

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04812

研究課題名(和文) 膵内・外分泌細胞の再生機構：インクレチン受容体陽性細胞の膵再生における役割の解明

研究課題名(英文) Regenerative mechanisms of pancreatic endocrine and exocrine cells

研究代表者

洪 繁 (KO, SHIGERU)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：90402578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、GLP1受容体ノックインマウスを作成し、ヒト多能性幹細胞からの細胞分化誘導法を開発することを目的とした。遺伝子組換えベクターをマウスES細胞に導入し、遺伝子組換えマウスを樹立した。内分泌細胞の蛍光観察を行ったところ、いずれのマウスからも導入した蛍光発色が認められなかった。ヒトES細胞に、リポフェクション法で転写因子を導入し培養した。分化誘導二週間後には、インスリンなどの膵内分泌ホルモンの発現が確認された。ヒトES細胞から、膵内分泌細胞への細胞分化誘導技術が確立された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop GLP1 receptor knock-in mice and to develop a method for inducing cell differentiation from human pluripotent stem cells. Recombination vector was introduced into mouse ES cells to establish genetically modified mice. Pancreatic endocrine cells from these mice showed no fluorescence. Transcription factors were introduced into human ES cells by the lipofection method. Expression of pancreatic endocrine hormone such as insulin was confirmed as early as two weeks after induction of differentiation. A method to induce cell differentiation from human ES cells to pancreatic endocrine cells was established.

研究分野：膵再生医学

キーワード：膵内外分泌細胞 細胞分化誘導 ヒトES細胞

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の膵は、内分泌機能を司るラ氏島に存在する膵内分泌細胞 (α 、 β 、 δ 、 ϵ 、PP細胞の5種類)と、外分泌細胞である膵腺房細胞、腺房中心細胞に始まり十二指腸乳頭に至る膵導管細胞、及び膵星細胞に分けられる。インスリン分泌 β 細胞量の減少や機能障害は、糖尿病発症の主な原因となる。更に、膵疾患に伴う膵性糖尿病では、外分泌と内分泌細胞両方の消失が同時に起こる。外分泌細胞障害に対しては、消化酵素補充療法である程度は治療ができるが、内分泌障害に対しては一生生涯インスリン補充が必要な例も多く、病態の解明とインスリンからの離脱を可能にする新規治療法が望まれる。

これまで、ヒトの膵内・外分泌細胞は、自己組織修復・再生能力が無いために炎症等で障害されると組織修復が不可能で、組織障害は進行することこそあれ、二度と改善しないと考えられてきた(Dor et al, Nature 2004; Pagliuca and Melton, Development 2013)。2型DMへの指導においても未だにそのように指導されており(例えば、糖尿病は内服薬で血糖コントロールはできるが治らないなど)、アルコール性慢性膵炎や急性膵炎後の患者に対しても同じ様な説明指導が行われる。これまでAIPの治療後の内分泌機能回復については報告されていたものの(Tanaka et al, Lancet 2000)、膵組織は一度障害されると二度と組織修復せず、機能的にも回復しないというドグマに対して、私達は自己免疫性膵炎(AIP)の治療前後の膵機能を経時的に観察することで、成人(老人)の膵ですら消化機能として消化酵素分泌量が著明に回復し、更に組織再生することを発見し、ヒト成人膵での自己再生能力の存在を明らかにした(Ko et al, Gastroenterology 2010)。

更に最近では、マウスの胚性幹(Embryonic Stem, ES)細胞のごく一部の細胞(1-5%)や、2細胞期初期胚において特異的に発現し、ゲノムの安定性やテロメラーゼ“非依存的”テロメア長伸長に関わる因子であるZscan4(Zinc finger and scan domain 4)が(Zalzman et al, Nature 2010)、成人ヒト膵の一部(導管細胞、腺房細胞、内分泌細胞、膵星細胞などのごく一部の細胞)に特異的に発現していることを報告した。炎症によってZscan4遺伝子発現が誘導されるとともに、治療中(治療開始1-3ヶ月後)のAIP組織のように組織再生が活発に起こっている組織では、組織再生中の殆どの細胞においてZscan4遺伝子が発現していたことから、成人ヒト臓器の維持・再生においてもマウスES細胞と同様の組織修復メカニズムが存在する可能性についても報告した。またZscan4陽性細胞の一部は、内分泌細胞分画や外分泌分画にあっても、内・外分泌の両マーカー遺伝子を発現する細胞が複数存在すること、またこれらの細胞では、成熟分化細胞マーカーだけでなく、未分化細胞マーカーも同時に発現していることから、これ

らは元々前駆細胞レベルの状態にある細胞、または分化細胞が脱分化した細胞である可能性を見出した(Ko et al, AJG GI 2013)。

しばらく前から、DM患者の治療薬として、インクレチンホルモンであるGlucagon Like Peptide (GLP)1アナログやインクレチンの機能を強めるDPP-4阻害剤が使えるようになった。GLP1アナログやDPP-4阻害剤は、DM患者の血糖コントロールの改善に有効であるが、少なくともマウスにおいてはこれらの薬剤は膵 β 細胞増殖作用や分化誘導作用が知られており、ヒトにおいても β 細胞の増殖・分化誘導も期待され処方されている。

我々は、これまでの研究成果からGLP1受容体陽性細胞が、少なくとも膵内分泌細胞(場合により外分泌細胞の)前駆細胞である可能性を考え、マウスの膵でGLP1受容体とホルモンの局在を詳細に検討したところ(右図参照)これまでの報告とは違い、GLP1受容体発現細胞は強陽性細胞と弱陽性細胞があり、弱陽性細胞は β 細胞であるが、強陽性細胞は、非 β 、非 β 細胞であること、また他の前駆細胞マーカー染色との共染色により、GLP1受容体強陽性細胞は膵前駆細胞である可能性を見出した。

2. 研究の目的

本研究では、GLP1受容体ノックインマウスを作成し、細胞系譜追跡実験や単離GLP1受容体陽性細胞の遺伝子発現パターン解析、*in vitro*分化誘導実験を行うことで、未だ仮説に過ぎない成体膵における組織幹細胞の実態を明らかにするとともに、今だヒトでは確立されていない多能性幹細胞からの β 細胞分化誘導法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9を用いたGlp1受容体ノックインマウスの作成

マウスGlp1受容体をノックインするために、Glp1受容体アレルのExon1のATGサイトの直後に緑色蛍光タンパクVenusを発現するユニットを組み込む。その下流にIRES-CREERT2カセット、組換えES細胞のセレクションのためのpGK-neoカセットを組み込む。また、ベクター遺伝子を導入したマウスES細胞は、薬剤で選別しヘテロノックインES細胞を樹立する。さらに樹立したES細胞を熊本大学生命資源研究・支援センターにおいて、マウス胚盤胞にinjectionすることで、遺伝子組換えマウスを作出する。作出されたマウスは、交配により生殖細胞系列に組み込まれたマウス子を得、遺伝子組換えマウス系統を樹立する。さらに樹立されたマウスからES細胞を樹立し研究に活用する。

(2) 転写因子遺伝子の合成mRNAによる膵内分泌細胞分化誘導法の開発

当研究室では、再生医療実現拠点ネットワークプログラム・技術開発個別課題において、「多能性幹細胞から多種類の分化細胞を、最短時間、高効率、高品質、大量、自在に生産するための基盤技術開発と産業化応用」(平成25～29年)の課題で研究を行ってきた。この研究課題では、JST CREST(平成24～平成29年)「動的遺伝子ネットワークの多次元構造解析による高精度な細胞分化制御技術の開発」の研究成果により作成された、ヒト転写因子遺伝子700種類をそれぞれヒト細胞発現用ベクターと、さらに、そこからそれぞれの遺伝子の mRNA を in vitro で合成するための鋳型となるテンプレートベクター700種類を活用して、ヒト多能性幹細胞に転写因子遺伝子の合成 mRNA を導入することにより、転写因子を強制的に発現させ、ヒト多能性幹細胞を任意の分化細胞に分化誘導する技術を開発してきた。本研究では、この細胞分化誘導技術を活用し、ヒト胚性幹細胞からヒト膵内分泌細胞に細胞分化誘導するための技術を開発した。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 を用いた Glp1 受容体ノックインマウスの作成

研究方法の通りに、遺伝子組換えベクターをマウス ES 細胞に導入し、組み換え体をスクリーニングを行った。その結果、5 クローンの組換え ES 細胞を得た。そのうち、3 クローンを用いて、マウス胚盤胞のインジェクションを行ったところ、2 個の組換え ES 細胞から、複数のマウスが得られた。これらのマウスを野生型のマウスと交配し、ノックインマウスを得た。これらのマウスの膵臓から、内分泌細胞を単離し、蛍光観察を行ったところ、いずれのノックインマウスからも導入した緑色蛍光である Venus の蛍光発色が認められなかった。

樹立した本マウスは、蛍光タンパクの発現が認められなかったため、蛍光タンパクを mCherry に変更したベクターを構築して、組換えマウス ES 細胞を取得した。再度マウス胚盤胞にインジェクションをし、複数のマウス系統を自立したが、残念ながらこれらのマウスも Glp1 受容体に特異的な蛍光を認めることができなかったことから、Glp1 受容体遺伝子への蛍光タンパク導入には成功しなかった。

(2) 転写因子遺伝子の合成 mRNA による膵内分泌細胞分化誘導法の開発

マウス膵内分泌細胞は、複数の転写因子がその発生過程における細胞分化ステップを制御していることが知られている。そこで本研究では、マウスの発生過程で膵内分泌細胞への細胞分化に関与する転写因子を複数選択して研究に使用した。使用する遺伝子は、研究室の合成 mRNA in vitro 合成用ベクターストックから作成した。ヒト ES 細胞に、リ

ポフェクション法で導入し、培養した。培養3日目には、膵内分泌細胞の前駆細胞への細胞分化が確認され、分化誘導二週間後には、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチンなどの膵内分泌ホルモンの発現を免疫染色法で確認された。ヒト ES 細胞から、転写因子遺伝子を用いて二週間で内分泌ホルモン陽性細胞への細胞分化誘導技術が確立された。現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計16件)

Akiyama T, Sato S, Chikazawa-Nohtomi N, Soma A, Kimura H, Wakabayashi S, Ko SB, Ko MS. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into skeletal muscle cells by combining RNA-based MYOD1-expression and POU5F1-silencing. *Sci Rep*. 査読有、2018 Jan 19;8(1):1189. doi: 10.1038/s41598-017-19114-y.

Hirayama M, Ko SB, Kawakita T, Akiyama T, Goparaju SK, Soma A, Nakatake Y, Sakota M, Chikazawa-Nohtomi N, Shimmura S, Tsubota K, Ko MS. Identification of transcription factors that promote the differentiation of human pluripotent stem cells into lacrimal gland epithelium-like cells. *NPJ Aging Mech Dis*. 査読有、2017 Jan 24;3:1. doi: 10.1038/s41514-016-0001-8. eCollection 2017.

洪 繁、秋山智彦、スラバンゴパラジュ、平山雅敏、洪 実、Quick-Tissue テクノロジー: ヒト転写因子合成 mRNA を用いたヒト多能性幹細胞の新しい細胞分化誘導法とその将来展望、月刊バイオインダストリー Vol.34, No.8, シーエムシー出版、査読無、2017年8月12日発行

Matsushita M, Nakatake Y, Arai I, Ibata K, Kohda K, Goparaju SK, Murakami M, Sakota M, Chikazawa-Nohtomi N, Ko SB, Kanai T, Yuzaki M, Ko MS. Neural differentiation of human embryonic stem cells induced by the transgene-mediated overexpression of single transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有、2017 Aug 19;490(2):296-301. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.039.

Akiyama T, Wakabayashi S, Soma A, Sato S, Nakatake Y, Oda M, Murakami M, Sakota M, Chikazawa-Nohtomi N, Ko SB, Ko MS. Epigenetic Manipulation Facilitates the Generation of Skeletal Muscle Cells from Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int*. 査読無、2017;2017:7215010. doi: 10.1155/2017/7215010.

Goparaju SK, Kohda K, Ibata K, Soma A, Nakatake Y, Akiyama T, Wakabayashi S, Matsushita M, Sakota M, Kimura H, Yuzaki M, Ko SB, Ko MS. Rapid differentiation of human pluripotent stem cells into functional neurons by mRNAs encoding transcription factors. *Sci Rep*. 査読有、2017 Feb 13;7:42367. doi: 10.1038/srep42367.

Ishiguro KI, Monti M, Akiyama T, Kimura H, Chikazawa-Nohtomi N, Sakota M, Sato S, Redi CA, Ko SB, Ko MS. Zscan4 is expressed specifically during late meiotic prophase in both spermatogenesis and oogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 査読有、2017 Feb;53(2):167-178. doi: 10.1007/s11626-016-0096-z.

Ishiguro KI, Nakatake Y, Chikazawa-Nohtomi N, Kimura H, Akiyama T, Oda M, Ko SB, Ko MS. Expression analysis of the endogenous Zscan4 locus and its coding proteins in mouse ES cells and preimplantation embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 査読有、2017 Feb;53(2):179-190. doi: 10.1007/s11626-016-0097-y.

Akiyama T, Wakabayashi S, Soma A, Sato S, Nakatake Y, Oda M, Murakami M, Sakota M, Chikazawa-Nohtomi N, Ko SB, Ko MS. Transient ectopic expression of the histone demethylase JMJD3 accelerates the differentiation of human pluripotent stem cells. *Development*. 査読有、2016 Oct 15;143(20):3674-3685. doi: 10.1093/dnares/dsv013.

洪 繁、ヒト臍内外分泌組織の再生と機能的回復：ヒトの臍は再生しないというドグマを超えて、*BIO Clinica*、査読無、第31巻、第7号、page88-93、北隆館、2016年6月10日発行

洪 繁、ヒト臍の組織再生と組織幹細胞、*BIO Clinica*、査読無、第31巻、第3号、page90-94、北隆館、2016年3月10日発行

洪 繁、ヒト臍の組織再生と組織幹細胞、*Medical Science Digest*、査読無、第42巻、第2号、page8-12、ニューサイエンス社、2016年2月25日発行

Kuroda Y, Maruyama K, Fujii H, Sugawara I, Ko SB, Yasuda H, Matsui H, Matsuo K. Osteoprotegerin Regulates Pancreatic β -Cell Homeostasis upon Microbial Invasion. *PLoS One*. 2016 査読有、Jan 11;11(1):e0146544. doi: 10.1371/journal.pone.0146544.

秋山智彦、小田真由美、石黒啓一郎、洪 繁、洪 実、Zscan4による特異的なヘテロクロマチン制御を介したマウスES細胞のゲノム安

定化、細胞工学、査読無 Vol.34, No.11, pp1052-1056、秀潤社 2015年10月22日発行

Akiyama T, Xin L, Oda M, Sharov AA, Amano M, Piao Y, Cadet JS, Dudekula DB, Qian Y, Wang W, Ko SB, Ko MS. Transient bursts of Zscan4 expression are accompanied by the rapid derepression of heterochromatin in mouse embryonic stem cells. *DNA Res*. 査読有、2015 Oct;22(5):307-18. doi: 10.1093/dnares/dsv013.

秋山 智彦, 中武 悠樹, 山水 康平, 相馬 淳美, 洪 繁, 洪 実
【再生医療-新たな医療を求めて-】臨床応用を目指した基礎研究 再生医療を進めるための技術開発
「転写因子操作による多能性幹細胞からの自在な細胞分化誘導技術の確立を目指して」日本臨床、査読無、73巻、増刊5 再生医療 Page330-336(2015.06)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

洪 繁 (KO, Shigeru)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授
研究者番号: 90402578

(2)研究分担者

石黒 啓一郎 (ISHIGURO, Kei-ichiro)
熊本大学・発生医学研究所・准教授
研究者番号: 30508114

(3)研究分担者

竹田 直樹 (TAKEDA, Naoki)
熊本大学・生命資源研究・支援センター
研究者番号: 90304998