

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09051

研究課題名(和文) TASCLを用いた人工膵幹細胞からインスリン分泌細胞への分化誘導法の開発

研究課題名(英文) Development of the differentiation derivative methods from induced tissue-specific pancreatic stem cells using TASCL to insulin excretory cells

研究代表者

潮平 知佳 (SHIOHIRA, CHIKA)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50325833

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、人工組織特異的膵幹細胞(induced tissue specific pancreatic stem cells:iTS-P細胞)をマイクロデバイスTASCLを用いて細胞塊のサイズを実際の膵島細胞の大きさに合わせ、さらに細胞移植に必要な細胞塊を一度に大量に作成するためにマイクロデバイスTASCLに改良を加え、人工インスリン分泌細胞塊の作成に成功した。

また、作成した人工インスリン分泌細胞を糖尿病マウスの腎皮膜下に移植して、血糖値の経時的な降下作用を確認した。TASCLに改良を加え、作成したiTS-P細胞に応用することで効率よい人工インスリン分泌細胞の作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ES/iPS細胞からインスリン分泌細胞への分化誘導を行う研究は数多くあるが、分化誘導効率が低いのが現状である。iTS細胞研究においては、研究代表者の施設が先駆的に行っており世界をリードしている。また、研究分担者の池内は、均一胚葉体を一度に大量に作製でき、その胚葉体の形状やサイズをコントロールするマイクロデバイスTASCLを作製し特許を取得している。本研究においてインスリン分泌細胞を短期間、低コストで効率よく作製するために、我々が樹立したiTS-P細胞とマイクロデバイスTASCLを組み合わせることで血糖降下作用を持った、人工インスリン分泌細胞を効率よく一度に大量に作製することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we succeeded in producing the cell mass of artificial insulin excretory cells from induced tissue specific pancreatic stem (iTS-P) cells using microdevice TASC. We were possible to make the cell mass which is necessary for transplantation in large quantities concurrently. Furthermore, we transplanted the insulin excretory cells under the capsule of the kidney of diabetes mouse and confirmed a diachronic descent effect of the blood glucose level.

研究分野：再生医療学

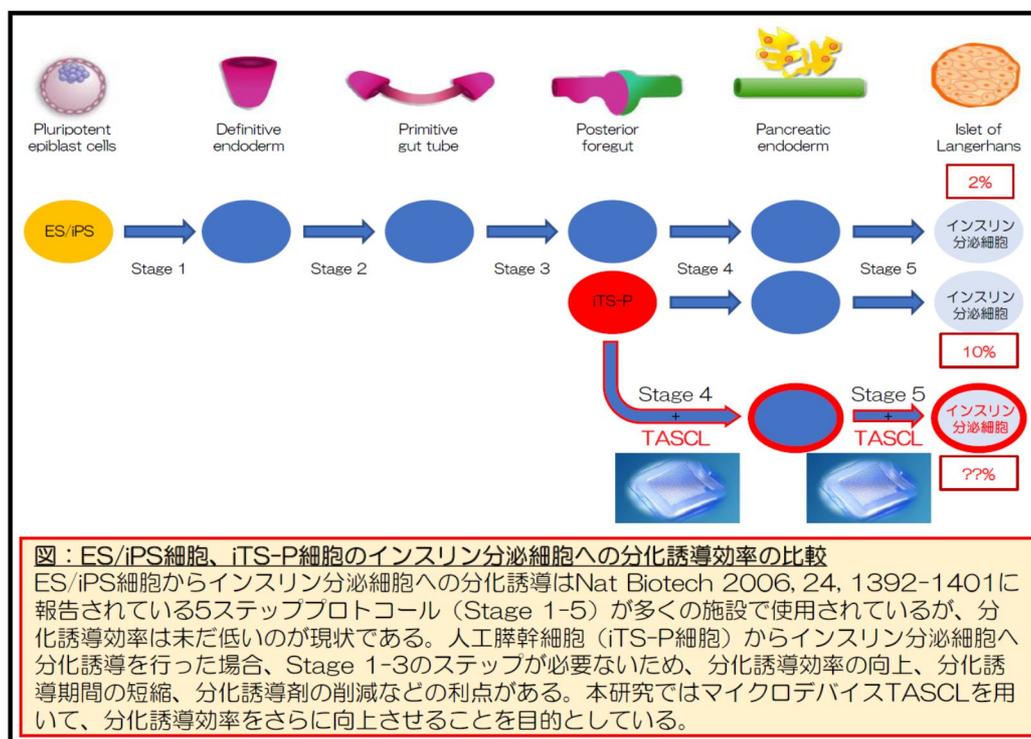
キーワード：組織特異的幹細胞 iTS-P TASCL 3次元培養 マイクロデバイス インスリン分泌細胞 糖尿病マウス
血糖降下作用

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本で5-15万人いるといわれる 型糖尿病は、急性合併症の低血糖発作や慢性合併症の腎不全などを伴うと生命の危険にさらされる。現在、糖尿病に対する移植療法には膵臓移植と膵島移植がある。膵臓移植は比較的大きな手術を必要とするのに対し、膵島移植は分離した膵ランゲルハンス島を経門脈的に注入するだけであり、外科的手術を必要とせず、重症の糖尿病患者にも行うことができる。しかしながら、最大の問題点はドナー不足であり、この臓器不足を解消する手段を確立することは非常に有意義であると考えられる。そこで我々はこれまでに、iPS細胞作製技術を応用して、人工組織特異的幹細胞(induced tissue-specific stem cells: iTSC細胞)を各組織から作製することに成功した(Noguchi H et al. Cell Death Differ (IF 8.000))。iTSC細胞の利点として、1)樹立効率がiPS細胞よりも高い、2)分化誘導効率が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点があげられる。本研究代表者は、自律複製型RNAを用いて、染色体を傷つけることなく人工膵幹細胞(iTSC-P細胞)を作製することに成功した(Miyagi-Shiohira C et al. Sci Rep (IF:4.122))。この細胞のインスリン分泌細胞への分化誘導効率はES細胞の3-6倍高く、同時にスフェロイド培養(3次元培養)のほうが接着培養(2次元培養)よりも分化誘導効率が高いことを報告している。一方、研究分担者の池内らが開発したマイクロデバイスTASCLは、一度の細胞播種操作で均一かつ大量の胚様体を形成できる新規培養デバイスであり、従来法よりも効率的に胚葉体の形成が可能であることを報告している(Yukawa H et al. Biomaterials (IF 8.806))。TASCLを用いた3次元培養は、iTSC-P細胞からインスリン分泌細胞への分化誘導にも有効であると考えられる(下図)。



これまでにES/iPS細胞からインスリン分泌細胞への分化誘導が、多くの施設で試みられている。ES/iPS細胞を用いた場合、膵幹・前駆細胞への分化誘導(上図のStage 1-3)のステップが必要となるが、膵幹細胞と同じ機能を持つiTSC-P細胞を用いた場合はこのステップが必要ない。そのためiTSC-P細胞の使用は、分化誘導効率を向上、分化誘導期間の短縮、コスト面の削減などにつながり、臨床応用化を考慮した場合利点が多い。しかしながらiTSC-P細胞を用いた場合も、最終分化細胞への分化誘導(上図のStage 4-5)のステップが必要であり、この点の開発が望まれているのが現状である。

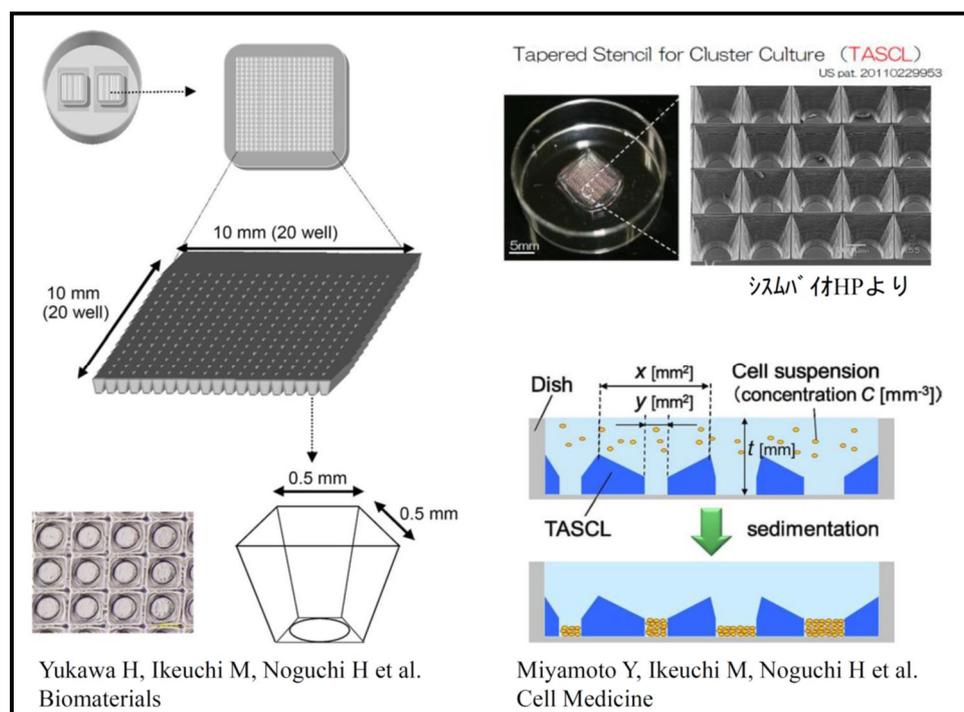
2. 研究の目的

本研究はマイクロデバイスTASCL(Tapered Stencil for Cluster Culture)を使って、人工膵幹細胞(iTSC-P細胞)からインスリン分泌細胞を効率よく作製することを目的とする。幹細胞からインスリン分泌細胞への効率の良い分化誘導効法が未だ確立されていない現在、我々はiTSC-

P細胞において接着培養（2次元培養）よりも、スフェロイド培養（3次元培養）のほうがインスリン分泌細胞への分化誘導効率がよいことを報告してきた（Miyagi-Shiohira C et al. Sci Rep (IF:4.122)）。この報告では、iTS-P細胞を「非接着性フラスコ」に播種することによりスフェロイドを形成させたため、スフェロイドのサイズが不均一であり、そのため分化誘導効率も、各スフェロイドによって異なるという欠点があった。より効率の良いインスリン分泌細胞を作製する手法の開発と、将来的な臨床応用化を目指すためのスフェロイドの大量培養法の検討も含めて、マイクロデバイス TASCL の技術が利用できるものと考えた。研究代表者は自身の作製した iTS-P 細胞を TASCL 上でスフェロイド培養しながら、分化誘導剤、培養日数、スフェロイドのサイズや形状を検討し、得られたインスリン分泌細胞の機能評価を *in vitro* の系で確認することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究においてインスリン分泌細胞を短期間、低コストで効率よく作製するために、我々が樹立した iTS-P 細胞を用いて、マイクロデバイス TASCL で分化誘導を行う計画となっている。膵島は、約 1,000 個の細胞が一つの塊となり、直径 100 ~ 200 μm 程の大きさで膵臓内に存在している。このことから、インスリン分泌細胞への分化誘導時におけるスフェロイドの大きさと、形状が分化誘導効率に影響を及ぼすことが推測される。本研究分担者である池内らが開発したマイクロデバイス TASCL（下図）は、1cm 四方で 1 度に 400 個の均質な大きさ・形状の細胞クラスタの培養ができる。さらに、TASCL は目的のスフェロイドのサイズや形状のコントロールが容易であり、従来法よりも簡便かつ効率的なスフェロイドの形成が可能である。



研究分担者である池内はマイクロ/ナノテクノロジー研究の権威である生田教授（東京大学大学院情報理工学系研究科）のもとで TASCL の開発を行い、ES/iPS 細胞からの胚葉体形成や肝細胞のスフェロイド形成に TASCL が有効であることを報告している（Yukawa H et al. Biomaterials (IF 8.806)）。本研究では TASCL の形状等改良を適宜行い研究代表者に供給する。研究分担者である野口は国内における臨床膵島移植の権威であり、これまで国内外において 150 例以上の膵島分離実績と指導経験を持つ。膵島再生に関しても組織特異的幹細胞の人工作製を世界で初めて報告している（Noguchi H et al. Cell Death Differ (IF 8.000)）。本研究においては研究分担者として、代表者が作製し *in vitro* で評価したインスリン分泌細胞を、糖尿病マウスへ移植し *in vivo* での評価を行う。

本研究代表は、研究期間で以下の研究計画表に記載の事項を明らかにする。また、研究代表者、研究分担者各々の役割についても同表に記載する。

TASCL を用いた iTS-P 細胞のインスリン分泌細胞への分化誘導法研究計画表

			2019年度	2020年度	2021年度
インスリン分泌細胞の作製および機能評価	研究代表者	潮平知佳	TASCL による iTS-P 細胞のスフェロイド培養と、分化誘導剤の検討を行う。作製した細胞のインスリン分泌細胞としての in vitro で機能評価と、in vivo 移植実験のための大量培養を行う。		作製したインスリン分泌細胞の評価により、TASCL の改良および改良後作製した細胞の機能評価をする。
細胞の移植実験および機能判定	研究分担者	野口洋文	研究代表者が作製したインスリン分泌細胞の in vivo で移植実験のために、研究分担者が保有している糖尿病マウス (CRISPR/Cas9 で作製したインスリン分泌低下型糖尿病マウス) を移植実験に必要な頭数準備する。細胞とマウスがそろった時点で、インスリン分泌細胞をマウスの腎被膜に移植し血糖降下作用を確認する。		
TASCL の作製および改良	研究分担者	池内真志	胚葉体培養のために必要な TASCL を作成・供給する。	研究代表者が作製したインスリン分泌細胞の機能評価に応じて、TASCL を改良し、供給する。	

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

TASCL を臍幹/前駆細胞に用いた報告例はいまだなく、今回本研究代表者は作製した人工臍幹細胞である iTS-P 細胞をインスリン分泌細胞へ分化誘導を行う際、TASCL を使用し分化誘導効率の向上を確認した。

iTS-P 細胞を TASCL でインスリン分泌細胞へと分化誘導した細胞は免疫染色において、insulin、C-pep、Nkx6.1 および Pdx1 を発現していることを確認した。また、iTS-P 細胞を付着させたままインスリン分泌細胞へ分化誘導を行ったものと、TASCL で分化誘導を行ったインスリン分泌細胞にて比較検討を行った結果、q-PCR による遺伝子発現では、TASCL で培養したインスリン分泌細胞は、接着培養のインスリン分泌細胞より insulin1 の発現が 3.5 倍、insulin2 の発現が 2 倍高かった。グルコース応答試験の結果では、低グルコースおよび高グルコース試験の刺激に対しても TASCL で培養したインスリン分泌細胞の反応が高く、特に高グルコース刺激においては接着の 60 倍と有意にインスリン応答を示した。また、マウス ES 細胞を使用して接着分化誘導と TASCL 分化誘導法での q-PCR での遺伝子発現の結果を検討した結果、insulin1 で 8 倍、insulin2 で 27 倍、Neurod1 で 8 倍、Ngn3 で 11 倍、Nkx6.1 では 10 倍遺伝子発現が高まった。また、TASCL によって作製したインスリン分泌細胞を糖尿病マウスの腎皮膜へ移植し、血糖降下作用を経時的に観察した結果において、血糖値を経時的に降下させる作用が観察された。考察として、iTS-P 細胞を使用して作成するインスリン分泌細胞のスフェロイドの欠点を改善するために、マイクロデバイス TASCL を用いて細胞塊のサイズを実際の膵島細胞の大きさに合わせ、さらに細胞移植に必要な細胞塊を一度に大量に作成するためにマイクロデバイス TASCL に改良を加え、iTS-P 細胞を用いて人工インスリン分泌細胞塊を作成することに成功した。また、作成した人工インスリン分泌細胞を糖尿病マウスの腎皮膜下に移植して、血糖降下作用を経時的に測定し、実際に移植した人工インスリン分泌細胞の生着を確認した。その結果、糖尿病マウス血糖値の経時的な血糖降下作用を確認した。マイクロデバイス TASCL を改良して作成した iTS-P 細胞に応用することで効率よく人工インスリン分泌細胞を作製することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Miyagi-Shiohira Chika, Saitoh Issei, Watanabe Masami, Noguchi Hirofumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Kyoto probe-1 reveals phenotypic differences between mouse ES cells and iTS-P cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 945-949
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-75016-6	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 該当する

1. 著者名 Miyagi-Shiohira Chika, Saitoh Issei, Watanabe Masami, Noguchi Hirofumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Gene Expression in Pancreatic Cancer-Like Cells and Induced Pancreatic Stem Cells Generated by Transient Overexpression of Reprogramming Factors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 454-466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm10030454	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 該当する

1. 著者名 Noguchi Hirofumi, Miyagi-Shiohira Chika, Nakashima Yoshiki, Kinjo Takao, Kobayashi Naoya, Saitoh Issei, Watanabe Masami, Shapiro A. M. James, Kin Tatsuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Induction of Expandable Tissue-Specific Progenitor Cells from Human Pancreatic Tissue through Transient Expression of Defined Factors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development	6. 最初と最後の頁 243 ~ 252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtm.2019.01.011	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 -

1. 著者名 Nakashima Yoshiki, Nahar Saifun, Miyagi-Shiohira Chika, Kinjo Takao, Kobayashi Naoya, Kitamura Shinji, Saitoh Issei, Watanabe Masami, Fujita Jiro, Noguchi Hirofumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Identification of Proteins Differentially Expressed by Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Isolated from Immunodeficient Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2672 ~ 2672
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20112672	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 -

1. 著者名 Nakashima Yoshiki, Nahar Saifun, Miyagi-Shiohira Chika, Kinjo Takao, Kobayashi Naoya, Saitoh Issei, Watanabe Masami, Fujita Jiro, Noguchi Hirofumi	4. 巻 2019
2. 論文標題 A Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis of Primary Cultured Cells and Subcultured Cells Using Mouse Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 1~97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/7274057	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1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 潮平知佳
2. 発表標題 自律複製型RNAベクターによる人工臍幹細胞(iTS-P)の樹立
3. 学会等名 再生医療学会総会
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
研究分担者	野口 洋文 (Noguchi Hirofumi) (50378733)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (18001)	
研究分担者	池内 真志 (Ikeuchi Masashi) (90377820)	東京大学・大学院情報理工学系研究科・講師 (12601)	

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