

課題番号 : 27指1201  
研究課題名 : 膵島移植を目指した機能性β細胞の大量培養法の開発  
主任研究者名 : 大河内 仁志  
分担研究者名 : 霜田雅之、安田和基、岩崎直子、矢部茂治  
キーワード : iPS細胞、膵β細胞、糖尿病

## 研究成果

大河内仁志、矢部茂治 :

### (1) iPS細胞から膵臓β細胞への分化と機能解析

これまでに接着培養法にて無血清、無フィーダー細胞の条件でヒト iPS 細胞からグルコースに応答する膵臓β細胞の分化誘導させる研究を進めてきた。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。スフェロイドの免疫染色にてc-ペプチド陽性を示すインスリン産生細胞は、平面培養では10%程度だったものが30-40%に認められた。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、iPS細胞から誘導した膵臓β細胞を含むスフェロイド(総細胞数:  $4 \times 10^6$  個)を腎被膜下に移植して、4週間程度の随時血糖の正常化がみられた。

細胞移植して1-2週間後の腎臓の組織を検討した所、c-ペプチド陽性を示すインスリン産生細胞が認められ、マウスの血中にヒトC-peptideが存在することをELISA法で確認した。これらの結果をJ Diabetesに発表した。

### (2) ヒト iPS細胞から膵臓β細胞の大量培養法の検討

臨床応用を目指すためにはマウスに必要とされる膵臓β細胞数の2000倍の細胞が最低でも必要となるため、大量培養という観点からは接着培養法ではなく浮遊旋回培養に切り替える必要があると考えた。そのためにエイブル社の30mlのスピナーフラスコと自動攪拌培養装置を購入して、培養条件を検討した。特筆すべきは接着培養のときよりもβ細胞への分化効率が30%から50-60%程度に上昇し、接着培養ではばらつきの見られたインスリン分泌量も安定するようになった。実際に糖尿病モデルマウスへの移植実験で随時血糖の降下を認めた。細胞はマウスの腎被膜下に移植したが、移植後1-2週間経過した時点でもマウス血中にヒトC-Peptideを検出できた。また1-2週間後の組織標本を作製して検討したところ、ヒトC-peptideやグルカゴンを発現する細胞が認められた。

霜田雅之 : 膵島移植を目指した免疫隔離膜の開発

半透膜はグルコースやインスリンなど低分子は透過するが、細胞や免疫グロブリンは透過しないものとする。物質の透過性やデバイス封入時の細胞生存をまずはMIN6細胞や動物の膵島を用いて、in vitroの培養系で評価した。ブタ膵島およびMIN6細胞を用いて、①アルギン酸ゲルを用いたカプセル②半透膜性のポリマー樹脂を用いたマクロカプセル、の2種類の開発を行った。①、②ともカプセルに細胞を封入し、in vitroで培養すると機能を維持し、インスリンを放出することを確認した。さらにカプセル化細胞を糖尿病マウスに移植すると、血糖値の改善効果を認めた。

### 安田和基：創薬を指向したヒト膵β細胞機能評価系の構築

我々は最近、糖尿病の病態において注目されている「膵β細胞の脱分化」時に発現が増加することを見出した。ラット膵β細胞株 INS-a 細胞を 200 代以上継代培養することで、MafA やインスリンの発現が低下する「脱分化」様の膵β細胞障害モデルを作成したところ、MafB の発現や MafB プロモーターの活性が増加していること、MafB プロモーターの特定の CpG サイトのメチル化が減少していることを見つけた。MODY の原因遺伝子も転写因子であり、その機能異常の解析には他の転写因子の発現調節や DNA メチル化変化が関与する可能性も考えられる。なおこの研究の過程で、本研究の準備として、バイサルファイト法及び PyroMarkQ24 を用いた、ヒト DNA メチル化の解析系を立ち上げた。

### 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

mouse insulinoma cell line MIN6 細胞において細胞膜を障害せず、塩素イオン濃度の影響無く、mit 内膜の外側の pH(mitpH) を定量可能な測定系を用いた (Ogata M, BBRC 2012)。2mMSuc、3mM グリチルリチン酸 2 カリウム (DPG)、50mM サッカリン (Sac)、50mMAceK、を培養液に添加し、ミトコンドリア pH のグルコース反応性が変化するか検討した。ミトコンドリア障害 MIN6 細胞では、Sucralose, Saccharin 単独投与にて mitpH は徐々に下がり、Glucose に対する反応性は認められなくなった。ミトコンドリア機能が障害された膵β細胞においては、代替糖の使用はβ細胞のグルコースに対するミトコンドリア膜反応性を顕著に低下させることが示唆された。

Subject No. : 27A1201

Title : Development of large scale culture of iPS-derived pancreatic  $\beta$  cells toward islet transplantation

Researchers : Hitoshi Okochi, Masayuki Shimoda, Shigeharu Yabe, Kazuki Yasuda, Naoko Iwasaki,

Key word : human iPS cell、 pancreatic  $\beta$  cell、 diabetes mellitus

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

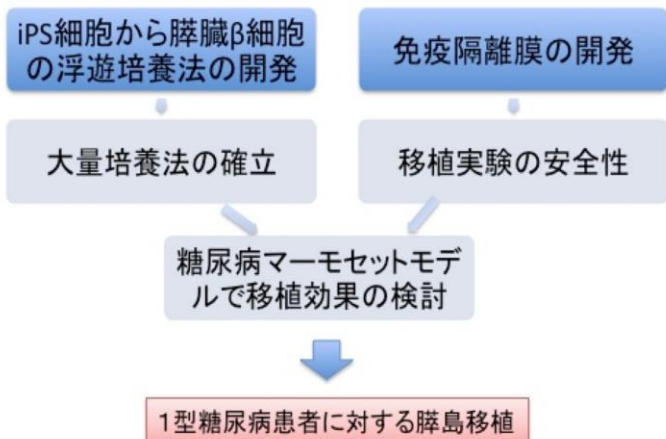
We differentiated human iPS cells into pancreatic  $\beta$  cells using a six-stage protocol mimicking the developmental process. We modified the reported protocols to promote endoderm differentiation and replaced FBS (fetal bovine serum) for KSR (knockout serum replacement). We added FGF2, CHIR99021 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. We found spheroid formation in the last stage improved the function of pancreatic  $\beta$  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. Moreover we confirmed glucose response of induced  $\beta$  cell by increasing glucose concentration from 2.5 mM to 25 mM in the media. After we transplanted  $4 \times 10^6$  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 normalize the blood glucose level of those mice for at least 4 weeks.

### **Large-scale culture**

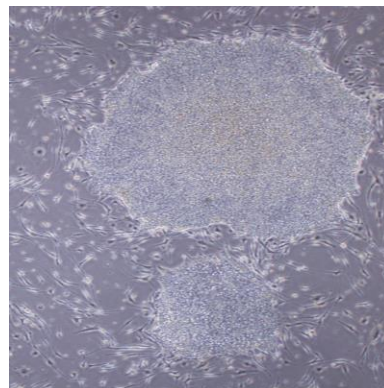
It is necessary to provide 2000 times more pancreatic  $\beta$  cells in human than in mouse for islet transplantation. Considering the large-scale culture for clinical use, we adopted floating culture system instead of adhesion culture system. We used 30ml vessels as spinner flasks from Able and started rotation culture of iPS cells at a speed between 50-70 rpm. We succeeded obtaining functional pancreatic  $\beta$  cells by slight modification of adhesion culture protocol. After we transplanted  $4 \times 10^6$  cells of iPS-derived cells under the kidney capsule of NOD/SCID diabetic model mice, we detected not only C-peptide positive cells but also glucagon positive cells in the kidney capsule of NOD/SCID mice. We also detected human C-peptide in their mice sera.

# 27指1201:膵島移植を目指した機能性β細胞の大量培養法の開発

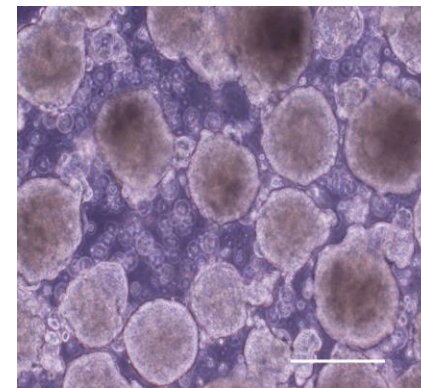
流れ図



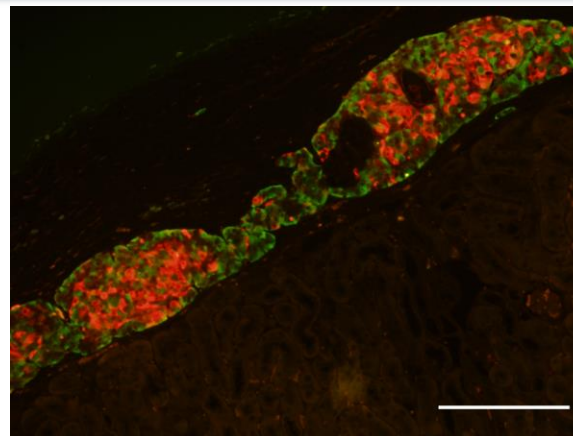
iPS細胞



膵臓β細胞

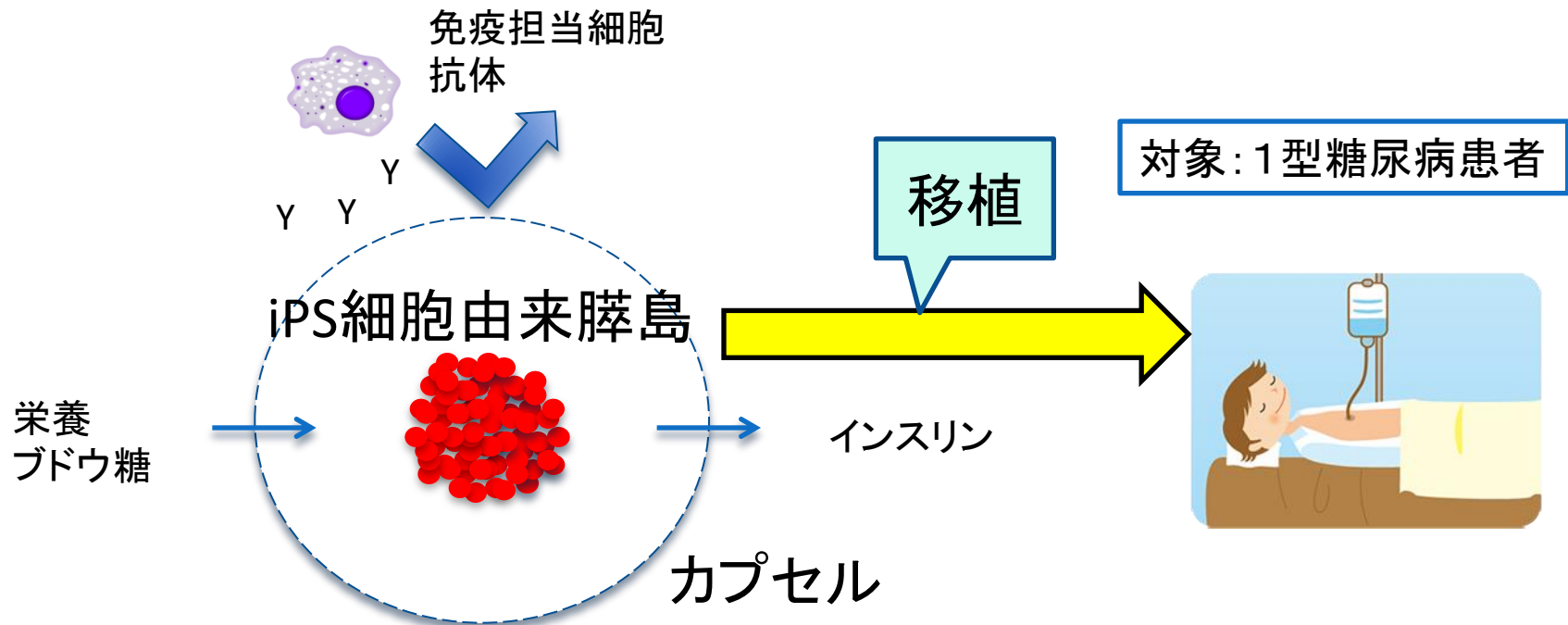


細胞移植後4週の腎組織の免疫染色像



C-peptide / Glucagon

# iPS細胞由来膵島を用いたバイオ人工膵島



- ☆ アルギニンカプセルが拒絶の原因の細胞と抗体をブロックし、免疫抑制剤が不要
- ☆ iPS細胞を用いて作成されているので大量生産でき、ドナー不足が解消される

課題番号 : 27指1201  
研究課題名 : 膵島移植を目指した機能性β細胞の大量培養法の開発  
分担研究課題名 : ヒト iPS 細胞から膵臓β細胞の大量培養法の検討  
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 : iPS 細胞、膵β細胞

研究成果 :

ヒト iPS 細胞から膵臓β細胞を分化誘導できるようになったので、膵島移植と糖尿病に対する創薬スクリーニングを目指して機能性β細胞を大量に培養する方法の開発を目的とする。

これまで接着培養で細胞の分化条件の検討を行い、ヒト iPS 細胞からブドウ糖濃度に応じてインスリンの分泌量を変化させることのできる機能的な膵臓β細胞を得ることができるようになった。この結果は論文にまとめた。Yabe GS, Fukuda S, Takeda F, Nashiro K, Shimoda M, Okochi H. Efficient Generation of Functional Pancreatic β Cells from Human iPS Cells. J Diabetes in press

臨床応用を目指すためにはマウスに必要とされる量の最低でも 2000 倍の細胞が必要となるため、培養皿への接着培養では対応が困難になると思われた。そこで大量培養という観点からは浮遊旋回培養に切り替える必要があると考えて、エイブル社の 30ml の自動攪拌培養装置を購入して、培養条件を検討した。多少の条件変更は必要であったが、おおむね接着培養の条件が適用できることが判明した。特筆すべきは接着培養のときよりもβ細胞への分化効率が 30%から 50-60%程度に上昇し、接着培養ではばらつきの見られたインスリン分泌量も安定するようになった。実際に糖尿病モデルマウスへの移植実験で随時血糖の降下を認めた。細胞はマウスの腎被膜下に移植したが、移植後 1 2 週経過した時点でもマウス血中にヒト C-Peptide を検出できた。また 1 2 週間後の組織標本を作製して検討したところ、ヒト C-peptide やグルカゴンを発現する細胞が認められた。

今回用いた iPS 細胞は東大医科学研究所でレトロウイルスを用いて樹立されたものであり、臨床に使うことは想定されていない株である。今後は CiRA の臨床グレード株を用いて検討する予定である。

また 30ml から 100ml に培養器をスケールアップさせる必要があるが、試薬代が飛躍的にかかるため、ある程度プロトコールをかためてから移行する予定である。

課題番号 : 27指1201  
研究課題名 : 膵島移植を目指した免疫隔離膜の開発  
主任研究者名 : 大河内仁志  
分担研究者名 : 霜田雅之

キーワード : 膵島移植、免疫隔離膜、再生医療、ヒト iPS 細胞  
研究成果 : 平成 27 年度の研究成果

ヒト iPS 細胞から機能的な膵臓  $\beta$  細胞を大量に培養する方法を開発し、平行して細胞を包む免疫隔離膜の開発も行い、免疫抑制剤を使用しない新規膵島移植法の確立を目指す。分担研究者は、3 年以内に誘導した膵臓  $\beta$  細胞を半透膜に包んで、霊長類のマーモセット糖尿病モデルに移植して、前臨床データを取得することを目的とする。

・分担研究計画：免疫隔離膜の開発

半透膜はグルコースやインスリンなど低分子は透過するが、細胞や免疫グロブリンは透過しないものとする。物質の透過性やデバイス封入時の細胞生存をまずは MIN6 細胞や動物の膵島を用いて、in vitro の培養系で評価する。

・研究成果

ブタ膵島および MIN6 細胞を用いて、①アルギン酸ゲルを用いたカプセル②半透膜性のポリマー樹脂を用いたマクロカプセル、の2種類の開発を行った。①、②ともカプセルに細胞を封入し、in vitro で培養すると機能を維持し、インスリンを放出することを確認した。さらにカプセル化細胞を糖尿病マウスに移植すると、血糖値の改善効果を認めた。

課題番号 : 27指1201  
研究課題名 : 創薬を指向したヒト膵β細胞機能評価系の構築  
主任研究者名 : 大河内 仁志  
分担研究者名 : 安田 和基

キーワード : 転写因子、MafA、MafB、脱分化、DNA メチル化  
研究成果 :

本分担課題では、全体課題の中で作成される iPS 細胞由来のヒト膵β細胞について、オミックス解析の手法等を用いて機能と発現分子との関係について解析し、普遍的な指標を抽出して、病態評価や創薬への応用を目指す。

具体的には、さまざまな刺激に対するインスリン分泌反応、発現遺伝子プロファイリング、エピゲノム解析などを行い、アジア人における正常ヒトβ細胞の機能評価系を確立するとともに、膵β細胞の新たな機能分子が得られた場合は、その解析を行う。可能であれば、MODY など糖尿病患者由来 iPS 細胞と、健常者由来 iPS 細胞とで、分化誘導した膵β細胞の機能を比較し、本システムの有用性を検証する。

初年度は、ヒト iPS 細胞から *in vitro* で作成した「正常」膵β細胞について、分子的解析を行う予定であった。しかし解析に適した「質」を維持した膵β細胞を十分得ることができなかったため、次年度以降とし、膵β細胞における転写因子の機能に関する基礎的研究を行った。

我々はこれまでに、インスリン遺伝子の転写制御に必須な分子 MafA について、膵β細胞分化、増殖、機能維持などにおける意義を明らかにしてきた。構造的に類似する MafB はマウスでは、MafA とミラーイメージのような発現形式を示し、膵α細胞や発生過程の未熟なβ細胞に発現するが、成熟した膵β細胞には発現しない。我々は最近、糖尿病の病態において注目されている「膵β細胞の脱分化」時に発現が増加することを見出した。ラット膵β細胞株 INS-a 細胞を 200 代以上継代培養することで、MafA やインスリンの発現が低下する「脱分化」様の膵β細胞障害モデルを作成したところ、MafB の発現や MafB プロモーターの活性が増加していること、MafB プロモーターの特定の CpG サイトのメチル化が減少していることを見つけた。MODY の原因遺伝子も転写因子であり、その機能異常の解析には他の転写因子の発現調節や DNA メチル化変化が関与する可能性も考えられる。

なおこの研究の過程で、本研究の準備として、バイサルファイト法及び PyroMarkQ24 を用いた、ヒト DNA メチル化の解析系を立ち上げた。



課題番号 : 27指1201

研究課題名 : 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

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 : MODY、iPS細胞、ミトコンドリア機能、2型糖尿病、LSS 遺伝子

研究成果 :

1) b細胞機能の新規評価システム樹立。

mouse insulinoma cell line MIN6細胞において細胞膜を障害せず、塩素イオン濃度の影響無く、mit 内膜の外側の pH(mitpH)を定量可能な測定系を用いた(Ogata M, BBRC 2012)。2mMSuc、3mM グリチルリチン酸2カリウム(DPG)、50mM サッカリン(Sac)、50mMAceK、を培養液に添加し、ミトコンドリア pHのグルコース反応性が変化するか検討した。

グルコース刺激によるインスリン分泌反応にて mitpHは  $0.34 \pm 0.11$  低下 (n=35) AcesulfameK で pHは平均  $0.06$ 、Glucose と共負荷して  $0.42 \pm 0.12$  下がる。DPGにて  $0.22 \pm 0.10$ 、Glucose と共負荷することで  $0.36 \pm 0.06$ 、合わせて  $0.58 \pm 0.14$  下がる。DPGによる mitpHの低下は、Rotenonにて抑制されず、加算されて pHは下がる。Sucralose では mitpHは変化せず、Glucose と共負荷することで pHは  $0.17 \pm 0.10$  下がる。Saccharin では pHの変化は認められなかった。Glucose と共負荷にて pHは  $0.42 \pm 0.12$  下がった。

EB 4 8時間にてミトコンドリア障害を起こした MIN6細胞では Glucose 負荷により、mitpHは  $0.21 \pm 0.06$  低下する。DPG では障害細胞では緩やかに mitpHの  $0.25 \pm 0.08$  の低下とそれに続く Glucose による mitpHの  $0.09 \pm 0.04$  の低下が認められたが、AcesulfameKによる低下は認められなくなり、Glucose との共負荷にての反応も明らかでは無くなった。ミトコンドリア障害 MIN6細胞では、Sucralose, Saccharin 単独投与にて mitpHは徐々に下がり、Glucose に対する反応性は認められなくなった。

考察

ミトコンドリア機能が障害された膵β細胞においては、代替糖の使用はβ細胞のグルコースに対するミトコンドリア膜反応性を顕著に低下させることが示唆された。

課題番号 : 27指1201  
研究課題名 : 膵島移植を目指した機能性 $\beta$ 細胞の大量培養法の開発  
分担研究課題名 : ヒト iPS 細胞から膵臓 $\beta$ 細胞の分化法の検討  
主任研究者名 : 大河内 仁志  
分担研究者名 : 矢部 茂治

キーワード : iPS 細胞、膵 $\beta$ 細胞

研究成果 :

これまでに接着培養法にて無血清、無フィーダー細胞の条件でヒト iPS 細胞からグルコースに応答する膵臓 $\beta$ 細胞の分化誘導させる研究を進めてきた。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。インスリンの産生量は ELISA 法の測定で 5000-20000pg/well とこれまでの 10 倍程度になり、グルコース濃度に反応してインスリン産生することも確認した。スフェロイドの免疫染色にて c-ペプチド陽性を示すインスリン産生細胞は、平面培養では 10%程度だったものが 30-40%に認められた。グルカゴン陽性細胞やソマトスタチン陽性細胞はわずかに認められる程度であった。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、iPS 細胞から誘導した膵臓 $\beta$ 細胞を含むスフェロイド(総細胞数:  $4 \times 10^6$  個)を腎被膜下に移植して、血糖降下を検討した。一部のマウスにおいては 4 週間程度の随時血糖の正常化がみられた。

細胞移植して 1 2 週間後の腎臓の組織を検討した所、随時血糖では高値を示したマウスにおいても c-ペプチド陽性を示すインスリン産生細胞が認められ、マウスの血中にヒト C-peptide が存在することを ELISA 法で確認した。グルカゴン陽性細胞やソマトスタチン陽性細胞も確認できた。これらの結果を J Diabetes に発表した。(Yabe GS, Fukuda S, Takeda F, Nashiro K, Shimoda M, Okochi H. Efficient Generation of Functional Pancreatic  $\beta$  Cells from Human iPS Cells. J Diabetes in press)  
以上の結果より、ヒト iPS 細胞から誘導した膵島様細胞は免疫不全マウスの腎被膜下にて長期生着し、インスリンを分泌することが確認された。随時血糖を正常化するためにはさらなる細胞機能の改善が必要であり、また移植細胞の生着率を上げる必要があると思われた。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 27指1201

研究課題名： 膵島移植を目指した機能性β細胞の大量培養法の開発

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
Efficient Generation of Functional Pancreatic β Cells from Human iPS Cells.	Yabe GS, Fukuda S, Takeda F, Nashiro K, Shimoda M, Okochi H.	J Diabetes	印刷中	2016
Establishment of Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY)-iPS cells from Japanese patient	Yabe S, Iwasaki N, Yasuda K, Hamazaki TS, Konno M, Fukuda S, Takeda F, Kasuga M, Okochi H	J Diabetes Invest	6:543-7	2015
Ultrasound-Targeted Microbubble Destruction (UTMD): Towards a new strategy for diabetes treatment?	Mozafari M, Shimoda M, Urbanska AM, Laurent S.	Drug Discovery Today	2015 Nov 29.	2015
Demethylation of the MafB promoter in a compromised β-cell model.	Nishimura W, Ishibashi N, Eto K, Funahashi N, Udagawa H, Miki H, Oe S, Noda Y, Yasuda K.	J Mol Endocrinol	55: 31-40	2015

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
ヒトiPS細胞から機能的膵β細胞 (iPS-beta) の分化誘導	矢部茂治、福田沙月、霜田雅之、大河内仁志	第15回日本再生医療学会総会	大阪府	2016年3月
Establishment of diabetes modeling in common marmoset.	Wenji Yuan, Satsuki Fukuda, Takashi Inoue, Daisuke Chujo, Hitoshi Okochi, Erika Sasaki, Masayuki Shimoda.	The 2015 American Transplant Congress.	Philadelphia, USA	2015年5月
High quality porcine islets can be isolated from middle-aged miniature pigs	Masayuki Shimoda, Daisuke Chujo, Wenji Yuan, Toshiaki Kurokawa, Tsuyoshi Kayo, Shinichi Matsumoto.	IPITA-IXA-CTS 2015 Joint Congress	Melbourne, Australia	2015年11月

研究発表及び特許取得報告について

3D imaging model for islet grafts in the transparent liver by whole-organ clearing method.	Masayuki Shimoda, Koya Shinohara, Wenji Yuan, Shinichi Matsumoto	IPITA-IXA-CTS 2015 Joint Congress	Melbourne, Australia	2015年11月
Islet Transplantation for Type 1 Diabetes.	Masayuki Shimoda	BIT's 4th Annual World Congress of Diabetes	Kaohsiung Exhibition Center, Taiwan	2015年11月
「糖尿病にかかわる遺伝学・体質の基礎」	安田和基	第50回糖尿病学の進歩	東京	2016年2月
1型糖尿病に対する膵島移植－現在とこれから－	霜田雅之	国立国際医療研究センター市民公開講座	NCGM	2015年6月
膵島移植の現状と展望	霜田雅之	第8回東京糖尿病フォーラム	東京都	2015年4月
成人発症1型糖尿病におけるIGRP特異的CD4陽性T細胞の重要性	中條大輔、浅香裕之、大島 梓、島裕幹、森由紀子、岡崎智子、霜田雅之、梶尾 裕、山岸正和、八木邦公、上野英樹	第58回日本糖尿病学会年次学術集会	山口県	2015年5月
日本人1型糖尿病の発症様式別における膵島特異的細胞性免疫解析の試み	中條大輔、川邊秋津、高橋信行、辻本哲郎、八木邦公、霜田雅之、梶尾 裕	第13回1型糖尿病研究会	東京都	2015年11月
内科におけるMODY頻度と診断に有用な臨床的特徴	滝澤美保、岩崎直子、尾形真規子、他	第58回日本糖尿病学会	山口県	2015年5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
iPS細胞を用いた糖尿病研究	大河内仁志	PHARMSTAGE	雑誌	2015年10月1日

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				