

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670603

研究課題名(和文)1型糖尿病の根治を目指した新規膵細胞誘導物質の同定と創薬展開

研究課題名(英文)Identification of new chemical compound to induce pancreatic beta-cells

研究代表者

坂井 大介 (SAKAI, Daisuke)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座助教

研究者番号：10621071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：STZ処理により糖尿病化したマウス及びob/obマウスを用いて同定した化合物を様々な濃度やタイムポイントで糖尿病マウスの脂肪組織または尾静脈に注入し糖尿病の改善効果を確認した。継続的血糖値測定を行った結果、血糖が低下し糖尿病改善効果を得ることができた。さらに、マウスに糖を経口投与し、血糖値及びインスリン量の変化によりグルコース応答性を調べた結果、投与前と比較してグルコース応答性も改善していることが明らかとなった。

英文

研究成果の概要(英文)：We confirmed the differentiation efficiency to pancreatic beta-cell of chemical compounds using adipose derived mesenchymal stem cells. Identified chemical compounds were injected in ob/ob mouse and diabetes mellitus mouse. And we checked the blood glucose level of these mouse. It was showed that a few compounds were effective to treat the diabetes mellitus.

研究分野：消化器外科学

キーワード：再生医学 糖尿病 発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

現在までにインスリン分泌細胞の分化誘導に関する研究は異なる細胞種、方法を用いて多数報告されている。現時点で最高の分化誘導法として考えられている 4step 分化誘導法 (ActivinA, Wnt3A, FGF10, KAAD-CYC 等を用いた誘導法) は確かに ES 細胞や iPS 細胞をインスリン産生細胞へ誘導することは可能であるが、誘導効率が低いことや分化誘導に時間がかかること(約 1 ヶ月)などまだまだ改善点が多数存在する。これらの問題点を回避するために我々は新たな膵臓細胞の分化誘導系の開発に取り組むこととした。我々は比較的危険が少ない状態で多量に採取出来る脂肪組織由来間葉系幹細胞を Min6(マウス由来のインスリンノーマ細胞株)の培養上清で培養することによりたった 3 日でインスリン陽性細胞を作成することに成功した(論文投稿中)。しかしながらこれほど強くインスリン陽性細胞を誘導する成分は未だ未知であり、その解明は糖尿病の新たな細胞療法にとって重要な課題である。

## 2. 研究の目的

Min6 細胞に含まれる強力な未知のインスリン産生細胞誘導物質を同定し、試験管内(マウス細胞、ヒト細胞)、及び将来臨床応用につなげる小動物実験によるインスリン産生細胞の誘導法の確立、さらに製剤化へ向けた PMDA コンサルトまで繋げることを目的とし研究を行った。

## 3. 研究の方法

**【平成 26 年度】インスリン産生細胞を強く誘導する Min6 培養上清中の成分を解明する(誘導物質解明のための基礎研究)** Min6 の培養上清を 2 次元電気泳動及び MS 解析を行うことで Min6 細胞培養上清中に含まれるタンパク質を網羅的に同定する。同定した物質を

様々な組み合わせで脂肪組織由来間葉系幹細胞に添加し培養することで効果的に膵細胞を誘導する物質の同定を行った。膵細胞が誘導されたか否かは PCR で膵細胞マーカー遺伝子(Pdx1, Insulin, MafA 等)の発現を確認することで行った。

また、誘導した膵細胞の機能を検討するため、誘導した細胞を糖尿病モデルマウス(STZ 投与マウスおよび ob/ob マウス)腎皮膜下に移植して、血糖値測定により糖尿病改善効果を調べた。また、腎臓の組織切片を作製することで生着率、遺伝子発現、インスリン分泌能を比較検討した。さらに、マウスに糖を経口投与し、血糖値及びインスリン量の変化によりグルコース応答性を調べ、生体内における機能を比較検討した。

### **【平成 27 年度】動物実験での効果確認および PMDA コンサルト(挑戦的応用研究)**

平成 26 年度に同定した物質を様々な濃度やタイムポイントで糖尿病マウスの脂肪組織または尾静脈に注入し糖尿病の改善効果を確認した。糖尿病モデルマウスは STZ 処理により糖尿病化したマウス及び ob/ob マウス(糖尿病自然発症マウス)を用いた。血糖値測定により糖尿病改善効果を調べ、脂肪組織の組織切片を作製することで分化率、遺伝子発現、インスリン分泌能を比較検討する。さらに、マウスに糖を経口投与し、血糖値及びインスリン量の変化によりグルコース応答性を調べ、生体内における機能を比較検討した。また、ヒト細胞での効果確認のためにヒト組織由来間葉系幹細胞(手術検体より入手)の培養上清中に同定した物質を添加することによりヒトでの膵細胞誘導効果を検討した。動物実験及びヒト細胞での効果確認が終了次第、革新的糖尿病根治薬の開発を目指して PMDA へコンサルトに行き創薬を目指した。

## 4. 研究成果

Min6 の培養上清からエキソソームを抽出し、

エキソソーム内に含まれる核酸を次世代シーケンサーによりシークエンスした。シークエンスの結果培養上清中に多く含まれる核酸を同定し、得られた核酸を様々な組み合わせで脂肪組織由来間葉系幹細胞に添加し培養することで効果的に膵細胞を誘導する最適な組み合わせの検討を行った。その結果数種類の核酸の組み合わせにとり細胞への分化誘導効果が見られることが明らかとなった。またこれらの核酸を用いて誘導した膵細胞の機能を検討するため、誘導した細胞を糖尿病モデルマウス(Akita マウス)腎皮膜下に移植して、血糖値測定により糖尿病改善効果を調べた。結果として血糖値改善効果が見られた。また、STZ 処理により糖尿病化したマウス及び ob/ob マウスを用いて同定した物質を様々な濃度やタイムポイントで糖尿病マウスの脂肪組織または尾静脈に注入し糖尿病の改善効果を確認した。継時的血糖値測定を行った結果、血糖が低下し糖尿病改善効果を得ることができた。さらに、マウスに糖を経口投与し、血糖値及びインスリン量の変化によりグルコース応答性を調べた結果、投与前に比較してグルコース応答性も改善していることが明らかとなった。ヒト細胞での効果確認は現在進行中であり研究期間内に終了しなかったが、今後ヒト細胞での効果確認が終了次第、革新的糖尿病根治薬の開発を目指して PMDA へコンサルトに行き創薬を目指す。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) Sueda, T., Sakai, D., Kawamoto, K., Konno, M., Nishida, N., Koseki, J., Colvin, S. H., Takahashi, H., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Yamamoto, H., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H., BRAF V600E inhibition

stimulates AMPK-mediated autophagy in colorectal cancer. *Sci. Rep.*, 6:18949, 2016.

- 2) Nishimura, J., Satoh, T., Fukunaga, M., Takemoto, H., Nakata, K., Ide, Y., Fukuzaki, T., Kudo, T., Miyake, Y., Yasui, M., Morita, S., Sakai, D., Uemura, M., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Ohno, Y., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Nezu, R., Doki, Y., Mori, M.; Multi-center Clinical Study Group of Osaka, Colorectal Cancer Treatment Group (MCSGO). Combination antiemetic therapy with aprepitant/fosaprepitant in patients with colorectal cancer receiving oxaliplatin-based chemotherapy (SENRI trial): a multicentre, randomised, controlled phase 3 trial. *Eur J Cancer*. 2015 Jul;51(10):1274-82.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

該当無し

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

坂井大介 (SAKAI Daisuke)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：10621071

##### (2)研究分担者

石井 秀始 (ISHII Hideshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授  
(常勤)

研究者番号：10280736

(3)研究分担者

今野 雅允 (KONNO Masamitsu)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座  
助教

研究者番号：80618207