

令和 6 年 5 月 19 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02978

研究課題名（和文）ヒト多能性幹細胞の分化誘導系を基軸とする膵島の制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism regulating pancreatic islets using human pluripotent stem cell differentiation system

研究代表者

糸 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）：発生途中の膵臓細胞において発現する代表的な2型糖尿病関連遺伝子としてC2CD4遺伝子がある。C2CD4と相互作用する分子について、たんぱく質近傍ラベリング法により検索し、複数の候補遺伝子を得て、その分子生物学的な解析を行った。また、膵島の機能制御において、ドパミンシグナルが抑制シグナルとして重要な役割を担っている。Drd1, Drd2の果たす役割について調べるために、膵臓細胞に特異的にDrd1やDrd2の遺伝子ノックアウトマウスを作成し、インスリン分泌に対する効果を調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は患者が年々増加し、重篤な患者には移植医療が適応となっているが、ドナーとなる細胞が足りない問題の解決には、再生医療による細胞移植治療が期待されている。再生医療を進めるためには、高機能なヒトiPS由来膵臓細胞（SC- $\beta$ ）の効率的な作製方法の開発が重要である。これまで、ある程度機能の高いSC- $\beta$ を作製することが可能になってきているが、生体内の内在性の膵臓細胞とは遺伝子発現上では依然として異なっている。膵臓細胞の機能制御の分子機構を理解することにより、ヒト膵島に近づくSC-膵島の作製が可能になると考える。

研究成果の概要（英文）：The C2CD4 gene is a type 2 diabetes-related gene expressed in pancreatic cells during development. We attempted to search for molecules that interact with C2CD4 using the protein proximity labeling. We obtained multiple candidate genes that interact with C2CD4 and performed molecular analysis. On the other hand, dopamine signals are essential as inhibitory signals in controlling pancreatic islet function. To investigate the roles played by Drd1 and Drd2, we generated pancreatic cell-specific Drd1 and Drd2 gene knockout mice and performed preliminary studies on their effects on insulin secretion.

研究分野：代謝内分泌

キーワード：多能性幹細胞 膵臓 内分泌細胞 分化誘導 インスリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は患者が年々増加し、重篤な患者には移植医療が適応となっているが、ドナーとなる細胞が足りない問題点の解決には、再生医療による細胞移植治療が期待されている。再生医療を進めるためには、高機能なヒト iPS 由来膵臓細胞 (SC-) の効率的な作製方法の開発が重要である。これまで、ある程度機能の高い SC- を作製することが可能になってきているが、生体内の内在性の膵臓細胞とは遺伝子発現上では依然として大きく異なっている。

## 2. 研究の目的

多能性幹細胞から機能的な膵細胞を作り出すためには、膵臓細胞の分化成熟、機能制御にどのようなシグナル系が関わるか、細胞の不均一性を作り出す分子機構、異なる性質の細胞間、あるいは他の内分泌細胞との相互作用について本質的な理解が必要である。本研究では、膵臓細胞の機能付与と機能維持に関わる遺伝子の役割について解析し、膵臓細胞について統合的に理解することを目的とする。膵臓細胞の機能制御の分子機構を理解することにより、ヒト膵島に近づく SC-膵島の作製が可能になると考え、膵臓細胞の機能制御について新たな知見を得ることを目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、代表的な 2 型糖尿病関連遺伝子として C2CD4 遺伝子にフォーカスして研究を進めた。また、膵臓細胞はヘテロ性を保つことで機能を維持すると考えられるが、そのヘテロ性に関与すると考えられるドパミンシグナルによる機能制御機構の解明を目指す。そのため、次の項目について進める。

- (1) ゲノムワイド遺伝子関連解析 (GWAS) により同定された 2 型糖尿病 (T2DM) 関連遺伝子についてヒト ES/iPS 細胞遺伝子操作を用いた解析
- (2) ドパミンシグナルによる膵細胞の機能制御の分子機構解明

## 4. 研究成果

発生途中の膵臓細胞において発現する代表的な 2 型糖尿病関連遺伝子として C2CD4 遺伝子がある。C2CD4 遺伝子は核タンパク質であり、ヒト iPS 細胞由来の膵臓への分化過程の細胞においても発現が見られている遺伝子である。C2cd4 遺伝子ノックアウトマウ

スでは、インスリン分泌能の低下が報告されている。C2CD4 と相互作用する分子について、たんぱく質近傍ラベリング法により検索し、複数の候補遺伝子を得て、その分子生物学的な解析を行った。C2CD 遺伝子ノックダウン細胞株の表現型解析からおおよそ相関がみられたことより、有意に膵臓 細胞の機能を調節していると思われる。

一方、膵島の機能制御において、ドパミンシグナルが抑制シグナルとして重要な役割を担っており、ドパミン D1 受容体 (Drd1) ならびに D2 受容体 (Drd2) の重要性が報告されている。本研究では、Drd1, Drd2 の果たす役割について調べるために、膵臓 細胞に特異的に Drd1 や Drd2 の遺伝子ノックアウトマウスを作成することとした。予備的な検討結果では、Drd2 の全身ヘテロノックアウトマウスにおいてインスリン分泌が有意に増加していることが分かった。単離膵島においても同様な結果が得られたため、Drd2 によるインスリン分泌に対する抑制が外れたためインスリン分泌は Drd2 ヘテロノックアウトマウスにおいて向上したと結論した。一方 Drd1 のヘテロノックアウトマウスにおいては特に対照実験のマウスとは差が見られなかった。さらに、膵臓 細胞特異的な Drd2, Drd1 ノックアウトマウスを作成するため、Pdx1CreER マウスと交配し、Tamoxifen により誘導した 細胞特異的な Drd1, Drd2 ノックアウトマウスについて、正常食および高脂肪食を与えた環境下におけるインスリン分泌能、耐糖能試験、などについてデータを取得し、解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Uefune F, Aonishi T, Kitaguchi T, Takahashi H, Seino S, Sakano D, Kume S	4. 巻 71
2. 論文標題 Dopamine negatively regulates insulin secretion through D1-D2 receptor heteromer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 1946-1961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/db21-0644	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 Sim Z.E, Enomoto T, Shiraki N, Furuta N, Kashio S, Kambe T, Tsuyama T, Arakawa A, Ozawa H, Yokoyama M, Miura M, Kume S	4. 巻 40
2. 論文標題 Methionine metabolism regulates pluripotent stem cell pluripotency and differentiation through zinc mobilization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 11120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.111120	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 Ozawa H., Kambe A, Hibi K, Murakami S, Oikawa A, Handa T, Fujiki K, Nakato R, Shirahige K, Kimura H, Shiraki N, Kume S	4. 巻 41
2. 論文標題 Transient methionine deprivation triggers histone modification and potentiated differentiation of induced pluripotent stem cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 271-286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/stmcls/sxac082	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 Ali M, Kato Y, Shiraki N, Kume S	4. 巻 12
2. 論文標題 Generation of induced pluripotent stem cell-derived beta-cells in blood amino acids-like medium.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio059581
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.059581	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 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 PLoSOne	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 1-2
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 門倉瑠乃、荒川哲大、Erinn Zixuan Sim、白木伸明、桑昭苑
2. 発表標題 多能性幹細胞の未分化および分化状態における細胞内亜鉛動態解析
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Marwa san, Y Kato, Shiraki N, Kume S.
2. 発表標題 Generation of induced pluripotent Stem Cell-Derived Beta cells in Blood Amino Acids-Like Medium
3. 学会等名 22nd IUNS-InternationalCongress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中原有理、井上愛里、徳間啓、坂野大介、白木伸明、桑昭苑
2. 発表標題 2型糖尿病原因遺伝子C2CD4Aの糖尿病発症メカニズム解明
3. 学会等名 第45回分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板谷勇輝、上船史弥、徳間啓、富永成海、坂野大介、桑昭苑
2. 発表標題 膵細胞におけるドーパミン生合成の役割とその制御機構の解明
3. 学会等名 第45回分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoya Hiyoshi, Takayuki Enomoto, Airi Inoue, Yusuke Kato, Daisuke Sakano, Kimi Araki, Nobuaki Shiraki, Shoen Kume
2. 発表標題 新規インスリン遺伝子変異を有するKumaマウスにおけるLC-MS/MSによる血漿中の代謝物プロファイルの解明
3. 学会等名 第45回分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金子知代、島慧理果 榎本孝幸、白木伸明、桑昭苑
2. 発表標題 メチオニン制限を組み込んだ新規iPS細胞膵臓分化方法の開発
3. 学会等名 アミノ酸学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shoen Kume
2. 発表標題 Metabolic control of pluripotent stem cells in the generation of pancreatic endocrine beta cells
3. 学会等名 第3回JSRM-A*STARジョイントシンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑昭苑
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来膵島の作成とインスリン分泌の制御機構解明
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳間啓 坂野大介 桑昭苑
2. 発表標題 WFS1の発現低下とインスリン分泌の関連性の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上愛里、下道隆広、坂野 大介、桑 昭苑
2. 発表標題 ドバミンによる膵臓発生機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上船史弥、坂野大介、青西亨、高橋晴美、清野進、桑昭苑
2. 発表標題 膵細胞におけるD1-D2ヘテロ多量体を介したドーパミンによるインスリン分泌抑制機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小澤弘樹、神戸梓沙、日比滉大、及川彰、藤木克則、白髭克彦、木村宏、白木伸明、桑昭苑
2. 発表標題 メチオニン除去培養によるエピジェネティック変化を伴うヒトiPS細胞分化促進
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑昭苑
2. 発表標題 アミノ酸の代謝を活用したiPS細胞の分化誘導系の構築
3. 学会等名 ICAAS 「アミノ酸セミナー・基礎と臨床を結ぶ会」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shoen Kume, Erinn Zixuan Sim, Takayuki Enomoto, Nobuaki Shiraki.
2. 発表標題 Metabolic control of pluripotent stem cells for the generation of pancreatic beta-cells
3. 学会等名 ISSCR /JSRM International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 糸昭苑
2. 発表標題 多能性幹細胞の維持と膵臓 細胞分化における亜鉛シグナルの関与
3. 学会等名 日本亜鉛栄養治療研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 糸昭苑
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞を用いた糖尿病の再生医療
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 糸昭苑
2. 発表標題 ヒトiPS細胞からの膵島作成とモデル細胞としての利用
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>異種のドーパミン受容体が結合したD1-D2ヘテロ多量体の活性化によってインスリン分泌が調節される  <a href="https://www.titech.ac.jp/news/2022/064340">https://www.titech.ac.jp/news/2022/064340</a>          ヒト多能性幹細胞におけるメチオニン代謝と亜鉛動態の関係性を解明  <a href="https://www.titech.ac.jp/news/2022/064523">https://www.titech.ac.jp/news/2022/064523</a></p>
--

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
---------	---------