

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19507

研究課題名（和文）iPS細胞を用いたインスリン遺伝子異常症モデルの作成

研究課題名（英文）In vitro recapitulation of insulin mutation diabetes using human iPSCs

研究代表者

川口 義弥（Kawaguchi, Yoshiya）

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：60359792

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒトiPS細胞を用いて、インスリン遺伝子のイントロン2にヘテロ接合型 c.188-31G>A変異を持つインスリン遺伝子異常症の病態モデルを作成し、薬剤スクリーニング系の樹立を目指した。ヒトiPS細胞株ChiPSC12株にc.188-31G>A変異を導入し、分化誘導を行ったところ、インスリン蛋白発現当初から分化過程を通じたインスリン細胞数の減少が観察され、早期からの小胞体ストレス反応発動とストレスマーカー陽性細胞の経時的蓄積を見出した。ところが、アポトーシスは意外にも分化過程終盤に散見される程度であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性疾患で、その病態発動が胎生期に遡ると考えられる疾患においては、iPS細胞を用いた病態モデルが、疾患進行の全過程を模倣し得る唯一の方法である。本研究ではインスリン遺伝子異常症を例として、細胞分化誘導プロトコルを用いた疾患モデルを作成し、分化過程における疾患の進行を観察できたことには一定の学術的意義が存在する。その一方で、疾患の病態は必ずしも一種類の細胞の異常だけで説明できるものではないことから、本研究方法の限界には留意する必要がある。

研究成果の概要（英文）：To recapitulate the pathogenesis of diabetes with insulin genes mutation, we applied the human iPSC-based beta cell induction protocol. First, we made iPSC line that carries c.188-31G>A mutation on insulin gene. Along with the multi-step differentiation protocol to beta cells, we observed three characteristic phenotype as below: (1) less number of beta cells observed as early as the onset of insulin expression, (2) ER stress and accumulation of stressed cells as induction protocol proceeds. (3) apoptotic cells were detected only at the final stage of induction protocol.

研究分野：発生学

キーワード：インスリン遺伝子異常症 iPS細胞 病態モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インスリン遺伝子異常症は、インスリン遺伝子のさまざまな変異を原因とする疾患群であり、臨床上の発症年齢や重篤度に差異があるが、いずれの病型も有用な疾患モデルがない。インスリン遺伝子上の変異部位や変異形式からそれぞれの病型が一部特有の病態を持つとも考えられるが、多くのインスリン遺伝子異常症が常染色体優性遺伝の遺伝形式を取ることから、変異によって生じる異常インスリタンパク質による細胞障害や細胞死が共通病態と想定される。

したがって、病態の発動はインスリン生成が初発する胎生期にまで遡ると考えられ、病態進行の全過程を再現するにはヒト iPS 細胞を用いた分化誘導系が最適である。これまで、ヒト iPS 細胞を用いた細胞分化誘導実験は、糖尿病治療に貢献し得る機能的細胞を作成することを目指したプロトコールの改善を目指した研究が多かった。ところが、既報の分化誘導プロトコールで作成された細胞は、残念ながら生体細胞に匹敵する機能を獲得しておらず、臨床応用に向けた障壁となっている。その一方で、機能的に未成熟な細胞しか作成できない分化誘導プロトコールであっても、病態発動が胎生期に遡ると考えられるインスリン遺伝子異常症の病態解析、特に細胞障害や細胞生死に関わるメカニズムの解明は可能であると思われる。

2. 研究の目的

本研究では本邦でも報告されているインスリン遺伝子イントロン 2 に c.188-31G>A 変異をもつインスリン遺伝子異常症を例にとり、その病態解明をめざす。この変異では、新たなスプライシング部位が形成される事でフレームシフトが起こり、それ以降のすべてのアミノ酸配列が改変される。その結果、C-ペプチドが形成されない異常インスリンが形成されると考えられる。そこで、本研究では同じ遺伝子変異を導入したヒト iPS 細胞を作成して分化誘導を行い、胎生期から始まる病態モデルの作成と病態解明、更には本モデルを用いた薬剤スクリーニング系の樹立を目指す。

3. 研究の方法

iPS 細胞株を用いた遺伝性疾患の病態再現には、患者自身の細胞から新たに iPS 細胞株を樹立し、変異箇所を是正した細胞株をコントロールとして、目的細胞に分化誘導して比較する手法がしばしば用いられる。この方法は、問題とされる遺伝子変異を含めた全ての患者遺伝背景を反映するメリットがあるが、目的細胞への分化誘導効率が低い細胞種の場合は、せっかく作成した患者由来 iPS 細胞株では病態再現が不明瞭になる(異常を検出しづらい)リスクがある。

実際、これまでに報告された様々なヒト iPS 細胞を用いた細胞分化誘導プロトコールでは満足できる誘導効率が得られていない。さらに、用いる細胞株によっても分化誘導効率が極端に異なることが知られており、我々の経験でも同様の結果を得ている。そこで、既存のヒト iPS 細胞株の中で細胞誘導効率の高いことが知られる ChiPSC12 株に CRISPER/Cas を用いて c.188-31G>A 変異を導入し、ヒト疾患と同じ変異を持つヘテロ変異株に加え、病態を極端に反映すると期待されるホモ変異株および正常株の三者を用いて分化誘導を行い、多段階分化過程におけるフェノタイプの違いに着目した。

さらに、個々の分化誘導プロトコールによるアーチファクトの影響を避けるため、既報と、我々独自のプロトコールの2種類の分化誘導方法で細胞を作成し、両者に共通したフェノタイプに注目した。

4. 研究成果

その結果、2種類の分化誘導プロトコールに共通して見られたフェノタイプとして、多段階分化ステップにおけるインスリン蛋白の発現段階当初から、それ以降の過程を通じたインスリン細胞数の減少が観察され、予想通り、インスリン蛋白早期からの小胞体ストレス反応発動とストレスマーカー陽性細胞の経時的蓄積を見出した。意外にも分化過程初期~中期の細胞死は促進しておらず、分化過程終盤にアポトーシス細胞が散見される程度であり、むしろ分化過程を通じた細胞増殖能の低下とインスリン転写抑制がインスリン細胞数減少の主因であることが分かった。また、上記すべてのフェノタイプは、ヘテロ変異株よりもホモ変異株のほうが強かった。

(研究成果の学術的意義や社会的意義)

ヒト iPS 細胞を用いた分化誘導系を用いて、インスリン遺伝子異常症(c.188-31G>A 変異)の病態再現モデルの作成に成功した。研究計画立案時の予想通り、インスリン蛋白発現時に一致した小胞体ストレスが主病態と考えられる。小胞体ストレスが細胞増殖能の低下を来すのか? に関して現在解析を続けている。また、明らかになった病態に着目し、治療薬候補となる化合物のスクリーニングを行っている。今後、得られた化合物について、多段階分化誘導プロトコールを用いた投与期間、投与量などの最適化を行うことで、実際のヒト臨床への応用が視野に入る。さらに、他のインスリン遺伝子変異パターンでも同様の解析方法をとることで、発症年齢および重症度が異なるインスリン遺伝子異常症候群における、細胞の機能低下から細胞死に至る病態メカニズム(病態進行スピード)の相違を解明し、それぞれの変異型での最適治療(治療薬および治療タイミング)の設定が可能になると見込まれる。

その一方で、胎生期からの投与が必要と判明した場合には、出生前診断が必須となる事から、実際の臨床応用に際しては倫理的側面からの検討も重要になってくる点は指摘しておくべきである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------