

課題番号 : 24指115  
研究課題名 : MODY患者由来のiPS細胞を用いた糖尿病の発症機序ならびに病態の解明  
主任研究者名 : 大河内 仁志  
分担研究者名 : 安田和基、岩崎直子  
キーワード : MODY, iPS細胞、膵β細胞、糖尿病

## 研究成果

### 大河内仁志：iPS細胞から膵臓β細胞への分化と機能解析

iPS細胞から膵臓β細胞を分化誘導する *in vitro* の実験系において、培養法に検討を加えて、健康人由来の iPS細胞と MODY患者由来の iPS細胞からインスリンを産生する細胞の誘導に成功した。インスリンの産生量は2000-3000pg/wellと昨年までの10倍以上に増加し、高濃度グルコースに反応して2倍程度のインスリン分泌を示すようなグルコース応答性をもつ膵臓β細胞を誘導できるようになった。

MODY3患者において HNF-1 $\alpha$  の P291fsinsC の変異によるフレームシフトがおこり、PTC (premature termination codon) が生じることが予想される症例を検討した。患者由来 iPS細胞からβ細胞に誘導した細胞から mRNA を抽出し、PCR で増幅し、ゲノム配列を解析したところ、確かに変異 mRNA が存在することが証明できた。MODY の遺伝子変異はヘテロ変異なので、理論的には正常と変異 mRNA の発現は半々のはずであるが、正常の HNF-1 $\alpha$  の mRNA に比べて変異 mRNA は少量であり、NMD (nonsense mediated decay) が生じて変異 mRNA が速やかに分解されていることが示唆された。そこでシクロヘキシミドを添加してタンパク合成を阻害すると、変異 mRNA の量が相対的に増加したことより、実際に NMD が起こっていることが証明できた。次に MODY5 の患者においても HNF-1 $\beta$  における R177X 変異による nonsense 変異で PTC が形成されると予想されているので、同様に mRNA の解析をしたところ、変異 mRNA の検出はできたが、NMD が起こって分解されていることが示唆された。MODY においては変異タンパクによる dominant negative 効果が発症原因であるという説があるが、本症例において変異 mRNA は速やかに分解されているので、変異タンパクが蓄積するとは考えにくく、むしろ haplo-insufficiency によるものと考えられた。

### 安田和基：MODY 由来 iPS細胞を用いた、糖代謝関連分子の探索と機能解析

作成方法の違いによる iPS細胞の遺伝子発現の比較を行った。その結果、同一人に由来する iPS細胞の遺伝子発現は、作製法の違いによらず予想以上に近似しており、一方で由来する個人の差を大きく反映していた。患者由来の iPS細胞では、分化誘導段階で、野生型のアリルに対して変異型のアリルの RNA が減少していること、cycloheximide 処理で変異型アリルの発現が相対的に回復するデータを共同で吟味し、これらは premature termination codon に対する nonsense-mediated decay により RNA 発現が低下し、haploinsufficiency が生じていると考えられた。このように罹患臓器でのメカニズムがヒトで確認された例は非常に少なく、今後、こうした分化段階での遺伝子発現の変化、などを検討してゆく予定である。

### 岩崎直子：ミトコンドリア機能からみたMODY患者iPS細胞由来膵β細胞の機能評価および新規MODY-X遺伝子の同定による糖尿病治療方法の開発

MODY家系のDNAを収集し、連鎖解析によって染色体上の関心領域を決定し、遺伝子の絞り込みを行い、最終的に2種類の遺伝子FOXP4とCUL9(PARC)にまで絞り込みができた。原因遺伝子不明のMODY発端者34名を対照としてFOXP4遺伝子とCUL9遺伝子の全エクソンについてシーケンスを行い、これらの遺伝子に変異を有する患者の検索を実施した。その結果、FOXP4遺伝子エクソン11に(Chr6;41,557,897;C>T) P449Lヘテロ変異、Polyphen 2 (0.941) and SIFT(0.000)を有する1例、CUL9遺伝子エクソン14に(Chr6;43,167,697;C>T) R1063Cヘテロ変異、Polyphen 2 (0.999) and SIFT (0.00)を有する1例を認めた。

Subject No. : 24A115  
Title : Research on the pathophysiology of MODY using iPS cells derived from MODY patients  
Researchers : Hitoshi Okochi, Kazuki Yasuda, Naoko Iwasaki,  
Key word : MODY、iPS cell、pancreatic  $\beta$  cell、diabetes mellitus

Abstract : MODY (maturity onset diabetes of the young) is a special type of diabetes caused by a single gene mutation. More than 13 genes were identified to cause MODY so far and most of them are transcription factors closely related hepatic and pancreatic development. It is very hard to obtain the fresh pancreatic tissue from the patients. No suitable mouse model has been established yet because heterozygous mutation in mice does not show similar phenotype to human. In this study we aimed at elucidating the pathophysiology of diabetes mellitus and MODY by establishing patient-derived iPS (induced pluripotent stem) cells and differentiating them into pancreatic beta cells.

### **Pancreatic $\beta$ cell induction from iPS cells**

We tried to differentiate iPS cells into pancreatic beta cells based on the Melton's method reported in PNAS in 2009. We modified the protocol to promote endoderm differentiation and replaced FBS (fetal bovine serum) for KSR (knockout serum replacement) to avoid the effect of different lot. We detected insulin and glucagon gene expression after 4 weeks culture by RT-PCR. Immunohistochemical analysis revealed that approximately 10% of the cells were positive for c-peptide. We measured insulin concentration secreted to the media by ELISA and detected 2000-3000 pg/ml of insulin, which was ten times more than last year. Moreover, we confirmed glucose response of induced  $\beta$  cell by increasing glucose concentration in the media.

### **Detection of Mutant Disease Gene mRNA Expression from MODY-iPS cells**

We established 3 types of MODY-iPS cells from Japanese patients: MODY1 (R127W), MODY3 (P291fsinsC), and MODY5 (R177X). These MODY-iPS cells possessed the characteristics of pluripotent stem cells. Disease gene mRNA expression was detected and cloned: HNF1a; beta stage, HNF1b; primitive gut tube stage, HNF4a; primitive gut tube stage. After those disease gene mRNA were sequenced, we found that R177X and P291fsinsC mutant transcripts were much less frequent than wild ones, but they increased after adding cycloheximide (CHX) to the medium. R177X and P291fsinsC mutant mRNAs, which have premature termination codons (PTC), are thought to be disrupted by nonsense mediated mRNA decay (NMD) in differentiated MODY-iPS cells. The results indicate that those MODY may be caused by a haplo-insufficiency effect rather than a dominant negative manner.

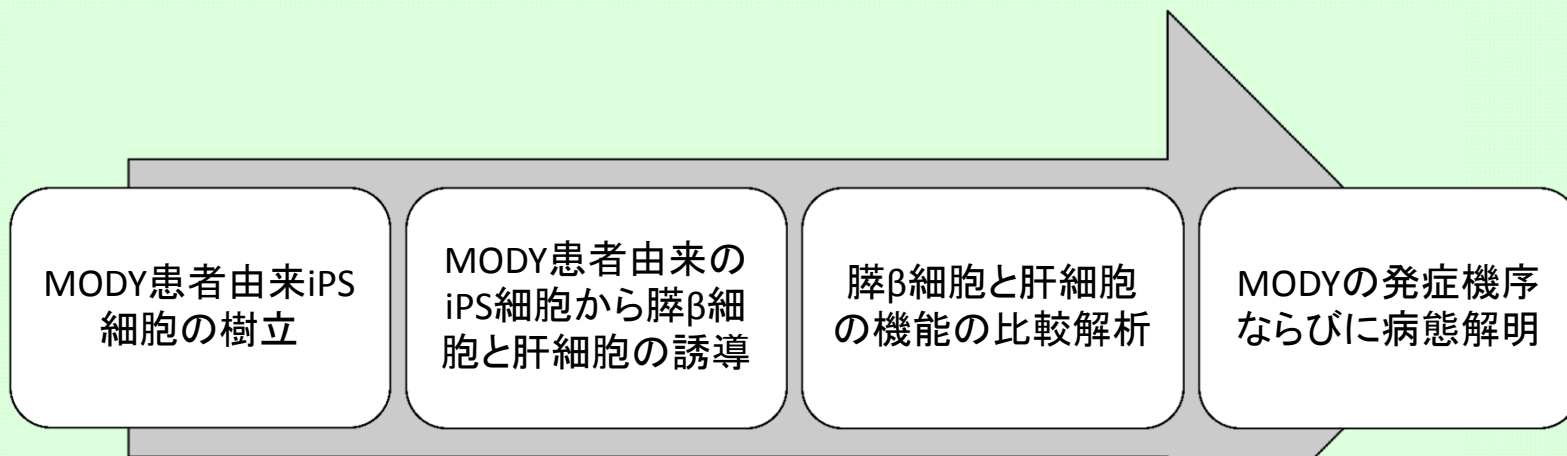
### **Analysis of MODY-X family by using whole exome sequencing**

Previous linkage analysis indicated unidentified MODY gene (MODY-X) might be located chromosome 6, 7, or 22. We picked up two candidate genes, FOXP4 and CUL9 by sequencing. We performed the whole exon sequence of these genes and we found several heterozygous mutations. We are now confirming the data again using next generation sequencer to increase the rate of coverage.

Researchers には、分担研究者を記載する。

# 24指115 研究の概要

研究課題名 : MODY患者由来のiPS細胞を用いた糖尿病の発症機序ならびに病態の解明



東京女子医科大学  
糖尿病センター  
岩崎直子准教授  
(新規MODY遺伝子の探索と  
ミトコンドリア機能解析)

匿名化した検体

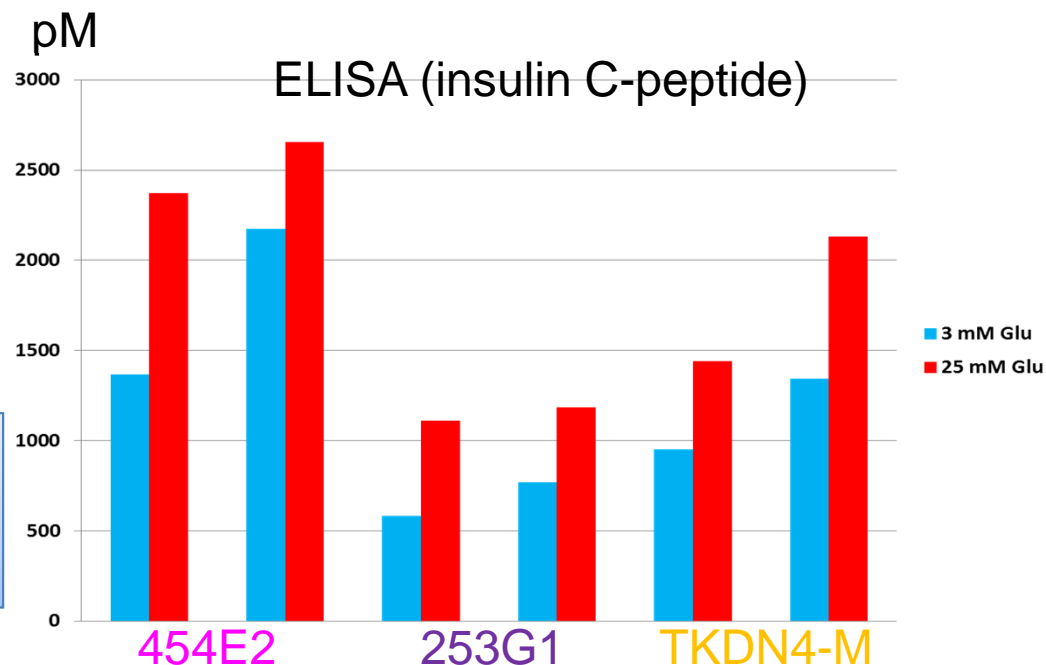
国立国際医療医療センター  
細胞組織再生医学研究部  
大河内仁志、矢部茂治  
(iPS細胞樹立と分化誘導法)

膵臓β細胞

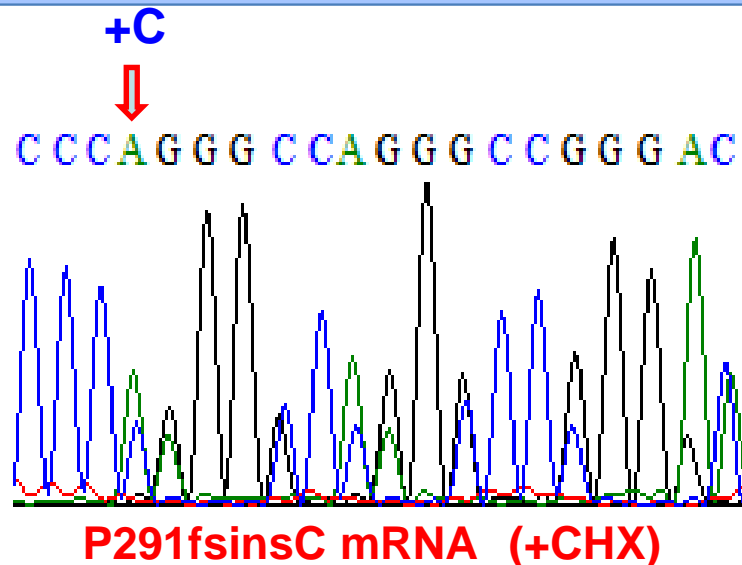
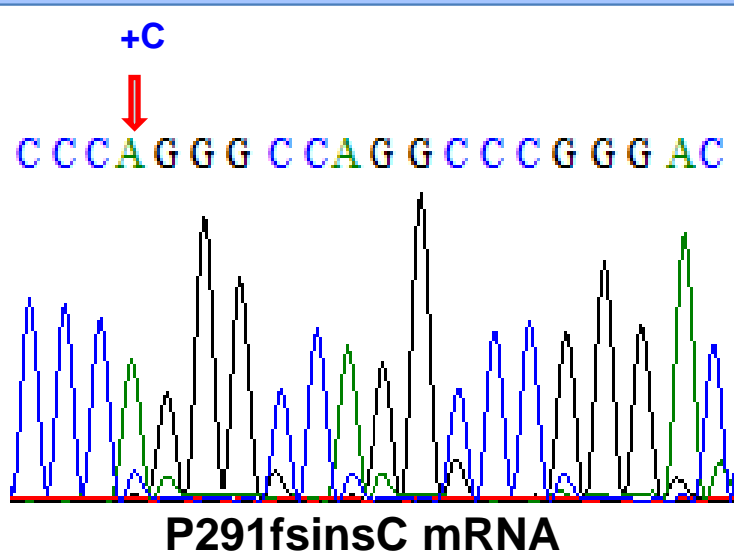
代謝疾患研究部  
安田和基部長  
膵臓β細胞の機能解析

# iPS細胞から膵β細胞への分化誘導

3種類のiPS細胞からグルコース濃度に反応してインスリンを産生する膵β細胞の誘導に成功した。



MODY3患者の変異HNF1a遺伝子のmRNAは通常では速やかに分解されてしまうが、シクロヘキシミド添加で分解が抑制された。



課題番号 : 24指115

研究課題名 : MODY患者由来のiPS細胞を用いた糖尿病の発症機序ならびに病態の解明

分担研究課題名 : iPS細胞から膵臓β細胞への分化と機能解析

主任研究者名 : 大河内 仁志

分担研究者名 : 大河内 仁志

キーワード : MODY、iPS細胞、膵β細胞

研究成果 : MODYは、ヒト糖尿病の単一遺伝子病モデルとしてFajansらにより1970年代に提唱された、常染色体優性遺伝を示す若年発症糖尿病である。臨床的には、インスリン分泌不全が病態の中心であるが、マウスではMODYの病態を再現することはできず、ヒト組織で解析する必要がある。これまでに3種類のMODY4症例(MODY1が1例、MODY3が2例、MODY5が1例)の患者からiPS細胞を樹立したので、本研究では膵β細胞の効率的な分化法を検討することを目的とする。

今年度の大きな成果は2点あり、(1) iPS細胞から分化誘導したβ細胞のインスリンの産生量の増加ならびにグルコース応答性が改善できたことと(2) MODY患者由来のβ細胞から原因遺伝子であるHNFの変異mRNAの検出ができたことである。

(1) については昨年度に無血清、無フィーダー細胞の条件でiPS細胞からグルコースに反応する膵臓β細胞の分化誘導という目標は一部の株で達成できたが、iPS細胞の株間の違いにより、同じ培養条件ではグルコースに対する反応性が必ずしも一定しないことが問題となっていた。膵臓の発生段階を模した5段階のステップにおいて、最初のdefinitive endoderm (DE)に誘導する過程が非常に重要であり、誘導効率を上げるためには、DEへの分化は90%以上にすると考えて培養条件を見直した。ところがSox17の発現を分化マーカーにしてDEへの分化効率を90%以上にすると、その後の細胞の状態が悪くなり、かえって最終的なβ細胞においてグルコース応答性がなくなってしまうことが判明した。そこでDEへの分化効率を70-80%にとどめつつ、細胞の活きをよくするように培養液を調節することで、高濃度グルコースに反応して2倍程度のインスリン分泌を示すようなグルコース応答性をもつ膵臓β細胞を誘導できるようになった。誘導効率はまだ10%程度であり、効率を改善する余地は残っているが、インスリンの産生量は2000-3000pg/wellとこれまでの10倍以上に増加した。また京都大学から譲渡されたiPS細胞株2種類についても、同様なインスリン産生を認めたことから、iPS細胞株間の違いを乗り越えて、使用できるプロトコルの確立に向けて大きな前進がみられたことになる。

(2) についてはまずMODY3患者においてHNF-1αのP291fsinsCの変異によるフレームシフトがおこり、PTC (premature termination codon)が生じることが予想される症例を検討した。β細胞に誘導した細胞からmRNAを抽出し、PCRで増幅し、ゲノム配列を解析したところ、確かに変異mRNAが存在することが証明できた。MODYの遺伝子変異はヘテロ変異なので、理論的には正常と変異mRNAの発現は半々のはずであるが、正常のHNF-1αのmRNAに比べて変異mRNAは少量であり、NMD(nonsense mediated decay)が生じて変異mRNAが速やかに分解されていることが示唆された。そこでシクロヘキシミドを添加してタンパク合成を阻害すると、変異mRNAの量が相対的に増加したことより、実際にNMDが起こっていることが証明できた。次にMODY5の患者においてもHNF-1βにおけるR177X変異によるnonsense変異でPTCが形成されると予想されているので、同様にmRNAの解析をしたところ、変異mRNAの検出はできたが、NMDが起こって分解されていることが示唆された。MODYにおいては変異タンパクによるdominant negative効果が発症原因であるという説があるが、本症例において変異mRNAは速やかに分解されているので、変異タンパクが蓄積するとは考えにくく、変異タンパクが病態に関与している可能性は低いと思われる。一方でMODY3の1症例とMODY1の症例ではPTCが起こらない変異のため、NMDはみられず、正常と変異mRNAは同量検出された。

課題番号 : 24指115  
研究課題名 : MODY患者由来のiPS細胞を用いた糖尿病発症機序の解明  
主任研究者名 : 大河内仁志  
分担研究者名 : 安田和基  
分担研究課題 : 「MODY 由来 iPS 細胞を用いた、糖代謝関連分子の探索と機能解析」

キーワード : MODY, 遺伝子発現、nonsense-mediated decay  
研究成果 : MODY (maturity-onset diabetes of the young) は代表的な単一遺伝子病であり、その主な病態は、インスリン分泌障害であるが、MODYにおける膵β細胞障害の分子機序はほとんど不明であり、MODY原因遺伝子ごとの病態の違いも全く不明である。特にモデル動物とヒトとの間に種差があり、MODYの病態解明にはヒトの細胞を用いる必要がある。そこで原因遺伝子が明らかにされたMODY患者の細胞からiPS細胞を作製し、そこから分化を誘導した膵β細胞を用いて、機能異常の分子基盤の解析を行う。

当初の研究計画に比べ、iPS細胞由来の機能的なβ細胞の作製が難航していたため、当初は作成方法の違いによるiPS細胞の遺伝子発現の比較を行った。その結果、同一人に由来するiPS細胞の遺伝子発現は、作製法の違いによらず予想以上に近似しており、一方で由来する個人の差を大きく反映していた。

研究代表者大河内らが開発した、iPS細胞からのβ細胞分化系を用いて、研究代表者らとともにMODY-iPS細胞由来β細胞の表現型（機能異常、遺伝子発現変化）の検討に着手した。今回対象としたMODY患者は、それぞれMODY1 (*HNF4A*) R127W、MODY3 (*HNF1A*) P291fsinsC、MODY5 (*HNF1B*) R177Xの遺伝子異常をもつ。一般にMODYがヘテロ接合体の異常で発症する機序としては、機能的なタンパク量が少なくなるhaploinsufficiency、異常なタンパクが正常タンパクの働きも抑制するdominant negative機構、などが考えられる。MODY研究代表者大河内らは、分化誘導の途中段階からこれらの遺伝子の発現が認められること、ナンセンス変異 (*HNF1B* R177X) 及びフレームシフト (*HNF1A* P291fsinsC) による患者由来のiPS細胞では、分化誘導段階で、野生型のアリルに対して変異型のアリルのRNAが減少していること、cycloheximide処理で変異型アリルの発現が相対的に回復すること、を示している。こうしたデータを共同で吟味し、これらはpremature termination codonに対するnonsense-mediated decayによりRNA発現が低下し、haploinsufficiencyが生じていると考えられた。このように罹患臓器でのメカニズムがヒトで確認された例は非常に少なく、今後、こうした分化段階での遺伝子発現の変化、などを検討してゆく予定である。

課題番号 : 24指115

研究課題名 :

生細胞ミトコンドリア機能評価システムを用いた MODY 由来 iPS 細胞誘導・細胞機能の評価、ならびに新規 MODY 遺伝子の同定

主任研究者名 : 大河内仁志

分担研究者名 : 岩崎直子

キーワード : 糖尿病、MODY、 $\beta$ 細胞、ミトコンドリア、次世代シーケンサー

研究成果 :

インスリン分泌障害は糖尿病の発症機序において主要な役割を担っている。このインスリン分泌障害を遺伝的に有するMODY (maturity onset diabetes of the young) は1種類の遺伝子の機能障害によって糖尿病を発症することからヒト糖尿病の成因研究において重要な疾患モデルである。原因遺伝子が未だ明らかにされていないMODY家系も多数存在しており、このような家系から新たなMODY遺伝子が同定することによって糖尿病の成因を明らかにすることができると期待される。また、 $\beta$ 細胞の機能異常を評価する方法も多岐に渡るが、生細胞ミトコンドリア機能評価システムを用いて、MODYiPS細胞由来 $\beta$ 細胞予定である。

35名から構成される若年発症糖尿病の1家系を対象とし、連鎖解析によって染色体6番上にその原因遺伝子が存在する可能性を既に報告した。本家系は、既知のMODY遺伝子に変異が認められず、その他の既知MODY遺伝子の存在領域にも有意なロッドスコアが得られなかった事から、新規MODY遺伝子の同定を目的として次世代シーケンサーを用いたwhole exome sequenceを施行した。

最初に実施した1回目のwhole exome sequenceではMODY患者3名と家系内の非糖尿病患者1名を対照とし、合計4名のゲノムを用いてSoLiDにより解析した。Paired-end解析の3名の平均Total read数は約450M、Mapped readは約300M、Total bases mapping to targetは4.7G、Mean target coverageは約100回であった。1塩基置換変異が156,959個、挿入欠失変異が262個、合計164935個得られ、うちアミノ酸置換を伴う変異は20,599個であった。1000GenomeとdbSNPに非登録で、染色体6、7または22のロッドスコア2以上の場所に存在し、正常者に認めない変異は12個に絞られた。さらに、当初の連鎖解析データに基づいて染色体6番、次に可能性が否定できない7番と22番の3つの染色体上にあつて、polyphen-2>0.15、かつSIFT<0.05を満たすという条件で絞ったところ、最終的に6つのVariant (SNP) が選択された。この6種類のSNPが存在する遺伝子はFOXP4、PRICKLE4、CUL9、ZNF318、C6orf154、HMGCLL1であり、家系内の患者において伝達を確認したところ、FOXP4とCUL9の両方において病型と遺伝子型が対応していた。次のステップとして、原因遺伝子不明のMODY発端者34名を対照としてFOXP4遺伝子とCUL9遺伝子の全エクソンについてシーケンスを行い、これらの遺伝子に変異を有する患者の検索を実施した。その結果、FOXP4遺伝子エクソン11に(Chr6:41,557,897;C>T) P449Lヘテロ変異、Polyphen 2 (0.941) and SIFT (0.000)を有する1例、CUL9 遺伝子にエクソン14に(Chr6:43,167,697;C>T) R1063Cヘテロ変異、Polyphen 2 (0.999) and SIFT (0.00)を有する1例を認めた。

以上から、本来1種類の遺伝子により発症が規定される可能性のある家系に2種類の遺伝子において変異が同定される結果となったが(2012年、欧州糖尿病学会およびIDF meetingで発表)、その原因として、今回のSoLiDにより解析した4名のうち、Fragment 解析1名を実施した1例では、paired-end 解析3名と比較して情報量が小さく、10x coverageの割合は53%であり(他3名は81%、84%、74%)、十分なqualityとは言えない、すなわち解析に用いたデータ自体が不十分であった可能性が考えられた。このため、新たに理研ジェネシスに、MODY2例と対照1例、合計3例の次世代シーケンサーによるwhole exome解析を実施し、同じ結果が出るのか、あるいは新規の可能性が得られるか、染色体を問わずに再検討する必要がある。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 24指115

研究課題名： MODY患者由来のiPS細胞を用いた糖尿病の発症機序ならびに病態の解明

主任研究者名： 大河内仁志

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles.	Hikichi T, Matoba R, Ikeda T, Watanabe A, Yamamoto T, Yoshitake S, Tamura-Nakano M, Kimura T, Kamon M, Shimura M, Kawakami K, Okuda A, Okochi H, Inoue T, Suzuki A, Masui S	Proc Natl Acad Sci	110(16):6412-7	2013
Genome-wide association study identifies three novel loci for type 2 diabetes	Hara K, Fujita H, Johnson TA, Yamauchi T, Yasuda K, Horikoshi M, Peng C, Hu C, Ma RC, Imamura M, Iwata M, Tsunoda T, Morizono T, Shojima N, So WY, Leung TF, Kwan P, Zhang R, Wang J, Yu W, Maegawa H, Hirose Hi DIAGRAM Consortim, Kaku K, Ito C, Watada H, Tanaka Y, Tobe K, Kashiwagi A, Kawamori R, Jia W, Chan JC, Teo YY, Shyong TE, Kamatani N, Kubo M, Maeda S, Kadowaki T.	Hum Mol Genet	23(1): 239-246	2014
Quantitative assessment of pdx1 promoter activity in vivo using a secreted luciferase reporter system	Nishimura W, Eto K, Miki A, Goto M, Kawaguchi M, Nammo T, Udagawa H, Hiramoto M, Shimizu Y, Okamura T, Fujiwara T, Yasuda Y, Yasuda K.	Endocrinology	154(11): 4388-4395	2013
GLP-1-related proteins attenuate the effects of mitochondrial membrane damage in pancreatic $\beta$ cells	Makiko Ogata, Naoko Iwasaki, Risa Ide, Miho Takizawa, Yasuko Uchigata	Biochem Biophys Res Commun	25;447(1):133-8	2014

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
単一遺伝子異常による糖尿病 (MODY) 患者由来ヒトiPS細胞の樹立	矢部茂治、岩崎直子、浜崎辰夫、今野雅允、大河内仁志	第12回日本再生医療学会	横浜	2013年3月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
MODY原因遺伝子の現状と診断の進め方	岩崎直子、他	医学のあゆみ	244:1030-1034	2013

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当無し				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。  
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。