

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、矢部 茂治、安田 和基、岩崎 直子

キーワード : iPS cells、膵臓β細胞、糖尿病

研究成果 :

ヒト iPS 細胞からグルコース応答性を持つ膵臓β細胞を接着培養にて分化誘導できるようになったので、膵島移植を目指して大量培養法の開発を行った。必要細胞数を減らし、培養コストを削減するためには高機能な膵臓β細胞を用いる必要があるため、引き続き分化誘導能の改善も行った。日本再生医療学会で成果を発表し、論文発表もした。

矢部茂治、福田沙月、霜田雅之、大河内仁志 浮遊培養系によるヒト iPS 細胞由来膵β細胞の分化誘導 (第 16 回日本再生医療学会総会、仙台、3 月、2017)

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 9 : 168-179, 2017

ヒトではマウスで必要な細胞数の 2000 倍の細胞を用意することになるので、接着培養ではプレートの数が膨大になるため、現実的ではないと考え、浮遊培養を検討した。30ml のスピナーフラスコ型の容器を用いて、浮遊状態で iPS 細胞を増やす条件を検討するとともに、分化条件も検討した。未分化状態から分化状態に移行する際の spheroid の形成にスターラーの回転数が影響することが判明し、剪断応力を考慮しつつ直径が 100-200um になるように調整した。

分化法を改善することにより、NKX6.1 の発現上昇を認め、細胞移植後にマウス血中のヒト C-peptide 濃度を上昇させることができ、100 日以上細胞生着も確認した。浮遊培養においても最初の分化段階がその後の分化誘導に重要であることを立証し、definitive endoderm への新規分化誘導法として特許を出願した。

また CiRA で樹立された複数の iPS 細胞を用いて同様に 30ml の浮遊培養を行ったが、株間の差が認められ、それぞれの株に対して培養条件を最適化させる必要があることが判明した。臨床応用に向けて、最も効率良く高機能な膵島を誘導できる最適な iPS 細胞株を選択する必要があるため、株間の比較を行う予定である。細胞株が決定できた段階で、100ml にスケールアップしたいと考えている。

免疫抑制剤を使用しない新規膵島移植法の確立を目指して、細胞を包む免疫隔離膜の開発も行った。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にしたヌードマウスおよび免疫正常マウスに移植し、数か月間の血糖値の改善効果を認めた。

Subject No. : 27A1201

Title : Large scale culture of functional pancreatic beta cells from iPS cells for islet transplantation

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

Key word : iPS cells, pancreatic beta cells, diabetes mellitus

Abstract :

We aimed at the large scale culture of functional pancreatic beta cells from iPS cells for islet transplantation.

We succeeded in differentiating functional pancreatic beta cells from iPS cells in adherent culture. Since the number of islet required for transplantation is 2000 times more in human than in mice, it is not reasonable to use culture dishes manually. We determined to use floating culture system because scaling up is relatively easier in floating system than in adherent culture. We started floating culture with 30ml spinner type culture vessels. We had to optimize the rotation speed of the fan in the vessel to avoid the shear stress to the cells. Although the protocol of adherent culture could be applied to the floating culture, the expression level of NKX6.1, one of the important markers of the pancreatic beta cells, was needed to improve.

We managed to line up the islet-like spheroid which were almost the same size and we could enhance the expression level of NKX6.1. Consequently we detected certain amount of human C-peptide in mice sera after induced human islet-like spheroids were implanted under the renal capsule of diabetic mice.

We applied the patent regarding new method for inducing definitive endodermal cells from iPS cells.

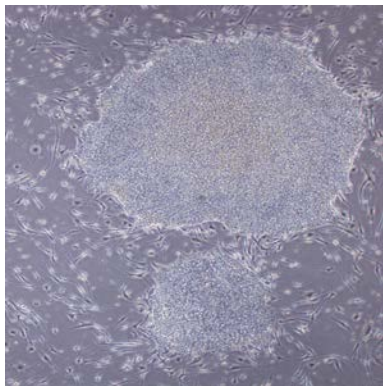
We started to use clinical grade iPS cell lines established by CiRA. However we had to optimize culture conditions for each iPS cell line because it has own characteristics for proliferation and differentiation.

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

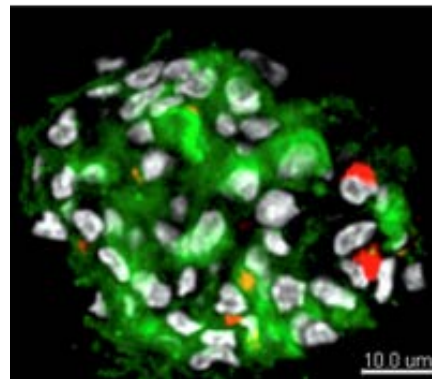
ヒトiPS細胞から膵臓β細胞の6段階分化法



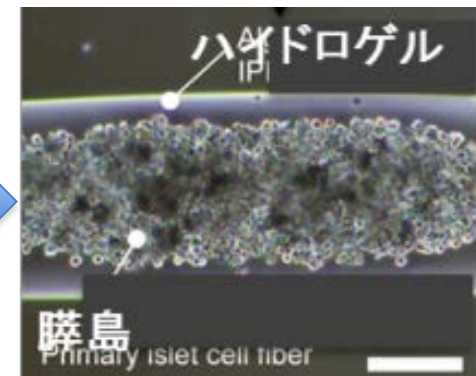
iPS細胞



膵島



免疫隔離膜



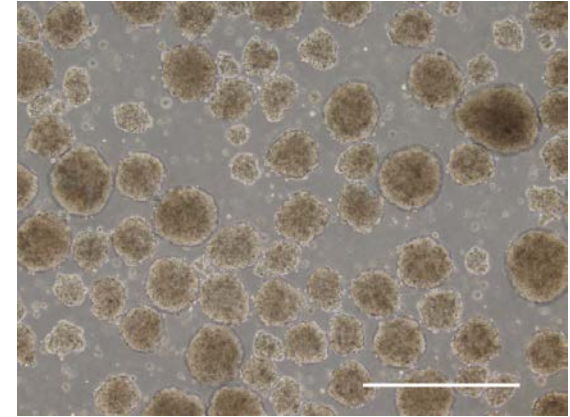
大量培養法の開発

攪拌培養

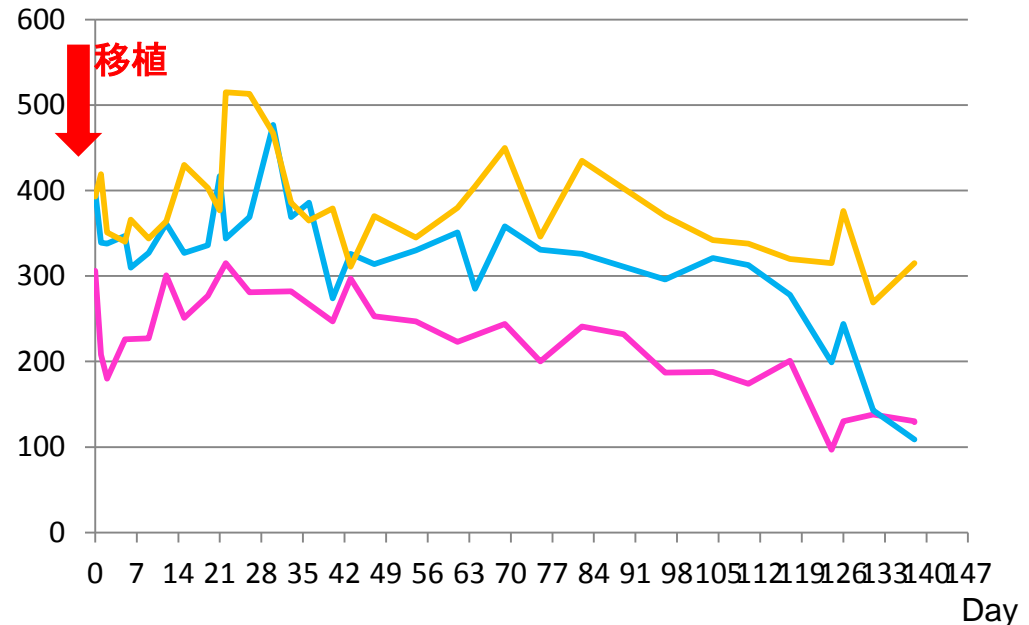
- ・リアクター(30mlベッセル:ABLE)
- ・細胞株:TKDN4-M,



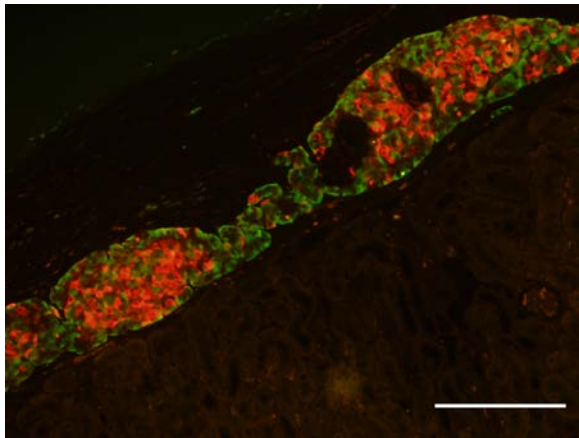
2-4x10⁷個程度



糖尿病マウスへの細胞移植後の随時血糖



腎被膜下に移植後4週の免疫染色像



C-peptide / Glucagon

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予定の、iPS 細胞由来ヒト膵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。

当初の予定では、研究期間前半では、ヒト iPS 細胞から作成した「正常膵β細胞」について、in vitro でトランスクリプトームやエピゲノムなどの分子的解析、インスリン分泌能などの細胞学的解析を行い、各分化・成熟段階における特徴を得ること、期間後半ではこの情報を元にして、健常人と MODY 患者 iPS 細胞由来の膵β細胞を比較検討すること、としていた。しかし作成したβ細胞の「量」及び「質」が安定しないとのことで、解析に十分な量の細胞を有ることでできなかった。

本研究で対象とする MODY 原因遺伝子は転写因子であるので、基盤的研究として、膵β細胞における標的遺伝子や機能的意義の重要性が従来から示されている MafA 及び MafB について、膵β細胞株および発生工学的手法も駆使して解析した。MafA は、インスリン遺伝子の転写に重要な因子として同定されたが、我々の研究などにより、膵β細胞の成熟維持に重要であることも明らかになっている。我々は Lineage tracing の手法も用いて、MafA ノックアウトマウスの膵島で、成熟した膵β細胞からインスリン顆粒が減少する、いわゆる「脱分化」が認められ、一部にグルカゴン陽性細胞も認めること、分子メカニズムとしては MafA の低下とともに、DNA メチル化変化を介した MafB の上昇が関与すること、などを明らかにし、論文発表した。MafA 自体は少なくともヒト MODY の主要な原因遺伝子ではないが、膵β細胞機能のコアとなる転写因子ネットワークを形成しており、MODY 患者由来 iPS 細胞から分化させた膵β細胞の機能解析においても有用な知見である。

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。

またこのほか、ヒト MODY のより広い臨床像のスペクトルを得るために若年発症の MODY の遺伝子異常のスクリーニングを行なった。

課題番号 : 21指114
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、個別化医療、β細胞、ミトコンドリア機能
研究成果 :

1. 背景及び目的

糖尿病の成因を明らかにするために、単一遺伝疾患の糖尿病である MODY (maturity onset diabetes of the young) の原因遺伝子を同定し、MODY 患者由来の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、さらに膵β細胞へ分化誘導し、糖尿病発症機序ならびに病態を解明する事。変異同定患者に対する個別化医療提供を実現する事。

2. 方法

1) 昨年来引き続き解析中であるが原因遺伝子が同定できていない、31人から構成される MODY 家系について Whole Exome Sequence により再解析する(家系の詳細は昨年以前に報告済み)。今回の解析では、Exome capture は solution-based hybridization 法 (SureSelect Human All Exon Ver5, Agilent Tech, USA)、sequence は Illumina HighSeq 2000 により paired end 法で行った。データ解析は BWA-MEM を用いてヒトレファレンスゲノム (hg19) に mapping し、variants call は GATK Ver 3.5 を用いた。変異機能アノテーションは ANNOVER にて付与した。

2) MODY1、2、3 変異が同定された患者に対する患者に個別化医療は既に欧米ではコンセンサスガイドラインが発表されているが、わが国ではまだ一般的ではない。変異同定者に対してガイドラインに沿った遺伝子診断に基づいた治療を行い、経過を観察する。

3. 結果

1) WES の対象であった発端者と娘に MODY4 (*IPF1/Pdx1*) 遺伝子の c.443G>T:p.R148L ヘテロ変異を見出した。exon2 (homeodomain)に位置する未報告の変異であり、CADD score = 34 で明らかな有害変異であった。サンガー法により家系内 31 名の genotype-phenotype の一致を確認し、MODY4 家系と考えた。唯一発端者の甥 (MODY) のみ本変異を有しておらず、代わりに MODY1 (*HNF4A*) 遺伝子 P2 promoter に -79C>T を有していた。本多型は 1000 人ゲノムデータベース上 0.14%と極めて稀で、CADD score = 18.11 と高く、病因の可能性も考えられた。しかし、この患者の父親(非糖尿病)と本変異を共有していたことから病因の可能性は否定された。甥の原因遺伝子は MODY1-13 には検出されておらず、それ以外の遺伝子のアウトプットデータの解析中である。2012年の解析では罹患同胞対法の結果に基づいて限定的な染色体上の遺伝子のみを解析したために同定出来なかったが、今回は最初に全 MODY 遺伝子を解析したところ、同定に至った(2017年日本糖尿病学会で発表)。

2) MODY2 患者は原則として経口薬の投薬が不要である事がコンセンサスガイドラインに記載されている。これに基づいて、診断が確定した MODY2 患者に対し投与中であった経口血糖降下薬 3 剤を全て中止した。前後でインスリン分泌や HbA1c 評価したが、悪化は認められなかった。患者 QOL 向上と薬剤中止による治療費軽減もたらされた。MODY3 患者に対し、投与中のインスリン量の減量を DPP4 阻害薬の追加によって試みた。2 症例中、1 例ではインスリンは 3 回法から 2 回法に変更可能でインスリンも半量に減量したが HbA1c は不変であった(2017年日本糖尿病学会で発表、東京女子医科大学雑誌 in press)。

5. 考察

- 1) 日本人 MODY 家系において MODY4 変異を同定した。この IPF1/PDX1 遺伝子変異は未報告である。
- 2) わが国においてコンセンサスガイドラインに沿った糖尿病の個別化医療を推進する枠組み作りが必要である。

課題番号 : 27指1202
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 28 年度の研究成果

ヒト iPS 細胞から機能的な膵臓 β 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 β 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にしたヌードマウスおよび免疫正常マウスに移植し、数か月間の血糖値の改善効果を認めた。

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、膵島移植を目指すために大量培養法の開発を目的とした。臨床応用を視野に入れると、より高機能なβ細胞の誘導が望ましく、そのことによって必要細胞数を減らせることになり、コストの削減にもつながる。これまでに接着培養ではブドウ糖濃度に応じてインスリンの分泌量を変化させられる機能性β細胞の分化誘導に成功しているが、ヒトに対してはマウスに必要とされる細胞数の約 2000 倍が必要となるため、培養皿では対応が難しいと考えられた。そこで大量培養という観点から浮遊培養に注目し、エイブル社の 30ml の自動攪拌培養装置を購入して、浮遊旋回培養を選択した。東大医科研で樹立された iPS 細胞については接着培養の培養条件が概ね適用でき、浮遊培養においても *in vitro* で機能性β細胞の分化誘導が可能であった。前年度に糖尿病モデルマウスの腎被膜下に細胞移植をして、細胞生着を確認し、マウス血中にヒト C-peptide を検出していたが、検出濃度としては数十 pM 程度であり、まだ生体における機能としては改善の余地があると考えられた。特に誘導したβ細胞において転写因子の NKX6.1 の発現が十分でないために、細胞の成熟度が低いことが考えられた。そこで NKX6.1 の発現を指標にして細胞の分化法を改善することにより、NKX6.1 の発現を上昇させることができた。実際に改善したプロトコールで誘導した細胞をマウスに移植したのち、血中のヒト C-peptide 濃度が経時的に上昇することが確認された。徐々に随時血糖の降下も認められ、120 日以上の細胞生着も確認した。生体内でのβ細胞の成熟化がどのように進むのかについて、そのメカニズムを解明したいと考えている。浮遊培養においても最初の分化段階がその後のβ細胞への分化誘導に重要であることを立証し、definitive endoderm への分化誘導法で特許を出願した。

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 SG, Fukuda S, Takeda F, Nashiro K, Shimoda M, Okochi H	J Diabetes	9 : 168-179	2017
Methods for Microencapsulated Porcine Islet Production.	Shimoda M, Matsumoto S.	Methods Mol Biol.	1479:347-356.	2017
Microencapsulation in Clinical Islet Xenotransplantation.	Shimoda M, Matsumoto S.	Methods Mol Biol.	1479:335-345.	2017
Genome-wide association studies in the Japanese population identify seven novel loci for type 2 diabetes.	Imamura M, Takahashi A, Yamauchi T, Hara K, Yasuda K, et al	Nature Commun	7: 10531	2016
Pancreatic developmental defect evaluated by celiac artery angiography in a patient with MODY5	Iwasaki N, Tsurumi M, Shimizu W, Watanabe A, Ogata M, Takizawa M, Ide R, Yamamoto T, Saito K	Human Genome Variation	DOI:10.1038/hg.v.2016.22	2016

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
浮遊培養系によるヒトiPS細胞由来膵β細胞の分化誘導	矢部茂治、福田沙月、霜田雅之、大河内仁志	第16回日本再生医療学会総会	仙台	2017年3月
iPS細胞を用いた次世代型膵島移植療法の開発	1. 霜田雅之, 矢部茂治, 篠原孝也, 元文姫, 福田沙月, 渡邊亜美, 渡邊貴一, 篠原満利恵, 井上貴史, 伊吹将人, 酒井康行, 竹内昌治, 道上達男, 大河内仁志, 佐々木えりか, 加藤智久, 宮島篤.	第59回日本糖尿病学会総会	京都	2016年5月

研究発表及び特許取得報告について

Development of small non-human primate diabetes model (Common marmoset).	Masayuki Shimoda	Laboratory Animal Research Center Symposium in Samsung Medical Center.	Seoul	2016年8月
Analysis of post-transplant islet by organ transparency and macro three-dimensional image.	Koya Shinohara, Masayuki Shimoda.	26th International Congress of The Transplantation Society	Hongkong, China	August 17-23, 2016
The availability of marmoset diabetes modeling as a transplantation model.	Wenji Yuan, Satsuki Fukuda, Takashi Inoue, Hitoshi Okochi, Erika Sasaki, Masayuki Shimoda.	26th International Congress of The Transplantation Society	Hongkong, China	August 17-23, 2016
「ゲノム網羅的解析結果を用いた膵島代償機序の検討」	南茂隆生、宇田川陽秀、舟橋伸昭、川口美穂、上番増喬、平本正樹、西村渉、安田和基	第59回日本糖尿病学会年次学術集会	京都	2016年5月
「脂肪細胞培養上清によるグルココルチコイド受容体を介した膵β細胞機能変化」	宇田川陽秀、舟橋伸昭、西村渉、平本正樹、川口美穂、南茂隆生、安田和基	第59回日本糖尿病学会年次学術集会	京都	2016年5月
Prevalence of MODY subtype and clinical characteristics in patients with early onset diabetes in Japanese	Iwasaki N, Ogata M, Fujimaki R, Uchigata Y, Saito K	The 13th International Congress of Human Genetics	Kyoto	April, 2016
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
第1特集・「世界を変えるiPS」	宮島篤	週刊ダイヤモンド		6月11日号
「1型糖尿病」根治 ふるさと納税が後押し	霜田雅之	佐賀新聞		4-6-2016
「1型糖尿病」根治 ふるさと納税が後押し	霜田雅之	NHK佐賀版		4-8-2016
「インスリン分泌不全の感受性遺伝子のゲノム検索」	安田和基	Diabetes Frontier 27巻4号 特集：糖尿病の遺伝素因の解明研究		2016年8月

研究発表及び特許取得報告について

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
内胚葉系細胞集団、及び多能性細胞から三胚葉のいずれかの細胞集団を製造する方法	特願2017-012802	大河内 仁志、矢部 茂治、伊吹 将人 (株式会社カネカ)	平成29年 1月27日	日本

※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