

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860272

研究課題名(和文) MODY (遺伝性糖尿病) 患者由来iPS細胞を用いた病態解析

研究課題名(英文) Pathologic analysis of MODY using pancreatic beta cells derived from MODY-iPS cells.

研究代表者

矢部 茂治 (Yabe, Shigeharu)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：40533716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞の発生過程を模倣した6段階からなる膵細胞分化誘導系を開発した。さらに膵細胞の段階でスフェロイドによる3D培養を行うことでグルコース応答性などの機能性を高めることに成功した。このiPS細胞から分化誘導した膵細胞をSTZ投与により得られた糖尿病モデルマウスに移植することで血糖値を低下させた。またマウス血中からヒトインスリンC-peptideも検出して、生体内においても機能している事を確認した。また遺伝性糖尿病(MODY)患者由来iPS細胞(MODY-iPSC)を樹立し、MODY-iPSC細胞の膵細胞の分化過程において変異mRNAのみがNDにより選択的に分解されている事を発見した。

研究成果の概要(英文)：We established a six-stage protocol mimicking the developmental processes of pancreatic beta cells for the differentiation of human iPSC to pancreatic beta cells using defined culture media without feeders or serum. Spheroid formation at the pancreatic beta cells stage showed more efficient insulin secretion than did monolayer culture. Cultured cells were transplanted under kidney capsules of streptozotocin-induced diabetic NOD/SCID mice. After cell transplantation, diabetic mice had lower blood glucose levels, and islet-like structure were detected in vivo. Moreover, 12 weeks after transplantation, Human C-peptide was detected in the mouse serum. These results indicated that iPSC-beta cells functioned in vivo.

We also established the iPSC from Maturity-onset diabetes of the young (MODY) 5 patient. In the course of differentiation from MODY5-iPS cells into pancreatic beta cells, we found that the amount of mutant transcripts was much less than that of wild one.

研究分野：再生医療

キーワード：糖尿病 膵細胞 iPSC細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在、家族性パーキンソン病、家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、ダウン症など様々な遺伝子疾患が知られている。これらの疾患の多くは患者から組織を採取して研究に用いる事が出来ないため病態解析が困難であったが、様々な組織へと分化可能なヒト iPS 細胞の樹立が報告され (Takahashi et al., Cell 2007)、遺伝病患者由来ヒト iPS (疾患 iPS) 細胞を疾患が発症している組織へ分化させる事で病態の再現が可能となった。現在までにパーキンソン病や ALS など様々な疾患 iPS 細胞の樹立が報告されており (Dimos et al., Science 2008、Park et al., Cell 2008)、今後はこれら疾患 iPS 細胞を用いた病態解析が期待される。

近年患者が増加を続け今後重要な生活習慣病になると考えられる糖尿病においても、単一の遺伝子異常が原因で優性遺伝をする MODY (家族性若年発症糖尿病) が報告されているが、患者から膵細胞などの組織を採取して研究することができず、今までは病態解析を行う事が困難であった。申請者は組織幹細胞を用いた糖尿病の細胞療法等で糖尿病研究に携わっており (Kajiyama, Yabe et al., Int. J. Dev. Biol. 2010)、MODY の病態解析から得られる知見は患者の治療や糖尿病研究全体に重要な進歩を与えると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究において MODY 患者由来 iPS 細胞 (MODY-iPS) を樹立し膵細胞に分化させる事で今までは困難であった MODY の病態解析を試みる。

## 3. 研究の方法

### 1) MODY-iPS 細胞の樹立

MODY1,3,5 患者由来皮膚繊維芽細胞にセンダイウィルスにより OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC を導入して、feeder 細胞に播種して iPS 細胞のコロニーを得る。

本研究ではヒト iPS 細胞 definitive endoderm (DE) primitive gut tube (PGT) posterior fore gut (PFG) pancreatic progenitor (PP) beta cell という 5 段階の発生過程を模倣した 5 stage protocol で分化誘導を行う。申請者は既に、臨床応用や再現性をとる際に問題となる牛胎児血清 (FBS) とフィーダー細胞を用いない無血清・無フィーダー細胞の分化誘導系の開発を行っており、さらなる改良を行う。

### 1) **Definitive endoderm (DE) への効率的分化誘導系**

5 stage protocol において DE の分化効率に最終的な膵細胞分化効率に重要であることが分かっている。通常は Wnt と activin を用いて DE へ分化誘導を行うが、この方法では分化効率にバラツキや株間の差が大きい事が分かった。申請者は 1 つの小分子化合物と 3 つの成長因子を組み合わせた 新たな高効率 DE 分化誘導法を最近開発したので (テストした全ての株で 80% 以上の分化効率)、これを元に DE 以降の分化誘導を行う事でさらなる膵細胞分化の促進が期待できる。

### 2) **posterior foregut (PFG) における位置情報の最適化**

膵細胞分化誘導を行うと PFG における細胞の状態が予想以上に最終的な分化率・インスリン分泌・グルコース応答性に大きく影響している事が分かった。PFG 近傍からは膵臓以外にも、胃や肝臓などの臓器も分化してくるため PFG において膵臓分化に適切な位置

情報を与えることが不可欠である。そこで位置情報に重要な因子である複数の FGF や RA を様々な濃度で組み合わせてマーカー遺伝子発現を免疫染色・定量的 PCR で詳細に調べることで適切な位置情報を与える因子・濃度の組み合わせを決定する。

### 3) Posterior fore gut(PFG)から beta cell の効率的分化誘導系の検討

現在のプロトコルでは 細胞への分化効率は低い、この理由として現在の分化条件では分化因子が数種類しか入っていないため、分化培地に適切な因子が入っていない事や因子の組み合わせが適切でない事が考えられる。そこで申請者は 細胞分化に効果があると報告のある因子を 20 種類程ピックアップしており、最初はこれらを全て加えて分化誘導を行い、次に 1 因子ずつ抜いて分化させる事で重要な因子を同定する。また申請者は 細胞株である MIN6 の培養上清をマウスの脂肪組織由来幹細胞に添加することで 細胞への分化を促進することを明らかにしたので(論文準備中)、本研究においても MIN6 の培養上清を用いることで 細胞分化の促進を試みる。

### 4) MODY-iPS 細胞の解析

分化誘導系を用い MODY-iPS 細胞から分化させた膵 細胞の解析を行う。

### 5) 糖尿病モデルマウスの条件検討

Streptozotocine (STZ)の腹腔内注射により 細胞を破壊し糖尿病モデルマウスを作成するが、STZ の量が少ないと血糖値が増加せず逆に多すぎるとマウスが死んでしまう。血糖値が 400mg/dl 以上の高血糖状態になり、かつマウスの生存率がよい STZ の量やマウスの週令を検討する。

### 6) 糖尿病モデルマウスを用いた生体内における MODY の病態再現および機能解析

iPS 細胞から分化させた膵 細胞を糖尿病モデルマウスの片側の腎被膜下に移植し生体内で MODY の病態を再現させ、血糖値の推移を調べる。さらにマウスに糖を経口投与し血糖値およびインスリン量の変化によりグルコース応答性を調べ、生体内における分化状態・機能を比較解析する。また片側の腎被膜下への移植を行うことで移植した細胞をそのまま摘出することが可能であるので(腎臓は 2 つあるので 1 つ摘出してマウスは生存可能である)、移植した細胞を摘出して生着率・遺伝子発現を免疫染色やマイクロアレイにより比較解析する。この際に移植細胞を摘出したマウスにおける血糖値変化やインスリン分泌量を解析することで移植細胞の効果をより解析できる。

### 4 . 研究成果

遺伝性糖尿病 (MODY) 患者由来 iPS 細胞 (MODY-iPSC) を樹立した。膵 細胞分化誘導を行うため、DE, PGT, PFG, PP, EP の各段階のマーカー陽性率が 90%以上であり、膵 細胞のマーカーである insulin C-peptide の陽性率が 30%以上になる膵 細胞の発生過程を模倣した 6 段階からなる膵 細胞分化誘導系を開発した。さらに膵 細胞の段階でスフェロイドによる 3D 培養を行うことでグルコース応答性などの機能性を高めることに成功した。この iPS 細胞から分化誘導した膵 細胞を STZ 投与により得られた糖尿病モデルマウスに移植することで血糖値を低下させた。またマウス血中からヒトインスリン c-peptide も検出して、生体内においても機能している

事を確認した。MODY-iPS 細胞と膵 細胞分化誘導系を用い、MODY-iPS 細胞の膵 細胞の分化過程において変異 mRNA のみが NMD により選択的に分解されている事を発見した。

#### 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 4 件)

- 1) Yabe SG, Fukuda S, Takeda F, Nashiro K and Okochi H. Efficient Generation of Functional Pancreatic Beta Cells from Human iPS Cells. **Journal of Diabetes** (in press)
- 2) Yabe SG, Iwasaki N, Yasuda K, Hamasaki TS, Konno M et al. Establishment of Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY)-iPS cells from Japanese patients. **Journal of Diabetes Investigation**. 6:543-547 (2015)
- 3) Fukuda S, Hagiwara S, Fukuda S, Yakabe R, Suzuki H, Yabe SG et al. Safety assessment of bone marrow derived MSC grown in platelet-rich plasma. **Regenerative Therapy**. 1:72-79 (2015)
- 4) Kawamoto K\*, Yabe S\*, Konno M\* et al. Murine Insulinoma Cell-Conditioned Medium with BETA2/Neurod1 Transduction Efficiently Induces the Differentiation of Adipose-Driven Mesenchymal Stem Cells into beta-Like Cell both In Vitro and In Vivo. **Journal of Stem Cell Research & Therapy**. 4:221-230 (2014). \*These author contribute equally to this work.

[学会発表](計 2 件)

- 1) 矢部茂治、福田沙月、霜田雅之、大河内仁志。ヒト iPS 細胞から機能的膵 細胞(iPS-beta)の分化誘導。第 15 回日本再生医療学会、2016 年 3 月 18 日、大阪国際会議場。
- 2) 矢部茂治、岩崎直子、安田和基、浜崎辰夫、福田沙月、大河内仁志。遺伝性糖尿病(MODY)患者由来 iPS 細胞の膵 細胞分化過程における NMD による MODY 変異 mRNA の分解、第 13 回日本再生医療学会、2015 年 3 月 19 日、パシフィコ

横浜。

[図書](計 1 件)

矢部茂治、大河内仁志。膵島の再生医療-膵細胞の発生と再生をめぐる新展開-第 2 章 5 疾患 iPS 技術を利用した遺伝性糖尿病の解明と再生、診断と出版社、45-51、2015 年

[産業財産権]

出願状況(計 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 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

矢部 茂治 (Yabe Shigeharu)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：40533716