

令和元年6月17日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05404

研究課題名(和文) iPS細胞作製技術を応用したヒト人工膵幹細胞、人工肝幹細胞の樹立

研究課題名(英文) Induction of human iTS-P and iTS-L cells using iPS cell technology

研究代表者

野口 洋文 (NOGUCHI, Hirofumi)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50378733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：われわれの研究室では、マウス膵幹細胞および、マウス肝幹細胞を人工的に作製することに成功している。本研究ではヒト膵・肝組織を用いて組織特異的幹/前駆細胞を人工的に作製(iTS細胞)することを目的とした。

本研究期間において、ヒト膵幹細胞およびヒト肝幹細胞の人工的作製を6因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, p53shRNA, L-MYC, LIN28)の一過性発現で試み、樹立することに成功した。ヒト膵幹細胞、ヒト肝幹細胞ともに組織特異的マーカーの発現を確認した。また、免疫不全マウスへの移植にて、奇形腫形成がないことも確認した。本研究は臨床応用化へ向けて重要な知見となると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、組織特異的幹細胞を人工的に作製することが可能であることが、ヒト細胞で証明された。この細胞の利点は1)樹立効率がiPS細胞よりも高い、2)分化誘導効率がES/iPS細胞より高い、3)奇形腫形成がなくES/iPS細胞で懸念された未分化細胞残存による腫瘍形成の心配がない、の3点である。この技術は膵・肝のみならず、さまざまな組織に関して応用可能であると考えられるため、画期的な技術であるといえる。今後、臨床応用化へ向けてiTS細胞の有効性・安全性試験を行っていきたい。

研究成果の概要(英文)：We recently demonstrated the generation of mouse induced tissue-specific stem (iTS) cells through transient overexpression of reprogramming factors combined with tissue-specific selection. Here we induced expandable tissue-specific stem/progenitor (iTS) cells from human pancreatic/hepatic tissue through transient expression of genes encoding the reprogramming factors OCT4, p53 shRNA, SOX2, KLF4, L-MYC, and LIN28. Transfection of episomal plasmid vectors into human pancreatic tissue efficiently generated iTS cells expressing genetic markers of endoderm and tissue-specific progenitors. The iTS cells differentiated into insulin/albumin-producing cells more efficiently than human iPS cells. iTS cells subcutaneously inoculated into immunodeficient mice did not form teratomas. The generation of human iTS cells may have important implications for the clinical application of stem/progenitor cells.

研究分野：細胞移植・再生医療

キーワード：再生医療 iTS細胞 iPS細胞 体性幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ES細胞は自己複製能 (self-renewal potency) と多分化能 (pluripotency) を持つ細胞であり、あらゆる細胞・臓器を作ることが理論上可能であるが、胚から樹立される細胞であるため、その臨床応用化は倫理的問題を多く含んでいる。iPS細胞は体性細胞より作成される細胞であり、その機能・特徴はES細胞とほぼ同じである。このiPS細胞作製技術は、ES細胞の持っていた倫理的側面を含む多くの問題点を解決することとなり、その臨床使用へむけた研究が活発に行われている。この数年間で、プラスミドやアデノウイルス、センダイウイルスなどを用いて、リプログラミングファクター(山中因子:Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, L-Myc, p53shRNA、LIN28など)を一過性発現させることにより、染色体を傷つけることなくiPS細胞を樹立することが可能となった。さらに、2014年にはiPS細胞を用いた網膜再生治療が臨床実施された。しかしながら、iPS細胞にはいまだいくつかの問題点が残っている。たとえば、ES/iPS細胞はその細胞そのものを生体へ移植した場合、奇形腫を形成する可能性があることや、ES/iPS細胞から目的の細胞への効率的な分化誘導法が確立していないものが多いことが挙げられる。

組織特異的幹/前駆細胞は多くの疾患の治療ソースとして期待されているものである。血液疾患に関しては、骨髄幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血幹細胞などを用いて実際に治療が行われており、その有益性は証明されている。また、最近では間葉系幹細胞がさまざまな疾患の治療に使用されており、一部その有益性も報告されている。しかしながら、多くの臓器に関しては組織特異的幹/前駆細胞の分離自体が困難であり、治療報告も少ないのが現状である。膵に関しては、膵管細胞が前駆細胞の働きをしていることがさまざまな報告で証明されており、臨床膵島移植においても移植時に膵管細胞を同時に移植することにより成績向上が認められたとの報告がなされている。しかしながら「自己複製能」をもつ膵“幹”細胞の樹立はヒト細胞ではいまだ報告されていない。マウス膵“幹”細胞の樹立はわれわれのグループも含めて複数施設から報告されているが、われわれの研究ではその樹立効率はマウスの週齢に依存し、成熟マウスからは膵“幹”細胞の樹立は困難であることがわかっている(樹立効率:0週齢マウス100%、8週齢マウス10%、24週齢マウス0%)。このことをヒトに当てはめると、成人膵の中には膵幹細胞はほとんどなく、自己複製能が限定的な前駆細胞(膵管細胞)のみが存在するのではないかと推測される。糖尿病を治療するためには多くの細胞が必要となるため、自己複製能が限定された“前駆”細胞でこれをまかなうのは困難である。そのため、自己複製能をもつ“幹”細胞の樹立が重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、iPS細胞樹立技術を応用して、ヒト人工組織特異的幹細胞(iTS細胞)を樹立することを目的とした。具体的には、ヒト人工膵幹細胞(human iTS-pancreas cells; hiTS-P cells)、ヒト人工肝幹細胞(human iTS-liver cells; hiTS-L cells)の樹立を目指した。また樹立したiTS-P細胞・iTS-L細胞をそれぞれ膵β細胞・肝細胞へ分化させ、その分化誘導効率をiPS細胞と比較した。

3. 研究の方法

ヒト人工膵幹細胞の樹立

われわれの研究室では、プラスミドで6因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, p53shRNA, L-MYC, LIN28)を一過性に発現させることにより、ヒトiPS細胞を安定して樹立することに成功していた。また、予備実験ではOCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYCの4因子ではヒトiTS-P細胞の樹立は困難である一方、上記6因子であればマウスiTS-P細胞と形態がよく似た細胞群が認められ

ることが分かっていた。本研究期間で、ヒト iTS-P 細胞が安定して樹立できる手技を確立することを目標とした。

ヒト膵細胞の入手方法であるが、現在共同研究をしているアルバータ大学から入手した。アルバータ大学は世界で最も多くの膵島移植を実施している施設であり、週 2-3 回の膵島分離を行っている。本研究では 5 回のヒト膵島細胞の提供を受けた。なお、琉球大学ではあらかじめ倫理申請を行い、承認を得たうえで膵島細胞の提供を受けた（琉球大学臨床研究倫理審査委員会 承認番号 809）。

膵ベータ細胞への分化誘導、糖尿病マウスへの移植

ES/iPS 細胞からインスリン分泌細胞への分化誘導は Nat Biotech 2006, 24, 1392-1401 に報告されている方法が多くの施設で使用されている。生体では受精卵から、1. Definitive endoderm、2. Primitive gut tube、3. Posterior foregut、4. Pancreatic endoderm を経てインスリン分泌細胞へと分化していくが、このプロトコールはこの過程を in vitro で模倣した形になっており（5 ステッププロトコール（Stage 1-5））理にかなった方法であるため、本研究で使用した。分化誘導を行った細胞は糖尿病マウスへ移植し、in vivo での評価を行った。

ヒト人工肝幹細胞の樹立

われわれの研究室では、山中因子の発現するプラスミドを用いて、マウス肝組織から iPS 細胞とともに iTS-L 細胞の樹立にも成功した。この細胞群は樹立効率が iPS 細胞より高く、奇形腫形成が認められなかった。さらに肝細胞への分化誘導を行ったところ、ES 細胞から分化誘導を行った場合の 6 倍高いアルブミンの遺伝子発現が認められた。これらのデータを背景に、本研究で、ヒト iTS-L 細胞が安定して樹立できる手技を確立することを目標とした。ヒト肝細胞の入手方法であるが、市販されているヒト肝細胞を購入し使用した。

肝細胞への分化誘導

ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導は研究代表者の共著論文（Nat Biotech 2006, 24, 1412-1419）に報告されている方法を用いた。研究代表者は、Nat Biotech の分化誘導法を数多く経験しており、手技的な問題はなかった。

4. 研究成果

ヒト人工膵前駆細胞の樹立

アルバータ大学より提供していただいた、ヒト膵組織にプラスミドで 6 因子（OCT3/4, SOX2, KLF4, p53shRNA, L-MYC, LIN28）を一過性に発現させることにより、ヒト iPS 細胞を樹立することができたが、自己複製能のあるヒト膵“幹”細胞の樹立は困難であった。その一方で自己複製能が大幅に増加した、膵“前駆”細胞を人工的に作製することに成功した（induced tissue-specific progenitor cells; iTP 細胞）。この細胞は細胞の継代が 20 回以上可能であり（通常は数回程度）、大幅に自己複製能が増加したことが証明された。この細胞は PDX1 などの膵幹/前駆細胞特異的のマーカを発現しており、また免疫不全マウスへ移植では、奇形腫/腫瘍形成が認められなかった。

膵ベータ細胞への分化誘導、糖尿病マウスへの移植

Nat Biotech 2006, 24, 1392-1401 に報告されている分化誘導法を用いて、iPS 細胞および

iTP 細胞のインスリン分泌細胞への分化誘導を行った。iTP 細胞は膵前駆細胞のマーカーを発現しているため、Stage 1-5 のうち、Stage 4, 5 のステップのみを使用した。その結果、iTP 細胞のインスリン分泌細胞への分化誘導効率はいPS 細胞に比べて高いことが示された。

iTP 細胞由来インスリン分泌細胞を糖尿病マウスへ移植し、血糖改善効果を確認したが、残念ながら、血糖改善には至らなかった。しかしながら、非糖尿病マウスへの移植後 30 日目に移植組織を摘出し、インスリン分泌細胞を確認したところ、インスリン陽性細胞が一定数認められた。これにより、iTP 細胞由来インスリン分泌細胞は *in vivo* においても生着し、インスリン分泌を行っていることが確認できた。

ヒト人工肝幹細胞の樹立

市販されているヒト肝細胞を用いて、プラスミドで 6 因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, p53shRNA, L-MYC, LIN28) を一過性に発現させることにより、ヒト人工肝幹細胞 (iTS-L 細胞) を樹立することができた。この細胞は HNF1 β , 4 α をはじめとする、内胚葉特異的マーカーを発現しており、また免疫不全マウスへ移植では、奇形腫/腫瘍形成が認められなかった。

肝細胞への分化誘導

研究代表者の共著論文 (Nat Biotech 2006, 24, 1412-1419) に報告されている分化誘導法を用いて、iPS 細胞および iTS-L 細胞の肝細胞 (アルブミン分泌細胞) への分化誘導を行った。iTS-L 細胞の肝細胞への分化誘導効率は iPS 細胞に比べて高いことが示された。今後、iTS-L 細胞由来アルブミン分泌細胞の肝硬変モデルマウスへの移植を実施していく予定である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 32 件)(下記抜粋:すべて査読有)

- 1: Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Shapiro AMJ, Kin T. Induction of Expandable Tissue-Specific Progenitor Cells from Human Pancreatic Tissue through Transient Expression of Defined Factors. Mol Ther Methods Clin Dev. 2019 Jan 29;13:243-252. doi: 10.1016/j.omtm.2019.01.011.
- 2: Nakashima Y, Nahar S, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Fujita J, Noguchi H. A Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis of Primary Cultured Cells and Subcultured Cells Using Mouse Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells Int. 2019 Jan 10;2019:7274057. doi: 10.1155/2019/7274057.
- 3: Soda M, Saitoh I, Murakami T, Inada E, Iwase Y, Noguchi H, Shibasaki S, Kurosawa M, Sawami T, Terunuma M, Kubota N, Terao Y, Ohshima H, Hayasaki H, Sato M. Repeated human deciduous tooth-derived dental pulp cell reprogramming factor transfection yields multipotent intermediate cells with enhanced iPS cell formation capability. Sci Rep. 2019 Feb 6;9(1):1490. doi: 10.1038/s41598-018-37291-2.
- 4: Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Ebi N, Hamada E, Tamaki Y, Kuwae K, Kitamura S, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M. A Novel Preservation Solution Containing a JNK Inhibitory Peptide Efficiently Improves Islet Yield for Porcine Islet Isolation. Transplantation. 2019 Feb;103(2):344-352. doi: 10.1097/TP.0000000000002555.
- 5: Nahar S, Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Toyoda Z, Kobayashi N, Saitoh I,

- Watanabe M, Noguchi H, Fujita J. Cytokines in adipose-derived mesenchymal stem cells promote the healing of liver disease. *World J Stem Cells*. 2018 Nov 26;10(11):146-159. doi: 10.4252/wjsc.v10.i11.146.
- 6: Nahar S, Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi H, Fujita J. A Comparison of Proteins Expressed between Human and Mouse Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells by a Proteome Analysis through Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 6;19(11). pii: E3497. doi: 10.3390/ijms19113497.
- 7: Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Kobayashi N, Kitamura S, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi H. Induction of Expandable Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from Aged Mesenchymal Stem Cells by a Synthetic Self-Replicating RNA. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 6;19(11). pii: E3489. doi: 10.3390/ijms19113489.
- 8: Nahar S, Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi H, Fujita J. A Comparison of the Preservation of Mouse Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Using the University of Wisconsin Solution and Hank's Balanced Salt Solution. *Stem Cells Int*. 2018 Sep 6;2018:1625464. doi: 10.1155/2018/1625464.
- 9: Nakashima Y, Nahar S, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Toyoda Z, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Fujita J, Noguchi H. A Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis of the Proteins Secreted by Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant*. 2018 Oct;27(10):1469-1494. doi: 10.1177/0963689718795096.
- 10: Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi H. Characterization of induced tissue-specific stem cells from pancreas by a synthetic self-replicative RNA. *Sci Rep*. 2018 Aug 17;8(1):12341. doi: 10.1038/s41598-018-30784-0.
- 11: Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Ebi N, Hamada E, Tamaki Y, Kuwae K, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M. Modified cell-permeable JNK inhibitors efficiently prevents islet apoptosis and improves the outcome of islet transplantation. *Sci Rep*. 2018 Jul 23;8(1):11082. doi: 10.1038/s41598-018-29481-9.
- 12: Nakashima Y, Nahar S, Miyagi-Shiohira C, Kinjo T, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Fujita J, Noguchi H. A Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis of Cells Cultured in DMEM 10% FBS and Chemically Defined Medium Using Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2018 Jul 13;19(7). pii: E2042. doi: 10.3390/ijms19072042.
- 13: Nakashima Y, Miyagi-Shiohira C, Noguchi H, Omasa T. Atorvastatin Inhibits the HIF1 α -PPAR Axis, Which Is Essential for Maintaining the Function of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Mol Ther*. 2018 Jul 5;26(7):1715-1734. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.06.005.
- 14: Noguchi H, Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y. Induced Tissue-Specific Stem Cells and Epigenetic Memory in Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 21;19(4). pii: E930. doi: 10.3390/ijms19040930.

15: Noguchi H, Sugimoto K, Miyagi-Shiohira C, Nakashima Y, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y. RCAN-11R peptide provides immunosuppression for fully mismatched islet allografts in mice. Sci Rep. 2017 Jun 8;7(1):3043. doi:10.1038/s41598-017-02934-3.

16: Saitoh I, Sato M, Soda M, Inada E, Iwase Y, Murakami T, Ohshima H, Hayasaki H, Noguchi H. Tissue-Specific Stem Cells Obtained by Reprogramming of Non-Obese Diabetic (NOD) Mouse-Derived Pancreatic Cells Confer Insulin Production in Response to Glucose. PLoS One. 2016 Sep 23;11(9):e0163580. doi: 10.1371/journal.pone.0163580.

〔学会発表〕(計 21 件)(下記抜粋)

1: Hirofumi Noguchi. Modified Cell-Permeable JNK Inhibitors Efficiently Prevent Islet Apoptosis. The 1st Congress of Asian Pancreas and Islet Transplant Association. 2019/2/22, Seoul, Korea.

2: Hirofumi Noguchi. Cell Therapy at University of the Ryukyus. 18th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR 2016). 2016/9/1, Shanghai, China.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：ヒト組織特異的幹／前駆細胞の人工製法
発明者：野口洋文、潮平知佳、中島義基
権利者：琉球大学
種類：特許
番号：特願 2018-228996
出願年：2018年
国内外の別：国内特許

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特記すべきことなし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：齊藤一誠

ローマ字氏名：SAITOH Issei

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：准教授

研究者番号(8桁)： 90404540

(2)研究協力者：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。