

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461638

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞膵臓分化系を用いた生活習慣病胎児期起源説の検証

研究課題名(英文) The verification of the fetal origins of adult disease theory using human iPS cell pancreatic differentiation system

研究代表者

白木 伸明 (shiraki, nobuaki)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：70448520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病胎児期発症説は疫学・動物実験により研究が行われているが、ヒトにおいて妊娠時の低栄養が胎児臓器の発分化にどのように関与するかを実験的に評価することは困難である。そこで、本研究ではヒトiPS細胞の膵臓分化誘導系を用いて、細胞に対して単一アミノ酸除去培地による低栄養負荷を与え、その後の細胞の機能を評価した。検討の結果、分化の特定の段階である種のアミノ酸を除去することにより、その後のインスリン陽性細胞数が低下することを見出した。げっ歯類を用いた研究で胎児期の低栄養による出生後の膵臓細胞数減少が報告されており、iPS細胞分化系はBarker説の検証に有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Low birth weight is strongly predictive of lifestyle related disease. Animal study indicated that fetal malnutrition induce fetuses with growth retardation have a decreased beta cell mass, which persists into adulthood and causes glucose intolerance. However, The verification of this malnutrition's effect on human fetuses was difficult. The aim of this study is checking the effect of fetal malnutrition on human using human iPS cell pancreatic differentiation methods. In this study, I have found that important amino acids which regulate pancreatic differentiation at narrow time windows using novel pancreatic differentiation methods established in this study. As a results of amino acid deprivation during pancreatic endocrine differentiation, the number of pancreatic beta cell is significantly decreased at final stage. These results indicated that iPS cell differentiation systems is useful tools for analysis of fetal origins of adult disease theory.

研究分野：幹細胞制御学

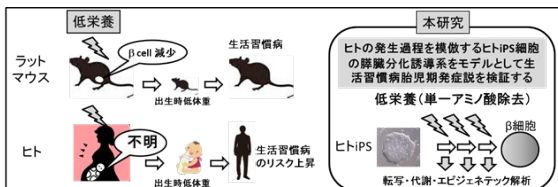
キーワード：DOHaD Barker説 生活習慣病胎児期発症説 iPS アミノ酸

### 1. 研究開始当初の背景

世界中で高血圧、高脂血症、動脈硬化、糖尿病などの生活習慣病が著しく増加している。生活習慣病は、遺伝素因と環境因子(生活習慣)の二つが発症に関わっていると考えられるが、さらに母親の胎内環境が生活習慣病の発症に深く関与することも明らかになってきた。この生活習慣病胎児期発症説(Barker説)に関しては、疫学、動物実験、分子レベル等多方面にわたって積極的に行われており、膵臓に関してはラットやマウスを用いた実験で、胎児期の低栄養により出生後の膵臓細胞の数が減少することが報告されている。しかし、ヒトにおける検証は非常に困難であった。

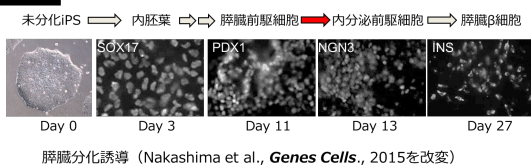
### 2. 研究の目的

本研究では、ヒトの発生過程を模倣するヒトiPS細胞の膵臓分化誘導系をモデルとして生活習慣病胎児期発症説を検証することを目的とする。生活習慣病胎児期発症説(Barker説)に関しては、疫学・動物実験により研究が行われているが、ヒトにおいて妊娠時の低栄養が胎児臓器の発生分化にどのように関与するかを実験的に評価することは困難である。そこで、本研究ではヒトiPS細胞の膵臓分化誘導系において、細胞に対して単一アミノ酸除去培地による低栄養負荷を与え、その後の細胞の機能を転写・代謝・エピジェネティック解析により多方面から評価することを目的とした。



### 3. 研究の方法

図1



(1) ヒト多能性幹細胞を用いて、単一アミノ酸除去培地を用いて、アミノ酸除去という低栄養暴露が多能性に与える影響を評価した。主に図1示す未分化iPS細胞時点について遺伝子発現、代謝、エピジェネティック修飾について詳細に検討した。細胞増殖(Edu assay)・細胞死(TuneI assay)・分化状態の評価(免疫染色)・網羅的遺伝子発現解析(GeneChip, Affymetrix)・網羅的DNAメチル化解析(Human Methylatin 450 BeadsChip,

illumina)・CE-TOF-MS法を用いたメタボローム解析(Human Metabolome Technologies)を用いて評価した。

(2) Barker仮説検証のために膵臓分化誘導方法の開発を行った。利用した細胞株はヒトES細胞株(khES1, khES3, 201B7, Toe)である。培養基材としてゼノフリー基材であるSynthemax II(corning)を用いた。

(3) ヒトiPS細胞の膵臓分化誘導系各分化段階において特に膵臓発生系譜において重要な内分泌前駆細胞への分化過程において、単一アミノ酸除去培地(基礎培地からGly, Ala, Ser, Thr, Val, Ile, Leu, Lys, Arg, His, Phe, Tyr, Trp, Met, Cys, Pro, Gln, Glu, Asn, Aspをそれぞれ除いた培地)による培養を行った(図1)。分化誘導方法は本検証のために開発した分化誘導方法を利用した(Nakashima et al., *Genes Cells*, 2015)。培養48時間後の細胞を回収し、免疫細胞化学的解析を行うことでNgn3陽性の内分泌前駆細胞の割合を算出した。さらに8日間培養することで膵臓細胞分化に与える影響を評価した。この場合は、抗Ins抗体を用いることで膵臓細胞数を算出した。

(4) ヒトiPS細胞の内分泌前駆細胞への分化過程において、単一必須アミノ酸除去培地(Trp, Lys, Met, Phe, Thr, Val, Leu, Ile, Hisをそれぞれ除いた培地)。分化誘導方法は(3)と同じ分化誘導方法を利用した(Nakashima et al., *Genes Cells*, 2015)。培養48時間後の細胞を回収し、免疫細胞化学的解析を行うことでNgn3陽性の内分泌前駆細胞の割合を算出した。さらに14日間培養することで膵臓細胞分化に与える影響を評価した。抗Ins抗体を用いることで膵臓細胞数を算出し、インスリンの基礎分泌についてはC-peptide ELISAで評価した。また、効果のあったアミノ酸についてはPCRアレイ(PrimerArray® Diabetes mellitus, Type I & Type II, Takara)を用いて、変化がある遺伝子を抽出した。得られた発現プロファイルは解析ソフトJMPを用いて主成分解析を行った。

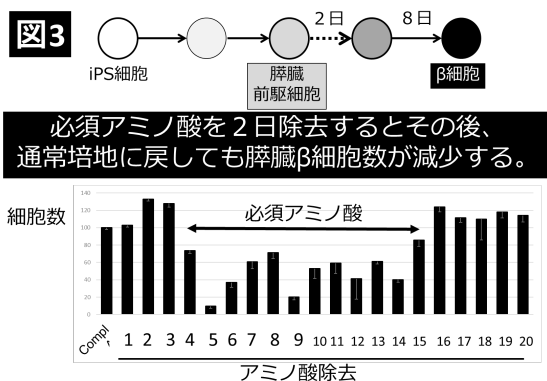
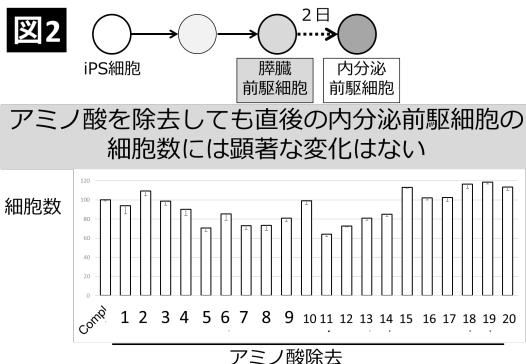
### 4. 研究成果

(1) アミノ酸除去による栄養負荷が未分化ヒト多能性幹細胞に与える影響を評価した。ヒト幹細胞の未分化維持および分化には生体内メチル化反応の基質であるSアデノシルメチオニン(SAM)が重要な役割を担っていることを世界で初めて明らかにした(白木ら, *Cell Metab.*, 2014)。

(2) 2つの分化誘導系を開発した。まずは、動物成分不含培地を用いてヒトiPS細胞膵臓分化誘導系を世界で初めて開発した

(Shahjalal et al., *J. Mol. Cell, Biol.*, 2014)。さらに、評価をより簡便かつ低コストで行うために利用する液性因子を低分子化合物へ置き換えた新たな分化誘導系を構築した(Nakahima et al., *Genes Cells*, 2015)。

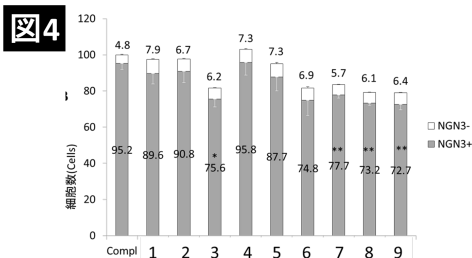
(3) 生活習慣病胎児期発症説 (Barker 説) の検証に関して、まずはげっ歯類を用いた研究で胎仔期の低栄養による出生後の膵臓細胞数減少が報告されていることに着目し、膵臓分化誘導系を用いて前駆細胞分化過程における低栄養負荷が分化に与える影響を評価した(図1)。膵臓は内胚葉、膵臓前駆細胞、内分泌前駆細胞を経て膵臓細胞への分化するため、膵臓前駆細胞から内分泌前駆細胞への分化過程において、20種の単一アミノ酸除去培地を用いて低栄養負荷を行った。処理直後の内分泌前駆細胞数および通常培地に変更し更に8日間分化誘導した後の膵臓細胞数を定量した。その結果、処理直後の内分泌前駆細胞数について、各種アミノ酸除去はコントロール群と比較して顕著な変化が認められなかったが(図2)、その後の膵臓細胞数に関しては必須アミノ酸除去群では顕著な細胞数の減少が認められた(図3)。



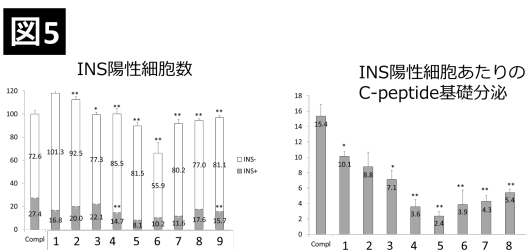
この結果は、膵臓では前駆細胞分化過程における必須アミノ酸摂取がその後の細胞分化に非常に重要な役割を果たすことを示唆した。また、この検討の結果は既報の動物実験結果とも合致し、栄養環境リスク評価におけるiPS細胞分化系の有用性を確認できた。

(4)(3)の結果から、内分泌前駆細胞過程における必須アミノ酸の重要性が分かっ

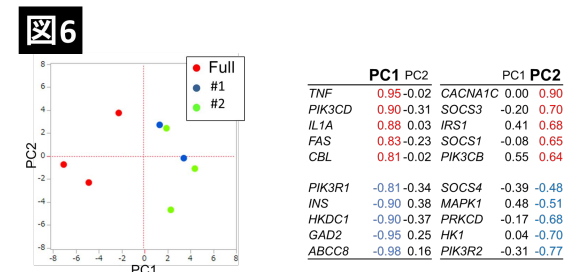
たことから次に、必須アミノ酸に絞って細胞の機能に与える影響を評価した。検討の結果、本検討でも Ngn3 陽性細胞数には顕著な変化は見られなかった(図4)。



一方、最終分化時の膵臓細胞数は顕著に変化し、ある種の必須アミノ酸では内分泌前駆細胞期間のみの処理にも関わらず、最終分化した膵臓細胞数は顕著に低下した。さらにインスリン陽性細胞あたりの分泌量を定量したところ、単位細胞あたりのインスリン分泌能力が著しく低下しているものがあった(図5 各アミノ酸除去は番号で示している)



除去により膵臓細胞数およびインスリン分泌能力低下に関与が認められたアミノ酸については、その機序を明らかにするために当該アミノ酸除去で得られた膵臓細胞とコントロールにおける糖尿病関連遺伝子の発現を評価した。検討の結果、アミノ酸1および2を除去した群では炎症関連遺伝子の発現が上昇していることが分かり、内分泌前駆細胞分化における低栄養負荷の影響で最終分化時の細胞において遺伝子発現が変化することが示唆された。



今回の(1)から(4)における検討により、ヒトiPS細胞分化系で生活習慣病胎児期発症説の検証に利用可能であり、膵臓分化系を用いた解析から分化中期において重要な役割を示すアミノ酸の同定に成功した。現在は、詳細なメカニズムについて検討を行っている。

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 17 件)

- 1: Kaitsuka T, Kobayashi K, Otsuka W, Kubo T, Hakim F, Wei FY, Shiraki N, Kume S, Tomizawa K. Erythropoietin facilitates definitive endodermal differentiation of mouse embryonic stem cells via activation of ERK signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2017 May 1;312(5):C573-C582. doi: 10.1152/ajpcell.00071.2016. (査読有)
- 2: Koga T, Shiraki N, Yano S, Suico MA, Morino-Koga S, Sato T, Shuto T, Kume S, Kai H. Mild electrical stimulation with heat shock guides differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing cells within the definitive endoderm. *BMC Biotechnol.* 2017 Feb 15;17(1):14. doi: 10.1186/s12896-017-0331-z. (査読有)
- 3: Sakano D, Choi S, Kataoka M, Shiraki N, Uesugi M, Kume K, Kume S. Dopamine D2 Receptor-Mediated Regulation of Pancreatic Cell Mass. *Stem Cell Reports.* 2016 Jul 12;7(1):95-109. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.05.015. (査読有)
- 4: Ogaki S, Omori H, Morooka M, Shiraki N, Ishida S, Kume S. Late stage definitive endodermal differentiation can be defined by Daf1 expression. *BMC Dev Biol.* 2016 May 31;16(1):19. doi: 10.1186/s12861-016-0120-2. (査読有)
- 5: Nakashima R, Morooka M, Shiraki N, Sakano D, Ogaki S, Kume K, Kume S. Neural cells play an inhibitory role in pancreatic differentiation of pluripotent stem cells. *Genes Cells.* 2015 Dec;20(12):1028-45. doi: 10.1111/gtc.12308. (査読有)
- 6: Tsuyama T, Shiraki N, Kume S. Definitive Endoderm Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Combined with Selective Elimination of Undifferentiated Cells by Methionine Deprivation. *Methods Mol Biol.* 2016;1307:205-12. doi:10.1007/7651\_2015\_224. (査読無し)
- 7: Umeda K, Shiraki N, Kume S. Hepatic Differentiation from Human Ips Cells Using M15 Cells. *Methods Mol Biol.* 2016;1357:375-81. doi: 10.1007/7651\_2014\_146. (査読無し)
- 8: Yamazoe T, Shiraki N, Kume S. Hepatic Differentiation from Murine and Human iPS Cells Using Nanofiber Scaffolds. *Methods Mol Biol.* 2016;1357:475-83. doi: 10.1007/7651\_2014\_138. (査読無し)
- 9: Shiraki N, Ogaki S, Kume S. Profiling of embryonic stem cell differentiation. *Rev Diabet Stud.* 2014 Spring;11(1):102-14. doi: 10.1900/RDS.2014.11.102. (査読無し)
- 10: Shahjalal HM, Shiraki N, Sakano D, Kikawa K, Ogaki S, Baba H, Kume K, Kume S. Generation of insulin-producing -like cells from human iPS cells in a defined and completely xeno-free culture system. *J Mol Cell Biol.* 2014 Oct;6(5):394-408. doi: 10.1093/jmcb/mju029. (査読有)
- 11: Shiraki N, Shiraki Y, Tsuyama T, Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H, Kume K, Endo F, Kume S. Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Metab.* 2014 May 6;19(5):780-94. doi:10.1016/j.cmet.2014.03.017. (査読有)
12. 白木伸明、ヒト iPS 細胞膵臓分化系を用いた生活習慣病胎児期起源説の検証、*BioClinica* 2016: 31: 76-78(査読無し)
13. 白木伸明、糸昭苑、アミノ酸代謝によるヒト多能性幹細胞の維持・分化誘導、*Medical Science Digest* 2016: 42: 52-53(査読無し)
14. 白木伸明、糸昭苑、iPS 細胞の内胚葉系への誘導、*日本臨牀* 2015: 73: 107-114(査読無し)
15. 白木伸明、糸昭苑、幹細胞維持と分化におけるメチオニン代謝、*日本臨牀* 2015: 73: 765-772(査読無し)
16. 白木伸明、糸昭苑、ES/iPS 細胞からの膵臓細胞への分化誘導、*糖尿病病学* 2015 (診断と治療社) 2015: 1-9(査読無し)
17. 白木伸明、糸昭苑、糖尿病の再生医学、*医学のあゆみ* 2015: 252: 647-653(査読無し)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 白木伸明、「幹細胞におけるアミノ酸代謝の役割」第 37 回トリプトファン研究会学術集会、2016 年 12 月 11 日(東京農業大学)

2. 白木伸明、「多能性幹細胞におけるメチオニン代謝の役割」第 4 回がん代謝研究会、2016 年 7 月 8 日(かごしま県民交流センター)

3. 門馬紗英子、白木伸明、及川彰、糸昭苑「幹細胞の未分化維持及び分化におけるメチオニン代謝の役割」第 68 回日本細胞生物学会大会、2016 年 6 月 15 日(京都テルサ)

4. 白木伸明、「アミノ酸代謝制御による幹細胞の未分化性維持と分化促進」、JBA “未来へのバイオ技術” 勉強会「幹細胞の創薬利用と産学連携」、2016 年 5 月 25 日(日本橋ライフサイエンスハブ)

5. 白木伸明、門馬紗英子、糸昭苑「幹細胞分化におけるアミノ酸代謝の役割」、第 9 回日本アミノ酸学会学術大会、2015 年 10 月 24 日(滋賀県立大学)

6. 白木伸明、「幹細胞維持と分化におけるメチオニン代謝」、第 8 回 Symphony、2015 年 9 月 26 日(ホテルメトロポリタンエドモント飯田橋)

7. 白木伸明、「ES/iPS 細胞分化制御におけるアミノ酸代謝」、第 96 回日本栄養・食糧学会関東支部大会、2015 年 9 月 5 日(新潟大学農学部)

8. 白木伸明、「ヒト多能性幹細胞におけるメチオニン代謝の役割」、第 18 回アミノ酸セミナー 2014 年 7 月 4 日(東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：インスリン産生細胞の分化誘導方法

発明者：糸昭苑、白木伸明

権利者：国立大学法人 熊本大学

種類：特許

番号：特願 2014-104019

出願年月日：2014 年 5 月 20 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.titech.ac.jp/laboratory/kume-shiraki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白木 伸明 (Shiraki, Nobuaki)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：70448520