

平成24年5月14日現在

機関番号：17401  
研究種目：若手研究（B）  
研究期間：2010～2011  
課題番号：22790653  
研究課題名（和文）低分子化合物を用いたマウスES細胞からの効率的な膵β細胞誘導法の確立  
研究課題名（英文） The establishment of a screening system for low molecular compounds for β cell inducing activity.  
研究代表者  
坂野 大介（SAKANO DAISUKE）  
熊本大学・発生医学研究所・COE リサーチ・アソシエイト  
研究者番号：40571039

研究成果の概要（和文）：マウスES細胞から膵β細胞を誘導する手法の効率化は将来的にヒトの糖尿病治療に有効な知見を得るために重要な研究である。我々は、1300種の低分子化合物からβ細胞の誘導効率を上昇させる化合物をスクリーニングした。その結果、10個のヒット化合物を発見し、これらの作用から特定の生体内の経路がβ細胞への細胞分化とインスリンの分泌能に深くかかわることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Establishment of an efficient method to induce pancreatic β-cells from ES cells is an important research in order to obtain the knowledge for the treatment of human diabetes in the future. We screened more than 1,300 small chemical compounds to increase the efficiency of β-cell induction. We found 10 hit compounds. Based on the information of screening results, we found that a certain cell signaling pathway regulates the differentiation of β-cell and its insulin secreting ability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：ES細胞・膵臓・β細胞・インスリン・糖尿病・低分子化合物・スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 研究の学術的背景

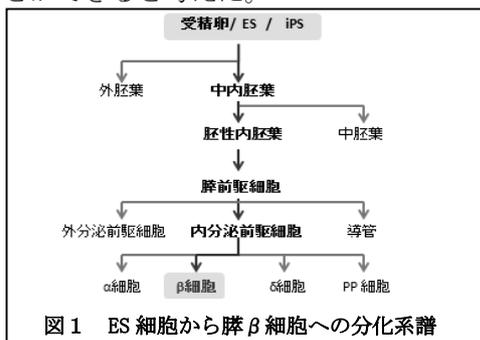
受精卵から細胞が中内胚葉に分化し、胚性内胚葉、膵前駆細胞、内分泌前駆細胞を経てβ細胞へ分化する。ES細胞からβ細胞を誘導する研究も盛んに行われており、ヒトES細胞

でも成長増殖因子の段階的な添加によって図1に示した分化系譜をたどりβ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β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β細胞が分化機構の解明と効率的な細胞移植が必須条件である。

## (2)我々のこれまでの研究

- ①マウス ES 細胞を M15 フィーダー細胞上で培養し、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)。
- ② M15 細胞との共培養の効果が M15 が供給する細胞外マトリクスであることがわかった。
- ③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)。この手法によってインスリン分泌能はなかったが 0.01%程度の細胞をインスリン産生細胞に分化せることに成功した。このような結果から、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。
- ④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(β細胞)に分化させることに成功している。上記の方法では細胞外マトリクスは分化細胞自身が効率的に生産することで分化に適した細胞外環境が形成されていると考えている。この場合最終的な分化効率は 0.1-0.5%であった。
- ⑤しかし、単なる In vitro での分化効率上昇は移植治療への応用に直結するわけではない。以前の研究では in vitro でのグルコース濃度依存的なインスリン分泌能の獲得(β細胞成熟化)には至らず、膵前駆細胞(図 1)にまで分化させた細胞をフローサイトメトリーにより純化したものをマウスの腎皮膜下に移植することで糖尿病治療効果があることを示している。分化過程の細胞を移植したためにテラトマを形成することがわかっている。しかも、移植した膵前駆細胞がどのような機構によって成熟したβ細胞になったのかは不明なままであることから、In vitro での成熟化β細胞の誘導を可能にすることで単に分化の効率化を求めめるだけでなく、発生学的なβ細胞分化機構の理解にもつながる。そして将来的により効率的かつ安全に臨床応用に向かうことができると考えた。



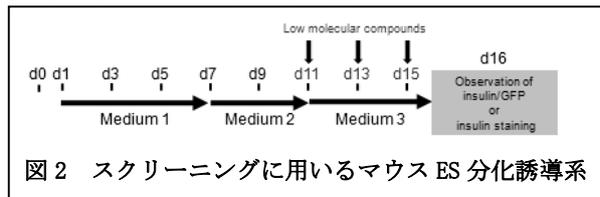
## 2. 研究の目的

1 型糖尿病は血糖値を下げるために必要なホルモンであるインスリンを産生する膵β細胞が破壊されることが原因である。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β細胞への分化機構の解明と移植後のβ細胞の機能維持・改良が可能となれば、多能性幹細胞を用いた再生医療の実現化に貢献できる。本研究では ES 細胞からの膵β細胞誘導研究において低分子化合物を用い生体の膵臓発生メカニズムの解明と臨床応用の可能性を探る。

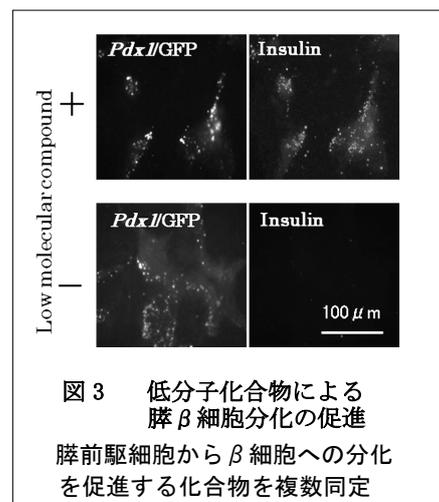
## 3. 研究の方法

### (1) 低分子化合物を用いたマウス ES 細胞からのβ細胞誘導の効率化

本研究においては膵前駆細胞およびβ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(図 2、3)。



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、図 2 に示したように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(図 1)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 Medium3 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る。この場合、両方の抗体により染色された細胞が膵β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β細胞の割合を算出する。

## (2) 低分子化合物の組み合わせ、アゴニスト等の使用による分化効率の更なる上昇

1-1 で示したようにインスリン産生細胞の誘導効率を上昇させる低分子化合物を得た後、その作用の特異性を立証するために同様の作用機序を持つ物質（アゴニスト）を用いてインスリン産生細胞誘導率を調べる。この場合、各低分子化合物の至適濃度についても検討する。

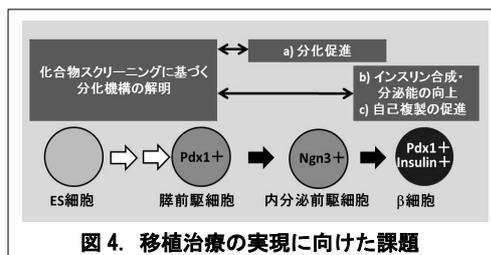
### (3) 膵β細胞の成熟化

インスリン産生細胞の誘導効率を上昇させる以外にβ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。β細胞の成熟度はインスリンの分泌能力を指標に判断する。その際、培地中に放出される C ペプチド量を定 ELISA 法を用いて定量する。

以上のようにβ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β細胞を得る。

### (4) インスリン産生細胞の増殖 機能維持・向上のための低分子化合物の探索

膵β細胞の分化研究においてグルコース濃度依存的なインスリン分泌は非常に重要な性質である。しかし、過去に報告されている分化手法で誘導されたインスリン産生細胞はインスリン分泌能やインスリン合成能力が生体の膵β細胞に比べると低く、より効率的に移植治療に応用するには更なる分化誘導の効率化と誘導されるβ細胞の性質向上が望ましい。そこで誘導されたインスリン陽性細胞のインスリン合成能を活性化させる化合物を新たに探索する（図4中b）。同時にβ細胞の自己複製を促進する低分子化合物のスクリーニングを試み、移植治療に必要な細胞数を減らす（図4中c）。これらの新たな研究が将来的な移植治療の効率化に貢献すると考えている。



### 3) 臨床応用を目指した糖尿病モデルマウスへの移植治療の条件探索

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う。移植前の細胞の分化条件と移植後のマウスへの低分子化合物の投与などより少ない細胞で効率的に治療に応用する方法を模索する。

## 4. 研究成果

### (1) β細胞の誘導・成熟化を促進する低分子化合物スクリーニング

マウスES細胞を用いたインスリン産生細胞への分化実験を行い、インスリン産生細胞数の増加を促す低分子化合物のスクリーニングを行った。ハイスループットかつ化合物の効果をより明確にするためフィーダー細胞を用いず合成基材を敷いた96穴細胞養プレートを使用し、無血清条件で培養した。化合物添加の効果の評価は抗GFPおよび抗Insulin抗体による免疫二重染色によって行った。その結果、1300個の既知の低分子化合物をスクリーニングし、10のヒット化合物を同定している。これらの10の全てが濃度依存的に効果を示しマウスES細胞分化における最適濃度を明らかにした。また、これらの化合物の作用機序は既に報告があり、標的分子が明らかになっている。そこで標的分子に同様に作用するような類似作用を持つ化合物の効果についても検討したところ、さらに29個のヒット化合物を得た。これらの化合物のなかから異なる作用をもつ化合物を組み合わせる実験を行った。その結果、相乗効果をもたらす場合や効果が変わらない場合があった。すなわち、複数の化合物が異なる生体内の経路や同一の経路の上流・下流に影響することでインスリン産生細胞への分化が促進していることが推察された。これらの化合物の組み合わせ添加によってインスリン産生細胞を増加させるだけでなく成熟化、すなわちグルコース濃度に応答したインスリン分泌能を有する細胞を分化させることができた。

## (2) $\beta$ 細胞分化にかかわる分子メカニズムの解明

化合物スクリーニングによって複数のヒット化合物を得たことをすでに述べたが、これらのうち最も効果のある化合物群の作用機序はGeneAによってコードされる転移酵素の阻害であった。この遺伝子の発現をレンチウイルスベクターを用いたshRNAによって抑制すると、 $\beta$  細胞への分化が促進された (図5)。現在はこの遺伝子により制御される経路のより下流の機構を明らかにするとともに膵臓特異的にGeneAを欠損させることができるコンディショナルノックアウトマウスの作製を進めている。

## (3) $\beta$ 細胞の自己増殖を促進する低分子化合物スクリーニング

マウス成体から取り出した膵島を酵素処理により単一細胞にし、培養する系を確立した。単一細胞にした細胞で自己増殖が起こるかどうかを調べるため接着培養を行った。細胞を Edu (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) によってラベリングすると、時間経過に伴ってインスリン陽性細胞に占める Edu 陽性細胞の割合が上昇した。このことから、単一になった細胞は持続的に自己増殖している事が示唆された。この培養系に低分子化合物ライブラリーを添加することにより、現在スクリーニングを進めている。

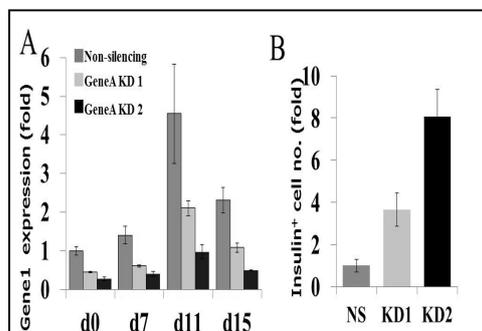


図5 GeneA ノックダウンによる  $\beta$  細胞誘導効率の上昇 A) マウス ES 細胞から  $\beta$  細胞分化に要するおよそ2週間の培養期間中 GeneA の発現量を異なる効率で抑制する2つの ES 細胞株を得た。B)  $\beta$  細胞への分化は遺伝子発現抑制効果に比例し促進された。

## (4) 臨床応用を目指した糖尿病モデルマウスへの移植治療の条件探索

誘導した ES 細胞由来の  $\beta$  細胞が生体内で正常に機能するかどうか評価するために糖尿病モデルマウスの腎皮膜下への移植実験を進めている。未だ実施例が少ないが、移植直後から血糖値の正常化がみられ

る実験結果を得ている (図6)。今後は移植前の細胞の分化条件と移植後のマウスへの低分子化合物の投与などより少ない細胞で効率的に治療に応用する方法を模索する。

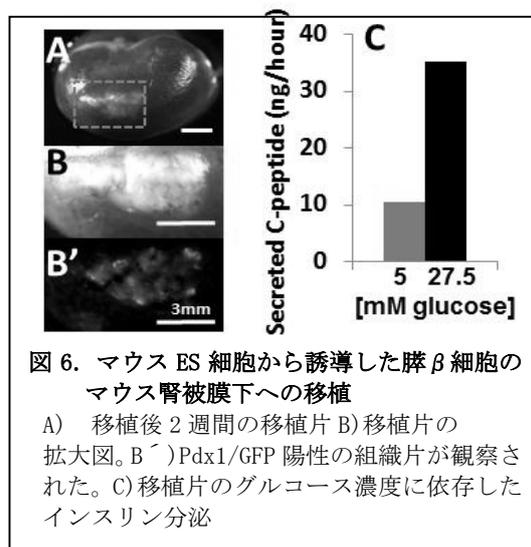


図6. マウス ES 細胞から誘導した膵  $\beta$  細胞のマウス腎被膜下への移植

A) 移植後2週間の移植片 B) 移植片の拡大図。B') Pdx1/GFP 陽性の組織片が観察された。C) 移植片のグルコース濃度に依存したインスリン分泌

## (5) 研究成果の位置づけとインパクト

① 分化誘導過程での低分子化合物のスクリーニングの成否には低分子化合物を添加する以前の細胞分化効率の安定性がとても重要である。申請者が確立したマウス ES 細胞の培養法は、分化誘導が非常に安定し、かつ効率が高いことから大規模スクリーニング実験に最適である。

② これまでに報告のある低分子化合物による膵臓分化研究では膵前駆細胞までの分化について効果を示す化合物に焦点が当てられている (Borowiak et al., 2009; Chen et al., 2009)。本研究はさらに分化過程が進んだ膵前駆細胞から  $\beta$  細胞への分化に関する知見を加えこの分野の研究に大きく貢献できると考えている。

## 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)

[学会発表] (計3件)

国際学会 (ポスター)

1. Sakano D., Shiraki N., Kataoka M., Kume K. and Kume S. Low molecular compounds screening system for  $\beta$  cell inducing activity. the workshop "Liver and Pancreas: From Development to Disease"

November 14-16 2011 (Baeza, Spain).

2. Sakano D., Shiraki N., Kataoka M., Kume K. and Kume S. The establishment of a screening system for low molecular compounds for  $\beta$  cell inducing activity. International Society for Stem Cell Research 9<sup>th</sup> Annual Meeting, June 15-18, 2011 (Tronto, Canada).

国内学会(ポスター)

3. Sakano, D., Shiraki, N., Kataoka, M., Kume, K and Kume, S. The establishment of a screening system for low molecular compounds for  $\beta$  cell inducing activity, , BMB2010 (The 33rd Annual Meeting of Molecular Biology Society of Japan, The 83rd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society) December 7-10 2010(神戸国際会議場)

#### 〔図書〕(計1件)

1. 坂野 大介、白木 伸明、糸 昭苑 「iPS 細胞による糖尿病医療研究のこれから」  
-The view of stem cell therapy for type I diabetes- 糖尿病 54, 268-270, 2011.  
今川企画)

#### 〔産業財産権〕

##### ○出願状況 (計1件)

名称：幹細胞からインスリン産生細胞への分化誘導を促進する低分子化合物および該化合物を用いた幹細胞からインスリン産生細胞への分化誘導方法

発明者：糸昭苑、坂野大介、白木伸明、梅田香穂子、山添 太士、糸 和彦、上杉 志成、  
権利者：国立大学法人 熊本大学、国立大学法人 京都大学

種類：特願

番号：2011-103281

出願年月日：2010年5月2日

国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

坂野 大介 (SAKANO DAISUKE)

熊本大学・発生医学研究所・COE リサーチ・アソシエイト

研究者番号：40571039