

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 4 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22670

研究課題名(和文) ヒト正常神経内分泌細胞の不死化

研究課題名(英文) Immortalization of normal human neuroendocrine cells

研究代表者

清野 透 (Kiyono, Tohru)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・プロジェクトリーダー

研究者番号：10186356

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)：ホルモン産生細胞などの神経内分泌細胞は単離培養・不死化が難しく、細胞移植療法は実用化されていない。本研究では正常ヒト膵島細胞、ホルモン産生性下垂体腺腫細胞の培養法を最適化し変異CDK4, cyclin D1, TERTの3遺伝子の導入により不死化した。さらに、名大 須賀秀隆博士、佐藤好隆博士、高知大学 西山充博士の協力のもと、将来の細胞補充療法を目指し、正常ACTH産生細胞の不死化を計画した。conditionalに変異CDK4, cyclin D1を発現するiPS細胞3クローンをを用いて下垂体オルガノイドの作成し、分化誘導によりACTHの分泌がDox添加時に増加するクローンが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵島や下垂体などのペプチドホルモンを産生する神経内分泌系細胞を単離培養できれば、細胞移植療法による補充治療に直結する。しかし神経内分泌細胞の単離、培養、増幅は難しく、機能性神経内分泌細胞株はほとんどない。膵島細胞や、下垂体腺腫細胞に変異CDK4, cyclin D1, TERTの3遺伝子の導入により不死化することには成功したが、ホルモン産生能が低下していた。そこで、より実用化を促進するためiPS細胞から分化したホルモン産生細胞を増幅不死化する方法を考案した。iPS細胞から分化誘導した神経内分泌細胞の増幅・不死化法を確立できれば細胞移植療法による補充治療への実用化を促進することができる。

研究成果の概要(英文)：Among normal human cells, neuroendocrine cells are most difficult to cultivate and immortalize, and thus hormone replacement therapy by using hormone-producing cell transplantation has not been available. In this study, normal human pancreatic islet cells and hormone-producing pituitary adenoma cells have been cultivated and immortalized by transducing mutant CDK4, cyclin D1 and TERT. For the future hormone-producing cell transplant therapy, we planned to immortalize normal ACTH-producing cells. So far, three iPS cell clones transduced with a PiggyBAC vector conditionally expressing mutant CDK4 and cyclin D1 were established, and now are subjected to differentiation into pituitary organoid. Mutant CDK4 and cyclin D1 as well as mCheery are designed to be induced by doxycyclin, and their induction was confirmed upon dox treatment. A clone from which ACTH secretion was enhanced upon doxycyclin administration was obtained. Now we are trying to immortalize them by TERT transduction.

研究分野：ウイルス腫瘍学

キーワード：不死化 神経内分泌細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

様々なヒト正常細胞の単離培養・不死化に成功しており、正常分化能や機能を維持したまま不死化した細胞も多くある。その中には、正常ヒト膵島細胞の不死化も試みたことがあり、不死化には成功したもののインスリン産生能が見られず、機能的ベータ細胞の不死化には至らなかった。連携研究者の千葉大 田中知明教授らとの共同研究では GHoma や TSHoma などの下垂体腺腫の長期培養と不死化にも成功しているが、GH、TSH 産生はほぼ消失していた。さらに、連携研究者の成育医療研究センター 梅澤明弘副所長らとの共同研究では数十例のヒト正常肝細胞の不死化に成功しているが、肝機能の指標であるアルブミン産生能や CYP4A4 の発現は低下しており不満があった。しかし、ヒト正常肝細胞にアルブミンプロモーター依存的に不死化遺伝子を発現させるなどの工夫を追加することにより、アルブミンや CYP4A4 の発現の高い正常ヒト不死化肝細胞を得ることに成功した。これらの成功例における工夫をヒト神経内分泌細胞に応用することで、ホルモン産生能を維持する神経内分泌細胞の不死化ができないかと考えるに至った。

### 2. 研究の目的

膵島や下垂体などのペプチドホルモンを産生する神経内分泌系細胞を単離培養できれば、細胞移植療法による補充治療に直結する。しかし神経内分泌細胞の単離、培養、増幅は難しく、機能性神経内分泌細胞株はほとんどない。わずかにマウスの insulinoma 由来の Min-6 やラット insulinoma 由来の RIN 細胞が研究に用いられているのが現状であり、もっとも研究の集中しているヒトの膵ベータ細胞でさえ、満足できるインスリン産生能を維持した細胞株はいまだなく、機能性下垂体神経内分泌細胞に至っては研究目的の細胞株すら存在しない。

近年、誘導多能性幹細胞(iPS 細胞)の再生医療への応用に大きな国民的期待がかけられ再生医療研究の中心となっている。実際、iPS 細胞より機能性膵ベータ細胞への分化誘導技術の開発も年々進歩しているが、単離したベータ細胞自身を増幅する培養技術が開発されていないため、大量の iPS 細胞から誘導する必要があることに加え、分化誘導後の細胞純化に要するコストが実用化の壁となっている。無限に増幅可能な機能性神経内分泌細胞を樹立すれば、近年のカプセル化技術などと組み合わせることで、安価な細胞移植療法の実現を加速させることが可能である。また、本研究による技術開発は iPS 細胞を用いた再生医療と排他的ではなく、iPS 細胞から誘導され純化された組織特異的細胞の無限増幅に応用可能であり、本研究の成果は再生医療全体を飛躍的に加速させる可能性がある。

申請者らは 3 つの不死化遺伝子の発現誘導により様々なヒト正常細胞から正常不死化細胞を誘導できる系を開発している。さらに、通常では免疫不全マウス皮下に生着しないヒト組織細胞に対して 4 つのがん遺伝子の可逆的発現により免疫不全マウス皮下に腫瘍形成後、正常ヒト組織構築を再現できる系も開発している。本研究ではこれらの技術をヒト神経内分泌細胞に適用し、インスリン、グルカゴン、GH、TSH などのペプチドホルモン産生細胞を無限増殖させることにより、安価で早期実現可能な再生医療技術創出のための研究基盤を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

神経内分泌腫瘍モデルマウスに形成される膵島腺腫、下垂体腺腫からホルモン産生性細胞株を長期培養し、確実に不死化する技術を確立する。次いで、ヒト正常膵島ならびに下垂体腺腫よりホルモン産生性神経内分泌細胞の長期培養と無限増幅技術の開発を進める。ヒト正常膵島細胞の不死化自体は過去にも成功しており、ホルモン産生能を維持する神経内分泌細胞の不死化のために、Wnt3a/RSP01 を始め、EGF, insulin などの増殖因子、ROCK 阻害剤 Y-27632, SMAD 経路阻害剤 A83-01 と DMH-1, p38MAPK 阻害剤 SB202190 などの阻害剤、AUGC のリボ核酸、NAC, アスコルビン酸、B27 などの抗酸化因子類を加えた培地でマウス膵島腫瘍細胞やヒト下垂体腺腫細胞の初期培養をした後、変異 CDK4 (CDK4R24C), cyclin D1, TERT の 3 遺伝子導入した。GHoma については、Matrigel 内でのオルガノイド培養を試みた。培養が困難だった ACTH 産生腺腫については POMC 遺伝子プロモーターをクローニングし、POMC 発現依存的に不死化遺伝子を発現させる準備を進めた。膵島ベータ細胞の不死化にはインスリン プロモーターを用いて tetOff (rtTA) を発現させ TRE プロモーター依存的に不死化遺伝子を発現させることで、目的の機能を維持した細胞のみを選択的に不死化した。免疫不全マウスを用いた in vivo での増幅計画は中止し、代わりに 2020 年度からは名古屋大学須賀博士らが確立した iPS 細胞から下垂体への分化システムを用いた正常下垂体細胞の不死化の試みを開始した。iPS 細胞に PiggyBAC ベクターにより、ドキシサイクリン依存的に変異 CDK4 (CDK4R24C) と cyclin D1 を発現する細胞を 3 つクローニングし、

下垂体への分化誘導を進めた。

#### 4. 研究成果

PHLDA3 遺伝子欠損神経内分泌腫瘍モデルマウスに形成される膵島腺腫、下垂体腺腫から変異 CDK4, cyclin D1, BMI1 の導入により細胞株の樹立に成功した。次いで、ヒト手術検体より GHoma などの下垂体腫瘍や Cushing 病 (ACTHoma)、褐色細胞腫、Merkel 細胞がん、由来不明の神経内分泌腫瘍の余剰検体より、初代培養を試みた。このうち MCPyV 陽性の Merkel 細胞がん と MCPyV 陰性の Merkel 細胞がんからは細胞株を樹立することに成功した。GHoma からも初期培養で間葉系細胞の中に上皮系細胞の形態をとる細胞が増殖した。CD56 (NCAM) 抗体磁気ビーズにより、CD56 陽性細胞を繰り返し濃縮し、変異 CDK4, cyclin D1, BMI1 の導入により GHoma 由来と考えられる長期培養可能な上皮性細胞株を複数樹立できた。しかし、このうち 2 細胞株を RNAseq で解析した結果 Synaptophysin や GH の発現は確認できず、本来の GHoma の性質を失った細胞株が樹立された。副腎腫瘍からは Cushing 病、褐色細胞種とも間葉系の細胞の増殖が主要細胞の増殖を凌駕し、腫瘍細胞株の樹立には至らなかった。

一方、膵頭部がんや乳頭部がんの正常膵臓組織部分より膵島細胞の培養と不死化を試みた。まずは、insulin プロモーターから発現する rtTA (tetOff) 蛋白と、rtTA により活性化する TRE をもつ promoter から変異 CDK4 (CDK4R24C), cyclin D1, TERT を発現する lentivirus vector を導入することで、膵島由来と思われる小型の細胞の初期培養と長期維持に成功した。しかし、増殖が極めて遅く継代時に apoptosis の傾向が強く、安定した細胞株の樹立には至っていない。樹立済みの消化管由来神経内分泌腫瘍細胞株や Merkel 細胞がん、由来不明の神経内分泌腫瘍の余剰検体より得られた MCPyV 陽性の Merkel 細胞がん と MCPyV 陰性の Merkel 細胞がん細胞株の培養条件最適化を試みた。最適化した培養条件を参考にして、下垂体ホルモン産生腫瘍の培養を行い細胞株を樹立した。しかし、樹立された GHoma 由来の細胞株は上皮性細胞株であるものの GH 産生が確認されなかった。LHoma, TSHoma についても初期培養に成功している。しかし、ACTHoma からの細胞は初期培養が困難で、新たな培養条件、不死化方法が必要と考えた。コンディショナルに不死化した細胞株を樹立すれば、不死化前の細胞に対する培養条件の最適化も容易になるため、rtTA (tetOff) 蛋白と、rtTA により活性化する TRE をもつ promoter から変異 CDK4 (CDK4R24C), cyclin D1 を発現する PiggyBAC ベクターを作成した。さらに、ACTH ホルモン産生細胞株を樹立するため、ACTH 産生細胞のみを不死化できるよう POMC プロモーターをクローニングし、rtTA (tetOff) 蛋白を ACTH 産生細胞のみで発現するように改変した PiggyBAC ベクターの作成を進めている。これらのベクターを iPSC へ導入し、名大 須賀秀隆博士、佐藤好隆博士ならびに高知大学 西山充博士の協力を得て iPSC から下垂体細胞への分化誘導系で下垂体に分化したホルモン産生細胞を不死化する計画を新たに進めている。一方、新型コロナウイルスの影響で手術検体の受け入れ数が少なくなったため、凍結保存済みの検体から培養を開始し不死化を試みた。比較的培養・不死化が順調な GHoma を用いてオルガノイド培養を試みた。不死化遺伝子導入前の GHoma 細胞はオルガノイド培養法においても増殖が遅く細胞を増幅できなかったが、不死化後の GHoma 細胞ではオルガノイド培養でオルガノイドを形成したため、GH 産生の確認を進めている。

ACTH ホルモン産生細胞株を樹立するため、ACTH 産生細胞のみを不死化できるよう POMC プロモーターをクローニングしたが、ACTH 産生細胞を分離できる既存の特異的プロモーターが使えることが分かった。rtTA (tetOn) 蛋白により CDK4R24C-ires-cyclin D1 を発現誘導される PiggyBAC ベクターの作成し、このベクターを iPSC へ導入した細胞を、名大 須賀秀隆博士、佐藤好隆博士ならびに高知大学 西山充博士の協力により 3 クローン得て iPSC から下垂体細胞への分化誘導系で下垂体への分化を進めている。なお、本研究は 2022 年度より西山博士が研究代表者となる挑戦的萌芽研究へと受け継がれることとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Orimoto, A. Kyakumoto, S. Eitsuka, T. Nakagawa, K. Kiyono, T. Fukuda, T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Efficient immortalization of human dental pulp stem cells with expression of cell cycle regulators with the intact chromosomal condition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0229996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0229996	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 -

1. 著者名 Orimoto, A. Katayama, M. Tani, T. Ito, K. Eitsuka, T. Nakagawa, K. Inoue-Murayama, M. Onuma, M. Kiyono, T. Fukuda, T.	4. 巻 525
2. 論文標題 Primary and immortalized cell lines derived from the Amami rabbit ( <i>Pentalagus furnessi</i> ) and evolutionally conserved cell cycle control with CDK4 and Cyclin D1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1046-1053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.036	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 -

1. 著者名 Tani, T. Eitsuka, T. Katayama, M. Nagamine, T. Nakaya, Y. Suzuki, H. Kiyono, T. Nakagawa, K. Inoue-Murayama, M. Onuma, M. Fukuda, T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Establishment of immortalized primary cell from the critically endangered Bonin flying fox ( <i>Pteropus pselaphon</i> )	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0221364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0221364	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 -

1. 著者名 Inoue, S. Hirota, Y. Ueno, T. Fukui, Y. Yoshida, E. Hayashi, T. Kojima, S. Takeyama, R. Hashimoto, T. Kiyono, T. Ikemura, M. Taguchi, A. Tanaka, T. Tanaka, Y. Sakata, S. Takeuchi, K. Muraoka, A. Osuka, S. Saito, T. Oda, K. Osuga, Y. Terao, Y. Kawazu, M. Mano, H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Uterine adenomyosis is an oligoclonal disorder associated with KRAS mutations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 5785
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-13708-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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	須賀 英隆  (Suga Hidetaka)		
研究協力者	佐藤 好隆  (Sato Yositaka)		
研究協力者	西山 充  (Nishiyama Mituru)		

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
---------	---------