

課題番号 : 29指1016

研究課題名 : HNF1AおよびHNF4A遺伝性糖尿病患者(MODY)由来iPS細胞を用いた病態再現・発症機序解析

主任研究者名 : 矢部茂治

分担研究者名 : 無

キーワード : MODY、糖尿病、iPS細胞、膵β細胞

研究成果 : 若年発症遺伝性糖尿病である MODY (Maturity onset Diabetes of the Young) の病態を解明するために、MODY 患者由来 iPS 細胞 (MODY-iPS 細胞) を樹立したので膵β細胞への分化誘導を試みた。膵β細胞分化誘導系は膵β細胞の生体内の発生過程を模倣したもので、iPS 細胞→胚性内胚葉→原始腸管→後方前腸→膵前駆体→膵内分泌前駆体→膵β細胞へと段階を経て分化するものである。当初は接着培養を基本とした分化誘導系であったが、大量培養が可能な浮遊培養による分化誘導系も構築したので、分化誘導をするにあたり、まず接着培養と浮遊培養のどちらが分化にとって優れているかを比較検討した。分化の最初のステップであり、膵β細胞分化に非常に重要である胚性内胚葉への分化段階に焦点を絞り分化誘導後 0, 12, 24, 48, 72, 96 時間後に接着・浮遊培養のサンプルから RNA を回収して real time qPCR による解析を行った。胚性内胚葉への分化過程は iPS 細胞→後方エピブラスト→原条→胚性内胚葉という段階を経て遷移していくので、この各段階におけるマーカー発現を比較すると押し並べて浮遊培養の方がマーカー発現が良い事が分かった。この結果から iPS 細胞から膵β細胞への分化誘導においては浮遊培養の方が優れていることが分かったので、本プロジェクトでにおける膵β細胞分化誘導法は浮遊培養で行う事にした。今までは樹立した MODY-iPS 細胞は SNL フィーダー細胞上で未分化維持培養を行っていたが、浮遊培養への適応等を検討した結果、浮遊培養で分化誘導するにはフィーダーフリーで未分化維持を行った方が良い事が分かった。また未分化維持能とコストを考え、フィーダーフリー用の基質と培地の組み合わせを検討した結果、基質を vitronectin、培地を Essential8 にするのが、未分化維持とコストの両方の面で良い事が分かった。そこで SNL フィーダー細胞上で培養していた MODY-iPS 細胞を vitronectin, Essential8 の条件で維持できるように培養を続け、フィーダーフリーで維持できる MODY-iPS 細胞を得て、浮遊培養系で分化誘導を行う体制を整えた。HNF1A が原因遺伝子である MODY3-iPS 細胞の分化誘導を行い変異 mRNA の検出試みると変異 mRNA が分解されている事を確認した。また HNF4A が原因遺伝子である MODY1 の変異 mRNA は分解されていない事も分かった。提供された MODY3 患者さんの変異はストップコドンが途中に入るタイプで (PTC: premature termination codon)、このタイプの変異は NMD (non-sense mediated mRNA decay) という細胞内における mRNA 品質管理機構により分解されることが報告されている。MODY1 患者さんはストップコドンではなく塩基置換によるアミノ酸変異のタイプであり、このタイプでは変異 mRNA を分解するという機構は報告されていない。これらの結果から、MODY 患者さんにおいて PTC を持つ変異の場合のみ選択的に変異 mRNA が分解されることを確認した。

次に変異遺伝子の影響で発生過程において、遺伝子発現に影響が出ているかどうか調べるために、健常人、MODY1, MODY3-iPS 細胞を膵β細胞へ分化誘導し、各分化段階において RNA を回収して qPCR により遺伝子発現を調べた。HNF1A (MODY3) と HNF4A (MODY1) の患者さんは臨床的特徴が似ており、HNF1A と HNF4A は互いの発現を制御する事が知られている。また HNF4A は P2, P1 という異なる 2 つのプロモーター由来の HNF4A mRNA を発現しており、発現時期、発現場所でプロモーターを使い分けており、特に P2 プロモーターには HNF1A が直接に結合する事が知られている。MODY1, MODY3 においてはこの P2, P1 プロモーター由来の mRNA の発現パターンに影響が出ている可能性があるため、P2, P1 プロモーター由来 HNF4A mRNA を区別できるプライマーを作成して、遺伝子発現を調べた。MODY1, 3 において P2, P1 由来 HNF4A mRNA の発現パターンは似ていたが、MODY1 の方が発現量が高い事が分かった。この事は MODY3 における HNF1A の変異が HNF4A の発現に影響を及ぼしている可能性を示唆する。今後は western blot 等によるタンパク質レベルにおける解析も行う予定となっている。

Subject No. : 29A1016

Title : Pathologic analysis of Maturity onset Diabetes of the Young(MODY) using
MODY1(HNF4A) or MODY3(HNF1A) patients-derived iPS cells.

Researchers : Shigeharu G. Yabe

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

Abstract :

Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) is an autosomal dominant form of diabetes that arise from one or more mutation in a single genes. To elucidate the pathology of MODY, we previously established MODY1(HNF4A) or MODY3(HNF1A) patient-derived iPS cells(MODY-iPSCs) and constructed the 6 step differentiation protocol on adherent culture mimicking the differentiation process of pancreatic beta cells in vivo(iPSCs, definitive endoderm(DE), primitive gut tube(PGT), pancreatic progenitor(PP), endocrine progenitor(EP), beta cell). Recently, we developed the 3D floating culture by spinner system during entire process modifying previous protocol. Upon differentiation, to compare differentiation capacity of adherent and suspension cultured hiPSCs during DE differentiation, we examined marker genes expression by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) at several time points (0, 12, 24, 48, 72, 96 hr after DE induction). Because markers gene expression was higher in suspension culture than in adherent culture for the most part, we selected suspension culture to differentiate MODY-iPSCs into pancreatic beta cells. Though we routinely cultured undifferentiated MODY-iPSCs on SNL feeder cells for differentiation on adherent culture, we found that feeder free cultured MODY-iPSCs were appropriate for differentiation in suspension culture. So we investigated a combination of medium and matrix in terms of maintenance of undifferentiated MODY-iPSCs and culture cost, as a result, it was found that a combination of Essential8 and vitronectin is good for the feeder free culture. We adapted on feeder cultured MODY-iPSCs to feeder free culture, and obtained feeder free cultured MODY-iPSCs. Next, we differentiated MODY3-iPSCs into pancreatic beta cells and attempted to detect mutant mRNA. We confirmed that MODY3 mutant mRNA which had premature termination codon (PTC) was degraded by non-sense mediated mRNA decay, in contrast MODY1 mutant mRNA which had no PTC was not degraded. Mutation of MODY3 is non-sense mutation and that of MODY1 is missense mutation. Taken together, we confirmed that MODY patient's mutant mRNA with PTC was selectively degraded.

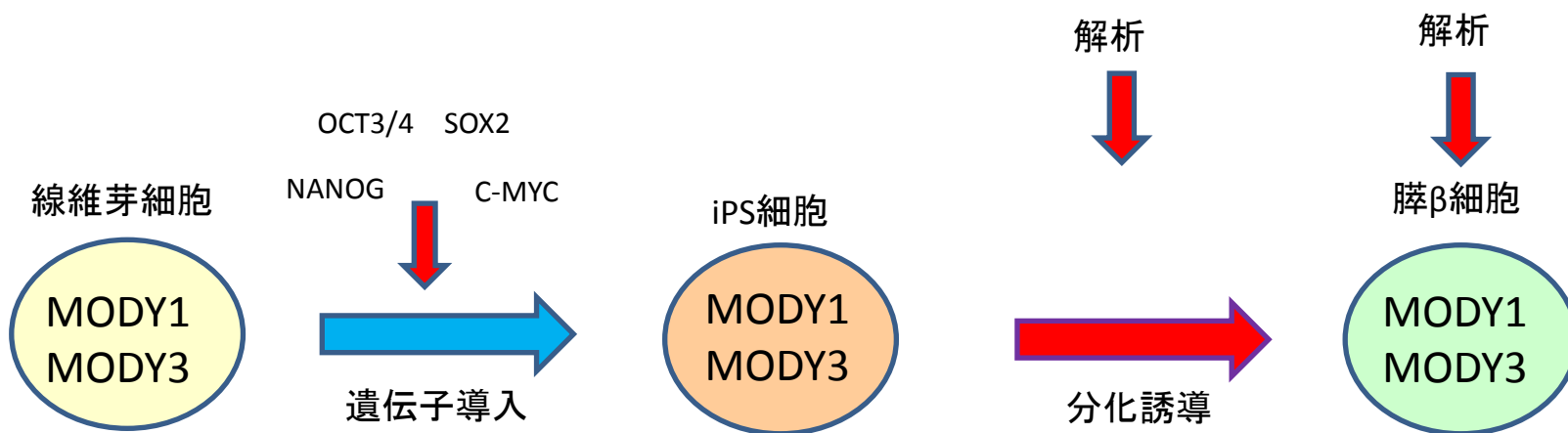
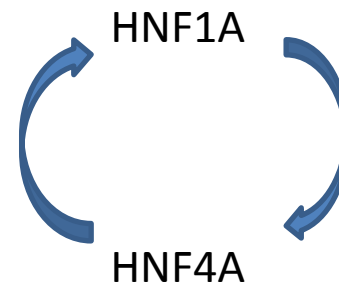
Next, to examine whether gene expression pattern was changed during differentiation process of MODY-iPSCs to pancreatic beta cells due to affection of mutant mRNA, we harvested mRNA from MODY1 or 3-iPSCs at each differentiation step (DE, PGT, PFG, PP, EP, beta) and carried out qRT-PCR. Clinical feature of MODY1 resemble that of MODY3 and HNF1A and HNF4A regulate gene expression each other. Moreover, HNF4A has two promoters (P2, P1) which were used at different expression site or timing, and HNF1A directly bind to P2 promoter. Therefore, expression pattern of P2 or P1-HNF4A mRNA may be altered during differentiation process of MODY1 or 3-iPSCs. So, we designed primers which could distinguish between p2 and P1 promoter derived HNF4A mRNA and investigated expression pattern of these mRNA by qRT-PCR. In future, we will examine behavior of these disease genes at protein level.

Researchers には、分担研究者を記載する。

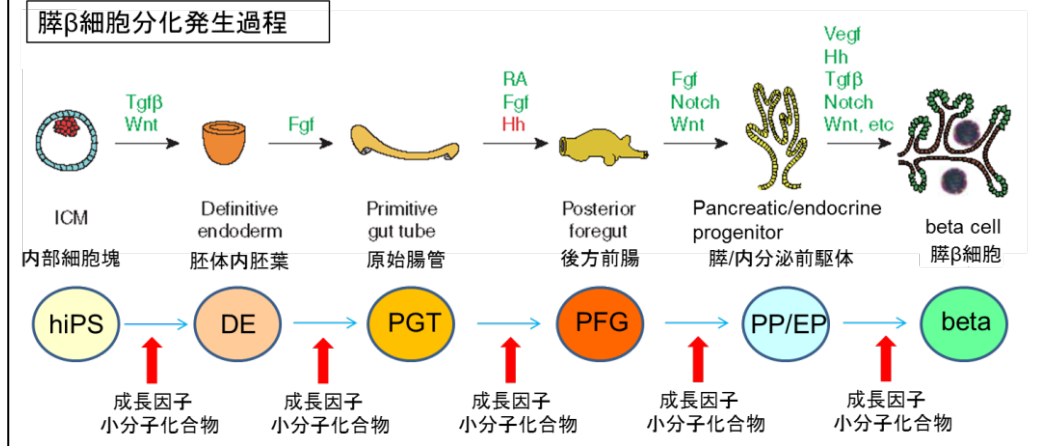
29指1016 HNF1AおよびHNF4A遺伝性糖尿病患者(MODY) 由来iPS細胞を用いた病態再現・発症機序の解析

MODY (若年発症遺伝性糖尿病)
・常染色体優性遺伝の若年発症糖尿病
・現在同定されている原因遺伝子は13種類
・この中のHNF1Aが原因遺伝子のMODY3
HNF4Aが原因遺伝子のMODY1
を研究対象とする。

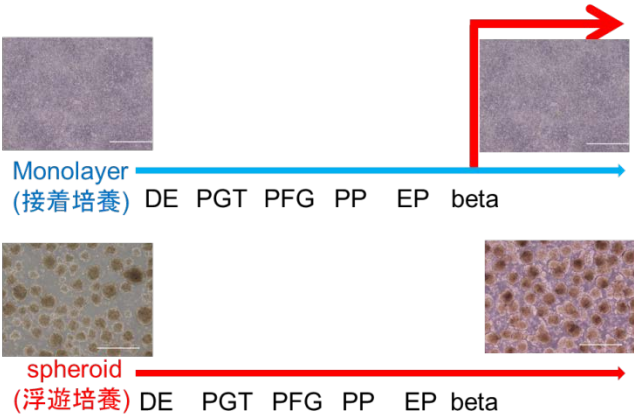
- ・MODY1とMODY3は臨床的特徴が似ている
- ・それぞれの原因遺伝子のHNF4AとHNF1Aは互いの発現を制御している



MODYの病態再現・発症機序の解析をするために、患者さんの膵β細胞を研究に用いる事は出来ないので、MODY1,3患者さんの繊維芽細胞に染色体に遺伝子が挿入されないセンダイウィルスを用いてOCT3/4, SOX2, NANOG, c-MYCを導入してMODY-iPS細胞を樹立する。このMODY-iPS細胞を膵β細胞に分化誘導して、その分化過程および分化した膵β細胞を解析する。

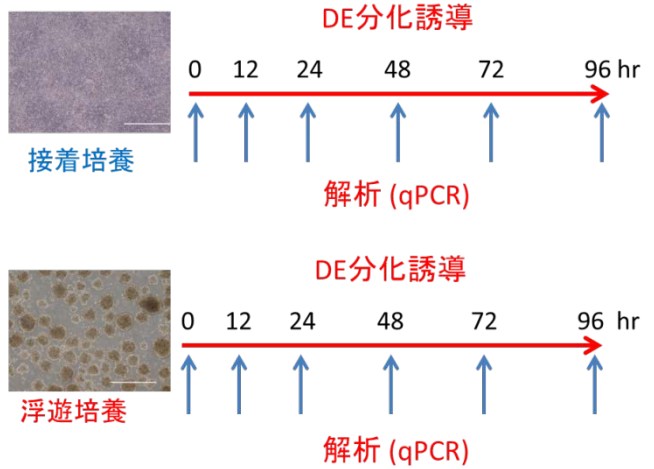


MODY-iPS細胞を膵β細胞に分化するための分化誘導法を構築(接着培養および浮遊培養系)



接着と浮遊培養どちらが分化誘導に良いか検討

浮遊培養の方が優れている事を見



浮遊培養にはon feederよりfeeder freeの方が適している事を確認し、MODY-iPS細胞を浮遊培養に適したfeeder free環境で培養可能にした。
 Feeder free MODY1,3-iPS細胞を分化誘導し、各発生段階でRNAを回収して遺伝子発現をqPCRにより遺伝子発現を解析した。
 HNF4AはP2,P1の2つのpromoterを使いわけるので、P2,P1由来HNF4A mRNAを区別できるprimerを作成し、MODY1,3の分化過程におけるP2,P1由来HNF4A mRNAの発現パターンを解析した。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：29指1016

研究課題名：HNF1AおよびHNF4A遺伝性糖尿病患者(MODY)由来iPS細胞を用いた病態再現・発症機序解析

主任研究者名：矢部茂治

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
該当なし				

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
ヒトiPS細胞のDefinitive endoderm(DE)分化過程における接着培養と浮遊培養の比較検討	矢部茂治、西田淳子、福田沙月、大河内仁志	日本再生医療学会	パシフィコ横浜	2018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
該当無し				

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
(原始腸管細胞の製造方法)	特願2018-087225	矢部茂治、大河内仁志、伊吹将人、松田拓敏	2018年4月27日	日本
(膵臓β細胞の製造方法)	特願2018-087226	矢部茂治、大河内仁志、伊吹将人、松田拓敏	2018年4月27日	日本
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	矢部茂治、大河内仁志、伊吹将人	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。