

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 ( 共通 )

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



令和 6 年 5 月 1 5 日現在

機関番号： 7 4 3 2 9

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2022 ~ 2023

課題番号： 2 2 K 2 0 9 0 3

研究課題名 ( 和文 ) クロモグリク酸ナトリウムが糖尿病薬になりうる可能性について iPS 細胞を用いて検討

研究課題名 ( 英文 ) Investigating the potential of sodium cromoglycate as a diabetes medication using iPS cells

研究代表者

近藤 恭士 ( Kondo, Yasushi )

公益財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号： 2 0 9 5 5 3 8

交付決定額 ( 研究期間全体 ) : ( 直接経費 ) 2,200,000 円

研究成果の概要 ( 和文 ) : ヒト iPS 細胞から膵インスリン産生 細胞様細胞への分化を促進する化合物として、クロモグリク酸ナトリウムを同定した。ヒト iPS 細胞由来の膵前駆細胞から内分泌前駆細胞 ( NEUROGENIN-3 ( NGN3 ) 陽性細胞 ) への分化を促進することでインスリン ( INS ) 陽性細胞を増加させていた。クロモグリク酸ナトリウムが膵臓の発生、膵内分泌前駆細胞 ( NGN3 陽性細胞 ) を分化促進させるメカニズムは未だ不明である。そのため本研究では NEUROGENIN-3 ( NGN3 ) と相関して蛍光色素を発現するレポーターヒト iPS 細胞株である NGN3-GFP iPS cell line を作製し詳細なメカニズムを検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植医療への応用に向けて、ヒト幹細胞 ( ヒト ES / iPS 細胞 ) から膵細胞を製作する研究が盛んに進められている。しかし糖尿病を根治するような分化誘導法の確立は出来ていない、そのため糖尿病創薬の研究が望まれている。

本研究では、以前同定したクロモグリク酸ナトリウムが内分泌前駆細胞 ( NEUROGENIN-3 ( NGN3 ) 陽性細胞 ) への分化を促進するメカニズムを NGN3-GFP iPS cell line を作製して解析出来たら糖尿病創薬の研究は前進すると考える。また標的遺伝子の解析を目的とした NGN3-GFP iPS cell line を作製すれば解析ツールとして有用である。

研究成果の概要 ( 英文 ) : We identified sodium cromoglycate, which is used clinically as an anti-allergy medication, as a small molecule compound that promotes the differentiation of human iPS cells into pancreatic insulin-producing -cell-like cells. It increased insulin ( INS ) -positive cells by promoting the differentiation of human iPS cell-derived pancreatic progenitor cells into endocrine progenitor cells ( NEUROGENIN-3 ( NGN3 ) -positive cells ). The mechanism by which sodium cromoglycate promotes pancreatic development and differentiation of pancreatic endocrine progenitor cells ( NGN3 -positive cells ) is still unknown. In this study, we produced a reporter human iPS cell line, NEUROGENIN-3 ( NGN3 ) -GFP iPS cell line, which expresses a fluorescent dye in correlation with NGN3, and investigated the detailed mechanism.

研究分野： 再生医学

キーワード： NEUROGENIN-3 膵臓 糖尿病 iPS 細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

2006年に京都大学の山中伸弥教授らは世界で初めて iPS 細胞の作製に成功し (Takahashi et al. Cell 126(4):663-76, 2006) 2012年にノーベル医学・生理学賞を受賞した。現在多くの分野で研究が施行され糖尿病に対しても、iPS 細胞を用いた再生医療に向けた研究が盛んに行われている。

膵 細胞の成熟化機構の詳細は未だ明らかではないが、2014 年ブレイクスルーとなる論文が報告された。カナダブリティッシュコロンビア大学の Rezania らは、既知の因子に加え、ビタミン C、プロテインキナーゼ C 経路活性化剤、TGF 受容体阻害剤、甲状腺ホルモンなどの因子を用いた分化誘導法の最適化を行い、約 50%の効率でインスリンを産生する細胞を作製することに成功した。(Rezania A et al. Nat Biotechnol 32:1121-1133, 2014)

一方、米ハーバード大学の Pagliuca らも分化誘導法の改変に着手し、70 種類以上の成長因子や低分子化合物の 150 種類以上もの組み合わせを試した結果、未分化細胞から約 5 週間かけてグルコース濃度の変化に応答してインスリンを分泌する膵 細胞を 30%以上の効率で作製できる分化誘導法を確立した。(Pagliuca FW et al. Cell 159:428-439, 2014)

しかし、その後も糖尿病を根治するような分化誘導法の確立は出来ていない。そのため糖尿病創薬の研究が望まれる。申請者は、iPS 細胞から膵内分泌細胞への分化を促進する低分子化合物を同定し報告をしている。(Kondo Y et al. Diabetologia 60(8):1454-66, 2017) 約 1,250 種類の低分子化合物をスクリーニングし、膵前駆細胞からインスリン陽性細胞への分化を促進する化合物として、臨床で抗アレルギー薬として用いられているクロモグリク酸ナトリウム (SCG) を同定した (図 1)。

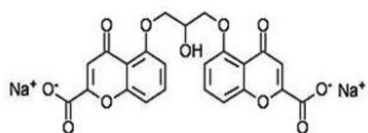


図 1 クロモグリク酸ナトリウムの化学構造

申請者の方法では膵前駆細胞から内分泌前駆細胞 (NGN3 陽性細胞) への分化過程で 4 つの因子にクロモグリク酸ナトリウムを追加することで、多種類の内分泌細胞のもととなる内分泌前駆細胞 (NGN3 陽性細胞) (4 因子: 14.2 ± 3.6% から 4 因子 + SCG: 32.6 ± 4.6%) への分化を促進することでインスリン (INS) 陽性細胞 (4 因子: 5.9 ± 1.5% から 4 因子 + SCG: 16.5 ± 2.1%) を増加させていた (図 2)。

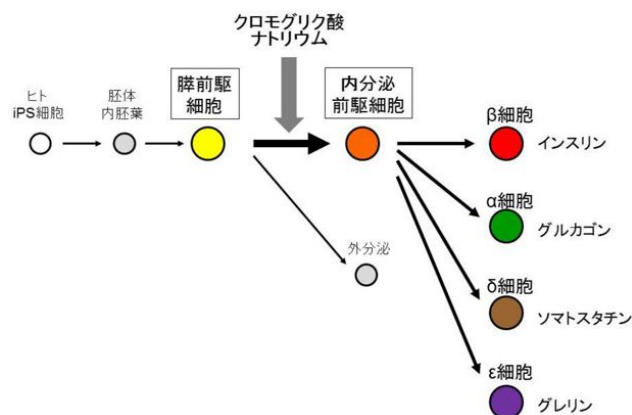


図2 クロモグリク酸ナトリウムは膵前駆細胞から内分泌前駆細胞への分化を促進する

クロモグリク酸ナトリウムを用いて作製された 細胞様細胞は、培養皿上でインスリンを分泌し、1 型糖尿病モデルマウスに移植したところ血糖値を低下させた。

また RNA シーケンシング解析を行った結果、骨形成因子 (bone morphogenetic protein; BMP)4 の発現を抑制することで、内分泌前駆細胞 (NGN3 陽性細胞) の分化を促進することが判明した。

膵発生研究手法の進歩とともに膵細胞の挙動や運命決定について明らかにされてきたが、いまだ不明な部分が残っている。今回クロモグリク酸ナトリウムが BMP4 の発現に関与していることがわかり、さらに詳細なメカニズムを解明し、膵発生の解明と創薬の研究につなげたい。

iPS 細胞創薬の最大の特徴は、開発研究の初期から治験直前に至るまでのすべてのフェーズで実際の患者細胞を用いられる点である。疾患特異的 iPS 細胞が樹立され、病態の改善が認められれば、場合によっては動物モデルによる検証を経ることなくヒトを対象とする臨床試験に移行できる可能性もある。創薬に必要なコストを低く抑えられる可能性もある。

## 2. 研究の目的

本研究はクロモグリク酸ナトリウムが、内分泌前駆細胞 (NEUROGENIN-3 : NGN3 陽性細胞) を増加させているメカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

(1) クロモグリク酸ナトリウムが、内分泌前駆細胞 (NEUROGENIN-3:NGN3 陽性細胞) を増加させているため NGN3 陽性細胞のみを評価するため NGN3-GFP iPS cell line を作製する。

(2) NGN3-GFP iPS cell line を用いてクロモグリク酸ナトリウムの有無で分化誘導した内分泌前駆細胞 (NGN3-GFP 陽性細胞) を FACS にて回収し RNA シークエンス等で評価する。そのうえでクロモグリク酸ナトリウムが BMP4 への関与を含めて詳細に検討する。

#### 4. 研究成果

本研究では NGN3-GFP iPS cell line を作成するため、まず NRUROGENIN3 (NGN3) の配列を含む BAC-clone を購入した。INSULIN-GFP iPS line を作製した時と同様に Red/ET Recombination system にて相同組み換えを施行し Electroporation にて iPS 細胞に遺伝子導入した。作製した細胞株を数十個選択して分化誘導施行して FACS にて評価しているが解析に有用な株の作製には至っていない。そのため分化誘導効率の改善、GFP 発現の増強などを修正し作製を繰り返している。

本研究で作製している NEUROGENIN-3(NGN3)-GFP iPS cell line は基礎研究に有用であり解析ツールに役立つと考える。

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
---------	---------