

令和 6 年 9 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06970

研究課題名（和文）ヒト疾患iPS細胞を利用した膵・腸管異常症の解明と再生医療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of pancreatic and intestinal dysbiosis using human disease iPS cells and its application to regenerative medicine

研究代表者

藤倉 純二（Fujikura, Junji）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70378743

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：RFX6は、膵低形成や腸管閉鎖を呈し糖尿病を発症するMitchell-Riley症候群の原因遺伝子である。RFX6ヘテロおよびホモのGFP K/1(K/O)hiPSCを樹立し内胚葉へ誘導した。原始腸管以後のPDX1及びCDX2陽性細胞は殆どがRFX6陽性であり、RFX6欠損によって両細胞数は著減した。cap解析を用いて、RFX6結合X-boxモチーフを発見し、PDX1とCDX2のエンハンサー領域にあるモチーフ配列が*vitro*でRFX6と結合することを示した。初期内胚葉形成の欠陥がMitchell-Riley症候群の病因であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RFX6はMitchell-Riley症候群だけでなく腸管内分泌や膵細胞の分化や機能に関わっている。今回RFX6欠損hiPSCを内胚葉分化系に適用し、病態モデル作成に成功した。ヒト胎児で不可能な網羅的解析を行いRFX6の結合する新たなmotifを発見した。今後RFX6が制御する遺伝子群の検討により各種内胚葉系疾患の病態解明が可能となる。また、RFX6発現をGFP蛍光で示す本細胞を用いてRFX6を制御する物質を探索し、RFX6陽性細胞由来である膵・腸管内分泌細胞への分化促進因子をスクリーニングし、*vitro*での膵・腸管細胞分化を実現させることにより膵腸管疾患再生医療への展開が可能となる。

研究成果の概要（英文）：RFX6 is the causative gene of Mitchell-Riley syndrome, which shows pancreatic hypoplasia and intestinal obstruction and develops neonatal diabetes. In this study, RFX6 heterozygous and homozygous GFP knock-in/knock-out hiPSCs were established and induced to differentiate into the endoderm lineage. RFX6 expression increased rapidly in the primitive intestinal tract, followed by RFX6 loss, which reduced expression of PDX1 and CDX2, regulatory genes of the posterior foregut and mid-hindgut, respectively. Using cap analysis, we found RFX6-binding X-box motifs and the motif sequences in the enhancer regions of PDX1 and CDX2 bind RFX6 *in vitro*. In Mitchell-Riley syndrome, defects in early endodermal patterning were shown to be etiologic.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：膵 腸管 RFX6 iPS細胞 発生 Mitchell-Riley症候群 糖尿病 インクレチン

1. 研究開始当初の背景

高齢社会においては、糖尿病・肥満はもとより低栄養も大きな問題となっている。これらの病態解明と治療法開発には、既存の動物モデルや不死化培養細胞による研究のみではヒト本来の生命現象として未解明の部分が多い。

ヒト iPS 細胞の樹立が 2007 年に報告されて 15 年以上が経過している。iPS 細胞は、受精卵の着床前環境を再現する培養により、正常ゲノムを維持しながら増殖し、全組織への分化が可能な稀有な細胞である。ヒトの生理と病理を正確に反映することが期待され、HLA を揃えた移植用ヒト iPS 細胞ストックも存在する。

しかし、パーキンソン病、脊髄損傷、網膜色素変性症などの外胚葉系組織や心筋、血小板などの中胚葉系組織に関する臨床応用は進んでいるが、内胚葉系組織に関する臨床応用は目途が立っていない。再生医療実現の為に意図しない目的外細胞への分化による混入や未分化細胞の腫瘍化も懸念されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞を用いて、膵・腸管に異常を来す Mitchell-Riley 症候群などの病態解明と治療法を開発することである。

具体的には、ヒト iPS 細胞から、最終分化した成熟膵・腸管細胞に至るまでの分化系を構築する。そのために、分化の指標となる遺伝子発現を追跡し、分化過程の生細胞を捕捉できるように、分化指標となる遺伝子領域へ蛍光や薬剤耐性遺伝子を導入したヒト iPS 細胞を作成する。更に、患者由来あるいは変異を導入した疾患 iPS 細胞を樹立し、構築した分化系を適用することで分化過程や分化後の発症メカニズムを解明する。

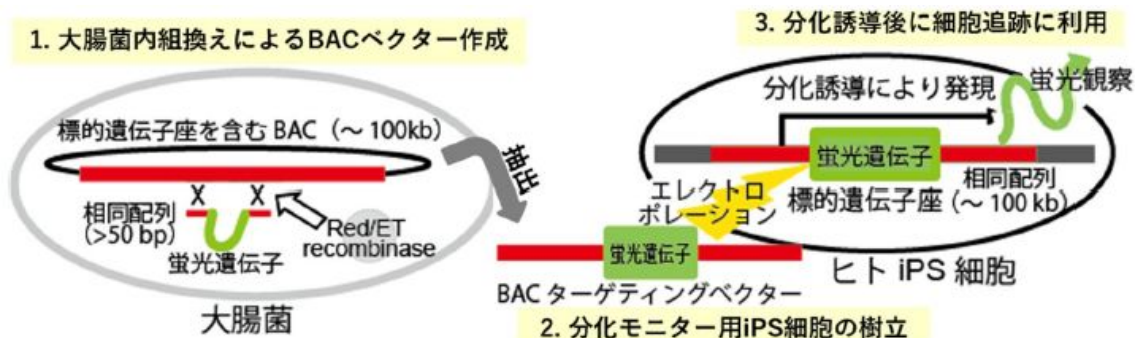
本研究では、ヒトにおける病態解明や臨床応用可能な発生病理学的研究を行うことで糖尿病・栄養疾患の治療法創出や移植再生治療への貢献が期待された。

3. 研究の方法

膵・腸管を含めたヒト内胚葉系組織の発生分化過程はとりわけ未解明の事柄が多く、分化条件を改良する必要がある。

分化指標となる転写因子を発現する細胞を正確に捕捉することが必要であり、発現を蛍光や薬剤耐性によりモニタリング可能な iPS 細胞を樹立する。

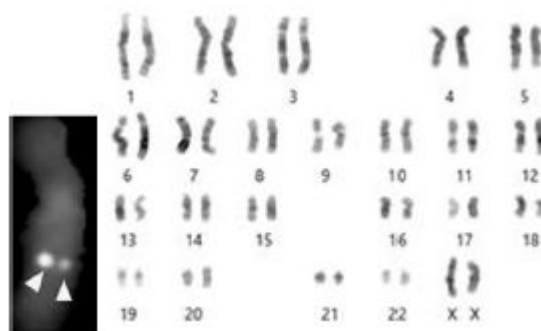
マーカーとなる蛍光・薬剤耐性遺伝子の挿入は CRISPR やプラスミドでは不可能なため大腸菌人工染色体 (BAC) 100kb の相同領域を有するターゲティングベクターにより行う(下図)。



転写因子の多くは良質な抗体が作成できないため、このマーカー発現を利用して分化細胞を定量化し、系を最適化できる。

生きたままの細胞をソーティングすることで、次の分化段階へ進むことができ、病態解析や移植治療も可能となる。

分化指標の一つとして、膵・腸管低形成から消化吸收障害や糖尿病を呈する Mitchell-Riley 症候群 (OMIM # 615710) の原因遺伝子 RFX6 に着目した。RFX6 は原始腸管や腸管内分泌細胞、成熟膵細胞等に多段階で複数種の細胞に発現し、系譜解析に適当である。1st exon へ GFP 遺伝子を挿入し FISH (右写真) により、染色体 6q21 への正確な挿入() と正常核型が確認できた。



4. 研究成果

RFX6 は、膵 細胞において KATP チャネル遺伝子の転写促進から糖反応性制御因子として若年型糖尿病 (MODY: Maturity-Onset Diabetes of the Young) の原因となったり、GIP 産生細胞で発現したりしているが、膵・腸管低形成を来す Mitchell-Riley 症候群の原因遺伝子でもある。

RFX6 KI/KO ヒト iPS を原始腸管へ分化させ RNA-Seq により網羅的解析を行ったところ膵・腸管発生に不可欠な PDX1, CDX2, Ngn3 発現低下をはじめ、多くの遺伝子発現に変化を認めた (右図)。RFX6 は成熟した膵・腸管内分泌細胞を規定しているだけでなく、発生過程における必須因子であり多段階で作用していることが判明した。

内胚葉系分化系においては、RFX6 ヘテロノックアウト (RFX6+/eGFP) ヒト iPS 細胞では、RFX6 がドライブされる緑色蛍光タンパク質 (GFP) 陽性細胞が PDX1 陽性細胞や CDX2 陽性細胞だ

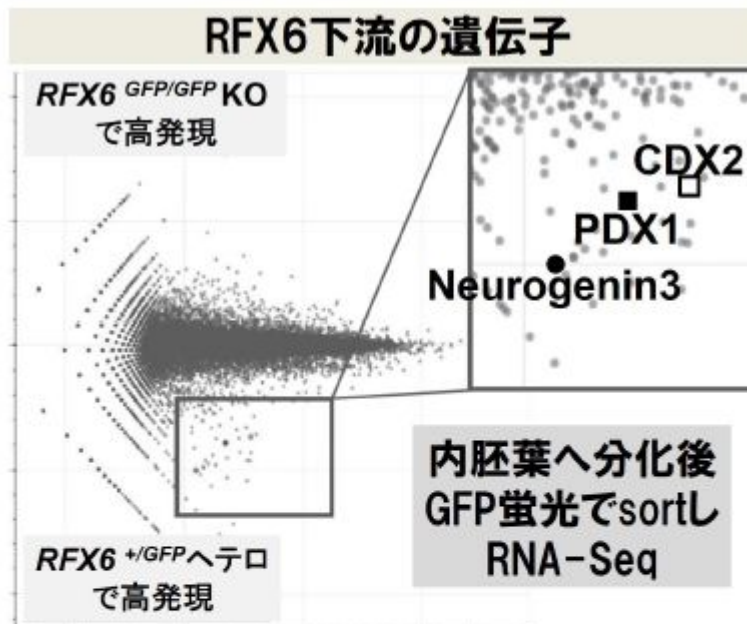
ったが、RFX6 ホモノックアウト (eGFP/eGFP) ヒト iPS 細胞では、RFX6 がドライブされたであろう内胚葉細胞系譜における PDX1 や CDX2 の陽性細胞数が著しく減少し、RFX6 が中後腸発生に重要な役割を果たしていることが細胞レベルで示された。

逆に、RFX6 発現が本来弱い領域である前腸については、前腸マーカーである SOX2 発現は、RFX6 欠損によって影響を受けなかった。

さらに、遺伝子発現 seq の cap 解析を用いて、推定される RFX6 結合 X-box モチーフを発見し、PDX1 と CDX2 のエンハンサー領域のモチーフ含有配列が in vitro で RFX6 と結合することを確認した。

このように、RFX6 は初期内胚葉分化において ParaHox 遺伝子 PDX1 と CDX2 を制御するが、SOX2 には影響を与えないことから、初期内胚葉の特に中・後腸領域分化の欠陥が Mitchell-Riley 症候群の形態学的病態の原因であることが示唆された。

RFX6 の発現が正常に維持されていることが、今後の膵・腸管等の中・後腸領域内胚葉細胞の関連した病態や発生・再生医療において非常に重要であることが示唆された。



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 7件）

1. 著者名 Nakamura Toshihiro, Fujikura Junji, Ito Ryo, Keidai Yamato, Inagaki Nobuya	4. 巻 3
2. 論文標題 Human RFX6 regulates endoderm patterning at the primitive gut tube stage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	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） 10.1093/pnasnexus/pgae001	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 Nakagawa Ryota, Minamiguchi Sachiko, Kataoka Tatsuki R., Fujikura Junji, Masui Toshihiko, Fujimoto Masakazu, Yamada Yosuke, Takeuchi Yasuhide, Teramoto Yuki, Ito Hiroaki, Saka Manduwa, Kitamura Kyohei, Otsuki Shinya, Nishijima Ryohei, Haga Hironori	4. 巻 18
2. 論文標題 Circularity of islets is a distinct marker for the pathological diagnosis of adult non-neoplastic hyperinsulinemic hypoglycemia using surgical specimens	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diagnostic Pathology	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） 10.1186/s13000-023-01403-y	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 Murakami Takaaki, Nakamura Toshihiro, Fujimoto Hiroyuki, Fujikura Junji, Shimizu Yoichi, Miyake Kanae K., Otani Daisuke, Sakaki Kentaro, Kiyobayashi Sakura, Anazawa Takayuki, Nakamoto Yuji, Inagaki Nobuya	4. 巻 14
2. 論文標題 Noninvasive evaluation of donor and native pancreases following simultaneous pancreas kidney transplantation using positron emission tomography/computed tomography	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1187 ~ 1191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.14045	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 Ito Ryo, Kimura Azuma, Hirose Yurie, Hatano Yu, Mima Atsushi, Mae Shin-Ichi, Keidai Yamato, Nakamura Toshihiro, Fujikura Junji, Nishi Yohei, Ohta Akira, Toyoda Taro, Inagaki Nobuya, Osafune Kenji	4. 巻 13
2. 論文標題 Elucidation of HHEX in pancreatic endoderm differentiation using a human iPSC differentiation model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-023-35875-1	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 Akira, Yokote Koutaro, Naitoh Takeshi, Fujikura Junji, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Metabolic surgery in treatment of obese Japanese patients with type 2 diabetes: a joint consensus statement from the Japanese Society for Treatment of Obesity, the Japan Diabetes Society, and the Japan Society for the Study of Obesity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetology International	6. 最初と最後の頁 1-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13340-021-00551-0	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 Murakami Takaaki, Fujimoto Hiroyuki, Hamamatsu Keita, Yamauchi Yuki, Kodama Yuzo, Fujita Naotaka, Fujikura Junji, Shimizu Yoichi, Nakamoto Yuji, Kimura Hiroyuki, Saji Hideo, Inagaki Nobuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Distinctive detection of insulinoma using [18F]FB(ePEG12)12-exendin-4 PET/CT	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94595-6	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 Nakamura Toshihiro, Fujikura Junji, Inagaki Nobuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Advancements in transplantation therapy for diabetes: Pancreas, islet and stem cell	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 143 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13358	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12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山根 佳(京都大学医学部附属病院 肝胆膵・移植外科), 穴澤 貴行, 藤倉 純二, 江本 憲央, 出羽 彩, 蘇 航, 長井 和之, 内田 洋一朗, 伊藤 孝司, 石井 隆道, 波多野 悦朗
2. 発表標題 膵臓移植・膵島移植実施体制の発展に向けた方策 膵島移植予後予測指標による成績評価と発展に向けた課題
3. 学会等名 日本移植学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤倉 純二(京都大学医学部附属病院 糖尿病・内分泌・栄養内科), 穴澤 貴行, 松山 陽子, 井山 なおみ, 境内 大和, 中村 聡宏, 伊藤 遼, 波多野 悦朗, 稲垣 暢也
2. 発表標題 保険診療下で3回の膵島移植を行った腎移植後膵島移植の一例
3. 学会等名 日本糖尿病学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤倉 純二(京都大学医学部附属病院 糖尿病・内分泌・栄養内科), 穴澤 貴行, 松山 陽子, 井山 なおみ, 境内 大和, 中村 聡宏, 伊藤 遼, 波多野 悦朗, 稲垣 暢也
2. 発表標題 膵島移植を保険診療下で施行した腎移植後膵島移植患者の一例
3. 学会等名 日本内分泌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 勝二 隆志(京都大学 大学院医学研究科糖尿病・内分泌・栄養内科学), 山内 一郎, 川崎 秀徳, 岩永 甲午郎, 田中 大祐, 藤倉 純二, 増井 俊彦, 鈴木 寿人, 山田 茉未子, 小崎 健次郎, 稲葉 慧, 和田 敬仁, 小杉 眞司, 植田 洋平, 藤井 寿人, 田浦 大輔, 稲垣 暢也
2. 発表標題 高インスリン血性低血糖症を伴った7番染色体重複によるSilver-Russell症候群の1例
3. 学会等名 日本内分泌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村 聡宏(京都大学 大学院医学研究科糖尿病・内分泌・栄養内科学), 藤倉 純二, 伊藤 遼, 稲垣 暢也
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた内胚葉発生機構における新生児糖尿病原因遺伝子RFX6の機能解明
3. 学会等名 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 聡宏(京都大学 大学院医学研究科糖尿病・内分泌・栄養内科学), 藤倉 純二, 伊藤 遼, 稲垣 暢也
2. 発表標題 RFX6-eGFP knock-inヒトiPS細胞を用いた、新生児糖尿病原因遺伝子RFX6の膵・腸管発生分化調節における役割の解明
3. 学会等名 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤倉 純二(京都大学医学部附属病院 糖尿病・内分泌・栄養内科), 穴澤 貴行, 松山 陽子, 伊藤 遼, 中村 聡宏, 境内 大和, 波多野 悦朗, 稲垣 暢也
2. 発表標題 膵・膵島移植患者に対する内科医の関わり方 全盲の1型糖尿病患者に対する膵島移植
3. 学会等名 日本移植学会総会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 穴澤 貴行(京都大学 肝胆膵・移植外科), 伊藤 孝司, 江本 憲央, 秦 浩一郎, 増井 俊彦, 田浦 康二郎, 波多野 悦朗, 藤倉 純二, 稲垣 暢也
2. 発表標題 保険適用となった膵島移植と今後の展望 保険適用後膵島移植の展望 必要な臨床エビデンスと分離膵島研究転用への展開
3. 学会等名 日本移植学会総会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 穴澤 貴行(京都大学 肝胆膵・移植外科), 伊藤 孝司, 江本 憲央, 秦 浩一郎, 増井 俊彦, 田浦 康二郎, 波多野 悦朗, 藤倉 純二, 稲垣 暢也
2. 発表標題 1型糖尿病に対するアプローチ:膵臓移植vs.膵島移植vs.再生医療 1型糖尿病に対するアプローチ 膵島移植と再生医療の現在地
3. 学会等名 日本移植学会総会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 穴澤 貴行(京都大学医学部附属病院 肝胆膵・移植外科), 波多野 悦朗, 藤倉 純二, 稲垣 暢也
2. 発表標題 新たなステージを迎えた糖尿病の移植医療 膵島移植の現状と課題
3. 学会等名 日本糖尿病合併症学会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 章(岩手医科大学 医学部外科学講座), 内藤 剛, 横手 幸太郎, 稲垣 暢也, 益崎 裕章, 綿田 裕孝, 小川 渉, 下村 伊一郎, 山内 敏正, 石垣 泰, 笠間 和典, 野崎 剛弘, 島袋 充生, 藤倉 純二, その他
2. 発表標題 日本人の肥満2型糖尿病患者に対する減量・代謝改善手術に関するコンセンサスステートメント
3. 学会等名 日本肥満学会総会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 穴澤 貴行(京都大学 外科(肝胆膵・移植外科)), 藤倉 純二, 稲垣 暢也
2. 発表標題 糖尿病に対する移植医療・再生医療の現状と展望 保険適用となった膵島移植の現状と展望
3. 学会等名 日本糖尿病学会年次学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Duck-Jong Han, Takashi Kenmochi, Yi-Ming Shyr, editor	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 236
3. 書名 Pancreas Transplantation - the Asian Experience	

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学 糖尿病・内分泌・栄養内科
<http://metab-kyoto-u.jp/index.html>

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