

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08510

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞から膵芽細胞への分化調節分子の同定とその役割の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms regulating the differentiation for pancreatic bud-like cells from human pluripotent stem cells

研究代表者

豊田 太郎 (TOYODA, TARO)

京都大学・iPS細胞研究所・講師

研究者番号：60593530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膵臓の元となる膵芽細胞の目印となる遺伝子NKX6.1を指標として、ヒトiPS細胞から膵芽細胞への分化を調節する分子を網羅的に探索・同定し、その役割を明らかにすることを目的とした。このため、遺伝子の発現を抑制するsiRNAを細胞に導入することで、網羅的に各遺伝子の機能を解析する系を構築した。この系を用いた網羅的な遺伝子の解析から、新たな制御分子候補を得た。候補遺伝子の詳細な解析の結果、当該分子は膵芽への分化を調節する新規の分子としての役割を担うことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、ヒト幹細胞から膵芽細胞への分化機序や、試験管内で高効率に作製する方法は確立されていない。本研究では、ヒトiPS細胞からNKX6.1+細胞への分化を調節する新規の分子を同定した。本研究で解明したヒト多能性幹細胞からのNKX6.1+細胞の分化の仕組みは、膵臓に関連した疾患の対策に向け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. In this study, we aimed to exhaustively search molecules which regulate the differentiation into NKX6.1+ cells from human iPS cells. We have developed the screening system with using siRNA libraries to knock-down target genes for the analysis. We identified novel target molecule candidates and clarified that one of the target molecules promotes the differentiation. The mechanism we identified in this study may be useful for both basic research and clinical application using pancreatic cells.

研究分野：再生医学

キーワード：NKX6.1 PDX1 膵臓 iPS細胞 ES細胞 siRNA 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

近年、移植医療や創薬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 90% 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き、ヒト ES/iPS 細胞から様々な膵細胞を分化誘導することが可能となってきた。例えば、ヒト ES/iPS 細胞から作製した、膵芽細胞 (PDX1⁺NKX6.1⁺) が含まれる細胞分画は、移植後に *in vivo* の環境下で機能的な膵細胞へと分化・成熟することから、胎生期の膵と同様の細胞であることが示されている (Kelly, 2011)。また、作製したヒト成体膵に近い膵細胞を移植することで糖尿病モデル動物を治療できることも報告されている (Pagliuca W, 2014; Reznika A, 2014)。

しかし、膵細胞の分化誘導は細胞株間で効率が異なること、ロットごとに不安定であること、さらには目的外細胞が混入したりするなどといった問題点があり、膵細胞の分化誘導法は未だ確立されていない。この原因として、これまでの分化誘導法は使用された各幹細胞株に適した条件が一部満たされているだけで、膵細胞への分化機序の全貌の解明に基づく普遍的な方法ではないからと考えている。

膵臓は、膵前駆細胞 (PDX1⁺) から膵芽と呼ばれる細胞塊を形成することで初めて形態学的に認識可能となる。膵芽細胞 (NKX6.1⁺) は膵臓にのみ分化する最初の細胞種であると考えられるため、我々は、効率的な膵細胞作製に向けて、膵芽細胞への分化段階に着目している。液性因子に注目した研究が多い中、申請者は細胞の物理的環境も膵芽細胞への分化調節因子であることを見出した。(Toyoda T, 2015) そして、細胞骨格変化に関連するシグナル伝達経路に注目し、低分子化合物を用いた検討から ROCK-非筋ミオシン経路の活性化が膵芽細胞への分化過程に抑制的に働くことを示した (Toyoda T, 2017)。しかしながら、ROCK の下流である非筋ミオシンは構造タンパク質であるため、膵芽細胞への分化すなわち NKX6.1 の発現調節には転写調節に関係する他の分子が存在すると考えた。また、低分子化合物を用いた検討は有効であるものの標的分子に特異的でない可能性もあり、他の経路や分子の関与も考えられる。このため、分子生物学的手法による特異的な検討や、分子レベルでの網羅的な解析が必要である。

2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞から膵芽細胞 (NKX6.1⁺) への分化調節に関わる分子を同定し、その役割を解明することで、ヒト膵発生の分子機構に基づく理解と、ヒト iPS 細胞からの安定かつ効率的な膵細胞の分化誘導法開発の基礎を築く。

3. 研究の方法

(1) siRNA を用いた膵芽細胞への分化制御分子の網羅的探索

膵前駆細胞 (PDX1⁺) から膵芽細胞 (NKX6.1⁺) への分化に関わる分子を同定するために、siRNA 導入による網羅的な遺伝子発現抑制スクリーニングを実施した。96-well プレートに播種した膵前駆細胞を膵芽細胞へと分化誘導させ、この過程で siRNA オリゴヌクレオチドを導入した。培養終了後に細胞を固定し、NKX6.1⁺細胞率を免疫染色にて評価した。siRNA オリゴヌクレオチドは、シグナル伝達との関連が深いキナーゼや転写因子を標的とするものを用いた。同一オリゴヌクレオチドによる二回の試行にて再現性良く NKX6.1⁺細胞への分化を抑制あるいは促進する siRNA の標的分子を候補分子とした。

(2) 候補分子の膵芽細胞への分化過程における役割の推定

候補分子の中から、別の配列の siRNA オリゴヌクレオチドで処理しても再現されるものに絞り込み、siRNA の標的分子の情報から経路を推定し、解析の優先順位を決定した。続いて、候補分子の膵芽分化への関与が、普遍的な現象であることを示すため、他の細胞株でも再現されるか検証した。また、分化誘導過程における候補分子の発現量の変化を、異なる培養形態で経時的に測定した。

(3) 発現量を操作した細胞を用いた候補分子の役割の解析

膵芽への分化を制御する既知の分子として PDX1 がある。そこで、候補分子の PDX1 との上下関係を明らかにするため、PDX1 の発現抑制が候補分子の発現量を変化させるか、逆に、候補分子の発現抑制が、PDX1 の発現量を変化させるか検討した。また、候補分子の強制発現が、膵芽細胞への分化に影響するか検討した。さらに、候補分子の発現量を抑制した細胞の遺伝子発現プロファイルを得ることで、後方前腸由来の膵周囲の細胞種との関係性を推測した。

4. 研究成果

(1) PDX1 が NKX6.1 の発現調節に関わると考えられている。まず、スクリーニング系の妥当性を示すために、PDX1 に対する siRNA オリゴヌクレオチドを導入してウェル間のばらつきや検出感度を測定した。ヒト iPS 細胞から膵前駆細胞を (PDX1⁺) を作製し、これをスクリーニング用のプレートに再播種した。続く、膵芽細胞への分化誘導と同時に PDX1 に対する siRNA オリゴヌクレオチドを導入し、その対照として導入試薬のみの群を比較したところ、Z' factor は 0.022 ± 0.14 となり、実施可能なスクリーニング系であることが示唆された。続いて、この系にて転写因子を標的とした siRNA ライブラリを評価し、NKX6.1⁺細胞率を上昇あるいは低下させる分子の一次候補として、29 種類を得た。それらの候補について再現性を確認し、二次候補として、9 種類を得た。

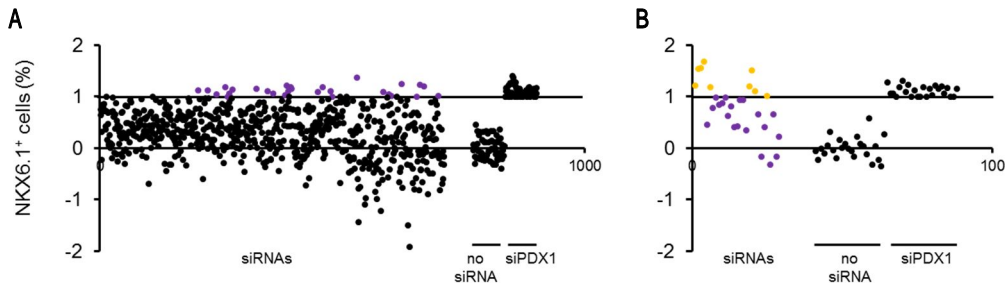


図1 膵芽細胞への分化に代わる分子の siRNA スクリーニング

膵前駆細胞から膵芽細胞への分化誘導過程において様々な遺伝子に対する siRNA オリゴヌクレオチドを添加し、培養後に免疫染色にて NKX6.1⁺細胞率を評価した。A) 一次スクリーニング。B) 二次スクリーニング。

(2) 候補分子に対して、スクリーニングとは異なる配列の siRNA オリゴヌクレオチドで再現性を確認したところ、3 種類の遺伝子が候補として得られた。これらのうち、発現抑制による顕著な細胞数低下がみられず、フローサイトメトリーでも免疫染色と同様の NKX6.1⁺細胞割合低下を認めるものに注目した。続いて、当該分子の発現抑制による NKX6.1⁺細胞率の低下が、これまでで使用してきた 585A1 株だけでなく他の細胞株でも再現されるか、他の iPS 細胞株 (Ff-101) およびヒト ES 細胞株 (KhES-3) を用いて検討した。いずれの細胞株においても、当該遺伝子の発現抑制は NKX6.1⁺細胞率を低下させたことから、当該分子は細胞株に依存せず、NKX6.1 の発現を制御することが示唆された。

未分化 iPS 細胞から膵芽細胞への分化誘導過程における当該遺伝子の mRNA 発現量を経時的に測定したところ、未分化細胞では発現がなく、内胚葉、後方前腸への分化過程で漸次的に増加し、膵芽への分化段階にて、顕著に増加していた。また、膵芽細胞への分化段階での顕著な増加は再播種の有無に関わらず起こり、NKX6.1 の発現に先んじていた。これらの結果から、当該分子の発現量の増加が NKX6.1 の発現開始に寄与すると考えられた。

(3)

当該分子が膵芽への分化を制御する既知の分子である PDX1 の上流あるいは下流として機能するかを明らかにするために、PDX1 あるいは当該分子の発現抑制がそれぞれの発現量を増減させるか検討した。当該遺伝子の siRNA による発現抑制は PDX1 の mRNA 発現量に影響しなかった。また、PDX1 の siRNA による発現抑制は当該遺伝子の mRNA 発現量に影響しなかった。これらのことから、当該分子と PDX1 は独立して NKX6.1 の発現を制御していることが示唆された。逆に、膵芽細胞への分化過程において当該分子の発現量をプラスミド遺伝子導入にて一過性に増加させたところ、NKX6.1 の mRNA 発現量が増加した。また、当該遺伝子の siRNA による発現抑制は NKX6.1 のみならず、他の膵芽の指標である PTF1A の mRNA 発現量も低下させ、遺伝子導入による当該分子の増加は PTF1A の mRNA 発現量も増加させた。これらの結果から、当該分子は NKX6.1 の発現制御だけでなく、膵芽細胞への分化を制御すると考えられた。

膵芽が形成される後方前腸からは肝、十二指腸、胆管が、隣接して形成される。そこで、後方前腸から膵芽細胞への分化過程において当該遺伝子の発現抑制の有無が膵周辺領域の細胞種への分化に影響を与えるか、遺伝子発現プロファイルを RNA シーケンシングにて比較した。当該遺伝子の発現抑制は、肝、十二指腸、胆管のマーカーの遺伝子発現を増加させることはなかったことから、当該分子の発現量増加は、他臓器への分化を制御には関わらず、後方前腸から膵芽の出芽のみ関与すると考えられた。

本研究で明らかとなったヒト多能性幹細胞からの膵芽細胞への分化機構は、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

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2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 Kimura Azuma, Toyoda Taro, Iwasaki Mio, Hiramata Ryusuke, Osafune Kenji	4. 巻 27
2. 論文標題 Combined Omics Approaches Reveal the Roles of Non-canonical WNT7B Signaling and YY1 in the Proliferation of Human Pancreatic Progenitor Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1561 ~ 1572.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2020.08.018	査読の有無 有
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 豊田太郎、畑野悠、長船健二	4. 巻 12
2. 論文標題 膵臓再生の up to date	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 腎臓内科	6. 最初と最後の頁 329-336
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 Toyoda Taro, Kimura Azuma, Tanaka Hiromi, Osafune Kenji	4. 巻 145
2. 論文標題 Efficient Generation of Pancreas/Duodenum Homeobox Protein 1+ Posterior Foregut/Pancreatic Progenitors from hPSCs in Adhesion Cultures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/57641	査読の有無 有
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 美馬 淳志、豊田 太郎、長船 健二	4. 巻 115
2. 論文標題 膵再生医療の現況と展望	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本消化器病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 681 ~ 690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11405/nisshoshi.115.681	査読の有無 無
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 木村東、豊田太郎、岩崎未央、平間竜介、長船健二
2. 発表標題 再生医療応用に向けたヒト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20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toyoda T
2. 発表標題 Pancreatic research with iPSC technology.
3. 学会等名 The 2nd Technion-Kyoto Joint Symposium
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 木村東、豊田太郎、長船健二（編集：門脇 孝、荒木 栄一、綿田 裕孝	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 348（そのうち275-276）
3. 書名 糖尿病最新の治療2019-2021（そのうち「XV 2. 再生医療」）	

〔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
連携研究者	長船 健二 (Osafune Kenji) (80502947)	京都大学・iPS細胞研究所・教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	太田 章 (Ohta Akira) (00168931)	京都大学・iPS細胞研究所・特命教授 (14301)	

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