

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

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。

大河内仁志 :

(1) iPS細胞から膵臓β細胞への分化と機能解析

ヒト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、健常人由来の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。そもそもiPS細胞は同じ線維芽細胞から樹立しても株毎に性質が異なることがわかり、報告されているプロトコールに従ってもなかなか結果を再現できなかったので、細胞株毎に培養条件の最適化が必要と考えた。膵臓の発生段階を模倣した培養プロトコールにおいて、最初の段階のdefinitive endodermへの分化が鍵を握ると考えて、内胚葉のマーカーであるSOX17の発現を指標にして検討した。Activinに加えてGSK-3βの阻害剤であるCHIR99021とFGF2とBMP4を添加すると、ほぼ100%SOX17が陽性となった。特に分化の最終段階において細胞を培養皿からはがして、強制的に凝集塊を作らせると膵臓β細胞の成熟化が促進することを見いだした。インスリンの産生量も5000-20000pg/wellと昨年よりさらに10倍以上に増加し、*in vitro*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。凝集塊の免疫染色にてc-ペプチド陽性を示すインスリン産生細胞は30-40%に認められた。グルカゴン陽性細胞は10%未満であった。免疫不全マウス(NOD/SCID)にストレプトゾトシン(STZ)を投与して糖尿病モデルマウスを作製したのち、これらの細胞 4×10^6 個を腎被膜下に移植して、血糖降下を検討した。高血糖状態の長く続いたマウスに細胞移植すると随時血糖測定においてほとんど血糖降下は認められなかった。移植して4週間以降の腎臓の組織を検討した所、移植細胞の生着は確認されたが、ほとんどの細胞はグルカゴン陽性のα細胞になっていることが判明した。

(2) MODY患者由来の細胞から変異mRNAの検出

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。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-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。変異mRNAの検出はできたが、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

したことから、やはり 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。これらの結果は Journal of Diabetes Investigation に投稿し、受理された。

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

1. 健常人、及び MODY3 患者一名から、レトロウイルスを用いて確立した iPS 細胞（それぞれ 6 株、4 株）と、センダイウイルスを用いた iPS 細胞（それぞれ 4 株、2 株）について、Affymetrix 社 GeneChip システムにより、遺伝子発現を網羅的に比較した。

その結果を以下に記す。

1) 同一人から同じ方法により確立した iPS 細胞についても、株間で遺伝子発現に違いがみられるが、その差は比較的小さく（2 倍以下のことが多い）、特に機能的なパスウェイなどで一定の傾向は認めなかった。

2) 同一人から、センダイウイルスとレトロウイルスという異なるベクターを用いて作製した iPS 細胞同士では、発現に 2 倍以上の変化がみられる遺伝子も少なくないが、株間で差がみられ、使用したベクターによる一定の傾向は認められなかった。

LOC51142 という遺伝子の発現が、健常人、MODY 患者に共通して、レトロウイルスで作成した iPS 細胞のほうで低下していたが、この遺伝子の機能は知られておらず、遺伝子発現低下の意義は全く不明である。

3) 由来する個人による発現遺伝子の差では、2 倍以上の差が再現性よく認められる遺伝子が相当数みとめられたが、遺伝子レベルで検討すると、MODY 由来 iPS 細胞で発現が大きく上昇している遺伝子の多くが Y 染色体の遺伝子であった。この傾向は特にセンダイウイルスで作製した iPS 細胞で顕著で、MODY 由来で発現が増加している遺伝子の 9 割前後が Y 染色体遺伝子であった。またレトロウイルス、センダイウイルスの両者で共通に、MODY で増加していた遺伝子も多いが、そのほとんどが Y 染色体遺伝子であった (*ZFY*, *EIF1AY*, *DBY*, *TTY15* など)。分担研究者は性別を知らされていなかったが、後日健常対照、MODY 患者がそれぞれ女性、男性だったことが判明した。ただし、こうした遺伝子の多くは精巣での発現が報告されており、獲得した未分化性との関連も否定できない。

4) レトロウイルスで作製した iPS 細胞では、このほかにも個人による発現差が大きい遺伝子が散見された。特に MODY 由来の iPS 細胞で、健常対照者由来 iPS 細胞に比べ、細胞外基質やその代謝に関連する遺伝子の発現増加をみとめた (*LUM*, *COL3A1*, *HAPLN1* など)。これらは MODY 遺伝子との関連は考えにくいため、個人の遺伝的背景の違いを反映する可能性が高いが、もとの皮膚線維芽細胞の性質が少し残ってしまっている可能性もあり、DNA メチル化状態など、ほかの方法で iPS 細胞の「質」の検討が必要かもしれない。

以上のように、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。

2. MODY 原因遺伝子の多くは転写因子であるが、膵β細胞における転写因子の役割としては、細胞特異的な分子の転写のほか、膵β細胞の発生・分化、増殖、分化度の維持、などへの寄与も注目されている。そこで膵β細胞に最も重要な転写因子の一つである MafA を対象にマウスでこうした点を検討した。MafA 欠損マウスでは、生下時の膵β細胞数は野生型と有意差はないが、その後 4-8 週で膵β細胞量が野生型より少ないことから、MafA が生後の膵β細胞の増殖に必要なことを示した。MafA の標的遺伝子のうち、この膵β細胞増殖作用を仲介する可能性のある分子として、プロラクチン受容体 (*Pr1r*)、及びサイクリン D2 (*Ccnd2*) を報告した (Eto K et al, PLoS One 2014)。また細胞の運命を追跡する lineage tracing の手法により、MafA 欠損マウスでは、インスリン陽性細胞が、

インスリン発現を失った内分泌細胞になり、ごく一部はグルカゴン陽性細胞に「分化転換」してしまうことを明らかにした。膵β細胞からα細胞の転換は、糖尿病などの MafA の発現が低下した状態でも報告され近年注目されており、MafA が成熟した膵β細胞の分化度の維持に重要であることが示された (Nishimura et al, Diabetologia 2015)。このように転写因子の異常は膵β細胞の様々な表現型に関わる可能性があり、MODY 由来 iPS 細胞から樹立した膵β細胞で今後検討してゆく上で有用な情報と思われる。

岩崎直子: 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

①-1 35名から構成される若年発症糖尿病の1家系 (MODY家系、ppt-1) 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。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。しかし、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 (2012年, 欧州糖尿病学会およびIDF meetingで発表)。その原因として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%)、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、再度理研ジェネシスにおいてMODY2例と対照1例の計3例の次世代シーケンサーによるwhole exome解析を実施した (ppt-1)。アウトプットデータは得られているが、最終的にサンガーシーケンスで確認するvariantsを選択する作業を行っているところである。

①-2 30歳未満診断非自己免疫型糖尿病患者276名を対象としてMODY1, 2, 3, 5, Wolfram 症候群遺伝子の検討を行い、39名 (14.1%) にいずれかの変異を同定した。変異陽性者の23.0%で家族歴が明らかでなく、変異陽性群は陰性群と比較して有意に診断時年齢が若く、既往最大BMIは低値であった。過去最大BMIが23.3以下、診断時年齢18歳以下では積極的に単一遺伝子異常による糖尿病を疑う必要があると考えられた (2015年日本糖尿病学会で発表) (ppt-1)。

②日本人2型糖尿病で関連が認められた LSS 遺伝子について、既に韓国人において関連の再現性は認められた。英国人とデンマークではほとんど関連は認められなかった。同じ中国人についてあらたに検討したところ、以外にも関連は認められなかった。この理由は明らかではないが、別の研究で中国人集団のゲノム構造は日本人と韓国人とは異なる系統樹上に位置する事が示されたが、これが関係している可能性がある

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 β cell、diabetes mellitus

Maturity-onset diabetes of the young (MODY) is a heterozygous monogenic diabetes; more than 13 disease genes have been identified. However, the pathogenesis of MODY is not fully understood because of inaccessibility to pancreatic beta cells of the patients. The objective of this study was to establish MODY patient-derived iPS (MODY-iPS) cells and to investigate the pathogenic mechanism of MODY by inducing pancreatic beta cells from MODY-iPS cells. Non-integrating Sendai virus (SeV) was introduced as a vector to establish the MODY-iPS cells using fibroblast derived from patients with MODY. Then we differentiated these MODY-iPS cells into pancreatic beta cells using a five stage protocol mimicking the developmental process. Expressions of each stage markers and causative gene were confirmed by RT-PCR, and transcripts of the causative genes were cloned and sequenced. 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 confirmed and cloned: HNF1a; beta stage, HNF1b; primitive gut tube stage (PGT), HNF4a; primitive gut tube stage (PaGT). 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 disrupted by nonsense mediated mRNA decay (NMD) in differentiated MODY-iPS cells. These results indicate that those MODY may be caused by a haplo-insufficiency effect rather than a dominant negative manner.

Pancreatic β 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 different effect between lots. We added FGF2, CHIR99021 and BMP4 in the presence of Activin A, resulting in not only higher positive rate of Sox17 but also greater viability than FGF2, BMP4 and Activin A treated group. Expression of marker genes for each stage was investigated by RT-PCR : definitive endoderm (DE), Sox17, FoxA2; primitive gut tube (PGT), HNF1b, HNF4a; posterior foregut (PFG), HNF6, HB9; endocrine progenitor (EP), Nkx6.1, pdx1; beta like cells (beta); insulin, HNF1a. We found spheroid formation in the last stage improved the function of pancreatic β cells. We detected insulin and glucagon gene expression after 4 weeks culture by RT-PCR. Immunohistochemical analysis revealed that approximately 30% of the cells were positive for c-peptide. We measured insulin concentration secreted to the media by ELISA and detected 5000-20000 pg/ml of insulin, which was ten times more

than last year. Moreover, we confirmed glucose response of induced β cell by increasing glucose concentration from 3 mM to 25 mM in the media.

When we transplanted 4×10^6 cells of iPS-derived cells under the kidney capsule of NOD/SCID diabetic model mice in which STZ (streptozotocin) were injected intravenously in advance. We could not normalize the blood glucose level, because immunohistological examination revealed that almost all the donor cells were glucagon positive 4 weeks later.

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: Because HNF1b and HNF4a were expressed at the PGT stage, and HNF1a was expressed at the beta stage, we obtained HNF1b and HNF4a mRNAs from the PGT stage and the HNF1a transcript from the beta 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. These results were accepted in Journal of Diabetes Investigation this year.

Gene expression analysis of iPS cells by using GeneChip microarray system

iPS cells from healthy control and MODY3 patient were examined by GeneChip microarray system. Even if the iPS cells were established by the same method and the same donor, each iPS cell line showed different expression pattern. However the extent of difference was more diverse between individuals rather than between the cell lines in the same origin. Therefore we must be careful about evaluating the data when comparing the gene expression of iPS cells between different origin.

We paid attention to the transcription factors such as MafA and demonstrated that MafA was required for the proliferation of neonatal pancreatic β cells because the number of pancreatic β cells was the same at birth between wild type mice and MafA knock out mice, but the number of pancreatic β cells of MafA KO mice was much less than that of wild ones 4 weeks later. We also demonstrated that MafA played an important role on maintaining the adult pancreatic β cells because insulin positive cells converted to glucagon positive cells in adult MafA KO mice.

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 exome sequence of these genes and we found several heterozygous mutations.

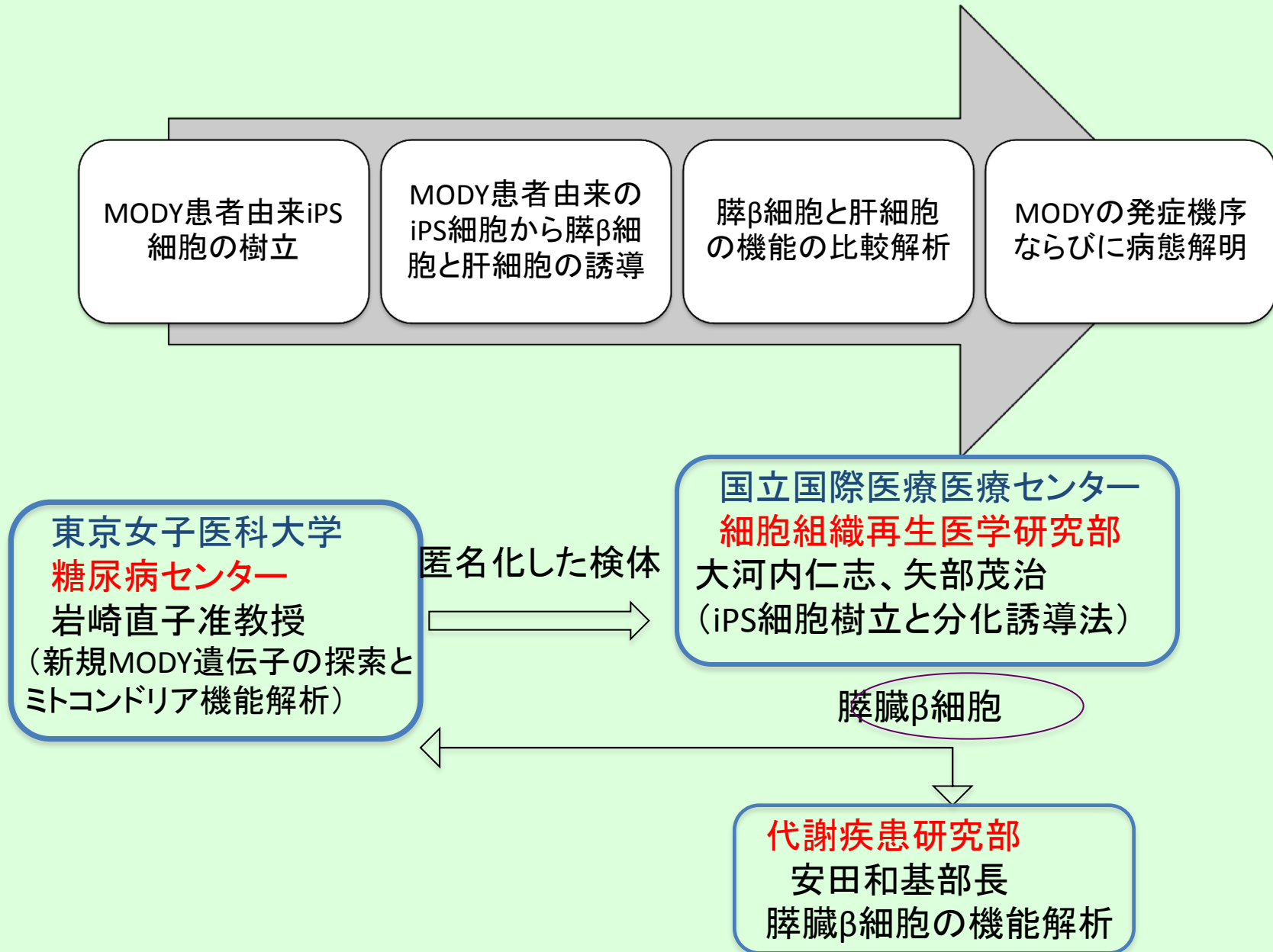
Researchers には、分担研究者を記載する。

We are now confirming the data again using next generation sequencer to increase the rate of coverage.

When we examined the genomic sequence of 276 diabetic patients who were under 30 years old and non-autoimmune diabetes, we detected one of the mutation among MODY1, 2, 3, 5 and Wolfram syndrome in 39 cases (14.1%). Twenty-three % of them had no family history. We should be careful about young diabetic patients for monogenic diabetes.

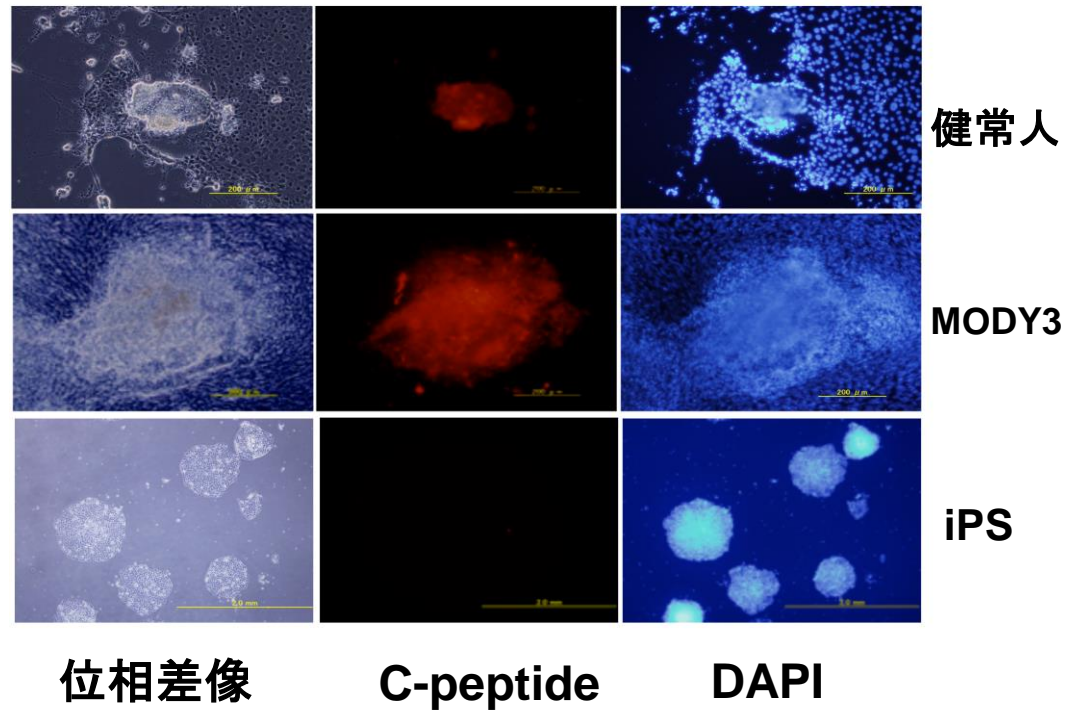
24指115 研究の概要

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

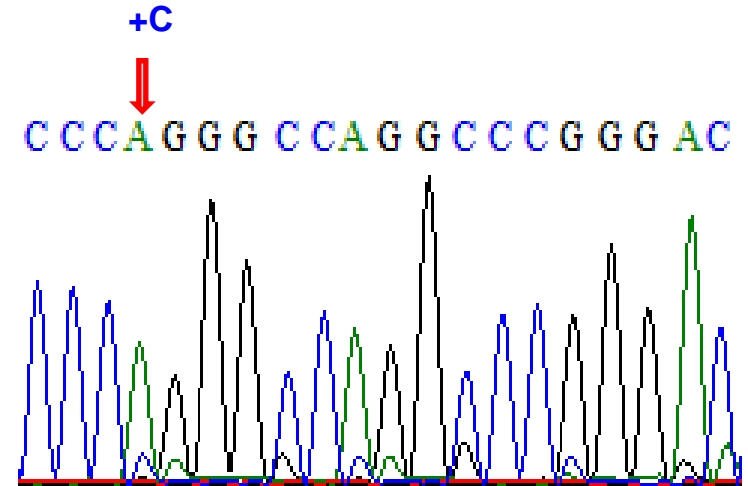
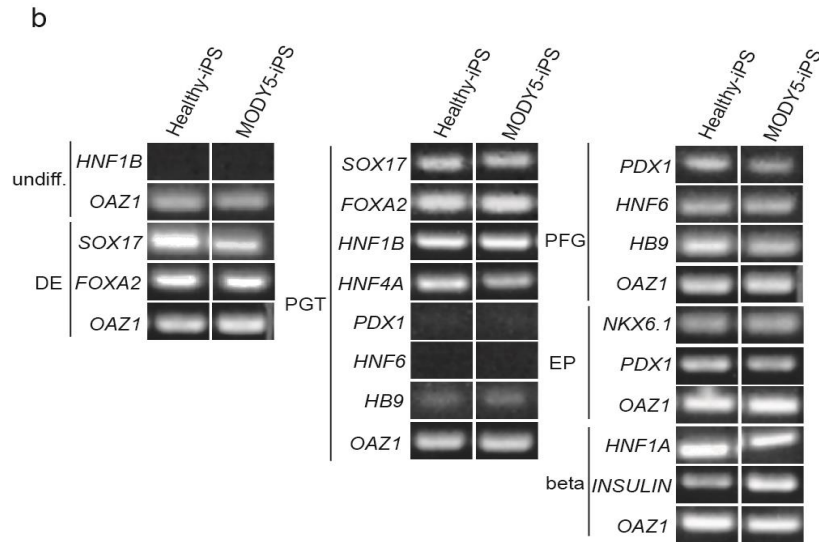
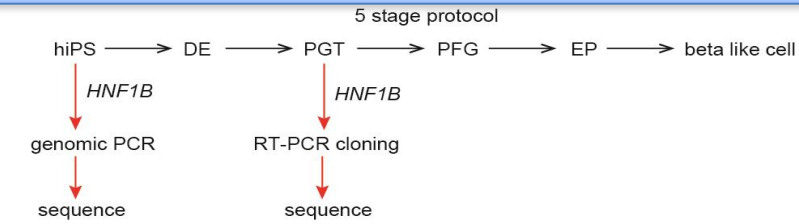


iPS細胞から膵β細胞への分化誘導

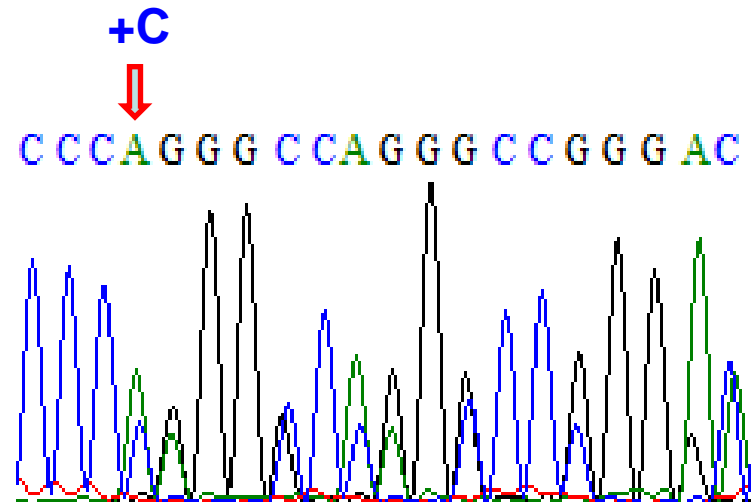
レトロウイルス法で
MODY3の2例樹立
センダイウイルス法で
MODY1: 1例
MODY3: 2例
MODY5: 1例樹立



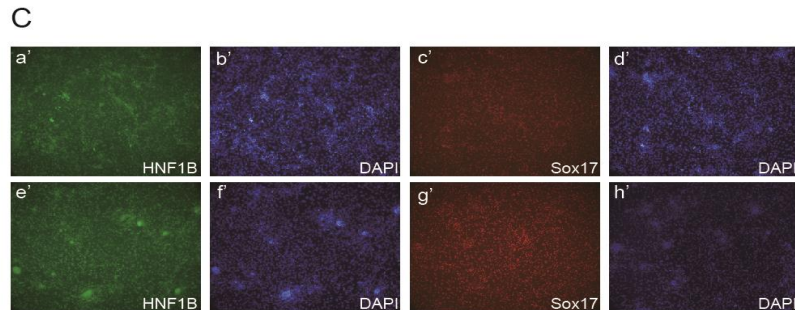
MODY3患者の変異HNF1a遺伝子のmRNAは通常では速やかに分解されてしまうが、シクロヘキシミド(CHX)添加で分解が抑制された。



P291fsinsC mRNA



P291fsinsC mRNA (+CHX)

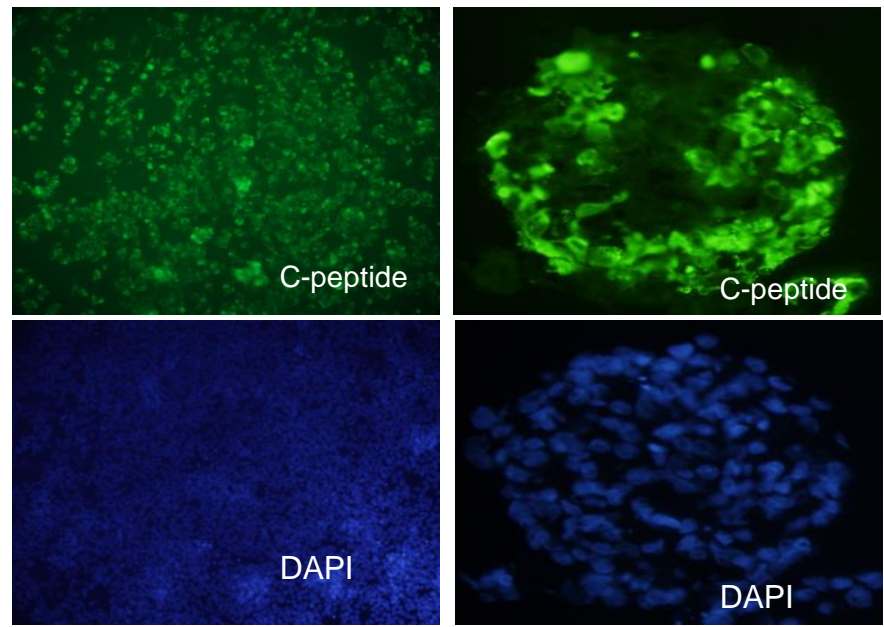


Spheroid化によって誘導したβ細胞のインスリン産生とグルコース応答性は向上する

Stage	0d	1.5d	5d	7d	11d	14d	17d	23d	
	DE	DE	PGT	PFG	PP	EP	beta		
	monolayer							spheroid	
Medium	1640	1640	1640	DMEM	DMEM	Ad-DMEM	Ad-DMEM		
Supp.	KSR	KSR	B27	B27	B27	B27	B27		
GF	FGF2+Act+ BMP4	Act	FGF2+FGF7	FGF2	FGF10		BMP4+FGF2 +HGF+IGF		
SM	CHIR99021		RA+SB +DM+S1	RA+SB +DM+S1	DM+A5ii +ILV	DM+A5ii +Ex4	NIC+Frk +Ex4		

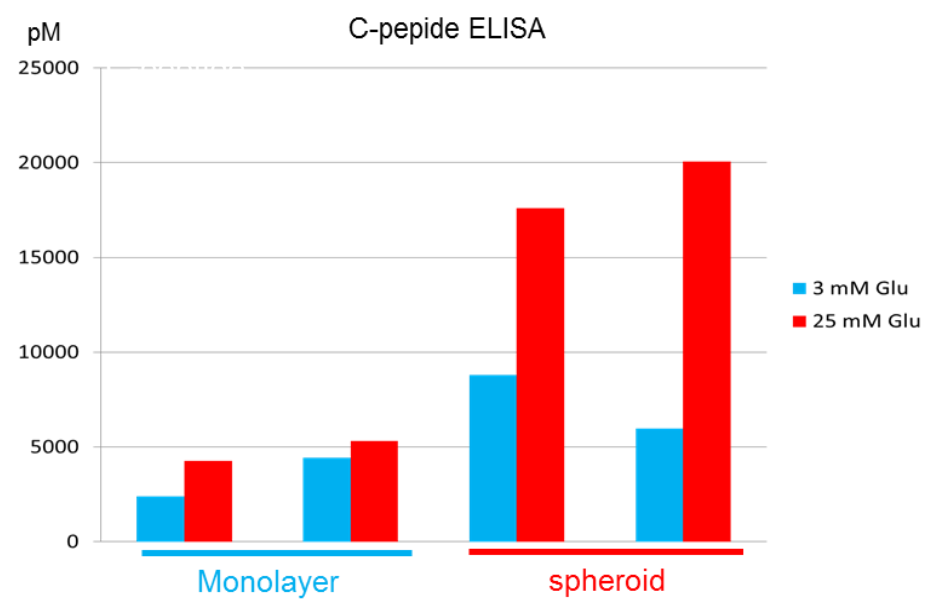
Ad-DMEM: Advanced DMEM

S1: SANT1, DM: dorsomorphin, RA: retinoic acid, SB: SB431542, A5ii: ALK5 inhibitor II
 ILV: Indolactam V, Ex4: Exendin-4, NIC: Nicotinamide, Frk: forskolin



Monolayer

Spheroid



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%以上にすると必要があ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。これまで誘導効率はまだ10%程度であったが、分化の最終段階で平面培養から凝集塊を作成(スフェロイド作成)すると、誘導効率が改善するのみならず、インスリン産生量が大幅に改善した。具体的にはインスリンの産生量はELISA法の測定で2000-3000pg/wellであったものが、5000-20000pg/wellとこれまでの10倍程度に増加した。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。凝集塊の免疫染色にてc-ペプチド陽性を示すインスリン産生細胞は30-40%に認められた。グルカゴン陽性細胞は10%未満であった。免疫不全マウス(NOD/SCID)にストレプトゾトシン(STZ)を投与して糖尿病モデルマウスを作製したのち、これらの細胞 4×10^6 個を腎被膜下に移植して、血糖降下を検討した。高血糖状態の長く続いたマウスに細胞移植すると随時血糖測定においてほとんど血糖降下は認められなかった。移植して4週間以降の腎臓の組織を検討した所、移植細胞の生着は確認されたが、ほとんどの細胞はグルカゴン陽性のα細胞になっていることが判明した。

(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た。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。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。これらの結果は *Journal of Diabetes Investigation* に投稿し、受理された。

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、転写因子

研究成果 : 単一遺伝子病である MODY (maturity onset diabetes of the young) の主な病態は、インスリン分泌障害であり、一般の 2 型糖尿病の発症機序においてもインスリン分泌障害は最も重要な因子である。しかし、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。さらにモデル動物はヘテロ変異で糖尿病を呈さないという種差があり、MODY の病態解明にはヒトの細胞を用いる必要があるが、患者から膵β細胞を取り出すことは臨床的に不可能であった。そこで原因遺伝子が明らかにされた MODY 患者由来 iPS 細胞から分化誘導した膵β細胞を用いて、機能異常の分子基盤の解析を行い、さらに MODY だけでなく一般の 2 型糖尿病の、発症機序や病態の解明を目指すこととなった。

1. 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、まず同一人由来の体細胞から異なる作成方法で樹立した iPS 細胞を遺伝子発現の点から比較を行った。初期化遺伝子の導入ベクターとしてレトロウイルスとセンダイウイルスが用いられるが、外来遺伝子がゲノムに組みまれて安定的に発現するか、一定期間後に脱落するか、という違いがあり、それが iPS 細胞の質や、その後の分化誘導効率などに影響する可能性がある。そこで、健常人、及び MODY3 患者一名から、レトロウイルスを用いて確立した iPS 細胞 (それぞれ 6 株、4 株) と、センダイウイルスを用いた iPS 細胞 (それぞれ 4 株、2 株) について、Affymetrix 社 GeneChip システムにより、遺伝子発現を網羅的に比較した。

その結果を以下に記す。

- 1) 同一人から同じ方法により確立した iPS 細胞についても、株間で遺伝子発現に違いがみられるが、その差は比較的小さく (2 倍以下のことが多い)、特に機能的なパスウェイなどで一定の傾向は認めなかった。
- 2) 同一人から、センダイウイルスとレトロウイルスという異なるベクターを用いて作製した iPS 細胞同士では、発現に 2 倍以上の変化がみられる遺伝子も少なくないが、株間で差がみられ、使用したベクターによる一定の傾向は認められなかった。*LOC51142* という遺伝子の発現が、健常人、MODY 患者に共通して、レトロウイルスで作成した iPS 細胞のほうで低下していたが、この遺伝子の機能は知られておらず、遺伝子発現低下の意義は全く不明である。
- 3) 由来する個人による発現遺伝子の差では、2 倍以上の差が再現性よく認められる遺伝子が相当数みとめられたが、遺伝子レベルで検討すると、MODY 患者由来 iPS 細胞で発現が大きく上昇している遺伝子の多くが Y 染色体の遺伝子であった。この傾向は特にセンダイウイルスで作製した iPS 細胞で顕著で、MODY 由来で発現が増加している遺伝子の 9 割前後が Y 染色体遺伝子であった。またレトロウイルス、センダイウイルスの両方で共通に、MODY で増加していた遺伝子も多いが、そのほとんどが Y 染色体遺伝子であった (*ZFY*, *EIF1AY*, *DBY*, *TTY15* など)。分担研究者は性別を知らされていなかったが、後日健常対照、MODY 患者がそれぞれ女性、男性だったことが判明した。ただし、こうした遺伝子の多くは精巣での発現が報告されており、獲得した未分化性との関連も否定できない。
- 4) レトロウイルスで作製した iPS 細胞では、このほかにも個人による発現差が大きい遺伝子が散見された。特に MODY 由来の iPS 細胞で、健常対照者由来 iPS 細胞に比べ、細胞外基質やその代謝に関連する遺伝子の発現増加をみとめた (*LUM*, *COL3A1*, *HAPLN1* など)。これらは MODY 遺伝子との関連は考えにくいいため、個人の遺伝的背景の違いを反映する可能性が高いが、もとの皮膚線維芽細胞の性質が少し残ってしまっている可能性もあり、DNA メチル化状態など、ほかの方法で iPS 細胞の「質」の検討が必要かもしれない。

以上のように、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。

2. 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 (Yabe S et al, J Diabetes Invest, published online)。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。
3. MODY 原因遺伝子の多くは転写因子であるが、膵 β 細胞における転写因子の役割としては、細胞特異的な分子の転写のほか、膵 β 細胞の発生・分化、増殖、分化度の維持、などへの寄与も注目されている。そこで膵 β 細胞に最も重要な転写因子の一つである MafA を対象にマウスでこうした点を検討した。MafA 欠損マウスでは、生下時の膵 β 細胞数は野生型と有意差はないが、その後 4-8 週で膵 β 細胞量が野生型より少ないことから、MafA が生後の膵 β 細胞の増殖に必要なことを示した。MafA の標的遺伝子のうち、この膵 β 細胞増殖作用を仲介する可能性のある分子として、プロラクチン受容体 (*Pr1r*)、及びサイクリン D2 (*Ccnd2*) を報告した (Eto K et al, PLoS One 2014)。また細胞の運命を追跡する lineage tracing の手法により、MafA 欠損マウスでは、インスリン陽性細胞が、インスリン発現を失った内分泌細胞になり、ごく一部はグルカゴン陽性細胞に「分化転換」してしまうことを明らかにした。膵 β 細胞から α 細胞の転換は、糖尿病などの MafA の発現が低下した状態でも報告され近年注目されており、MafA が成熟した膵 β 細胞の分化度の維持に重要であることが示された (Nishimura et al, Diabetologia 2015)。このように転写因子の異常は膵 β 細胞の様々な表現型に関わる可能性があり、MODY 由来 iPS 細胞から樹立した膵 β 細胞で今後検討してゆく上で有用な情報と思われる。

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 : 2型糖尿病、MODY、 β 細胞、LSS、ミトコンドリア、次世代シーケンサー

研究成果 :

①-1 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、この様な家系から新たな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。

35名から構成される若年発症糖尿病の1家系 (MODY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。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。しかし、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 (2012年, 欧州糖尿病学会およびIDF meetingで発表)。その原因として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%)、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、再度理研ジェネシスにおいてMODY2例と対照1例の計3例の次世代シーケンサーによるwhole exome解析を実施した。アウトプットデータは得られているが、最終的にサンガーシーケンスで確認するvariantsを選択する作業を行っているところである。

①-2 若年発症非自己免疫性糖尿病集団におけるMODYもしくは単一遺伝子病としての糖尿病の頻度は未だ明らかにされていない。

30歳未満診断非自己免疫型糖尿病患者276名を対象としてMODY1, 2, 3, 5, Wolfram症候群遺伝子の検討を行い、39名 (14. 1%) にいずれかの変異を同定した。変異陽性者の23. 0%で家族歴が明らかでなく、変異陽性群は陰性群と比較して有意に診断時年齢が若く、既往最大BMIは低値であった。過去最大BMIが23. 3以下、診断時年齢18歳以下では積極的に単一遺伝子異常による糖尿病を疑う必要があると考えられた (2015年日本糖尿病学会で発表)。

②2型糖尿病は多因子疾患であるが、その成因に人種差が存在する事が注目されている。我々は罹患同胞対法によって得られたデータを基に新規の日本人2型糖尿病感受性SNPを2種類見出し、うち1つがKCNJ15遺伝子内に存在することを報告し、もう一方がLSS (Lanosterol synthase) 遺伝子内に存在する事を見出した。このSNPの人種による2型糖尿病発症への関連を検討する必要がある。

日本人2型糖尿病で関連が認められたLSS遺伝子について、既に韓国人において関連の再現性は認められた。英国人とデンマークではほとんど関連は認められなかった。同じ中国人についてあらたに検討したところ、以外にも関連は認められなかった。この理由は明らかではないが、別の研究で中国人集団のゲノム構造は日本人と韓国人とは異なる系統樹上に位置する事が示されたが、これが関係している可能性がある (2015年第75回米国糖尿病学会、ならびに第58回日本糖尿病学会で発表)。現在論文はほぼ完成。

③ β 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 β 細胞予定である。本年度は、本検討に用いるためのMODYiPS細胞由来 β 細胞が得られていないため、入手でき次第本検討を行う予定である。

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
Establishment of maturity-onset diabetes of the young (MODY)-induced pluripotent stem cells from a Japanese patient.	Yabe S, Iwasaki N, Yasuda K, Hamazaki T, Konno M, Fukuda S, Takeda F, Kasuga M, Okochi H.	J Diabetes Invest	published online	2015
MafA is critical for maintenance of the mature beta cell phenotype in mice.	Nishimura W, Takahashi S, Yasuda K.	Diabetologia	58(3)	2015
Generation and characterization of MafA-Kusabira Orange mice.	Nishimura W, Oishi H, Funahashi N, Fujiwara T, Takahashi S, Yasuda K.	Endocr J	62(1)	2015
Murine Insulinoma Cell-Conditioned Medium with BETA2/Neurod1 Transduction Efficiently Induces the Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells into β -Like Cells both In Vitro and In Vivo.	Kawamoto K, Yabe S. et al.	J Stem Cell Res Ther	4	2014
MafA is required for postnatal proliferation of pancreatic β -cells.	Eto K, Nishimura W, Oishi H, Udagawa H, Kawaguchi M, Hiramoto M, Fujiwara T, Takahashi S, Yasuda K.	PLoS One	9(8)	2014
Quantitative assessment of pdx1 promotor 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)	2013
A sibling case of Wolfram syndrome with a novel mutation Y652X in WFS1.	Iwasaki N, Fukawa K, et al.	Diabetology International	5(2)	2014
GLP-1 related proteins attenuate the effects of mitochondrial membrane damage in pancreatic beta-cells.	Ogata M, Iwasaki N, Fujimaki R, Takiazawa M, Uchigata Y	Biochemical and Biophysical Research Communications	447(1)	2014

研究発表及び特許取得報告について

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
遺伝性糖尿病 (MODY) 患者由来iPS細胞の膵β細胞分化過程におけるNMDによるMODY変異mRNAの分解	矢部茂治、岩崎直子、安田和基、浜崎辰夫、福田沙月、大河内仁志	第14回日本再生医療学会	横浜	平成27年3月
「転写因子MafAは成熟膵β細胞の機能維持に重要である」	西村渉、三木玄方、大江総一、木戸敬治、中井吉保、高橋智、安田和基、野田泰子	第120回日本解剖学会総会・全国学術集会	京都	平成27年3月21-23日
「糖尿病と遺伝子-今、臨床でどこまで応用できるのか-」	安田和基	湖東糖尿病セミナー	彦根	平成27年1月24日
「次世代シーケンサーとは、どのようなものか？」	安田和基	糖尿病遺伝子Basic Seminar	東京	平成26年11月26日
MafA is important for maintenance of the mature beta-cell phenotype.	Nishimura W, Kawaguchi M, Udagawa H, Funahashi N, Nammo T, Yasuda K.	9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress.	International Conference Center, Kyoto	Sep 12-14, 2014.
「教育講演：遺伝子異常と糖尿病」	安田和基	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	平成26年5月
「細胞系譜追跡実験による膵β細胞障害の時間経過の解析」	西村渉、川口美穂、宇田川陽秀、衛藤弘城、舟橋伸昭、南茂隆生、平本正樹、安田和基	第51回日本臨床分子医学会学術集会	東京	平成26年4月11日-12日
「転写因子MafAによる膵β細胞の分化可塑性制御」	西村渉、川口美穂、宇田川陽秀、衛藤弘城、舟橋伸昭、南茂隆生、平本正樹、安田和基	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	平成26年5月
「糖尿病の遺伝子と臨床」	安田和基	第32回糖尿病研修セミナー	東京	平成26年10月19日
「MafA KOマウスβ細胞のlineage tracing study」	西村渉、川口美穂、宇田川陽秀、南茂隆生、安田和基	分子糖尿病学シンポジウム	大阪	平成25年12月
「Lineage tracingによる膵β細胞障害の解析」	西村渉	第5回北海道若手糖尿病研究会	札幌	平成25年10月
「教育講演：糖尿病診療に遺伝情報は役立つのか」	安田和基	第13回糖尿病・情報学会	徳島	平成25年8月
Application of MODY probability calculator for Japanese patients with MODY3.	N Iwasaki, M Takizawa et al	73rd Annual meeting of American Diabetes Association	Chicago	2013年6月

研究発表及び特許取得報告について

「分泌型ルシフェラーゼによる膵島の評価」	西村渉、衛藤弘城、三木厚、南茂隆生、川口美穂、宇田川陽秀、平本正樹、佐久間康成、安田是和、安田和基	第56回日本糖尿病学会年次学術集会	熊本	平成25年5月
「糖尿病の遺伝子と臨床」	安田和基	第23回糖尿病研修セミナー	東京	平成25年2月
「糖尿病の遺伝因子」	安田和基	第24回糖尿病研修セミナー	東京	平成25年3月
「糖尿病の遺伝子と臨床」	安田和基	第28回糖尿病研修セミナー	神戸	平成25年12月
「分泌型ルシフェラーゼを利用した生体におけるPdx1プロモーター活性の定量的評価」	西村渉、衛藤弘城、川口美穂、南茂隆生、宇田川陽秀、平本正樹、安田和基	第35回日本分子生物学会	福岡	平成24年12月
「膵β細胞における転写因子MafAの機能解析」	衛藤弘城、西村渉、平本正樹、南茂隆生、安田和基	第85回日本生化学会	福岡	平成24年12月
“Genetic factors for type 2 diabetes mellitus in Japanese”	Kazuki Yasuda, Haruhide Udagawa, Takao Nammo, Masaki Hiramoto.	9th IDF-WPR Congress & 4th AASD Scientific Meeting	Kyoto	2012年11月
「膵β細胞における転写因子Mafファミリーの機能解析」第139回内分泌セミナー、平成24年6月2日、東京	西村渉	第139回内分泌セミナー	東京	2012年6月
Mechanism regulating proliferation and mutation of β-cells in new natal and young mice.	Wataru Nishimura	5th Incretin and Insulin Initiative	Tokyo	2012年9月
「膵β細胞における転写因子Mafファミリーの機能解析」第139回内分泌セミナー、平成24年6月2日、東京	西村渉	第139回内分泌セミナー	東京	2012年6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
該当なし				

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
該当なし				

※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。