

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18024

研究課題名（和文）バイオリアクターを用いたヒトiPS由来膵細胞の大量調製

研究課題名（英文）Scalable production of human iPS cell derived pancreatic beta cells using a bioreactor

研究代表者

小長谷 周平（Shuhei, Konagaya）

京都大学・iPS細胞研究所・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） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトiPS細胞から大量の膵島細胞を調整するための三次元培養法の確立を目的とした。これまでの静置培養系をバイオリアクターを用いた三次元攪拌培養化することで、ヒトiPS細胞由来膵前駆細胞の拡大培養と膵前駆細胞から膵島細胞への分化誘導のスケールアップを達成した。今後は、臨床応用に向けて目指し、さらなるスケールアップは検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病の根本治療法として膵島移植が行われているが、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が、十分な薬効を達成するためには大量な細胞を移植する必要があり、大量培養培養法の確立は必要不可欠である。本研究は、大量の移植可能な膵島細胞の調製を可能にする。

研究成果の概要（英文）：Islet transplantation has been performed as a treatment for insulin-dependent diabetes mellitus, but the shortage of transplanted islets has become a problem. The use of islets derived from ES / iPS cells is expected as a new cell source. Since a large amount of cells are required for the treatment of type 1 diabetes, it is indispensable to establish a three-dimensional culture method. The purpose of this study is to establish a three-dimensional culture method for large-scale production of iPS cell-derived islet cells.

研究分野：再生医療

キーワード：バイオリアクター 膵島移植 iPS細胞 分化誘導

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

型糖尿病の根本治療を目指して膵島移植が行われているが、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多能性幹細胞から分化誘導した膵島細胞が期待され、ES 細胞や iPS 細胞から膵島細胞を分化誘導する研究が広く行われているが、型糖尿病治療のためには約  $10^9$  個の大量な細胞を移植するので、大量分化誘導法の確立が必要である。大量の移植細胞を得るために、バイオリアクターを用いた三次元攪拌培養の検討が国内外で行われている(Serra M et al, Trends Biotechnol., 2012)。多くは多能性幹細胞の未分化維持培養が検討されているが、心筋(Kempf H et al, Stem Cell Reports, 2014)や神経(Srinivasan G et al, Acta Biomater., 2018)への分化培養も試みられている。バイオリアクターを用いた膵系譜への分化誘導の報告はわずかであり、詳細な条件検討を行った報告例はない。今後、ヒト iPS 細胞を用いた再生医療が実用化されていく中で、大規模で安定的な分化誘導法の確立は必要不可欠である。

また、ヒト膵島への外挿性がより高いヒト iPS 細胞由来膵島細胞を安定的に提供する事により、基礎研究の発展にも寄与できると考えられる。ヒト膵島組織の入手は困難なため、医薬品開発などには齧歯類等の動物由来膵島やインスリンノーマ由来の株化細胞が使用されている。オルガノイド研究など、ヒト iPS 細胞由来膵島細胞の多分野での使用も期待される。

### 2. 研究の目的

未分化の多能性幹細胞は、増殖性は高いが膵島細胞への分化誘導に長期間必要であり、未分化の多能性幹細胞が残存する恐れもある。一方で、分化が進んだ膵島細胞は増殖力が低く、細胞増殖させることが困難である。そのため、多能性幹細胞由来の膵前駆細胞の増殖を試みた研究が行われている。それらの研究では、多能性幹細胞由来の膵前駆細胞を増殖させるために、各種のフィーダー細胞を用いて共培養が行われている(JB Sneddon et al. Nature. 2012, Kao, D.I. et al. Stem Cell Reports, 2015, Trott J et al. Stem Cell Reports. 2017.)。しかしながら、このようなフィーダー細胞や血清を使用する培養法では、バッチ間での培地成分等の差を生じ、均一な性質を持つ膵前駆細胞を安定して調製することは難しい。これまでの研究において、無血清・無フィーダーの培養条件化で、多能性幹細胞由来の膵前駆細胞(SOX9 及び PDX1 陽性細胞)の分化状態を維持したまま高効率に増幅させることができる培養法を独自に確立している。多孔プレートを用いて細胞凝集体を作成し、三次元静置培養系での iPS 細胞由来膵前駆細胞の増幅を行った。多孔プレートを用いた培養系では、直径の揃った細胞凝集体を作製することができるが、一度の培養で調製できる凝集体の数は限られている。膵島移植では  $10^5$  個以上の細胞凝集体(1 凝集当たり細胞数千個)が必要である。一度に大量の細胞凝集体を作製できるバイオリアクターの利用は、大量の移植細胞の調製に有利である。しかしながら、多孔プレートを用いた静置培養と攪拌浮遊培養では、培養環境が大きく異なり、培養法の確立が新たに必要になる。例えば、攪拌培養では、細胞凝集体の径を制御するのが難しく、前駆細胞の増幅効率や膵細胞への分化誘導効率に影響を及ぼす可能性がある。本研究では、バイオリアクターを用いた攪拌浮遊培養による膵前駆細胞の増幅及び膵島細胞への分化を可能にする培養の確立を目的とした。

### 3. 研究の方法

三次元静置培養系では、直径 400  $\mu\text{m}$  のマイクロウェルを 256 個有するアガロース製多孔プレートを培養基材として用いた。ヒト iPS 細胞から分化誘導した膵前駆細胞(PDX1 陽性細胞)を

酵素処理により単個細胞に分散させた後、アガロース製多孔プレートへ播種し、上皮成長因子および R-spondin 1 を含む無血清培地中で培養した。6~7 日おきに継代を行い、膵前駆細胞を増幅させた。継代時には、単個細胞に分散した後に細胞数を測定した。また、フローサイトメトリック解析により、膵系譜細胞マーカーの PDX1 及び細胞増殖マーカーの Ki67 陽性細胞率を測定した。

三次元攪拌培養系では、30 mL スケールの攪拌式バイオリアクターを用いた膵前駆細胞の増幅培養を行った。播種密度や攪拌速度の最適化を行った後、最長で 4 継代の増幅培養を行った。その後、培養液を前駆増幅用培地から膵島細胞への分化培地へ交換することにより、バイオリアクター内で分化誘導を行った。

#### 4 . 研究成果

新たに 2 株のヒト iPS 細胞から膵前駆細胞を分化誘導し、増幅培養の再現性を得た。これまでの研究では、最大で  $10^4$  倍までの増幅であったが、培養期間をさらに延長し、マイクロウェルを用いた三次元静置培養ではあるが、 $10^8$  倍以上に増幅することができた。長期間の増幅培養後も高い PDX1 発現細胞率を維持していた。一般的な培養皿で調製できる  $10^6$  個程度の細胞から増幅培養を開始すれば、理論上は  $10^{14}$  個の前駆細胞を調製できることになる。

また、小スケールではあるが、三次元浮遊攪拌培養による膵前駆細胞の増幅培養を行った。PDX1 の発現を維持したまま増幅する事が可能であり、静置培養と同程度の速度で増幅可能であった。以上のように、膵島移植に十分量の細胞を得るための膵前駆細胞の増幅が可能である事、三次元攪拌培養により膵前駆細胞の増幅が可能である事を明らかにした。

続いて、培養液を分化培地へ交換することにより、バイオリアクター内で膵島細胞へ分化誘導を行った。約 2 週間の培養後、膵前駆細胞は膵 細胞マーカーの INS 及び NKX6.1 陽性細胞へと分化した。以上のように、膵前駆細胞の増幅及び膵 細胞への分化を可能とする三次元攪拌培養系を確立することができた。今後は、臨床応用を念頭に置き、培養系のさらなるスケールアップを進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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