

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09385

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞から膵芽細胞への分化機序解明と新規誘導法の開発

研究課題名(英文) Mechanism based development of differentiation method for pancreatic bud-like cells from human pluripotent stem cells

研究代表者

豊田 太郎 (Toyoda, Taro)

京都大学・iPS細胞研究所・講師

研究者番号：60593530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵芽・膵上皮細胞(NKX6.1+細胞)は、発生過程において膵臓への分化が決定された細胞である。NKX6.1+細胞への分化誘導は多能性幹細胞からの膵細胞作製において要所となる。しかしながら、ヒト幹細胞から膵芽細胞への分化機序や、試験管内で高効率に作製する方法は確立されていない。本研究では、ヒトiPS細胞からNKX6.1+細胞への分化を促進する低分子化合物を同定し、その解析から細胞骨格関連分子が関与することを明らかにした。本研究で解明したヒト多能性幹細胞からのNKX6.1+細胞の分化誘導法およびその機序は、膵細胞を用いた基礎研究や臨床応用に有用である。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic bud/epithelial cells (NKX6.1+ cells) are considered as pancreas-committed cells. Induction of the NKX6.1+ cell is a critical step for the generation of pancreatic cells from human pluripotent stem cells. However, the induction method and mechanism have not yet been fully established. In this study, we identified low molecular weight compounds which promote differentiation into NKX6.1+ cells from human iPS cells. Based on the analysis of the compounds, we found that cytoskeleton regulating molecules are involved in the part of the mechanisms. Our differentiation protocol established in this study and the mechanism may be useful for both basic research and clinical application using pancreatic cells.

研究分野：再生医学

キーワード：NKX6.1 PDX1 膵臓 iPS細胞 ES細胞 細胞骨格 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病の患者数は世界中で劇的に増加している。本邦においても最新の厚生労働省の統計によると、糖尿病患者および予備軍は2,050万人と国民の16%にのぼり、その対策は我が国の急務である。また、糖尿病の医療費は1兆2,152億円と国民医療費の3.2%を占める膨大なものであるため、医療経済的にも重大な問題である。糖尿病の病因・病態として膵細胞の機能低下および細胞数の減少があり、新たな膵細胞の補充療法の開発が求められている。

近年、移植医療への応用に向けて無限の増殖能と多分化能を有するヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES 細胞) やヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPS 細胞) から様々な臓器や細胞種の作製が試みられており、膵細胞も大きな標的の一つである。膵細胞は、膵臓内にある膵島と呼ばれる内分泌細胞集団の90%を占める最大の構成要素である。発生物学の知見に基づき、ヒト ES/iPS 細胞から膵島様細胞塊を分化誘導する報告がなされているが、機能的な膵細胞を作製するのは依然困難である (Assady, 2002; Tateishi, 2008)。一方、ヒト ES/iPS 細胞から作製した成体膵細胞ではなく、胎生期の膵芽細胞 (PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>) が含まれる細胞分画を移植すると、*in vivo* の環境下で機能的な膵細胞へと分化・成熟することが報告された (Kelly, 2011)。したがって、膵細胞よりも前段階の膵系譜細胞の作製と利用も有力な解決策の一つである。

膵臓は、膵前駆細胞 (PDX1<sup>+</sup>) から膵芽と呼ばれる細胞塊を形成することで初めて形態学的に認識可能となる。膵芽細胞 (NKX6.1<sup>+</sup>) は膵臓にのみ分化する最初の細胞種であると考えられるため、我々は、効率的な膵細胞作製に向けて、膵芽細胞の分化段階に着目している。しかし、膵芽細胞の分化誘導法は未だ確立されていない。この原因として、これまでの分化誘導法は使用された各幹細胞株に適した条件が一部満たされているだけで、膵前駆細胞から膵芽細胞への分化機序の全貌の解明に基づく普遍的な方法ではないからと考えている。

我々は、これまでにヒト ES/iPS 細胞から膵前駆細胞 (PDX1<sup>+</sup>) を80%以上の誘導効率で作製することを達成し、膵発生の次段階である膵芽細胞 (NKX6.1<sup>+</sup>) を細胞塊の浮遊培養系を用いることで、40%以上の誘導効率で作製する分化誘導系を確立した。さらに、作製した細胞塊を免疫不全マウスへ移植することで、検出可能な量のヒトインスリンをマウス血中に分泌する成熟した膵細胞を得た。これらの結果から、我々はヒト ES/iPS 細胞から正常発生にて得られるものと近い膵芽細胞を作製可能であった。

同じ液性因子処理下であっても、平面培養に比べ、細胞塊の浮遊培養において、膵芽細胞

(NKX6.1<sup>+</sup>) への分化が顕著に促進される。細胞塊を形成することで膵芽細胞への分化が促進されることから、3次元構造の形成が、平面培養には無いシグナルを惹起していると考えられる。例えば、細胞骨格のダイナミックな変化が細胞分化の刺激となることが脂肪細胞への分化系で最近報告された (Nobuse, 2014)。このため我々は、細胞骨格変化に関連するシグナル伝達経路に注目している。

## 2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞から作製した膵前駆細胞 (PDX1<sup>+</sup>) から膵芽細胞 (NKX6.1<sup>+</sup>) への分化機序に細胞骨格の変化に関連するシグナル伝達経路が関与するか明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 平面培養系にて膵芽細胞への分化を促進する方法の確立

細胞骨格の再編成に関わるシグナル伝達経路や、細胞骨格分子そのものに影響を与える化合物が膵芽細胞の分化に寄与するか検討する。また、分化誘導に影響を与える化合物と類似の効果を持つ化合物や、作用機序の異なる化合物の効果と比較する。これらによって細胞骨格の状態に関連するシグナル伝達経路のどの段階が分化誘導に関与するかを推定する。

(2) 新たに作製される NKX6.1<sup>+</sup>細胞が膵芽細胞であることの検証

平面培養系にて新たに作製される NKX6.1<sup>+</sup>細胞が、これまでの細胞塊形成による3次元培養で作製されるものと同等の機能を有する膵芽細胞であるか否かを検証する。このため新たに作製される細胞集団の遺伝子発現プロファイルを得る。また、分化能を検討するため、免疫不全マウス (NOD-SCID マウス) へ移植し、移植から30-120日後に形態・発現タンパク質の組織化学的な解析にて分化状態を追跡する。また、空腹時および糖負荷時の血糖値やヒトCペプチド値などの分析から膵細胞の機能を解析する。

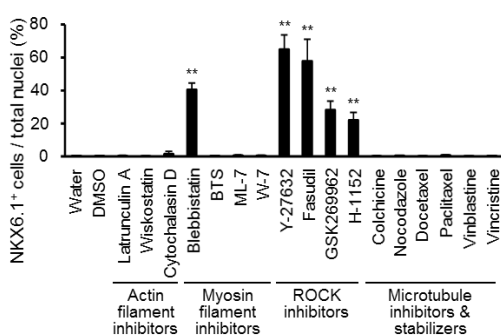
(3) 膵芽細胞分化の分子機構の解明

分化誘導を促進する薬剤が、細胞塊の形成時に惹起されるシグナルと同様であるかを検証する。このため、膵芽細胞への分化が促進する培養条件 (高密度平面培養、細胞塊の浮遊培養) において候補シグナル伝達分子の活性が、(1) で効果のあった化合物処理と同様であるか検討する。

## 4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞から膵前駆細胞 (PDX1<sup>+</sup>) を作製し、これを平面培養のまま細胞骨格再編

成に関わる薬剤（アクチン阻害剤、ミオシン阻害剤や、その上流分子の活性化剤・阻害剤）にて刺激した。ミオシン阻害剤の 1 種類（Blebbistatin）や、ROCK に対する全ての阻害剤（Y-27632、Fasudil、GSK269962、H-1152）で処理した場合に膵芽細胞（NKX6.1<sup>+</sup>細胞）への分化が促進した（図 1）。一方、筋ミオシン II の阻害剤（BTS）では分化が促進されなかったことから、非筋ミオシン II の阻害が分化を促進すると考えられる。また、ROCK 阻害剤や非筋ミオシン II 阻害剤による分化誘導促進効果は、他のヒト iPS 細胞株やヒト ES 細胞でも同様であった。これらの結果から、ROCK およびその下流分子である非筋ミオシン II が膵芽細胞への分化に関与することが示唆された。



**図1 ミオシン阻害剤やROCK阻害剤は膵芽細胞への分化を誘導する**

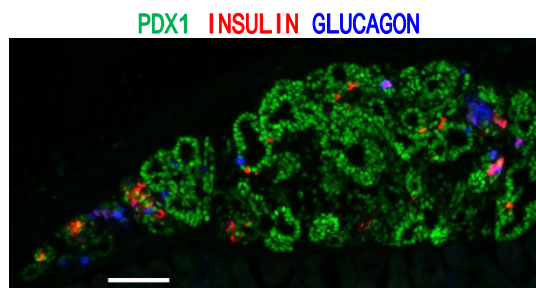
膵前駆細胞から膵芽細胞への分化誘導過程を様々な細胞骨格調を調節する試薬で刺激した。（Toyoda T, 2017 より引用改変）

ROCK 阻害剤や非筋ミオシン II 阻害剤は、細胞死を抑制する作用があることが報告されている。そこで、これら化合物の作用機序に細胞死抑制作用が関与するか、細胞死の指標を経時的に比較したところ化合物の有無によらず細胞死は安定して<5%と低度であった。このことから、作用機序として細胞死抑制作用は関与しないことが示唆された。

(2) ROCK 阻害剤や非筋ミオシン II 阻害剤を用いて作製される細胞の *PTF1A*（膵芽細胞の指標）、*SOX9*（多能性前駆細胞の指標）を経時的に測定した。*PTF1A* の発現量は ROCK 阻害剤や非筋ミオシン II 阻害剤処理を行った群でのみ NKX6.1<sup>+</sup>細胞率と相関して経時的に増加していた。一方、*SOX9* の発現量は全ての群において経時的に増加していた。これらの結果は ROCK 阻害剤や非筋ミオシン II 阻害剤処理が、膵芽細胞への分化を誘導することを支持する。

また、ROCK 阻害剤や非筋ミオシン II 阻害剤処理を行った細胞を免疫不全マウスの腎被膜に移植したところ、移植から 30 日後には、PDX1<sup>+</sup>細胞からなる管状構造と、それらから出芽する INSULIN<sup>+</sup>細胞、GLUCAGON<sup>+</sup>細胞を観

察することができた（図 2）。これらは、ヒトの胎児膵と合致する所見で、作製した細胞は生体内に移植されると膵上皮へと分化可能であることを示唆する。



**図2 ヒト iPS 細胞由来の膵組織**

ROCK 阻害剤処理にて作製した膵芽細胞を移植して 30 日後の移植片を免疫染色した。緑色：膵前駆細胞(PDX1)、赤色：インスリン産生細胞、青色：グルカゴン産生細胞。Scale bar, 100 μm。（Toyoda T, 2017 より引用改変）

さらに、非筋ミオシン II 阻害剤で処理した細胞を移植した場合、移植から 60-90 日後から血中にヒト C-peptide が検出され始め、その血中量は経時的に増加した。移植から、120 日以上後には成熟した膵細胞の指標である血中グルコース濃度に応じたヒト C-peptide の分泌が観察された。

以上のことから ROCK 阻害剤や非筋ミオシン II 阻害剤を用いて作製される細胞は膵芽細胞であると考えられる

(3) 高細胞密度状態での培養や細胞塊の浮遊培養の、ROCK の活性やその下流にある非筋ミオシン II のタンパク質量を調べたところ、いずれも低下していた（図 3）。つまり、ROCK 阻害剤や非筋ミオシン II 阻害剤は、膵芽細胞への分化に有利な培養条件と同じ細胞内シグナル伝達状態を作り出していると考えられた。

本研究で開発したヒト多能性幹細胞からの膵芽細胞への分化誘導法と明らかにした分化機序は、膵細胞を用いた基礎研究や臨床応用に有用である。

## 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 10 件)

- (1) Kimura A, Toyoda T, Nishi Y, Nasu M, Ohta A, Osafune K, Small molecule AT7867 proliferates PDX1-expressing pancreatic progenitor cells derived from human pluripotent stem cells, Stem Cell Res, 査読有, 2017, 24:61-68.

doi: 10.1016/j.scr.2017.08.010.

- (2) Toyoda T, Kimura A, Tanaka H, Ameku T, Mima A, Hirose Y, Nakamura M, Watanabe A, Osafune K, Rho-associated kinases and non-muscle myosin IIs inhibit the differentiation of human iPSCs to pancreatic endoderm, Stem Cell Reports, 査読有, 2017, 8;9(2):419-428.  
doi: 10.1016/j.stemcr.2017.07.005.
  - (3) 伊藤遼、豊田太郎、稲垣暢也、長船健二、膵臓・膵島再生研究の現状と展望、胆と膵 (医学図書出版)、査読無し、2017、38(9): 879-884
  - (4) 廣瀬友里恵、豊田太郎、長船健二、ES/iPS細胞を用いた膵島再生療法の現状と展望、内分泌・糖尿病・代謝内科 (科学評論社)、査読無し、2017、44(2): 130-135
  - (5) 豊田太郎、中村剛士、田上寛、長船健二、iPS細胞を用いた糖尿病の細胞療法への取り組み、実験医学増刊「糖尿病」 (羊土社)、査読無し、2017、35(2): 175-179
  - (6) 天久朝廷、豊田太郎、長船健二、iPS細胞を用いた糖尿病に対する再生医療開発、月間糖尿病 (医学出版)、査読無し、2016、8(6): 30-37
  - (7) 美馬淳志、豊田太郎、妹尾浩、長船健二、iPS細胞と糖尿病-移植用膵細胞の再生、G.I. Reserch (先端医学社)、査読無し、2016、24(2): 24-29
  - (8) 伊藤遼、豊田太郎、稲垣暢也、長船健二、膵細胞の再生 最近の進歩「最新医学」(最新医学社)、査読無し、2016、71(3): 457-462
  - (9) 木村東、豊田太郎、長船健二、iPS細胞から再生膵細胞、腎と透析 (東京医学社)、査読無し、2015、79(6): 955-959
  - (10) 美馬淳志、豊田太郎、長船健二、インスリン分泌を回復させる iPS細胞の可能性、糖尿病診療マスター (医学書院)、査読無し、2015、13(12): 925-930
- 〔学会発表〕(計 13 件)
- (1) 豊田太郎、木村東、田中ひろみ、天久朝廷、美馬淳志、廣瀬友里恵、中村正裕、渡辺亮、長船健二、ヒト iPS/ES 細胞から膵芽細胞への分化過程における細胞骨格調節分子の役割、第 17 回日本再生医療学会総会、0-47-5、2018 年 3 月 21-23 日 (3 月 23 日) 横浜
  - (2) Toyoda T, Kimura A, Tanaka H, Ameku T, Mima A, Hirose Y, Nakamura M, Watanabe A, Osafune K, Rho-associated kinases and non-muscle myosin IIs inhibit the differentiation of human iPSCs to pancreatic endoderm, CiRA 2017 International Symposium, P-3004, 2017 年 11 月 6-8 日 (11 月 6 日), Kyoto, Japan
  - (3) Toyoda T, Kimura A, Tanaka H, Ameku T, Mima A, Hirose Y, Nakamura M, Watanabe A, Osafune K, RHO-ASSOCIATED KINASES AND NON-MUSCLE MYOSIN IIS PLAY INHIBITORY ROLES FOR THE DIFFERENTIATION OF HUMAN IPSCS TO PANCREATIC ENDODERM CELLS, International Society for Stem Cell Research 2017, F-1068, 2017 年 6 月 14-17 日 (6 月 16 日), Boston, USA
  - (4) Toyoda T, Kimura A, Ameku A, Mima A, Osafune K, Insights into the regulatory mechanisms for the differentiation of human iPSCs to pancreatic endoderm cells, Kyoto Diabetes Mini-Symposium - Beta-Cell Replacement Strategies, 2017 年 6 月 5 日, 京都
  - (5) Kimura A, Toyoda T, Nishi Y, Nasu M, Ohta A, Osafune K, Small molecule-induced in vitro expansion of PDX1(+) pancreatic progenitor cells, Kyoto Diabetes Mini-Symposium - Beta-Cell Replacement Strategies, 2017 年 6 月 5 日, 京都
  - (6) 伊藤遼、近藤恭士、豊田太郎、船戸道徳、細川吉弥、須藤智美、庄暁桐、太田章、稲垣暢也、長船健二、ヒト iPS 細胞から膵内分泌前駆細胞への分化を促進する低分子化合物クロモグリク酸ナトリウムの作用機序の解明、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、II-宝 10-21、2016 年 5 月 19-21 日 (5 月 20 日) 京都
  - (7) 細川吉弥、豊田太郎、福井健司、馬殿恵、須藤智美、岩橋博見、岸田真里菜、岡田千尋、渡辺亮、浅香勲、長船健二、今川彰久、下村伊一郎、劇症1型糖尿病患者由来 iPS細胞を用いた膵細胞傷害機構の解明、第59回日本糖尿病学会年次学術集会、II-宝6-17、2016年5月19-21日 (5月20日) 京都
  - (8) 豊田太郎、木村東、田中ひろみ、美馬淳志、廣瀬友里恵、渡辺亮、長船健二、再生医療応用に向けたヒト iPS細胞から膵芽細胞への分化機序解明、第59回日本糖尿病学会年次学術集会、I-宝-14-3、2016

年5月19-21日(5月19日)京都

- (9) 木村東、豊田太郎、田中ひろみ、西洋平、太田章、長船健二、再生医療応用に向けたヒトiPS細胞由来膵系譜細胞の増殖促進因子の探索、第59回日本糖尿病学会年次学術集会、I-宝-14-2、2016年5月19-21日(5月19日)京都
- (10) Kimura A, Toyoda T, Tanaka H, Nishi Y, Ohta A, Osafune K, Identification of proliferation promoting factors for hiPSC-derived pancreatic progenitor cells, CiRA/ISSCR International Symposium 2016, P1-077, 2016年3月22-24日(3月22日)京都
- (11) 木村東、豊田太郎、長船健二、糖尿病に対する細胞療法確立に向けたヒトiPS細胞由来膵系譜細胞の増殖促進因子の探索、第15回日本再生医療学会総会、0-30-2、2016年3月17-19日(3月18日)大阪
- (12) 近藤恭士、豊田太郎、船戸道徳、細川吉弥、須藤智美、庄暁桐、太田章、山中伸弥、稲垣暢也、長船健二、ヒトiPS細胞から膵内分泌前駆細胞への分化を促進する低分子化合物の同定、第58回日本糖尿病学会年次学術集会、III-11-16、2015年5月21-24日(5月23日)山口
- (13) 細川吉弥、豊田太郎、福井健司、浅香勲、馬殿恵、須藤智美、岩橋博見、長船健二、今川彰久、下村伊一郎、劇症1型糖尿病特異的iPS細胞の樹立とインスリン産生細胞への分化誘導、第58回日本糖尿病学会年次学術集会、I-11-13、2015年5月21-24日(5月21日)山口

〔図書〕(計2件)

- (1) 豊田太郎、長船健二 他、南江堂、「再生医療」小児・思春期糖尿病コンセンサス・ガイドライン、p108-113(総315頁)2015年6月5日
- (2) 近藤恭士、豊田太郎、稲垣暢也、長船健二 他、西村書店、「再生医学・iPS細胞」糖尿病学p594-600(総623頁)2015年5月15日

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

- (1) 名称：膵芽細胞の製造方法  
発明者：長船健二、豊田太郎、木村東  
権利者：国立大学法人京都大学  
種類：特許  
番号：特願2015-185662  
出願年月日：2015年9月18日  
国内外の別：日本

- (2) 名称：膵芽細胞の製造方法および膵芽細胞を含む膵疾患治療剤  
発明者：長船健二、豊田太郎  
権利者：国立大学法人京都大学  
種類：特許  
番号：PCT/JP2015/064529  
取得年月日：2015年5月20日  
国内外の別：PCT

〔その他〕

- (1) ヒトES/iPS細胞由来の膵前駆細胞を特異的に増殖促進する低分子化合物を同定  
<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/presrelease/news/170823-140000.html>
- (2) ヒトiPS細胞から膵臓細胞への分化を制御するメカニズムの一端を解明  
<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/presrelease/news/170809-083000.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 太郎 (TOYODA, Taro)  
京都大学・iPS細胞研究所・講師  
研究者番号：60593530

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

長船 健二 (OSAFUNE, Kenji)  
京都大学・iPS細胞研究所・教授  
研究者番号：80502947

渡辺 亮 (WATANABE, Akira)  
京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教  
研究者番号：60506765

(4) 研究協力者

なし