

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19915

研究課題名(和文) 膵島細胞マスプロダクション技術の開発

研究課題名(英文) Development of mass production technology for pancreatic islet cells

研究代表者

長谷川 光一 (Hasegawa, Kouichi)

京都大学・高等研究院・特定拠点講師

研究者番号：50378890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性膵炎や 1 型糖尿病、膵癌組織の切除等による膵組織の障害の治療に向けて、高品質(均一性と機能性)な膵島細胞を一度に大量に産生するための技術革新が望まれています。本研究では、ヒト ES/iPS 細胞からの高品質膵島細胞の大量産生法を目指して、ヒト膵臓発生や分化誘導をモニター可能な新規抗体の作製と、膵島細胞の分化や成熟もモニター可能なインスリンプロモーター下に GFP を挿入したレポーター細胞株を作製しました。これらを用いて、ジェランガムやメチルセルロースなどのポリマーを使用した 3 次元培養法に膵島細胞分化誘導を最適化することに成功しました。現在は、この系の拡大と閉鎖系への移行に取り組んでいます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ラボレベルと実用レベルのギャップを埋めるハイデマンドの挑戦的・探索的橋渡し研究です。本研究で得られた膵島細胞の 3 次元スフェア誘導法がさらに発展し、均一なヒト ES/iPS 細胞由来の膵島細胞が閉鎖系で大量に産生可能となれば、膵島移植治療が加速できると予測されます。

研究成果の概要(英文)：In order to treat pancreatic tissue disorders such as chronic pancreatitis, type 1 diabetes, and excision of pancreatic cancer tissue, production of large amounts of high-quality (homogeneous and functional) islet cells is highly desired. In this study, we challenged technological innovation for mass production of high-quality islet cells from human ES / iPS cells. We have developed a novel antibody capable of monitoring human pancreas development in embryos and induction from human ES/iPS cells. We have also established a reporter human ES cell line in which GFP was inserted under the insulin promoter so that differentiation and maturation of pancreatic islet cells could be monitored. Using these monitoring tool, we succeeded in optimizing islet differentiation in our three-dimensional culture system using polymers such as gellan gum and methyl cellulose. We are further working on expanding this system and transferring to a closed culture system.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：膵島細胞 分化誘導 多能性幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性膵炎や I 型糖尿病、膵癌組織の切除等で膵組織に障害が起こると非可逆性であり、殆どの場合は対処療法のみが行われています。そのうち最も有効な治療法は、膵移植もしくは膵島移植とされています。しかし、移植治療が可能なドナーの数は圧倒的に不足しているうえに、移植を受けても数年で再度移植が必要となるケースが多いため、ドナーに非依存の膵島細胞供給源が求められています。そこで、無限に増殖可能で、膵島細胞を誘導可能なヒト多能性幹細胞(ヒト ES 細胞や iPS 細胞)を膵島細胞の供給源として移植治療に用いることが期待されています。しかし現状では、ヒト ES/iPS 細胞から誘導した膵島細胞の機能は一定せず、移植に十分な量の細胞の産生も難しいため、ドナー由来細胞の移植ほどの治療効果は難しいと予測されています。このため、ヒト ES/iPS 細胞から高品質(均一性と機能性)な膵島細胞を一度に大量に産生するための技術革新が望まれています。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト ES/iPS 細胞からの均一な品質の膵島細胞の大量分化・産生(マスコプロダクション)法の開発・技術革新に挑戦しました。具体的には、膵前駆細胞に特異的な糖鎖マーカー抗体やインスリン発現レポーター細胞を作製し、ヒト多能性幹細胞からの膵島分化過程とヒト膵発生との詳細な比較解析による分化誘導の最適化し、私どもが開発した簡便で均一なヒト多能性幹細胞を大量培養可能な閉鎖系 3 次元スフェア浮遊培養法と組み合わせることを目的としました。

3. 研究の方法

- (1) ヒト膵臓発生をモニター可能な新規の細胞表面マーカーの同定ならびにその抗体の作製(研究協力者)
- (2) ヒト多能性幹細胞からの膵島誘導におけるマーカーの発現確認
- (3) 既存の膵島分化誘導方法と我々が開発した 3 次元スフェア浮遊培養法を組み合わせ、(1)のマーカーや他のマーカーを用いて分化誘導方法を最適化
- (4) インスリン発現をライブ観察可能なインスリンプロモーター下にレポーター GFP を挿入した遺伝子を導入したヒト ES 細胞株と iPS 細胞株を作製
- (5) (3)で開発した 3 次元スフェア浮遊膵島分化誘導法と(4)で開発したインスリンレポーター細胞株を用いて、均一で成熟した膵島細胞の産生方法の探索

4. 研究成果

- (1) ヒト膵臓発生をモニター可能な新規の細胞表面マーカーの同定
研究協力者の Farley 博士と Pera 教授らと共に、先行研究で得ていた GCTM-5 抗体と膵臓前駆細胞に類似した特徴を持つ膵癌細胞株を利用して、新規のモノクローナル抗体 ENPRO1 を得ました。この抗体は Sialyl Lewis A 抗原複体の一種を認識し、ヒト胎児期の膵臓で SOX9 陽性の膵臓原基細胞の表面を認識し、その後の膵臓発生では膵管前駆細胞に発現することを見出しました。このことにより、膵臓発生初期ならびに膵管発生をモニターできるマーカーとして使用可能なことを見出しました。本結果は、膵臓における ENPRO1 ならびに GCTM-5 抗原の発現解析と共に論文発表しました(文献 1)。

- (2) ヒト多能性幹細胞からの膵島誘導におけるマーカーの発現確認
ヒト ES 細胞ならびに iPS 細胞を既存の膵島細胞誘導方法(文献 2)で分化誘導し、各種マーカーの発現を調べたところ、予想通り Sialyl Lewis A 抗原複体は SOX9 陽性、FOXA2 陽性、PDX 1 陽性の膵臓前駆細胞から内分泌前駆細胞の初期まで発現し、グルカゴンやインスリンが発現する膵島細胞ではその発現が消失することが分かりました。

- (3) 膵島分化誘導における 3 次元スフェア浮遊培養法の最適化
上記の膵島分化誘導法と我々が開発したメチルセルロースによる 2 次元ならびにメチルセルロースとゼランガムポリマーによる 3 次元浮遊スフェア培養法(文献 3)を組み合わせることで分化誘導の最適化を行いました。最初にヒト ES 細胞を用い 2 次元スフェア培養法によって膵島分化誘導法の最適化を試みましたが、メチルセルロースのみではスフェア同士の融合を抑えきれず、大小様々な大きさの非均一なスフェアとなってしまった(図 1)。これらのスフェアのうち、生体内の膵臓と同じかそれより少し大きいくらいの直径 300 μm 程度までの小さなスフェアでは分泌 β 細胞を示すインスリン(C ペプチド)や α 細胞を示すグルカゴンを発現する膵島の内分泌細胞の誘導が認められたものの、大きなスフェアでは未だ膵臓前駆細胞の PDX1 や NKX6.1 が発現している膵臓前駆細胞や未熟な内分泌細胞であり均一な分化誘導は難しいことが分かりました(図 2)。一方で 3 次元スフェア浮遊培養では均

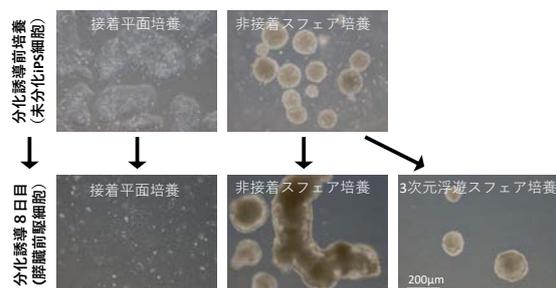


図 1. 各培養条件でのコロニー/スフェアの形態

一な大きさのスフェアが得られたので、3次元スフェア浮遊培養で膵島細胞誘導法の条件検討に使用することとしました。

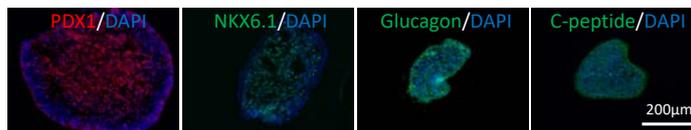


図2. 分化誘導 35 日目でのスフェアの大きさとマーカー発現

分化誘導を開始する際のスフェアのサイズやサイズに合わせたポリマーの濃度、各分化誘導ステップの化合物や成長因子の濃度や処理期間などを変化させ、各マーカー分子や遺伝子の発現をモニターすることで最適化を行いました。

その際、Sialyl Lewis A 抗原複合体に対する抗体を用いてライブセル観察での条件の絞り込みを期待していたのですが、Sialyl Lewis A 抗原複合体を高く発現する条件では、スフェアは膵管様に伸長しながら運動し膵臓オルガノイドとしては良いモデルと考えられましたが、膵島への分化誘導効率が高くないことが分かったため、各分化誘導段階でのサンプリングによる通常の膵臓発生・膵島分化のマーカーによる最適条件の検討を行いました。これにより、分化誘導開始から膵前駆細胞までは効率よく分化誘導可能となり、殆どのスフェアで膵島の分泌細胞が認められる様になりました。しかし、それ以降の段階で成熟度や均一性が担保されないことがわかったため、これを効率よく最適化するためのツールを作製することとしました。

(4) インスリン発現をライブ観察可能な細胞株の作製

内分泌細胞の分化や成熟度をもライブセルでモニター可能とするため、インスリンプロモーター下にレポーターとなる GFP を挿入した遺伝子発現ベクターを作製し、それをヒト ES 細胞株と iPS 細胞株にそれぞれ導入した細胞株を複数株作製しました。それぞれの細胞株を膵島細胞に分化誘導し、GFP の蛍光とインスリン (C ペプチド) の免疫染色を比較することで、GFP 発現が正しくインスリン発現を示す細胞株を選別しました (図 3)。

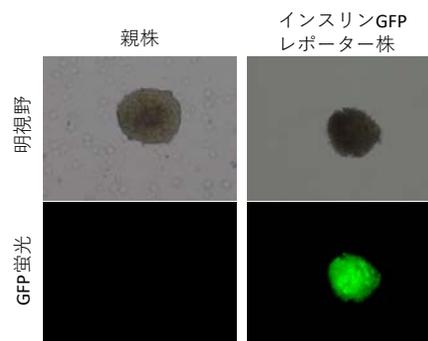


図3. 分化誘導 33 日目におけるレポーター ES 細胞株での GFP 発現

(5) 均一で成熟した膵島細胞の産生方法の探索

作製したレポーターラインを用いて3次元浮遊培養下での膵島分化ならびに分泌細胞の成熟化条件の探索を行いました。その結果、均一な大きさで、これまでの平面培養や2次元スフェア法に比べて、膵島細胞の成熟マーカー分子の発現も高い膵島スフェアを作製する方法の開発に成功しました (図 4)。

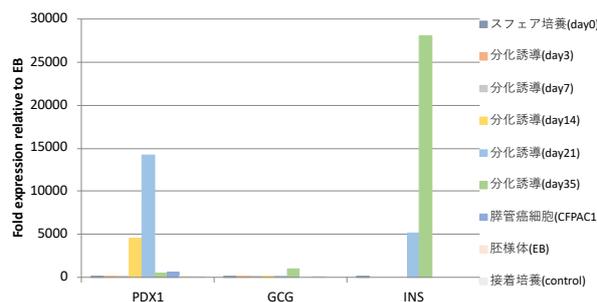


図4. スフェアでの誘導過程における前駆細胞マーカー (PDX1)、成熟マーカー(インスリン: INS、グルカゴン: GCG)の発現レベル(対胚葉対比)

<引用文献>

- ① Farley AM, Braxton DR, Li J, Trounson K, Sakar-Dey S, Nayer B, Ikeda T, Lau KX, Hardikar W, Hasegawa K, Pera MF “Antibodies to a CA 19-9 Related Antigen Complex Identify SOX9 Expressing Progenitor Cells in Human Foetal Pancreas and Pancreatic Adenocarcinoma” Scientific Reports, 2019. 9, Article number: 2876
- ② Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu JH, Peterson QP, Greiner D, Melton DA “Generation of functional human pancreatic β cells in vitro” Cell. 2014, 159(2):428-39
- ③ Otsuji TG, Bin J, Yoshimura A, Tomura M, Tateyama D, Minami I, Yoshikawa Y, Aiba K, Heuser JE, Nishino T, Hasegawa K, Nakatsuji N “A Novel 3D Sphere Culture System Containing Functional Polymers for Large-scale Human Pluripotent Stem Cell Production” Stem Cell Reports, 2014, 2(5) 734-745

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Farley AM, Braxton DR, Li J, Trounson K, Sakar-Dey S, Nayer B, Ikeda T, Lau KX, Hardikar W, Hasegawa K, Pera MF	4. 巻 9
2. 論文標題 Antibodies to a CA 19-9 Related Antigen Complex Identify SOX9 Expressing Progenitor Cells In Human Foetal Pancreas and Pancreatic Adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2876
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-38988-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	ペラ マーチン (Pera Martin F)	ジャクソンラボラトリー・Profesor	
研究協力者	ファーレイ アリソン (Farley Alison M)	メルボルン大学・1Department of Anatomy and Neuroscience・Researcher	