

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23791025
研究課題名（和文）フローサイトメトリーによる細胞純化を用いたヒト多能性幹細胞からの膵β細胞作製
研究課題名（英文）Generation of pancreatic beta cell from human pluripotent stem cell by use of the purification with flow cytometry
研究代表者
豊田 太郎 (TOYODA TARO)
京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教
研究者番号：60593530

研究成果の概要（和文）：ヒト多能性幹細胞からの膵β細胞の作製は、糖尿病の根治に向けた一つの解決策である。現時点では、単一の細胞種を作製することは困難なため、作製した細胞の正確な解析には細胞を単離する必要がある。本研究では、膵臓細胞の分化・機能発揮の要所を担う転写因子 PDX1 の発現と相関して蛍光を発するヒト iPS 細胞株を樹立した。本細胞株はヒト多能性幹細胞由来の膵臓細胞の解析に有用である。

研究成果の概要（英文）：Cell therapy using pancreatic β cells generated from human pluripotent stem cells (hPSCs) is one of the possible solutions of diabetes problems. Since the generation of target cell types from PSCs with high purity is currently difficult, it is necessary to isolate differentiated pancreatic cells for accurate analysis. In this study, we generated a human iPS cell line in which the fluorescent protein reporter gene is expressed under the control of the promoter of PDX1 gene, a key transcriptional factor for pancreatic development and function. This cell line is useful to analyze pancreatic cells derived from hPSCs.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：再生医学、エネルギー、糖質代謝異常、PDX1、膵臓β細胞、インスリン、糖尿病、iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の患者数は世界中で劇的に増加している。糖尿病の病因・病態として膵β細胞の機能低下および細胞数の減少があり、新たな膵β細胞の補充療法の開発が求められている。無限の増殖能と多分化能を有するヒト

胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES 細胞) やヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPS 細胞) から膵β細胞の作製が試みられている。発生生物学の知見に基づいた研究から、ヒト ES/iPS 細胞から膵島様細胞塊を分化誘導できることが

報告されたが (Assady, 2002; Tateishi, 2008)、既知の分化誘導方法では未熟な膵β細胞集団しか得られないと考えられている。

申請者が既報の分化誘導法の追試を行った結果から、これらの諸問題の原因の一つは、誘導効率の低さに起因する不純な細胞集団しか形成されないことであると考えた。したがって、ヒト幹細胞から膵β細胞を作製するには、膵β細胞系譜以外の細胞を含まない高純度な細胞集団を用いた検討が必要である。

膵臓は発生の初期段階で転写因子 pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX1) を発現する細胞を起源とする。また、成体においても体内のインスリン不足を補う際や、障害に対する応答として膵臓β細胞の新生・再生が起こる。このような新生・再生部位では PDX1 が発現する (Sharma, 1999)。さらに、PDX1 は膵β細胞においてインスリンや GLUT2 など糖代謝関連酵素の発現も調節する (Ahlgren, 1998)。ヒトでは染色体の片方の PDX1 遺伝子座で欠損・変異があるだけでも若年性糖尿病 MODY4 に見られるような膵β細胞機能の低下を顕著に引き起こす (Stoffers, 1997)。このように PDX1 陽性細胞は、膵β細胞へと最終分化して機能を発揮するまでの過程において要所に位置する。しかしながら、これまでヒト PDX1 陽性細胞を生存させたまま単離して、分化能力・機能を評価した検討はない。

2. 研究の目的

- (1) ヒト iPS 細胞から PDX1 陽性細胞への高効率な分化誘導法を確立する。
- (2) ヒト iPS 細胞を分化誘導させた細胞集団から、PDX1 陽性細胞を生存させたまま単離する方法を確立する。
- (3) 単離した PDX1 陽性細胞が、自然発生で得られる膵β細胞と同様の機能を有する膵β細胞へと *in vitro* で成熟化するか検討する。
- (4) *In vitro* で作製した膵β細胞が、生体へ生着して機能を発揮するか検討する。

3. 研究の方法

(1) 申請時点で、ヒト ES 細胞 (Kh3 株) やヒト iPS 細胞 (201B6 株, 201B7 株) を用いて、当研究室では約 30% の効率まで PDX1 陽性細胞へと誘導することに成功していた。これに加え、既報の分化のシグナル伝達をもとに、誘導効率を上昇させる増殖因子や化合物の組み合わせを検討する。

(2) PDX1 遺伝子の欠損から予想される正常

な発生・機能に対する弊害 (Stoffers, 1997) を回避するため以下の二つの方法で、ヒト iPS 細胞にレポーター遺伝子の導入を行う。

① ヒト PDX1 遺伝子の上流 4.6 kbp までには、PDX1 の発現を制御する領域 (プロモーター) がある (Gerrish, 2000)。ヒト PDX1 プロモーターの下流に蛍光色素 GFP の遺伝子および薬剤耐性遺伝子を付加したベクターを作製する。これをエレクトロポレーション法にてヒト iPS 細胞 201B7 株に導入し、トランスジェニック細胞株を作製する。薬剤耐性を持つ細胞株を選択し、それらの細胞株を分化誘導することで、PDX1 の遺伝子発現と相関して蛍光色素を発現する細胞株を選択する。

② ゲノム中の PDX1 遺伝子座における終止コドンの後ろに IRES 配列と蛍光色素 tdTomato 遺伝子をノックインすることで、PDX1 遺伝子を保持したまま、PDX1 発現と相関させて蛍光色素を別個に発現させる。ターゲティングベクターとしては人工染色体 (Bacterial artificial chromosome, BAC) を用いる。BAC は長い相同配列 (約 100 kbp) を持ち、相同組み換えに有利である。BAC ベクターの PDX1 遺伝子の後部に IRES 配列と蛍光色素遺伝子 tdTomato と薬剤耐性遺伝子を挿入させる。これをエレクトロポレーション法にてヒト iPS 細胞 201B7 株に導入する。薬剤耐性株を選択し、PCR 法にてゲノムを解析することで、相同組み換えの起こった細胞株を選別する。相同組み換えの起こった株を得られなかった場合、①と同様に細胞株を分化誘導することで、PDX1 の遺伝子発現と相関して蛍光色素を発現するトランスジェニック細胞株を選択する。

(3) 検討(2)で得られたレポーター細胞株を検討(1)で得られた分化誘導方法で分化させ、フローサイトメトリーにて PDX1 陽性細胞を単離する。単離した PDX1 陽性細胞を既存の方法で (Maehr, 2009) さらに *in vitro* で分化させ、膵β細胞への成熟化を行う。また、NGN3 やインスリンの発現を指標として膵β細胞への分化誘導に効果的な増殖因子や既報の分化のシグナル伝達をもとにした化合物の組み合わせも検討する。*In vitro* の分化で、自然発生で得られる膵β細胞と同様の機能を有するものが得られるかを、複数の発現マーカーの解析にて明らかにする。また、機能解析としてインスリンの産生量およびインスリン分泌調節刺激 (グルコース、アミノ酸、K⁺、インクレチン、スルホニルウレア剤) に対する応答能を、ELISA を用いたインスリン量および C-ペプチド量の測定にて検討する。

増殖因子や既知のシグナル伝達をもとに

した化合物の組み合わせで、*in vitro* の成熟化効率をさらに上げる必要が認められた場合、当研究室にある化合物ライブラリー（2万種）を用いて、新規の分化シグナル伝達経路を介したより効率的な成熟化も検討する。

(4) *In vitro* で作製した膵β細胞を生体へと移植して、移植後も形態・発現タンパク質を維持できるか組織化学的な解析にて追跡する。また、空腹時および糖負荷時の血中成分の分析（血中ヒトインスリン量、ヒトC-ペプチド分泌量）をELISAにて測定することで機能解析する。移植対象には免疫拒絶反応のない免疫不全マウスを用い、腎被膜下あるいは門脈経路で肝臓へと移植する（Alipio, 2010）。長期的な（3、6、9ヶ月）観察を行って、作製した細胞が生体で長期間生存するか、また他の細胞種や腫瘍へと変化するか安全性も評価する。

4. 研究成果

(1) PDX1 陽性細胞への分化誘導効率を向上させるため、既報をもとに増殖因子や化合物の組み合わせを検討した。内胚葉細胞に、TGFβファミリーの阻害剤、レチノイン酸、Shh阻害剤、FGFR2b 活性化剤の組み合わせ刺激を行うことで、誘導効率約 75-90%を達成した。

(2) PDX1 陽性細胞を生存させたまま単離する方法を確立するため以下の①②の方法を検討した。

① PDX1 プロモーターで制御された GFP 遺伝子配列を導入したトランスジェニック細胞株を樹立した。薬剤耐性株 135 株を得た。これらを分化誘導させ、PDX1 の発現と相関して GFP を発現する細胞株を探索した。しかしながら、この方法では PDX1 の発現と GFP の発現が一致する株を得られなかった。この原因として導入遺伝子が、未分化細胞では開いているが、分化した細胞では閉じているゲノム領域であったためと考えられる。

② ゲノム中の PDX1 遺伝子座における終止コドンの後ろに IRES 配列と tdTomato 遺伝子をノックインすることで、PDX1 遺伝子発現と相関して赤色蛍光を発する細胞株の樹立を試みた。薬剤耐性株 29 株中からはノックイン細胞株を得ることはできなかったが、tdTomato の発現が PDX1 発現制御機構下にあるトランスジェニック細胞株（PDX1-tdTomato 細胞株）を 4 株得た。

PDX1-tdTomato 細胞株 4 株の中でも 3 株は PDX1 の発現と相関して赤色蛍光を発し、フローサイトメーターにて単離することが可能であった（図 1A, B）。

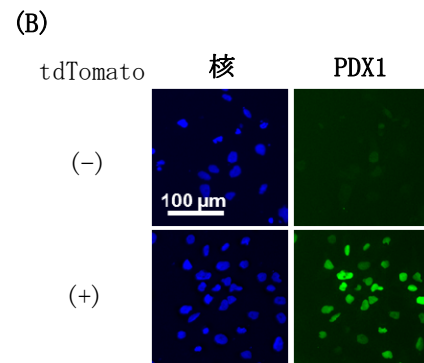
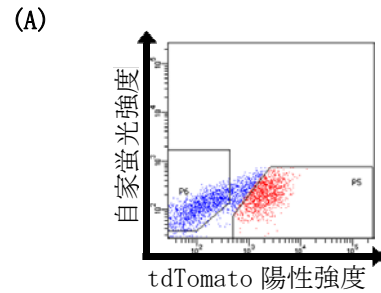


図 1 PDX1 レポーター細胞株の樹立 (A) フローサイトメーターによる tdTomato 陽性細胞集団(赤)の分画化。(B) 免疫染色による tdTomato 陰性細胞(-)と陽性細胞(+)における PDX1(緑)発現の比較。青色は細胞核

(3) 現在、検討(2)で得た細胞株を用いて、単離した PDX1 陽性細胞を *in vitro* で膵β細胞へと分化させて機能を評価する準備をしている。

作製した細胞の *in vitro* 機能評価系の妥当性を検証するため、レポーターラインの樹立と並行して、ヒト ES 細胞 KhES3 株を用いて作製した膵β細胞を純化せずにインスリンの分泌能を評価した。作製した膵β細胞（誘導効率 5-10%）は KCl に応答してインスリンを分泌するが、成熟した膵β細胞の指標であるグルコース応答能はなかった。これらのことから、現在の *in vitro* で作製した膵β細胞は機能的に未熟であると考えられた。

(4) 現在、検討(2)で得た細胞株を用いて、単離した PDX1 陽性細胞を *in vitro* で膵β細胞へと分化させた後、*in vivo* で機能を評価する準備もしている。

作製した細胞の *in vivo* 機能評価系の妥当性を検証するため、レポーターラインの樹立と並行して、ヒト ES 細胞 KhES3 株を用いて作製した PDX1 陽性細胞を純化せずに、そのままあるいは膵β細胞へと分化してから免疫不全マウスの精巣上体周囲脂肪へと移植し、細胞の生着状態や分化状態を評価した。*In vitro* で作製した膵β細胞は移植しても

生着しなかったことから、現在の in vitro で作製した膵β細胞は移植に適さないものであると考えられた。一方、PDX1 陽性細胞(誘導効率 75-95%) を移植したところ 30 日後も移植細胞が生存したことから、生体内での生存には膵β細胞へと分化する前の細胞が適すると考えられる。生体内に移植可能で、成熟した機能を発揮する膵β細胞の作製には、膵内分泌系譜へと分化の系列決定がなされているが最終分化していない前駆細胞を効率良く作製することが、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1 長船健二, 豊田太郎, 多能性幹細胞からの膵β細胞の分化誘導, 代謝系臓器(再生医療叢書), 朝倉書店, 2012 年 10 月, p39-47, 査読無.
- 2 長船健二, 豊田太郎, iPS 細胞による膵島再生の現状と未来, 別冊「プラクティス」ブリットル糖尿病の病態と治療・管理のコツ 進化する治療・広がる未来, 医歯薬出版株式会社, 2012 年 3 月, p184-185, 査読無.

[学会発表] (計 1 件)

- 1 船戸道徳, 豊田太郎, 近藤恭士, 細川吉弥, 須藤智美, 沖田圭介, 浅香勲, 上杉志成, 加藤善一郎, 太田章, 山中伸弥, 近藤直実, 長船健二, 病態解析に向けたヒト iPS/ES 細胞から膵外分泌細胞への高効率分化誘導法の開発, 第 12 回日本再生医療学会, 横浜, 2012 年 3 月, 0-32-4.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 太郎 (TOYODA TARO)

京都大学・iPS 細胞研究所・特定拠点助教
研究者番号: 60593530

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: