

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16209

研究課題名（和文）分化過程の経時的遺伝子発現解析による成熟膵細胞への新たな分化転換法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a new differentiation conversion method to mature pancreatic beta cells by analysis of gene expression over time during differentiation process

研究代表者

松田 恵理子（MATSUDA, Eriko）

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：20815914

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ダイレクトリプログラミング（DR）法は、自立再生能を保持しない臓器・細胞の疾患の根治療法として発展が期待されている。1型糖尿病は自己免疫による細胞破壊から絶対的なインスリン欠乏により発症する疾患であり根治療法としてDR法による細胞への分化転換の報告はされているが、グルコース応答性を示す機能的な細胞の作製には至っていない。機能的に成熟した細胞への分化転換には新たな分化転換因子の探索と解析が必要である。そこで、細胞の機能的成熟化の過程の一端を解明するため、経時的遺伝子発現解析に用いるACT-SCレポーター細胞の機能検証を行った結果、特定安全領域における導入遺伝子の発現に予想外の結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病は自己免疫反応による細胞の破壊によって引き起こされ、重度の高血糖を引き起こす。治療の主体はインスリン療法のみであるため、細胞量を維持・回復するための介入方法の開発が求められている。細胞など自立再生能を保持しない臓器・細胞の疾患の根治療法として発展が期待されるDR法は誘導効率が低いため、機能的に成熟した細胞への分化転換には新たな分化転換因子の探索と解析が必要である。ヒトES/iPS細胞から目的細胞への分化段階に応じた遺伝子発現解析法を確立させることは、新規分化転換因子の獲得を可能とし、DR法による目的細胞への分化転換効率の改善と、成熟細胞への分化転換法の確立に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Direct reprogramming is expected to be developed as a curative therapy for diseases of organs and cells that do not retain the ability to regenerate on their own. Although there have been reports on the conversion of cells to functional glucose-responsive cells by direct reprogramming as a curative therapy, the creation of functional cells has not yet been achieved. The search for and analysis of new differentiation factors are necessary for the differentiation conversion to functionally mature cells. To elucidate a part of the process of functional maturation of cells, we verified the function of ACT-SC reporter cells used for temporal gene expression analysis, and obtained unexpected results in transgene expression in specific safety regions.

研究分野：再生医療

キーワード：ダイレクトリプログラミング 再生医療 細胞 糖尿病

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

インスリンは血糖を低下させる唯一のホルモンであり、膵β細胞はインスリン分泌に高度に分化した細胞である。この膵β細胞が自己免疫により破壊され、絶対的なインスリン欠乏状態に至る疾患が1型糖尿病である。この疾患に対する治療法として膵臓・膵島移植が行われているが、慢性的なドナー不足解消などの課題を抱えている。近年、革新的な医療・医薬創出の基盤ツールとして期待されるヒトES/iPS細胞より、膵発生過程を模倣する分化誘導法を用いて、多段階における膵β細胞への分化誘導法が確立され、グルコース応答性膵β細胞を分化誘導した報告も出てきている(Yoshihara *et al* 2016 など)。さらに、ヒトES細胞由来膵前駆細胞を用いた治験がアメリカで始まっており、膵β細胞の再生医療の実現化に向けた研究が進んでいる。

一方で、ES/iPS細胞には「移植細胞中に残存する未分化細胞由来の奇形腫形成」や、さらに「それらの細胞が悪性化することによる発がんの危険性」という共通の問題が依然として残っている。近年開発されたダイレクトリプログラミング(DR)法は、体細胞からES/iPS細胞を経ずに直接目的細胞へと分化誘導できることから、ES/iPS細胞の腫瘍化問題を回避することができる。また、倫理的問題の軽減、目的細胞を得るまでの速さや再現性の高さなど、ヒトへの臨床応用に対する利点が多く、根治療法が未だに確立されていない疾患の新たな治療法としての発展が期待される。1型糖尿病の治療法としての最終目標は、膵外分泌細胞(腺房細胞)から直接膵β細胞への転換であり、これはDR法を用いてでは成し得ない根治療法であるが、そこに至るまでの課題は多い。これまでに、DR法による膵β細胞への分化転換において、線維芽細胞からインスリン産生細胞を作製し、治療効果の一部を確認した報告がされている(Zhou Q *et al* 2008 など)。しかし、1型糖尿病の根治療法に不可欠な機能的に成熟したグルコース応答性膵β細胞には至っておらず、新たな誘導因子の探索が重要視されている。そのためには、膵発生過程のある1点に着目した遺伝子発現による分化誘導法でなく、多段階における経時的な遺伝子発現解析により、膵β細胞の機能的成熟化の過程の一端を解き明かすことが必要である。そのためには、細胞の分化段階に応じた経時的な遺伝子発現解析法の確立がまず必要である。

### 2. 研究の目的

DR法に必要な因子は、目的細胞の発生・分化時に機能している因子である。申請者は、DR法による成熟膵β細胞転換法の確立には、膵β細胞の分化段階に応じた経時的な遺伝子発現解析の確立が必要と考えた。そこで、当研究室指導者の小賤健一郎(研究協力者)らが開発したどのような目的(分化)細胞でも、特異的に可視化し、確実に同定・単離する標準化技術(Adenoviral Conditional Targeting in Stem Cell; ACT-SC法)を用いることで、必要な因子の探索が可能と考えた。ACT-SC法では、組織特異的プロモーター(Tissue-Specific promoter: TS)下でCreを発現させるアデノウイルス(Ad.TS-Cre)と、強力な恒常発現プロモーター下にloxP配列で挟まれたNeo<sup>R</sup>とそれに次ぐEGFP(CApr-loxP-Neo<sup>R</sup>-loxP-EGFP: CA-LNE)を持つアデノウイルス(Ad.CA-LNE)が、目的細胞内でのみCre発現によるloxP配列リコンビネーション反応を起こすことにより、目的分化細胞を特異的に、かつ確実に可視化することができる。これまでにマウスES細胞で心筋細胞の単離を成功させ、ACT-SC法の有用性を実

証している(Takahashi *et al* 2006, 国内特許取得済)。この技術を応用し、膵  $\beta$  細胞分化誘導時に機能する Ad.TS-Cre を作製し、各分化段階の細胞を経時的に単離・解析することで、様々な分化段階に応じた分化誘導因子を特定することができると考えた。

### 3. 研究の方法

- (1) ES 細胞から膵  $\beta$  細胞への分化誘導系の確立
  - ・ 現在既報のマウス/ヒト ES 細胞からの膵  $\beta$  細胞分化誘導系を基に、ACT-SC レポーター細胞 (ヒト ES 細胞) を用いた成熟膵  $\beta$  細胞誘導系を確立する。
- (2) DR 法による膵  $\beta$  細胞への分化誘導系の確立
  - ・ 現在既報の DR 法で用いられている膵  $\beta$  細胞分化誘導因子 (Pdx1, Ngn3, および Mafa など) を用いて、線維芽細胞からの分化誘導系を確立する。
- (3) 膵  $\beta$  細胞の発生段階に応じた特異的プロモーターを用いた発現調節アデノウイルスベクターの作製
  - ・ 膵  $\beta$  細胞の各分化段階において高発現する遺伝子のプロモーター (初期 : Sox9, HNF1 $\beta$  など、中期 : Ngn3 など、後期 : Pdx1 など) を持つ、発現調節アデノウイルスベクターを作製する。
- (4) 膵  $\beta$  細胞の成熟に関わる遺伝子および miRNA の探索と解析
  - ・ 膵  $\beta$  細胞成熟化の各段階において、改良 ACT-SC 法を用いて細胞の単離を行い、分化誘導遺伝子および miRNA 発現について、網羅的に探索する。
- (5) 膵  $\beta$  細胞の成熟に関わる遺伝子および miRNA の探索と解析
  - ・ 前年度に引き続き、膵  $\beta$  細胞の分化段階に特異的発現遺伝子および miRNA の探索と解析を行い、成熟膵  $\beta$  細胞への誘導を促進する新たな候補因子の解析を行う。
- (6) DR 法による成熟膵  $\beta$  細胞への分化誘導系の確立
  - ・ (4), (5) で特定した分化誘導遺伝子を用いて、成熟した膵  $\beta$  細胞への誘導効率について検証する。
- (7) DR 法により分化誘導した成熟膵  $\beta$  細胞の機能検証
  - ・ インスリン産生細胞の増殖量およびインスリン分泌量の確認を行う。
  - ・ グルコース応答性によるインスリン分泌能について検証を行う。
- (8) 実験動物による成熟膵  $\beta$  細胞分化転換遺伝子の機能検証
  - ・ *in vitro* で分化誘導した成熟膵  $\beta$  細胞を免疫不全マウスに移植し、膵  $\beta$  細胞の機能検証ならびに安全性について確認を行う。
  - ・ ウイルスベクターを用いて、免疫不全マウスの腺房細胞に成熟膵  $\beta$  細胞への分化転換遺伝子を導入し、分化転換遺伝子の発現と安全性を確認する。

### 4. 研究成果

$\beta$  細胞の成熟に関わる遺伝子の経時的な発現解析に使用する ACT-SC レポーター細胞の機能検証において、予想外の結果を得たことから、経時的遺伝子発現解析のさらなる効率化を図るため、ACT-SC レポーター細胞の特定安全領域に挿入した遺伝子の発現について詳細な解析を進めた。また、 $\beta$  細胞の発生段階に応じた特異的プロモーターを用いた発現調節アデノウイルスベクターの作製についても試験を進めた。このように、3.に記載した当初の計画では予期でき

ない結果を得たことから計画に一部変更を生じたが、分化過程の経時的遺伝子発現解析法の確立に向け、研究を進めることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 松田 恵理子
2. 発表標題 多能性幹細胞での再生医療のための目的細胞単離の独自ベクター技術の開発
3. 学会等名 日本遺伝子細胞治療学会第3回若手研究会セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田 恵理子
2. 発表標題 多能性幹細胞における目的細胞単離の独自ベクター技術の開発
3. 学会等名 第12回 桜ヶ丘地区基礎系研究発表会
4. 発表年 2019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
研究協力者	小賤 健一郎  (KOSAI Ken-ichiro)		
研究協力者	三井 薫  (MITSUI Kaoru)		

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
---------	---------