

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17968

研究課題名（和文）ヒトiPS由来膵 細胞シートを用いた1型糖尿病治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a treatment for type 1 diabetes using human iPS-derived pancreatic beta cell sheets

研究代表者

望月 翔太（Mochizuki, Shota）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90814799

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）： 現在世界で行われている膵島移植はドナー不足や複数回の移植を要し、再生医療が期待されている。iPS細胞やES細胞による細胞再生による研究は世界で行われてきているが、動物実験では移植された細胞が機能的に未熟であることも課題であった。今回は新たな移植方法の確立及び細胞の増殖能に着目し研究を遂行させた。

iPS細胞から膵前駆細胞を誘導し（細胞の分化誘導効率が低かったため）、さらに抗炎症反応や血管新生作用を要するとされる脂肪由来間質細胞との共培養シート（フィブリンゲルシート）を作製することに成功した。また膵島の増殖制御過程においてp53が増殖能に重要な因子である可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病や膵臓全摘術後の治療はインスリン投与が必須となっている。根治術として膵島移植は行われているが、ドナー不足により複数回の移植が必要となるなど課題も多い。膵島の再生医療及び移植方法の確立は今後の1型糖尿病の完治治療となる可能性がある。今後更なる研究により臨床に応用されることを願っている。

研究成果の概要（英文）： The islet transplantation currently performed in the world requires multiple transplants due to the shortage of donors, and regenerative medicine is expected.  $\beta$ -cell regeneration using iPS cells and ES cells has been studied worldwide, but the functional immaturity of transplanted  $\beta$ -cells in animal experiments has been an issue. In this study, we focused on the establishment of a new transplantation method and the proliferative ability of  $\beta$  cells.

They induced pancreatic progenitor cells from iPS cells (because the induction efficiency of cell differentiation was low) and succeeded in producing a co-culture sheet (fibrin gel sheet) with adipose-derived stromal cells, which are considered to be necessary for anti-inflammatory reactions and angiogenesis. p53 may be an important factor for the proliferative ability of pancreatic islets during their maturation process.

研究分野：糖尿病代謝内科

キーワード：iPS細胞 再生医療 p53 増殖能 膵島 脂肪由来間質細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界で糖尿病の患者数は増加の一途を辿っており、2017年時点で4億2500万人に上り今後も増加すると予測され医療費も多額になる(WHO(世界保健機構))。その中で1型糖尿病は国内で毎年8万6000人が発症しており、発症数は毎年3%ずつ増加している。1型糖尿病の病態としては特発性、ウイルス感染、自己免疫により膵細胞の破壊が起こりインスリン分泌の障害により高血糖をきたしてしまう。そのため、現時点では生涯インスリンによる治療が必要とされる。その他の治療として、膵島移植、膵臓移植も行われているが、免疫抑制剤の使用や長期的効果の減弱のため数回の移植が必要であり、ドナー不足など問題は多く存在する。また近年、ES細胞、iPS細胞といった多能性幹細胞を用いた膵細胞の再生医療研究は世界で多く行われているが、分化誘導された細胞は機能的に未熟なことが多く、また治療効果を示すための細胞数や移植方法など課題が多いのが現状である。そこで、本研究では膵細胞の成熟過程の解明を行い、それを用いて多能性幹細胞から分化誘導した細胞の機能的成熟に繋がる研究を行うこととした。

### 2. 研究の目的

1型糖尿病の主たる要因は膵細胞の不可逆的な喪失である。細胞の補充療法は、その根本治療として期待されており、多能性幹細胞由来膵細胞を用いた再生医療開発が世界的に行われている。しかし、依然その実用化には、多能性幹細胞由来細胞の生産方法や成熟化、移植方法など課題が多く存在する。東京女子医科大学では、独自の細胞シート技術を基盤に国内外の研究機関との共同研究を通し、すでに7つの疾患領域での再生医療の実用化に繋げている。また我々は最近独自の三次元浮遊攪拌培養技術を用いて、ヒトiPS細胞由来膵前駆細胞、膵細胞および膵外分泌細胞の量産化を可能にしている。

一方、細胞の成熟化と増殖能の喪失は相反する事象である。我々は、出生後のラット膵細胞の経時的な細胞増殖能の喪失を見出し、機能的成熟化の関係性を含め分子機序の解明を進めている。

そこで本研究では、(1)生体の膵細胞の増殖を制御する因子を明らかにし、(2)ヒトiPS細胞由来膵細胞の細胞シート移植による膵細胞補充治療の開発および移植用膵細胞の機能性向上を介した治療効果の向上にも繋げることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)膵細胞の増殖能の検証

我々は膵細胞の増殖プロセスに着目している。既報で膵細胞が出生後経時的に増殖能を失うとされており、細胞周期調整因子の解析を行い、制御機構についての研究を行う。そして、iPS細胞分化誘導後の膵細胞での細胞周期調整因子の発現を検証し、移植前後の膵細胞の成熟化のパラメーターとして活用する。

#### (2)iPS細胞由来膵細胞シートによる治療法の開発

現在1型糖尿病に対する根本治療として、近年多能性幹細胞からの細胞の再生医療が注目されている。しかし分化誘導後の細胞は、インスリン分泌量やグルコース応答性などの機能性が依然未熟であり、ヒトへの応用に際しては、相応の細胞数の確保と移植が必要となり、それに伴う腫瘍化リスクおよび移植方法など解決すべき課題も数多く存在する。本学では、独自の細胞シート技術により、細胞のみから成る組織の形成と移植によって再生医療を実現し、また最近独自

の大量培養技術によりヒト iPS 細胞由来膵 細胞の量産化も可能としており、その技術は国内外の製薬企業等にも活用されている。世界的には膵 細胞のみを移植する手法が多用されているが、膵臓の成熟化には組織内間質細胞の存在が不可欠であり、本研究では分化誘導後の膵 細胞を間葉系幹細胞等の間質細胞上で培養した細胞シートを移植する予定である。移植前には、間質細胞の共培養による膵 細胞の機能的成熟化についても検証する。また移植後の環境にも着目する。本研究では肝表面への細胞シート移植を予定しており、膵 細胞を含む細胞シートを直接肝表面に移植を行い、移植 細胞の機能性との関係性を明らかにする。これらの研究は、より効果的な膵 細胞移植法の確立に繋がるものである。

本研究では、iPS 細胞から膵 細胞の分化誘導方法として、Generation of Functional Human Pancreatic Cells In Vitro (Cell 159, 428–439, October 9, 2014) を参考に改良したプロトコルを用いて作製している。分化誘導した 細胞と間葉系幹細胞を共培養し、遠心して膵 細胞シートを作製し、研究に用いている。

#### 4 . 研究成果

##### (1)膵 細胞の増殖能の検証

ラット膵 細胞の増殖能評価として、細胞周期マーカーである Ki67 と分裂期マーカーであるリン酸化ヒストン H3 の染色及び成熟 細胞マーカーである PDX1 の共染色を行った ( 図 1 )。

結果として既報同様に、週齢が経つにつれて増殖能の低下を認めた ( 図 2 )。

次に細胞周期の制御に関与する因子として p21、p27、p53 に着目し、RT-PCR および Western Blot で解析行ったところ膵島で p 週齢に伴い 53 の有意な上昇を認めた ( 図 3 )。そこで、増殖抑制に p53 が関与していると仮説をたて、p53 の inhibitore である Pifithrin- を 6 週齢ラットに 2 週間投与し 8 週齢での増殖能に与える影響を検討した。その結果、Pifithrin- 投与群で Control 群 ( DMSO 投与 ) と比較し、増殖能を維持する結果が得られた。今回の結果より膵 細胞の増殖制御に p53 が関与している可能性が考えられた。元々、がん抑制遺伝子である p53 はアポトーシスの誘導に寄与し、がんに対する防御機構として作用することが知られている。成熟過程において、酸化ストレスや栄養状況の変化などを介して増殖抑制に p53 が関与した可能性が考えられた。本研究では酸化ストレスなどの解析に加え RNA シークエンス解析、single cell 解析に関して施行できておらず今後の課題である。

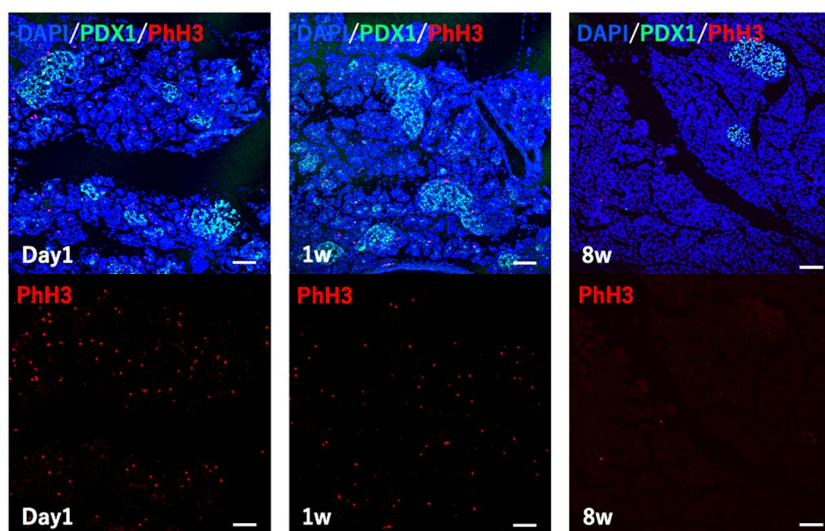


図 1 : リン酸化ヒストン H3 と PDX1 の共染色

分裂期(M期)に入っているβ細胞の割合

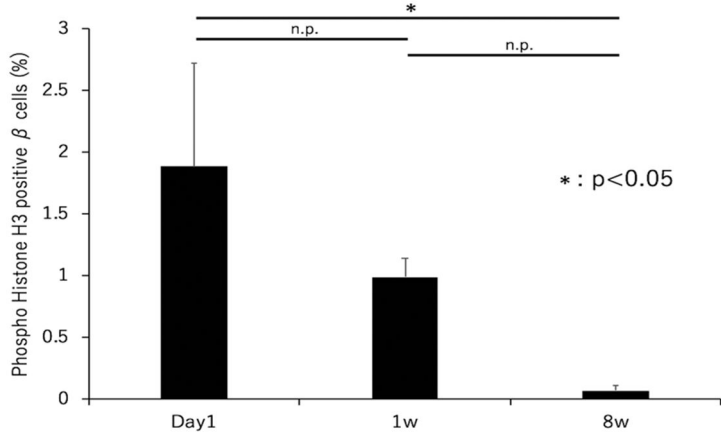


図2：リン酸化ヒストン H3 陽性/PDX1 陽性細胞割合の経時変化

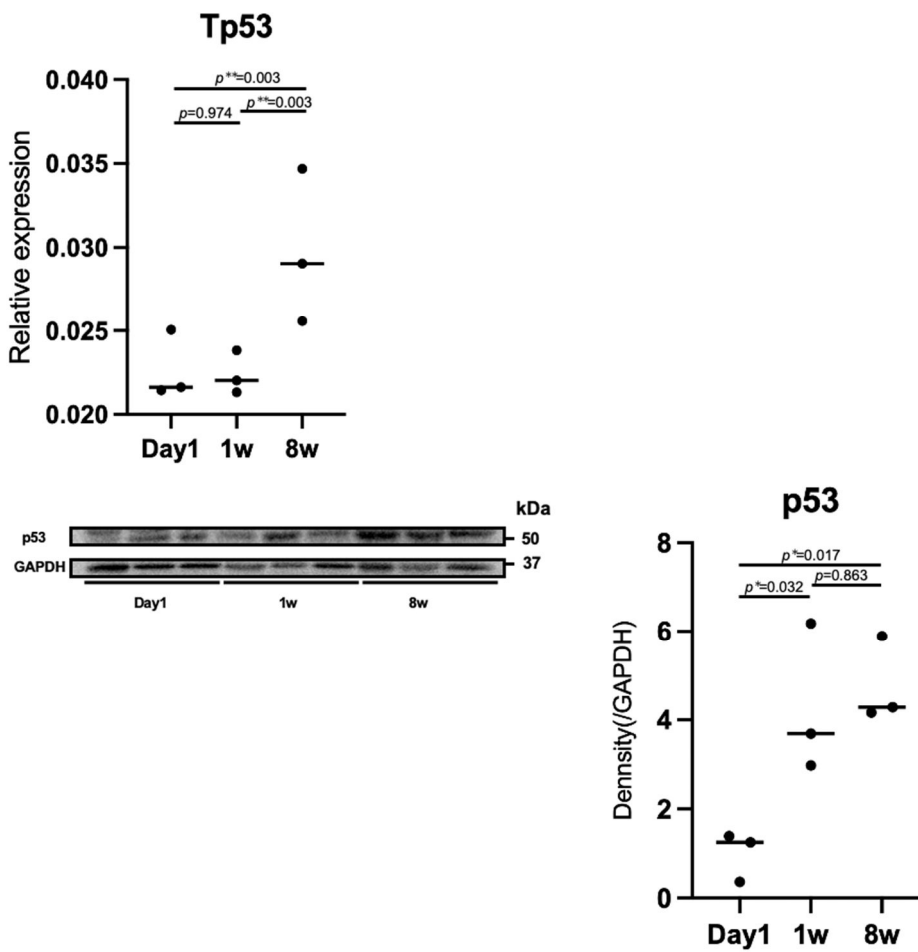


図3：膵島の RT-PCR と WesternBlot 解析

## (2) iPS 細胞由来膵 細胞シートによる治療法の開発

今回、iPS 細胞由来 細胞および脂肪由来間質細胞との共培養シートによる移植方法を確立した。iPS 細胞由来 細胞は分化誘導効率が低く、そのため膵前駆細胞までを誘導し、既報でもあるように生体での成熟を期待し移植を行った。iPS 細胞からの分化誘導効率として内分泌細胞分化に必要な PDX1 かつ NKX6.1 陽性細胞割合は 50%程度であった。脂肪由来間質細胞に関しては、ラットの鼠蹊部脂肪組織より採取した。

細胞シートにはフィブリンゲルを用いて、フィブリンゲルの上に iPS 細胞由来膵前駆細胞および脂肪由来間質細胞を共培養し、遠心技術を用いてシートを作製した(図 4)。1 型モデルラットを作製し、移植部位として肝臓表面に移植を行った(図 5)。今回は肝臓への生着は確認できたが、血糖改善効果までは認めなかった。今後移植する細胞数の検討や移植部位の検討も課題であり、引き続き研究を行う。

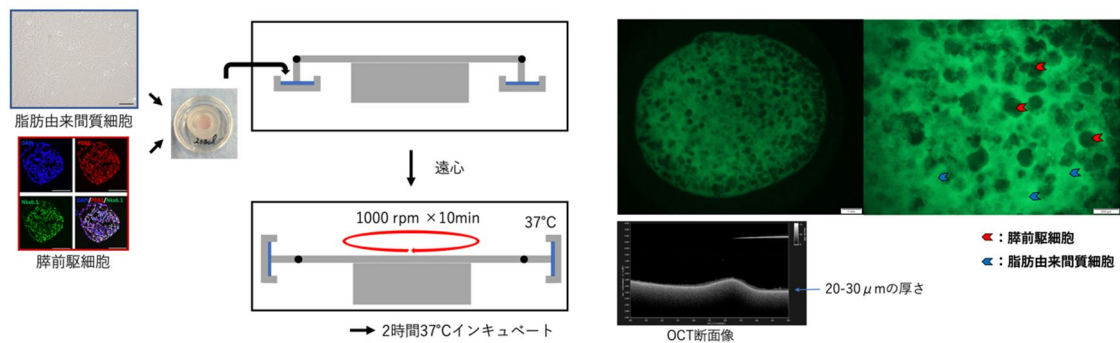


図 4 : iPS 細胞由来膵前駆細胞と脂肪由来間質細胞の遠心シート (フィブリンゲル上)

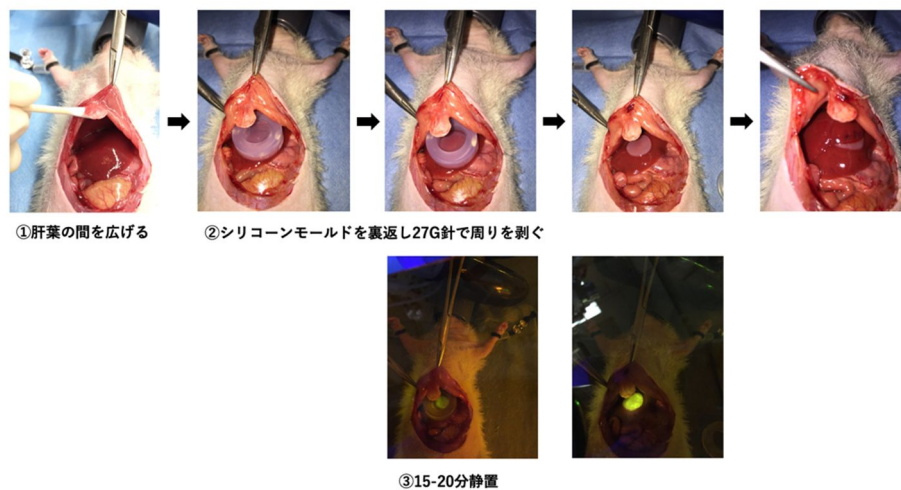


図 5 : iPS 細胞由来膵前駆細胞と脂肪由来間質細胞の遠心シートの肝臓表面移植

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Shota Mochizuki   | 4. 巻<br>6            |
| 2. 論文標題<br>Rat -Cells Lose Their Proliferative Ability After Birth Through p53 Upregulation | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Tokyo Women ' s Medical University Journal  | 6. 最初と最後の頁<br>91-100 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.24488/twmuj.2022008   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>望月翔太                                       |
| 2. 発表標題<br>遠心法を用いたiPS細胞由来膵前駆細胞と脂肪由来間質細胞の共培養 シート移植法の確立 |
| 3. 学会等名<br>第63回糖尿病年次学術集会                              |
| 4. 発表年<br>2020年                                       |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>望月翔太                                    |
| 2. 発表標題<br>iPS細胞由来膵前駆細胞とラット脂肪由来幹細胞の遠心共培養シートの移植法の確立 |
| 3. 学会等名<br>第19回日本先進糖尿病治療研究会・第17回1型糖尿病研究会           |
| 4. 発表年<br>2019年                                    |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|