

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21631

研究課題名（和文）ヒト膵島内での分化転換機構を応用したiPS細胞からの機能的膵島分化誘導法の開発

研究課題名（英文）Exploring differentiation protocols for iPSC-derived functional islets by referring human primary beta-cells.

研究代表者

古山 賢一郎（Furuyama, Kenichiro）

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点講師

研究者番号：10868798

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：iPS細胞の開発以降、多能性幹細胞から膵細胞を作製して糖尿病治療を目指す試みがなされてきたが、十分な機能をもつ細胞を再現性良く作製する技術が未だ確立していない。本研究では、以下の戦略的コンセプトのもと、iPS細胞から機能的膵島を分化誘導する方法の開発に取り組んだ。手本とすべきヒト機能的細胞プロファイルの「カタログ」化。細胞の機能発揮およびmono-hormonal化に重要な3D組織構築を持った細胞の作製。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞の医療応用が様々な分野で推し進められているが、糖尿病治療を目指したiPS細胞由来の膵細胞移植は、未だ実用化の目処がつかない。それは、インスリンを発現する様細胞（-like cells）の創出は比較的容易にできるようになったが、十分な機能をもつ細胞を再現性良く作製する技術が未だに確立できなかったからである。本研究では、これまでの研究で欠けていた視点を補い、新たな作製法を開発した。本研究成果が臨床応用への弾みとなるだけでなく、遺伝性糖尿病など疾患の解明にも貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Despite tremendous efforts since iPSC technologies were developed, we have not yet launched iPSC-derived -cell therapy for diabetic patients.

In this project we established a novel protocol to differentiate human iPSCs into functional -cells. By focusing on recapitulation of 3D-architecture of pancreatic islets and referring to the profiling of human primary -cells, we improved our differentiation protocol, achieving more proliferation and better functionality in iPSC-derived -cells.

研究分野：膵島再生

キーワード：細胞再生 iPS細胞 分化誘導 ヒト膵島

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞の開発以降、多能性幹細胞の医療応用が様々な分野で推し進められている。糖尿病治療を目指した膵細胞作製もその一つであるが、未だに臨床応用に至っていない。つまり、インスリンを発現する様細胞 ( -like cells) の創出は比較的容易にできるようになったが、十分な機能をもつ細胞を再現性良く作製する技術が未だに確立していなかった。本研究分野は競争の激しい分野にもかかわらず、その歴史では、iPS 細胞からの細胞作製の効率化に始まり、ようやく機能獲得の端緒についたものの、その再現性に劣ると総括されてきた。

### 2. 研究の目的、および 3. 研究の方法

本研究では、これまでの先人たちの研究戦略を踏まえ、次項にあげた戦略的コンセプトのもと、iPS 細胞から機能的膵島を分化誘導する方法の開発に挑戦した。

#### 1) ヒト成人細胞の profile に基づいたゴールの設定

これまでの分化誘導法開発ではゴールが曖昧であった。細胞は糖感知機構、電気興奮性、cAMP シグナルによる調節性の開口分泌機構等を備えた、高度に機能分化した細胞であることはマウスモデルを用いて明らかにされてきたが、目指すべきヒトの(機能的)成人細胞の profiling は充分でなかった。それ故に作製した細胞がどこまで機能的細胞に近似しているか? の評価ができなかった。近年ヒト細胞の遺伝子発現解析が scRNA-seq でも可能になってきたが、pure な細胞集団を使った Ca imaging・電気生理学的試験などのインスリン分泌機構、さらには細胞機能に重要な解糖系/酸化リン酸化、ATP 産生といった代謝活性の profiling に関してはヒトの data が欠けていた。つまりヒト細胞の profiling が充分ではない暗中模索の状態、readout としてインスリン分泌試験といくつかのマーカーだけを頼りに機能的細胞を作製しようとしてきたと言える。問題解決に向けて、研究代表者がこれまで開発したヒト脳死ドナー膵島由来細胞の純化および解析方法 (Nature 2019) を使い、ヒト細胞を多元的に評価することで、明確なゴールが設定でき、効率的かつ合理的に分化プロトコルを改良できると考えた。

#### 2) 機能的単位としての膵島を重視した分化誘導

上記のアプローチで、細胞レベルのゴールは明確になると期待されたが、細胞機能を発揮するために組織立体構築に注目した。例えば、細胞が凝集塊を作ることで、糖刺激に対して協調して反応し、インスリン分泌が増強することを先の研究で我々は示してきた。膵島は細胞だけで構成されるのではなく、隣接する他の内分泌細胞 (、細胞) との相互作用によって互いに分泌調節する機能的単位であるが、これまで多くの研究者はひたすら細胞の効率的作成を追求して来た。我々は膵島内の non-細胞の存在にも着目し、細胞が機能を発揮するのに、non-細胞が必要かどうか検証した。

#### 3) mono-hormonal 化機構の解明

ヒト胎児の膵島細胞は当初複数のホルモンを発現する poly-hormonal 細胞 (主にインスリン、グルカゴン共陽性細胞) が存在すると報告があるが、そこから mono-hormonal になる機構は分かっていない。また多くの iPS 細胞由来 -like 細胞も poly-hormonal である点が既存のプロトコルの課題であった。研究代表者が取り組んできたグルカゴン産生細胞から細胞への分化転換現象 (Nature 2019, Nat Cell Biol. 2018) では、poly-hormonal 細胞がその過程で見られる。加えて、3D 環境では 2D と比べて効率よく分化転換が誘導できたことは、膵島構築下での mono-hormonal 化誘導戦略という点で注目できる。成人細胞の細胞化(分化転換)機構から学ぶことで、膵島細胞の mono-hormonal 化機構を解明し得ると考え、分化誘導プロトコルの改良に取り組んだ。

### 4. 研究成果

#### 1) ヒト成人細胞の profiling

研究代表者がこれまで開発したヒト脳死ドナー膵島由来細胞の純化および解析方法を用いて、ヒト細胞の多元的評価を試みた。この解析で用いた細胞は純度 99% であり、細胞特異性の高い、さまざまな解析が可能である。先の研究で施行していた、細胞の bulk RNA-seq data を用いて詳細な細胞遺伝子発現リストを得ていたが、今回はこれに加えて NanoString

nCounter を用いた miRNA 発現解析によって、細胞の miRNA 発現 profiling を構築することができた (右表: top 5 miRNA in 細胞 vs 細胞, 未発表データ、および Ghila et al, Biomedicines 2020)。また細胞の proteomic 解析 data から、protein レベルでの発現状況もリスト化して、より網羅的な profiling が可能となった。ヒト細胞の更なる指標の構築を目指して、現在、Ca イメージング、MEA を用いた電気生理学的試験、seahorse による代謝試験を共同研究にておこなっている。これらのヒト細胞の包括的な profiling は単に細胞分化誘導実験でのベンチマークとしての活用だけでなく、広く細胞 biology の理解にも貢献すると期待できる。

| miRNA          | FC    | FDR      |
|----------------|-------|----------|
| hsa-miR-136-5p | 520.0 | 2.29E-07 |
| hsa-miR-433-3p | 303.1 | 2.29E-07 |
| hsa-miR-432-5p | 185.9 | 2.29E-07 |
| hsa-miR-424-5p | 153.3 | 2.29E-07 |
| hsa-miR-409-3p | 146.0 | 2.29E-07 |

## 2) 組織立体構築に着目した分化誘導

本アプローチでは、本来、生体臓腑が有している 3D 構築を伴った組織を分化誘導することに着目した。

膵臓全体の分化誘導:

これまで我々のグループでは、膵臓細胞だけを分化誘導するのではなく、周囲の組織/細胞との相互作用が、正しい発生過程の再現および細胞機能発現に重要であると考えてきた。例えば、発生期に膵外分泌細胞から分泌される Tff2 (Hirata et al., Scientific Reports 2019) や Ccl5 (投稿準備中) が胎児期細胞の増殖および抗アポトーシスに寄与していることを我々はマウスモデルで明らかにしてきた。現在、我々は早期発生の細胞環境を模倣して、前腸内胚葉および中胚葉を分化誘導することで、臓器芽形成とその後の発生分化過程の再現に成功しており (基盤 B 研究)、今後細胞も含めた細胞機能の評価を予定している。

膵島 non-細胞は必要か? :

上記で述べた臓器移植も可能となる臓器丸ごと分化誘導する戦略は、移植医療および発生生物学上、大変魅力的な挑戦であるが、大多数の研究者が、組織/細胞単位つまり膵島/細胞単位で再生させる戦略をとっている。自他も含めたこれまでの発生学的知見によれば、機能的細胞の発生には、膵外分泌組織および細胞周囲に発生する、細胞といった膵島 non-細胞との相互作用が重要であると考えられているが、果たして、成熟した膵臓/膵島では細胞以外の細胞が細胞機能発揮に必要不可欠なのであろうか? つまり、ES/iPS 細胞から機能的細胞さえ分化誘導できれば、その他の non-細胞は要らないのか? という命題は長らく議論されてきたが、未だ答えがなかった。これを検証するには *in vitro* 実験系では限界があり、我々は共同研究者と共にマウス *in vivo* での証明に挑戦した。

膵島 non-細胞の全て、つまり細胞、細胞、細胞にジフテリアトキシン受容体を発現させたノックインマウスを作製し、成体マウスにジフテリアトキシンを投与すると 99% 以上の、細胞が除去され、膵島には細胞のみが観察された。驚くことに、この -only マウスは通常マウスと比べて、耐糖能、インスリン感受性ともに優れていた。また膵島を分離して *in vitro* 分泌試験を施行すると、健常膵島と同等のインスリン分泌能を示した (Perez-Frances et al., in revision)。つまり、細胞が機能を発揮するのに、non-細胞は必ずしも必要とは言えず、再生医療の戦略としては、細胞さえ再生させれば良いことが示唆された。

-only 膵島の分化誘導法の開発:

上記の知見により、我々は細胞からなる膵島の分化誘導法の開発を行った。分化誘導早期より細胞を凝集させ、3D 構築の内胚葉を作製し、多段階分化プロトコルを開発した。プロトコル開発に終着点は無いが、現在のプロトコルの特徴を 2 つ挙げる: (i) 3D 組織構築によって変化した力学的シグナルに応答し、細胞形態だけでなく細胞骨格も変化することが予想された。最近、膵内分泌前駆細胞の分化にアクチン細胞骨格が関与しているとの報告があったため、我々の誘導法に細胞骨格を標的とした step を加えた。(ii) *in vitro* 組織と、*in vivo* 組織間で、活性化しているシグナリング経路の違いを同定し、そのギャップを補正すべく低分子化合物を用いて、分化誘導法を改良した。以上の 2 点を改良した新規分化誘導法では、改良前と比べて細胞の増殖が増加、アポトーシスが減少、さらに細胞の NKX6-1 陽性率が著しく向上した (投稿準備中)。

## 3) 分化転換機構に着目した分化誘導法

我々は、成体細胞から細胞への分化転換現象は 2D と比べて 3D 環境によって促進されることを報告したが、本研究では iPS 細胞からの細胞分化誘導に 3D 構築化する戦略をとったことで、細胞の mono-hormonal 化に成功した。分化転換促進現象と同様のメカニズムが関与しているのか、現在 JST 創発研究にて継続して研究をおこなっている。

分化転換現象、あるいは ploy-から mono-hormonal 化の研究には、細胞の分化状況を正確に評価することが肝要になるが、これまで膵島各細胞種を特徴づける指標は、各ホルモン (インスリン、グルカゴンなど) や転写因子 (PDX1、ARX など) の限られたマーカーの発現状況だけで評価せざるを得なかった。我々はヒト脳死ドナー由来の膵島細胞 single-cell RNA-seq data を用いて、膵島各細胞種の ID geneset を同定した (共同研究: van Gurp et al., Nat. Commun

2022)。このツールを用いることで、分化した細胞が、どれくらい 細胞に近いか、あるいは細胞寄りなのか分化状況を数値化して評価することが可能になった。また既報の 細胞分化誘導プロトコールとの比較検討も可能になった。

本萌芽研究で開発した新規 細胞分化誘導法を活用して、疾患 iPS 細胞を用いた糖尿病病態解析が可能になり、新たな萌芽研究「iPS 細胞を用いたインスリン遺伝子異常症モデルの作成」に繋げることができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 6件）

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Ghila Luiza, Furuyama Kenichiro, Grey Shane T., Scholz Hanne, Chera Simona  | 4. 巻<br>13                    |
| 2. 論文標題<br>Editorial: Beta-Cell Fate: From Gene Circuits to Disease Mechanisms  | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Genetics   | 6. 最初と最後の頁<br>-               |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fgene.2022.822440   | 査読の有無<br>無                    |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                  |
| 1. 著者名<br>Perez-Frances Marta, van Gurp L?on, Abate Maria Valentina, Cigliola Valentina, Furuyama Kenichiro, Bru-Tari Eva, Oropeza Daniel, Carreaux Ta?na, Fujitani Yoshio, Thorel Fabrizio, Herrera Pedro L. | 4. 巻<br>12                    |
| 2. 論文標題<br>Pancreatic Ppy-expressing -cells display mixed phenotypic traits and the adaptive plasticity to engage insulin production  | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Nature Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>-               |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41467-021-24788-0  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                  |
| 1. 著者名<br>Pahlavanneshan Saghar, Behmanesh Mehrdad, Oropeza Daniel, Furuyama Kenichiro, Tahamtani Yaser, Basiri Mohsen, Herrera Pedro L., Baharvand Hossein   | 4. 巻<br>99                    |
| 2. 論文標題<br>Combined inhibition of menin-MLL interaction and TGF- signaling induces replication of human pancreatic beta cells   | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>European Journal of Cell Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>151094 ~ 151094 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ejcb.2020.151094  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                  |
| 1. 著者名<br>Ghila Luiza, Bj?rlykke Yngvild, Leg?y Thomas Aga, Vethe Heidrun, Furuyama Kenichiro, Chera Simona, R?der Helge  | 4. 巻<br>8                     |
| 2. 論文標題<br>Bioinformatic Analyses of miRNA?mRNA Signature during hiPSC Differentiation towards Insulin-Producing Cells upon HNF4 Mutation   | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Biomedicines  | 6. 最初と最後の頁<br>179 ~ 179       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/biomedicines8070179   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                  |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Sankoda Nao, Tanabe Wataru, Tanaka Akito, Shibata Hirofumi, Woltjen Knut, Chiba Tsutomu, Haga Hironori, Sakai Yoshiharu, Mandai Masaki, Yamamoto Takuya, Yamada Yasuhiro, Uemoto Shinji, Kawaguchi Yoshiya | 4. 巻<br>12      |
| 2. 論文標題<br>Epithelial expression of Gata4 and Sox2 regulates specification of the squamous?columnar junction via MAPK/ERK signaling in mice  | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>Nature Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41467-021-20906-0   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Sasaki Ben, Uemoto Shinji, Kawaguchi Yoshiya  | 4. 巻<br>44                    |
| 2. 論文標題<br>Transient FOXO1 inhibition in pancreatic endoderm promotes the generation of NGN3+ endocrine precursors from human iPSCs | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Stem Cell Research  | 6. 最初と最後の頁<br>101754 - 101754 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.scr.2020.101754   | 査読の有無<br>無                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>van Gurp Leon, Fodoulian Leon, Oropeza Daniel, Furuyama Kenichiro, Bru-Tari Eva, Vu Anh Nguyet, Kaddis John S., Rodr?guez Iv?n, Thorel Fabrizio, Herrera Pedro L. | 4. 巻<br>13      |
| 2. 論文標題<br>Generation of human islet cell type-specific identity genesets   | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>Nature Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41467-022-29588-8  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する    |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>古山賢一郎, 川口義弥                          | 4. 巻<br>38        |
| 2. 論文標題<br>膵発生 / 再生における細胞系譜解析と細胞間相互作用の解明       | 5. 発行年<br>2023年   |
| 3. 雑誌名<br>膵臓                                   | 6. 最初と最後の頁<br>2~9 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2958/suizo.38.2 | 査読の有無<br>無        |
| オープンアクセス<br>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<br>-         |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>古山賢一郎, 川口義弥                  | 4. 巻<br>43 (8)  |
| 2. 論文標題<br>臍立体構築における細胞間相互作用            | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>胆と臍                          | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし         | 査読の有無<br>無      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>古山賢一郎                                 | 4. 巻<br>13 (30) |
| 2. 論文標題<br>ヒト臍 細胞を材料とした臍 細胞作製 - 糖尿病に対する分化転換療法 - | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>月刊糖尿病                                 | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし                  | 査読の有無<br>無      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>古山賢一郎, Pedro Herrera              | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>臍島内分泌細胞間の分化転換現象とそれを応用した糖尿病治療の可能性 | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>糖尿病学2020                          | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし              | 査読の有無<br>無      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>古山賢一郎, Pedro Herrera         | 4. 巻<br>50 (2)  |
| 2. 論文標題<br>臍島内でのダイレトリプログラミング (分化転換)    | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>月刊 糖尿病・内分泌代謝科                | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし         | 査読の有無<br>無      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ahmed Rashwan, Kenichiro Furuyama, Yoshiya Kawaguchi                                 |
| 2. 発表標題<br>Elucidating of Pathological Mechanism of Insulin Gene Mutation Using Human iPS Cells |
| 3. 学会等名<br>CiRA International Symposium (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>川口 義弥                      |
| 2. 発表標題<br>膜立体構築における細胞間相互作用           |
| 3. 学会等名<br>第19回日本再生医療学会総会WEB学会 (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2020年                       |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>古山賢一郎                                   |
| 2. 発表標題<br>Cell plasticity in the pancreatic islet |
| 3. 学会等名<br>第55回 発生物学会 シンポジウム 金沢 (招待講演)             |
| 4. 発表年<br>2022年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>古山賢一郎   |
| 2. 発表標題<br>New insights into understanding the neuroendocrine tumors of the pancreas |
| 3. 学会等名<br>第26回 国際膵臓学会 joint Symposium with AACR - JCA, Kyoto (招待講演) (国際学会)          |
| 4. 発表年<br>2022年  |

〔図書〕 計3件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------------------|--|---|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 川口 義弥<br><br>(Kawaguchi Yoshiya)<br><br>(60359792) | 京都大学・iPS細胞研究所・教授<br><br><br><br>(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 |  |  |  |
|---------|---------|--|--|--|
| ノルウェー   | ベルゲン大学  |  |  |  |
| スイス     | ジュネーヴ大学 |  |  |  |