

機能性インスリン産生細胞の作製

熊谷 勝義 大原 麻子

東京医科大学大学機能関連分野疾患モデル研究センター

【要旨】 膵島移植は、1型糖尿病および2型糖尿病の有望な治療法として示唆されているが、移植用膵島の不足が問題となっている。iPS細胞のような多能性幹細胞よりインスリン産生細胞を作製することができれば、移植用膵島の不足問題を解消し、糖尿病患者への細胞移植療法の実現が可能になると考えられる。ここでは、マウス由来 iPS 細胞が *in vitro* でインスリン産生細胞に分化できること、および Gck 高発現インスリン産生細胞がグルコース刺激に応答することを実証した。さらに、*in vivo* では、高血糖値を呈するマウスへ Gck 高発現インスリン産生細胞を移植することで血糖値が下がり、マウスの表現型が改善された。以上のことから、本研究ではマウス iPS 細胞からグルコース応答性インスリン分泌機能を有するインスリン産生細胞を作製することに成功した。

はじめに

がん、心筋梗塞、脳卒中および糖尿病といったいわゆる生活習慣病は、遺伝素因がその発症に強く影響しており、糖尿病ではこれまでにいくつもの原因遺伝子が同定されている。また、国内ではインスリン抵抗性を示す2型糖尿病の急速な患者人口の増加が深刻な問題となっており、これに伴い、合併症の進行に伴う医療費高騰やQOLの低下を招いている。糖尿病は、発症後の罹病期間が長くなるほど膵β細胞数は減少し、日本人を含む東洋人では膵β細胞数が欧米人に比べて少ないことなどから糖尿病になりやすいと考えられている¹⁻³⁾。糖尿病の治療薬は、膵島内の数少ない膵β細胞から強制的にインスリンを分泌させるものが多く、膵β細胞数の減少抑制または増殖させる根本的な治療薬はない。

Glucokinase (Gck) は、グルコースのグルコース6-リン酸へ変換を触媒する酵素であり、膵β細胞と肝臓では全身のグルコース恒常性を保つ上で重要である。特に膵β細胞においては、Gckがグルコース

濃度に応じてインスリン分泌量を制御するグルコースセンサーの役割を果たしている⁴⁾⁵⁾。また、ヒトにおいては約600以上のGCK変異が知られ、グルココキナーゼ活性低下を来すヘテロ遺伝子変異は、type 2 maturity onset diabetes of young (MODY2)であり、その病態はインスリン分泌能低下および軽度の耐糖能異常を示す⁶⁻⁸⁾。また、インスリン抵抗性に対する膵β細胞の代償性過形成が不十分であり、その背景にGckの障害が存在することが考えられる。すなわち、Gckは膵β細胞の新生・増加に関与することが考えられる。また、Gck活性剤は、2型糖尿病患者の膵β細胞でのインスリン分泌能増強作用と肝での糖利用亢進作用が認められている⁹⁾¹⁰⁾。しかし、2型糖尿病の病状が進むと共に患者の膵β細胞は減少してゆくことから、Gck活性剤による糖尿病治療は根本的な解決策には至らない。

本研究では、Gck高発現マウスiPS細胞を作製し、三次元培養法および分化誘導薬物を用いてインスリン産生細胞の作製に成功した。また、作製した細胞の機能性について Glucose-stimulated Insulin Secre-

令和2年8月21日受付、令和2年9月25日受理

キーワード：マウス、iPS細胞、Gck、インスリン産生細胞

(別冊請求先：〒160-8402 東京都新宿区新宿6-1-1 東京医科大学疾患モデル研究センター)

TEL：03-3351-6141 (内線312) E-mail：kumagai@tokyo-med.ac.jp

tion (GSIS) Assayにて検証したところ、グルコース応答性インスリン分泌能を有することが明らかとなった。さらに、*in vivo*にて機能性を検証するために、Gck高発現インスリン産生細胞群をストレプトゾシン (STZ, Sigma-Aldrich) 投与によって高血糖を呈する免疫不全マウスの腎臓皮膜下へ移植し、随時血糖値の測定を行った。その結果、細胞移植翌日より血糖値が低下し、高血糖を呈するマウスの表現型が改善された。これらの結果から、我々はマウスiPS細胞よりグルコース応答性インスリン分泌能を有するインスリン産生細胞を樹立することに成功した。

研究材料および方法

1. 研究材料

1) 実験動物

iPS細胞作製では、4週令、雄、C57BL/6JJmsSlc (日本エスエルシー株式会社、静岡、日本) を使用した。また、インスリン産生細胞群の腎臓皮膜下への移植では、8週令、雄、C57BL/6JJmsSlc (日本エスエルシー株式会社) および熊本大学エイズ研究所より分与頂いた8週令、雄、超免疫不全マウス (BRJ; BALB/c Rag-2^{tm1}/Jak3^{tm1}) を利用した。なお、本研究は動物実験 (動物実験計画書番号 S-26017) に関する東京医科大学動物実験指針を遵守して実施した。

2) 使用薬剤

Activin A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、Retinoic acid (Sigma-Aldrich)、Nicotinamide (Sigma-Aldrich) を使用した。

2. 研究方法

1) 細胞培養

マウス尾部線維芽細胞の培養はDMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) へ10% FBS (Gibco) を加えた培養液 (MEF) を用いた。つぎに、マウス Tail Tip iPS (TTiPS) 細胞の培養ではDMEM (Gibco) へ15% FBS (Gibco)、1% NEAA (Gibco)、1% Sodium Pyruvate (Gibco)、110 μM 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)、1% Glutamine (Gibco)、500 U/mL LIF (MILLIPORE, Burlington, Massachusetts, USA) を加えた培養液 (ESM with FBS) を用いた。さらに、TTiPS細胞よりインスリン産生細胞へ分化誘導させた際に利用した培養液は、DMEM (Gibco) へ20% FBS (Gibco)、2 mM L-Glutamine (Gibco)、2 mM NEAA (Gibco)、450 μM

Monothioglycerol (Sigma-Aldrich) を加えたD1とDMEM F12 (Gibco) へ25 μg/mL Insulin (Sigma-Aldrich)、50 μg/mL Transferrin (Sigma-Aldrich)、30 ng/mL Sodium Selenite (Sigma-Aldrich)、10 ng/mL bFGF (invitrogen) を加えたDM3を用いた。

2) Gck高発現コンストラクト構築

8週令雄のC57BL/6JJmsSlc (日本エスエルシー株式会社) の腓島よりRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてTotal RNAsを抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) を用いて逆転写した。つぎにPrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本) を用いてGckのcDNAを合成した。GckのcDNA合成用プライマーは以下に記す。Gck_cDNA_XhoI primer: 5'-AAAAAACTCGAGATGCTGGATGACAGAGCC-3'、Gck_cDNA_ERI primer: 5'-AAAAAAGAATTCTCACTGGCCCAGCATGCA-3'。次に、合成したcDNAをXhoI/EcoRIにより消化後、pIRES2-EGFP vector (Addgene, Watertown, Massachusetts, USA) のXhoI/EcoRIサイトへ挿入して構築した。

3) Gck高発現TTiPSの作製

TTiPS細胞は事前にマイトマイシンC (富士フィルム和光純薬株式会社、大阪、日本) によって増殖を抑えたマウス胚性線維芽細胞 (feeder細胞) 上にて培養し、エレクトロポレーション法にて 1×10^7 cellsへ25 μgのGck高発現コンストラクトを挿入した。24時間後に、ネオマイシン誘導体のG418 (Gibco) を300 μg/mlで培養液へ添加することで薬剤耐性細胞のセレクションを開始し、7~10日目に実体顕微鏡下でコロニーを採取した。その後、細胞を増殖させ、Gck発現解析へ備えた。

4) 高血糖マウスへのインスリン産生細胞移植および血糖値測定

高血糖症を誘導するために8週令、雄のBRJマウスへSTZ (Sigma-Aldrich) を150 mg/kg、腹腔内投与した。STZ注射後1~2週間にマウスの血糖値を測定し、高血糖を示す400~500 mg/dLのマウス個体を選抜し、50個のGck未導入TTiPS由来分化誘導細胞 (Gck-TTiPS由来分化誘導細胞) およびGck導入TTiPS由来分化誘導細胞 (Gck+TTiPS由来分化誘導細胞) を各々腎皮膜下へ移植した。移植後、尾静脈から採血を行いグルテストPRO R (株式会社三和化学研究所、愛知、日本) を用いて血糖

値を測定した。なお、実験動物は untreated (細胞非移植群) および実験群 (細胞移植群) を各々 $N=5$ の2群に分けて各群の比較検討を行った。

5) ALP 染色解析

Alkaline Phosphatase Detection kit (MILLIPORE) を利用し、手順書に従って解析を行った。

6) 蛍光免疫染色解析

SSEA-1 および Oct3/4 については、ES Cell Characterization Kit (MILLIPORE) を利用し、手順書に従って解析を行った。さらに Insulin については、膵β細胞蛍光染色キット (株式会社プライマリーセル、北海道、日本) を利用し、手順書に順じて解析を実施した。

7) RNA 抽出および RT-PCR 解析

細胞より Isogen 試薬 (ニッポンジーン、大阪、日本) を用いて Total RNA を抽出した。1 μg の total RNA を Quantitect Rev、Transcription kit (Qiagen) を用いて逆転写し、得られた cDNA は定量的 RT-PCR (TaqMAN Assay) へ供した。TaqMAN Assay では、以下のように温度および時間を設定した: 95°C で10分間変性、95°C で15秒、60°C で1分間の40サイクル。β-Actin (Assay ID, Mm01205647_g1; Applied Biosystems) Gck (Assay ID, Mm01187796_m1; Applied Biosystems) を使用した。定量的 RT-PCR は、7900HT Fast Real-Time PCR システム (Applied Biosystems) を利用し、SDS v2.4 ソフトウェア (Applied Biosystems) を用いて分析を行った。

8) ウェスタンブロッティング解析

プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma-Aldrich) を添加した RIPA 緩衝液 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) で細胞を溶解した。タンパク質を SDS-PAGE で分離し、Immobilon-P Transfer Membranes (MILLIPORE) へ転写した。メンブレンを5% スキムミルクでブロックし、一次抗体は4°Cで一晩穏やかに振盪しながらインキュベートした後、二次抗体は室温で60分間インキュベートした。メンブレン上のタンパク質バンドは、ECL select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) および ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて可視化した。なお、一次抗体は Insulin (Assay ID, ab181547; abcam, Cambridge, UK)、Glucagon (Assay ID, ab92517; abcam)、Pdx1 (Assay ID, ab219207; abcam)、Ngn3 (Assay ID, ab216885; abcam)、β-Actin

(Assay ID, M177-3; MBL、愛知、日本) を使用した。一方、二次抗体は An anti-mouse IgG (Assay ID, A5278-1ML; Sigma-Aldrich)、anti-rabbit IgG (Assay ID, A9169-2ML; Sigma-Aldrich) を利用した。

9) マウス膵島単離

マウスからの膵島の単離は、十二指腸出口に近い点で総胆管をクランプした後、0.6 mg Liberase TL (Roche, Basel, Switzerland) および 25 mmol/l HEPES を含む 2.5 ml の Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma-Aldrich) を膵管内に注入した。その後、膨張した膵臓を摘出し、37°C で24分間インキュベートした。つぎに、膵臓組織をピペティングで分散させ、25 mmol/l HEPES および 10% FBS (Sigma-Aldrich) を含む氷冷 HBSS で2回洗浄した。その後、膵島を実体顕微鏡下にて手動で採取し、直ちに実験に使用した。

10) グルコース応答性インスリン分泌測定

各々 10 個のマウス膵島および Gck+TTiPS 由来分化誘導細胞を1サンプルとし、レビスインスリン-マウス Kit (株式会社シバヤギ、群馬、日本) を用いて、そのプロトコールに順じ、インスリン分泌を測定した。また、Gck+TTiPS 由来分化誘導細胞の測定は、3回に分けて実施した。なお、インスリン分泌測定ではグルコースの濃度 50 G (50 mg/dL)、100 G (100 mg/dL)、200 G (200 mg/dL)、400 G (400 mg/dL) および High K⁺ (K⁺=50 mM) で刺激した。

インスリン分泌率は以下の計算式にて算出した。
$$\text{インスリン分泌率} = \frac{\text{インスリン分泌量 (ng)} \times 100}{\text{インスリン分泌量 (ng)} + \text{インスリン含有量 (ng)}}$$

11) 統計学的検討

検定は Non-repeated measures ANOVA 検定を用いた。

結 果

1. Gck 高発現 TTiPS 細胞の作製

Gck 高発現 iPS 細胞を作製するためには、まず、マウス尾部線維芽細胞 (TTF; mouse tail-tip fibroblasts) より iPS 細胞を作製する必要がある。しかし、iPS 細胞作製に用いるレトロウイルスを用いた遺伝子導入では、挿入変異が起因し、細胞がガン化する可能性がある¹¹⁾。そこで我々は、ウイルスベクターを利用せずに、山中ファクターを有する2種類のプラスミドを TTF へ4回程度トランスフェクションさせる方法¹¹⁾を用いて iPS 細胞の作製を試みた (Fig.

1-A)。その結果、Day 27に安定して増殖する4つのマウス尾部線維芽細胞由来 iPS 細胞 (TTiPS 細胞) を樹立した (Fig. 1-A, B)。通常、iPS 細胞などの幹細胞は未分化能を有するため、我々は得られた TTiPS 細胞の未分化能を検証するために、ALP 活性確認を行い、さらに SSEA-1 および Oct3/4 の発現

を蛍光免疫染色法により確認した。その結果、樹立した全ての TTiPS 細胞では、ALP の活性化が認められ、さらに SSEA-1 および Oct3/4 の発現が認められた (Fig. 1-B)。つぎに、Gck を高発現した TTiPS 細胞を作製するために、Gck 高発現コンストラクトを TTiPS 細胞へ電ポレーション法

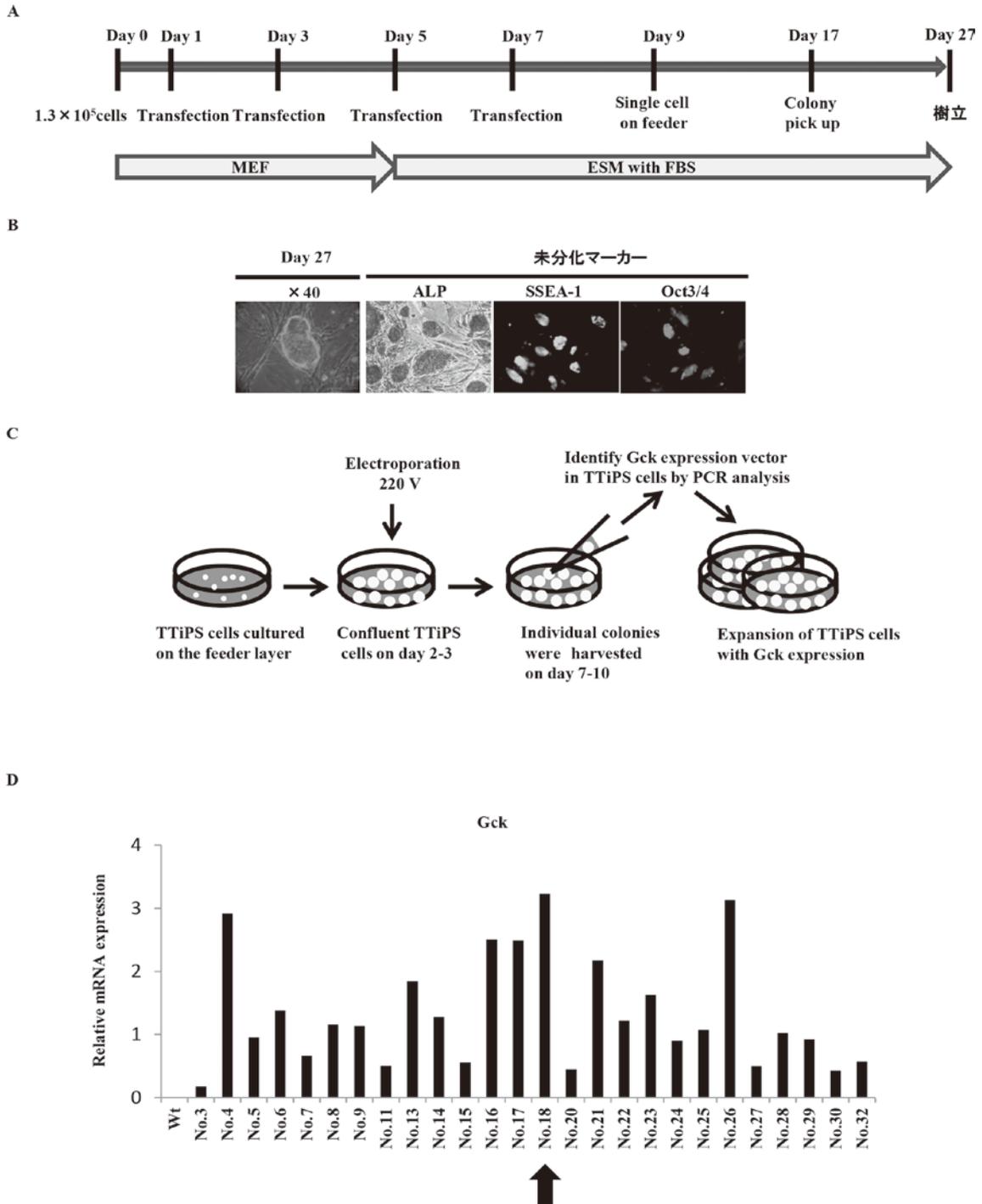


Fig. 1 Gck 高発現 TTiPS 細胞の作製 A マウス tail tip より iPS 細胞を作製するためのスキーム。B TTiPS 細胞の形態および未分化マーカー発現。C Gck 高発現 TTiPS 細胞を作製するためのスキーム。D Gck を導入した TTiPS 細胞における Gck の mRNA 発現量。

で導入し、Gck 高発現 TTiPS 細胞の獲得を試みた (Fig. 1-C)。その結果、No. 18 の細胞にて Gck の高発現が認められた (Fig. 1-D)。これらの結果から、我々はマウスより未分化能を有する TTiPS 細胞の作製に成功し、さらに、この細胞より Gck 高発現 TTiPS 細胞の作製に成功した。

2. Gck 高発現 TTiPS 細胞よりインスリン産生細胞への分化誘導

1 drop あたり 600 個の Gck 高発現 TTiPS 細胞 (No. 18) を Hanging drop 法で培養し、Embryoid body (EB) を作製した。また、EB は三次元培養することで効率よくインスリン産生細胞へ分化誘導することが報告されている¹²⁾。そこで我々は EB を超低接着表面ディッシュ (Surface dish; 住友ベークライト株式会社) を用いて三次元培養を行うと共に、薬物を用いて EB からインスリン産生細胞へ分化誘導させることを試みた。胚性内胚葉への分化誘導には、TGFβ (transforming growth factor β) スーパーファミリーに属するアクチビンが用いられる¹³⁾。そこで我々は

Day 2 から Day 4 まで 50 ng/mL の activin A を D1 培地へ添加した。つぎに、retinoic acid は Pdx1 陽性内胚葉や膵臓細胞へ分化誘導することが知られる¹⁴⁾¹⁵⁾。そこで Day 6 から Day 10 まで 1 μM の retinoic acid を D1 培地へ添加した。さらに、nicotinamide を用いることでインスリン陽性細胞へ分化誘導が可能となるため¹⁶⁾¹⁷⁾、我々は Day 10 から Day 29 まで 10 mM の nicotinamide を DM 3 培地へ添加することでインスリン産生細胞への誘導を試みた (Fig. 2-A)。つぎに獲得した分化誘導細胞のインスリン活性について検証するために、蛍光免疫染色を行った。その結果、Gck を導入していない TTiPS 由来分化誘導細胞 (Gck-TTiPS 由来分化誘導細胞) および Gck を導入した TTiPS 由来分化誘導細胞 (Gck+TTiPS 由来分化誘導細胞) では、いずれもインスリン活性が認められた (Fig. 2-B)。さらに、膵 β 細胞 (Islet) で陽性を示す Insulin、Glucagon、Pdx1 および Ngn3 について、Gck+TTiPS 由来分化誘導細胞での発現を検証するためにウエスタンブロッティング法によ

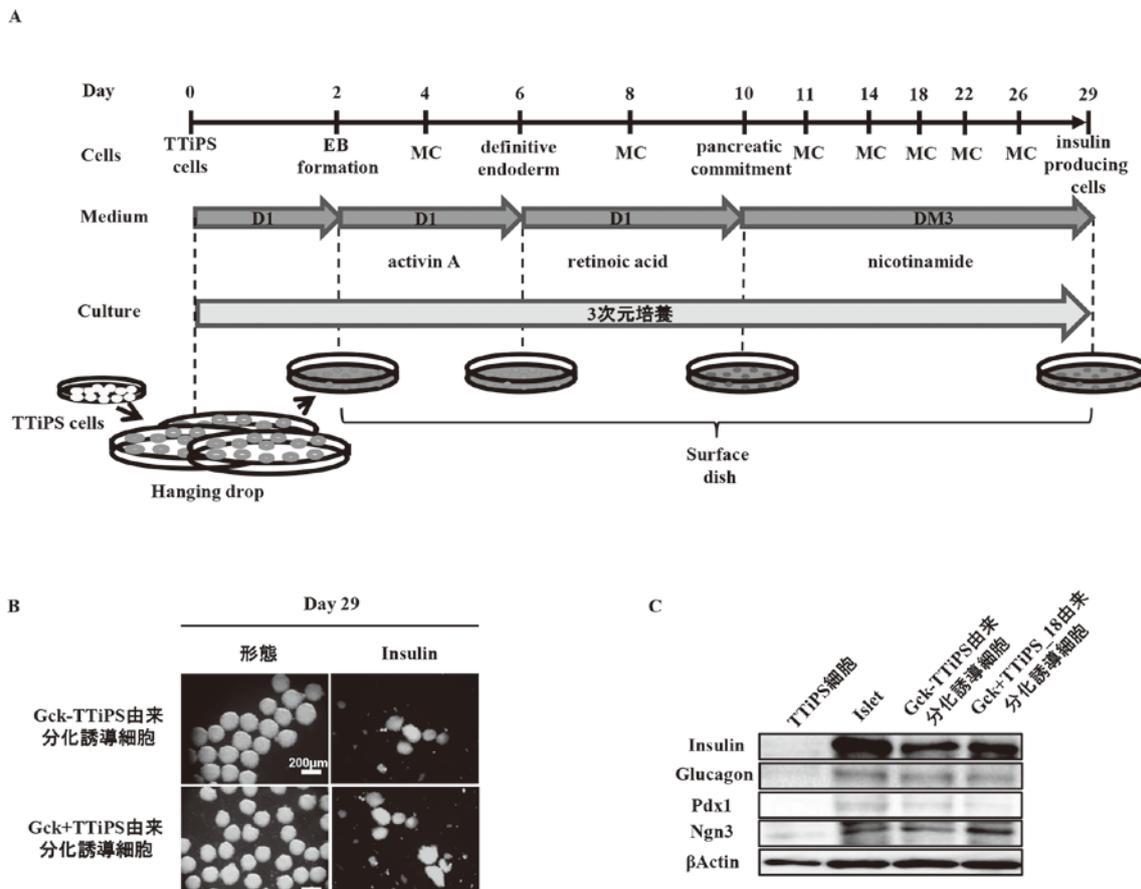


Fig. 2 TTiPS 細胞より作製したインスリン産生細胞 A TTiPS 細胞よりインスリン産生細胞を作製するためのスキーム。B インスリン産生細胞の形態およびインスリン陽性。C インスリン産生細胞における膵 β 細胞 (Islet) 陽性マーカー発現。EB, Embryoid Body; MC, Medium Change

り発現解析を行った。その結果、Gck+TTiPS 由来分化誘導細胞では Insulin、Glucagon、Pdx1 および Ngn3 の全てが発現していることが示された (Fig. 2-C)。これらの結果から、我々は Gck 高発現 TTiPS 細胞よりインスリン産生細胞を作製することに成功した。

3. インスリン産生細胞の機能性

Gck 高発現 TTiPS 細胞由来インスリン産生細胞の機能性を検証するために、グルコース応答性インスリン分泌能 (GSIS) を検証した。その結果、Gck+TTiPS 由来分化誘導細胞では Islet に比べて、いずれの刺激においてもグルコース応答性インスリン分泌率が高いことが示された (Fig. 3)。なお、Islet では 50 G と 400 G で比較すると 400 G の刺激ではインスリン分泌率が4倍程高いのに対し、Gck+TTiPS 由来分化誘導細胞では差が認められず、さらに 400 G の刺激では 100 G に比べてインスリン分泌率が低い傾向を示した。この結果から、作製した Gck 高発現 TTiPS 細胞由来インスリン産生細胞のグルコース感受性は、Islet よりも強いことが示唆された。

4. *in vivo* におけるインスリン産生細胞の機能性

つぎに我々は、生体での Gck 高発現 TTiPS 細胞由来インスリン産生細胞の機能性について検証した。生体を用いた検証では、高血糖を呈すると共に細胞移植時に拒絶反応を示さないマウスを利用する必要がある。また、STZ は *Streptomyces achromogenes* から抽出された広範囲抗菌スペクトルを有する抗生物質で、膵β細胞の可逆的な細胞壊死を引き起こす。STZ を小動物へ腹腔内注射すると高血糖を誘導し、1型糖尿病やインスリン分泌障害を呈する2型糖尿病を発症する¹⁸⁾。そこで我々は TTiPS 細胞を作製した同系統の8週令、雄の C57BL/6JJmsSlc マウスへ STZ を腹腔内注射し、高血糖を呈したマウスの腎臓皮膜内下へ Gck+TTiPS 細胞由来分化誘導細胞を50個移植することで予備実験を試みた。その結果、細胞移植から1日目で血糖値が150 mg/dL 程度まで減少を示したが、9日目に血糖値が300 mg/dL 程度まで血糖値が上昇した (data not shown)。この結果から、移植細胞の生着効率に問題が来している可能性が考えられた。BALB/c 遺伝的背景を持つ Rag-2/Jak3 二重欠損マウス (BRJ) は、ヒト造血幹細胞と末梢血単核球移植で C57BL/6 系統マウスに比べてはるかに高い生着効率を示す¹⁹⁾。これらの

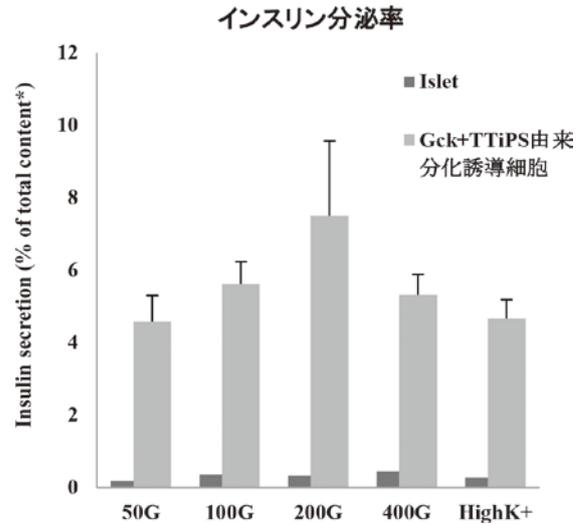


Fig. 3 Gck 高発現インスリン産生細胞におけるグルコース応答性インスリン分泌能 *content; 膵島や細胞に含まれていたインスリン含量

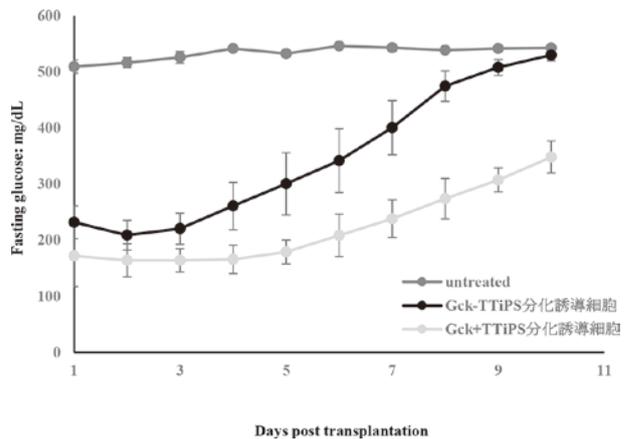


Fig. 4 Gck 高発現インスリン産生細胞移植マウスにおける随時血糖値の変化

ことか、我々は予め BRJ へ STZ を投与することで、膵β細胞破壊により高血糖を呈するマウスを作製し、50個の Gck+TTiPS 細胞由来分化誘導細胞を腎臓皮膜内下へ移植し、随時血糖値を計測した。この結果、Gck+TTiPS 細胞由来分化誘導細胞を移植した日の翌日 (1日目) から移植10日目までの間、Gck+TTiPS 細胞由来分化誘導細胞ではコントロール群 (untreated) および Gck-TTiPS 細胞由来分化誘導細胞に比べて血糖値が有意に低いことが示された (Fig. 4)。この結果から、Gck 高発現 TTiPS 細胞由来インスリン産生細胞は生体内で数日間機能することで血糖値を減少させることが示唆された。

考 察

糖尿病治療薬は、膵島内の数少ない膵β細胞から強制的にインスリンを分泌させるものが多く、膵β細胞数の減少抑制または増殖させる根本的な治療薬はない。近年、薬物によって数少ない膵β細胞から強制的にインスリンを分泌させる事とは異なり、ES細胞やiPS細胞よりインスリン産生細胞を分化誘導させる研究や膵臓の異種間移植など、新たな試みが盛んに行われている²⁰⁻²⁵⁾。本研究では、マウス尾部線維芽細胞よりウイルスベクターを用いない、安全な方法によりTTiPS細胞を樹立することに成功した。さらに、樹立したTTiPS細胞へGck高発現コンストラクトを導入することでGck高発現TTiPS細胞を作製し、*in vitro*にて三次元培養や胚体内胚葉や膵臓へ分化誘導させる薬物を用いることでインスリン産生細胞を作製した。しかし、三次元培養法は培養細胞数に制限があり、一度に大量生産できない問題がある。この課題を克服するために、今後はさらに研究を邁進させる必要がある。

Gckは、解糖系の最初のステップに関与する酵素であり、肝臓と膵β細胞に発現してグルコース恒常性を保つ役割を担う。Gck活性剤は、このGckを活性化させて肝臓での糖取り込みを促進し、膵β細胞でのインスリン分泌を促進することで血糖降下作用を示すと期待される¹⁰⁾。しかし、糖尿病の患者は、発症後の罹病期間が長くなるほど膵β細胞数は減少する¹⁻³⁾。このため、Gck活性剤によって膵β細胞のインスリン分泌促進機構が働かなくなる可能性が考えられる。本研究では、TTiPS細胞よりGck高発現TTiPS細胞を作製し、インスリン産生細胞への分化誘導に成功した。作製した細胞は高血糖を呈するマウスへ移植したところ、移植日の翌日(1日目)から血糖値の減少が認められたが、移植から10日目には血糖値が300 mg/dL程度へ戻ってしまった。すなわち、インスリン産生細胞の作製には成功したが、生体内で移植細胞のターンオーバーが起こっていないことが考えられた。また、この結果はGckの機能として膵β細胞の新生や増加とは反する結果となり、我々が作製したGck高発現インスリン産生細胞には、定着という克服すべき大きな課題が明らかとなった。これら課題を克服することができれば、Gck活性剤に代わる新たな糖尿病治療法の確立につながると考えられる。

結 語

マウスiPS細胞よりグルコース応答性インスリン分泌機能を有するインスリン産生細胞の作製に成功した。

COI 申告の開示

COI開示：全ての著者は、本論文発表内容に関連して特に申告なし

謝 辞

実験動物の管理にご協力頂いた東京医科大学大学機能関連分野疾患モデル研究センター所属のスタッフおよび超免疫不全マウスを寄贈して頂いた熊本大学エイズ研究センターの岡田誠治先生へ感謝の意を表す。また、本研究は日本学術振興会より科研費(25830064 to K.K.)として助成を受けたものである。

文 献

- 1) Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S: Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* **45**: 85-96, 2002
- 2) Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC: Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**: 102-110, 2003
- 3) Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim HS, Lee IK, Bonner-Weir S: Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 2300-2308, 2003
- 4) Matschinsky FM: Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* **45**: 223-241, 1996
- 5) Iyenedjian PB: Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cell Mol Life Sci* **66**: 27-42, 2009
- 6) Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, Beer NL, Bellanné-Chantelot C, Ellard S, Gloyn AL: Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat* **30**: 1512-1526, 2009
- 7) Froguel Ph, Vaxillaire M, Sun F, Velho G, Zouali H, Butel MO, Lesage S, Vionnet N, Clément K, Fougere F, Tanizawa Y, Weissenbach J, Beckmann JS, Lathrop GM, Passa Ph, Permutt MA, Cohen D: Close linkage of glucokinase locus on chromosome

- 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* **356** : 162-164, 1992
- 8) Hattersley AT, Turner RC, Permutt MA, Patel P, Tanizawa Y, Chiu KC, O'Rahilly S, Watkins PJ, Wainscoat JS : Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet* **339** : 1307-1310, 1992
 - 9) Meininger GE, Scott R, Alba M, Shentu Y, Luo E, Amin H, Davies MJ, Kaufman KD, Goldstein BJ : Effects of MK-0941, a novel glucokinase activator, on glycemic control in insulin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **34** : 2560-2566, 2011
 - 10) Kiyosue A, Hayashi N, Komori H, Leonsson-Zachrisson M, Johnsson E : Dose-ranging study with the glucokinase activator AZD1656 as monotherapy in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* **15** : 923-930, 2013
 - 11) Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S : Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322** : 949-953, 2008
 - 12) Saito H, Takeuchi M, Chida K, Miyajima A : Generation of glucose-responsive functional islets with a three-dimensional structure from mouse fetal pancreatic cells and iPS cells in vitro. *PLoS One* **6** : e28209, 2011
 - 13) Brown S, Teo A, Pauklin S, Hannan N, Cho C H-H, Lim B, Vardy L, Dunn NR, Trotter M, Pedersen R, Vallier L : Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors. *Stem Cells* **29** : 1176-1185, 2011
 - 14) Micaleff SJ, Janes ME, Knezevic K, Davis RP, Elefanty AG, Stanley EG : Retinoic acid induces Pdx1-positive endoderm in differentiating mouse embryonic stem cells. *Diabetes* **54** : 301-305, 2005
 - 15) Davenport C, Diekmann U, Budde I, Detering N, Naujok O : Anterior-Posterior Patterning of Definitive Endoderm Generated from Human Embryonic Stem Cells Depends on the Differential Signaling of Retinoic Acid, Wnt-, and BMP-Signaling. *Stem Cells* **34** : 2635-2647, 2016
 - 16) Shahjalal HM, Shiraki N, Sakano D, Kikawa K, Ogaki S, Baba H, Kume K, Kume S : Generation of insulin-producing β -like cells from human iPS cells in a defined and completely xeno-free culture system. *J Mol Cell Biol* **6** : 394-408, 2014
 - 17) Zhang D, Jiang W, Liu M, Sui X, Yin X, Chen S, Shi Y, Deng H : Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res* **19** : 429-438, 2009
 - 18) Mansford KR, Opie L : Comparison of metabolic abnormalities in diabetes mellitus induced by streptozotocin or by alloxan. *Lancet* **30**(1) : 670-671, 1968
 - 19) Ono A, Hattori S, Kariya R, Iwanaga S, Taura M, Harada H : Comparative study of human hematopoietic cell engraftment into BALB/c and C57BL/6 strain of rag-2/jak3 double-deficient mice. *J Biomed Biotechnol* **2011** : 539748, 2011
 - 20) Schroeder, Rolletschek A, Blyszczuk P, Kania G, Wobus AM : Differentiation of mouse embryonic stem cells to insulin-producing cells. *Nat Protocol* **1** : 495-507, 2006
 - 21) Jiang W, Shi Y, Zhao D, Chen S, Yong J, Zhang J, Qing T, Sun X, Zhang P, Ding M, Li D, Deng H : In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Res* **17** : 333-344, 2007
 - 22) Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Iбата M, Sato H, Lee YS, Usui J, Knisely AS, Hirabayashi M, Nakauchi H : Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* **142** : 787-799, 2010
 - 23) Saito H, Takeuchi M, Chida K, Miyajima A : Generation of glucose-responsive functional islets with a three-dimensional structure from mouse fetal pancreatic cells and iPS cells in vitro. *PLoS One* **6** : e28209, 2011
 - 24) Matsumoto S, Tomiya M, Sawamoto O : Current status and future of clinical islet xenotransplantation. *J Diabetes* **8** : 483-493, 2016
 - 25) Kondo Y, Toyoda T, Ito R, Funato M, Hosokawa Y, Matsui S, Sudo T, Nakamura M, Okada C, Zhuang X, Watanabe A, Ohta A, Inagaki N, Osafune K : Identification of a small molecule that facilitates the differentiation of human iPSCs/ESCs and mouse embryonic pancreatic explants into pancreatic endocrine cells. *Diabetologia* **60** : 1454-1466, 2017

Generation of insulin-producing cells from mouse-derived iPS cells

Katsuyoshi KUMAGAI, Asako OOHARA

University-related Facilities Pre-clinical Research Center, Tokyo Medical University

Abstract

Islet transplantation has been suggested to be a promising treatment for type 1 and type 2 diabetes. iPS cells hold great potential for a cure for diabetes using a cellular therapy to ameliorate symptoms associated with both reduced insulin secretion and insulin sensitivity. Therefore, highly efficient differentiation of iPS cells into insulin-producing cells will enhance the potential for patient specific cell transplantation therapy in diabetes. Here, we demonstrate that mouse-derived iPS cells can be differentiated into insulin-producing cells with high-level expression of Gck *in vitro* and that they respond to glucose stimulation under physiological conditions. The hyperglycemic phenotype in model mice was improved by transplantation of the insulin-producing cells with high-level expression of Gck. Therefore, we conclude that we have successfully generated insulin-producing cells with glucose-responsive insulin secretion function from mouse iPS cells.

〈Key words〉 : mouse, iPS cells, Gck, insulin-producing cells
