

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21116

研究課題名(和文) 多能性幹細胞由来膵島の新たな細胞機能評価法

研究課題名(英文) A new method of functional evaluation of pluripotent stem cell-derived islet

研究代表者

小長谷 周平 (Konagaya, Shuhei)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定研究員

研究者番号：60770295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から分化誘導した膵島細胞の新たな細胞機能評価法として、Microelectrode arrayによる細胞外電位計測法の確立を目指した。電極への細胞接着性を向上させることにより、単離膵島を用いた細胞外電位測定系を確立し、グルコース刺激に伴う間欠的なスパイク群の発生を測定することができた。ヒトiPS細胞由来の膵島細胞を用いた場合、細胞外電位測定が部分的には可能であったが、分化細胞の改良が必要であることが分かった。解決方法の一つとして、分化誘導した細胞の中から膵系譜の細胞を効率的に増幅させる純化培養法を新たに確立した。

研究成果の概要(英文)：To develop a new method of functional evaluation of pluripotent stem cell-derived islet, we have recorded the electrical activity of the cells using planar, extracellular electrodes arranged in a microelectrode array (MEA). Although isolated-mouse islet cells poorly adhered on MEA, the cells adhered well on the laminin-332-coated MEA. We succeeded in recording of the electrical activity of islet cells in response to glucose stimulation. We also recorded the activity of human iPS cell-derived islet cells. However, the electrical signal was very low and noisy. It might be caused by insufficient maturation and heterogeneity of the differentiated cells. As a solution, we newly developed a culture method for expansion and purification of pancreatic cells derived from human iPS cells.

研究分野：再生医療

キーワード：膵島 細胞外電位 多能性幹細胞 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

(1) インスリン依存性糖尿病の根本治療法として膵島移植が行われているが、移植膵島の不足が問題となっている。新たな細胞供給源として ES/iPS 細胞から分化誘導した膵島の利用が期待されている。膵島の重要な生理機能としてグルコース濃度に依存したインスリンの分泌があり、従来では膵島機能の評価法として、分泌されたインスリンの定量が行われている。しかし、分析に時間を要し、また、同時に個々の膵島を大量に評価することは困難である。

(2) 膵島は周辺環境のグルコース濃度に応じて、そのインスリン分泌量を変化させる。今後、ES/iPS 細胞に由来する膵島細胞の移植が実用化される中で、移植細胞の品質管理の必要性が増すことが予想される。また、グルコース濃度に応じたインスリン分泌量を基準として、品質管理された膵島を定められた量で移植することで、移植効果の向上が期待できる。分化誘導した膵島は、従来のドナー由来の分離膵島と比べ、細胞株間の差や分化誘導法によるロット間の差が生じやすいと想定されるので、移植前の膵島機能評価は必須である。膵島のインスリン分泌機能の評価する方法として、濃度の異なるグルコース液に暴露した時のインスリンまたは C-peptide の分泌量を ELISA 法で定量する手法が一般的に行われている。しかし、この手法では 4~5 時間程度の時間を要し、また、リアルタイムに膵島の細胞機能を観察することはできない。

2. 研究の目的

(1) 膵島のグルコース応答能を評価する手法として、膵島の膜電位を計測する手法が研究されてきた。古くは、パッチクランプ法による評価が試みられてきたが、計測法に習熟する必要あり、また一度に少数の膵島細胞しか計測できない問題点があった。近年、新たな膵島細胞の電気生理計測の手法として Microelectrode array (MEA) の利用が試みられてきた。この測定法では、アレイ状に配列した電極上の細胞の膜電位をリアルタイムに測定することができる。高濃度のグルコース液に暴露した時、膵島の細胞内カルシウムイオンの変動に伴う過分極・脱分極の周期的な過程をミリ秒以下の時間分解能で追跡することができる。さらには、電極上の同じ膵島を数日間にわたって繰り返し電位測定することも可能である。本研究では、ヒト iPS/ES 細胞から分化誘導した膵島細胞の新規生理機能評価法を確立することを目的とした。ES/iPS 細胞を利用した再生医療の実用化が期待されているが、より高い治療効果を発揮するには、安全性試験等の従来の評価基準に加えて、細胞機能を評価する手法の確立は必須である。膵島機能評価として、分泌インスリンの定量の補完あるいは代替となりうる分析法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞の膵島細胞への分化誘導

分化培養基材として、直径 400 μ m のマイクロウェルを 256 個有するアガロースプレートを用いた。ヒト iPS 細胞を酵素処理により単個細胞に分散させた後、アガロースプレートへ播種した。24 時間培養することで各ウェルに直径 200 - 300 μ m の細胞凝集体を形成させた。細胞凝集体を無血清培地中で 30 日間培養し、膵島細胞への分化誘導を行った。

(2) 細胞外電位測定

細胞外電位の測定には、Multi-electrode dish (MED, Alpha med scientific 社) を用いた。MED は使用する前に、30 分間 UV を照射することで滅菌した。MED の中心にある 64 個の電極を囲うように、内径 5 mm のシリコンゴムのリングを MED にのせた。マウスまたはラットより単離した膵島、あるいは、ヒト iPS 細胞から分化誘導した膵島様細胞凝集体約 100 個をシリコンゴムのリング内へ播種した。膵島が沈降した後、リングの周囲にも培地 2 mL 程度添加した。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の条件下で、2-3 日間培養し、膵島を電極上に接着させた。濃度の異なるグルコース溶液 (135mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 3 mM or 9 mM or 15 mM glucose) に暴露した時の細胞外電位を MED64 (systemALPHA MED SCIENCE) を用いて測定した。高速フーリエ変換 (Fast Fourier Transform, FFT) を用いて周波数解析を行った。3 mM、9 mM または 15 mM の異なるグルコース濃度で細胞外電位を測定したデータについて、それぞれ FFT を行った。膵島特有の周波数領域のデータを抽出し、逆フーリエ変換 (inverse fast fourier transform, IFFT) により波形を得た。

(3) 膵前駆細胞の純化培養

ヒト iPS 細胞から膵前駆細胞への分化誘導した後、上皮成長因子 (Epidermal growth factor, EGF) および R-spondin 1 (RSP01) を含む無血清培地により膵前駆細胞の増殖をさせた。6 日おきに継代培養を行い、最大 54 日間の培養を行った。

4. 研究成果

(1) まず、多能性幹細胞由来の膵島の機能評価の比較対象として、マウスおよびラットから単離した膵島を用いた細胞外電位測定を試みたが、電極への膵島の接着性が悪く、安定して細部外電位を測定ができないという問題があった。各種細胞外マトリックス (ゼラチン、マトリゲル、Laminin-111、Laminin-332) を比較検討した結果、Laminin-332 をコートした表面への膵島細胞の接着が良好であることが分かった。Laminin-332 をコーティングした電極へ膵島を接着させることで、細胞外電位の測定を行った。グルコースで刺激した時、膵島の細胞内 Ca²⁺ の変動に伴う間欠的なスパイク群の発生を測定することができた。刺激するグルコ

ース濃度を 3 mM、9 mM または 15 mM に変えたときに同時内スパイク群の発生頻度が上昇した(図 1)。測定時間内でのプラトー相の割合 (fraction of the plateau phase, FOPP) についても、グルコース濃度に依存して変化した。また、アドレナリン刺激により、膵島細胞に特有のスパイクの発生は抑えられた。アドレナリンは膵細胞に存在する 2 受容体に作用し細胞内の cAMP 濃度を低下させ、K⁺チャネルを活性化させる。その結果細胞の膵細胞からのインスリンの分泌を抑制する。

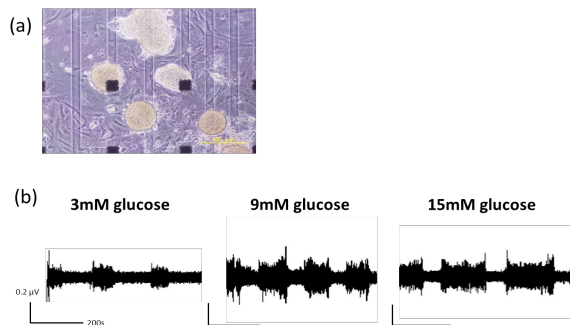


図 1 .MEA を用いた膵島の細胞外電位測定 (a)電極へ接着した膵島の位相差顕微鏡像 (b)濃度の異なるグルコース溶液に暴露した時の膵島の細胞外電位の経時変化

(2) ヒト iPS 細胞の膵島細胞への分化誘導を行った。免疫染色及びフローサイトメトリ分析を行った結果、90%以上の細胞が膵前駆細胞及び膵島細胞マーカーの PDX1 陽性であり、その多くが内分泌細胞マーカーの NKX6.1 及び Synaptophysin 陽性であった。また、60%程度の細胞が細胞マーカーの C-peptide 陽性であった(図 2)。糖負荷試験を行ったところ、分化誘導後の膵島様細胞凝集体はグルコース濃度に応じたインスリン及び C-peptide の分泌量を変化させた。

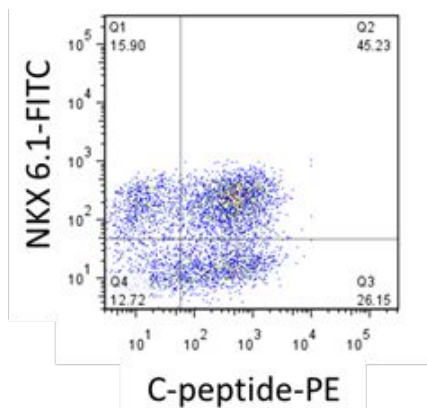


図 2. 分化誘導後のフローサイトメトリ分析結果

(3) 次に、ヒト iPS 細胞由来膵島細胞の細

胞外電位の測定を試みた。電極に接着されたヒト iPS 細胞由来膵島を 3 mM または 15 mM の異なるグルコース濃度で刺激をした時の細胞外電位を測定した結果、膵島の細胞内 Ca²⁺の変動に伴う間欠的なスパイク群の発生を測定することができた。しかし、単離膵島に比べて電位変化のシグナルは弱く、また他系譜の細胞に由来すると思われるノイズが大きく、定量的に測定することは困難であった(図 3)。膵島細胞への分化が不十分で正常な機能を獲得できていない可能性や、他の系譜の細胞の混入が考えられた。

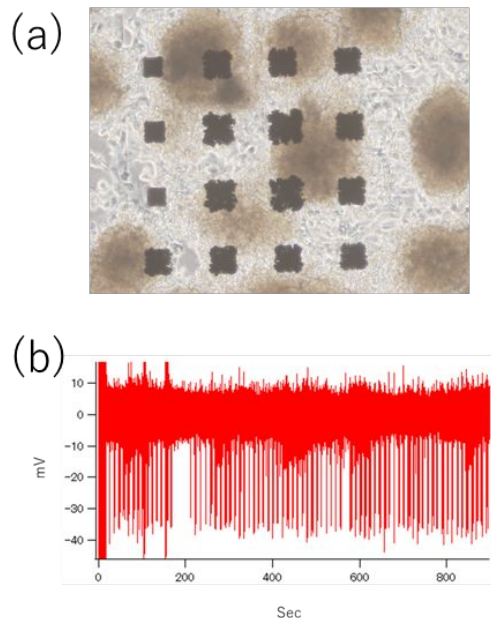


図 3. MEA を用いたヒト iPS 細胞由来膵島細胞の細胞外電位測定. (a) MEA 上に接着した細胞の位相差顕微鏡像 (b) 15mM グルコース刺激を与えた時の細胞外電位測の経時変化

(4) ヒト iPS 細胞から誘導した膵島細胞の細胞外電位計測も同様に試み、一部計測も可能であったが、ヒト iPS 細胞の株間や分化誘導した細胞のロット間で測定結果に大きな差が見られた。分化誘導効率や成熟度の差や、心筋細胞や神経細胞といった他の電位活性のある細胞の混入が影響していると推測された。分化誘導実験の過程で、膵前駆細胞を効率的に増幅させる培養法を新たに見出したので、細胞外電位測定が可能な高純度な膵島細胞の安定供給のための実験を行った。新たに開発した EGF および RSP01 を含む無血清培地を用いることにより、95%以上の純度の SOX9 及び PDX1 陽性の膵前駆細胞を得ることができた(図 4)。増幅した膵前駆細胞は凍結保存することが可能であった。さらには、長期培養により約 1 万倍に増幅することができた。また、膵内分泌細胞への成熟が可能であり、インスリン分泌能を保持していた。

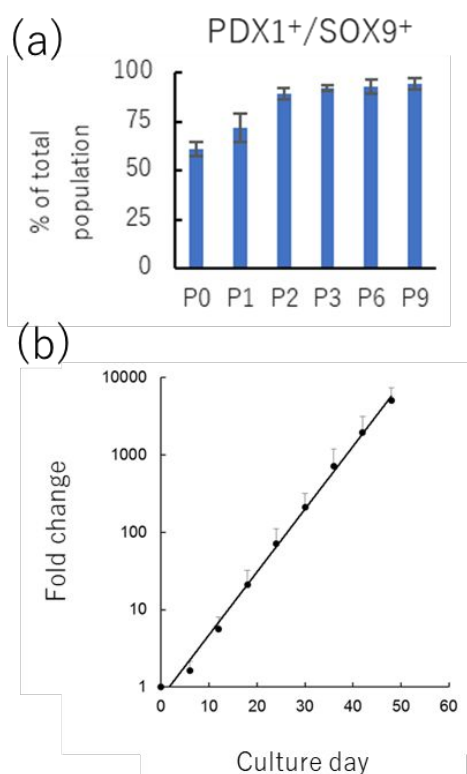


図 4. 膵前駆細胞の純化 (a) PDX1/SOX9 陽性率 (b) 細胞数の経時変化

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)

[学会発表](計 4 件)

Shuhei Konagaya, Takaharu Nishiyama, Yusuke, Arima, and Hiroo Iwata. Differentiation of human iPS cells into pancreatic endocrine cells. 11th International Symposium of The Institute Network. (2017.1.26-27 Tokushima, Japan)

小長谷周平. ヒト iPS 細胞から膵内分泌細胞への分化誘導. 医工学フォーラム-2016 年度特別学術講演会 (2017. 2.10 京都)

小長谷周平, 西山 喬晴, 有馬 祐介, 岩田 博夫. 多能性幹細胞由来膵前駆細胞の増幅. 第 44 回日本膵・膵島移植研究会. (2017. 3.10-11.京都)

Shuhei Konagaya, and Hiroo Iwata. Expansion of pancreatic progenitors derived from human induced pluripotent stem cell. Kyoto Diabetes Mini-Symposium. (2017.6.5 Kyoto, Japan)

Shuhei Konagaya, Taro Toyoda, Toyoda and Hiroo Iwata. Chemically defined conditions for the expansion of pancreatic progenitor cells derived from human iPS cells. CiRA 2017 International Symposium. (2017.11.6-8

Kyoto, Japan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小長谷 周平 (KONAGAYA Shuhei)

京都大学・iPS 細胞研究所・特定研究員

研究者番号: 60770295