

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成23年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	ヒト iPS 細胞から膵β細胞の分化誘導
研究機関・ 部局・職名	熊本大学 発生医学研究所 教授
氏名	桑 昭苑

1. 当該年度の研究目的

本研究は、β細胞ができる多くの段階の仕組みを詳細に調べ、その情報を利用して、iPS細胞を育てる環境を工夫することで、ヒト iPS 細胞から正常な膵臓β細胞を作ることを目指しています。また、得られた情報から膵β細胞への分化の分子機序を明らかにすることを目指す。

これまでの研究により、試験管内で ES/iPS 細胞からβ細胞への分化誘導を促進する作用のある化合物をいくつか見つけている。当該年度では、促進作用のある化合物を用いて、分化機構の解明をめざす。また、同定された化合物のターゲット分子が実際生体内において膵β細胞への発生分化過程に関与しているか否かを調べる。

2. 研究の実施状況

これまで、作用メカニズムが解明されている医薬品などからなるライブラリーを活用して、これまでに構築した分化誘導系で、ES/iPS 細胞から膵臓前駆細胞まで分化した細胞に加えて、インスリン産生β細胞への分化促進活性を評価した。昨年度に引き続き、β細胞増加の要因について検討した。昨年度には、膵前駆細胞 (Pdx1 遺伝子発現細胞) を GFP (緑色蛍光タンパク質) で追跡できる ES 細胞を用いて解析を行った。今年度はさらに、膵内分泌前駆細胞 (Ngn3 遺伝子発現細胞) を GFP で追跡できる ES 細胞を樹立して解析を行った。その結果、化合物による Pdx1/GFP の数が増加しないが、Ngn3/GFP 陽性細胞数が増加した。したがって、膵臓内分泌細胞への分化が促進され、その結果β細胞に分化した細胞数も増加したと結論つけた。また、得られた ES 細胞由来の分化したβ細胞について、特性解析を行なった。

化合物が作用するターゲット分子について解析を行った。昨年度の結果では、ターゲット分子のノックダウンによるβ細胞分化の促進が見られたことから、ノックアウトマウスの作成に着手した。膵臓の細胞系譜特異的に遺伝子ノックアウトマウスを作る実験を進めている。今後ノックアウトマウスの表現系について解析を行う予定である。一方、それに先立ち、試験管内培養系でターゲット分子の機能について検討を行なった。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計10件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計10件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ueno T, Masuda N, <u>Kume S</u>, and Kume K. Dopamine modulates the rest period length without perturbation of its power law distribution in <i>Drosophila melanogaster</i> <b>PLoS ONE</b> 7(2):e32007, 2012.</li> <li>2. Ueno T, Tomita J, <u>Kume S</u>, Kume K. Dopamine modulates metabolic rate and temperature sensitivity in <i>Drosophila melanogaster</i> <b>PLoS ONE</b> 7(2):e31513, 2012.</li> <li>3. Miki, R., Yoshida, T., Murata, K., Oki, S., Kume K. and <u>Kume, S.</u> Fate maps of ventral and dorsal pancreatic progenitor cells in early somite stage mouse embryos. <b>MOD</b> 128, 597-809, 2012.</li> <li>4. Yamazaki M, Tomita J, Takahama K, Ueno T, Mitsuyoshi M, Sakamoto E, <u>Kume S</u> and Kume K. High calorie diet augments age-associated sleep impairment in <i>Drosophila</i>. <b>Biochem. Biophys. Res. Commun</b> 417, 812-816, 2012.</li> <li>5. Takahama K, Tomita J, Ueno T, Yamazaki M, <u>Kume S</u> and Kume K. Pan-neuronal knockdown of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) results in reduction in sleep and longevity in <i>Drosophila</i>. <b>Biochem. Biophys. Res. Commun.</b> 417, 807-811, 2012.</li> <li>6. Isagawa T, Nagae G, Shiraki N, Fujita T, Sato N, Ishikawa S, <u>Kume S</u>, Aburatani H., DNA methylation profiling of embryonic stem cell differentiation into the three germ layers. <b>PLoS ONE</b> 6(10): e26052. (2011)</li> <li>7. Tomita J, Mitsuyoshi M, Ueno T, Aso Y, Tanimoto H, Nakai Y, Aigaki T, <u>Kume S</u> and Kume K. Pan-neuronal knockdown of calcineurin reduces sleep in the fruit fly, <i>Drosophila melanogaster</i>. <b>J. Neuroscience</b>, 31, 13137-13146, 2011.</li> <li>8. Shiraki N, Yamazoe T, Qin Z, Ohgomori K, Mochitate K, Kume K, <u>Kume S.</u>, Efficient differentiation of embryonic stem cells into hepatic cells in vitro using a feeder-free basement membrane substratum. <b>PLoS ONE</b> 6(8), e24228, 2011.</li> <li>9. Akiyama, M., Shiraishi E., Sakugawa T, Hosseini, SHR. Akiyama H., Shiraki N. and <u>Kume S</u>. Influence of 60 ns Pulsed electric fields on embryonic stem cells. <b>IEEE transactions on DEI</b> (Dielectrics and Electrical Insulation). Vol. 18, Issue 4, pp. 1119-1123, 2011.</li> <li>10. Nagae G, Isagawa T., Shiraki N., Suemori H., <u>Kume S.</u>, Aburatani, H. Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation. <b>Human Molecular Genetics</b> 20(14), 2710–2721, 2011.</li> </ol> <p>(掲載済み一査読無し) 計0件 (未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計30件</p>	<p>専門家向け 計30件 (国際会議)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Shoen Kume “The role of extracellular matrices in guiding ES/iPS cell differentiation into hepatic or pancreatic cells” The 11th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems Dec 16, 2011. Maui, U.S.A</li> <li>2. Shoen Kume “Can we turn ES cells into pancreatic beta cells?” 12月5-6日 11th iCeMS international Symposium, Kyoto, Japan</li> <li>3. Shoen Kume, “Signals involved in guiding ES cells to differentiate into pancreatic beta cell” UNIA WORKSHOP 2011" LIVER AND PANCREAS: FROM DEVELOPMENT TO DISEASE" 14-16 NOVEMBER 2011. Baeza, Spain</li> <li>4. Sakano, D., Shiraki, N., Kataoka, M., Kume, K and Kume, S. Low molecular compounds screening system for <math>\beta</math> cell inducing activity. UNIA WORKSHOP 2011" LIVER AND PANCREAS: FROM DEVELOPMENT TO DISEASE" 14-16 NOVEMBER 2011. Baeza, Spain (poster)</li> </ol>

5. Shiraki N, Shiraki Y, Yamazoe T, Mochida T, Kume K, Endo F, Kume S. The specific amino acid metabolic state of human ES/iPS cells and its significance. UNIA WORKSHOP 2011"LIVER AND PANCREAS: FROM DEVELOPMENT TO DISEASE" 14-16 NOVEMBER 2011. Baeza, Spain (poster)
  6. Yamazoe T, Shiraki N, Kume K, Kume S Nanofiber; A synthetic scaffolds that promotes hepatic differentiation of mouse and human ES cells and iPS cells *in vitro*. UNIA WORKSHOP 2011"LIVER AND PANCREAS: FROM DEVELOPMENT TO DISEASE" 14-16 NOVEMBER 2011. Baeza, Spain (poster)
  7. Sakano, D., Shiraki, N., Kataoka, M., Kume, K and Kume, S. The establishment of a screening system for low molecular compounds for  $\beta$  cell inducing activity. ISSCR2011, Toronto June 15-18, 2011 (poster)
  8. Yamazoe T., Shiraki N., Umeda, K., Kume, K., and Kume, S. Identification of a synthetic nanofibrillar matrix that promotes hepatic differentiation of mouse and human ES cells and iPS cells *in vitro*. ISSCR2011, Toronto June 15-18, 2011. (poster)
  9. Shoen Kume, "Signals involved in guiding ES cells to differentiate into pancreatic beta cells" KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine-Supported by Global COE and IMEG, Kumamoto University Sep 8-9, 2011, Kumamoto, Japan.
  10. Umeda K, Suzuki K, Yamazoe T, Shiraki N, Kume K, Mitani K and Kume S. Perspective isolation and characterization of human Albumin-expressing hepatic cells using knock-in human iPS and ES cell line. KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine-Supported by Global COE and IMEG, Kumamoto University Sep 8-9, 2011, Kumamoto, Japan.
  11. Shahjalal Hussain Md., Shiraki N, Kume K, and Kume S Differentiation of hiPS cells into pancreatic lineages in xeno-free, chemically defined medium. KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine-Supported by Global COE and IMEG, Kumamoto University Sep 8-9, 2011, Kumamoto, Japan.
  12. Shiraki N, Shiraki Y, Yamazoe T, Mochida T, Endo F, Kume K, Kume S. Dependence of human ES/iPS cells on methionine metabolism. KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine-Supported by Global COE and IMEG, Kumamoto University Sep 8-9, 2011, Kumamoto, Japan.
  13. Yamazoe T, Shiraki N, Kume K, Kume S. A synthetic nanofibrillar matrix that promotes hepatic differentiation of mouse and human ES cells and iPS cells *in vitro*. KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine-Supported by Global COE and IMEG, Kumamoto University Sep 8-9, 2011, Kumamoto, Japan.
  14. Sakano, D., Shiraki, N., Kataoka, M., Kume, K and Kume, S. Low molecular compounds screening system for  $\beta$  cell inducing activity. KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine-Supported by Global COE and IMEG, Kumamoto University Sep 8-9, 2011, Kumamoto, Japan.
  15. Ogaki, S., Shiraki, N., Kume, K., and Kume, S. "Generation of intestinal epithelial like cell derived from ES cells. KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine-Supported by Global COE and IMEG, Kumamoto University Sep 8-9, 2011, Kumamoto, Japan.
- (国内会議)
16. Yamazoe T., Shiraki N., Umeda, K., Kume, K., and Kume, S. A synthetic nanofibrillar matrix that promotes hepatic differentiation of mouse and human ES cells and iPS cells *in vitro*. 44<sup>th</sup> Annual Meeting for JSDB 2011 (OKINAWA) May 18-21, 2011. (poster)
  17. Ogaki, Shiraki, Kume,K., and Kume S. Generation of intestinal epithelial like cell

	<p>derived from ES cells (May 18) Satellite Workshop (oral) 44<sup>th</sup> Annual Meeting for JSDB 2011 (OKINAWA) May 18-21, 2011. (poster)</p> <p>18. Kataoka M., Sakano D., Shiraki N., Kume K., <u>Kume S.</u> The establishment of a screening system for low molecular compounds for <math>\beta</math> cell inducing activity. 44<sup>th</sup> Annual Meeting for JSDB 2011 (OKINAWA) May 18-21, 2011. (poster)</p> <p>19. 白木伸明、山添太士、曾勤、大籠敬子、持立克身、桑和彦、桑昭苑 Efficient differentiation of embryonic stem cells into hepatic cells <i>in vitro</i> using a feeder-free basement membrane substratum. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. (Yokohama) Dec 15, 2011. (poster)</p> <p>20. Yamazoe T, Shiraki N, Kume K, Kume S. A synthetic nanofibrillar matrix that promotes hepatic differentiation of mouse and human ES cells and iPS cells <i>in vitro</i>. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. (Yokohama) Dec 15, 2011. (poster)</p> <p>21. Tayama S, Yamazoe T, Shiraki N, Kume K, Kume S. Optimization of long-term culture condition for murine primary hepatocytes. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. (Yokohama) Dec 15, 2011. (poster)</p> <p>22. Shahjalal Hussain Md., Shiraki N, Kume K, and Kume S. Differentiation of human iPS cells into pancreatic lineages in xeno-free, chemically defined culture system. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. (Yokohama) Dec 15, 2011. (poster)</p> <p>23. Kataoka M, Kawamuro Y, Miki R, Sakano D, Shiraki N, Yoshida T, Kume K, and Kume S. Regeneration of beta cells in neonatal mouse after streptozotocin treatment. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. (Yokohama) Dec 15, 2011. (poster)</p> <p>24. Miki R, Murata K, Yoshida T, Shinya Oki, Kume K and Kume S Fate maps of ventral and dorsal pancreatic progenitor cells in early somite stage mouse embryos. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. (Yokohama) Dec 15, 2011. (poster)</p> <p>25. 桑 昭苑 「多能性幹細胞から膵<math>\beta</math>細胞への分化研究の最近の進歩」中国糖尿病学会(岡山) 11月26日</p> <p>26. 桑 昭苑 (特別講演) 「多能性幹細胞から膵<math>\beta</math>細胞への分化研究の最近の進歩」日常診療に役立つ熊本代謝・内分泌研究会(熊本) 2011年10月25日</p> <p>27. 桑 昭苑 東京医科歯科大学 難治疾患共同研究拠点事業による研究集会『器官発生の分子機構解明と疾患克服への基盤的理解』 「多能性幹細胞を用いた肝・膵への分化誘導研究」 2011年10月21日</p> <p>28. 桑 昭苑 (特別講演) 「多能性幹細胞から膵<math>\beta</math>細胞への分化研究」東京インスリン分泌研究会(東京) 2011年9月28日</p> <p>29. 桑 昭苑 「多能性幹細胞を用いた膵<math>\beta</math>細胞の発生・再生研究」サノフィ DM2011. 京都 2011年8月21日</p> <p>30. 桑 昭苑, 白木伸明、山添太士、曾 勤、持立 克身 「ES/iPS細胞から肝への分化誘導」日本組織培養学会第84回大会 日本組織培養学会-動物実験代替法学会合同シンポジウム「ES、iPS細胞の培養技術と動物実験代替法への利用スキーム」- JTCA-JSAAE 合同シンポジウム- 2011年5月27日 (東京)</p> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書 計3件</p>	<p>勝本恵一、<u>桑昭苑</u> 「膵発生：膵臓前駆細胞の起源と領域化」『胆と膵の再生医学の最新胆と膵 Vol.32.No 11, 1201-1206, 2011.</p> <p>白木伸明 <u>桑 昭苑</u> 第1編 再生医療に必要な“材料”とは 第1章 細胞(ES細胞・細胞)『ものづくりからみる再生医療-細胞研究・創薬・治療-』シーエムシー出版 10-2011.</p> <p>坂野 大介、白木 伸明、<u>桑 昭苑</u> 「iPS細胞による糖尿病医療研究のこれから」-The view</p>

様式19 別紙1

	stem cell therapy for type I diabetes- 糖尿病 54, 268-270, 2011. 今川企画)
産業財産権 出願・取得状 況 計1件	(取得済み) なし (出願中) 計1件 特願 2011-103281 平成 23 年 5 月 2 日「幹細胞からインスリン産生細胞への分化誘導を促進する低分子化合物および該化合物を用いた幹細胞からインスリン産生細胞への分化誘導方法」 条 昭苑、上杉 志成、坂野大介、白木伸明、梅田香穂子、山添太士、 条 和彦 (出願人: 国立大学法人 熊本大学、国立大学法人 京都大学)
Webページ (URL)	発表論文について、所属機関の HP にて紹介記事を載せた。研究室の HP を更新した。 <a href="http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np49.html">http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np49.html</a> <a href="http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np47.html">http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np47.html</a> <a href="http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np46.html">http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np46.html</a> <a href="http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/stem_cell_biology/publications.html">http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/stem_cell_biology/publications.html</a>
国民との科 学・技術対話 の実施状況	1. 最先端・次世代研究開発プログラムキックオフシンポジウム 平成 23 年 6 月 30 日(熊本) 参加人数: 延べ 200 名 「ヒト iPS 細胞から膵β細胞の分化誘導」について講演した。 2. 平成 23 年八代中学校から中学生(40 名)が研究室見学 平成 23 年 6 月 3 日
新聞・一般雑 誌等掲載 計2件	1. 「熊大、臓器再建研究へ」平成 24 年 3 月 22 日 (熊本日日新聞) 第一面 2. 「女性研究者の養成を」熊大でシンポ公募枠など説明 3 月 27 日 (熊本日日新聞) 暮らし面 2 件とも名前入りで紹介された。
その他	1. 平成 23 年度熊本大学テレビ放送公開講座 「私はここで輝く。～熊大の女性プロフェッサーたち～」に出演 第 1 回「熊本発! 再生医療研究の世界的リーダーとして」発生医学研究所教授 条 昭苑 〔放送: 11 月 26 日(土) (再放送)11 月 28 日(月)〕 2. 熊本北高校 SSH 協力委員として活動している。 3. 熊本大学大学院医学教育部における教育活動表彰を受けた。

4. その他特記事項

特になし。

## 実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	130,000,000	45,000,000	0	85,000,000	0
間接経費	39,000,000	13,500,000	0	25,500,000	0
合計	169,000,000	58,500,000	0	110,500,000	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	39,019,865	0	0	39,019,865	37,828,977	1,190,888	
間接経費	13,500,000	0	0	13,500,000	11,700,000	1,800,000	
合計	52,519,865	0	0	52,519,865	49,528,977	2,990,888	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	26,732,235	インキュベーター、分子生物学試薬、細胞培養試薬
旅費	476,410	学会参加旅費等
謝金・人件費等	6,573,301	博士研究員、補助研究員人件費、講演謝金
その他	4,047,031	動物飼育費、論文投稿費等
直接経費計	37,828,977	
間接経費計	11,700,000	
合計	49,528,977	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
CO2インキュベーター	MCO-20AIC	1	1,008,000	1,008,000	2011/5/24	熊本大学
CO2インキュベーター	MCO-20AIC	1	1,056,300	1,056,300	2011/5/24	熊本大学
MX Image Server		1	1,205,400	1,205,400	2012/2/14	熊本大学
リクイーター96手動 卓上型ヒパッティング システム	LIQ-96- 200(17010335)	1	1,494,701	1,494,701	2012/2/15	熊本大学
ライトガイド光源装置	U-HGLGPS	1	547,575	547,575	2012/2/3	熊本大学