

令和 4 年 12 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19591

研究課題名(和文)経口投与による1型糖尿病の根治法の開発と消化管上皮の細胞運命変換の機序解明

研究課題名(英文)Development of oral therapy towards type 1 diabetes and molecular mechanism of cell fate conversion in gut epithelium

研究代表者

松本 征仁(Matsumoto, Masahito)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：90321819

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文): 糖尿病の再生医療では、iPS/ES細胞由来のヒト膵細胞(2014 Cell, Nat.Biotech)やブタ膵島の異種細胞を用いた1型糖尿病(T1D)の臨床研究(2016 EBioMed)が進行しているが、癌化リスクと免疫拒絶の回避・コスト高の課題が残されている。本研究は従来の遺伝子・細胞補充療法とは異なる、消化管上皮細胞など生体組織内の体細胞を直接変換させてT1Dの根治に繋がる基盤技術の開発を目的とする。直接変換因子を導入した結果、肝組織や腸管上皮細胞においてインスリン産生細胞を誘導した。従って、本技術は簡便かつ安全で患者負担を抑えることが可能な新規治療法の開発に繋がると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、従来のタンパク・遺伝子補充療法とは異なり、生体内で機能性インスリン産生細胞を作出することを可能にするため、次世代型「細胞運命変換」療法、即ち生体リプログラミングによる治療・創薬を提唱するものである。従って、インスリンの連日投与と血糖管理の負担や膵島移植によるドナー不足や免疫応答による拒絶反応が起こる等、今日の1型糖尿病の治療法が抱える課題を克服する可能性が期待される。更に試験管内で作製した膵細胞を用いた細胞治療(アロ移植・異種細胞移植・自家移植)で抱える安全性・コスト高・免疫拒絶の問題を改善することが期待されるため、post cell therapyの創薬開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文): Clinical trials toward type 1 diabetes are in the process of developing human pancreatic beta cells from iPS/ES cells (2014 Cell, Nat.Biotech) and porcine islets (2016 EBioMed) capsulated by devices. It remains, however, there are the risk of carcinogenesis, avoiding graft rejection and higher cost. The purpose of this study is to develop a novel technology of in vivo direct conversion of somatic cells in digestive tissues instead of on-going gene or cell therapies. As a result of the introduction of reprogramming factors we have identified in Ins-DsRed2 mice expressing DsRed2 under the control of insulin promoter, we found that functional DsRed2-positive insulin-producing cells gave rise to liver and gut epithelial cell in mice by direct conversion. Therefore, it is thought that our technology might be possible to cure T1D patients invasively as easier and safer advantages.

研究分野：再生医学

キーワード：分化転換 糖尿病 再生医学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病(T1D)は、膵細胞が特異的に障害を受けてインスリン分泌不全を発症する成因不明の自己免疫疾患である。殆ど全ての T1D 患者は、生涯にわたりインスリン補充療法が必要となるため患者家族の血糖管理の負担が大きい上に、過剰インスリン投与が低血糖による昏睡に陥る危険に晒されることが臨床的課題である。また T1D の成因が異なる生活習慣病の 2 型糖尿病(T2D)と混同されるがゆえに、T1D 病態の社会的認知度の低さが依然として患者家族の QOL の改善の意識の高さと共に、新たな根治法の開発が強く求められる理由の 1 つといえる。

膵島移植は、免疫抑制剤との併用が不可欠であるため、ドナー不足と免疫拒絶の課題に加えて、免疫抑制剤が幼小児に適用されないため、13 才未満の糖尿病患者の約 97%が T1D で本来必要とする T1D 患者全てが満足できるような、膵島移植に替わる細胞治療に期待が寄せられている。しかしながら、糖尿病の再生医療では、iPS/ES 細胞由来のヒト膵細胞(2014 Cell, Nat. Biotech)やブタ膵島の異種細胞を用いた 1 型糖尿病(T1D)の臨床試験(2016 EBioMed)が進行しているが、癌化リスクと免疫拒絶の回避・コスト高の改善の課題が残されている。

2. 研究の目的

研究代表者が開発した体細胞を用いたダイレクトリプログラミングによる膵細胞の作製手法は、簡便で再現が容易であり、生産効率に優れ、かつ短期間で製造することができる膵内分泌細胞の製造方法の速やかな提供が強く求められているのが現状である。本研究は従来の遺伝子・細胞補充療法とは異なる、消化管上皮細胞など生体組織内の体細胞を直接変換させて T1D の根治に繋がる基盤技術の開発を目的とする。直接変換因子を導入した結果、肝組織や腸管上皮細胞においてインスリン産生細胞を誘導した。従って、本研究は、細胞治療を主体とする糖尿病の再生医療が抱える問題として挙げられる癌化リスクと免疫拒絶の回避・コスト高の課題を克服できる可能性があることから、本技術は簡便かつ安全で患者負担を軽減し得る新規治療法の開発に繋がると考えられる。

3. 研究の方法

膵内分泌前駆細胞を GFP で蛍光標識した遺伝子改変マウスと、前記膵細胞を DsRed 2 で蛍光標識した遺伝子改変マウスとを交配させた後、産仔マウス(ヘテロ)の雌と雄とを交配し、ゲノミックサザン法によってホモ化された 2 重蛍光標識遺伝子改変マウス(Ngn3-eGFP/Ins-DsRed)を作出した。前記ホモ化された 2 重蛍光標識遺伝子改変マウスの雌と雄とを交配し、胎生期 14.5 日目の胎児を摘出し、洗浄後、DMEM入り 10 cm 細胞培養ディッシュ内にて胎児をハサミで細切した。細切した胎児組織を 1.4 krpm で 4 分間、室温で遠心し、上清を捨て、ペレットに 0.25%トリプシン含有 EDTA 溶液 1 mL を加えて懸濁後、37 °C のウォーターバスでインキュベートした。DMEM入り 10 cm 細胞培養皿へ移して、37 °C、5%CO₂インキュベータで培養し、翌日 10 mL の DMEM を入れ替え、約 4 日間後から 5 日間後、10 cm 培養皿いっぱいが増えた dMEF を 6 mL のリン酸緩衝食塩水で洗浄後、1 mL の 0.25%トリプシン含有 EDTA 溶液を入れ、37 °C、5%CO₂インキュベータ内で 2 分間後、細胞が剥がれたことを確認した後、10 mL の DMEM (10% FBS 含有) を入れよく懸濁し、培養皿 1 枚分の dMEF を新たな 10 cm 培養皿 5 枚に播種し、更に培養した。dMEF がコンフルエントに増殖したことを確認し、6 mL の PBS で洗浄後、1 mL の 0.25%トリプシン/EDTA 溶液を入れ、37 °C、5%CO₂インキュベータ内で 2 分間後、細胞

が剥がれたことを確認した後、6 mLのDMEM(10% FBS含有)を入れ、よく懸濁し、50 mLチューブに入れ、1.4 krpmで4分間、室温で遠心後に上清を捨て、細胞ペレットに10 mLのセルパンカー(タカラバイオ株式会社製、#CB011)を加えて、懸濁後、0.5 mLずつバイアルチューブへ分注し、-145 °Cの超低温フリーザー内にて保管した。

レトロウイルスの作製

長期にわたって高力価のウイルスを産生できるウイルス構造タンパク質gag-pol及びenvをMoMuLV LTRのコントロール下で発現させているPlat-E細胞と、プラスミドDNA(pMXベクター又はpMX-puroベクター)とを用い、以下のようにしてレトロウイルスを作製した(Onishi, M., et al., Exp. Hematol. 24, 324-329, 1996)。

- レトロウイルスの作製 -

PBSで10倍希釈したPoly-L-Lysineで、コート処理(37 °C、5%CO₂で1時間)した6ウェルプレートに、Plat-E細胞を1ウェルあたり 8×10^5 細胞数播種し、一晚培養した。

翌日、前記プラスミドDNA 4 µgを250 µLのOPTI-MEM(ライフテクノロジーズ社製)が入った1.5 mLチューブへ入れ、混和して室温で5分間放置した。一方、250 µLのOPTI-MEM入りの別の1.5 mLチューブへ、リポフェクタミン2000(LP2000)(ライフテクノロジーズ社製)を10 µL入れ、混和して室温5分間放置した。プラスミド/OPTI-MEM溶液と、前記LP2000/OPTI-MEM溶液とをよく混和し、室温で20分間静置した。トランスフェクション後48時間でウイルス粒子を含む培養上清を2.5 mLシリンジ(テルモ株式会社製、SS-02SZ)で回収し、0.45 フィルターでPlat-E細胞を除去し、ウイルス粒子を含む培養上清を2.0 mLチューブへ移した。

導入

dMEFへ前記レトロウイルスを感染させることにより、遺伝子を細胞に導入した。感染は、以下のようにして行った。dMEFを、24ウェルプレートへ、1ウェルあたり 2.5×10^4 細胞数で播種した。dMEFの培養上清を吸引して除去後、下記のウイルス溶液をそれぞれ、24ウェルプレートの1ウェルあたり200 µL加えた。ウイルス溶液添加後、37 °C、5%CO₂インキュベータ内で培養した。培養中は、2日間又は3日間毎に培地交換を行った。導入を行い、培養22日後にDsRed2陽性インスリン産生細胞を蛍光顕微鏡装置で撮影した。

定量PCR解析

培養後のdMEF細胞または肝臓などの組織を摘出後、RNA抽出試薬Trizol, TriagentまたはRNAisoを添加しホモジナイズし、total RNA抽出後、cDNA合成し、これを鋳型DNAとして定量PCR解析を行った。GAPDH, HPRTまたはbeta-Actin遺伝子に対するインスリン遺伝子の相対発現量を調べた。細胞を細胞・組織溶解液に懸濁し、SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR(東洋紡株式会社製、#SCQ-101)又はSV96 Total RNA Isolation System(Promega社製、#Z3505) ReverTraAce qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(東洋紡株式会社製、#FSQ-301)にてRNA調製及びcDNA合成を行った後、GeneAce SYBR qPCR Mix(日本ジーン株式会社製)を用いて定量PCRを行った。

4. 研究成果

腸管組織に直接変換を誘導してインスリン産生細胞を誘導するため、細胞治療の抱える課題を克服できることが期待される。従来はレトロウイルスベクターを用いて線維芽細胞などの体細胞から機能的インスリン産生細胞を作製したが(米・日・欧州特許認可 2019年 2020年 2021年)、ヒトおよびマウスの腸管由来のさまざまな体細胞からエピゾーマル系のみならずセンダイウイルスベクターを用いて高効率の直接変換により *in vitro* および *in vivo* でインスリン産生細胞を作り出せることを見出した。これまでに線維芽細胞・肝細胞・神経細胞・血球細胞・腸管細胞などさまざまな体細胞から内在性インスリンを発現誘導することを見出しており、本技術の高い再現性が示された。特筆すべき点として、インスリン産生が起こると赤色蛍光タンパク(DsRed2)を発現する遺伝子改変マウスに代表者が同定したリプログラミング因子を搭載した核酸を導入した結果、生体内の直接変換誘導を行い、肝臓の組織内、および腸管上皮組織内に DsRed2 陽性インスリン産生細胞を検出した。さらに 1 型糖尿病モデルマウスにおいて高血糖の改善が観察された。従って、本研究によって代表者が同定したリプログラミング因子を用いた生体リプログラミングによる T1D 治療における有用性が初めて示され、肝臓や腸管等を標的とする細胞運命変換療法の可能性を実証することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yasuoka Y, Matsumoto M, Yagi K, Okazaki Y	4. 巻 37(1)
2. 論文標題 Evolutionary History of GLIS Genes Illuminates their Roles in Cell Reprogramming and Ciliogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular biology and evolution	6. 最初と最後の頁 100-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/molbev/msz205	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 Fink J, Schoenfeld BJ, Hackney AC, Matsumoto M, Maekawa T, Nakazato K, Horie S.	4. 巻 47(1)
2. 論文標題 Anabolic-androgenic Steroids: Procurement and Administration Practices of Doping Athletes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Physician and sportsmedicine	6. 最初と最後の頁 10-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00913847.2018.1526626	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 Ohki J Sakashita A, Aihara E, Inaba A, Uchiyama H, Matsumoto M, Ninomiya Y, Yamane T, Oishi Y, Iwatsuki K	4. 巻 84
2. 論文標題 Comparative analysis of enteroendocrine cells and their hormones between mouse intestinal organoids and native tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem (in press)	6. 最初と最後の頁 936-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1713043.	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 Tanaka A, Watanabe A, Nakano Y, Matsumoto M, Okazaki Y, Miyajima A	4. 巻 25
2. 論文標題 Reversible Expansion of Pancreatic Islet Progenitors Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes Cells (in press)	6. 最初と最後の頁 302-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12759	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 Tanaka Tomoko, Kojima Daibo, Mera Toshiyuki, Matsumoto Masahito, Yasunami Yohichi, Yanase Toshihiko	4. 巻 4
2. 論文標題 Expansion of transplanted islets in mice by co-transplantation with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e00632 ~ e00632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2018.e00632	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 Nakajima C, Kamimoto K, Miyajima K, Matsumoto M, Okazaki Y, Kobayashi-Hattori K, Shimizu M, Yamane T, Oishi Y, Iwatsuki K.	4. 巻 24(8)
2. 論文標題 A new method for identifying mouse pancreatic ducts.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tissue Eng.	6. 最初と最後の頁 480-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.TEC.2018.0127.	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 Fink J, Matsumoto M, Tamura Y.	4. 巻 138
2. 論文標題 Potential application of testosterone replacement therapy as treatment for obesity and type 2 diabetes in men.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Steroids	6. 最初と最後の頁 161-166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00913847.2018.1526626.	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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 松本征仁
2. 発表標題 試験管の中でどんな細胞でも、インスリンも作れるかもしれない技術の開発
3. 学会等名 日本IDDMネットワークサイエンスフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsumoto M, Itaka K, Okazaki Y.
2. 発表標題 Integrative screening for identification of cell fate driver for beta cells with endocrine progenitor cell line Tec-3p and tracing model of dual-labeled Ngn3-eGFP/Ins-DsRed mice
3. 学会等名 ISSCR international symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 位高啓史、福島雄大、松本征仁
2. 発表標題 mRNA医薬の関節・軟骨疾患治療への応用
3. 学会等名 第6回JCRベーシックリサーチカンファレンス (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本征仁、Deng Jia, 大久保昌彦、水野洋介、佐藤毅、位高啓史
2. 発表標題 Kinesinファミリーによる間葉系幹細胞の分化制御システム
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 蛭原郁弥、長田和也、福島雄大、松本征仁、位高啓史
2. 発表標題 mRNA医薬の骨格筋への投与による末梢神経障害の早期機能回復
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ebihara F, Nagata K, Fukushima Y, Matsumoto M, Itaka K.
2. 発表標題 Muscle-targeted hydrodynamic injection of mRNA medicine for treating peripheral nerve injury
3. 学会等名 19th Symposium for Gene Design and Delivery,
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大木淳子, 稲葉明彦, 田中啓介, 篠澤章久, 吉瀬祐子, 松本征仁, 野村政壽, 山根拓実, 大石祐一, 岩槻健
2. 発表標題 甘味料スクラロースがマウス消化管オルガノイドに与える影響の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大木淳子, 坂下陽彦, 稲葉明彦, 粟飯原永太郎, 内山博允, 松本征仁, 二ノ宮裕三, 山根拓実, 大石祐一, 岩槻健
2. 発表標題 腸管オルガノイドと生体腸組織における内分泌細胞の比較
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fink JE, Hackney A, Matsumoto M, Maekawa M, Horie S.
2. 発表標題 老齡男性における運動性と生体力学的機能 テストステロンとロコモ
3. 学会等名 第44回日本運動療法学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本征仁、Deng Jia, 大久保正彦、佐藤毅、位高啓史
2. 発表標題 Kif11による骨芽細胞の分化制御システム
3. 学会等名 第6回JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村 渉, 安田 和基, 松本 征仁, 岡崎 康司, 野田 泰子
2. 発表標題 成熟膵島で抑制されている遺伝子の解析
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中嶋ちえみ, 神元健児, 美谷島克宏, 松本征仁, 岡崎康司, 山根拓実, 岩槻健, 大石祐一
2. 発表標題 in vivo / in vitro双方からの膵臓再生メカニズムの解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大木淳子, 坂下陽彦, 稲葉明彦, 粟飯原永太郎, 内山博允, 松本征仁, 二ノ宮裕三, 山根拓実, 大石祐一, 岩槻健
2. 発表標題 腸管オルガノイドと生体腸組織における内分泌細胞の比較
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本征仁 岡崎康司
2. 発表標題 細胞分化と直接変換による細胞運命決定のコントロール
3. 学会等名 H30年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本征仁 岡崎康司
2. 発表標題 低血糖に陥らないヒトバイオ人工膵島の革新的作出法と安全性評価
3. 学会等名 AMED橋渡し研究戦略的推進プログラム成果発表会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松本征仁	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (株)NTS	5. 総ページ数 (第10章, p93-108担当(全270ページ))
3. 書名 ダイレクトプログラミングによる膵 細胞作出と1型糖尿病に対する機能再建	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 体細胞の直接分化転換法	発明者 岡崎康司, 松本征仁, 萩原裕子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/042289	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 Pancreatic endocrine cells, Methods for producing same, and transdifferentiation agents.	発明者 Matsumoto M, Okazaki Y, et al.	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、US10214728B2	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

〔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
研究協力者	岡崎 康司 (Okazaki Yasushi)		
研究協力者	安波 洋一 (Yasunami Yoichi)		

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