The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Insulin-producing cells derived from ‘induced pluripotent stem cells’ of patients with fulminant type 1 diabetes: Vulnerability to cytokine insults and increased expression of apoptosis-related genes
Author(s)	細川, 吉弥
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69263
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　細川吉弥

論文審査担当者		（職）	氏　名
	主　査	大阪大学教授	下村伊一郎
	副　査	大阪大学教授	西田幸二
	副　査	大阪大学教授	中神啓徳

論文審査の結果の要旨

劇症1型糖尿病は1型糖尿病のサブタイプのひとつであり、発症から数日のうちに膵β細胞がほぼ完全に破壊されてインスリン依存状態となる疾患である。申請者らは劇症1型糖尿病患者からiPS細胞を樹立し、それより分化誘導して得られたインスリン陽性細胞にTNF-α，IL-1β，IFN-γを投与し、インスリン陽性細胞に占めるカスパーゼ3陽性細胞の割合が健常人由来iPS細胞より有意に高値であること、劇症1型糖尿病患者iPS細胞由来インスリン陽性細胞を単離し、RNAシークエンスにてGSEA解析を行ったところ、アポトーシスに関連する一部の遺伝子発現に差を認められたことから、劇症1型糖尿病ではこのようにβ細胞自体の脆弱性もβ細胞傷害の亢進に関与する可能性が考えられた。今後この細胞モデルを用いて劇症1型糖尿病における膵β細胞傷害機構のさらなる検討が実施できる可能性があると考えられ学位に値するものと認める。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	細川　吉弥
論文題名 Title	Insulin-producing cells derived from 'induced pluripotent stem cells' of patients with fulminant type 1 diabetes: Vulnerability to cytokine insults and increased expression of apoptosis-related genes (劇症1型糖尿病患者iPS細胞由来インスリン産生細胞におけるサイトカイン刺激に対する脆弱性とアポトーシス関連遺伝子発現の増加)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

劇症1型糖尿病は本邦において最初に報告された1型糖尿病のサブタイプのひとつであり、発症から数日のうちに 膵β細胞がほぼ完全に破壊されてインスリン依存状態となる。劇症1型糖尿病においては、発症時にはすでに標的となる膵β細胞のほとんどが破壊されており、 β細胞傷害の状態を観察することは非常に困難である。これに対して近年、さまざまな疾患を有した患者から人工多能性幹細胞（induced Pluripotent Stem Cells：iPS 細胞）を樹立し、*in vitro* において標的細胞に分化誘導して、その疾患の発症機構を解明する取り組みが行われている。そこで今回、劇症1型糖尿病患者体細胞から iPS 細胞を樹立し、それより分化誘導して得られたβ細胞を用いて劇症1型糖尿病の膵β細胞傷害機序を明らかにすることを目的に検討を行った。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

劇症1型糖尿病患者3名の皮膚線維芽細胞にエピソーマルベクター法により6つの初期化因子(*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *LIN28* and *p53*-shRNA)を導入することによりiPS細胞(FT1D-iPSCs)を樹立した。このFT1D-iPSCsはNANOGやOCT4などの未分化マーカーを発現しており、胚様体（Embryoid body; EB)形成法もしくは奇形腫形成法により外胚葉、中胚葉、内胚葉の三胚葉成分への多分化能を有することを確認した。またFT1D-iPSCsはいずれも正常の核型を有していることを確認した。

FT1D-iPSCsおよび健常人由来iPS細胞から既報の方法（Kunisada Y, et al. 2012. 一部改変）を用いて*in vitro*において分化誘導を行ったところ、胚体内胚葉(SOX17陽性細胞)、膵前駆細胞(PDX1陽性細胞)を経て、インスリン陽性細胞を得ることができた。FT1D-iPSCsのインスリン陽性細胞への分化誘導効率は、健常人由来iPS細胞(Control-iPSCs)と同程度であった。またインスリン陽性細胞と同時にグルカゴン陽性細胞、ソマトスタチン陽性細胞、グレリン陽性細胞、アミラーゼ陽性細胞に分化誘導することが可能であった。FT1D-iPSCsより分化誘導して得られたインスリン陽性細胞はグルコース応答性のCペプチド分泌能は認めなかったが、KClに反応したCペプチドの分泌を認めた。

FT1D-iPSCsおよびControl-iPSCs由来インスリン陽性細胞にTNF-α, IL-1β, IFN-γを投与し、アポトーシスに陥ったインスリン陽性細胞を免疫染色にて評価した。インスリン陽性細胞に占めるTUNEL・インスリン共陽性細胞の割合はFT1D-iPSCs とControl-iPSCsの間で差がなかったが、Cleaved caspase-3・インスリン共陽性細胞の割合は、FT1D-iPSCsにおいてControl-iPSCsより有意に上昇していた。

このようにFT1D-iPSCs由来INS陽性細胞においてサイトカインに対して脆弱性を認める可能性が示唆されたため、その原因を評価するためにFT1D-iPSCsおよびControl-iPSCs由来インスリン陽性細胞において発現遺伝子の違いを検討することとした。iPS細胞由来のさまざまな細胞にサイトカインを投与後、RNA固定液で固定・透過処理、ブロッキング、抗体処理を行い、フローサイトメトリーを施行した。INS陽性細胞集団のpopulationが得られたのでそれらを回収し、RT-qPCRを施行したところ、INS陰性細胞集団にくらべINS陽性細胞集団では著明なINS発現の上昇を認めたことから、RNAを保持した状態でINS陽性細胞を単離する系を樹立することができた。この方法を用いて、サイトカイン刺激後のFT1D-iPSCsおよびControl-iPSCs由来INS陽性を単離し、RNAシークエンスにてGene Set Enrichment Analysisを行ったところ、アポトーシスに関連する一部の遺伝子発現に差を認めた。

〔総　括(Conclusion)〕

今回、劇症1型糖尿病患者よりiPS細胞を樹立できたことにより、今後この細胞を用いて劇症1型糖尿病の病態解明に応用できる可能性が示された。また、健常人由来iPS細胞からインスリン陽性細胞に分化誘導する方法で、FT1D-iPScからインスリン産生細胞に分化し得たことは、今後細胞移植などへの治療応用の可能性を示したものと考えられる。また、FT1D-iPSCs由来インスリン陽性細胞はサイトカインによる細胞傷害が増大しており、劇症1型糖尿病における膵β細胞傷害機序に関与する可能性がある。