

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860747

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞からの移植可能な膵上皮細胞への分化誘導法の開発と生理機能の検証

研究課題名(英文) Development and verification of implantable pancreatic epithelial cells from human pluripotent stem cell

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵芽・膵上皮細胞(NKX6.1+細胞)は、発生過程において膵臓への分化が決定された細胞である。NKX6.1+細胞への分化誘導は多能性幹細胞からの膵細胞作製において要所となる。しかしながら、その作製方法は確立していない。本研究では、細胞塊の形成がNKX6.1+細胞の誘導因子の一つであることを示した。また、作製したNKX6.1+細胞は膵芽細胞の指標となる遺伝子発現をしており、移植することで膵上皮様構造やグルコースに応答してインスリン分泌する膵細胞へと分化可能であった。本研究で開発したヒト多能性幹細胞からのNKX6.1+細胞の分化誘導法は、膵細胞を用いた基礎研究や臨床応用に有用である。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic bud/epithelial cells (NKX6.1+ cells) are considered as pancreas committed cells. Induction of the NKX6.1+ cell is a critical step for the generation of pancreatic cells from human pluripotent stem cells. However the induction protocol is not established. In this study we demonstrated that cellular aggregation is a key factor for induction of NKX6.1+ cells. Our generated NKX6.1+ cells expressed marker genes for pancreatic bud cells and could differentiate into pancreatic epithelia-like structures and beta cells which secrete insulin in response to glucose level after implantation. Our new protocol is useful for basic research and clinical application using pancreatic cells.

研究分野：再生医学

キーワード：iPS細胞 ES細胞 PDX1 NKX6.1 膵臓 糖尿病

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。本邦においても最新の厚生労働省の統計によると、糖尿病患者および予備軍は2,210万人と国民の17%にのぼり、その対策は我が国の急務である。また、糖尿病の医療費は1兆1,893億円と国民医療費の3.2%を占める膨大なものであるため、医療経済的にも重大な問題である。糖尿病の病因・病態として膵細胞の機能低下および細胞数の減少があり、新たな膵細胞の補充療法の開発が求められている。

近年、移植医療への応用に向けて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) から様々な臓器や細胞種の作製が試みられており、膵細胞も大きな標的の一つである。膵細胞は、膵臓内にある膵島と呼ばれる内分泌細胞集団の70%を占める最大の構成要素である。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 (Assady, 2002; Tateishi, 2008)。しかしながら、これまでに報告された膵島様細胞塊は、自然発生で得られる膵島と比べて少ないインスリン分泌能力を示し、また細胞外の糖濃度に対する生理的な応答がほとんどないなど、既知の *in vitro* 分化誘導方法では未熟な膵細胞集団しか得られないと考えられている。

一方、ヒト ES/iPS 細胞から作製した膵細胞ではなく、作製途中の PDX1⁺かつ NKX6.1⁺の細胞が含まれる細胞分画を移植すると、*in vivo* の環境下で機能的な膵細胞へと分化・成熟することが報告された (Kelly, 2011)。膵島は発生の初期段階で転写因子 PDX1 を発現する細胞を起源とする。その後、PDX1 陽性細胞の一部が NKX6.1 を発現する膵芽と呼ばれる細胞塊の形態を経て、膵上皮構造を形成する。PDX1 と NKX6.1 の発現は最終的には膵細胞へと限局していく。また、遺伝子改変マウスにおいて PDX1 の欠損は膵臓の欠損を (Ahlgren, 1996) Nkx6.1 遺伝子の欠損は膵細胞の顕著な減少を引き起こす (Sander, 2000)。このように、PDX1 と NKX6.1 を持続的に発現することが膵細胞への分化に重要であると考えられる。しかしながら、現在までのところ、膵上皮細胞の前段階である膵前駆細胞 (PDX1⁺細胞) を膵芽・膵上皮細胞 (NKX6.1⁺細胞) へと特異的に誘導する刺激は不明である。

2. 研究の目的

(1) PDX1⁺細胞が NKX6.1 を発現するまでの過程を厳密に解析するため、ヒト iPS 細胞を分化誘導させた細胞集団から、PDX1⁺細胞を生存させたまま単離する方法を確立する。

(2) ヒト iPS 細胞から作製した PDX1⁺細胞を

NKX6.1⁺細胞へと高効率に分化誘導する方法を確立する。

(3) 作製した NKX6.1⁺細胞の分化能を *in vitro* および *in vivo* で検討する。

3. 研究の方法

(1) PDX1 の遺伝子発現と相関して蛍光タンパク質を発現するレポーター細胞株を樹立する。これまでの検討でヒト PDX1 プロモーター制御下では蛍光タンパク質が有効に機能しなかったことから、レポーター遺伝子をゲノム中の PDX1 遺伝子座に相同組み換えにて導入する改良を行う。また、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細胞機能の低下を顕著に引き起こす (Stoffers, 1997)。そこで、ゲノム中の PDX1 遺伝子の後部に IRES 配列と 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 tdTomato を別個に発現させる。これにより PDX1 遺伝子の欠損から予想される正常な発生・機能に対する弊害を回避する。

ターゲティングベクターとしては細菌人工染色体 (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択する。相同組み換えの起こった株を得られなかった場合、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。

(2) これまでの検討で作製された NKX6.1⁺細胞は、立体的に積み重なった特定の部位に限局しており、細胞コロニー様の集団を形成していた。一般的に、細胞塊の形成は細胞間接着を介したシグナル伝達を惹起させることが知られている。そこで、3次元構造の形成が NKX6.1⁺細胞への分化誘導因子であることを明らかにするため、PDX1⁺細胞から細胞塊を形成した上で増殖因子の組み合わせ刺激を行うことで NKX6.1⁺細胞への分化誘導効率が向上することを示す。

(3)

作製した NKX6.1⁺細胞を *in vitro* で膵細胞へと分化させる。*In vitro* の分化で得られた膵細胞が、自然発生で得られる膵細胞と同様の機能を有するかを明らかにするため、遺伝子の発現を解析する。また、インスリン分泌調節刺激に対する応答能を検討する。

作製した NKX6.1⁺細胞の *in vivo* での分化能を示すため、NKX6.1⁺細胞を成体マウスへ移植する。移植対象には免疫拒絶反応のない免疫不全マウス(NOD-SCID マウス)を用いる。移植後の分化能を形態・発現タンパク質の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から機能を解析する。

4. 研究成果

(1) PDX1 の遺伝子発現と相関して蛍光タンパク質を発現するレポーターヒト iPS 細胞株の樹立を試みた。PDX1 遺伝子に続いて IRES 配列と赤色蛍光色素 tdTomato の遺伝子を含む BAC ベクターをヒト iPS 細胞 201B7 株および 585A1 株に導入した。薬剤耐性株にて遺伝子が導入された株をそれぞれ、29 株、4 株得た。このうちノックイン株はなく、全てトランスジェニック細胞株であった。トランスジェニック細胞株の中で、PDX1 の発現と相関して赤色蛍光を発する細胞株は各親株から 3 株、1 株ずつ得られた。このうち正常核型の細胞株 1 株を候補株として得ることができた (585A1 株由来)。この細胞株から得られた tdTomato⁺細胞は、全て PDX1 を発現しており、さらにフローサイトメーターにて単離することができた。したがって、PDX1⁺細胞を生存させたまま単離することが可能となった。

(2) 膵芽細胞は膵上皮の前段階であるが、膵芽細胞と膵上皮細胞を区別する指標が明らかでないことから、ここでは膵芽細胞の効率的な作製法の確立を目標とすることにした。Activin A、GSK3 阻害剤、レチノイン酸など 7 種類の増殖因子と化合物の組み合わせで、正常の膵発生を模倣した 4 段階からなる分化誘導を行ったところ、ヒト ES 細胞 KhES-3 株から膵予定領域である後方前腸 (PDX1⁺HNF6⁺GATA4⁺細胞)の細胞まで効率的に分化誘導することができた (>80%)。しかし、次段階である膵芽 (PDX1⁺NKX6.1⁺細胞)への分化誘導効率安定せず、さらなる因子の関与が推測された。このとき NKX6.1⁺細胞が PDX1⁺細胞の集積部に局在していたことから、細胞密度が分化を促進する可能性が考えられた。

そこで、高細胞密度が膵芽細胞への分化を促進するかを明らかにするために、PDX1⁺細胞を再播種し様々な細胞密度で接着培養、あるいは様々な細胞密度で細胞塊を形成し 4 日間浮遊培養した。平面培養においては細胞密度の増加に従い NKX6.1⁺細胞率は増大し、細胞塊において最大の NKX6.1⁺細胞率となった。この細胞塊形成による分化誘導効率の向上は、他のヒト iPS 細胞株でも同様に認められた。これらのことから、細胞密度の高まりが膵芽細胞への分化誘導因子であることが示唆された。

細胞塊形成の効果と既知の液性因子の関

係を検討するために、液性因子を組み合わせ、NKX6.1 mRNA 発現量を測定した。いずれの液性因子も NKX6.1 の mRNA 発現量を増加させ、全ての存在下で最大となった。これらの結果は細胞塊形成によって惹起されるシグナルは既知の液性因子とは独立していることを示唆する。

PDX1⁺NKX6.1⁺細胞率は細胞塊形成後に経時的に増加し、12 日後には約 70%、20 日後までに約 90%に到達した (図 1)。

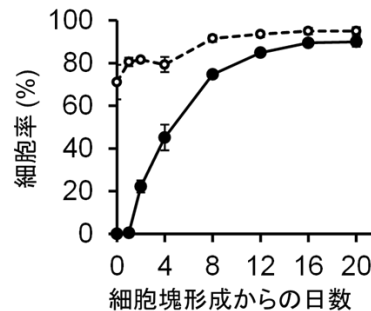


図 1 PDX1⁺NKX6.1⁺細胞率の経時変化

平面培養で作製した後方前腸の細胞 (PDX1⁺) から細胞塊を作製して膵芽細胞への分化誘導を行った。細胞塊形成からの各時点での PDX1⁺細胞率 (白丸、破線)、PDX1⁺NKX6.1⁺細胞率 (黒丸、実線) をフローサイトメーターにて測定した。(Toyoda, 2015 より改変引用)

以上のことから、本培養法で高効率に PDX1⁺NKX6.1⁺細胞を得ることが可能となった。

(3)

分化誘導した PDX1⁺NKX6.1⁺細胞が膵芽細胞であることを確認するため、NKX6.1 以外の指標が相関しているか PTF1A の mRNA 発現量を経時的に測定した。平面培養では、NKX6.1、PTF1A とともに発現量がほとんど増加しなかった。一方、細胞塊を形成した場合、NKX6.1、PTF1A の遺伝子発現が経時的に増加した。これらの結果は作製した細胞が膵芽細胞であることを支持する。

さらに、PDX1⁺NKX6.1⁺細胞が膵内分泌細胞へと分化可能であるか検討した。作製した PDX1⁺NKX6.1⁺細胞に *in vitro* で膵細胞への分化誘導因子 (Kunisada, 2011) にて刺激を行った。すると、刺激前には存在しなかった INSULIN⁺NKX6.1⁺ が出現した。INSULIN⁺NKX6.1⁺ は、INSULIN⁺NKX6.1⁺ に比べて発生的に進んだ段階の膵細胞であると考えられている。そこで、新たに得られた INSULIN⁺NKX6.1⁺ にグルコース応答能があるか検討した。しかし、高グルコースで刺激しても低濃度のグルコースで刺激した場合と同程度しかインスリン分泌の指標である C-peptide を分泌しなかった。したがって、得られた細胞は成熟型ではなく、胎児型であると考えられる。

作製した細胞塊の生体内での分化能を検証するために、T 細胞、B 細胞、NK 細胞を持たない免疫不全マウスの腎被膜下に細胞

塊を移植した。移植から 30 日後、細胞塊は融合して一つの巨大な組織を形成した。その内部では PDX1⁺細胞が管様の構造を形成していた(図 2)。また、管様構造の一部から INSULIN⁺細胞が出芽している様子や、INSULIN⁺細胞や GLUCAGON⁺細胞の細胞集団も観察された。これらはヒトの胎児膵の所見と合致するもので、作製した細胞塊は生体内に移植されると膵上皮へと分化可能であることを示唆する。

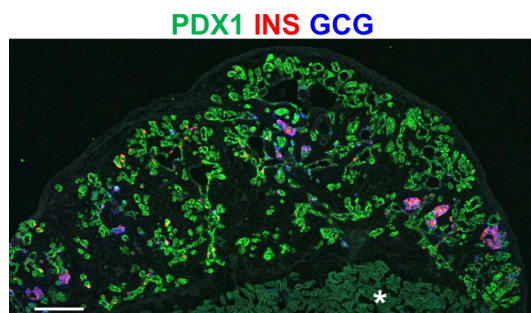


図 2 ヒト ES 細胞由来の膵組織

作製した膵芽細胞を移植して 30 日後の移植片を免疫染色した。緑色：膵前駆細胞 (PDX1)、赤色：インスリン産生細胞 (INS)、青色：グルカゴン産生細胞 (GCG)。*: マウス腎臓。Scale bar, 300 μ m. (Toyoda, 2015 より引用改変)

膵芽細胞が生体内で機能的な膵細胞へと分化可能であることを示すために、インスリン分泌の指標である血中ヒト C-peptide 量を経時的に測定した。移植から 60-90 日後にヒト C-peptide は検出され始め、その血中量は経時的に増加した。続いて、内分泌細胞への分化を促進するために、移植 1-2 日前に細胞塊を既知の内分泌細胞への分化誘導因子で処理した。移植から 90 日後以降に、成熟した膵細胞の指標である血中グルコース濃度に応答したヒト C-peptide の分泌が観察された。よって、我々の作製した細胞は生体内で成熟した膵細胞へと分化可能であることが示唆された。

以上のことから作製した細胞は膵芽細胞であることが確認できた。また、新規誘導法で用いた培養条件は既知の液性因子と相乗効果があったことから独立したシグナル伝達を担っていることが示唆された。本研究で開発したヒト多能性幹細胞からの NKX6.1⁺細胞の分化誘導法は、膵細胞を用いた基礎研究や臨床応用に有用である。

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 5 件)

1. Toyoda T, Mae S, Tanaka H, Kondo Y, Funato M, Hosokawa Y, Sudo T, Kawaguchi Y, Osafune K, Cell aggregation optimizes the

differentiation of human ESCs and iPSCs into pancreatic bud-like progenitor cells, Stem Cell Research, 2015, 14(2):185-97, DOI: 10.1016/j.scr.2015.01.007, 査読有り.

2. 居神麻衣子, 豊田太郎, 長船健二, 多能性幹細胞を用いた腎臓、膵臓系譜の分化誘導研究の最前線, 実験医学増刊「再生医療まで2015」(羊土社), 33(2): 108(260)-114(266), 2015, 査読無し.

3. Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, Takizawa N, Ichisaka T, Asano K, Morizane A, Doi D, Takahashi J, Nishizawa M, Yoshida Y, Toyoda T, Osafune K, Sekiguchi K, Yamanaka S. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. Scientific Reports 4, 2014, 3594, DOI: 10.1038/srep03594, 査読有り.

4. 木村東, 豊田太郎, 長船健二, 膵細胞の再生医療 どこまで進んだのか, プラクティス(医歯薬出版株式会社), 31(4): 475-482, 2014, 査読無し.

5. 細川吉弥, 豊田太郎, 長船健二, iPS 細胞を用いた糖尿病に対する再生医療, 腎と透析(東京医学社), 75(2): 268-273, 2013, 査読無し.

[学会発表](計 11 件)

1. 豊田太郎, 木村東, 前伸一, 田中ひろみ, 長船健二, 細胞塊形成を利用したヒト ES/iPS 細胞から移植可能な膵芽細胞への分化誘導, 第 14 回日本再生医療学会総会, 2015 年 3 月 19-21 日 (3 月 20 日), 0-43-1, パシフィコ横浜(横浜).

2. Taro Toyoda, Shin-Ichi Mae, Azuma Kimura, Hiromi Tanaka, Yasushi Kondo, Michinori Funato, Yoshiya Hosokawa, Tomomi Sudo, Yoshiya Kawaguchi, Kenji Osafune, Cell aggregation optimizes the differentiation of human ESCs and iPSCs into pancreatic bud-like progenitor cells, 第 18 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム, 2015 年 1 月 15 日-17 日, Poster-055, 武田薬品研修所(大阪).

3. Yasushi Kondo, Taro Toyoda, Michinori Funato, Yoshiya Hosokawa, Satoshi Matsui, Tomomi Sudo, Xiaotong Zhuang, Akira Ohta, Shinya Yamanaka, Nobuya Inagaki, Kenji Osafune, A small molecule that facilitates the

- differentiation into pancreatic endocrine cells from human ES/iPS cells, 10th International Diabetes Federation (IDF)-Western Pacific Region Congress 2014/ 6th Asian Association for the Study of Diabetes (AASD) Scientific Meeting, 2014年11月21-24日(11月24日), OP-73, Singapore (Singapore).
4. Taro Toyoda, Shin-Ichi Mae, Hiromi Tanaka, Yasushi Kondo, Michinori Funato, Yoshiya Hosokawa, Tomomi Sudo, Shinya Yamanaka, Kenji Osafune, CELL AGGREGATION OPTIMIZES THE DIFFERENTIATION INTO PANCREATIC BUD-LIKE PROGENITOR CELLS FROM HUMAN ESCS AND IPSCS, 12th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research, 2014年6月18-21日(6月18日), W-1009, Vancouver (Canada).
 5. Sho Senda, Satoru Okamoto, Yukimasa Taniguchi, Hiroki Ozawa, Yumi Ando, Mizuho Yokoyama, Takuya Matsumoto, Tsuyoshi Kobayashi, Nanako Takizawa, Tomoko Ichisaka, Kanako Asano, Asuka Morizane, Daisuke Doi, Jun Takahashi, Yoshinori Yoshida, Taro Toyoda, Kenji Osafune, Jyunko Itoga, Emiko Yagi, Masatoshi Nishizawa, Shinya Yamanaka, Kiyotoshi Sekiguchi, Masato Nakagawa, DEVELOPMENT OF A NOVEL XENO-FREE MEDIUM, STEMFIT™, FOR FEEDER-FREE CULTURE OF HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS, 12th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research, 2014年6月18-21日(6月19日), T-2109, Vancouver (Canada).
 6. Yasushi Kondo, Kentaro Toyoda, Taro Toyoda, Michinori Funato, Yoshiya Hosokawa, Satoshi Matsui, Tomomi Sudo, Xiaotong Zhuang, Akira Ohta, Shinya Yamanaka, Nobuya Inagaki, Kenji Osafune, Development of the Method to Differentiate Pancreatic β -like Cells from Human iPS Cells by Using Small Molecules, American Diabetes Association 74th Scientific Sessions, 2014年6月13-17日, 2129-P, San Francisco (USA).
 7. 豊田太郎, 前伸一, 田中ひろみ, 近藤恭士, 船戸道徳, 細川吉弥, 須藤智美, 山中伸弥, 長船健二, ヒトiPS/ES細胞からの移植可能な膵芽細胞への分化誘導法の開発, 第57回日本糖尿病学会年次学術集会, 2014年5月22-24日(5月22日), YIA-4, 大阪国際会議場(大阪).
 8. 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, 病態モデル作製に向けたヒト 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13回日本再生医療学会総会, 2014年3月4-6日(3月6日), 0-52-1, 国立京都国際会館(京都).
 9. Michinori Funato, Taro Toyoda, Yasushi Kondo, Yoshiya Hosokawa, Tomomi Sudo, Keisuke Okita, Isao Asaka, Motonari Uesugi, Zen-ichiro Kato, Akira Ohta, Shinya Yamanaka, Naomi Kondo, Kenji Osafune, DEVELOPMENT OF AN EFFICIENT DIFFERENTIATION METHOD FROM IPSCS/ESCS INTO PANCREATIC EXOCRINE LINEAGES TOWARDS NOVEL PANCREATIC DISEASE MODELS, 11th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research, 2013年6月12-15日(6月12日), W-1073, Boston (USA).
 10. Yasushi Kondo, Taro Toyoda, Michinori Funato, Yoshiya Hosokawa, Tomomi Sudo, Xiaotong Zhuang, Kentaro Toyoda, Akira Ohta, Shinya Yamanaka, Nobuya Inagaki, Kenji Osafune, Development of the differentiation method from human iPSCs into pancreatic cells using small molecules, 第56回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013年5月16日-18日(5月16日), E02-3, 熊本キャッスルホテル(熊本).
 11. 近藤恭士, 豊田太郎, 稲垣暢也, 長船健二, ケミカルバイオロジーを用いたヒト iPS細胞から膵細胞への分化誘導研究, 第56回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013年5月16日-18日(5月17日), SS5-2, メルパルク熊本(熊本).
- 〔図書〕(計 2件)
1. 豊田太郎, 長船健二, 膵細胞と臓器再生, 膵島の再生医療(診断と治療社), p6-10(総頁数173), 2015年2月.
 2. 細川吉弥, 豊田太郎, 長船健二, 1型糖尿病, 遺伝子医学 MOOK27 iPS細胞を用いた難病研究・臨床病態解明と創薬に向けた研究の最新知見(メディカルドゥ), p164-169(総頁数228), 2015年2月.
- 〔産業財産権〕
出願状況(計 2件)
- 名称: 膵芽細胞の製造方法および膵芽細胞を

含む膵疾患治療剤
発明者：長船健二、豊田太郎
権利者：国立大学法人京都大学
種類：特許
番号：特願 2014-105049
出願年月日：2014 年 5 月 21 日
国内外の別：国内

名称：膵ホルモン産生細胞の製造方法
発明者：長船健二、稲垣暢也、豊田太郎、近藤恭士
権利者：国立大学法人京都大学
種類：特許
番号：特願 2013-164137
出願年月日：2013 年 8 月 7 日
国内外の別：国内

〔その他〕

(ホームページ等)
糖尿病治療に向けてヒトES/iPS細胞から移植用の膵細胞を効率よく作製する方法を開発
<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/150205-084839.html>

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