

**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24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

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、促進化合物の標的分子の作用について、実際生体内において膵β細胞の発生分化過程に関与するかどうかを調べるために、膵臓前駆細胞(Pdx1 陽性細胞)や膵内分泌前駆細胞(Ngn3 陽性細胞)で特異的にノックアウトするようなマウスを作成して、解析を行う計画である。また、ES 細胞に同時に作用することで相乗作用を示すもう一つの化合物も同定したが、その作用機序について解析する。成熟膵島において、これらの化合物も作用を示すが、発生過程と同様な作用を示すか、ステージ特異的な作用があるかどうかについても解析を進める。これまでに知られなかった新規なβ細胞の発生分化制御シグナルについて作用機序を明らかにすることを目指す。

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、スクリーニングした結果、Pdx1 陽性の膵前駆細胞に作用して、Ngn3 陽性細胞への分化を促進する化合物を同定した。この化合物のターゲットについて、shRNA を用いたノックダウン実験により同定した。さらに、同時に投与することで相乗作用を示すもう一つの化合物も同定した。今年度はこの化合物のターゲット分子の作用についてさらに調べるために、細胞系譜特異的なノックアウトマウスを作成し、解析を進める。これらの成果により、ど発生分化過程の膵内分泌前駆細胞への分化がどのように制御されるかについて知る手がかりを与えてくれると期待される。この分子はその後も引き続き内分泌細胞で発現されるが、その作用について、細胞特異性あるいはステージ特異性があるかどうかについて解析する。一方、両方の化合物を同時に作用すると ES 細胞は糖応答性インスリン分泌能を獲得する膵β細胞に分化するが、得られた細胞を動物に移植した時、体内でさらに膵β細胞が成熟した。その機序についても解析を進める。ヒトの iPS 細胞における作用についても研究を進める予定である。ヒトの膵島においても関連分子の発現、関連シグナル伝達系が作用するかどうかについて調べる。マウスとヒトにおける作用機序の相違点と相似点について、示唆が得られると期待される。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計7件</p>	<p>(掲載済み－査読有り) 計5件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Katsumoto K and <u>Kume S.</u> The role of CXCL12-CXCR4 signaling pathway in pancreatic development. Theranostics 3, 11-17, 2013. 2. Kataoka M, Kawamuro Y, Shiraki N, Miki R, Sakano D, Yoshida T, Yasukawa T, Kume K, <u>Kume S.</u> Recovery from diabetes in Neonatal mice after a low-dose streptozotocin treatment. Biochem. Biophys. Res. Commun BBRC 430, 1103-1108, 2013. 3. Umeda K, Suzuki K, Yamazoe T, Shiraki N, Higuchi Y, Tokieda K, Kume K., Mitani K., <u>Kume S.</u> <i>Albumin</i> gene targeting in human ES and iPS cells with helper-dependent adenoviral vector for monitoring hepatic differentiation and isolation of ES and iPS cell-derived hepatocyte-like cells. Stem Cell Res. 10, 179-194, 2012. 4. Ueno T, Tomita J, Tanimoto H, Ito K, <u>Kume S.</u> Kume K. Identification of sleep regulating dopamine circuit in <i>Drosophila</i>. Nature Neuroscience 15, 1516-1523, 2012. 5. 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> PLoS One 7(2):e32007, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0032007 <p>(掲載済み－査読無し) 計0件</p> <p>(未掲載) 計2件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Iwashita H., Sakano D., Shiraki N., Shiga M., Sasamoto K, Kume K., and <u>Kume S.</u> Secreted Cerberus1 as a marker for quantification of definitive endoderm differentiation of pluripotent stem cells. PLoS ONE, in press 2. Ogaki S, Shiraki N, Kume K, <u>Kume S.</u> Wnt and Notch signals guide embryonic stem cell differentiation into the intestinal lineages. Stem Cells DOI: 10.1002/stem.1344, in press.
<p>会議発表 計27件</p>	<p>専門家向け 計27件 (国際会議)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Yamazoe T., Shiraki N., Kume K., Yutaka S. and <u>Kume S.</u>, Nanofiber scaffold promotes hepatic differentiation from ES cells through Rac1 pathway. The 63rd annual meeting of the American association for the study of liver diseases, Boston, MA, U.S. Boston, Nov 9-13, 2012. 2. Morooka M, Sakano D, Shiraki N, Ogaki S, Uesugi M, Kume K, <u>Kume S.</u> A step wise approach for the screening of low molecular compounds that induce pancreatic beta cell from Ins1/ GFP mES cells. 10th International Society for Stem Cell Research (ISSCR), Yokohama. June 15, 2012. 3. Kataoka M, Kawamuro Y, Miki R, Sakano D, Shiraki N, Yoshida T, Kume K, and <u>KumeS.</u> A neonatal mouse model of pancreatic beta-cell regeneration after destruction by streptozotocin. 10th ISSCR, June Yokohama, June 15, 2012. 4. Shahjalal Hussain Md., Shiraki N, Kume K, and <u>Kume S.</u> Differentiation of human iPS cells into pancreatic lineages in xeno-free, chemically defined culture system. 10th ISSCR, June Yokohama. June 15, 2012. 5. Sakano, D., Shiraki, N., Kataoka, Kikawa K., Endo F., M., Kume, K, Uesugi, M. and <u>Kume, S.</u> A high throughput screening for molecules promoting pancreatic β cell differentiation of ES cells. 10th ISSCR, June Yokohama. June 15, 2012. 6. Shiraki S, Shiraki Y, Tsuyama T, Kume K, Endo F, and <u>Kume S.</u> A specific amino acid metabolic state of human ES/iPS cells and its significance. 10th ISSCR, June Yokohama. June 15, 2012. 7. Yamazoe T, Shiraki N, Kume K, <u>Kume S.</u> A synthetic nanofibrillar matrix mimicking in

	<p>vitro circumstances, promotes hepatic differentiation of mouse and human ES cells. 10th ISSCR, June Yokohama. June 15, 2012.</p> <p>(国内学会)</p> <ol style="list-style-type: none"> 8. 条 昭苑 Signals guiding differentiation of pluripotent stem cells into pancreatic beta cells 「膵 β 細胞の分化を制御するシグナル」日本薬理学会「幹細胞を制御する受容体と薬理学への応用」シンポジウム 福岡 平成 25 年 3 月 21 日 9. 条 昭苑 「多能性幹細胞から膵 β 細胞への分化誘導」『臨床医にも分かる基礎研究』第 7 回糖尿病学の進歩 四日市市 2013 年 2 月 15 日 10. Shiraki S, Shiraki Y, Nagae G, Tsuyama T, Aburatani H, Kume K, Endo F, and <u>Kume S.</u>, A specific amino acid metabolic state of human ES/iPS cells and its significance. Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ) Fukuoka, Dec 2012. 11. Umeda U, Suzuki K, Yamazoe T, Shiraki N, Kume K, Mitani K and <u>Kume S.</u> Albumin Gene Targeting in Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells with Helper-Dependent Adenoviral Vector to Monitor Hepatic Differentiation. MBSJ, Fukuoka, Dec 2012. 12. Sakano D, Nagura T., Choi S, Shiraki N, Kataoka M, Kikawa K, Endo F, M., Kume K, Uesugi, M. and <u>Kume S.</u> Small compounds promote differentiation from pancreatic progenitor to endocrine cells. MBSJ, Fukuoka, Dec 2012. 13. Morooka M, Sakano D, Shiraki N, Ogaki S, Uesugi M, Kume K, <u>Kume S.</u> A screen for low molecular compounds that promote differentiation of pancreatic β cell from Ins1/ GFP mES cells. MBSJ, Fukuoka, Dec 2012. 14. Yamazoe T., Shiraki N., Uesugi M., Kume K., <u>Kume S.</u> A screen for small molecular chemical compounds that promote maturation of human iPS-derived hepatocytes. MBSJ, Fukuoka, Dec 2012. 15. Sakano, D., Shiraki, N., Kataoka, Kikawa K., Endo F., M., Kume, K, Uesugi, M. and Kume, S. A high throughput screening for molecules promoting pancreatic β cell differentiation of ES cells. (Oral presentation) 64th Japanese Society of Developmental Biology meeting, (Kobe). May 31, 2012. 16. Shiraki S, Shiraki Y, Tsuyama T, Kume K, Endo F, and <u>Kume S.</u> A specific amino acid metabolic state of human ES/iPS cells and its significance. (Oral presentation) 64th Japanese Society of Developmental Biology meeting, May 31, 2012. (Kobe). 17. 条 昭苑 「多能性幹細胞から膵 β 細胞への分化誘導研究」『ここまで来た iPS/ES 細胞研究 —実験動物からヒト臨床へ』第 59 回日本実験動物学会(別府大会)2012 年 5 月 25 日 18. Shoen Kume, Signals guiding differentiation of pluripotent stem cells into pancreatic beta cells. 第 55 回日本糖尿病学会「再生医療による糖尿病治療の可能性」横浜 2012 年 5 月 17-19 日 19. 条昭苑「多能性幹細胞の分化をサポートする細胞外環境」日本組織培養学会 JTCA 第 85 回大会シンポジウム「細胞接着と細胞機能制御の最先端」京都 2012 年 5 月 18 日 20. 山添大士、佐々木裕、条昭苑「胚性幹細胞から肝細胞への分化誘導における細胞外基質の役割」ワークショップ『肝再生医療への展望』第 98 回日本消化器病学会 2012 年 4 月 19 日 21. 条 昭苑 「ES/iPS 細胞から β 細胞への分化誘導」『再生医療と内分泌疾患』日本内分泌学会総会(名古屋) 2012 年 4 月 19-21 日 22. 条 昭苑 「iPS 細胞を用いた糖尿病治療について」” Directed differentiation of pancreatic beta cells from iPS cells” 日本小児科学会「iPS 細胞を利用した研究の展開」シンポジウム(福岡) 2012 年 4 月 20 日 (その他の集会) 23. 条 昭苑「第 21 回 北野糖尿病・内分泌倶楽部」特別講演 「多能性幹細胞を用いた膵臓の発生分化と再生研究」(大阪) 平成 24 年 11 月 15 日
--	---

様式19 別紙1

	<p>24. 条 昭苑 浜松医科大学大学院特別講演「多能性幹細胞を用いた消化器系細胞の発生再生研究」浜松市 平成 24 年 11 月 13 日</p> <p>25. 条 昭苑 「消化器官の発生と再生：幹細胞からのアプローチ」細胞生物学信州夏期研究会（松本市）平成 24 年 8 月 20 日</p> <p>26. 山添太士、白木伸明、佐々木裕、条昭苑 「ナノファイバーを用いた胚性幹 (ES) 細胞からの肝細胞分化」『シンポジウム II 肝細胞の機能発現を制御する環境因子』第 19 回肝細胞研究会（札幌）平成 24 年 6 月 30 日（土）</p> <p>27. 条 昭苑 「多能性幹細胞から膵臓 β 細胞への分化誘導研究」第一三共株式会社セミナー2012年6月12日（東京）</p> <p>一般向け 計0件</p>
図書 計 5 件	<p>1. Katsumoto, K., Miki R., Umeda, K., Shiraki, N., <u>Kume, S.</u> "Chapter 9. ENDODERM" (p225-252) in "Stem Cell Biology: Basic Concepts to Frontiers Students Edition", Edited by "Dinender K. Singla, PhD, FAHA. Publisher: Create Space Independent Publishing Platform; Student edition. ISBN-10: 1466291079. ISBN-13: 978-1466291072.</p> <p>2. 勝本恵一, 条昭苑 「膵臓の初期発生機構の解明と再生医療への応用」特集『膵 β 細胞の発生生物学と再生医療の応用』内分泌・糖尿病・代謝内科（科学評論社）Vol 36 No. 3, 2013.</p> <p>3. 大垣総一郎 条昭苑 「消化器幹細胞：膵上皮」『Surgery Frontier』（Medical Review Co. Ltd）2013 年 3 月号</p> <p>4. 坂野大介・条昭苑 『発生・分化・再生と代謝関連臓器』 「多能性幹細胞から膵 β 細胞への分化」 『内分泌・糖尿病・代謝内科』 35, 101-106, 2012 （科学評論社）</p> <p>5. 白木伸明・条昭苑 最前線『躍進する幹細胞研究』 「ES/iPS 細胞から膵臓への分化誘導」ファルマシア、日本薬学会（東京），48(9)，852-856, 2012.</p>
産業財産権 出願・取得状況 計 0 件	<p>（取得済み）計 0 件</p> <p>（出願中）計 0 件</p>
Webページ (URL)	<p>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。</p> <p>http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np58.html</p> <p>http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np57.html</p> <p>http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np55.html</p> <p>http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np50.html</p>
国民との科学・技術対話の実施状況	<p>1. 「多能性幹細胞を使った夢の再生医療～糖尿病の再生医療～」『高校生のための熊大ワクワク連続講義』（熊本大学内 全学教育棟 C301 教室 2012 年 9 月 1 日 100 名</p> <p>2. 「最先端の生命科学教育拠点としての取組」『くまもと医療都市ネットワーク懇話会』2012 年 8 月 23 日（熊本市役所） 30 名</p> <p>3. 「柴三郎 Jr. の発掘」プログラム 2012 年 8 月 30 日実施（高校生を対象とする研究体験事業） 3 名</p> <p>4. 八代中学校 発生医学研究所見学、研究について紹介 2012 年 6 月 8 日 16 名</p>
新聞・一般雑誌等掲載 計3件	<p>1. 熊本日日新聞 2013年2月8日 3面「E S細胞で小腸細胞作成 熊本大発生研が世界初」</p> <p>2. 熊本日日新聞『iPS 細胞熊本も長期保管』厚労省選定 移植後の検証に利用 2013 年 11 月 30 日 iPS 細胞おアークイブ</p> <p>3. 熊本日日新聞 2012 年 6 月 13 日一面「がん化の危険性減少熊本大が i P S 細胞新技術」</p>
その他	<p>熊本北高校 SSH 運営委員会委員として活動している。</p> <p>論文査読を多く行っている。平成 24 年度は計 14 本の論文を査読した。</p>

4. その他特記事項

特になし。

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

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	44,000,000	41,000,000	0
間接経費	39,000,000	13,500,000	13,200,000	12,300,000	0
合計	169,000,000	58,500,000	57,200,000	53,300,000	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	1,190,888	44,000,000	0	45,190,888	45,036,069	154,819	0
間接経費	1,800,000	13,200,000	0	15,000,000	15,000,000	0	0
合計	2,990,888	57,200,000	0	60,190,888	60,036,069	154,819	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	22,524,204	実験小動物用ガス麻酔システム、分子生物学 試薬、細胞培養試薬
旅費	1,751,970	学会参加旅費等
謝金・人件費等	16,371,321	博士研究員、補助研究員人件費
その他	4,388,574	動物飼育費、論文投稿費等
直接経費計	45,036,069	
間接経費計	15,000,000	
合計	60,036,069	

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
(消耗品) ecombinant Human /Mouse/Rat ActivinA	0001-990111	1	693,000	693,000	2012.7.11	熊本大学
(消耗品) ecombinant Human /Mouse/Rat ActivinA	0001-990111	1	693,000	693,000	2012.7.11	熊本大学
(消耗品) ecombinant Human /Mouse/Rat ActivinA	0001-990111	1	693,000	693,000	2012.7.11	熊本大学
(消耗品)Activin A, Human, ecombinant, HumanXpress	HZ-1141 1mg	1	954,450	954,450	2012.10.16	熊本大学
実験小動物用ガス 麻酔システム	DSファーマSF- B01	1	977,550	977,550	2012.10.19	熊本大学