

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02861

研究課題名(和文)試験管内分化誘導に基づく膵細胞の機能維持と恒常性維持の分子機序解明

研究課題名(英文)The mechanism for the maintenance of pancreatic beta cells derived by in vitro differentiation of human pluripotent stem cells

研究代表者

桑 昭苑 (Kume, Shoen)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：70347011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓細胞の恒常性維持の分子基盤の解明を目指し、膵臓細胞特異的なVMAT2遺伝子変異マウスの解析を進めた。変異マウスでは、細胞内ドパミンが減少し、糖応答性インスリン分泌が上昇した。高脂肪食を給餌した条件では、細胞の脱分化、細胞死や耐糖能の悪化が認められた。詳細な解析の結果、糖応答性インスリン分泌とともにドパミンが分泌されるが、VMAT2の欠失細胞では、再取り込みされたドパミンは分泌小胞に格納されずに、細胞内の分解酵素MAOにより分解され、ROSが発生する。高脂肪食条件では、インスリン分泌が亢進し、次第に細胞はROSにより脱分化、そして細胞死が引き起こされるに至ることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VMAT2-ドパミンシグナルは膵臓細胞の分化抑制シグナルとして働くのみならず、細胞の量を制御するシグナルでもあり、糖応答性インスリン分泌を負に制御するシグナルである。一方、VMAT2-ドパミンシグナルを欠くと、糖応答性インスリン分泌が亢進した。高脂肪食給餌条件下では、細胞特異的VMAT2遺伝子変異マウスは、対照の野生型よりも早く耐糖能の改悪を示し、細胞の脱分化、脱落を引き起こした。これらの結果から、膵臓細胞を正常に維持するためには、負に制御するシグナルが重要な役割を果たすことが示された。膵臓細胞の恒常性維持のためには、その機能を適宜に制御することが重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：VMAT2 plays a significant negative regulatory role in the transmission of dopamine. VMAT2KO beta cells (or WT beta-cells treated with VMAT2 inhibitor TBZ) cannot uptake dopamine into vesicles; thus, dopamine is subjected to degradation by MAO, leading to a reduced dopamine content and an increased generation of ROS. The decreased dopamine content leads to a reduction in the dopamine negative feedback loop which, in turn, leads to elevated insulin secretion. Under HFD conditions, where excess nutrient stress exists, insulin secretion occurs frequently, increasing beta-cell exposure to ROS. Long-term exposure to ROS leads to increased vulnerability of VMAT2KO beta-cells and accelerated beta-cell failure. VMAT2KO beta-cells show an initial compensation via beta-cell growth and increased beta-cell mass followed by dedifferentiation and beta-cell death, which is a characteristic of the progression of beta-cell failure.

研究分野：糖代謝・内分泌

キーワード：膵臓細胞 ドパミン VMAT2 インスリン分泌

## 1. 研究開始当初の背景

重篤な糖尿病の治療には、移植医療が行われているが、移植細胞源の不足を解決する方法の一つとして、iPS細胞を用いた再生医療が期待されている。申請者らは長年、ヒトiPS細胞を用いた膵β細胞の作製方法についての技術開発を行ってきた。最近、ヒトiPS細胞から、高い機能を付与した膵臓細胞(ヒトiPS-膵細胞)を試験管内で作成できるようになってきた。一方、ヒトiPS細胞から膵臓細胞を作製するうえでは、膵島の恒常性維持機構の理解が大変重要である。本研究では、ES/iPS細胞から成熟な膵島を分化誘導する際に関与する遺伝子に注目し、その作用を解析することにより、膵島の機能向上、恒常性維持機構を理解することを目指す。

## 2. 研究の目的

膵島の内分泌β細胞は血糖値の恒常性維持において重要な役割を担っている。糖負荷など長期のストレス条件下において、膵臓β細胞量や分泌量の増加で血糖値の恒常性を維持しようとする。近年、ストレスが長期間続くとやがてβ細胞の疲弊を引き起こし、β細胞の脱分化、脱落などの病態に陥ることが2型糖尿病の発症の一つの原因と考えられるようになってきた。本研究では、膵臓細胞の機能維持、恒常性維持の分子基盤を明らかにすることを目指す。そのために、膵臓細胞における発現が見られる分子に着目し、その膵臓細胞の恒常性維持における役割を調べることとした。

## 3. 研究の方法

マウスおよびヒトES/iPS細胞の分化促進化合物のスクリーニングにおいて、小胞型モノアミントランスポーター2(VMAT2)の阻害剤により、膵臓細胞への分化が促進されることを見出した(Sakano et al, Nat. Chem Biology 2014)。一方、膵臓β細胞の増殖促進化合物についてのスクリーニングにおいては、ドパミン受容体Drd2のアンタゴニストであるDomperidoneがプライマリー膵臓細胞の培養系において膵臓細胞量を増やし、脱分化を抑制することが分かった(Sakano et al, Stem Cell Reports 2016)。また、申請者らのヒトiPS細胞の分化誘導系においても、VMAT2-ドパミンシグナルは分化に対して時期特異的に促進する効果を示した(未発表データ)。これらのことから、VMAT2-ドパミンシグナルは膵臓細胞の分化と機能維持において重要な役割を担っていることが考えられた。本研究では、細胞の機能維持因子の一つとして、VMAT2-ドパミンシグナルの役割について理解することを目指した。

マウス膵細胞株であるMin6細胞株における、ドパミン合成酵素の強制発現(Gain of function)およびドパミン合成に対する阻害剤添加(loss of function)による影響、また、ドパミンを細胞内小胞に輸送するトランスポーター(VMAT2)の阻害剤による影響、など様々な解析を行った。また、膵臓細胞特異的なVMAT2変異マウスを作成し、その解析を行った。特にドパミンの作用にフォーカスして、膵島における作用機序について詳細に検討した。

#### 4 . 研究成果

ドパミンを貯蔵小胞に取り込むトランスポーター-VMAT2 (VMAT2<sup>loxP/loxP</sup>) を膵 細胞特異的変異のドライバー (RIP-Cre) マウスと掛け合わせて、 細胞特異的な VMAT2 変異マウスを作成し、それを用いて解析を行った。変異マウスにおいて、若年期ではインスリン分泌の増強が見られたが、加齢により 細胞の脱落がみられた。詳細に解析した結果、VMAT2 遺伝子の欠損により、細胞内ドパミンが減少し、糖応答性インスリン分泌が上昇した。高脂肪食を給餌したマウスにおいて、耐糖能の悪化が遺伝子変異マウスで認められた。 細胞に過度な栄養負荷を加えることにより、糖応答性インスリン分泌を過剰に引き起こした結果、 細胞の脱分化、最終的には 細胞死を引き起こすことが分かった。糖応答性インスリン分泌とともにドパミンが分泌されるが、ドパミンは細胞膜上に存在するドパミントランスポーターにより 細胞内に再取り込みされる。しかし、VMAT2 を欠失すると、細胞質内に取り込まれたドパミンは分泌小胞に格納されずに、細胞内の分解酵素 MAO により分解され、ROS が発生する。インスリン分泌が過剰に起きる高脂肪食条件では、次第に 細胞は ROS により脱分化、そして 細胞死が引き起こされることに至った、ということが分かった。

このように、ドパミンシグナルは 細胞の分泌能に対して抑制的に働く、Vmat2 はドパミンの毒性から 細胞を守る働きを有することが明らかになった。Vmat2-ドパミンシグナルは膵臓 細胞の機能維持において、重要な役割を果たしている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sakano D, Uefune F, Tokuma H, Sonoda Y, Matsuura K, Takeda N, Nakagata N, Kume K, Shiraki N, Kume S.	4. 巻 69
2. 論文標題 VMAT2 safeguards beta-cells against dopamine cytotoxicity under high-fat diet induced stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db20-0207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakano D, Inoue A, Enomoto T, Imasaka M, Okada S, Yokota M, Koike M, Araki K, Kume S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Insulin2 Q104del (Kuma) mutant mice develop diabetes with dominant inheritance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68987-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida S, Hirota M, Kawachi T, Kume S, Takahashi K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation of intestinal organoids derived from human pluripotent stem cells for drug testing.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63151-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taki K, Takagi H, Hirose T, Sun R., Yaginuma H, Mizoguchi A, Kobayashi T, Sugiyama M, Tsunekawa T, Onoue T, Hagiwara D, Ito Y, Iwama S, Suga H, Banno R, Sakano D, Kume S, Arima H,	4. 巻 16
2. 論文標題 Dietary sodium chloride attenuates increased $\beta$ -cell mass to cause glucose intolerance in mice under a high-fat diet.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plos One	6. 最初と最後の頁 e0248065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/ journal.pone.0248065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sim Z.E, Shiraki N, Kume S	4. 巻 41
2. 論文標題 Recent progress in pancreatic islet cell therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-020-00152-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida S, Honjo T, Iino K, Ishibe R, Leo S, Shimada T, Watanabe T, Ishikawa M, Maeda K, Kusahara H, Shiraki N, Kume S.	4. 巻 16
2. 論文標題 Generation of human induced pluripotent stem cell-derived functional enterocyte-like cells for pharmacokinetic studies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 295-308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.12.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida S, Hirota M, Kawachi T, Kume S, Takahashi K	4. 巻 10
2. 論文標題 Yoshida S, Hirota M, Kawachi T, Kume S, Takahashi K. Generation of intestinal organoids derived from human pluripotent stem cells for drug testing.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Reports	6. 最初と最後の頁 5989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63151-z. 2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shiraki S, Kume S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Detailed analysis at a single-cell level of cells undergoing pancreatic differentiation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 20-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakai S, Shibata I, Shitamichi T, Yamaguchi H, Takagi N, Inoue T, Nakagawa T, Kiyokawa J, Wakabayashi S, Miyoshi T, Higashi E, Ishida S, Shiraki N, Kume S	4. 巻 8
2. 論文標題 Collagen vitrigel promotes hepatocytic differentiation of induced pluripotent stem cells into functional hepatocyte-like cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 42192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.042192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaitsuka T, Kojima R, Kawabe M, Noguchi H, Shiraki N, Kume S and Tomizawa K	4. 巻 14
2. 論文標題 A Culture Substratum with Net-like Polyamide Fibers Promotes the Differentiation of Mouse and Human Pluripotent Stem Cells to Insulin-Producing Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 45019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1748-605X/ab261c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto K, Cnop M, Mori D, Kume S, Anazawa T, Doi M, Chikazawa K, Matsumaru N.	4. 巻 53
2. 論文標題 Future perspectives for the treatment of diabetes: importance of a regulatory framework.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Therapeutic Innovation & Regulatory Science,	6. 最初と最後の頁 535-541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2168479018795854.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuura K, Ito K, Shiraki N, Kume S, Hagiwara N, Shimizu T.	4. 巻 24
2. 論文標題 iPS cell elimination in a cell sheet by methionine-free and 42 °C condition for tumor prevention.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tissue Eng Part C Methods.	6. 最初と最後の頁 605-615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.TEC.2018.0228.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liu KC, Leuckx G, Sakano D, Seymour PA, Mattssona CL, Rautioa L, Verdonck Yannick, Serup P, Kume S, Heimberg H, Andersson O	4. 巻 67
2. 論文標題 Inhibition of Cdk5 Promotes $\beta$ -cell differentiation from ductal progenitors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 58-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db16-1587	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 桑 昭苑
2. 発表標題 メチオニン代謝による多能性幹細胞の分化制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Marie Ono, Daisuke Sakano, Yuki Toyoda, Sai Araki, Shoen Kume
2. 発表標題 Improvement of pancreatic $\beta$ cells differentiation from human iPS cells, especially for maturation and expansion
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shoen Kume
2. 発表標題 Present status for the generation of pluripotent stem cell-derived pancreatic beta cells for the treatment of diabetes
3. 学会等名 The Diabetes and Obesity in the region (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Erinn Zixuan Sim, Nobuaki Shiraki, ShoenKume
2. 発表標題 Insulin supplement is essential in differentiating human induced pluripotent stem cells into pancreatic beta cells
3. 学会等名 ISSCR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 糸 昭苑
2. 発表標題 多能性幹細胞から膵臓 細胞への分化誘導研究
3. 学会等名 糖尿病と再生医療フォーラム in Nagoya (招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 糸 昭苑
2. 発表標題 多能性幹細胞を用いた膵臓 細胞の再生研究
3. 学会等名 第53回糖尿病学の進歩 (招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 柴田伊真, 下道隆広, 渡邊輝彦, 山口宏之, 白木伸明, 糸昭苑
2. 発表標題 メチオニン除去培地とコラーゲンビトリゲル薄膜を用いて分化誘導したヒトiPS細胞由来肝臓細胞を利用した薬物毒性試験系の構築
3. 学会等名 細胞アッセイ研究会
4. 発表年 2018年～2019年



1. 発表者名 桑 昭苑
2. 発表標題 多能性幹細胞の未分化性維持と分化制御の分子基盤
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Airi Inoue, Daisuke Sakano, Takayuki Enomoto, Mai Imasaka, Seiji Okada, Kimi Araki, Shoen Kume
2. 発表標題 Insulin2タンパクへのQ104del変異導入による自然発症1型糖尿病モデルマウスの作製
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 日比滉大, 秋山智彦, 洪実, 白木伸明, 桑昭苑
2. 発表標題 メチオニン除去培養によるヒトiPS細胞分化促進の機序解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Erinn Sim Zixuan, Nobuaki Shiraki, Shoen Kume
2. 発表標題 Insulin supplement is essential in differentiating human induced pluripotent stem cells into pancreatic beta cells.
3. 学会等名 The 16th Asia-Oceania Congress of Endocrinology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Shoen Kume
2. 発表標題 Generation of pancreatic beta cells from human iPS cells
3. 学会等名 The 16th Asia-Oceania Congress of Endocrinology 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Sakano D, Inoue A, Enomoto T, Imasaka M, Okada S, Araki K, Kume S
2. 発表標題 Insulin2 Q104del (Kuma) mutant mice develop diabetes with dominant inheritance
3. 学会等名 Joint Meeting of JSCB 70th & JSDB 51st (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 桑 昭苑
2. 発表標題 ヒトiPS細胞から膵臓 細胞への分化誘導の技術開発
3. 学会等名 日本糖尿病学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 桑 昭苑
2. 発表標題 代謝による多能性幹細胞の分化制御
3. 学会等名 第6回がん代謝研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 桑 昭苑
2. 発表標題 多能性幹細胞から膵 細胞への分化制御
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会（招待講演）
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 糖尿病モデル動物	発明者 桑昭苑、坂野大介、 榎本孝幸、荒木喜 美、岡田誠治	権利者 東京工業大学、 熊本大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-076855	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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