

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19506

研究課題名(和文)異種動物胎仔の体内環境を用いたヒトiPS細胞から膵臓の作製

研究課題名(英文)Generation of pancreas from human iPS cells using in vivo environment of experimental animals

研究代表者

長船 健二(Osafune, Kenji)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：80502947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトiPS細胞由来膵前駆細胞からマウス胎仔の体内環境を用いて膵臓臓器を作製する目標に向けて、膵臓形成不全となる遺伝子改変マウスの子宮内胎仔への細胞注入によって、ホストマウス体内でドナー細胞由来の膵組織を作製する移植法の開発を行った。また、ヒトとマウスのキメラ膵組織形成の促進因子を同定するためのスクリーニング系を構築した。今後、siRNAスクリーニングによるキメラ化促進因子の同定とその遺伝子を改変したヒトiPS細胞由来膵前駆細胞とマウス体内環境を用いた膵臓の作製法開発を達成し、ヒトiPS細胞由来膵臓から摘出した膵島を用いた1型糖尿病に対する新規細胞療法の開発に繋げる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病は自己免疫等により膵臓細胞が破壊されることで発症し、生涯にわたってインスリン治療を必要とする。特に頻回のインスリン注射を行っても血糖コントロールが不安定な患者では、致死的な重症低血糖などを引き起こす。1型糖尿病の根治的治療法である膵臓移植における深刻なドナー不足の問題の解決に向けて、無限の増殖能を有するヒトiPS細胞から作製される膵臓組織を1型糖尿病患者に移植する再生医療が期待されている。今後、本研究の成果をもとに、ヒトiPS細胞から臓器としての膵臓を作製し、そこから機能的に成熟した膵臓組織を採取し、膵臓移植に使用する再生医療の開発に繋げる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop the basic technology towards the generation of pancreas organs from human iPS cell-derived pancreatic progenitor cells using the in vivo environment of mouse embryos. For the goal, we developed a transplantation method by which donor cells are transplanted in utero into the gene-manipulated pancreatogenesis-disabled mouse embryos to form pancreatic tissues. In addition, we created an siRNA screening system to identify the factors that facilitate chimeric pancreatic tissue formation between human iPS cell- and mouse embryo-derived pancreatic progenitors. Using these techniques, we will generate pancreas organs from human iPS cells to develop a novel cell therapy for type 1 diabetes using pancreatic islets removed from the regenerated human pancreas organs.

研究分野：再生医学

キーワード：iPS細胞 1型糖尿病 異種動物 膵臓再構築 再生医療 膵臓移植 膵島移植

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病は自己免疫等の機序により膵β細胞が破壊されることで発症し、生涯にわたってインスリン治療を必要とする。特に頻回のインスリン注射を行っても血糖コントロールが不安定な患者においては、致死的な無自覚性重症低血糖や逆に高血糖による様々な血管合併症などが引き起こされる。根治的治療法である膵臓・膵島移植の有効性が示されているが、深刻なドナー臓器不足の問題が依然として存在している。その解決に向けて、無限の増殖能と膵臓を含む全身の臓器の構成細胞種への多分化能を有するヒト iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) から作製される膵島組織を 1 型糖尿病患者に移植する再生医療の開発が期待されている。申請者らも、膵臓発生を段階的に再現する独自の分化誘導法を開発し、ヒト iPS 細胞から高効率な膵島組織作製に成功している (Kimura A. et al., 2017)。しかし、iPS 細胞から *in vitro* で作製される膵島組織は生体内のものに比べ機能的に未熟であり、また増殖因子や化合物などの高価な誘導因子を大量に使用するため製造コストが高額となることなどが課題となっている。

ヒト iPS 細胞から臓器としての膵臓を作製し、そこから機能的に成熟した膵島を入手するために、「胚盤胞補完法」と呼ばれる研究手法を用いて膵臓臓器の作製研究が進められている。それは、膵臓を欠損する遺伝子改変ブタの受精卵胚盤胞に正常ヒト iPS 細胞を注入することによって、ブタ体内で本来欠失するはずの膵臓が注入されたヒト iPS 細胞に補充されて形成される現象を活用することによって膵臓臓器の作製を目指す研究である。しかし、胚盤胞補完法はマウスとラット間のような遺伝学的に近い動物種間では可能となっているが、ブタとヒトなど遺伝学的に遠い種間では成功していない。遺伝学的に遠い種間ではキメラ組織形成が生じにくいことが知られており、近年、その機序の 1 つとして細胞競合の関与が報告され、NF-κB, p65, MYD88 のシグナル経路の発現抑制や抗アポトーシス分子 BCL2 の強制発現がマウスとヒト間のキメラ率を向上させることが報告されているが (Zheng C. et al., 2021)、キメラ組織形成を促進させる技術はほぼ未開発である。また、胚盤胞補完法では、全身の細胞種への多分化能を有する未分化 iPS 細胞を異種動物体内に移植するため、ホスト動物の脳内にヒトの神経細胞が形成されることや生殖組織内にヒトの生殖細胞が形成されるなどの倫理的な課題も考えられている。

2. 研究の目的

申請者は、胚盤胞補完法における上記の課題を解決するために、受精卵に iPS 細胞を注入するのではなく、膵臓欠損動物胎子の膵臓形成予定部位にヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞を注入することで、発生学的ニッチ (niche) を用いてヒト膵臓を作製する着想に至った。また、siRNA ライブラリの網羅的探索を行い、同定されるキメラ形成促進因子の強制発現を用いた人為的遺伝子改変を組合せることを考案した。

本研究の目的は、将来的にブタ体内でヒト iPS 細胞から膵臓を作製する目標の第一ステップとして、膵臓が形成不全となる遺伝子組換えマウスの胎子膵とヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞のキメラ膵臓の作製方法の開発である。本研究は、未確立であるヒト iPS 細胞から異種動物胎子の体内環境を用いた膵臓形成を発生学的ニッチと人為的遺伝子改変を組み合わせることで達成することを最終目的とし、異種細胞間キメラ形成の機序解明により発生進化学および基礎生物学を進展させ、加えて、ヒト iPS 細胞から移植用臓器を作製する技術を開発することで再生医学の進展に貢献する革新的な挑戦的研究である。

3. 研究の方法

(1) 発生学的ニッチを用いたキメラ膵組織形成

膵臓を完全欠損する Pdx1 ノックアウトマウスと膵臓低形成となる Ptf1a ノックアウトマウス (共に京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) の川口義弥教授より供与) の胎生 9.5-15.5 日の膵組織を採取し、*in vitro* で器官培養を行う。器官培養は、既報の膵組織の培養法 (Shih, 2014) を改良して最適化する。その組織に GFP を恒常的に発現するヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞の解離した細胞や細胞塊を注入し、*in vitro* の培養や免疫不全マウス腎被膜下に移植する *in vivo* の培養で、形成不全のマウス膵臓にヒト膵細胞が補充され、キメラ膵組織が形成される培養条件を開発する。ヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞に加え、その前段階として野生型マウスおよびラット胎子由来の膵前駆細胞も使用して条件検討を行う。

(2) 人為的遺伝子改変によるキメラ膵組織形成

CiRA の所有する siRNA ライブラリを用いて発現低下させたヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞を (1) の方法にてマウスとキメラ膵組織を形成させるスクリーニングを実施することで、キメラ形成促進因子を同定する。その因子の強制発現または発現抑制によってキメラ組織形成率が向上する方法を開発する。

(3) 子宮内胎子への移植を用いたキメラ膵臓形成

(2) で同定した因子を強制発現または発現抑制するように遺伝子改変したヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞を Pdx1 または Ptf1a ノックアウトマウスの子宮内胎子の膵臓形成予定部位に移植し出生直前まで成長させ、キメラ膵臓形成を行う。移植に関しては、子宮内マウス胎子腎への細胞移

植法を確立している既報の方法 (Yamanaka S. et al., 2019) を改良し、さらに高感度超音波画像診断装置の使用も検討する。

4. 研究成果

本研究では、1型糖尿病に対する膵島移植のドナー不足の問題解決に向けて、ヒト iPS 細胞から異種動物胎仔の体内環境を用いた膵臓臓器の作製方法開発を目指した。具体的には、ヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞の膵臓形成不全となる Pdx1 や Ptf1a 遺伝子などのノックアウトマウスの胎仔膵組織への *in vitro* での注入や子宮内の同マウス胎仔膵臓形成予定部位への移植によって、マウスとヒトのキメラ膵臓を作製する方法の開発を実施した。また、siRNA ライブラリを導入したヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞を用いてマウスとのキメラ膵組織を形成するスクリーニングを行うことで、異種間キメラ臓器形成を促進する因子を同定し、高効率なキメラ膵臓形成技術を開発するための基盤となる研究を実施した。

(1) 発生学的ニッチを用いたキメラ膵組織形成

膵臓を完全欠損する Pdx1 ノックアウトマウスと低形成となる Ptf1a ノックアウトマウスの胎生 (E) 9.5-15.5 日の膵組織を採取し、既報の膵組織の培養法 (Shih HP. et al., 2014) を改良することで *in vitro* で様々な器官培養の条件検討を行った。その結果、GFP を恒常的に発現する野生型マウス由来の胎仔膵前駆細胞を注入し、ほとんどの構成細胞がドナー由来となるキメラ膵組織を形成する膵臓形成不全マウス胎仔膵組織を用いた *in vitro* 培養系を確立した。また、ホストおよびドナーマウス胎仔ともに適切な胎生日齢を見出した。免疫組織学的検討にて、形成されたドナー由来膵組織には Amylase 陽性の腺房細胞と Insulin 陽性の内分泌細胞の分化を認めた。しかし、同じ実験系において、ヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞の注入を行ったところ、キメラ率がかなり低く、膵組織の形成は困難であることが判明した。今後、(2)においてヒトとマウスのキメラ化を促進する因子を同定し、その遺伝子改変を行ったヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞を用いてキメラ膵組織形成を行う予定である。

(2) 人為的遺伝子改変によるキメラ膵組織形成

siRNA ライブラリを用いて網羅的に遺伝子を発現低下させたヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞を用いて、マウス胎仔膵組織とのキメラ形成促進因子を同定するために、ヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞に siRNA を導入する方法の検討を行った。その結果、膵前駆細胞の前の分化段階である後方前腸細胞にリポフェクションによって siRNA を導入し、膵前駆細胞への分化誘導を平行して行うことで、高効率かつ細胞毒性なく siRNA を導入することに成功した。

当初、siRNA ライブラリを用いて遺伝子を発現低下させたヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞を膵臓形成不全マウス胎仔由来の膵臓形成予定部位の組織と *in vitro* でキメラ膵組織を形成させ、キメラ形成促進因子を同定するスクリーニングを予定していた。しかし、遺伝子改変マウスの繁殖と交配の効率が低く、必要数の胎仔の入手が困難であることが判明したため。その代替として、siRNA スクリーニングを実施可能なヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞と野生型マウス胎仔由来膵前駆細胞の共培養系を確立し、スクリーニング系を完成した。今後、siRNA ライブラリのスクリーニングを実施する予定である。また、スクリーニングのコントロールとして、既報 (Zheng C. et al., 2021) で報告されたヒトとマウスの多能性幹細胞間のキメラ化を促進する p65 および TP53 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムでノックアウトしたヒト iPS 細胞株の樹立を行った。今後、その iPS 細胞株より膵前駆細胞を分化誘導しキメラ実験に用いる予定である。

(3) 子宮内胎仔への移植を用いたキメラ膵臓形成

マウス体内でヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞から膵臓臓器を作製するために、遺伝子改変による膵臓形成不全マウスの子宮内胎仔の膵臓形成予定部位に細胞を移植し、胎仔および母親マウスを生存させたまま出生直前まで胎仔を成長させる方法の開発研究を実施した。その結果、移植を受けた胎仔および母親マウスが生存する移植条件を確立できた。現在、高感度超音波診断装置を用いて子宮内胎仔内の膵臓形成予定部位に正確にドナー細胞を注入する方法の開発を実施している。

今後、前段階として野生型マウスおよびラット胎仔由来の膵前駆細胞を(3)で開発した移植法を用いて注入することで子宮内胎仔の体内で膵組織を形成する。その後、(2)で同定されるキメラ形成促進因子を遺伝子改変したヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞を子宮内胎仔へ移植を行うことで、遺伝子改変による膵臓形成不全マウス体内でヒト膵臓形成を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 大槻 健弥、長船 健二	4. 巻 94(3)
2. 論文標題 iPS細胞	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 359-362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 畑野悠、長船健二	4. 巻 49(4)
2. 論文標題 膵 細胞再生医療のUpdate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetes Journal	6. 最初と最後の頁 127-134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 長船健二	4. 巻 2
2. 論文標題 留学中および留学予定の皆さまへ - be bold ! -	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Connect - 研究知識と留学経験を繋ぐ -	6. 最初と最後の頁 8-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Nagaya Masaki, Hasegawa Koki, Uchikura Ayuko, Nakano Kazuaki, Watanabe Masahito, Umeyama Kazuhiro, Matsunari Hitomi, Osafune Kenji, Kobayashi Eiji, Nakauchi Hiromitsu, Nagashima Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Feasibility of large experimental animal models in testing novel therapeutic strategies for diabetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Journal of Diabetes	6. 最初と最後の頁 306 ~ 330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4239/wjd.v12.i4.306	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16件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 前田貴広, 木村東, 伊藤遼, 布施広光, 太田章, 長船健二
2. 発表標題 ヒト膵 細胞の増殖促進因子の探索と増殖機構の解明
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤遼, 木村東, 廣瀬友里恵, 畑野悠, 美馬淳志, 前伸一, 境内大和, 中村聡宏, 藤倉純二, 西洋平, 太田章, 豊田太郎, 稲垣暢也, 長船健二
2. 発表標題 ヒトiPS細胞分化モデルを用いた膵内胚葉分化におけるHHEXの役割の解明
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Osafune K
2. 発表標題 Mechanistic analyses of differentiation and proliferation of pancreatic progenitor cells derived from human iPSCs
3. 学会等名 Translational Advances in Stem Cells for Diabetes Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長船健二
2. 発表標題 iPS細胞を用いた腎、膵、肝疾患に対する再生医療と新規治療薬の開発
3. 学会等名 第11回細胞再生医療研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前田貴広, 木村東, 伊藤遼, 長船 健二
2. 発表標題 ヒト膵 細胞増殖促進因子の探索
3. 学会等名 第96回日本薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長船健二
2. 発表標題 iPS細胞を用いた腎、膵、肝疾患に対する再生医療と新規治療薬の開発
3. 学会等名 第8回細胞凝集研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸岡あずさ, 木村東, 服部文幸, 人見浩史, 長船健二, 塩島一朗, 豊田長興
2. 発表標題 ヒトiPS細胞から膵 細胞への分化に及ぼす甲状腺ホルモンの作用を解明する
3. 学会等名 第65回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長船健二
2. 発表標題 iPS細胞を用いた難治性腎、膵、肝疾患に対する再生医療の開発
3. 学会等名 第58回日本移植学会総会, 臓器横断的シンポジウム8.CSY8 移植医療と再生医療のクロストーク（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長船健二
2. 発表標題 iPS細胞を用いた糖尿病に対する再生医療の開発
3. 学会等名 第24回熊本糖尿病フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長船 健二
2. 発表標題 糖尿病に対する再生医療
3. 学会等名 第56回糖尿病学の進歩（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kimura A, Osafune K
2. 発表標題 Development of an efficient expansion culture for human iPSC-derived pancreatic progenitor cells
3. 学会等名 ISSCR/JSRM 2021 Tokyo International Symposium Virtual（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長船健二
2. 発表標題 iPS細胞を用いた1型糖尿病に対する再生医療の開発
3. 学会等名 第57回日本移植学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kimura A, Toyoda T, Iwasaki M, Hiram R, Osafune K
2. 発表標題 The roles of non-canonical WNT7B signaling and YY1 in the proliferation of human pancreatic progenitors revealed by transcriptome and phosphoproteome approaches
3. 学会等名 ISSCR 2021 Annual Meeting Virtual (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村 東、豊田 太郎、岩崎 未央、平間 竜介、長船 健二
2. 発表標題 糖尿病に対する細胞療法確立に向けたヒトES/iPS細胞由来膵前駆細胞の増殖機序の解明
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長船 健二、木村 東
2. 発表標題 糖尿病に対する再生医療開発に向けたヒトiPS細胞由来膵前駆細胞の増殖機序解明
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長船 健二
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた内分泌疾患に対する再生医療の開発
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 臍前駆細胞の増殖方法	発明者 木村東、豊田太郎、 長船健二、平間竜介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/016977	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
---------	---------