

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21006

研究課題名(和文) 膵内分泌前駆細胞を用いたヒトiPS膵島の効率的分化誘導法開発

研究課題名(英文) Differentiation of functional islets from human iPS cells and hiPS-endocrine progenitor cells in vitro.

研究代表者

渡邊 亜美 (Watanabe, Ami)

東京大学・定量生命科学研究所・特任研究員

研究者番号：40611421

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)：本研究では、当研究室で樹立した三次元膵島形成系において、ヒト膵島前駆細胞から膵島様構造形成に至るまでのメカニズムを理解し、これを応用して生体外で高効率かつ大量に膵島を作成する系を確立することを目的として研究を行ってきた。膵島の分化過程を検討した結果、膵島の種となる内分泌前駆細胞を分取可能にする後期内分泌前駆細胞マーカーCD82の特定に成功し、さらにこれを膵島に成熟させる系を作成した。またこのマーカー遺伝子が膵細胞の機能成熟に関わる可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵島移植は一型糖尿病の根本的な治療法になりうる可能性があるが、絶対的なドナー不足がこの普及を妨げている。ドナーに依存しない膵島の供給源として、多能性幹細胞からの膵細胞の分化誘導方法が研究されている。しかし、現状では分化誘導効率が低く、未分化細胞の混入などの安全性の問題、およびコストの問題などを抱える。本成果を応用することで、分化誘導効率を向上させ、細胞の安全性を高めることが期待できる。

研究成果の概要(英文)： To identify pancreatic endocrine progenitor cell markers, we performed microarray analysis of iPS cell-derived pancreatic endocrine progenitor cells. As a result, we discovered a new cell surface marker CD82 for endocrine progenitor cells. iPS-derived pancreatic progenitor cells were isolated from endocrine progenitor cells and found to efficiently generate cells that secrete insulin. Furthermore, this gene was also expressed in mature pancreatic islets. Marker-positive cells isolated from mature human islets showed a strong ability to secrete insulin and expressed mature beta cell markers such as Ucn3. We also found that suppression of this gene with siRNA inhibited the maturation of insulin-secreting pancreatic beta cells. This study indicates that the expression of this marker gene plays an important role in the maturation of pancreatic endocrine cells, especially pancreatic beta cells, and provides new insights into understanding the development of the pancreas.

研究分野：再生医療

キーワード：iPS 膵島

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、インスリン依存性重症糖尿病への移植治療に供する目的で、ヒト iPS/ES 細胞からインスリン分泌細胞の膵細胞を作る試みが国内外で行われている。本方法は膵島移植のドナー不足を解決しうる有効な手段であると考えられるが、これまでに報告された分化誘導法は以下の様な解決すべき多くの問題を抱えている。

- 1) 既報の ES/iPS-細胞は生体膵島と比較するとグルコース濃度応答性インスリン分泌能が低く in vitro における成熟分化が不十分である。
- 2) 未分化細胞混入を除外する方法がない。
- 3) 多段階、かつ長期間の培養に多大なコストがかかる。

申請者の所属する研究室では、マウス胎児膵細胞より in vitro で膵島を作製する実験から得た知見を元に、マウス iPS 細胞から糖尿病マウスの血糖値改善機能を持つ膵島様構造を作る事に成功している。(Saito et al. PLoS One 2011)。これをヒト iPS にそのまま応用しても膵島はできなかった。そこで申請者は、種々の検討を重ねて、ヒト iPS 細胞から膵島を誘導することに成功した。

しかし誘導効率の安定性が低いこと、1ヶ月程度の時間を要する事、生産コストが高いことなど、解決すべき問題もある。これらを解決する事で医療応用に大きく近づくと考えられる。

申請者は問題解決のために、膵島の種となる膵島前駆細胞の特定と、これを膵島にする系の構築、膵島前駆細胞を無尽蔵に増やす系の作成が有効であると考えた。研究開始時までに、機能的細胞に分化可能な前駆細胞集団の濃縮に成功しているため、確実に膵島に分化する膵島前駆細胞の特徴が特定でき、かつ分化が可能となれば、効率的な膵島形成法の構築が可能となる。また、膵島前駆細胞の維持増殖が可能になれば、時間の短縮と共に大幅なコスト削減がはかれる。

2. 研究の目的

膵島前駆細胞の分離を行い、これを確実に生体外で膵島に分化誘導する系を確立するために以下の実験に取り組む。

- (1) ヒト iPS 細胞由来膵島分化誘導系からの膵島前駆細胞の分離と成熟培養系の開発
 - 膵島前駆細胞を分離可能な膜タンパク質の探索
 - 膵島前駆細胞からの膵島形成過程の解析
 - 膵島前駆細胞からの膵島形成培養系の最適化
 - (2) iPS 膵島大量培養法の開発
- 自己増殖可能な膵島前駆細胞の分取、維持培養系の確立と大量培養法への応用

3. 研究の方法

申請者が新たに本研究課題で明らかにすべき課題は1) 本誘導系における NGN3 発現細胞に含まれる膵島前駆細胞の特徴を詳細に解析することで、特殊な iPS 細胞を用いずとも膵島前駆細胞を分離可能とすること 2) この細胞を無尽蔵に増殖させ、膵島に分化させる至適な成熟培養系の開発を行うことである。このことから以下の実験を行った。

(1) 膵島前駆細胞を分離可能な膜タンパクの探索

内分泌前駆細胞マーカー (NGN3) と、内分泌細胞マーカー (インスリン) の発現を検出可能な蛍光レポーターを組み込んだヒト iPS 細胞を内分泌前駆細胞ステップまで誘導した後、NGN3 発現を指標としてセルソートを行う。しかし、NGN3 陽性細胞は均一な集団でなく、大きさや遺伝子発現量などで幾つかの分画に分かれる。このうち内分泌細胞(、、細胞、特に細胞)になる細胞を特定する為、iPS 細胞を内分泌前駆細胞まで分化誘導したのち、細胞を NGN3、インスリン発現量、FSC, SSC 等でいくつかの分画にわけてソートする。その後分化誘導することで特に成熟細胞に効率良く分化する細胞分画を絞りこむ。この分画の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ、あるいは RNAseq で解析し、特に細胞膜タンパク質関連で特徴的な発現変動を示す遺伝子を同定する。候補膜タンパク質を検出可能な抗体を入手あるいは作製して、目的的分画を分取可能な抗体の組み合わせを検討する。また分取した細胞が膵内分泌細胞へ成熟培養可能かを検討する。

(2) 膵島前駆細胞の分化過程の解析

- ・ 申請者はこれまでに、分化誘導過程において NGN3 発現細胞同士が自発的に集合塊を形成したのち、、細胞等に分化することを示唆する結果を得ている。しかし細胞が成熟分化する過程の詳細は不明である。そこで、NGN3 陽性細胞集団、あるいは a) で得られたマーカーを用いて分離した細胞が集合塊を形成し、成熟する様子をタイムラプスで観察する。
- ・ 前述のように、内分泌前駆細胞が集合後に成熟分化する様子が認められることから、申請者は、細胞への運命決定スイッチを切り替えるうえで細胞間の接触が重要である可能性が

高いと考えている。この仮説を検証する為に、内分泌前駆細胞同士の接触阻害条件下で各種内分泌細胞への分化が可能か検討する。接触が成熟に必須であった場合、細胞間の接触因子阻害実験、成熟培養時における細胞間接着関連遺伝子のなかに特徴的な発現を示すものがないか探索し、分化にどのような影響が認められるかを調べる。予想に反し前駆細胞が単独で成熟可能であった場合、単独培養条件下で特定の内分泌前駆細胞、特に細胞になりやすい条件を主に添加因子などの観点に絞り検討する。以上の実験を行う事で、分化過程を解析し、系最適化に必要なデータを揃える。

(3) 得られた知見を元に、膵島形成系を改良する。

見出した分離マーカーで前駆細胞を分取した上で、至適な膵島形成条件を検討する。シングルセルでの成熟培養が可能であった場合、各種内分泌細胞を単独で誘導、膵島様構造の形成を可能とする培養系を開発する。特に細胞、細胞等各種内分泌細胞の存在割合が細胞の機能に重要であると考えられるため、細胞からのインスリン分泌が最大になる細胞塊形成条件を見出す。細胞塊での成熟培養が必須である場合は、細胞播種密度、培養形態等を変更し、至適な培養条件を検討する。以上の知見を統合し、浮遊培養での大量成熟培養系の構築を行う。

(4) iPS 膵島大量培養法の開発

自己複製可能な膵島前駆細胞の分取、維持培養系の確立と大量培養法への応用

膵島を効率的、かつ大量に得る為に、自己複製する膵島前駆細胞を大量に培養する系を開発する。最近、マウス間葉系細胞をフィーダーとして用いて付着培養条件下で膵内分泌前駆細胞を増殖させる系が報告された (Sneddon et al. Nature 2012)。この膵島前駆細胞は申請者が見出した Ngn3 陽性細胞を含む細胞に非常に類似しているため、NGN3 陽性細胞をマウス、ヒト間葉系細胞と共培養することで維持増殖可能か検討する。

また、増殖フィーダーによる維持培養が不可能だった場合に備え、内分泌前駆細胞に遺伝子導入等を行う事で不死化を試みる。内分泌前駆細胞に、レンチウイルスを用いて hTERT 等の不死化遺伝子を導入することで株化が可能かを検討する。内分泌前駆細胞での増殖維持が困難である場合、遺伝子導入する分化誘導段階を変更し、維持が可能な段階を検討する。上記の知見を元に、大量培養したヒト iPS 細胞由来の膵島前駆細胞から膵島への分化誘導を実施する。

4. 研究成果

(1) 膵島前駆細胞を分離可能な膜タンパクの探索

内分泌前駆細胞マーカーヒト iPS 細胞を内分泌前駆細胞ステップまで誘導した後、NGN3 発現強度を指標としてセルソートを行った。Ngn3 強陽性、弱陽性、陰性の分画を分取し、遺伝子発現解析を行うと、Ngn3 強陽性細胞分画に内分泌前駆細胞マーカーを強く発現する細胞が濃縮されることがわかった(図 1)。またこれらの細胞の分化誘導を行うと、Ngn3 強陽性細胞が特に成熟細胞に効率良く分化することがわかった。次に、Ngn3 強陽性分画および弱陽性分画の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイで解析し、細胞膜タンパクで特徴的な発現変動を示す遺伝子を選定した。候補膜タンパク質を検出可能な抗体を入手し、Ngn3 強陽性分画に発現する新規候補膜タンパクを同定した。新規候補膜タンパク陽性細胞は内分泌前駆細胞マーカー遺伝子を強く発現し、純化したのち成熟培養を行うと膵内分泌細胞、特に膵細胞に効率よく分化することがわかった(図 2,3)。また、新規細胞膜マーカーはこれまで報告されている膵臓前駆細胞、および膵臓内分泌前駆細胞マーカー陽性細胞と異なる分画の細胞を分取可能であり、分取した細胞は既報のマーカー陽性細胞よりも効率よく膵細胞に分化することも明らかにした。

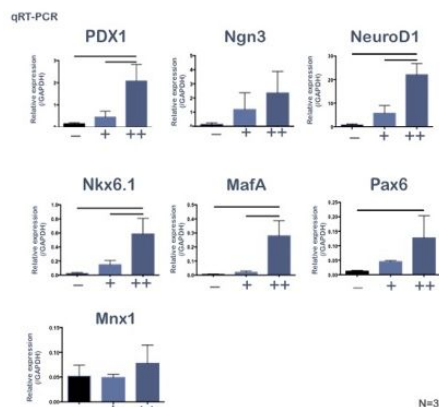


図 1 Ngn3 強度で分画した細胞の遺伝子発現解析

(2) 膵島前駆細胞の分化過程の解析

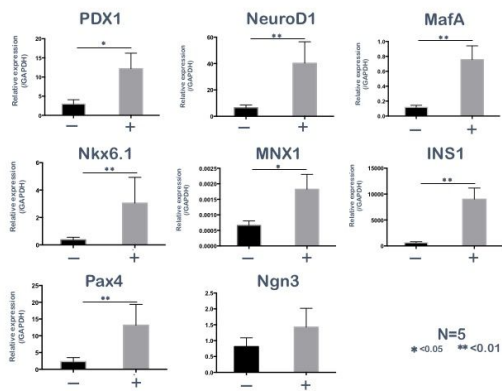
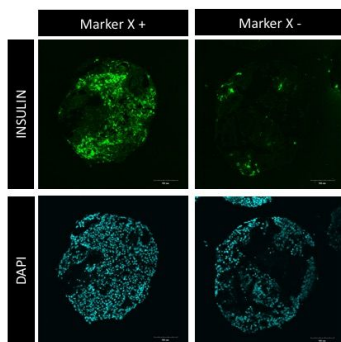


図2 新規マーカーで分画した細胞の遺伝子発現

NGN3 陽性細胞集団が集合塊を形成し、成熟する様子を経時的に観察した。Ngn3 陽性細胞を播種すると細胞が自発的に集合し、播種後 24 時間以内に密な構造の細胞塊を作成した。培養開始時にはインスリン分泌能を持たない細胞塊は成熟培養 5 日後以降にインスリン分泌能をもつことがわかった。また、内分泌前駆細胞の成熟に細胞間の接触が重要であるか調べるために、Ngn3 陽性細胞の single cell での分化誘導を行なった。Ngn3 強陽性細胞はほとんど増殖能をもたず、2 週間後も内分泌細胞への成熟を示す結果は得られなかった。当初の予想通り、内分泌前駆細胞の成熟には複数の細胞が接触することが必要であると考えられる。

(3) 膵島形成培養系の効率化



本研究で得られた知見を元に、Ngn3 強陽性細胞および新規細胞膜マーカー陽性細胞の効率的な分化誘導法を検討した。従来法ではフィーダー細胞にこれらの細胞を播種し、細胞塊化させていたが、培地組成を検討した結果、フィーダーフリーでの成熟培養が可能になった。また大量培養への応用を想定して、

図3 新規マーカー由来細胞塊

震盪培養条件下での成熟培養方法を検討した。その結果、2ml の 6 well plate に 1×10^6 cell の播種密度で培養すると、効率的に細胞塊を作成可能であることがわかった。本方法は培養機材を変更することによってスケールアップも可

能である。この結果は、膵島形成培養系を大量培養に応用する上で重要な知見である。

(4) iPS 膵島大量培養法の開発

Ngn3 陽性細胞、および新規マーカー陽性細胞の維持培養系の確立を試みた。しかしこれらの細胞は増殖能をほとんどもたないが、非常に弱いことがわかった。この結果は間葉系細胞をフィーダー細胞として用いた場合も同様であった。そこでレンチウイルスベクターを用いた外来性の増殖因子の導入による細胞増殖を試みた。hTERT 等の不死化遺伝子を導入した結果、これらの細胞がある程度内分泌前駆細胞マーカー遺伝子の発現を維持したまま増殖能を得ることを確認した。増殖後の細胞を内分泌細胞に分化誘導すると、インスリン分泌能を持つことも確認できた。しかし継代数が進むにつれ、内分泌前駆細胞マーカーの発現が徐々に弱まることも確認した。この問題を解決するために、現在維持培養系の改良を行なっている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

渡邊亜美, 田中杏奈, 山下-菅原泉, 宮島篤
ヒト iPS 細胞由来膵内分泌前駆細胞に発現する細胞膜タンパクの機能解析
第 18 回日本再生医療学会総会 2019

田中杏奈、渡邊亜美、山下-菅原泉、宮島篤
iPS細胞由来膵細胞の大量培養に向けた膵前駆細胞の増幅法の開発
第18回日本再生医療学会総会 2018

田中杏奈、渡邊亜美、山下-菅原泉、宮島篤
iPS細胞由来膵細胞の大量調製に向けた膵前駆細胞の性状解析と増幅法の開発
第91回日本生化学大会 2018

Ami Watanabe, Anna Tanaka, Atsushi Miyajima
Differentiation of functional islets from human iPS derived endocrine progenitor cells.
ISSCR Annual Meeting 2018

渡邊亜美、田中杏奈、宮島篤
ヒト iPS細胞由来膵内分泌前駆細胞の純化と機能解析
第17回日本再生医療学会 2018

Ami Watanabe, Anna Tanaka, Hiroyuki Otsubo, Masahiro Ohta, Yzumi Yamashita-Sugahara,
Kohnosuke Mitani, Mahito Nakanishi, Yasushi Okazaki, Atsushi Miyajima
Differentiation of functional islets from human iPS cells and hiPS-endocrine progenitor
cells in vitro.
ISSCR 2016

渡邊亜美、田中杏奈、大坪寛之、太田正広、山下-菅原泉、三谷幸之介、中西真人、岡崎 康
司、宮島篤
ヒト iPS細胞由来の膵内分泌前駆細胞を用いた機能的膵島分化誘導系の開発
第16回日本再生医療学会総会 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。