

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08321

研究課題名(和文) グルカゴン分泌機構解明のためのヒトiPS細胞由来膵 細胞の分化誘導系の構築

研究課題名(英文) Differentiation method of human pluripotent stem cells-derived pancreatic alpha cells

研究代表者

矢部 茂治 (Yabe, Shigeharu)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・細胞組織再生医学研究部 上級研究員

研究者番号：40533716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞由来の膵 細胞の分化誘導系の改良を行い、より安定的・効率的な分化誘導系を構築した。また、培養しながらのモニタリングやFACSによるソートで膵 細胞を純化出来るようにCRISPER/Cas9のシステムを用い、proglucagonの下流に2A peptideによりtdTomatoを繋いで、細胞が赤く光るヒトiPS細胞株を樹立した。さらにMofloにより細胞をソートする条件を検討し、細胞の純化に成功した。また、長期にストレス負荷をかける系を構築するために、ヒトiPS細胞由来膵 細胞をアルギン酸で出来たfiberに封入する事で、長期維持を可能とする培養系の構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病の高血糖の主要因はインスリンの作用不足と考えられていたが、近年になり、インスリン不足状態のマウスにおいてグルカゴンのシグナルを阻害すると高血糖にならない事が示され、また2型糖尿病患者でグルカゴンが過剰分泌していることから、グルカゴンの過剰分泌も糖尿病における高血糖に大きく寄与している可能性が示された。しかし、日本で特に研究に使用できる膵 細胞が入手困難であるため、細胞研究が大きく遅れている。本研究においてヒトiPS細胞由来膵 細胞の分化誘導系の構築を行い、さらにアルギン酸ファイバーに封入する事で長期維持を可能とした。この成果により、膵 細胞研究を大きく推進する事が可能となる。

研究成果の概要(英文)：We improved our protocol for differentiating pancreatic alpha cells from human induced pluripotent stem cells and constructed a more stable and efficient differentiation protocol. To monitor pancreatic alpha cells during the differentiation and purify them using FACS (Moflo), we established a human iPS line expressing tdTomato connected with proglucagon by 2A peptide sequence using CRISPER/Cas9 system. We confirmed pancreatic alpha cells differentiated from this iPS line expressed tdTomato. And then, we investigated the condition for FACS and successfully purified pancreatic alpha cells using Moflo. To maintain pancreatic alpha cells long-term in vitro to load environmental stress for a long term, we embedded them into alginate-fiber. This method allowed culturing of pancreatic alpha cells for several months in vitro.

研究分野：再生医療

キーワード：膵 細胞 グルカゴン ヒトiPS細胞 アルギン酸ファイバー 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

血糖値は主に膵細胞から分泌され血糖値を低下させるホルモンであるインスリンと膵細胞から分泌され血糖値を上昇させるホルモンであるグルカゴンにより厳密に制御されている。全世界で患者が増加している2型糖尿病における高血糖の主要因はインスリンの作用不足であると考えられていたが、近年になり、インスリン不足状態のマウスにおいてグルカゴンのシグナルを阻害すると高血糖にならない事が示され、また2型糖尿病患者においてはグルカゴンが過剰分泌していることから、グルカゴンの過剰分泌も糖尿病における高血糖に大きく寄与している可能性が示された。このため、細胞によるグルカゴン分泌機構の解明は非常に重要であるが、マウスやハムスター由来の細胞株は存在するが機能面に問題があり、また日本においては臓器移植用の細胞は研究に使用できないため、研究に使用できるヒト細胞が担保できず、特にヒトにおいてグルカゴン分泌機構を含めた細胞研究は遅れている。

## 2. 研究の目的

ヒト膵細胞不足によるグルカゴン分泌機構等のヒト膵細胞研究の遅れを克服するために、ヒトiPS細胞から効率的・選択的に機能的膵細胞を分化誘導する。また2型糖尿病患者で見られるようなグルカゴン過剰分泌の状態を再現し、ヒト膵細胞のグルカゴン分泌機構の解明を推進する。

## 3. 研究の方法

分化誘導条件を検討し、効率的なヒトiPS細胞由来膵細胞分化誘導系構築する。また、高純度の膵細胞を得るためプログルカゴンに2A peptideでtdTomatoを繋いで細胞において赤い蛍光タンパク質の発現が誘導されるヒトiPS細胞の樹立する。さらに、細胞の機能的成熟化および分泌異常状態を再現するためのアルギン酸fiberを用いた長期維持培養の検討を行う。

## 4. 研究成果

ヒトiPS細胞由来の膵細胞の分化誘導系の改良を行い、より安定的・効率的な分化誘導系を構築した。また、培養しながらのモニタリングやFACSによるソートで膵細胞を純化出来るようにCRISPER/Cas9のシステムを用い、proglucoagonの下流に2A peptideに

より tdTomato を繋いで、細胞が赤く光るヒト iPS 細胞株を樹立した。さらに Moflo により細胞をソートする条件を検討し、細胞の純化に成功した。また、長期にストレス負荷をかける系を構築するために、ヒト iPS 細胞由来腓 細胞をアルギン酸で出来た fiber に封入する事で、長期維持を可能とする培養系の構築に成功した。

## 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 1件）

1. 著者名 Ikeda Mayumi, Yabe Shigeharu, Kiso Masahiro, Ishiguro Naoko, Tsunemi Yuichiro, Okochi Hitoshi	4. 巻 in press
2. 論文標題 TERT/BMI1-transgenic human dermal papilla cells enhance murine hair follicle formation in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2022.03.009	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 -
1. 著者名 Ozawa Fumisato, Nagata Shogo, Oda Haruka, Yabe Shigeharu G., Okochi Hitoshi, Takeuchi Shoji	4. 巻 24
2. 論文標題 Lotus-root-shaped cell-encapsulated construct as a retrieval graft for long-term transplantation of human iPSC-derived -cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102309 - 102309
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102309	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 -
1. 著者名 Yabe Shigeharu G., Fukuda Satsuki, Nishida Junko, Takeda Fujie, Nashiro Kiyoko, Okochi Hitoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Efficient induction of pancreatic alpha cells from human induced pluripotent stem cells by controlling the timing for BMP antagonism and activation of retinoic acid signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0245204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0245204	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 -
1. 著者名 Yabe Shigeharu G., Fukuda Satsuki, Nishida Junko, Takeda Fujie, Nashiro Kiyoko, Okochi Hitoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Efficient induction of pancreatic alpha cells from human induced pluripotent stem cells by controlling the timing for BMP antagonism and activation of retinoic acid signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1,17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0245204	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢部茂治、福田沙月、西田淳子、武田富志枝、大河内仁志
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来SARS-CoV-2の宿主細胞の分化誘導
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢部茂治、福田沙月、西田淳子、武田富志枝、名城浄子、大河内仁志
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来膵 細胞の分化誘導
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢部茂治、福田沙月、西田淳子、武田富志枝、名城浄子、大河内仁志
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来膵 細胞の分化誘導
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 膵臓 細胞への分化誘導法	発明者 矢部茂治、木村圭一、伊吹将人、大河内仁志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/11125	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 膵臓 細胞への分化誘導方法	発明者 矢部茂治、木村圭一、伊吹将人、大河内仁志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/11125	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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