

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03742

研究課題名(和文) 膵島内の非 細胞から 細胞への分化転換による糖尿病治療の基盤的研究

研究課題名(英文) New strategy for diabetes therapy via intra-islet transdifferentiation

研究代表者

古山 賢一郎 (Furuyama, Kenichiro)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点講師

研究者番号：10868798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまで我々はヒト脳死ドナー膵島を用いてnon- 細胞から 細胞への分化転換を報告し、ヒト臨床応用のproof of conceptを示してきた。本研究が目指すのは、未来型糖尿病治療として分化転換療法を確立することである。我々は、分化転換の改善、および、そのメカニズム解明を目指して、分化転換療法開発の基盤的研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリン分泌 細胞の再生による糖尿病治療を目指した場合、膵島内の隣接するnon- 細胞から 細胞への分化転換(ダイレクトリプログラミング)を誘導する戦略は解剖学的・発生学的さらには機能的見地からも大変有望なアプローチである。つまり、 細胞を膵島内に存在する近隣の他細胞から分化転換誘導するので、作製した細胞を移植する必要が無く、その再生した細胞は元来の膵島内細胞環境で機能を発揮しやすいことから、糖尿病に対する未来型再生治療戦略と言える。

未来の臨床現場では、本研究の分化転換療法を含め、多角的なアプローチを組み合わせることで、個別化された糖尿病治療戦略が患者さんに必要だと考えている。

研究成果の概要(英文)： Previously we have shown that non- -cells from islets of cadaveric donors can convert into insulin producing cells, providing a proof of concept for clinical applications. Our ultimate goal was to develop the transdifferentiation therapy as a future-oriented therapeutic strategy for diabetes. Here we improved the transdifferentiation, quantitatively and qualitatively, and elucidated its underlying mechanisms, enabling us to establish the foundation for future development of transdifferentiation therapy for diabetes.

研究分野：膵島再生

キーワード：ヒト膵島 再生医療 糖尿病 分化転換

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病治療を目指した膵細胞再生戦略には、理論上以下の3つが考えられる。(i) 既存の細胞の増殖、(ii) 組織幹細胞やES、iPS細胞からの分化誘導、さらには(iii) 他の成体細胞からの分化転換 (direct reprogramming) 誘導である。我々は膵障害マウスモデルにて、膵細胞は成体の膵組織幹細胞 (duct 等)からは再生しないことを示し、糖尿病治療の困難さを再確認した(Nat. Genet. 2011)。また、ES、iPS細胞からの分化誘導は魅力的な戦略であるが、*in vitro*で作製後どこに移植するかは懸案事項である。腸管、肝、膵外分泌など膵島外の細胞からの分化転換研究では、誘導効率や機能が十分なものではなかった。我々はこれまで、成体マウスにて細胞死を誘導すると膵島内の、細胞から細胞への分化転換が少数ながらも始まる事を見出し (Nature 2018)、膵島内の細胞に隣接する細胞から分化転換を誘導することが理に適っていると考えた。つまり、膵島非細胞は、1) 発生学上もエピジェネティックにも細胞に近く、2) 糖尿病患者にも豊富に存在し、3) 分化転換後もそのまま細胞の環境ニッチを共有できるため侵襲的な移植などの手技が不要である。

つまり、補充したい細胞の近隣細胞から分化誘導できれば、それが理想であり、より自然な機能的組織を再構成できると考えられる。

これまでマウス膵島内の分化転換は示されてきたが、ヒト膵島では細胞系譜解析が困難なため、それを永らく証明できなかった。研究代表者はヒト脳死ドナー膵島を用いた *in vitro*の新しい実験系を開発し(後述) ヒト膵島細胞に reprogramming 因子 PDX1 と MAFA (PM 因子)を誘導することで機能的なインスリン産生細胞へと分化転換できることを初めて証明した(Nature 2019)。

## 2. 研究の目的

研究代表者は先の研究で、細胞再生による新たな糖尿病治療法として、膵島内の隣接する非細胞を標的とした分化転換誘導戦略がヒトでも可能であるという proof of concept を示した。また我々の共同研究者らは米国での遺伝子治療の臨床試験前段階として、非ヒト霊長類を用いた上部消化管内視鏡的 AAV 投与による *in vivo*分化転換研究を既に着手している。代表者のこれまでの研究により、この分野の臨床応用に大きな弾みがついたが、我々自身が目指すのは、その先にある non-viral approach であり、より安全な低分子化合物を使うことで、臨床応用が促進することを期待している。

本研究では、膵島内分泌細胞間で分化転換を誘導して細胞を再生させる未来型糖尿病治療法開発の基盤的研究として、分化転換のメカニズムの解明を目指した。分化転換現象の理解が深まることで、責任シグナル経路を調節する低分子化合物の同定が可能となるだけでなく、分化転換誘導の改善が質・量の両面にて可能となり、より厚みのある治療戦略を構築できると考えた。

## 3. 研究の方法

### (1) 分化転換の質的改善を目指し、分化転換メカニズムを解析する

遺伝子発現解析による分化転換メカニズムの解明：我々はこれまで細胞から細胞への分化転換現象において RNA-seq 解析および proteomic 解析を網羅的におこない、分化転換に関与する遺伝子群、signalling pathway 候補を抽出してきた。本研究では、それらに加えて NanoString nCounter を用いた miRNA 発現解析によって、分化転換現象において変動する miRNA の profiling を行った。

膵島細胞種の ID の同定：分化転換の研究には、細胞の分化状況を正確に評価することが肝要になるが、これまで膵島各細胞種を特徴づける指標は、各ホルモン(インスリン、グルカゴンなど)や転写因子(PDX1、ARX など)の限られたマーカーの発現状況だけで評価せざるを得なかった。我々はもっと包括的な指標を遺伝子発現 profiling から同定できないか試みた。

### (2) 分化転換の量的改善を目指す

細胞以外の non-細胞から細胞への分化転換：膵島内での分化転換戦略の target となりうる細胞は、細胞の近隣に存在する膵島非細胞である。具体的には、これまで研究してきた細胞のほか、ソマトスタチン産生細胞、膵ポリペプチド(Ppy)産生細胞が存在しているが、分化転換誘導が可能な細胞源となり得るのか？、細胞可塑性を有するのか？、代表者が開発した実験系(Nature 2019)で検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 細胞から 細胞への分化転換に関する miRNA 発現の解析

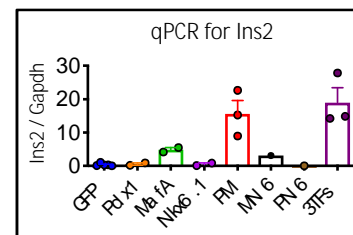
本研究ではこれまで終えた RNA-seq 解析および proteomic 解析に加えて、細胞から 細胞への分化転換に関する miRNA 発現の解析を行い、分化転換過程で変動する miRNA の profiling を行った。ここで同定した分化転換の責任因子候補を強制発現させて、分化転換がどのように制御されるのか今後検討してゆく。

##### (2) 膵島細胞種の ID geneset の同定

細胞の分化転換の解析には、細胞の可塑性や、細胞の cell identity を詳細に検討することが重要となる。我々はヒト脳死ドナー由来の膵島細胞 single-cell RNA-seq data を用いて、膵島各細胞種の ID geneset を同定した(共同研究: van Gurp et al., Nat. Commun 2022)。このツールを用いることで、分化転換した細胞が、どれくらい 細胞に近いのか、あるいは未だ 細胞寄りなのか分化状況を数値化して評価することが可能になった。この ID geneset は、分化転換にとどまらず、発生期の分化状況や多能性幹細胞からの分化誘導法の評価においても、より明確に cell identity が評価可能である。

##### (3) 細胞以外の non- 細胞から 細胞への分化転換

細胞以外の膵島 non- 細胞である 細胞や 細胞は、はたして分化転換戦略に資することができるのか? という問いに、マウスモデルを用いて検討した。成体のソマトスタチン発現レポーターマウスから 細胞を FACS 分取し、インスリン産生細胞へと direct reprogramming 可能なリプログラミング因子の同定実験を行った。アデノウイルスで候補因子の強制発現実験を繰り返し、右図のように Pdx1, MafA を同定した(未発表データ)。驚くべきことに 細胞のリプログラミング因子も、細胞と同一であった。続いて Ppy 発現 細胞の実験であるが、細胞研究は他の膵島細胞研究と比べて立ち遅れていた。それは、膵島細胞種の minority であるという理由だけではなく、Ppy 発現パターンを正確に評価できる抗体がこれまで存在しなかったからである。非常に特異性の高い Ppy 抗体を開発された群馬大学 藤谷教授のサポートが突破口となり、マウス Ppy 細胞系譜解析が可能になった。成体マウス 細胞を FACS 分取して、同様にリプログラミング因子を同定すると、またしても同じ Pdx1, MafA であった (Perez et al., Nat. Commun 2021, 未発表データ)。またヒトにおいても Pdx1, MafA が全ての膵島 non- 細胞を 細胞に direct reprogramming することが可能であった。つまり、Pdx1, MafA は、膵島 non- 細胞をインスリン産生細胞にリプログラミングするマスター因子であると考えられる。この事は、リプログラミングの標的細胞として 細胞特異的な戦略を探索する必要がなく、むしろ広範に膵島全体を狙った分化転換手法の方が合理的かつ効果的治療であるという新たな戦略を提唱できた。



本基盤研究の成果を、今後の治療法開発に繋げて発展させてゆきたい。

未来の臨床現場では、本研究の分化転換療法を含め、多角的な異なるアプローチを組み合わせることで、個別化された糖尿病治療法を患者さんに提供できるよう、今後も研究を進めてゆきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ghila Luiza, Furuyama Kenichiro, Grey Shane T., Scholz Hanne, Chera Simona	4. 巻 13
2. 論文標題 Editorial: Beta-Cell Fate: From Gene Circuits to Disease Mechanisms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2022.822440	査読の有無 無
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 該当する
1. 著者名 Perez-Frances Marta, van Gurp Leon, Abate Maria Valentina, Cigliola Valentina, Furuyama Kenichiro, Bru-Tari Eva, Oropeza Daniel, Carreaux Ta?na, Fujitani Yoshio, Thorel Fabrizio, Herrera Pedro L.	4. 巻 12
2. 論文標題 Pancreatic Ppy-expressing -cells display mixed phenotypic traits and the adaptive plasticity to engage insulin production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24788-0	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 該当する
1. 著者名 Pahlavanneshan Saghar, Behmanesh Mehrdad, Oropeza Daniel, Furuyama Kenichiro, Tahamtani Yaser, Basiri Mohsen, Herrera Pedro L., Baharvand Hossein	4. 巻 99
2. 論文標題 Combined inhibition of menin-MLL interaction and TGF- signaling induces replication of human pancreatic beta cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 151094 ~ 151094
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejcb.2020.151094	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 該当する
1. 著者名 Ghila Luiza, Bjorlykke Yngvild, Legoy Thomas Aga, Vethe Heidrun, Furuyama Kenichiro, Chera Simona, R?der Helge	4. 巻 8
2. 論文標題 Bioinformatic Analyses of miRNA?mRNA Signature during hiPSC Differentiation towards Insulin-Producing Cells upon HNF4 Mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 179 ~ 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines8070179	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 該当する

1. 著者名 Sankoda Nao, Tanabe Wataru, Tanaka Akito, Shibata Hirofumi, Woltjen Knut, Chiba Tsutomu, Haga Hironori, Sakai Yoshiharu, Mandai Masaki, Yamamoto Takuya, Yamada Yasuhiro, Uemoto Shinji, Kawaguchi Yoshiya	4. 巻 12
2. 論文標題 Epithelial expression of Gata4 and Sox2 regulates specification of the squamous?columnar junction via MAPK/ERK signaling in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-021-20906-0	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 Sasaki Ben, Uemoto Shinji, Kawaguchi Yoshiya	4. 巻 44
2. 論文標題 Transient FOXO1 inhibition in pancreatic endoderm promotes the generation of NGN3+ endocrine precursors from human iPSCs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101754 - 101754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101754	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 van Gurp Leon, Fodoulian Leon, Oropeza Daniel, Furuyama Kenichiro, Bru-Tari Eva, Vu Anh Nguyet, Kaddis John S., Rodr?guez Iv?n, Thorel Fabrizio, Herrera Pedro L.	4. 巻 13
2. 論文標題 Generation of human islet cell type-specific identity genesets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-29588-8	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 該当する

1. 著者名 古山賢一郎, 川口義弥	4. 巻 38
2. 論文標題 膵発生 / 再生における細胞系譜解析と細胞間相互作用の解明	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 膵臓	6. 最初と最後の頁 2~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2958/suizo.38.2	査読の有無 無
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 古山賢一郎, 川口義弥	4. 巻 43 (8)
2. 論文標題 臍立体構築における細胞間相互作用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 胆と臍	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 古山賢一郎	4. 巻 13 (30)
2. 論文標題 ヒト臍 細胞を材料とした臍 細胞作製 - 糖尿病に対する分化転換療法 -	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊糖尿病	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 古山賢一郎, Pedro Herrera	4. 巻 -
2. 論文標題 臍島内分泌細胞間の分化転換現象とそれを応用した糖尿病治療の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 糖尿病学2020	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 古山賢一郎, Pedro Herrera	4. 巻 50 (2)
2. 論文標題 臍島内でのダイレトリプログラミング (分化転換)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊 糖尿病・内分泌代謝科	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川口 義弥
2. 発表標題 膜立体構築における細胞間相互作用
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会WEB学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古山賢一郎
2. 発表標題 Cell plasticity in the pancreatic islet
3. 学会等名 第55回 発生生物学会 シンポジウム 金沢（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古山賢一郎
2. 発表標題 New insights into understanding the neuroendocrine tumors of the pancreas
3. 学会等名 第26回 国際膵臓学会 joint Symposium with AACR - JCA, Kyoto（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計3件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	川口 義弥  (Kawaguchi Yoshiya)  (60359792)	京都大学・iPS細胞研究所・教授    (14301)	

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			
ノルウェー	ベルゲン大学			
スイス	ジュネーヴ大学			