

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09625

研究課題名(和文) 糖尿病予測およびiPS細胞移植基盤の確立

研究課題名(英文) Prediction of Diabetes Mellitus by using with iPS cell technology

研究代表者

松本 志郎 (MATSUMOTO, SHIROU)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：70467992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、糖尿病の早期予測法の開発と重症糖尿病への再生医療の基盤の確立、の2つを主たる目的として研究を行った。糖尿病患者由来のiPS細胞から作成した膵細胞はインスリン分泌能・分化のレベル・生存細胞数に違いがあった。また、バイオマーカーとしては、発症早期に特徴的なアミノ酸変化(アラニン、マーカーXの上昇)をきたすことを見出した。エネルギーフラックス検査を行った結果、小児糖尿病群では中心エネルギー代謝系(特にミトコンドリア機能)に異常があることがわかった。iPS細胞から誘導したベータ細胞を糖尿病モデルマウスへ移植し、ミトコンドリア保護薬を用いて治療効果期間を延長する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We tried to establish for prediction of Diabetes Mellitus by using with iPS cell technology and novel therapeutic strategy with stem cells. We could isolated iPS cells originated from healthy control and type 1 Diabetes Mellitus, which were differentiated into beta cells. We could establish the way to purify the insulin producing cells and expansion methods with these iPS cells. We could also establish the method of mass culture suitable to clinical therapy. In addition, we analyzed metabolome investigation in beta cells differentiated from iPS cells and it is indicated that mitochondrial dysfunction may influence type 1 diabetes.

研究分野：内分泌・代謝・再生医療

キーワード：小児糖尿病 iPS細胞 エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

世界の糖尿病患者数は 2013 年現在で糖尿病有病者数は 3 億 8,200 万人 (有病率 8.3%) に上る。有効な対策を施さないと、2035 年までに 5 億 9,200 万に増加すると予測されている (国際糖尿病連合発表、2013 年)。特に、成人発症後の治療では既に潜在性に動脈硬化などの障害が進行していると指摘されており、“糖尿病予備群”もしくは“糖尿病ハイリスク群”のスクリーニングの重要性が指摘されてきている。我々はこれまでに、糖尿病モデルマウスにおける血液中アミノ酸プロファイルを利用し、糖尿病予測が可能であるという報告をした (Mochida et al Mol Genet Metab. 2011, Tanaka et al Springerplus. 2013)。我々の発表と同時期に糖尿病患者においてもアミノ酸プロファイリングが糖尿病予測に有用であることが示された (Wang et al. Nature Medicine 2011)。一方、一旦発症した場合の治療に関しては、糖尿病の大半は運動療法、食事療法、内服加療及びインスリン注射でコントロール可能である。しかし、小児の 1 型糖尿病、2 型糖尿病の末期、膵炎、手術による膵臓摘除などで完全にインスリン分泌能が枯渇した場合、インスリン注射によってもコントロール不良となる患者群が知られている。このような場合、薬剤の適正な使用にも関わらず高血糖と低血糖を繰り返し、自宅などで気づかれずに放置されると高血糖性ケトアシドーシス、低血糖性昏睡を引き起こし死に至る。このような急激な変化を何とか回避したとしても、慢性的な血糖コントロールの悪化は合併症を引き起こす。いずれの糖尿病の場合でも、末期になると心筋梗塞、脳卒中、腎不全、網膜症、末梢神経障害が起こり、腎不全も透析開始後の予後が他疾患を原因とするものより不良である。このような患者に対し、膵臓移植・膵島移植が行われてきた。特に、カナダ、エドモントンのアルバータ大学のグループが確立したエドモントンプロトコールによる膵島移植法は従来の方法に比べて著しい移植後の血糖コントロールの改善を示した (下図 C)。具体的には、複数(2 人から 3 人)の脳死ドナー(組織提供者)から分離した膵島組織を短期間に、ひとりの 1 型糖尿病患者に移植するという膵島移植を 7 人の 1 型糖尿病患者に対して行い、その 7 人全員がインスリン離脱(インスリン注射が不要)となったとの結果が示された(2000 年、New England Journal of Medicine)。この報告が発表されて以降、膵島移植は世界中に普及し、膵・膵島移植研究会を中心として膵島移植が進められてきている。2005 年、2006 年の Diabetes によればエドモントンプロトコールのインスリン離脱率は移植後 1 年では 80%を越えているが 3 年経つとおよそ 24%に減り、5 年経つと約 10%と報告された (図 B)。し

かし、5 年後の血中 c-peptide 陽性率は 80%を維持し、インスリン治療と併用することで血糖コントロールに大きく貢献していることが示唆された。更に、近年では再生医療技術を併用することでより高い効果を示す改善策などが報告されてきている。特に、日本国内で山中らが開発した iPS 細胞を代表とする再生医療への需要は高まってきている。

2. 研究の目的

本研究は、①増加傾向にある 2 型糖尿病の早期発病予測法の開発、②既に糖尿病になっている患者の中でも重度の症状を呈する重症糖尿病 (1 型糖尿病および 2 型療法を含む) への再生医療を応用した細胞移植治療法の基盤の確立、の 2 つを主たる目的として実施されるものである。特に、①予測法については、当研究室が 10 年以上まえから研究を開始し、国際誌に報告したアミノ酸プロファイルを用いた糖尿病予測式の小児への応用、②治療に関しては、当研究室が 15 年前から研究に携わり、基盤を確立している糖尿病モデル動物への細胞移植治療の応用：特に京都大学で実施されている重症糖尿病に対する膵島移植をベースにした方法を基にした iPS 細胞を用いた細胞移植治療への応用技術の開発を目的とする。

3. 研究の方法

①予測マーカーについては、実際の小児患者におけるプロファイルを行い、さらに既にデータの蓄積されたデータを用いた後ろ向き検討を行った。具体的には、生活習慣病検診陽性患者におけるプロファイルを行った。

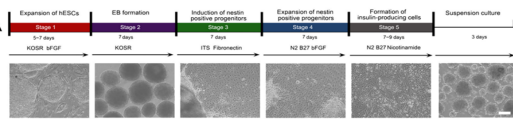
②iPS 細胞を用いた β 細胞の誘導と誘導 β 細胞を用いた細胞移植治療の現実的な方法の開発を行った。iPS 細胞は現在までに報告されている方法に加えて、我々が新規に開発したデバイスおよび誘導手法を用いて効率的誘導基盤の開発を行った。更に、既に体制幹細胞を用いて我々が確立した細胞移植評価系を用いて、iPS 細胞を用いた細胞移植治療の効果・副作用を検討し、実現可能で臨床に受け入れられる方法について、具体的に検討を行った。

[膵 β 前駆細胞、 β 細胞への誘導]

β 細胞への誘導は、既報に加えて、我々が独自に開発した方法で行う。具体的には、維持培養中の iPS 細胞を用い、未分化マーカーおよび分化マーカーについて PCR 法ならびに免疫蛍光染色法を用いて精査を行い、未分化細胞であることを 4 週間ごとに繰り返す。この未分化が証明された iPS 細胞に対し、以下の方法で分化誘導を行う。まず、維持培養の細胞を iPS 細胞剥離液 (リプロセル社製) を用いて剥離する。剥離した細胞は、遠心回収し、iPS 細胞維持培地から bFGF を除去した培地に懸濁し、低接着プレート (Corning 社製) へ播種し、7 日間培養する。培地交換は

連日とする。その後、培養液に1%ITS-x(Invitrogen社製)および5μg/mlのFibronectinを添加し、さらに7日間培養を行う。培地交換は連日とする。増殖細胞は、0.5%Trypsin-EDTA(Invitrogen社製)を用いて剥離し、1%N2(Invitrogen社製)、2%B27(Invitrogen社製)、10ng/mlbFGFを添加したDF12培地で懸濁後、gelatin培養皿(GIBCO社製)で7日間培養する。その後、培養液に10mMnicotinamide(Sigma社製)およびBetacellulin(Sigma社製)を添加し、7日間培養する。増殖細胞は、0.5%Trypsin-EDTA(Invitrogen社製)を用いて剥離し、低接着プレート(Corning社製)へ播種し、ベータ細胞スフェアとして解析に用いた(下図1)

図1：分化誘導方法概略



【インスリン分泌細胞の純化】

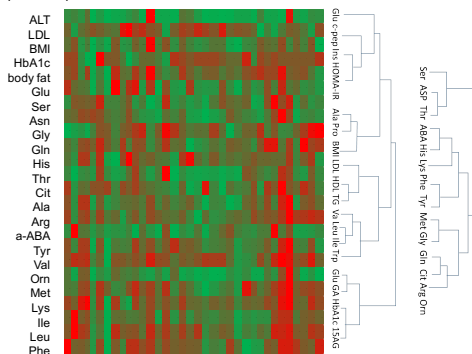
インスリン産生細胞を96well plateに1cell/wellの割合で播種し、培養する。培養には我々が開発した分化誘導特殊培地を用いる(現時点で内容は明らかにできない)。2-3週間培養した細胞に対しヒトc-peptide ELISA KIT(和光純薬)、ヒトインスリンELISA kit(MercoDia)を用いてインスリン分泌能を測定する。インスリン(c-peptide)分泌量が多いwellの細胞のみ培養を続け、更に60mm dishに増殖したところで分泌試験を行う。これにより最もインスリン分泌能の高い細胞集団が得られることとなる。

4. 研究成果

①糖尿病予測マーカー

糖尿病予測マーカーについては、すでに我々が糖尿病マウスで明らかにした因子を基礎として、実際の臨床で使用可能かどうかについて検証を行った。具体的には熊本市で実施されている10歳児生活習慣病検診の患者データをレトロスペクティブに観察研究を行い検証した。その結果、バリン>チロシン>アラニン>リジン>ロイシン>グルタミン酸といったアミノ酸とインスリン分泌能との相関が高く、また、耐糖能とグルタミン

図2. Cluster analysis of plasma amino acid and other clinical variables in obesity pediatric patients



酸>アラニン>プロリンとの相関が高いことが示された(図2)。これらのことは、2型糖尿病(耐糖能障害)だけではなく、1型糖尿病(インスリン分泌能の低下)についても生体内の状況を予測できる可能性を示唆した。

②ベータ細胞移植の現実応用を目指した方法の開発

【大量培養系の開発】従来の培養方法では、移植に十分な細胞を得るためには大量の培養が必要で時間がかかるため現実的には大量培養法の開発が必要不可欠である。そのため、これまで報告されている方法を検討し、その結果、スピナーフラスコによる培養により大量の細胞が短期間で得られることがわかった(表1)。

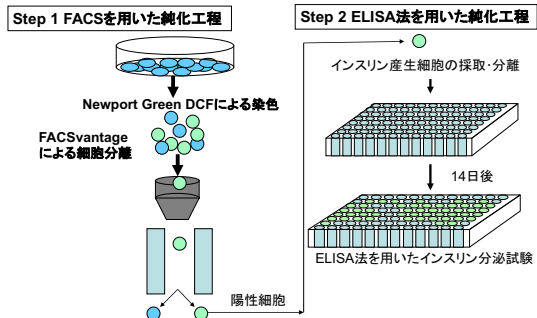
表1 移植ドナー細胞の大量培養法の確立

	立		浮遊培養	ゲル培養
	平板培養	スピナーフラスコ		
培養効率	5x10 ⁶ cell/10cm dish	1x10 ⁸ cell/10cm dish	5x10 ⁸ cell/10cm dish	5x10 ⁷ cell/10cm dish
増殖率	++++	+++	+	+
死細胞(トリパンブルー染色)	-	+	+	+
分化細胞	<5%	30%-50%	25%-50%	60-80%



【インスリン分泌細胞の純化方法の開発】我々は、インスリンを高い精度で分泌できる細胞のみを純化し、これを移植に用いるシステムを開発してきた。今回、このシステムがヒトiPS細胞由来ベータ細胞にも応用可能かについて検証した。その結果、本方法はベータ細胞の純化に有効出ることがわかった。

インスリン産生細胞の細胞純化



インスリン産生細胞をnewport greenで染色し、陽性分画をフローサイトメトリー法で分離した。得られた細胞を96well U-plateでsingle cell cloningをおこなった。インスリン分泌試験を行い、インスリン分泌能が高いウェルを選別した。

【1型糖尿病患者由来ベータ細胞の病因解

析】1型糖尿病患者のiPS細胞からベータ細胞を文化誘導し、これをメタボローム解析した。その結果、1型糖尿病患者から誘導したベータ細胞は、正常ベータ細胞に比較して、中心エネルギー代謝における異常が認められた（非公開）。

（研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計11件）

5. 主な発表論文等

（研究代表者 11件）

1. Kido J, Inoue H, Suzuki Y, Tanaka M, Mitsubuchi H, Nakamura K, Endo F, Matsumoto S. * A significant difference in the blood carnitine values obtained by the enzymatic cycling and andem mass spectrometry methods. Clin Lab. 2018 Jan 1;64(1):211-215.
2. Yoshida S, Kido J, Matsumoto S, Momosaki K, Mitsubuchi H, Shimazu T, Sugawara K, Endo F, Nakamura K. * Prenatal diagnosis of Gaucher disease using next-generation sequencing. Pediatr Int. 2016 Sep;58(9):946-9.
3. Sakamoto R, Nakamura K, Kido J, Matsumoto S, Mitsubuchi H, Inomata Y, Endo F. * Improvement in the prognosis and development of patients with methylmalonic acidemia after living donor liver transplant. Pediatr Transplant. 2016 Dec;20(8):1081-1086.
4. Mori H, Momosaki K, Kido J, Naramura T, Tanaka K, Matsumoto S, Nakamura K, Mitsubuchi H, Endo F, Iwai M. * Amelioration by glycine of brain damage in neonatal rat brain following hypoxia-ischemia. Pediatr Int. 2017 Mar;59(3):321-327.
5. Tanaka K, Nakamura K, Matsumoto S, Kido J, Mitsubuchi H, Ohura T, Endo F.

* Citrulline for urea cycle disorders in Japan. Pediatr Int. 2017 Apr;59(4):422-426.

6. Kido J, Matsumoto S, Momosaki K, Sakamoto R, Mitsubuchi H, Inomata Y, Endo F, Nakamura K. * Plasma exchange and chelator therapy rescues acute liver failure in Wilson disease without liver transplantation. Hepatol Res. 2017 Mar;47(4):359-363.
7. Nakamura K, Kido J, Matsumoto S, Mitsubuchi H, Endo F. * Clinical manifestations and growth of patients with urea cycle disorders in Japan. J Hum Genet. 2016 Jul;61(7):613-6.
8. Kölker S*, Matsumoto S, Cazorla AG. (省略53名、39番目) The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 2: the evolving clinical phenotype. J Inherit Metab Dis. 2015 Nov;38(6):1157-8.
9. Kölker S*, Matsumoto S, Burgard P. (省略53名、39番目) The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 1: the initial presentation. J Inherit Metab Dis. 2015 Nov;38(6):1155-6. 査読あり
10. Kölker S*, Matsumoto S, Garcia-Cazorla A. (省略53名、39番目) The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 2: the evolving clinical phenotype. J Inherit Metab Dis. 2015 Nov;38(6):1059-74.
11. Kölker S*, Matsumoto S, Burgard P. (省略53名、39番目) The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea

cycle disorders. Part 1: the initial presentation. J Inherit Metab Dis. 2015 Nov;38(6):1041-57.

〔学会発表〕（計 4 件）

1. Shirou Matsumoto, Tadahiro Numakawa, Takumi Era. Drug development and in vitro modeling of Methylmalonic Acidemia (MMA) using patient specific induced pluripotinet stem cells. The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan(招待講演)(国際学会) 2016/11/30 パシフィコ横浜

2. Shirou Matsumoto, Jun Kido, Endo Fumio, Kimitoshi nakamrua. MATI/III deficiency with demyelination of central tegmental tract during neonatal period. The 12th Asia-Pacific Conference of Human Genetics.(国際学会) in the Royal Orchid Sheraton Hotel and Towers, Bangkok, Friday, November 10, 2017

3. 鈴木 陽輔、城戸 淳、黒澤 茶々、水洗 添 泉、坂本 理恵子、中村 公 俊、松本 志郎、遠藤 文夫小児生活習慣病患者における血中アミノ酸プロファイル 日本アミノ酸学会第11回学術大会(JSAAS2017) 2017/9/30 京都府立大学稲盛記念会館

4. Shirou Matsumoto, Jun Kido, Hiroshi Mitsubuchi, Fumio Endo and Kimitoshi Nakamura. Perinatal diagnosis and amino acid profiles of a large family with ornithine transcarbamylase deficiency. the International Conference on Ureagenesis Defects(招待講演)(国際学会) Hotel Saratz Via da la Staziun 2, 504 Pontresina / St. Moritz / Switzerland March 19 – 21, 2018.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0）

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本志郎 (MATSUMOTO SHIROU)
熊本大学・大学院生命科学研究部
小児科学分野・准教授
研究者番号：70467992

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中村公俊 (NAKAMURA KIMITOSHI)
熊本大学・大学院生命科学研究部
小児科学分野・教授
研究者番号：30336234

城戸淳 (KIDO JUN)

熊本大学・医学部附属病院
小児科学分野・特任助教
研究者番号 70721215

(4) 研究協力者

なし