびに新たな膵内分泌前駆細胞の細胞表面マーカーの利用によりSirt1を介した膵細胞分化の分化機序が明らかとなり、これらの知見は新たな創薬標的因子の同定の可能性ならびに将来の糖尿病の再生医療の実用化に繋がることが期待される。

マウス細胞のみならずヒト細胞分化の分子機序の解明を目的として、ヒトiPS細胞を用いて、繊維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)1の阻害剤が膵細胞分化を分化段階特異的に促進することを証明した。この知見は、FGFR1シグナルはPDX1誘導因子として膵臓発生初期段階に必須であるという従来の定説を覆すものであり、本研究により膵細胞の分化過程の後半の膵内分泌前駆細胞から膵細胞分化においてはFGFR1を阻害することで、効率良く分化誘導を促進することが判明した。本成果は、FGFR1シグナルを介する分化誘導は分化の段階に応じて適切にスイッチングのOnとOffの選択的なしくみの重要性を示した。

概して、本研究で見出された直接変換技術ならびに新たな分化機序を調節する技術の開発によって、糖尿病の再生医療の実用化に向けて、再生医療製品等の製造と臨床応用、さらには腫瘍リスクを回避して安全性を担保する上で重要な情報を提供すると考えられる。1型糖尿病の根治を目指し、体細胞の種類と直接変換技術の最適化を図り、非臨床POCの取得および免疫拒絶の回避技術との融合を経て、将来全ての1型糖尿病患者を根治できる再生医療技術の開発に繋がることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Nakajima C, Kamimoto K, Miyajima K, Matsumoto M, Okazaki Y, Kobayashi-Hattori K, Shimizu M, Yamane T, Oishi Y, Iwatsuki K. A new method for identifying mouse pancreatic ducts. *Tissue Eng.* 2018, 24(8), 480-485.

doi: 10.1089/ten.tec.2018.0127

Tanaka T, Kojima D, Mera T, Matsumoto M, Yasunami Y, Yanase T. Expansion of transplanted islets in mice by co-transplantation with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Helixyon* 2018, 4(5), e00632

doi: [10.1016/j.helixyon.2018.e00632](https://doi.org/10.1016/j.helixyon.2018.e00632)

Jiang F-X, Li K, Archer M, Mehta M, Jamieson E, Charles A, Dickinson JE, Matsumoto M, Morahan G. Differentiation of Islet Progenitors Regulated by Nicotinamide into Transcriptome-verified  $\beta$  Cells that Ameliorate Diabetes. *Stem Cells*, 2017, 35:1341-1354. 2017

doi: 10.1002/stem.2567

Sato M, Kokabu S, Enoki Y, Hayashi N, Matsumoto M, Nakahira M, Sugawara M, Yoda T. Functional roles of netrin-1 in osteoblast differentiation. *In vivo*, 2017, 31(3):321-328.

PMID: 28882944

Yamashita-Sugahara Y, Matsumoto M, Ohtaka M, Nishimura K, Nakanishi M, Mitani K, Okazaki Y. An inhibitor of Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (FGFR1) promotes

late-stage terminal differentiation from NGN3+ pancreatic endocrine progenitors.  
Scientific Rep. 2016, 6, 335908  
doi: 10.1038/srep35908

〔学会発表〕（計 14 件）

Matsumoto M, Sugahara-Yamashita Y, Okazaki Y: Novel approaches for making beta cells towards beta cell replenishment therapy. Kyoto Diabetes Mini-symposium-Beta cell replacement strategies, Kyoto, June 2017

Yamashita-Sugahara Y, Matsumoto M, Ohtaka M, Nishimura K, Nkanishi M, Mitani K, Okazaki Y. An inhibitor of fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) promotes late-stage terminal differentiation from NGN3+ pancreatic endocrine progenitors. Diabetes 2017 ELSEVIER winter symposium, Miami, USA, Jan. 2017.

菅原泉, 松本征仁, 大高真奈美, 西村健, 中西真人, 三谷幸之助, 岡崎康司: FGFR1 阻害剤は膵内分泌前駆細胞 (NGN3+) から内分泌細胞への分化を促進する. 第 16 回再生医療学会総会 仙台国際センター, 仙台, 3月 2017 年 3/7-9

Matsumoto M, Yatsuka Y, Suzuki S, Sugahara-Yamashita Y, Nikaido I, Ssagawa Y, Momma N, Igata J, Ikeo K, Bando M, Shirahige K, Vale WW, Okazaki Y. Direct conversion of somatic cells into pancreatic islet-like cells towards regenerative medicine of diabetes. 14<sup>th</sup> RCGM International Academic Frontier, Saitama, Nov. 2016

Yamashita-Sugahara Y, Matsumura R, Sato T, Matsutani T, Nakachi Y, Aizawa E, Iwanaga Y, Matsumoto M, Mitani K, Okazaki Y: Screening of chemical promoting cell differentiation using double fluorescence-labeled human iPS cells (hIveNry). 14<sup>th</sup> RCGM International Academic Frontier, Saitama, Nov. 2016

〔図書〕（計 2 件）

松本征仁: ペプチドを利用した糖尿病・骨代謝疾患の機能再建と再生, 医療・診断をささえるペプチド科学-再生医療・DDS・診断への応用 第 V 編再生治療第 5 章 (p203-219 を執筆担当), 平野義明監修, (株)シーエムシー出版, 東京, (2017 年 10 月 30 日発刊)

稲垣 暢也, 長船 健二, 松本 征仁, 山口 智之 糖尿病における再生医療の最新知見 Islet Equality 6(2) 5-14 2017 年 8 月

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 膵内分泌細胞及びその製造方法、並びに分化転換剤

発明者: 松本征仁 岡崎康司 菅原泉

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/082095

出願年: 平成 28 年

国内外の別: 国外

取得状況 (計 1 件)

名称: Methods for increasing insulin secretion by co-stimulation of corticotropin - releasing factor receptors

発明者: Masahito Matsumoto, Mark Huising, Wylie Vale

権利者: 同上

種類: 特許

番号: US9,314,506B2

取得年: 2016 年

国内外の別: 国外 (米国)

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岡崎 康司

ローマ字氏名：Okazaki, Yasushi

研究協力者氏名：安波 洋一

ローマ字氏名：Yasunami, Yoichi

研究協力者氏名：菅原 泉

ローマ字氏名：Sugahara, Yzumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。