

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 (幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)

(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine
(The Program for Technological Innovation of Regenerative Medicine)

研究開発課題名： (日本語) 多能性幹細胞を用いた膵β細胞の成熟化機構解明

(英語) The use of pluripotent stem cells to model the mechanism of pancreatic beta cell maturation

研究開発担当者 (日本語) 生命理工学院 教授 桑 昭苑

所属 役職 氏名： (英語) School of Life Science and Technology Professor Shoen Kume

実施期間： 平成28年11月21日 ～ 平成29年3月31日

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

下記の研究は、糸 昭苑教授（東京工業大学 生命理工学院）、荒木喜美教授（熊本大学 生命資源研究・支援センター）、佐々木えりか部長（公益財団法人実験動物中央研究所 マーモセット研究部）らのグループによる成果です。

私たちは、ドナー不足を解決するため、移植医療に使えるような、成熟度の高い膵β細胞をヒト iPS 細胞より創り出す技術の開発を目指す。今年度は、ヒト iPS 細胞由来膵β細胞への分化誘導方法の最適化を行った。その結果、安定に糖依存的にインスリン分泌する能力を有するヒト iPS 細胞由来膵β細胞を作ることができるプロトコルを決定した。また、今後分化細胞を純化して解析できるように、ゲノム編集を用いたレポーター遺伝子を組み込んだ遺伝子改変ヒト iPS 細胞株の作成を行い、得られた遺伝子改変ヒト iPS 細胞株由来の分化細胞についての解析を進めた。そして、この研究課題で構築した分化誘導方法が早く臨床に応用できるように、京都大学 iPS 細胞研究所で行われている再生医療用 iPS 細胞ストックプロジェクトから iPS 細胞株を入手し、ワーキングセルバンクの作製と共に、それを用いた分化誘導実験を行った。その結果、私たちがこれまで確立した分化誘導方法が適用できることが確認された。来年度以降は、さらに再生医療用 iPS 細胞株の数を増やして、多くの細胞株について適用可能かどうかの検討を行う予定である。また、ヒト iPS 細胞由来の分化細胞を用いた動物体内への移植実験を行う必要があるが、今年度はまずは、正常な動物モデルへの移植実験を行い、移植手法について検討した。

ヒト多能性幹細胞から作製された膵β細胞の機能を生体において検証するには、実験動物への移植系を確立することが必要である。ゲノム編集を用いて、膵β細胞の機能が低下しているマウス系統を樹立することに成功した。表現型解析の結果、この系統では、かなり早期から膵β細胞の機能不全が観察されており、移植実験に利用できると期待される。体外受精を行うことで、マウスの数を効率的に増やしており、同時に凍結 2 細胞期胚も作製している。

一方、前臨床試験を見据えて、非ヒト霊長類を用いた安全性、有効性試験が行えるよう環境整備するため、定量性に優れたトランスジェニック技術を用いた糖尿病モデルマーモセットの開発を目指します。変異型 Hepatocyte nuclear factor 1α (P291fsinsC) を原因遺伝子とする若年性成人発症型糖尿病モデルマーモセット作製を目的とし、CMV プロモーター下に HNF1α P291fsinsC と P2A を介してレポーター遺伝子である GFP を搭載した発現ベクターを作製した。作製した発現ベクターは 293T 細胞にトランスフェクションし、各遺伝子の発現をウエスタンブロッティングにより確認後、レンチウイルスにパッケージングした。29 年度より個体作製のため、本レンチウイルスベクターを用いてマーモセット受精卵へインジェクション、胚移植を開始する。

The followings are the results performed by research groups led by Shoen Kume (Professor, Tokyo Tech, School of Life Science and Technology), Kimi Araki (Professor, Kumamoto University, Institute of Resource Development and Analysis) and Erika Sasaki (Director, Applied Developmental Biology Center and Marmoset Research Department, Central Institute for Experimental Animals).

We aim to develop functional matured pancreatic beta cells derived from human induced pluripotent stem (hiPS) cells that can be used for cell replacement therapy for the cure of diabetes. This year, we try to optimize the protocol for in vitro differentiation of hiPS cells into pancreatic beta cells. Under our revised protocol, the hiPS-derived pancreatic beta (hiPS-beta) cells are able to respond to high glucose and secrete insulin in a reproducible manner. We also performed gene expression analysis on these hiPS-beta cells, and compared with the expression profile of the adult islets and pancreas. To enable purifying the hiPS-derived pancreatic beta cells, we created an iPS cell line that carries a reporter under insulin promoter, using genome editing technology. We analyzed the cell line obtained and the derived differentiated cells.

We also obtained hiPS cells stocks for Regenerative Medicine distributed by CiRA Kyoto University. We prepared working cell stocks from these iPS cell lines and performed in vitro differentiation using our established protocol on some of the cell lines and found that our protocol works well. We will continue this on the rest of the cell lines we obtained. We also performed some experiment for transplanting the differentiated hiPS cells into wild type mice to test the stage, site of transplantation.

It is necessary to establish transplantation system using experimental animals to verify the function of pancreatic β cells derived from iPS cells *in vivo*. We have succeeded in establishing a mouse strain showing dysfunction of pancreatic β cells using CRISPR-Cas9 genome editing. In this line, hyperglycemia was observed from three weeks old in both male and female, therefore, it is expected to be useful for transplantation experiments. By performing in vitro fertilization, we are efficiently increasing the number of mice and frozen 2 - cell stage embryos.

It is important to develop the diabetic non-human primate model using marmoset by the transgenic technology toward the preclinical study for quantitative evaluation of safeties and efficacies of regenerative medicine in diabetes. Type3 form of maturity-onset diabetes of the young (MODY3) is known to be caused due to the mutation in the human hepatocyte nuclear factor 1 α gene (HNF1 α P291fsinsC). To generate transgenic marmoset carrying a HNF1 α P291fsinsC, we have created the lentiviral vector that consists of CMV promoter followed by HNF1 α P291fsinsC, P2A and GFP. This vector was transfected to 293T cell and the individual gene expressions were confirmed by western blotting. We will start viral injection to a marmoset zygotes and embryo transfer in April 2017.

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 2件、国際誌 5件）

1. Koga T, Shiraki N, Yano S, Suico MA, Morino-Koga S, Sato T, Shuto T, Kume S, Kai H. Mild electrical stimulation with heat shock guides differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing cells within the definitive endoderm. **BMC Biotechnology** 2017. 17(1), 14. Doi:10.1186/s12896-017-0331-z
2. Kaitsuka T, Kobayashi K, Otsuka W, Kubo T, Hakim F, Wei FY, Shiraki N, Kume S and Tomizawa K. Erythropoietin facilitates definitive endodermal differentiation of mouse embryonic stem cells via activation of ERK signaling. **Am. J. of Physiology - Cell Physiology**, 2017. ajpcell.00071.2016. doi: 10.1152/ajpcell.00071.2016.
3. Kume S. Heterogeneity of β -cells. **J Diabetes Investig**. Published on line Jan 31, 2017. 10.1111/jdi.12608
4. Omori H, Ogaki S, Sakano D, Sato M, Umeda K, Nakagata N, Kume S. Changes in expression of C2cd4c in pancreatic endocrine cells during pancreatic development. **FEBS Lett** 590, 2584-93, 2016.
5. Sakano D., Choi S, Kataoka M, Shiraki N, Uesugi M, Kume K, Kume S. Dopamine D2 receptor-mediated regulation of beta cell mass. **Stem Cell Report** 7, 95-109, 2016.
6. 白木伸明 桑昭苑「iPS細胞と肝胆膵疾患—膵臓・肝臓への分化—」*GI Research* 第24巻2号30-36, 2016
7. 坂野大介 桑昭苑「膵 β 細胞の再生」*Bio Clinic* 31(3), 28-32, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「多能性幹細胞を用いた膵の発生再生研究」（口頭、シンポジウム）桑昭苑 日本解剖学会 長崎、2017/3/30 国内
2. 「多能性幹細胞の分化制御における培地組成の重要性 ～メチオニン除去培地を利用した分化制御～」（口頭）桑昭苑 仙台 再生医療学会 2017/3/8 国内
3. 「多能性幹細胞を用いた膵 β 細胞への分化誘導研究～再生医療と創薬への展望～」（口頭）桑昭苑 第13回山口糖尿病フォーラム 宇部市 2017/2/20 国内
4. 「ヒト iPS 細胞におけるメチオニン代謝とヒストン修飾の役割の解明」（ポスター）神戸梓沙、白木伸明、木村宏、桑昭苑 横浜市 日本分子生物学会 2016/11/30—12/2 国内
5. 「未分化 iPS 細胞および分化過程における亜鉛の役割」（ポスター）古田奈央、白木伸明、荒川、桑昭苑 横浜市 日本分子生物学会 2016/11/30—12/2 国内
6. 「モノアミンによるインスリン分泌制御機構の解明」（ポスター）上船史弥、園田雄輝、坂野大介、桑昭苑 横浜市 日本分子生物学会 2016/11/30—12/2 国内
7. “How can we generate functional beta cells?” 『The Japan Diabetes Innovation Summit』（口頭）Shoen Kume 京都市 2016/11/29-30 国内
8. 「多能性幹細胞から膵臓 β 細胞を創る」（口頭）桑昭苑 「細胞を創る」研究会 9.0 東京都 2016/11/21 国内

9. ‘Generation of insulin-producing β -like cells from human iPS cells’ (口頭) Shoen Kume, 11th IDF WPR & 8th AASD meeting, Taipei. 2016/10/29 国外
10. “Generation of insulin-producing β -like cells from human iPS cells.” (口頭) Shoen Kume, 10th International Conference on Cell Therapy (IRICT) Seoul, 2016/9/29 国外
11. “Monoamine signaling controls cell proliferation and differentiation state of pancreatic beta cell” (口頭) Daisuke Sakano, Choi Sungik, Masateru Kataoka, Nobuaki Shiraki, Shoen Kume. 日本生化学会 仙台市 2016/9/25-27 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「多能性幹細胞を用いた糖尿病の再生医学の展望～ライフワークバランスで人生も研究も楽しく！～」(口頭) 糸 昭苑 第50回日本小児内分泌学会学術集会ランチョンセミナー 東京都 2016/11/17 国内
2. 「iPS細胞と再生医療」(口頭) 糸 昭苑 地元自治会と懇談会 横浜 2016/8/25
3. 研究室見学会 東京工業大学附属科学技術高等学校 2016/7/11
4. 「多能性幹細胞から膵 β 細胞への分化誘導」(口頭) 糸 昭苑 バイオインダストリー協会勉強会 東京 2016/5/25

(4) 特許出願

なし

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 (幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)

(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine
(The program for technological innovation of regenerative medicine)

研究開発課題名：(日本語) 多能性幹細胞を用いた膵β細胞の成熟化機構解明

(英語) The use of pluripotent stem cells to model the mechanism of
pancreatic beta cell maturation

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人熊本大学 生命資源研究・支援センター 教授 荒木 喜美

所属 役職 氏名：(英語) Kumamoto University, Institute of Resource Development and Analysis,
Professor Kimi Araki

実施期間：平成 28 年 11 月 21 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 病態モデルマウスの開発と供給

開発課題名：(英語) Development and production of diabetes model mice

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：国立大学法人 東京工業大学 生命理工学院 桑 昭苑 総括研究報告を参照。

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 0件、国際誌 2件）

1. Sakata, K., Araki, K., Nakano, H., Nishina, T., Komazawa-Sakon, S., Murai, S., Lee, G.E., Hashimoto, D., Suzuki, C., Uchiyama, Y., Notohara, K., Gukovskaya, A.S., Gukovsky, I., Yamamura, K., Baba, H., Ohmuraya, M. Novel method to rescue a lethal phenotype through integration of target gene onto the X-chromosome. *Sci. Rep.* 2016, 6, 37200.
2. Liu, L., Suzuki, T., Shen, J., Wakana, S., Araki, K., Yamamura, K., Lei, L., Li, Z. Rescue of retinal morphology and function in a humanized mouse at the mouse retinol-binding protein locus. *Lab Invest.* 10, 1038, 2017

（2）学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. p53により誘導される LincRNA-p21 の生体内発現解析, ポスター, 古畑 理樹, 中原 舞, 伊東 春香, 荒木 正健, 吉信 公美子, 山村 研一, 荒木 喜美: 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016.11.30-12.2, 国内.
2. Gene-trap mutagenesis is useful for analysis of long intergenic non-coding RNA genes in vivo. ポスター, Nakahara, M., Yoshinobu, K., Furuhata, R., Kido, Y., Sugimoto M., Yamamura K., Araki M. and Araki, K. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016.11.30-12.2, 国内.

（3）「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

特になし

（4）特許出願

特になし

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 (幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)

(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine
(The Program for Technological Innovation of Regenerative Medicine)

研究開発課題名： (日本語) 多能性幹細胞を用いた膵β細胞の成熟化機構解明

(英語) The use of pluripotent stem cells to model the mechanism of pancreatic beta cell maturation

研究開発担当者 (日本語) 公益財団法人実験動物中央研究所 マーモセット研究部 部長
・応用発生学研究センター センター長(兼任) 佐々木 えりか

所属 役職 氏名： (英語) Central Institute for Experimental Animals, Applied Developmental Biology Center and Marmoset Research Department, Director, Erika Sasaki

実施期間： 平成28年11月21日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 糖尿病モデルマーモセットの開発

開発課題名： (英語) Development of the diabetes model marmoset.

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：桑昭苑（東京工業大学・生命理工学院・教授）総括研究報告を参照。

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 0 件、国際誌 0 件）
該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 非ヒト霊長類を用いた iPS 細胞を用いた再生医療の前臨床研究, 口頭(招待講演), 佐々木えりか, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/9, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし