

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25505003

研究課題名(和文) hiPSCを用いた新規 細胞分化誘導因子の探索・化合物ライブラリーから段階的探索

研究課題名(英文) Chemical screening of novel factor to promote beta cell differentiation from hiPS cells

研究代表者

岡崎 康司 (Okazaki, Yasushi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：80280733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病患者に対する再生医療の実現のためには、ヒトiPS細胞(hiPS)から細胞への分化効率や質の向上を格段に引き上げる必要がある。そこで我々はhiPS細胞から膵細胞への分化の指標となる蛍光タンパク質を2種類の分化マーカー(Insulin, Neurogenin3)の下流に挿入した細胞を作製し、誘導効率をあげる化合物のスクリーニングを行った。FGFR1シグナルを特異的に阻害する化合物が見出され、成熟細胞の指標であるグルコース応答性が改善された。

研究成果の概要(英文)：Human induced pluripotent stem (hiPS) cells are an ideal resource for the cell based therapy. In this sense, the beta cell production by hiPS cells is a prominent therapeutic method to replenish the beta cells that are destroyed in type 1 diabetes. However, the efficiency and the quality of the beta cells produced from hiPS cells are not sufficient for cell therapy. The aim of this study is to improve the pancreatic beta cell differentiation from hiPS cells by screening with the chemical library. We found that the FGFR1 specific inhibitor C8 augmented the beta cell differentiation by improving the glucose responsiveness and expression of the mRNA genes related to insulin releasing procedure, such as GCK, SIC30A8 and GLP1R.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：膵 細胞分化 hiPSレポーター ケミカルスクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 1型糖尿病は膵細胞が破壊され、インスリン分泌がほとんどなくなる疾患である。多くの場合、インスリン投与だけでは血糖値をコントロールすることが難しく、現在では膵島移植のみが根治療法である。しかし、ドナーが少ないことや膵島分離が困難なため、本治療法も広く普及していない。一方で再生医療の臨床応用を考えた場合、倫理的問題や免疫適合性の観点から、現時点ではヒト iPS 細胞 (hiPSC) が再生医療に利用される公算が最も高い。hiPSC から膵細胞への分化誘導は、現在世界中の研究グループが競って誘導法を開発しているにも関わらず、臨床のレベルには達していない。したがって、早急にこの技術の効率をあげることが求められる。

(2) 2006年にNovocell社のグループにより初めてhES細胞から膵細胞への分化誘導法が報告された<sup>1</sup>。その方法は、基本的には発生過程を模倣した5つのステップを経て誘導を行っている。2012年の3月にKunisadaら<sup>2</sup>により、新たな誘導方法として、3ステップのみで、更にほぼ化合物のみの組合せでinsulin陽性細胞に分化できることが報告された。しかし、分化誘導後の膵細胞は、KCLや薬剤によるインスリン分泌は見られるが、グルコースに应答したインスリン分泌はみられていない<sup>2</sup>。従って、グルコース应答性をもつ新規膵細胞の分化誘導因子を探索していくことが必須である。そのために我々は、hiPSCを用いて新規膵細胞分化誘導因子が簡便化できるように、本学における遺伝子治療部門の三谷幸之介らによって開発された、hESやhiPSに高効率で相同組み換えを起こすアデノウィルスベクター<sup>3</sup> (Aizawa et.al. 2012)を用いて、内在性のInsulinプロモーターの下流にVenusを相同組み換えによって挿入することにより、Insp-Venus

KI-hiPSCを作製した。分化時、細胞が出現する頃にはVenusが発現し、蛍光顕微鏡下で候補因子の振り分けが可能となる(図1)。我々はKunisadaら<sup>2</sup>の方法にのっとり、我々が開発したhiPSCを用いて分化誘導を行ったところ、非常に再現性よく分化することが確認され、Venusの発現も確認された(図1)。このInspVenus-KI-hiPSCを用いて、Kunisadaらの方法で分化誘導を行い、新たな膵細胞分化誘導因子を段階的に化合物ライブラリーからの探索を試みようと考えた。

## 2. 研究の目的

1型糖尿病患者の再生医療には、hiPSCから膵細胞への分化効率を現状より格段に向上させる必要がある。hiPSCやhES細胞から膵細胞への分化誘導法の開発は世界中で競って行われているが、臨床応用できるレベルには達していない。したがって、膵細胞の分化誘導因子の更なる探索が必須である。本研究では、それらの分化誘導因子の探索が簡便に行えるツールとして、insulin-promoterの下流にVenus(緑色蛍光)をノックインしたhiPSCを作製した(図1)。蛍光標識したhiPSCを用いて膵細胞に分化させ、化合物群から、膵細胞分化効率をあげる因子の探索を行い、再生医療の応用に役立てることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) スクリーニングを行うために再現性の高い誘導方法を確立する。  
(2) 実際のスクリーニングを、化合物ライブラリーを用いて行う。  
(3) スクリーニング法:3段階におけるスクリーニング。第1段階:イメージングアナライザー(Array Scan, Thermo)により細胞分化がより亢進しているものを蛍光発現により選択する。第2段階:mRNAレベル発現解析により選択する。第3段階(機能

解析): 第1、第2段階でスクリーニングされた化合物を用いてグルコース応答性の確認を行う。

(4) 得られた化合物を用いてより詳細に解析、誘導法の確立を行う

#### 4. 研究成果

(1) **ダブル蛍光標識 hiPS 細胞の作製**: 研究当初は Insulin promoter の下流に Venus を発現させる hiPS 細胞を作成予定だったが、内分泌前駆細胞のマーカーである NGN3 promoter の下流に mCherry を相同組み換えによりノックイン (KI) をすることでより効率的なスクリーニングが可能であると判断しダブル KI 蛍光細胞を作製した (図1)。

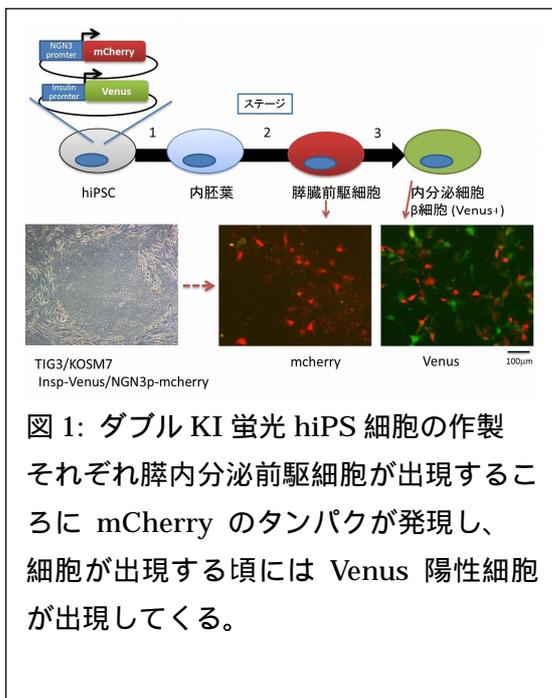


図1: ダブル KI 蛍光 hiPS 細胞の作製  
それぞれ膵内分泌前駆細胞が出現するころに mCherry のタンパクが発現し、細胞が出現する頃には Venus 陽性細胞が出現してくる。

(2) **ケミカルスクリーニングを行うための系の立ち上げ**: Kunisada らのプロトコルは非常に簡便に再現性よく分化する。しかし 96 well plate にて誘導を行った際には、各 well ごとの誘導効率を一定にすることが困難であった。そこで我々は V-bottom plate を用いて各ウェルにスフェアを形成させてから誘導を行うことで全ウェルを一定の条件でそろえることが可能になった。またケミカルの効果をより見やす

くする目的で、最終ステップにおけるケミカルを入れない条件でも 細胞が出現することが確認できたので、そのステップにおいては元々のプロトコルのケミカルを省いた状態でスクリーニングを行うことにした。

(3) **スクリーニングの方法**: Kunisada らの方法で、最終ステップに元々の報告にあったケミカルを入れない方法を用いた (図 3A 参照)。最終段階である内分泌前駆細胞から内分泌細胞への分化時に今回スクリーニングに使用したケミカルを個々に 10 $\mu$ M の濃度で添加した (図 2)。

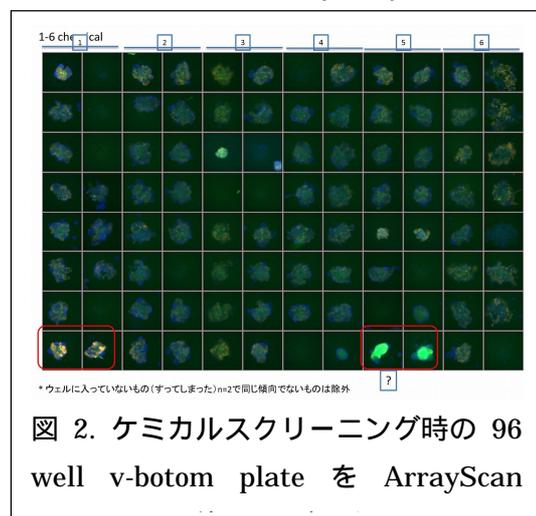


図 2. ケミカルスクリーニング時の 96 well v-bottom plate を ArrayScan

それぞれのケミカルを n=2 で添加し、さらに 3 回実験を行い再現性が取れているものを及び、緑や赤く光る細胞がより多いものを第一段階の選定基準とした。その後 total RNA を抽出し、内分泌細胞マーカーの発現により確認を行った (図 3)。

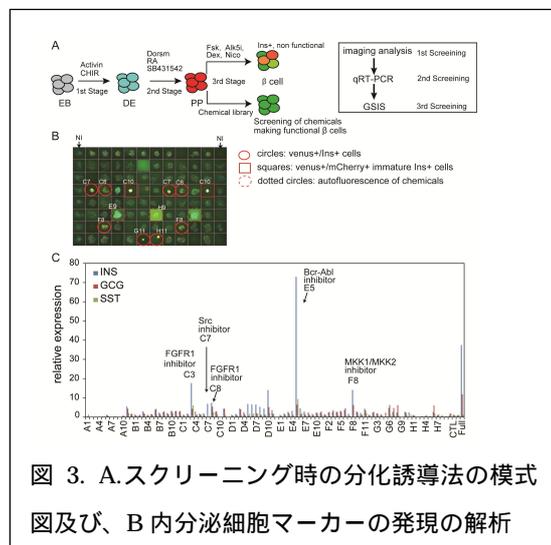


図 3. A.スクリーニング時の分化誘導法の模式図及び、B 内分泌細胞マーカーの発現の解析

最後に機能解析を行い、グルコース応答性のあるものの探索を行った。上記発現解析により再現性があるケミカルを6種類選出し機能解析を行った。その結果一種類(C8)の化合物がグルコース応答性を改善させた。(図4)。

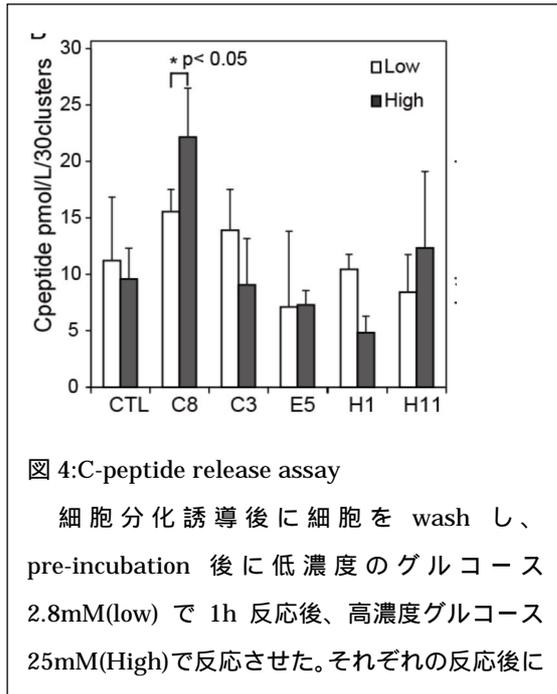


図4:C-peptide release assay

細胞分化誘導後に細胞を wash し、pre-incubation 後に低濃度のグルコース 2.8mM(low) で 1h 反応後、高濃度グルコース 25mM(High)で反応させた。それぞれの反応後に

(4) mRNA レベルの解析：本ケミカル C8 は FGFR1 を特異的に阻害する化合物である。これまでに報告されている細胞の機能に関わる遺伝子群について mRNA レベルの発現解析を行ったところ、*SIC30A8*, *GCK*, *CHGB*, *UCN3* などの遺伝子の上昇が見られた。すなわち細胞の成熟化が進行したと思われた。

(5) 更に C8 を用いて分化誘導時期の検討を行ったところ、早期(膵前駆細胞が作製される時期)に添加すると細胞の分化が完全に抑えられた。PDX1 は膵前駆細胞のマスターレギュレーターであり、その発現を見ると完全に抑えられていたことから FGFR1 と PDX1 との関連性が示唆された。実際にこれまでの報告からも PDX1 を強制発現させると *FGFR1* の発現が誘導されることや<sup>4</sup>、FGFR1 のアゴニストである FGF4 を添加すると *PDX1* の発現が上昇するなどの報

告もある<sup>5</sup>。また FGFR1 と PDX1 のノックダウンを行いそれぞれの発現が減少することから互いに制御しあっていることを示唆した。本研究において FGFR1 を特異的に阻害することで PDX1 や NGN3 への発現に影響を与えることで細胞の分化が促進されることを新たに示した。

#### REFERENCE

1. D'Amour, K.A. et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **24**, 1392-401 (2006).
2. Kunisada, Y., Tsubooka-Yamazoe, N., Shoji, M. & Hosoya, M. Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* **8**, 274-84 (2012).
3. Aizawa, E. et al. Efficient and accurate homologous recombination in hESCs and hiPSCs using helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther* **20**, 424-31 (2012).
4. Dessimoz, J., Opoka, R., Kordich, J.J., Grapin-Botton, A. & Wells, J.M. FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo. *Mech Dev* **123**, 42-55 (2006).
5. Johannesson, M. et al. FGF4 and retinoic acid direct differentiation of hESCs into PDX1-expressing foregut endoderm in a time- and concentration-dependent manner. *PLoS One* **4**, e4794 (2009).

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 2件)

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.  
Sci Rep. 2016 Oct 27;6:35908. 査読有  
doi:10.1038/srep35908.

Blaabjerg L, Christensen GL,  
Matsumoto M, Huising MO, van der Meulen T,  
Gillestrup N, Vale W. CRFR1 activation  
protects against cytokine-induced beta  
cell death. J. Mol. Endocrinol. 2014,  
53(3), 417-27. 査読有、doi:  
10.1530/JME-14-0056.

[学会発表](計 6件)

第16回日本再生医療学会総会、2017  
年3月7日 9日、宮城県仙台市、仙台国際  
センター、「FGFR1 阻害剤は内分泌前駆細胞  
(NGN3+) から内分泌への分化を促進する」  
菅原泉、松本征仁、大高真奈美、西村健、中  
西真人、三谷幸之介、岡崎康司

50<sup>th</sup> Miami 2017 Winter  
Symposium, 2017, 01/22-25, Miami US, Hyatt  
Regency Miami, 'An inhibitor of  
fibroblast growth factor receptor-1  
(FGFR1)promotes late stage terminal  
differentiation from NGN3+ pancreatic  
endocrine progenitors '  
Y.Yamashita-Sugahara, M.Matsumoto,  
M.Ohtaka, K.Nishimura, M.Nakanishi, K.Mita  
ni, Y.Okazaki.

第14回RCGMフロンティア国際シン  
ポジウム、2016年11月11、12日、埼玉県日  
高市、埼玉医科大学、創立30周年記念講堂  
「Screening of chemical promoting  
differentiation using double  
fluorescence-labeled hiPSCs (hIveNry)」  
Y.Yamashita-Sugahara, R. Matsumura, T.  
Sato, T.Matsutani, Y. Nakachi, E. Aizawa, Y.  
Iwanaga, M. Matsumoto, K. Mitani, Y.  
Okazaki

第13回RCGMフロンティアシンポジ  
ウム、2015年10月30-31日、埼玉県日高市、  
埼玉医科大学、創立30周年記念講堂  
「Insulin promoter-Venus/NGN3  
promoter-mCherry ダブルノックインhiPS細  
胞を用いた細胞分化誘導の解析」  
菅原泉、松村瞭、佐藤達也、松谷智子、相澤  
絵美、岩長ゆずる、松本征仁、三谷幸之介、  
岡崎康司

第37回日本分子生物学会年会、  
2014年11月25-27日、神奈川県横浜市、パ  
シフィコ横浜「iPS細胞を用いた、新規消化  
管ホルモンIBCAPが膵β細胞分化に与える  
影響の検討」菅原泉、横尾友隆、渡邊和寿、  
飯田薫子、鈴木浩明、島野仁、山田信博、岡  
崎康司、豊島秀男

第11回RCGMフロンティアシンポ  
ジウム、2013年11月22-23日、埼玉県日高市、  
埼玉医科大学、創立30周年記念講堂。「ヒ  
トiPS細胞におけるヘルパー依存型アデノウ  
イルスを用いたInsulin promoter-Venusレ  
ポーター細胞の作製とその解析」  
菅原泉、松村瞭、佐藤達也、松谷智子、相  
澤絵美、岩長ゆずる、松本征仁、三谷幸之介、  
岡崎康司

[図書](計 0件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
岡崎康司(Yasushi, Okazaki )  
埼玉医科大学 医学部・教授  
研究者番号: 80280733

(2)研究分担者 (なし)  
( )

研究者番号 :

(3)連携研究者  
松本征仁 (Matsumoto, Masahito )  
埼玉医科大学 医学部・講師  
研究者番号 : 90321819

(4)研究協力者  
菅原 泉 (Yamashita-Sugahara, Yzumi)  
埼玉医科大学 医学部・研究員  
研究者番号 : 10633000