

令和 6 年 5 月 19 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19543

研究課題名（和文）ヘテロ性付与によるヒトiPS由来膵臓 細胞の機能向上

研究課題名（英文）Improvement of functionality by heterogeneity formation of the iPS-derived pancreatic beta cells

研究代表者

糸 昭苑（Kume, Shoen）

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：70347011

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ヘテロ性付与に関与する候補遺伝子としてTH（ドパミン合成酵素）をマウス膵臓 細胞において強制発現を行い、正常膵島細胞にある割合で混ぜることにより、膵島の糖応答性インスリン分泌能について評価を行った。その結果、THを強制発現した膵島細胞を一定の割合で含む膵島のほうは、分泌能がやや低下したものの、より長期にわたり糖応答性インスリン分泌能が維持されたことを見出した。この結果より、膵臓 細胞へのヘテロ性付与により、膵臓 細胞の機能温存を図ることができると推測された。今後さらに検証を進めたいと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓内分泌 細胞は血糖の恒常性維持において重要な役割を果たしている。糖尿病における膵臓 細胞の機能低下の一つの成因として、脱分化が考えられるようになってきた。脱分化による臓器の機能低下は膵臓 細胞のみならず、他の臓器にも共通して見られた現象であり、その意義と分子機序の解明が急がれる。一方、膵臓 細胞における不均一性（ヘテロ性）が報告され、その意義が不明である。本研究では、分化・脱分化、ヘテロ性に関する遺伝子群の作用機序の解明をめざし、将来それを応用したiPS細胞由来膵臓 細胞のヘテロ性付与による機能向上を目指している。

研究成果の概要（英文）：We identified TH (dopamine synthase) as a candidate gene involved in heterogeneity in mouse pancreatic cells. To examine the underlying molecular mechanism of the heterogeneity of beta cells, we performed forced expression of TH in mouse pancreatic cells. We mixed it with normal pancreatic islet cells at a certain ratio. We then evaluated pancreatic islets' glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) ability with or without overexpressing TH. As a result, we found that overexpression of TH in the beta cells lowered the GSIS ability. However, pancreatic islets containing a certain proportion of islet cells expressing TH maintained their GSIS ability for longer. From this result, we therefore concluded that heterogeneity confers pancreatic cells to preserve their function.

研究分野：代謝内分泌

キーワード：インスリン 内分泌 膵臓 機能維持

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵臓内分泌細胞は血糖の恒常性維持において重要な役割を果たしている。糖尿病における膵臓細胞の機能低下の一つの成因として、脱分化が考えられている。脱分化による臓器の機能低下は膵臓細胞のみならず、他の臓器にも共通して見られた現象であり、その意義と分子機序の解明が急がれる。一方、組織の上皮細胞は一様に同じ細胞からなるわけではなく、異なる細胞集団の存在により組織恒常性が維持されるという考えが提唱されるようになってきた。いわゆるヘテロ性による組織恒常性の維持の分子機序については分かっていないところが多い。

2. 研究の目的

本研究では、膵臓細胞において、分化・脱分化、ヘテロ性に関与する遺伝子群を同定し、その作用機序の解明を目指す。そのため、膵臓細胞において、ヘテロ性に関与する遺伝子の検索を行う。また、ドパミン産生能におけるヘテロ性が存在することに着目し、研究を進めることとした。膵島のヘテロ性を操作することによる、膵島の機能への寄与について調べ、その分子機序を明らかにすることを目指した。将来的には、それをヒト iPS 由来膵臓細胞に応用し、ヘテロ性の付与による機能向上を目指す。

3. 研究の方法

次の2つの項目について研究を進める。

膵臓細胞のヘテロ性に関わる因子の探索と検証

申請者らが保有するヒト iPS 細胞由来膵臓細胞における遺伝子発現データと、ヒト膵島の Single cell RNA sequencing によるデータベース上の遺伝子情報との比較により、インスリン分泌を正に制御する因子、負に制御する因子を検索する。また、アデノウイルスベクターを用いてマウス膵島への遺伝子強制発現を行い、遺伝子強制発現した膵臓細胞と野生型膵臓細胞との割合を変化させて、ヘテロ性への介入実験を行う。その結果、インスリン分泌能、機能維持に与えるインパクトを検証する。ヘテロ性遺伝子の意義を明らかにすることを目指す。

ヒト iPS 由来細胞へのヘテロ性因子の機能検証

ヒト iPS 細胞において、遺伝子を強制発現する系を立ち上げているので(Safe harbor 部位への挿入により発現する系)、ヘテロ性を担う遺伝子の強制発現による機能へ与えるインパクトを調べる。強制発現は、DOX 添加により誘導可能な系を用いて、発現誘

導のタイミングなどについても検討する。ヘテロ性を作り上げるために、強制発現したヒト iPS 細胞を一定の割合で野生型 hiPS 細胞と混ぜることにより、ヘテロ性の与えるインパクトについて検討する。

4 . 研究成果

ヘテロ性付与に關与するドパミンシグナルの働きを調べるために、ドパミン合成酵素である TH(Tyrosine hydroxylase)についての 細胞のヘテロ性の意義を調べた。マウス膵臓 細胞で強制発現させ、正常膵島細胞にある割合で混ぜることにより、ヘテロな状態の膵島を作製し、その機能について評価を行った。TH を強制発現した膵島細胞を一定の割合含むことにより、膵島の機能の維持に良い影響を与える結果を得た。

一方、ヒト膵島についてRNA sequencingの公共データベースより、インスリン分泌を正に制御、負に制御する因子について健常者および糖尿病患者における遺伝子発現に差がみられる候補遺伝子を抽出した。抽出した遺伝子について、ヒトiPS細胞由来分化細胞での発現解析から、今後、遺伝子強制発現の実験を進めていくための優先順位付けを行った。

まず、ヘテロ性付与に關与するドパミン合成酵素THについて、ヒトiPS細胞における強制発現を試みた。DOX添加による誘導可能なベクターに組み込み、ヒトiPS細胞において、DOX添加による誘導可能なヒトiPS細胞株を取得した。このヒトiPS細胞株を用いて、未分化細胞の状態では、Doxによる遺伝子発現誘導可能であることを確認した。また、このヒトiPS細胞株を用いた膵臓 細胞への分化誘導をさせたところ、膵臓への分化誘導が可能な細胞株があることが確認された。このヒトiPS細胞株を用いて、分化誘導させ、分化途中段階においてDox添加による遺伝子発現誘導したところ、初期ではほぼすべての内胚葉細胞で発現が見られたが、後期分化細胞においては目的の遺伝子の発現がモザイク状になることが確認された。今後このヒトiPS細胞株を用いて引き続き検討を進めることとした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 1. 著者名 Ali M, Kato Y, Shiraki N, Kume S | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Generation of induced pluripotent stem cell-derived beta-cells in blood amino acids-like medium. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Biology Open | 6. 最初と最後の頁 59581 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.059581 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Sim Z.E, Enomoto T, Shiraki N, Kume S | 4. 巻 102183 |
| 2. 論文標題 Protocol to generate human PSC-derived pancreatic beta-cells through methionine and zinc deprivation | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 STAR Protocols | 6. 最初と最後の頁 102183 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2023.102183 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ozawa H., Kambe A, Hibi K, Murakami S, Oikawa A, Handa T, Fujiki K, Nakato R, Shirahige K, Kimura H, Shiraki N, Kume S. | 4. 巻 41 |
| 2. 論文標題 Transient methionine deprivation triggers histone modification and potentiated differentiation of induced pluripotent stem cells | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cells | 6. 最初と最後の頁 271-286 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/stmcls/sxac082 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Sim Z.E, Enomoto T, Shiraki N, Furuta N, Kashio S, Kambe T, Tsuyama T, Arakawa A, Ozawa H, Yokoyama M, Miura M, Kume S | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Methionine metabolism regulates pluripotent stem cell pluripotency and differentiation through zinc mobilization | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 111120 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.111120 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Uefune F, Aonishi T, Kitaguchi T, Takahashi H, Seino S, Sakano D, Kume S | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 Dopamine negatively regulates insulin secretion through D1-D2 receptor heteromer. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Diabetes | 6. 最初と最後の頁 1946-1961 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db21-0644 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

| |
|------------------------------------------|
| 1. 発表者名 桑昭苑 |
| 2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来膵島の作成とインスリン分泌の制御機構解明 |
| 3. 学会等名 第95回日本内分泌学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Kato Y, Shiraki N, Kume S. |
| 2. 発表標題 Generation of functional pancreatic beta cells derived from human induced pluripotent Stem Cell-with physiological cell culture medium |
| 3. 学会等名 ISSCR (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Shoen Kume |
| 2. 発表標題 Metabolic control of pluripotent stem cells in the generation of pancreatic endocrine beta cells |
| 3. 学会等名 第3回JSRM-A*STARジョイントシンポジウム (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|------------------------------------------|
| 1. 発表者名 金子知代、島慧理果 榎本孝幸、白木伸明、桑昭苑 |
| 2. 発表標題 メチオニン制限を組み込んだ新規iPS細胞膵臓分化方法の開発 |
| 3. 学会等名 アミノ酸学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Marwa san, Y Kato, Shiraki N, Kume S. |
| 2. 発表標題 Generation of induced pluripotent Stem Cell-Derived Beta cells in Blood Amino Acids-Like Medium |
| 3. 学会等名 22nd IUNS- InternationalCongress of Nutrition. (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Naoya Hiyoshi, Takayuki Enomoto, Airi Inoue, Yusuke Kato, Daisuke Sakano, Kimi Araki, Nobuaki Shiraki, Shoen Kume |
| 2. 発表標題 新規インスリン遺伝子変異を有するKumaマウスにおけるLC-MS/MSによる血漿中の代謝物プロファイルの解明 |
| 3. 学会等名 第45回分子生物学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|------------------------------------------|
| 1. 発表者名 板谷勇輝、上船史弥、徳間啓、富永成海、坂野大介、桑昭苑 |
| 2. 発表標題 膵 細胞におけるドーパミン生合成の役割とその制御機構の解明 |
| 3. 学会等名 第45回分子生物学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|------------------------------------------|
| 1. 発表者名 中原有理、井上愛里、徳間啓、坂野大介、白木伸明、桑昭苑 |
| 2. 発表標題 2型糖尿病原因遺伝子C2CD4Aの糖尿病発症メカニズム解明 |
| 3. 学会等名 第45回分子生物学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 門倉瑠乃、荒川哲大、Erinn Zixuan Sim、白木伸明、桑昭苑 |
| 2. 発表標題 多能性幹細胞の未分化および分化状態における細胞内亜鉛動態解析 |
| 3. 学会等名 日本再生医療学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>ヒト多能性幹細胞におけるメチオニン代謝と亜鉛動態の関係性を解明 https://www.titech.ac.jp/news/2022/064523 異種のドーパミン受容体が結合したD1-D2ヘテロ多量体の活性化によってインスリン分泌が調節される https://www.titech.ac.jp/news/2022/064340</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

| | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|