

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21333

研究課題名(和文) 単一細胞解析によるhiPSCから 細胞への分化メカニズムの解明と分化効率向上化

研究課題名(英文) Development and finding the mechanism of pancreatic beta cell differentiation from hiPS cells through Single cell analysis

研究代表者

菅原 泉 (Sugahara, Izumi)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：10633000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：hiPS細胞は再生医療において大きな期待が寄せられている。1型糖尿病は血糖コントロールのインスリンを分泌する細胞が破壊されインスリンを投与し続ける必要がある。インスリンを分泌する細胞を移植するという細胞治療は大きな期待が寄せられており、実際には膵臓や膵島移植などの治療法もあるが圧倒的なドナー不足というのが現状である。したがってhiPS細胞などの多能性分化能を持つ細胞から 細胞へ分化させたものを移植するというに大きな期待が寄せられている。本研究ではhiPS細胞から分化した 細胞のメカニズムの解明を目指して単一細胞解析を行い、よりよい 細胞の作成のための機序を明らかにし分化効率を高める。

研究成果の概要(英文)：The human induced pluripotent stem cells are potential resource for type 1 diabetes cell based therapies. Although, the beta cell differentiation had been deeply investigated, the molecular mechanism of differentiation of beta cell from hiPSCs and in which levels were achieved the beta cell derived hiPSCs has not been understood completely. In this study we provide, a single cell transcriptome of differentiated beta cells from hiPSCs, in which double labelled with Venus and mCherry proteins (hlveNry). The Venus protein could express under INS promoter and mCherry under NGN3 promoter, meaning that by fluorescent protein could monitor from NGN3+ red endocrine progenitor to the Venus positive beta cells. In this study we performed the cell profiling of the fluorescent positive cells viewing the status of the differentiation of the beta cells in which the maturation process was confirmed by glucose responsivity.

研究分野：生物学

キーワード：beta cell single cell analysis hiPS

## 1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病患者の治療には膵細胞移植は移植ドナー不足を解消するために有効な治療方法である。hiPS 細胞はどのような細胞にも分化しうる多能性幹細胞であり再生医療分野では大きな期待が寄せられている。これまで世界中でマウス iPS 細胞や ES 細胞を用いて細胞への分化誘導の方法は開発されてきており基本的な分化方法は 2006 年に報告された論文 ([1]) をもとに分化法に大きな違いはない。しかし、細胞の成熟化という観点からはまだ誰も完成させていない。細胞の機能はインスリンを分泌することであるが、グルコースの濃度に応じて分泌する機能を有するものを成熟の一つの指標である。したがって *in-vitro* の実験においてはグルコース応答性を見る Glucose test という試験法がある。最終的には糖尿病治療効果を有することが重要である。*In-vitro* においてグルコース応答性を有していたとしても移植後すぐに血糖値を下げる効果はまだないのが現状の分化した細胞である。血糖降下の効果がないのは量的に不足だからかまだ未成熟のためであると思われる。糖尿病治療する細胞はほとんどの場合移植後 30 日後など生体内において成熟化が進んでの効果である。*In-vitro* での分化方法では臨床に耐える細胞ができていないのが現状であるが分化メカニズム、特に hiPS 細胞からの分化の詳細な解析はこれまでおこなわれていない。我々は簡便に分化の指標となるように hiPS 細胞に分化マーカーの下流に蛍光タンパク質を発現させる hIveNry 細胞を作成している [2]。ダブル蛍光標識の hiPS 細胞であり、内分泌前駆細胞のマーカーである NGN3 の下流には mCherry の赤蛍光、細胞のマーカーの INS の下流には Venus の緑蛍光が光るシステムである。したがって分化に伴って赤から緑へと変換する過程が見られるものである。本細胞を使用し分化の状態をより詳細に解析するためにシングルセル解析を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では、hIveNry 細胞を用いて膵細胞への分化を行い、単一細胞解析により hiPS 細胞から細胞への分化のメカニズムの解明を試みる。hiPS 細胞からの細胞への分化において網羅的な解析は多くなされているが、単一細胞の解析はこれまでおこなわれていない。hiPS 細胞は多能性を有するがゆえに分化誘導を行うと一斉に同じ方向に向かっていない可能性が高い。したがって、個々の細胞を詳細にみることで実際に成熟に向かうために必要な因子は何かなどが特定できれば新たな分化誘導方法を確立できると思われる。

## 3. 研究の方法

hIveNry 細胞を用いて成熟に近い細胞へ

の分化誘導を行い、単一細胞を採取し Quartz seq の解析を行う。分化誘導後の細胞はグルコース応答性のある細胞群が含まれている。そのため成熟に近い細胞があると仮定しての解析である。ソーティングは最終分化に到達した細胞をランダムに蛍光の緑、赤、黄色のものを採取した。分化した際にたとえ最終であってもすべてが緑の細胞になってはいない。途中分化のものも厳然と存在し、また、内分泌前駆細胞は細胞へ分化するものであるが、その他内分泌細胞への分化も進む。内分泌細胞はそれぞれ 5 種類あり、Glucagon を発現する細胞、Somatostatin を発現細胞、そのほかにも PP 細胞や細胞などの生体内でも少ない細胞群なども存在する。mCherry のみで発現する細胞群にはそうした別の細胞などが存在しうる可能性や分化が進まなかった細胞などが含まれていると思われる。また、緑と赤のダブル蛍光細胞においては細胞への方向に進んでいると思われるが、緑蛍光だけの細胞群との違いはどのようなものかなどを見ていきたい。

## 4. 研究成果

4.1. 分化誘導法の改良：確実に分化を成熟化に向かわせるためには NGN3 の分化効率が必要であるとの見解から分化誘導の途中で一度蛍光細胞のみをソーティングして成熟化過程を経ることでより分化効率、成功率があがることを見出された (東大宮島研改良) 実際に分化後にグルコース応答性の有無を見た際にインスリンの量やグルコースの濃度に従って分泌量があがり、そのあとにグルコース濃度を下げるとインスリン分泌量もさがる (図 1)。そうした細胞を用いて約 300 種類の細胞を単一細胞解析を Quartz seq の方法で行った (理研：二階堂) (図 2)

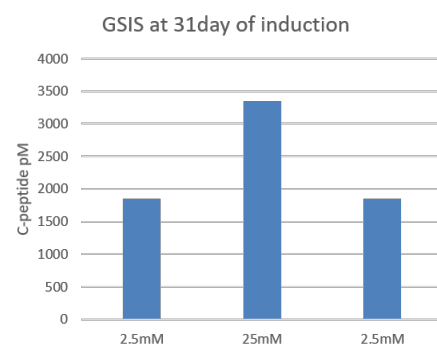


図 1: hiPS 細胞から細胞への分化を行い、成熟課程を経て最終日においてシングルセルソーティング前にグルコース応答性を確認した。

4.2 約 3 プレート分の Quartz-seq を行ったところ、277 細胞は正常にデータが取れておりそれらの解析を進めた。8 サンプルについてはリード数が満たないために除外した。

4.3 ソーティングした細胞群は、Venus の

細胞群は約 20-30%、mCherry の細胞群は 30 - 40%の群衆でありダブルポジティブ細胞

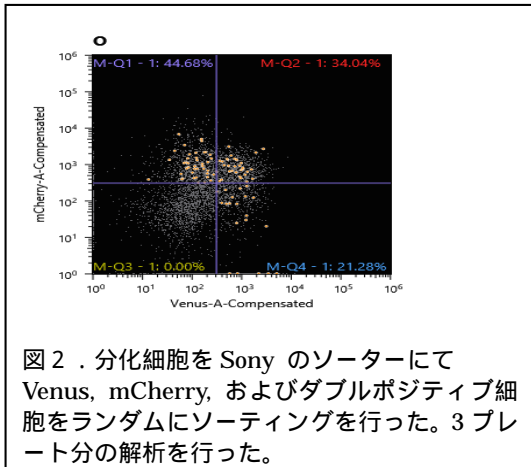


図 2 . 分化細胞を Sony のソーターにて Venus, mCherry, およびダブルポジティブ細胞をランダムにソーティングを行った。3 プレート分の解析を行った。

群は約 30%以上であった(図 2)。全体の細胞においてほとんどの細胞種において INS が強く発現していた。しかし同時に GCG や SST など多くの細胞で発現していることが分かった。そこで各種ソーティング群における分布を、INS を強く発現する細胞群、INS/GCG でダブルに発現するものの分布を示した(図 3)。その結果、Venus ソート細胞群において INS 単独に強く発現している細胞群(67%)は他のソート細胞群に比べ多く、ダブルポジティブ細胞群(DP:double positive)では INS/GCG の細胞群(77%)が INS のみを発現する細胞群(23%)より多かった。mCherry の細胞群においては内分泌前駆細胞のマーカによるソーティングであるが、様々な細胞種が存在する。その中でも INS/GCG(low)の存在が大半を占めている(43%)。INS のみを発現するものは 25%と INS/GCG(High)においても 25%であった。また GCG のみで発現する細胞は 1 割未満で存在していた。Mcherry 細胞群でも INS のみを発

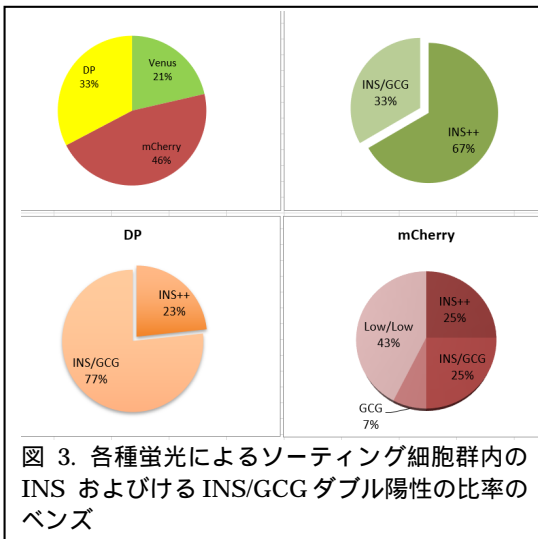


図 3. 各種蛍光によるソーティング細胞群内の INS および INS/GCG ダブル陽性の比率のベンズ

現する細胞も多く存在するが Venus のたんぱく質がまだ出てくる前あるいは mCherry や Venus の蛍光遺伝子はホモではなくヘテロ

に挿入されているものであり、片側からの INS の発現によるものも存在しているためである。以上のことから蛍光によりソートしてきた細胞群においてはおよそ INS の発現に比例した細胞分布になっていることが確認できた。細胞群全体では全体的に insulin を発現する INS 陽性細胞であり、そのうち約半分は GCG が発現しており、SST など多くの細胞で発現している。これらの細胞群は INS 陽性細胞ではほとんどの場合に GCG が発現していることがわかった。すなわち 細胞のマーカと 細胞のマーカ遺伝子が同時に発現しているポリホルモンである。これらの細胞はこれまでの報告では未成熟であることが知られている。一方で、SST が発現している細胞群もあり、GCG が強く発現していると

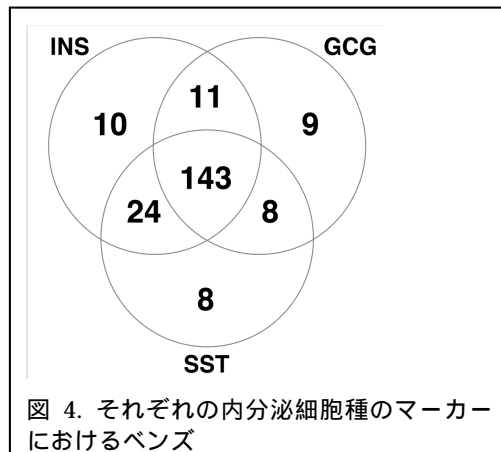


図 4. それぞれの内分泌細胞種のマーカにおけるベンズ

ころには発現していないことが分かった。これらの主要なマーカ遺伝子のみを全体において分類すると、INS のみを発現する細胞は 10、GCG との共発現細胞は 11、三つのマーカ遺伝子が発現する細胞群は最も多く 143 も存在する(図 4)。それぞれのマーカ単独では INS, GCG, SST らは意外にもほとんど同じ割合であった。先の解析でソート別に見ると Venus 群においては INS ポジティブな細胞がほとんどであるが、その他の部分において割合がそれぞれ違うことから、多くの細胞以外の細胞も分化されていることが分かった。またこれら全体の細胞群において NGN3 の発現はほとんど見られない。すなわち mCherry 陽性の細胞群は蛍光としては出てくるが NGN3 の mRNA レベルでの発現は早期に発現しており、後期における発現はほとんどないことが示唆される。その意味では後期の分化法ではより内分泌への分化を優先的に促進しているのであり、mCherry 陽性細胞は必ずしも前駆細胞ではないということが示唆された。しかし mCherry 細胞群の中には前駆細胞様の細胞種が多く含まれており、その中でも未熟と思われる細胞が多く含まれている。様の細胞群が多いものこの群である。一方でダブルポジティブ細胞および Venus 細胞群において全体的な解析では一定した違いのマーカは得られていない。Insulin の発現量においても多様であり、こ



れまでに知られている成熟マーカー遺伝子も発現が様々であり、一定の遺伝子を均一に発現するという細胞は存在しなかった。細胞は個々に違い多様な細胞群であることが分かった。全体的に INS を発現していてもその他の遺伝子によってその特性は決定づけられていると思われる。

生体内において細胞で一番発現が高いのは圧倒的に Insulin であるがただ単に Insulin が強く発現することが良いという単純なものでもなく、そのほかにどのような遺伝子が発現していれば成熟に近いといえるのかというのが最大の焦点であるが、今のところ決定打というものが無い。実際のところこれまで成熟に重要だといわれている NKX6.1 や MAFA, GLP1R などの遺伝子もそれぞれの細胞で発現しているものは少なく、また十分な発現量とは言えない。しかしこれらの遺伝子が発現していなくてもグルコース応答性がある細胞ができている可能性もあることが示唆された。

#### 4.4: 細胞、細胞特異的遺伝子群におけるクラスタリング:

生体内における膵島細胞のシングルセル解析が報告された ([3],[4])。細胞特異的な遺伝子群やその他内分泌細胞に特異的に発現する遺伝子群を参考に細胞全体における

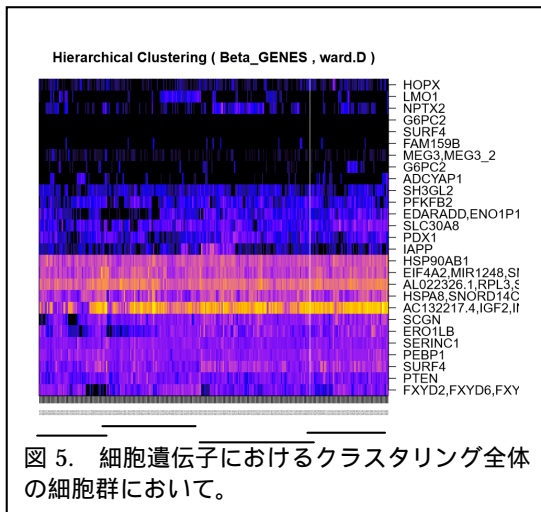


図 5. 細胞遺伝子におけるクラスタリング全体の細胞群において。

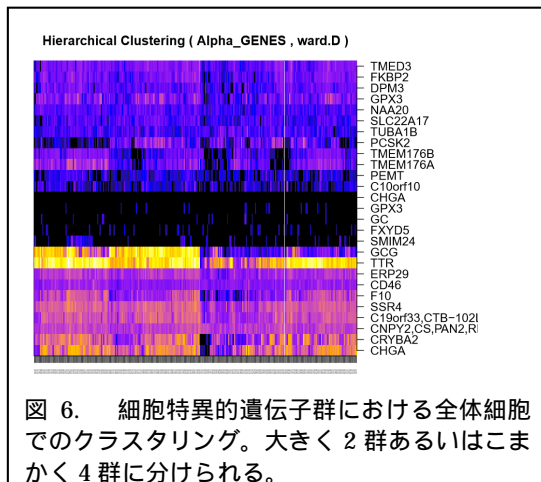


図 6. 細胞特異的遺伝子群における全体細胞でのクラスタリング。大きく 2 群あるいはこまかく 4 群に分けられる。

Heatmap クラスタリングを行った。細胞特

異的遺伝子における全体の細胞のクラスタリングでは主に 4 群に分けられるようにも見える (図 5)。INS の発現の高い方向に向かいその他の遺伝子も発現が高くなっている。また細胞特異的遺伝子群においては大きく 2 つないし 4 群に分けられると思われた (図 6)。

細胞においては GCG と TTR で強共発現している細胞群において全体的に様の遺伝子群の発現が高いことからこれらの群は細胞に近いと思われる。細胞特異的遺伝子群においては SST の発現を高値に従い 2 群に分けられると思われるが、その他の遺伝子につ

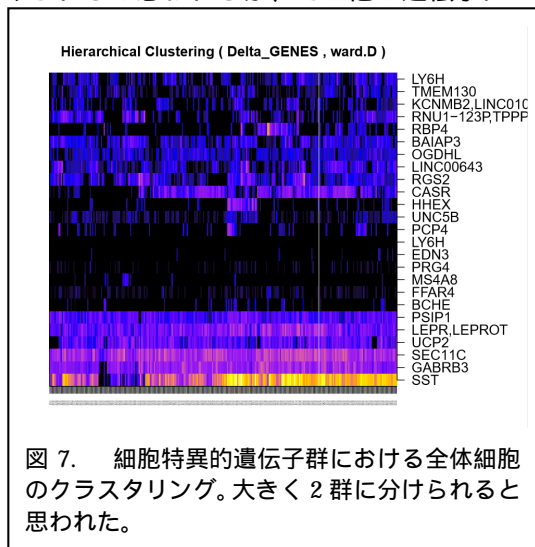


図 7. 細胞特異的遺伝子群における全体細胞のクラスタリング。大きく 2 群に分けられると思われた。

いてさほど分布が分かれてはいない (図 7)。細胞全体において細胞や細胞特異的な遺伝子群が全体的に発現している。すなわち細胞特異的あるいは特異的遺伝子群が同時に発現している細胞群であることが分かる。一方で細胞においては SST 以外は発現量としては低いことから最終分化細胞群は細胞および細胞に似た細胞群であることが示唆された。

5. 結語: 本研究では蛍光ラベル hiPS 細胞から機能的な細胞へと分化を進め、最終分化における細胞群のシングルセル解析を行った。INS の下流に Venus, NGN3 の下流に mCherry をノックインしている hiPS (hIveNry) を樹立しており、最終分化時には Venus の蛍光、mCherry の蛍光そして Venus と mCherry が発現するダブルポジティブ細胞で構成される。そのほかにも蛍光が発現しない群も存在するが、本研究では蛍光陽性細胞群におけるシングルセル解析を行った。また細胞の機能としてグルコース応答性があることを確認した細胞群である。Venus ソート細胞群とダブルポジティブ細胞群との間にはさほど差は見られない。同じ用に INS を強く発現し、と同時に GCG も発現している。一見するとポリホルモンであるが、これらの細胞のみをソートしてもグルコース応答性があるとの結果も一部得られている。したがって、その中には成熟な細胞がいると思われ

る。一方で mCherry 陽性細胞群では INS 発現細胞、GCG 単独の細胞などや様々な細胞群の集団であり Heterogeneity に富んでいる群でもある。全体的に INS が強く発現している細胞集団であるが同時に GCG や SST も強く発現している。ポリホルモンの状態である細胞が細胞の大半を占めている。しかし、これらの中に機能を有する細胞が存在しうる。細胞への分化過程において現在の提唱ではポリホルモンの方向に行くものと成熟細胞になるものは別の方向であると提唱されている。しかしそれが確かなのかは不明である。生体内においてもポリホルモンのような細胞は存在し、また分化した細胞が脱分化することなども知られている。したがって、ポリホルモンは分化途中のものなのか、分化しきれなかった副産物なのかあるいは脱分化したものののかなどの由来は不明である。

本細胞を用いた解析においては 細胞へ分化した細胞は In-vitro ではグルコース応答性のある細胞であることから INS-GCG が発現していたとしてもその他の重要な遺伝子の発現によりわずかであっても機能を有する細胞になりえるのではないかと思われた。

hiPS 細胞からの 細胞への分化は一様に INS を高発現しておりインスリン分泌能もこれまでの分化方法に比べると高いことは確かな結果であるが個々の細胞はかなり差がある細胞集団であることが分かった。今回の結果からはどの細胞が実際に機能的であるかの特定には至らなかった。今後どのような遺伝子が実際に機能にかかわっているのかなどの解析を進める必要がある。

#### Reference

1. KA, D.A., et al., - *Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic*. - Nat Biotechnol. 2006 Nov;24(11):1392-401. doi: 10.1038/nbt1259. Epub 2006 Oct 19., (- 1087-0156 (Print)): p. - 1392-401.
2. Yamashita-Sugahara, Y., et al., *An inhibitor of fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) promotes late-stage terminal differentiation from NGN3+ pancreatic endocrine progenitors*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 35908.
3. Segerstolpe, A., et al., *Single-Cell*

*Transcriptome Profiling of Human Pancreatic Islets in Health and Type 2 Diabetes*. Cell Metab, 2016. **24**(4): p. 593-607.

4. Wang, Y.J., et al., *Single-Cell Mass Cytometry Analysis of the Human Endocrine Pancreas*. Cell Metab, 2016. **24**(4): p. 616-626.

#### 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1件)

- 1: Yamashita-Sugahara Y., Matsumoto M, Ohtaka M, Nishimura K, Nakanishi M, Mitani K, Okazaki Y. An inhibitor of fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) promotes late-stage terminal differentiation from NGN3+ pancreatic endocrine progenitors. Sci Rep. 2016 Oct 27;6:35908. doi: 10.1038/srep35908. PubMed PMID:27786288; PubMed Central PMCID: PMC5081516.

[学会発表](計3件)

1. Yamashita-Sugahara Y., Matsumoto, M., Ohtaka M., Nishimura K., Nakanishi M., Mitani K. and Okazaki Y. Miami Winter Symposium 2017, Diabetes; Today's Research Tomorrows Therapies. "An inhibitor of fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) promotes late-stage terminal differentiation from NGN3+ pancreatic endocrine progenitors"
2. 菅原泉,松本征仁,大高真奈美,西村健,中西真人,三谷幸之介,岡崎康司  
第16回日本再生医療学会総会  
ポスター8「消化管・肝臓・膵臓」  
抄録登録番号: 10605  
演題名: FGFR1 阻害剤は膵内分泌前駆細胞(NGN3+)から内分泌細胞への分化を促進する
3. Yuzumi Yamashita-Sugahara, Ryo Matsumura, Tatsuya Sato, Tomoko Matsutani, Yutaka Nakachi, Emi Aizawa, Yuzuru Iwanaga, Masahito Matsumoto, Kohnosuke Mitani, Yasushi Okazaki  
第14回RCGMフロンティア国際シンポジウム 2016年11月11-12日 日高市 埼玉医科大学 "Screening of chemical promoting differentiation using

double fluorescence-labeled hiPSCs  
(hIveNry)”

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅原泉 (Izumi Sugahara)  
国立国際医療研究開発法人国立国際医療  
研究センター, その他部局等, 研究員  
研究者番号: 10633000

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

岡崎康司 (Yasushi, Okazaki)  
埼玉医科大学, 医学部, 客員教授  
順天堂大学, 医学(系)研究科 (研究院)  
教授  
研究者番号: 80280733

松本征仁 (Matsumoto, Masahito)  
埼玉医科大学, 医学部, 客員講師  
順天堂大学, 医学(系)研究科 (研究院), 准  
教授

研究者番号: 90321819

仲地豊 (Yutaka, Nakachi)  
埼玉医科大学, 医学部, 助教  
研究者番号: 10522097

渡邊亜美 (Ami, Watanabe)  
東京大学, 定量生命科学研究所, 特任研究員  
研究者番号: 40611421

二階堂愛 (Itoshi, Nikaido)  
国立研究開発法人理化学研究所, 生命機能  
科学研究センター, ユニットリーダー  
研究者番号: 00383290