

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10688

研究課題名(和文) 移植可能なiPS細胞由来膵外分泌細胞の作成と膵液流出路を確保した移植方法の確立

研究課題名(英文) Generation of pancreatic exocrine cells from iPS cells and delivery of pancreatic digestive enzymes into the gastrointestinal tract by pancreatic exocrine tissue transplant

研究代表者

阪本 良弘 (Yoshihiro, Sakamoto)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：70343746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞技術の急速な発展に伴い膵外分泌細胞を多能性幹細胞から作成することが可能となり、膵外分泌機能不全に対して再生医療学的な治療アプローチが期待されている。一方で、作成された膵外分泌細胞を如何にして機能的に生体へ移植するかは未解決の課題である。本研究では3次元浮遊攪拌培養技術を用いてヒトiPS細胞より膵外分泌細胞の分化誘導を行った。また、移植モデルとして、ラットの膵外分泌細胞を胃粘膜下層へ同型移植し、3日後に移植部位の粘膜筋板を焼灼することで、移植した膵外分泌細胞が生着すること、および胃内へ膵消化酵素を分泌することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、1) iPS細胞から膵外分泌細胞を分化誘導することが可能であった、2) 膵外分泌細胞の機能的に胃粘膜下層へ同型移植することが可能であった、3) 同手法を用いてiPS細胞由来膵外分泌細胞をNudeラットの胃粘膜下層へ移植し、機能的な移植が可能であることが示唆された。近年の幹細胞技術の発展により、様々な疾患に対する再生医療学的アプローチが期待されている。本研究の結果は、膵外分泌機能不全に対する再生医療学的なアプローチの臨床応用につながることを期待できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Exocrine pancreatic insufficiency, caused by disease-induced loss of pancreatic exocrine cells, may be treated through regenerative stem cell technologies that facilitate the production of pancreatic exocrine cells from induced pluripotent stem cells (iPSCs). However, delivering the digestive enzymes produced in the transplanted cells to the gastrointestinal tract remains a challenge. Human iPSCs were differentiated into pancreatic exocrine cells by stage-specific treatment with growth factors and chemical compounds, and the differentiated pancreatic cells were implanted into the gastric submucosal space of nude rats with ablation of muscularis mucosa. The transplanted cells were engrafted, and amylase was detected in the gastric juice in some cases.

研究分野：再生医療

キーワード：iPS細胞 膵外分泌機能不全 再生医療

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵外分泌機能不全は、膵消化酵素の不足による食物の消化不全と低栄養を特徴とする疾患である。原因として嚢胞性線維症、1型糖尿病、慢性膵炎、膵切除後などが挙げられ、症状としては腹痛、脂肪便、低栄養を認める。また、膵外分泌機能不全では低栄養に伴う心血管疾患などによる死亡率が高いことが報告されている。現時点での治療は食事療法と経口膵酵素補充療法であるが、腹痛や脂肪便が残存するなどその効果は限定的であり、また、生涯にわたり治療を継続する必要がある。

近年の幹細胞技術の発展により、ヒト多能性幹細胞から様々な種類の体細胞を分化誘導することが可能となり、疾患や外科的処置により失われてしまった臓器機能に対する再生医療的な治療アプローチが期待されている。膵臓の細胞について、ES細胞やiPS細胞から内分泌細胞である細胞を誘導したとする報告は多数見られるが、膵腺房細胞や膵管細胞などの外分泌機能に関わる細胞の分化誘導についての報告は少ない。また、誘導された膵外分泌細胞を生体に移植して、膵外分泌機能不全に対する細胞補充療法を行った報告はなされていない。

2. 研究の目的

iPS細胞からの膵外分泌細胞の誘導、および、膵外分泌細胞を機能的に生体に移植する手法を開発すること。

3. 研究の方法

・iPS細胞からの膵外分泌細胞の誘導

iPS細胞を接着培養から浮遊攪拌培養に移行したのち、二日間の培養で細胞凝集塊を形成し、Stage 1-5の多段階誘導法により胚体内胚葉 (Day6)、前腸 (Day9)、後部前腸 (Day11) を経て膵前駆細胞 (Day17) を誘導した。更に、低付着性培養皿にて二週間の静置培養を行うことで膵腺房細胞・膵管細胞へ誘導を行った (Day31)。Stage 1の培地は StemPro34 medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) に 50 µg/mL ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich)、400 µM 1-thioglycerol (Sigma-Aldrich) を添加したものを、Stage 2-5の段階では improved MEM medium (Life Technologies) に 1% B27 supplement (Life Technologies)、400 µM monothioglycerol (Sigma-Aldrich) を添加したものを使用した。Stage 4までは 30ml の三次元培養槽による浮遊攪拌培養を行い、Stage 5からは低付着性培養皿である 10 cm HydroCell plate (CellSeed, Tokyo, Japan) による静置培養を行った。

各培養段階で以下の分化誘導因子の添加を行った。Stage 1の day 3では 100 ng/mL Activin A (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、3 µM CHIR 99021 (TOCRIS Bioscience, Bristol, UK) を添加し、Stage 1の day 4-5では CHIR 99021 を除いた 100 ng/mL Activin A のみを添加した。Stage 2 (day 6-8) では 50 ng/mL KGF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)、10 mM SB431542 (TOCRIS)、1 µM dorsomorphin (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) を添加した。Stage 3 (day 9-10) では 3 nM TNPB (Sigma-Aldrich)、2.5 µM cyclopamine (Sigma-Aldrich)、50 ng/mL Noggin (StemRD, Burlingame, CA, USA) を添加した。Stage 4 (day 11-16) では 50 ng/mL KGF、50 ng/mL Noggin、50 ng/mL EGF (Peprotech) を添加した。培地交換は、Stage 2 および Stage 3 では各ステージ初日のみ、Stage 4 では 2 日毎に行った。

・膵外分泌細胞を機能的に生体に移植する手法

オスの 8-10 週齢 F344/Jcl ラットを開腹し、膵臓の左側半分を摘出した。摘出した膵臓をミンスにより小さく破碎し、破碎膵組織片を回収した。回収した小膵組織片をオスの 8-10 週齢 F344/Jcl ラットの胃粘膜下に移植した。回収した小膵組織片をオスの 8-10 週齢 F344/Jcl ラットの胃粘膜下に移植した。24 時間絶食の後、開腹下にラットの胃を周囲の組織から授動した。前胃の大彎側を約 1cm 切開し胃内腔を生理食塩水で洗浄した。膵小組織片溶解液 200 µL (5×10^6 cells) を、ラット膵胃背側の胃粘膜下層に 23G 針で注入した。切開した胃を 5-0 Vicryl で 1 層に連続縫合閉鎖し、胃を生理的な位置に還納したのちに閉創した。

小膵組織片移植後 3 日目に再度開腹し、移植時に切開した部位で胃を再度開放した。モノローラー電気メスを用いて膨隆した移植部位を焼灼し、粘膜および粘膜筋板を傷害した胃潰瘍を作成した。解放した胃を 5-0 Vicryl で 1 層に連続縫合閉鎖し、胃を生理的な位置に還納したのちに閉創した。胃潰瘍作成後は Lansoprazole (Takeda, Osaka, Japan) を 10 mg/kg/day で連日投与した。移植後 21 日目で胃液の採取、サクリファイスを行った。

また、iPS細胞より誘導された膵外分泌細胞の細胞凝集塊も同様の手法でヌードラットに移植を行った。

4. 研究成果

誘導した iPS 細胞全体の 40-60% を膵腺房細胞に、20% を膵管細胞に誘導することが可能であった。膵外分泌細胞の移植に際しては、1) ラット膵外分泌細胞を胃粘膜下層へ同種移植、2) 移植部位の粘膜筋板を焼灼して胃潰瘍を作成、3) 潰瘍の治癒、というプロセスを経るこ

とで、移植組織から胃内腔に膵消化酵素が分泌され、膵外分泌細胞を機能的に同種移植することが可能であった。また、iPS細胞から誘導された膵外分泌細胞を同様の手法でヌードラットの胃粘膜下へ移植し、一部で移植組織の生着および胃内へのアミラーゼ分泌が確認され、iPS細胞由来膵外分泌細胞を移植することによる、膵外分泌酵素補充療法の可能性が示唆された。

研究成果につき Scientific Reports 誌に論文報告を行い(2019 Apr 11;9(1):5922.)、また、2019年度の日本再生医療学会、Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society Americasにて学会発表を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Kyoji Ito	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Delivery of pancreatic digestive enzymes into the gastrointestinal tract by pancreatic exocrine tissue transplant.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-42362-z.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤橋司
2. 発表標題 膵外分泌機能不全治療を目的とした膵外分泌細胞移植法に関する研究
3. 学会等名 第18回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤橋司
2. 発表標題 iPS由来膵外分泌細胞による膵外分泌機能不全治療のための基礎研究
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	松浦 勝久 (Katsuhisa Matsuura) (70433993)	東京女子医科大学・医学部・准教授 (32653)	