

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591305

研究課題名(和文)患者由来iPS細胞を用いた糖尿病の遺伝・病態解明と再生治療

研究課題名(英文)iPS cells from diabetic patients

研究代表者

藤倉 純二(Fujikura, Junji)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70378743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア遺伝子異常を有する糖尿病患者からiPS細胞を樹立した。

樹立したiPS細胞においては変異の消失と増加が認められ、各クローンは継代培養や分化においても一定の変異比率を維持した。

変異を消失したミトコンドリアiPS細胞を用いれば自家移植による治療が可能である。また同一ゲノムを有しながら大幅に変異比率が異なるiPS細胞クローンが得られることから、ミトコンドリア機能の病態生理学的意義をヒト細胞において検討することで新たな治療法の開発に結び付く可能性を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：iPS cells were successfully generated from patients with the mtDNA A3243G mutation (Mt-iPS). The Mt-iPS cells exhibited a bimodal degree of mutation heteroplasmy. The mutation frequencies decreased to an undetectable level in six of 14 clones, while the others showed several-fold increases in mutation frequencies compared with those in the original fibroblasts. During serial cell culture passage and after differentiation, no recurrence of the mutation or no significant changes in the levels of heteroplasmy were seen. Mutation-rich, stable Mt-iPS cells may be a suitable source of cell for human mitochondrial disease modelling in vitro. Mutation-free iPS cells could provide an unlimited, disease free supply of cells for autologous transplantation therapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：再生医療 糖尿病 人工多能性幹細胞 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

薬物治療中の本邦糖尿病患者の平均 HbA1c は 7.26%と未だ高く合併症の抑制に必要なレベルに達していない(平成 15 年国民健康・栄養調査の概要)。加齢とともに低下するインスリン分泌と代謝機能を、既存の薬物療法で治療するには限界があり、血糖正常化を目指した大規模臨床試験では、重症低血糖の頻度増加や心血管イベント発生率や生存率が改善しないことが示されている。

膵・膵島移植による血糖正常化が 1 型糖尿病において報告されており、膵細胞移植の有効性が確認されている。しかし、拒絶反応、免疫抑制剤副作用、膵移植の侵襲や膵島の低生着率に伴うドナー不足等が大きな問題である。そこで、患者自身の細胞から生理的反応性をもつ細胞が豊富に得られれば、その移植は糖尿病の根治療法となりうる。

一方、細胞と糖代謝臓器においては、加齢に伴うミトコンドリア DNA 量の減少と変異蓄積、あるいはミトコンドリア機能低下が分泌能とインスリン感受性低下に関係している。母系遺伝する先天的なミトコンドリア病だけでなく、糖尿病の約 1% にミトコンドリア変異が関係するとされる。しかし先天的・後天的変異の蓄積過程、遺伝、代謝異常発症の予測などについては不明である。

2. 研究の目的

糖尿病患者から人工多能性幹(iPS)細胞を作成し、糖尿病の遺伝と病態の解明を行うとともに、創薬開発と分化再生療法を目指す。

3. 研究の方法

糖尿病患者から、「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究(京都大学医学研究科・医の倫理委員会承認)」に対して同意を頂いた方から、皮膚採取を行う。腹部から径 4mm 程の皮膚採取を行い、線維芽細胞を培養し 10⁷ 個に増殖させ一部を凍結保存する。レンチウイルスベクターにより線維芽細胞にレトロウイルス受容体を発現させた後、更に OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC の 4 遺伝子を発現するレトロウイルスベクターを感染させ、患者由来ヒト iPS 細胞を多数のクローンとして得る。糖尿病患者からも確実に iPS 細胞作成が可能であることを実証するために iPS 細胞樹立の検証を以下の項目について行う。初期化が生じていることを未分化マーカー(SSEA-3, SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81, NANOG)発現を免疫染色で確認する。サイレンシングが導入遺伝子について生じていることを、定量 PCR により検討し導入遺伝子発現が総遺伝子発現の 1%未滿に抑制されていることを確認する。更に、分化全能性について、胚葉体(Embryoid body)形成後約 2 週間にて内胚葉(AFP, SOX17,

FOXA2), 中胚葉(SMA), 外胚葉(Tuj-1)マーカーの免疫染色・RT-PCR による確認、SCID マウス精巣への iPS 細胞移植後 3 カ月の奇形腫において、組織学的に確認する。

皮膚生検後の線維芽細胞、iPS 誘導過程、誘導後、そして分化誘導前後のミトコンドリアコピー数と変異比率の解析を行う。

4. 研究成果

様々な原因の糖尿病患者(ミトコンドリア糖尿病患者 2 名、1 型糖尿病患者 2 名、インスリン分泌低下 2 型糖尿病患者 1 名)から疾患特異的 iPS 細胞を樹立することに成功した。

ミトコンドリア糖尿病では、個々の細胞において、正常なミトコンドリアゲノム(3243A)と異常なミトコンドリアゲノム(3243G)を種々の割合で保有しており、一定の変異遺伝子比率がある閾値を超えると障害が生じると考えられている。

患者血液・線維芽細胞・樹立した iPS クローンにおける変異率を検討したところ、血液細胞、線維芽細胞における変異比率は約 20% であるのに対し、樹立した iPS 細胞においては変異比率が検出感度以下となるクローンと変異比率が高いクローンとが得られ、変異比率の 2 極分化が生じていた。患者由来線維芽細胞の検討から初期化に関連した現象と考えられた。

各 iPS 細胞クローンを継代培養した結果、変異の消失したクローンにおいては変異が復活することはなく、変異が多いクローンにおいても変異比率が減少したり増加することはなく一定の変異比率を維持することが観察された。

また、変異比率が iPS 細胞からの分化において変化するかを胚様体形成法により検討した。その結果、変異の消失したクローンにおいては変異が復活することはなく、変異が多いクローンにおいても変異比率が減少したり増加することはなく一定の変異比率を維持することが観察された。

以上の知見から、変異を消失したミトコンドリア iPS 細胞を用いればリスクを伴う遺伝子改変を行わずに自家移植による治療が可能であること、また同一ゲノムを有しながら大幅に変異比率が異なるミトコンドリア iPS 細胞を分化させた場合、各組織におけるミトコンドリア機能の病態生理学的意義をヒト細胞において検討することで新たな治療法の開発に結び付く可能性を見出すことができた。

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)

1: Noguchi M, Hosoda K, Nakane M, Mori E, Nakao K, Taura D, Yamamoto Y, Kusakabe T, Sone M, Sakurai H, Fujikura J, Ebihara K, Nakao K.

In vitro characterization and engraftment of adipocytes derived from human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells.

Stem Cells Dev. 2013 Nov

1;22(21):2895-905.

doi:10.1089/scd.2013.0113. Epub 2013 Jul

20. PubMed PMID: 23750558.

2: Fujikura J, Hosoda K, Nakao K. Cell transplantation therapy for diabetes mellitus: endocrine pancreas and adipocyte.

Endocr J. 2013;60(6):697-708. Epub 2013

May 29. Review. PubMed PMID: 23719783.

3: Miyazaki S, Tashiro F, Fujikura J, Yamato E, Miyazaki J. Acinar-to-ductal metaplasia induced by adenovirus-mediated pancreatic expression of Isl1.

PLoS One. 2012;7(10):e47536. doi:

10.1371/journal.pone.0047536. Epub 2012

Oct 15.

PubMed PMID: 23077629; PubMed

Central PMCID: PMC3471997.

4: Fujikura J, Nakao K, Sone M, Noguchi M, Mori E, Naito M, Taura D, Harada-Shiba M, Kishimoto I, Watanabe A, Asaka I, Hosoda K, Nakao K.

Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation.

Diabetologia. 2012 Jun;55(6):1689-98. doi:

10.1007/s00125-012-2508-2. Epub 2012

Mar 7. PubMed PMID: 22396012.

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計11件)

LMNA 遺伝子異常を伴った家族性部分性脂肪萎縮症患者由来 iPS 細胞の脂肪細胞分化の検討

松原 正樹, 野口 倫生, 日下部 徹, 藤倉 純二, 海老原 健, 細田 公則, 中尾 一和
2012 年 日本肥満学会総会

ヒト多能性幹細胞由来前駆脂肪細胞の単離細胞表面マーカーの探索

野口 倫生, 細田 公則, 森 栄作, 松原 正樹, 藤倉 純二, 海老原 健, 中尾 一和
2012 年 日本肥満学会総会

Adipomedicine の新展開 肥満症の基礎研究
ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞の分化誘導と細胞移植

野口 倫生, 細田 公則, 森 栄作, 松原 正樹, 田浦 大輔, 曾根 正勝, 藤倉 純二, 海老原 健, 中尾 一和

2012 年 日本肥満学会総会

ヒト iPS 細胞由来脂肪細胞の脂肪細胞機能解析と細胞移植

Author: 野口 倫生, 細田 公則, 田浦 大輔, 森 栄作, 松原 正樹, 曾根 正勝, 藤倉 純二, 海老原 健, 中尾 一和

2012 年 日本内科学会総会

脂肪萎縮症に対する脂肪組織移植治療に関する検討

森 栄作, 細田 公則, 野口 倫生, 藤倉 純二, 孫 徹, 富田 努, 内藤 雅喜, 日下部 徹, 海老原 健, 中尾 一和

2012 年 日本内科学会総会

LMNA 遺伝子異常を伴った家族性部分性脂肪萎縮症患者由来 iPS 細胞の脂肪細胞分化の検討

松原 正樹, 藤倉 純二, 森 栄作, 中尾 一和, 野口 倫生, 細田 公則, 中尾 一和

2012 年 日本内分泌学会総会

糖代謝組織の補充と保護に基づく糖尿病治療法の研究

藤倉 純二

2012 年 日本内分泌学会総会

ヒト iPS/ES 細胞由来脂肪細胞の機能解析

中根 舞子, 野口 倫生, 森 栄作, 中尾 一和, 松原 正樹, 山本 祐二, 藤倉 純二, 海老原 健, 細田 公則, 中尾 一和

2011 年 日本肥満学会総会

ヒトにおけるエネルギー調節のメカニズム解析ツールとしてのヒト iPS 細胞由来神経細胞の検討

越智 ゆかり, 山田 伸子, 田浦 大輔, 野口 倫生, 勝浦 五郎, 藤倉 純二, 山本 祐二, 曾根 正勝, 海老原 健, 細田 公則, 中尾 一和

2011 年 日本内分泌学会総会

ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いたメラノコルチン系の検討

Author: 山田 伸子(京都大学 大学院医学研究科臨床病態医科学内分泌代謝内科), 勝浦 五郎, 田浦 大輔, 野口 倫生, 藤倉 純二, 越智 ゆかり, 山本 祐二, 曾根 正勝, 海老原 健, 細田 公則, 中尾 一和

2011年 日本内分泌学会総会

ヒト iPS 細胞を用いた脂肪萎縮症の細胞治療法の開発

野口 倫生, 細田 公則, 森 栄作, 中根 舞子, 中尾 一泰, 藤倉 純二, 山本 祐二, 曾根 正勝, 海老原 健, 中尾 一和

2011年 日本内分泌学会総会

ヒト iPS 細胞を用いた脂肪細胞治療法の開発

野口 倫生, 細田 公則, 森 栄作, 中根 舞子, 藤倉 純二, 海老原 健, 中尾 一和

2011年 日本糖尿病学会総会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: Mitochondrial Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells, Method of Producing Same and Use Thereof

発明者: 中尾一和 藤倉純二 細田公則

曾根正勝 中尾一泰

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: 61/503,283

取得年月日: 2011年6月30日

国内外の別: 外国

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤倉 純二 (FUJIKURA JUNJI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 70378743

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

浅香 勲 (ASAKA ISAO)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号: 10543639

足立 壮一 (ADACHI SOICHI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号: 10273450

高橋 和利 (TAKAHASHI KAZUTOSHI)

京都大学・iPS細胞研究所・講師

研究者番号: 80432326