

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830064

研究課題名(和文) 発生工学的手法を用いたマウスiPS細胞由来膵細胞樹立と新規糖尿病治療法の開発

研究課題名(英文) Differentiation and transplantation of insulin-secreting cells generated from mouse-derived iPS cells.

研究代表者

熊谷 勝義 (Kumagai, Katsuyoshi)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：20567911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：重症化した糖尿病を改善させるためには、患者の体細胞からiPS細胞を樹立し、分化誘導した膵細胞を患者へ移植する方法が考えられる。この場合、移植後の膵細胞は患者の体内で長期間に渡り十分に機能していなければならない。膵細胞内でグルコースセンサーとして機能するグルコキナーゼ(Gck)は膵細胞の代償性過形成やグルコキナーゼ活性化薬による膵細胞のインスリン分泌能増強作用と肝での糖利用亢進作用が認められる。本研究では、Gckを強制発現させたiPS細胞より機能的な膵細胞を樹立し、生体へ移植することで新たな糖尿病の治療法を確立する。

研究成果の概要(英文)：Islet transplantation has been suggested to be a promising treatment for type 1 and type 2 diabetes. iPS cells have potential cure for diabetes using a cellular therapy to ameliorate symptoms associated with both reduced insulin secretion and insulin sensitivity. Therefore, highly efficient differentiation of iPS cells into insulin-secreting cells will enhance the potential for patient specific cell transplantation therapy in diabetes. Here, we demonstrate that mouse-derived iPS cells can be differentiated into insulin-secreting cells in vitro and that they respond to glucose stimulation under physiological conditions. The hyperglycemic phenotype in model mice was improved by transplantation of the insulin-secreting cells.

研究分野：実験動物学

キーワード：マウスES/iPS細胞 インスリン産生細胞

1. 研究開始当初の背景

がん、心筋梗塞、脳卒中、糖尿病といったいわゆる生活習慣病は、遺伝素因がその発症に強く影響しており、糖尿病ではこれまでにいくつもの原因遺伝子が同定されている。また、国内ではインスリン抵抗性を示す 2 型糖尿病の急速な患者人口の増加が深刻な問題となっており、これに伴い、合併症の進行に伴う医療費高騰や QOL の低下を招いている。糖尿病は、発症後の罹病期間が長くなるほど膵細胞数は減少し [Diabetologia 45,85-96,2002. Diabetes 52,102-110,2003. J Clin Endocrinol Metab 88,2300-2308,2003]、日本人では膵細胞数が欧米人に比べて少ないことなどから糖尿病になりやすいと考えられている。現在、糖尿病を改善させる治療薬は、膵島内の数少ない膵細胞から強制的にインスリンを分泌させるものが多く、膵細胞数の減少抑制または増殖させる根本的な治療薬はない。したがって、インスリン分泌能および自己増殖能を有する膵細胞を樹立し、生体へ移植することができれば糖尿病を克服できると考えられる。

糖尿病治療の一つの試みとして、糖尿病患者より iPS 細胞を樹立し、インスリン分泌機能や自己増殖機能を有する膵細胞へ分化誘導後、糖尿病患者へ移植する方法が考えられる。移植した膵細胞は、生体内でグルコース応答性によるインスリン分泌が期待され、体内の血糖値を正常値に維持できると考えられる。マウスを使ったこの方法の試みでは、iPS 細胞より 3 次元構造の機能的な膵細胞を有する膵島を作製し、streptozotocin(STZ) 投与によってインスリン分泌を枯渇させたマウスの腎臓皮膜下へ移植したところ、血糖値が約 500mg/dL から約 300mg/dL へ低下したが、血糖値は長期に渡り正常値へ至らなかったため、移植した膵島内膵細胞の機能性に問題があると考えられる [PLoS One 6,e28209,2011]。このことから、つぎの課題として血糖値を長期にわたり正常値に制御できるインスリン分泌能および自己増殖能を有する膵細胞を作製する必要があり、一つの方法として、膵細胞の新生・増加に関わる因子を iPS 細胞へ導入することで、インスリン分泌能および自己増殖能を有する機能的な膵細胞を樹立することが考えられる。

Gck は、グルコースのグルコース 6-リン酸へ変換を触媒する酵素であり、膵細胞と肝臓における役割は全身のグルコース恒常性を保つ上で重要である。特に膵細胞

においては、Gck がグルコース濃度に応じてインスリン分泌量を制御するグルコースセンサーの役割を果たしている [Diabetes 51,S394-S404,2002]。また、ヒトにおいては現在までに約 600 以上の GCK 変異が知られ [Hum. Mutat 30,1512-1526,2009]、グルコキナーゼ活性低下を来すヘテロ遺伝子変異は、type 2 maturity onset diabetes of young (MODY2) であり、その病態はインスリン分泌能低下および軽度の耐糖能異常を示す [Nature 356,162-164,1992. Lancet 339,1307-1310,1992. Hum. Mutat 30,1512-1526,2009]。また、インスリン抵抗性に対する膵細胞の代償性過形成が不十分であり、その背景に Gck の障害が存在することが考えられる。すなわち、Gck は膵細胞の新生・増加に関与することが考えられる。また、グルコキナーゼ活性薬では、2 型糖尿病患者の膵細胞でのインスリン分泌能増強作用と肝での糖利用亢進作用が認められている [Diabetes Care 34,2560-2566,2011]。このことから、Gck は膵細胞のインスリン分泌および自己増殖を担う重要な因子であることが考えられる。そこで本研究では、Gck を強制発現させたマウス iPS 細胞よりグルコース応答性インスリン分泌能および自己増殖能を有する膵細胞を樹立し、生体へ移植することで糖尿病の新たな治療法を確立する。

2. 研究の目的

糖尿病は、発症後の罹病期間が長期に渡ると膵細胞数が減少して重症化する。重症化した糖尿病を改善させるためには、患者の体細胞から iPS 細胞を樹立し、分化誘導した膵細胞を患者へ移植する方法が考えられるが、この場合、移植後の膵細胞は患者の体内で長期間に渡り十分に機能していなければならない。膵細胞内でグルコースセンサーとして機能するグルコキナーゼ(Gck)は膵細胞の代償性過形成に関与し、また、グルコキナーゼ活性化薬による膵細胞のインスリン分泌能増強作用と肝での糖利用亢進作用が認められる。すなわち、Gck は膵細胞のインスリン分泌および自己増殖を担う重要な因子である。本研究では、Gck を強制

発現させた iPS 細胞より機能的な膵 細胞を樹立し、生体へ移植することで新たな糖尿病の治療法を確立する。

3. 研究の方法

Gck 強制発現コンストラクトを構築し、エレクトロポレーション法を用いてマウス ES 細胞のゲノムへ導入後、Gck 発現を示す ES 細胞クローンより膵 細胞へ in vitro で分化誘導させる。分化誘導した膵 細胞の中でインスリン分泌能および自己増殖能が最も良好な細胞株を 1 型糖尿病モデルの NOD マウスや 2 型糖尿病モデルの KK マウス、誘導的な Gck 発現抑制によって低週令から高週令にかけて MODY2 を呈するヒトの病態モデルマウスの腎臓皮膜下へ移植し、糖尿病の改善効果について評価する。同様に、Gck 強制発現コンストラクトをマウス iPS 細胞へ導入後、マウス ES 細胞と同じ手法を用いて膵 細胞の中でインスリン分泌能および自己増殖能が最も良好な iPS 細胞クローンを 1・2 型糖尿病や MODY2 を呈する病態モデルマウスの腎臓皮膜下へ移植し、糖尿病の改善効果について評価する。なお、糖尿病・代謝関連解析を行うことで糖尿病の改善効果について評価する。

(1) Gck 発現 iPS 細胞より膵 細胞へ分化誘導

Gck 強制発現コンストラクトを構築し、エレクトロポレーション法を用いてマウス iPS 細胞のゲノムへ導入後、恒常的に Gck 発現を示す iPS 細胞クローンを獲得し、in vitro で膵 細胞へ分化誘導を行った。

(2) 分化誘導させた膵 細胞の機能評価

分化誘導させた膵 細胞のインスリン産生能について評価するために、蛍光免疫染色を行った。つぎにグルコース応答性インスリン分泌能の評価を行った。また、分化誘導させた膵 細胞を STZ 注射により高血糖を呈したマウスの腎臓皮膜下へ移植することで血糖値の改善効果について評価を行った。

(3) 病態モデル動物へ移植後の分化誘導させた膵 細胞の機能評価

ヒトにおいては現在までに約 600 以上の GCK 変異が知られ、グルコキナーゼ活性低下を来すヘテロ遺伝子変異は、MODY2 であり、その病態はインスリン分泌能低下および軽度の耐糖能異常を示す。このため、ヒトの病態である MODY2 を呈する病態モデルマウスを作成するために、ドキシサイクリン(DOX)による Gck 遺伝子ノックダウンマウスの作成を行った。

4. 研究成果

平成 25 年度はマウス iPS 細胞より膵 細胞

の分化誘導を試みた。その結果、まず iPS 細胞を Embryonic Body (EB)へ分化させ、特殊コーティングした Dish にて三次元培養させることで細胞塊を得ることができた。

平成 26 年度は、得られた細胞塊のインスリン産生能について検討を行った。その結果、抗インスリン抗体で蛍光免疫染色を行ったところ、インスリン陽性が認められた。また、得られたインスリン陽性細胞のグルコース応答性インスリン分泌能について検討するために GSIS を行った。その結果、膵 細胞に比べて、極めて強いグルコース応答性インスリン分泌能が認められた。

つぎに、得られたインスリン産生細胞を STZ で膵 細胞を破壊することで高血糖を呈したマウスの腎臓皮膜下へ移植し、血糖値の改善について検討した。その結果、血糖値が約 500mg/dL から約 150mg/dL へ低下することが示された。

さらに、病態モデル動物へ移植後の分化誘導させた膵 細胞の機能評価を行うため、ヒトの病態である MODY2 を呈する病態モデルマウスを作成を行った。DOX により Gck 遺伝子ノックダウンのコンストラクトを構築し、ES 細胞へ導入することで Gck ノックダウンを誘導することが可能な ES 細胞のクローンの獲得を試みた。その結果、DOX 添加により 50-90% の Gck 発現ノックダウンが認められる ES 細胞クローンを 8 つ獲得した。つぎに、得られた ES 細胞クローンより生殖毛列へ移行するキメラマウスの作成を行った。その結果、生殖系列へ移行したキメラマウスの獲得に成功した。しかし、作成したマウスへ DOX を添加したところ、高血糖が認められず、MODY2 の病態を呈するまでには至らなかった。

現在、iPS 細胞より分化誘導して作成したインスリン産生細胞を 1 型・2 型糖尿病病態モデルマウスへ移植することで病態を改善させることを試みている。

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)

(雑誌論文)(計 3 件)

1. Takamoto I, Kubota N, Nakaya K, Kumagai K, Hashimoto S, Kubota T, Inoue M, Kajiura E, Katsuyama H, Obata A, Sakurai Y, Iwamoto M, Kitamura T, Ueki K, Kadowaki T. TCF7L2 in mouse pancreatic beta cells plays a crucial role in glucose homeostasis by regulating beta cell mass. *Diabetologia* 57, 542-553, Mar 2014. (査読有)

2. Sato T, Goyama S, Kataoka K, Nasu

R, Tsuruta-Kishino T, Kagoya Y, Nukina A, Kumagai K, Kubota N, Nakagawa M, Arai S, Yoshimi A, Honda H, Kadowaki T, Kurokawa M. Evi1 defines leukemia-initiating capacity and tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia. *Oncogene*, 1-11, Mar 2014
Open access. (査読有)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 勝義 (KUMAGAI KATSUYOSHI)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 20567911