

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題  
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine,  
Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) iPS 細胞を用いた新規糖尿病治療法開発  
(英語) Establishment of new therapeutic method for diabetes using iPS cells

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所  
教授 川口 義弥

所属 役職 氏名： (英語) Kyoto University, Center for iPS Cell Research and Application,  
Professor Yoshiya Kawaguchi

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### <Ngn3 陽性膵内分泌前駆細胞を効率よく作成する方法の開発>

これまでにヒト iPS 細胞から内分泌組織と外分泌組織の両方を備える立体的膵組織の作成方法を樹立した。作成した組織の内分泌細胞含有率は成体膵臓の内分泌細胞含有率と同等の 5%であった。そこで、今年度は、内分泌細胞含有率を上げる方法の開発に着手した。マウス発生現象に立ち返り、内分泌分化過程における細胞増殖の検討を行ったところ、胎生過程のインスリン細胞、Ngn3 陽性内分泌前駆細胞はほとんど増殖しておらず、Ngn3 陽性内分泌前駆細胞発生の際である Nkx6.1 陽性 Trunk 細胞の段階で活発に増殖していることが判明した。したがって、目標達成の要は、Nkx6.1 陽性 Trunk 細胞を多く作り、そこから効率的に Ngn3 陽性細胞の分化を引き起こすことにあると考えた。しかし、マウス発生における Nkx6.1 発現調整機構はほとんど分かっておらず、Ngn3 発現誘導に関しても Notch シグナル阻害が有効である以外の知見は得られていない。手がかりを得るために、まずはマウス膵内分泌細胞系列の各分化段階を規定する FoxO1, Pdx1, Ngn3, Nkx6.1, Hes1 の 5つの転写因子の発現量推移を解析した。その結果、Nkx6.1 陽性 Trunk 細胞、Ngn3 陽性内分泌前駆細胞、インスリン細胞へと分化する過程でそれぞれの転写因子がダイナミックな変動を遂げていることが判明した。そこで我々は、「これらの重要な転写因子群は各々独立した発現制御機構を持つのではなくて、全体をコーディネートする“指揮者”によって制御されている」と仮説した。その候補として注目したのが、遺伝子 X である。遺伝子 X の機能的阻害剤を分化誘導プロトコールに添加したところ、発生の段階的細胞分化における上記転写因子群のダイナミックな発現変化パターンを *in vitro* で再現するとともに、有意な Nkx6.1 と Ngn3 の上昇が得られ、最終的にインスリン細胞誘導効率が約 2.5～3 倍に改善した。

< Establishment of new method to efficiently induce Ngn3<sup>+</sup> endocrine precursor cells from human iPS cells >

We have already established a basic protocol to make “three-dimensional whole pancreas” that contains both endocrine and exocrine cells from human iPS cells. The endocrine content was approximately 5% of the whole tissue that was almost equal to that in mature organ. However, the size of the induced tissue was limited and the core region of the tissue showed increased cell death presumably insufficient oxygenation as the tissue size got bigger. Furthermore, endocrine cells did not form apparent islet-like cell clusters that prevented from obtaining islet function. After transplantation into the immune-deficient diabetic mice, the induced tissue secreted human c-peptide and elevation of human c-peptide level in the blood was confirmed after glucose stimulation, but they failed to normalize the blood glucose level of the recipient animal.

This year, we attempted to create a new method to increase the endocrine content. For this purpose, we analyzed the cell proliferation during murine endocrine development and found that embryonic Insulin<sup>+</sup> cells and Ngn3<sup>+</sup> cells do not actively proliferate whereas Nkx6.1<sup>+</sup> trunk cells, the precursor of Ngn3<sup>+</sup> cells, are actively proliferate. Thus, establishing a method to achieve efficient induction of Nkx6.1 cells and differentiation into Ngn3<sup>+</sup> status are thought to be important to make more endocrine cells. Unfortunately, however, previous mouse studies have clarified no regulatory mechanism in regulating Nkx6.1 expression. As to the Ngn3, Notch inhibition has been shown to induce Ngn3 but other mechanism is still unrevealed.

For seeking the clue, we analyzed the expression levels of important transcription factors including FoxO1, Pdx1, Ngn3, Nkx6.1 and Hes1 that define multistep differentiation status of endocrine lineage during mouse pancreatogenesis. We found they showed very dynamic change at each step and hypothesized that each transcription factors are not regulated independently but unknown conductor orchestrates the set of transcription factors. We focused on gene X and applied the inhibitor of gene X to the induction protocol and found that this treatment successfully recapitulated the dynamic changes of each transcription factors on the culture dish and caused accelerated expressions of Nkx6.1 and Ngn3 resulting in the more Ins<sup>+</sup> cell production that corresponded 2.5~3 times more than the previous protocol.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 3 件、国際誌 1 件）

1. Goto T, Elbahrawy A, Furuyama K, Horiguchi M, Hosokawa , Aoyama Y, Tsuboi K, Sakikubo M, Hirata K, Masui T, Kubo H, Sakai Y, Uemoto S and Kawaguchi Y. Liver-specific Prox1 inactivation causes hepatic injury and glucose intolerance in mice. FEBS Lett. 2017, 591, 624-635
2. 川口義弥、糖尿病の再生医療の展望、BIO Clinica (0919-8237)、2016、31 巻 11 号 Page43-47
3. 川口義弥、膵組織の病態からの膵組織分化機構、実験医学、2016、vol. 34、No. 17（増刊）、Page167 (2935) -172 (2940)
4. 川口義弥、膵発生段階で外分泌組織を欠くマウスは糖尿病になる、医学のあゆみ、2017、vol. 260, No. 6, 537-538

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. iPS 細胞を用いた立体的膵組織作製について、口頭、川口義弥、第 89 回内分泌学会学術総会「Late Breaking Science2」、2016/4/23、国内
2. 多能性幹細胞を用いた糖尿病治療開発の展望について、口頭、川口義弥、宮城県泌尿器科医会講演会、2016/5/21、国内
3. iPS 細胞研究が拓く糖尿病治療の未来について、口頭、川口義弥、第 59 回西東京臨床糖尿病研究会例会、2016/6/11、国内
4. 糖尿病と細胞分化について、口頭、川口義弥、The 3<sup>rd</sup> Diabetes Research Innovation Symposium 2016、2016/7/9-10、国内
5. 多能性幹細胞を用いた立体的膵組織の作成について、口頭、川口義弥、第 71 回日本消化器外科学会・総会シンポジウム 2 「細胞移植・再生医療・人工臓器治療の Orthodox & Serendipity」、2016/7/14-16、国内
6. 発生・再生・がんにおける立体組織構築内の細胞非自律的制御機構について、口頭、川口義弥、第 16 回 GI リサーチフォーラム、2016/7/27、国内
7. 多能性幹細胞からの機能的膵組織作成の展望について、口頭、川口義弥、再生内分泌代謝研究会世話人会・講演会、2016/9/3、国内
8. 多能性幹細胞を用いた糖尿病治療開発の展望について、口頭、川口義弥、DPP-4 Inhibitor Update 2016 in Kyoto、2016/9/29、国内
9. 多能性幹細胞を用いた立体的膵組織の作成について、口頭、川口義弥、第 65 回近畿膵疾患談話会、2016/10/15、国内
10. 多能性幹細胞を用いた立体的膵組織の作成について、口頭、川口義弥、第 4 回 Type1 DM Summit、2016/10/22、国内

11. Construction three-dimensional pancreatic tissue from pluripotent cells, 口頭、川口義弥、  
The 2<sup>nd</sup> IMCR Symposium on Endocrine and Metabolism, 2016/11/10-12, At Gunma
12. 多能性幹細胞を用いた立体的膵組織の作成について、口頭、川口義弥、第 26 回 DM Club Meeting、  
2016/11/25、国内
13. 多能性幹細胞を用いた立体的膵組織の作成について、口頭、川口義弥、第 7 回 EndoDM カンファ  
レンス、2016/12/10、国内
14. iPS 細胞を用いた立体的膵組織作成について、口頭、川口義弥、美波セミナー in Kanagawa、  
2017/2/4、国内
15. 膵立体構築における細胞自律的・非自律的制御について、口頭、川口義弥、3<sup>rd</sup> Cardiovascular  
Diabetes network Meeting 研究会、2017/2/24、国内
16. Non-cell autonomous regulation pancreatic organogenesis, regeneration and cancer、口頭、  
川口義弥、CDB Symposium 2017、2017/3/27-29、At Kobe
17. 正常なマウス膵内分泌組織発生には外分泌組織との共存が必要である、口頭、川口義弥、第 94  
回日本生理学会大会、2017/3/30、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

以下の機会研究成果を発表した。

- ・膵発生における細胞非自律的制御について、川口義弥、  
第 12 回分生研シンポジウム「発生再生のダイナミズムと細胞間相互作用」  
2016/12/21、国内

(4) 特許出願

特許出願番号の公開を希望しない。