

31. ヒト iPS 細胞を用いた 2 型糖尿病発症機序の解明

木戸 良明

*神戸大学 大学院保健学研究科 病態解析学領域 分析医科学分野

Key words : ヒト iPS 細胞, 2 型糖尿病感受性遺伝子, 膵 β 細胞

緒言

我が国における 2 型糖尿病患者の急増が問題となり、国民病と呼ばれるようになってから久しい。2 型糖尿病の病態は、肥満などによりインスリンが効かなくなる「インスリン抵抗性」と、膵 β 細胞からのインスリン分泌が低下した「インスリン分泌不全」に大別される。日本人の 2 型糖尿病患者の特徴として、特に「インスリン分泌不全」が重要な病態と考えられており、欧米人と比べて日本人をはじめとした東アジア人では膵 β 細胞の機能・量ともに低下していると考えられている。

近年、2 型糖尿病患者を対象としたゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、2 型糖尿病発症の危険因子が複数同定されている。特に電位依存性カリウムチャネルの一つである *Kcnq1* 遺伝子の一塩基多形 (SNP) については、わが国の異なる 2 グループから報告されており、今最も注目されている 2 型糖尿病感受性遺伝子である。こうした「遺伝因子」の同定が進みつつあるが、2 型糖尿病発症におけるメカニズムに関しては未だにほとんどわかっていないのが現状である。

我々は、マウスを用いたこれまでの解析によって、*Kcnq1* 遺伝子内に変異が存在すると出生時より膵 β 細胞量が減少することを明らかにしている¹⁾。しかしながら、これらはマウスを用いた実験データであり、実際の SNP がどのような役割を担っているかは、ヒトの膵 β 細胞を使用しないと判断できない。そこで *Kcnq1* 遺伝子の SNP を保有している個人の組織より iPS 細胞を作製し、膵 β 細胞に分化させることにより、膵 β 細胞における SNP の重要性を確認することにした。*Kcnq1* の SNP の有無が、膵 β 細胞への分化、もしくは分化した膵 β 細胞の viability に影響するかどうかについての検討を行うべく本研究を開始した。

方法

1. 細胞培養

SNL 細胞 (マウス線維芽細胞の一種でフィーダー細胞として用いた) を SNL 培地 (DMEM、FBS、penicillin/streptomycin) を用いて、37°C、5% CO₂ 下で培養した。SNL 細胞にマイトマイシン C 処理をして増殖をとめた MSTO 細胞も同じく、SNL 培地を用いて 37°C、5% CO₂ の下で培養した。ヒト iPS 細胞 (201B7: 神戸大学大学院イノベーション研究科 iPS 細胞応用医学講座の青井教授より供与) は、hES 培地 (Primate ES medium、penicillin/streptomycin、rhbFGF) を用い、MSTO を播種したディッシュで 37°C、5% CO₂ の下で培養した。またフィーダーフリー細胞 (FF201B7: 青井教授より供与) は StemFit AK02N (味の素) を培地として用いて、37°C、5% CO₂ のもと培養を行った。

2. 未分化マーカーの発現確認

未分化維持していたヒト iPS 細胞を用いて細胞免疫染色を行った。固定は 4% PFA、ブロッキングは 1% BSA、0.1% TritonX-100/PBS(-) を用いて行い、一次抗体には抗 NANOG モノクローナル抗体、二次抗体には Alexa 488 抗ヤギ IgG 抗体を用いた。また、同様に未分化維持していたヒト iPS 細胞から、Rneasy Mini Kit (QIAGEN) を使用して

*現所属：神戸大学 大学院保健学研究科 病態解析学領域 病態代謝学分野

RNA を抽出し、PrimeScript High Fidelity RT-PCR Kit (TaKaRa) を用いて RT-PCR を行って、電気泳動により NANOG、OCT3/4 の発現を確認した。

3. 分化マーカーの発現確認

胚様体形成後 8 日間培養して分化した iPS 細胞を用いて細胞免疫染色を行った。一次抗体には、内胚葉マーカーとして抗 SOX17、抗 FOXA2 モノクローナル抗体、中胚葉マーカーとして抗 α -SMA モノクローナル抗体、外胚葉マーカーとして抗 β -III tubulin、抗 Nestin、抗 CDX2 モノクローナル抗体を用いた。二次抗体には、Alexa 594 抗マウス IgG 抗体、Alexa 488 抗ヤギ IgG 抗体を使用した。また、同様に分化した iPS 細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行って内胚葉マーカーである PAX6、SOX17、FOXA2 の発現をみた。

4. 分化誘導実験

既報²⁾をもとに、ヒト iPS 細胞からインスリン陽性細胞への分化を試みた (図 1)。Stage I : 2% GFR-B27 を含む RPMI1640 で FF207B を培養しつつ、100 ng/ml Activin A、3 μ M CHIR99021 を 4 日間投与することによって胚体内胚葉への分化を行った。 Stage II : 1% GFR-B27 を含む iMEM メディウムで培養しつつ、3 日間 50 ng/ml KGF 投与を行い原始腸管への分化を行った。 Stage III : 後方前腸まで分化誘導すべく、100 ng/ml NOGGIN、0.5 μ M KAAD-CYC、10 nM TTNPB を 3 日間負荷した。

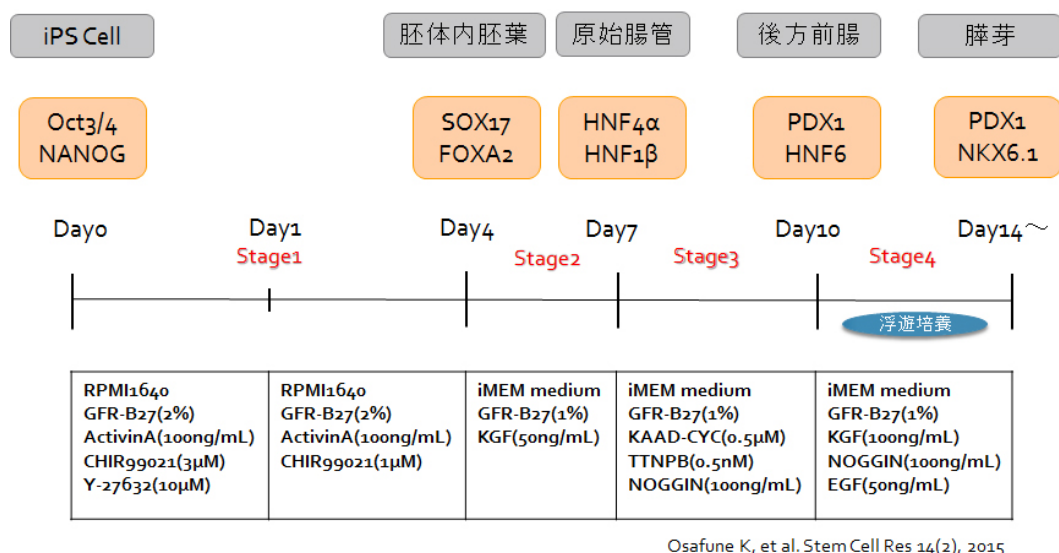


図 1. 芽までの分化誘導プロトコール
上記方法に従って分化誘導を行った。

5. iPS 細胞ゲノム DNA 塩基配列解析

計 11 クローンの iPS 細胞のゲノム DNA を抽出し、*Kcnql* SNP を同定する primer (sense 5-AAAAGTGGCAGGATTGTCTG-3, antisense 5-TGGTAGGGAACAACACTGGAGA-3) を用いて、PCR ならびに sequence 反応を行った。

結 果

ヒト iPS 細胞 (FF207B) を解凍して培養すると、日数を経るにしたがってコロニーの増大が認められた。コロニーは大きくなるにつれ分化しやすい傾向にあるため、未分化状態を維持するには継代時期が重要であると思われた。継代して 3 日後には、明瞭に分化したコロニーが観察された。未分化状態を維持できているか確認するため、24 well plate を用いて細胞免疫染色を行ったところ、未分化マーカーである NANOG および OCT3/4 の発現が認められた。また、RNA を抽出し RT-PCR を行ったところ、再び NANOG、OCT3/4 の発現を認め、未分化状態を維持できていることが

証明された。次に iPS 細胞を HEMA コートディッシュを用いて浮遊培養し胚様体形成を試みたところ、3 日目には球状の凝集塊が観察され、6 日目には胚様体を形成した。形成された胚様体を 24 well plate に移し培養を続けると 14 日目には神経様に分化しているのが観察された。この細胞に対し、細胞免疫染色を行ったところ、内胚葉マーカー (SOX17、FOXA2)、中胚葉マーカー (α -SMA)、外胚葉マーカー (β -III tubulin、Nestin、CDX2) それぞれの発現がみられ、iPS 細胞が三胚葉に分化したことが示された。

分化誘導実験を行ったところ、Stage I である胚体内胚葉の分化マーカーとして SOX17 および FOXA2 の発現が RT-PCR と免疫染色によって確認された (図 2)。

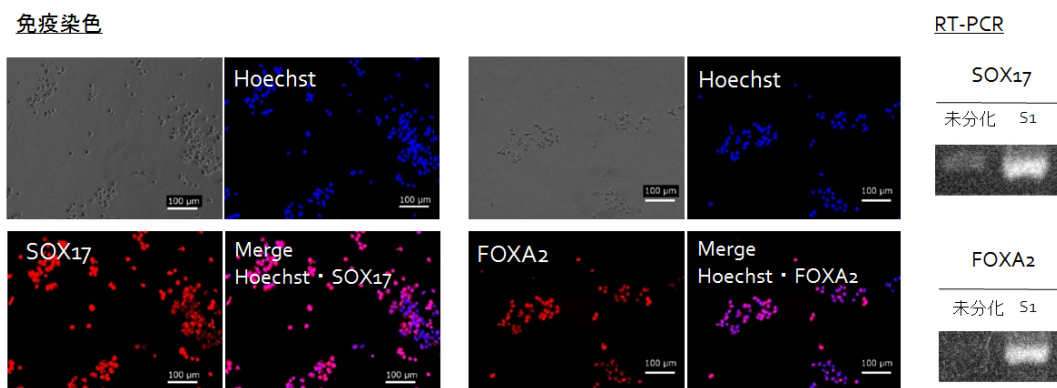


図 2. 胚体内胚葉

(左) 免疫染色 : SOX17 (左) および FOXA2 (右) の発現が確認された。(右) RT-PCR : 未分化 iPS 細胞では認められなかった SOX17、FOXA2 の発現が確認された。

Stage II では HNF4a、Stage III では PDX1 の発現を免疫染色、RT-PCR によってそれぞれ確認したところ、いずれにおいても発現が確認された。さらに、浮遊培養に変更して Stage IV (膝芽) への分化誘導を行ったところ、NKX6.1 の発現が確認され、膝芽までの分化誘導を達成した (図 3)。

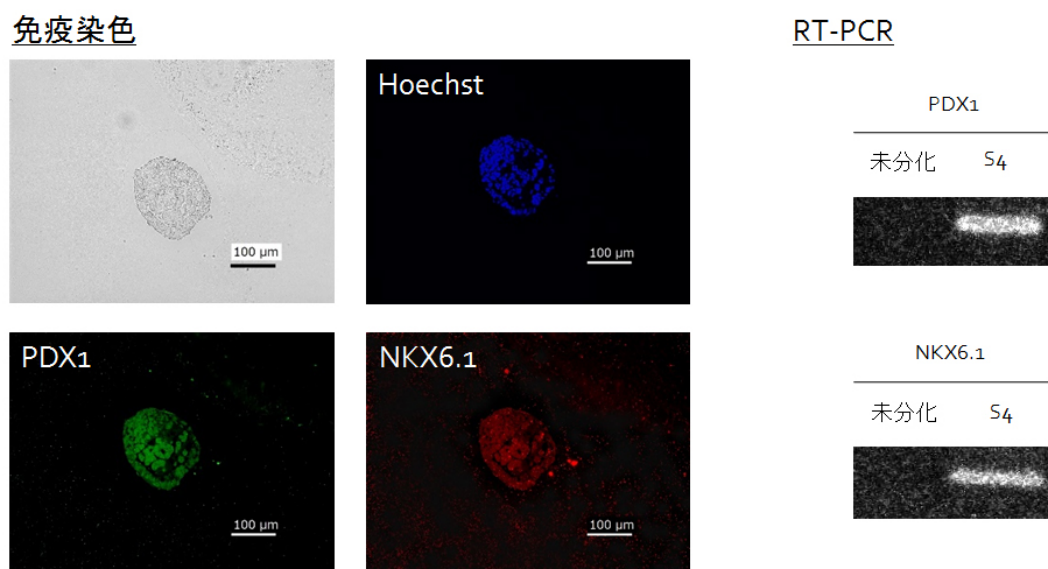


図 3. 膝芽

(左) 免疫染色 : (左下) PDX1、(右下) NKX6.1 の発現が確認された。(右) RT-PCR : 同様に PDX1、NKX6.1 の発現が確認された。

さらに内分泌細胞、 β 細胞までの分化誘導を行うことが今後の研究課題である。

また、当初の目的である *Kcnq1* 遺伝子の SNP がヒト iPS 細胞においても確認されるかを検討するため、抽出したゲノム DNA を用いて sequence 解析を行った。その結果、現在我々が保持している 11 クローンの iPS 細胞のうち、8 クローンにおいて糖尿病発症リスクとなる SNP が存在することが明らかとなり、そのうち 1 つがリスクアリルをホモで有していた (表 1)。

表 1. 2 型糖尿病感受性遺伝子 KCNQ1 の SNP 検索

iPS細胞クローン	KCNQ1
201B7	C/T (Risk:Hetero)
73E	C/T (Risk:Hetero)
75B	T/T (non-Risk:Homo)
3AB-4	C/T (Risk:Hetero)
T/G120	T/T (non-Risk:Homo)
T/G118	T/T (non-Risk:Homo)
409B2	C/T (Risk:Hetero)
62B7	C/T (Risk:Hetero)
29A-1	C/T (Risk:Hetero)
46C-2-4	C/T (Risk:Hetero)
47C3	C/C (Risk:Homo)

C がリスクアリル、T が非リスクアリルである。11 クローンのヒト iPS 細胞について検索したところ、8/11 でリスクアリルの存在が認められた。

考 察

当初の計画では、本研究期間内にインスリン陽性細胞までの分化、および *Kcnq1* 遺伝子の SNP による phenotype 確認まで行う予定であったが、予定より大きく遅れてしまった。原因としては、ヒト iPS 細胞培養中にコンタミネーションが相次ぎ、一時実験をストップせざるを得なかった点が挙げられる。iPS 細胞の培養・維持において、十分な管理体制が整っていなかったことが悔やまれる。実験再開後は Stage IV まで順調に分化誘導できたものの、そこから先への進展で難渋しており、今後条件の再検討が必要と考えている。

また *Kcnq1* 遺伝子のリスクアリルとなる SNP に関しては、日本人で 30%、欧米人で 5% 存在すると報告されており、我々が保有・使用している iPS 細胞が欧米人由来であることから SNP 保有確率は低いものと想定していた。しかしながら予想に反し、8/11 クローンがリスクアリルの SNP を有していた。リスクアリルを持たないコントロール群も 3 クローン存在することから、比較検討が進められる状態である。ただし、2015 年に我々が報告したマウスの結果では、リスクアリルとなる変異が父親から引き継ぐか母親から引き継ぐかによって表現型が異なることを明らかにしている¹⁾。この結果がヒトでも当てはまるのであれば表現型が現れるのは 1/2 になることから、コントロール群の iPS 細胞はもう少し n 数を増やしていく必要があると考えている。リスクアリル群に関しては N = 8 あることから、とりあえず十分であろう。あとは、2 型糖尿病患者の iPS 細胞を独自に作製することによって、*Kcnq1* 遺伝子の SNP だけでは定義されない糖尿病発症メカニズムが、何によって影響されているかの検討も行っていく予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、神戸大学大学院イノベーション研究科 iPS 細胞応用医学講座の青井貴之教授、および神戸大学大学院医学研究科糖尿病内分泌内科学講座の浅原俊一郎特命助教である。最後に、本研究にご支援賜りました上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Asahara S, Etoh H, Inoue H, Teruyama K, Shibutani Y, Ihara Y, Kawada Y, Bartolome A, Hashimoto N, Matsuda T, Koyanagi-Kimura M, Kanno A, Hirota Y, Hosooka T, Nagashima K, Nishimura W, Inoue H, Matumoto M, Higgins MJ, Yasuda K, Inagaki N, Seino S, Kasuga M, Kido Y. Paternal allelic mutation at the *Kcnq1* locus reduces pancreatic beta cell mass via epigenetic modification of *Cdkn1c*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(27):8332-8337. doi:10.1073/pnas.1422104112.
- 2) Toyoda T, Mae S, Tanaka H, Kondo Y, Funato M, Hosokawa Y, Sudo T, Kawaguchi Y, Osafune K. Cell aggregation optimizes the differentiation of human ESCs and iPSCs into pancreatic bud-like progenitor cells. *Stem Cell Res*. 2015;14(2):185-197. doi: 10.1016/j.scr.2015.01.007.