

**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25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

申請者らは、これまでにマウスおよびヒト ES/iPS 細胞を用いた試験管内分化誘導系を構築してきた。さらに、成熟な膵β細胞を得るために、培地と基材などの培養条件の至適化とともに、ハイスループットに分化誘導を促進する低分子化合物のスクリーニング系を立ち上げた。このスクリーニング系により、既に 1000 個の既知な低分子化合物をスクリーニングし、マウス ES 細胞からインスリン陽性細胞への分化を促進する化合物を得ている。これまでに、これらのヒット化合物のうち、代表的な化合物のターゲット分子である VMAT2 (vesicle monoamine transporter 2) に対する作用について進めてきた。今年度はさらに、

- ・糖尿病モデルである AKITA マウスへの移植実験を進め、糖感受性インスリン分泌能に与える影響について詳細に検討を行う。
- ・ヒト ES/iPS 細胞を用いた検討を継続して進める。
- ・VMAT2 分子の胚発生における発現様式とその果たす機能を調べる。そのために、コンディショナル・ノックアウトマウスラインを作成して解析を進める。
- ・ほかの候補化合物についても、同様に作用機序の解明を進める。

2. 研究の実施状況

申請者らは、下記を明らかにした：

1) 得られた2種の分化促進化合物を ES 細胞に作用させることにより、AKITA 糖尿病マウスの高血糖を正常化できた。2つの化合物を同時に作用させることが必要であり、いずれか一方の化合物のみでは血糖値を正常化する作用が不十分である。2) ヒト ES/iPS 細胞を用いた分化誘導系を構築し、試験管内でヒト ES/iPS 細胞から分化した膵β細胞は高糖濃度に応答してインスリンを分泌する機能を示した (Shahjalal et al, in revision)。今後 VMAT2 についての検討を行えるようになった。3) 初期胚の膵原基を用いた実験により、VMAT2 が初期胚発生においても、膵β細胞への分化を抑制する働きがある。VMAT2 の機能を抑制した結果、膵臓原基からの膵β細胞を含くめ、膵内分泌細胞の分化が促進された。より詳細に調べるために、膵臓の細胞において、発生段階において特異的に機能を破壊したコンディショナル・ノックアウトマウスを作製した。今後の更なる解析により、詳細な分子機構を明らかにできると期待する。4) ほかの候補化合物についても調べた結果、膵島β細胞の増殖を促進する作用を示した化合物を見出した。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計7件</p>	<p>(掲載済み一査読有り)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K and Shoen Kume. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. <i>J. Cell Sci.</i> 126, 5391–5399, 2013. 2. Kaitsuka T, Noguchi H, Shiraki N, Kubo T, Wei FY, Hakim H, Kume S, and Tomizawa K. Generation of functional insulin-producing cells from mouse embryonic stem cells through 804G cell-derived extracellular matrix and protein transduction of transcription factors. <i>Stem Cells Transl. Med.</i> 3, 114–27, 2014. 3. Sakano D, Shiraki N, Kikawa K, Yamazoe T, Kataoka M, Umeda K, Araki K, Mao D, Matsumoto S, Nakagata N, Andersson O, Stainier D, Endo F, Kume K, Uesugi M and Kume S. VMAT2 identified as a regulator of late-stage beta cell differentiation. <i>Nat. Chem. Biol.</i> 10, 141–148, 2014. 4. Isono K, Jono H, Ohya Y, Shiraki N, Sugasaki A, Era T, Fusaki N, Tasaki M, Ueda M, Shinriki S, Inomata Y, Kume S, and Ando Y. Generation of familial amyloidotic polyneuropathy-specific induced pluripotent stem cells. <i>Stem Cell Res.</i> 12, 574–583, 2014. 5. Hakim F, Kaitsuka T, Mohd Raeed J, Wei FY, Shiraki N, Akagi T, Yokota T, Kume S, Tomizawa K. High Oxygen Condition Facilitates the Differentiation of Mouse and Human Pluripotent Stem Cells into Pancreatic Progenitors and Insulin-Producing Cells. <i>J. Biol. Chem.</i> 2014. 6. Kikawa K, Sakano D, Shiraki N, Kume K, Endo F, Kume S. The beneficial effect of insulin treatment on the outcome of islet transplantation in Akita mice. <i>PLoS ONE</i> 9(4): e95451, 2014. 7. Shiraki N., Shiraki Y., Tsuyama T., Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H., Kume K, Endo F, Kume S. Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. <i>Cell Metab.</i> 19, 780–794, 2014.
<p>会議発表 計29件</p>	<p>専門家向け 計24件 (国際会議)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Shoen Kume Signals guiding pluripotent stem cells into pancreatic beta cells. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto April 24, 2013 2. Sakano, D, Shiraki, N., Kikawa, K., Kataoka, M., Nagura, T., Choi, S., Endo F., Kume, K, Uesugi, M. and Kume, S., Screening of small compounds to promote differentiation of mouse ES cells to functional pancreatic β cells. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto April 22, 2013. 3. Sakano, D., Shiraki, N., Kataoka, Kikawa K., Endo F., M., Kume, K, Uesugi, M. and Kume, S. Screening of small compounds to promote differentiation of mouse ES cells to functional pancreatic β cells. ISSCR Boston, June 12–15, 2–13, 2013. 4. Yamazoe T, Shiraki N, Uesugi M, Kume K, Kume S, Chemical genetic identification of molecules that potentiate hepatic maturation of human iPS-derived hepatocytes, ISSCR Boston, June 12–15, 2–13, 2013. 5. Shoen Kume Screening for low molecular compounds that potentiate beta cell differentiation. Canada–Japan Stem Cell Workshop ISSCR 2013, Boston. June 13, 2013. <p>(国内学会)</p> <ol style="list-style-type: none"> 6. 桑 昭苑「多能性幹細胞から膵β細胞への分化を制御するシグナル」第56回日本糖尿病学会年次学術集会総会 シンポジウム「膵β細胞研究の進化と展望」2013年5月18日熊本市 7. Ogaki S, Shiraki N, Kume K, Kume S. Wnt and Notch signals guide embryonic stem cell differentiation into the intestinal lineages 第46回日本発生生物学会 2013年5月28日から31日まで島根県松江市 8. Omori H, Ogaki S, Nakahata Y, Shiraki N, Kume K, kikuchi Y, Kume S, Investigation of role of a novel pancreatic beta cell gene 第46回日本発生生物学会 2013年5月28日から31日まで島根県松江市 9. 大垣総一郎, 白木伸明, 桑和彦, 桑昭苑「WntシグナルとNotchシグナルがES細胞から腸上皮細胞への分化を促進する」Wnt and Notch signals guide embryonic stem cell differentiation into the intestinal lineages, 第65回日本細胞生物学会 2013年6月19–21日 ウィンクあいち 名古屋市 10. 桑 昭苑 「多能性幹細胞を用いた膵β細胞の発生再生研究」「内分泌代謝学サマーセミナー」2013年7月12日 由布院(世話人児島将康先生) 11. 桑 昭苑 「多能性幹細胞を用いた膵β細胞への分化誘導研究」(特別講演)「第3回細胞再生医療研究会」2013年7月27日 神戸臨床研究情報センター 12. 木川和英, 坂野大介, 白木伸明, 遠藤文夫, 桑昭苑, 「レシピエントに対するインスリン治療が膵島移植

	<p>の成績に与える影響」日本小児内分泌学会、2013年10月10-12日(口頭発表)</p> <ol style="list-style-type: none"> 13. 白木伸明、桑昭苑 “The establishment of endoderm differentiation methods of ES/iPS cells”「ES/iPS細胞から内胚葉組織への分化誘導方法の開発」第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 仙台 2013年11月23-24日 14. Sakano D, 第36回日本分子生物学会 『哺乳類の系統特異的幹細胞・前駆細胞の発生メカニズム』ワークショップオーガナイザー(原孝彦、桑昭苑)2013年12月4日 15. 中原良成・武藤彰彦・桑昭苑・菊池 裕 Notch-Hey1経路はゼブラフィッシュ脳下垂体においてホルモン分泌細胞の分化を制御している Yoshinari Nakahara, Akihiko Muto, Shoen Kume, Yutaka Kikuchi “Notch-Hey1 pathway is involved in cell fate determination of hormone secreting cells in zebrafish adenohypophysis”. 第36回日本分子生物学会 2013年12月4日 16. 桑 昭苑 「多能性幹細胞を用いた膵β細胞の分化誘導研究」第一回 Cardiology Metabolism Endocrinology Nephrology Conference (CARMEN conference) 2014年2月1日 17. 桑 昭苑 「多能性幹細胞から膵β細胞への分化誘導」第13回日本再生医療学会総会 『iPS細胞、ES細胞の生物学の進歩と再生医療応用』シンポジウム(福田恵一、桑昭苑座長) 2014年3月6日(その他の集会) 18. 桑昭苑 「ES細胞から膵臓β細胞と腸への分化誘導研究」塩野義探索研究所セミナー(大阪)2013年4月22日 19. 桑 昭苑「多能性幹細胞を用いた膵臓の再生医療研究」熊本大学医学部付属病院 臨床カンファレンス「再生医療—iPS細胞を用いた再生医療研究の最前線」2013年5月13日(熊本大学) 20. 桑 昭苑「熊大におけるiPS細胞研究の現状について」熊杏会八代支部総会 特別講演 2013年8月1日(八代市) 21. 桑 昭苑 奈良先端科学技術大学院大学 動物科学特論「多能性幹細胞から消化器官を創る」2013年12月6日 22. 桑 昭苑「多能性幹細胞を用いた膵の再生医学と創薬への展開」平成26年1月23日 鹿児島大学 23. 桑 昭苑 Islet Equality 「膵β細胞の再生医療と糖尿病治療への応用」Islet Equality座談会(2014年5月号掲載)2014年1月7日 24. 桑 昭苑 「多能性幹細胞を用いた膵β細胞の再生医学研究」長崎大学 大学院セミナー 『脳病態治療シンポ』 2014年1月25日 <p>一般向け 計5件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 桑 昭苑「iPS細胞を用いた再生医療研究」八代中学校(40名)研究室見学時の講義 2013年6月6日 2. 桑 昭苑「多能性幹細胞を用いた再生医療研究」熊本県健康サービス協議会 特別講演 2013年6月27日(熊本市)(熊本テルサ) 3. 桑 昭苑 「iPS細胞を用いた再生医療研究」女性研究者賞表彰式講演 ソロプチミスト熊本 2013年07月18日 4. 桑 昭苑 「iPS細胞と夢の再生医学」熊本同友会 講演、2014年1月21日(熊本市) 5. 桑 昭苑 日本薬学会(熊本市)市民公開講座「ES/iPS細胞が拓く未来の再生医療」2014年3月27-30日
<p>図書 計8件</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 大垣総一郎 桑昭苑「消化器幹細胞:膵上皮」『Surgery Frontier』(Medical Review Co. Ltd) Vol.20 No.1, 70-72, 2013. 2. 勝本恵一 桑昭苑 「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, 169-175, 2013. 3. 山添太士、白木伸明、佐々木裕、桑 昭苑 肝臓の再生医療 「日本医師会雑誌」vol 142, no.4, 791-795,2013. 4. 白木伸明 桑昭苑 【開発編】第2章「iPS細胞・ES細胞の開発応用」『再生医療・細胞培養の開発と市場』シーエムシー出版 ISBNコード: 978-4-7813-0814-2. 5. 白木伸明 桑昭苑 Dojin review No. 149/2013, 1-6. 「ES/iPS細胞から内胚葉組織への分化誘導方法の開発」“The establishment of endoderm differentiation methods of ES/iPS cells”. 6. 坂野大介 桑昭苑 「幹細胞からβ細胞を誘導するシグナル」“膵島のバイオロジーの新たな展開” Diabetes Frontier vol 24, 544-549, 2013. (Medical Review Co. Ltd) 7. 坂野大介 桑昭苑「iPS細胞を用いた膵β細胞研究の最前線」Diabetes Journal Vol 42,no 1, 2014. 8. 坂野大介 桑昭苑「膵β細胞・膵島の再生研究」“Recent studies in regeneration of pancreatic β cells.”最新医学 69巻1号 36-41, 2014.

様式19 別紙1

<p>産業財産権 出願・取得状 況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>(H25) 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。 http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np59.html http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np66.html http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np67.html http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/newpress/np69.html 熊本大学 HP でプレスリリース http://www.kumamoto-u.ac.jp/daigakujouhou/kouhou/pressrelease/2013_file/release131216.pdf http://www.kumamoto-u.ac.jp/daigakujouhou/kouhou/pressrelease/2014-file/release140418.pdf 熊本大学 HP で研究紹介 http://genderkyoten-ku.jp/female_researchers/kume.html (その他の研究成果紹介の HP) 1. 山添太士、白木伸明、佐々木裕、桑昭苑 「幹細胞研究における ES 細胞,iPS 細胞の利用 (肝細胞研究会 研究交流)http://hepato.umin.jp/kouryu/kouryu27.html. 2. 坂野大介 桑昭苑 「小胞型モノアミン輸送体 VMAT2 は膵臓 β 細胞の分化を制御する」First Author's http://first.lifesciencedb.jp/archives/8151 3. 白木伸明 桑昭苑「メチオニンの代謝はヒトの ES 細胞および iPS 細胞の未分化維持および分化を制御している」 First Author's http://first.lifesciencedb.jp/archives/8655 (プロトコール公開) Ogaki S and Kume S. Intestinal differentiation of human ES cells. Bio-protocol. www.bio-protocol.org Ogaki S and Kume S. Intestinal differentiation of mouse ES cells. Bio-protocol. www.bio-protocol.org</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 桑 昭苑「iPS 細胞を用いた再生医療研究」八代中学校(40名)研究室見学時の講義 2013年6月6日 2. 桑 昭苑「多能性幹細胞を用いた再生医療研究」熊本県健康サービス協議会 特別講演 2013年6月27日(熊本市)(熊本テルサ)45名 3. 桑 昭苑「iPS 細胞を用いた再生医療研究」女性研究者賞表彰式講演 ソロプチミスト熊本 2013年7月18日 87名 4. 桑 昭苑 「iPS 細胞と夢の再生医学」熊本同友会 講演、2014年1月21日(熊本市)約120名 5. 桑 昭苑 日本薬学会(熊本市)市民公開講座「ES/iPS 細胞が拓く未来の再生医療」2014年3月27-30日 約70名
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計15件</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 熊本日日新聞 暮科・021『内胚葉の分化容易に確認 熊大などの研究グループ割り出し方を開発』2013年6月5日 2. 熊本日日新聞 都2・021 街かどクリップ 2013年7月19日 熊本市国際ソロプチミスとのクラブ賞贈呈式 3. 日経新聞 16面科学 「ES細胞で膵臓細胞 熊本大インスリン大量分泌マウスに移植」2013年12月17日 4. 共同通信 血糖値下げる細胞作製、熊本大 マウスで成功 2013年12月16日 (北海道新聞、中日新聞) 5. 日刊工業新聞 熊本大、インスリン分泌能高いβ細胞をマウス ES細胞から作製 2013年12月16日 6. 毎日新聞 27面(社会) ES細胞から膵臓細胞作製 熊本大がマウスで成功 2013年12月16日 7. 読売新聞 37面(地域)血糖値抑制能力の高いβ細胞 熊大の桑教授ら生成成功 2013年12月16日 8. 熊本日日新聞 1面 血糖値下げる膵臓細胞 マウス ES細胞から作製 2013年12月16日 9. 中国 健康報 医学前線 「胚性幹細胞糖尿病治療」 2013年12月17日 10. 科学新聞 4面 「ES細胞から膵臓細胞作製 熊本大 成体と同等の能力を持つ糖尿病治療に貢献期待」 2014年1月1日 11. 朝日新聞12版 2014年1月20日科学面 「インスリン分泌細胞10倍」 12. 朝日新聞デジタル版 2014年1月20日「インスリン分泌細胞、10倍多く作製 熊本大チーム」 13. 日本経済新聞 「iPS細胞から小腸細胞 熊本大、移植のリスク低減」2014年1月21日

様式19 別紙1

	<p>14. 文教速報 第7955号 2014年1月15日「熊本大、隣臓細胞の効率的な作製に成功 作製効率は10倍、効果は生体なみ」</p> <p>15. 日経バイオテク 2014年2月3日号「培養上清のみで内胚葉細胞への分化ノモニタリングが可能に！【同仁化学研究所】」</p>
<p>その他</p>	<p>1. 熊本北高校 SSH 運営委員会委員として活動している。</p> <p><u>テレビ報道</u></p> <p>2. TKU テレビ熊本 2013年7月18日 本日のニュース ソロプチミスト女性研究者賞表彰式</p> <p>3. KKT ニュース 2013年12月16日 11:41, 18:15</p> <p>4. NHK クマロク 2013年12月16日 18:20</p> <p>5. NHK ニュース 2013年12月16日; 18:00 「ES 細胞から高機能すい臓細胞」</p>

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25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	89,000,000	41,000,000	0	
間接経費	39,000,000	26,700,000	12,300,000	0	
合計	169,000,000	115,700,000	53,300,000	0	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	154,819	41,000,000	0	41,154,819	41,154,819	0	0
間接経費	0	12,300,000	0	12,300,000	12,300,000	0	0
合計	154,819	53,300,000	0	53,454,819	53,454,819	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	28,380,086	ハイコンテンツスクリーニングシステム用半導体光源等
旅費	2,207,690	学会参加旅費等
謝金・人件費等	5,063,296	研究員、技術補佐員人件費、講演謝金
その他	5,503,747	実験動物飼育料、学会誌投稿料等
直接経費計	41,154,819	
間接経費計	12,300,000	
合計	53,454,819	

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
(材料品) Recombinant Human /Mouse/Rat Activin A (分化誘 導する際の成長増 殖因子)	338-AC-01M	1	779,625	779,625	2013/9/27	熊本大学
(消耗品) Recombinant Human Noggin (分化誘導する際の 成長増殖因子)	R&D-3344-NG	1	616,875	616,875	2013/9/27	熊本大学
ハイコンテンツスク リーニングシステム 用半導体光源	米国モレキュラーテ ィス社・5016536	1	3,476,550	3,476,550	2013/12/26	熊本大学
ハイブリット高速冷 却遠心機	久保田商事・ 6200	1	760,305	760,305	2014/3/14	熊本大学
液体窒素凍結保存 容器	サーモフィッシャー社 CS509X22A-70	1	717,360	717,360	2014/2/27	熊本大学