

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06980

研究課題名(和文)革新的分化誘導法を用いた膵細胞のシングルセルプロテオーム解析による成熟機序解明

研究課題名(英文)Elucidation of maturation mechanism of insulin producing cells induced by direct reprogramming

研究代表者

萩原 裕子(Hagiwara, Hiroko)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・客員研究員

研究者番号：30589429

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)：本研究の結果から、申請者らが開発したダイレクトリプログラミングを用いた膵細胞様インスリン産生細胞は、既存の手法と比較し、早期に成熟し、機能性が高い細胞になることが明らかになった。しかし、成熟の完全なメカニズムを解明するには至らなかったため、今後の検討課題としたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、罹患率がますます上昇している糖尿病の革新的な治療薬として、本研究課題で開発された人工成熟膵細胞は、学術的、社会的に意義がある。特に、既存の人工膵細胞と比較し、早期で成熟し、高い機能を持つ細胞の作出とそのメカニズムの解明は、社会的にも大きな影響を与えられる。

研究成果の概要(英文)：Our study suggested that insulin producing-cells induced by direct reprogramming with OKAP have higher effectiveness and maturation rate than any other way to produce -cells. In the future study, we have to elucidate detail maturation mechanism of our insulin producing cells.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療

1. 研究開始当初の背景

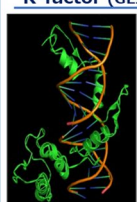
申請者らが開発した OKAP 遺伝子を用いたダイレクトリプログラミング法で作出した人工膵細胞(インスリン産生細胞)は、iPS 細胞を用いた既存の細胞作出方法と比較して、成熟までの期間が短く、成熟度も高いことが明らかとなっていたが、そのメカニズムは不明であった。このことから、当該細胞がどのような過程を経て成熟していくのかを明らかにしたいと考えた。

新ダイレクトリプログラミング特徴

	項目	iPSC 分化細胞	K因子カクテルDRP 分化細胞	新DRP 優位性
高効率	誘導細胞数	無限	細胞誘導率は80% (従来法DRPは20%程度)	±
	分化時間	数ヶ月	数週間 (従来法DRPは1か月以上)	+
	分化細胞の成熟度	幼若	成熟	+
簡便	分化ステップ数	体細胞+iPSC+数段階の分化誘導過程	体細胞+1回の分化誘導過程	+
	自家、他家移植	他家移植	自家移植個別化医療 (他家移植も検討中)	+
	コスト	数千円代/患者	1000万円以下/患者	+
	免疫原性	あり (HLAホモを使用し会費)	ほぼ無し (自家移植)	+
安全	造腫瘍性	検査要	iPS作成の過程での造腫瘍性を除外できる	+

ダイレクトリプログラミング法を用いたK-factorの導入による膵β細胞への分化

K-factor (GLIS1)

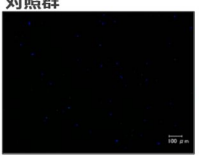


The Krüppel-like zinc finger transcription factor: GLI-similar 1 (GLIS1)

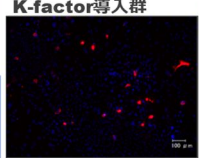
- 細胞の初期化に寄与する転写因子。
(Yasuoaka Y et al. Molecular Biology and Evolution, 2019, 10.1093/molbev/msz205)
- 高効率なiPS細胞の作製にも用いられている。
(Maekawa M, et al. Nature 2011, 474, 225-229)

ダイレクトリプログラミング法によるK-factorの細胞内への導入は、画期的な膵β細胞の再生療法になる可能性を示唆

対照群



K-factorを導入群



K-factorを線維芽細胞内に導入することで、通常は決して発現しないインスリンが発現!!!

Blue: 核
Red: インスリン
細胞種: マウス線維芽細胞
*K-factor導入3週間後の染色像

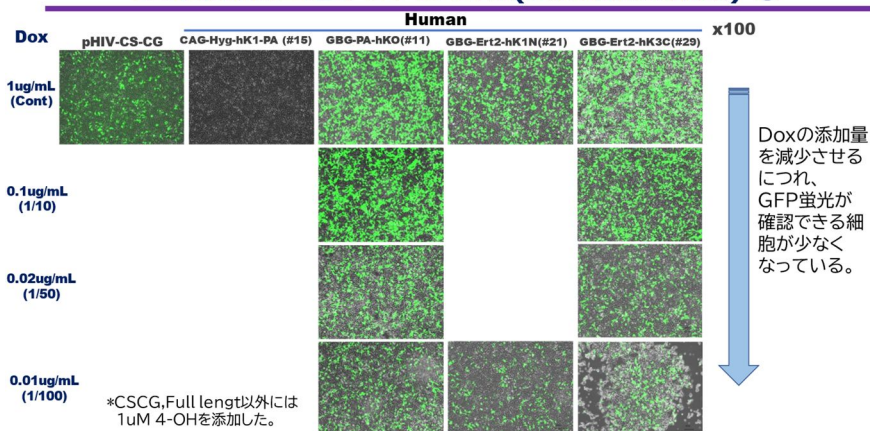
2. 研究の目的

OKAP 遺伝子をダイレクトリプログラミング法で導入した人工インスリン産生細胞の成熟ステージごとの遺伝子発現解析を行い、なぜ当該細胞の成熟スピードが速いのかを検証する。

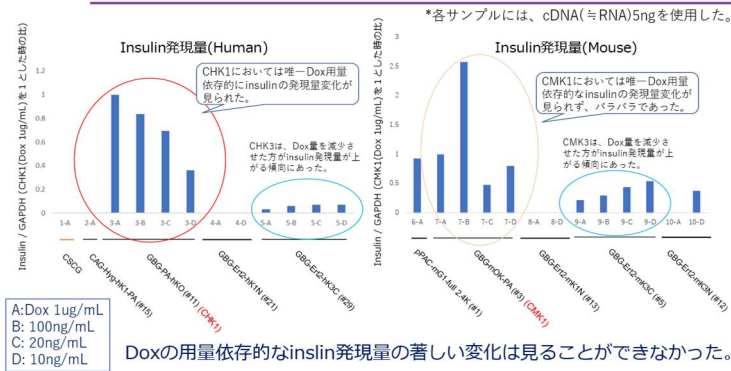
3. 研究の方法

Human, mouse の Primary cells に対して lipofection 法を用いて OKAP 遺伝子を導入する(ダイレクトリプログラミング法)。各成長段階で細胞を採取し、インスリン分泌試験を行い、インスリン産生細胞の成熟度を測定するとともに、次世代シーケンサーを用いて遺伝子発現変化を解析する。

Doxの添加量とタンパク発現(蛍光顕微鏡観察) ①



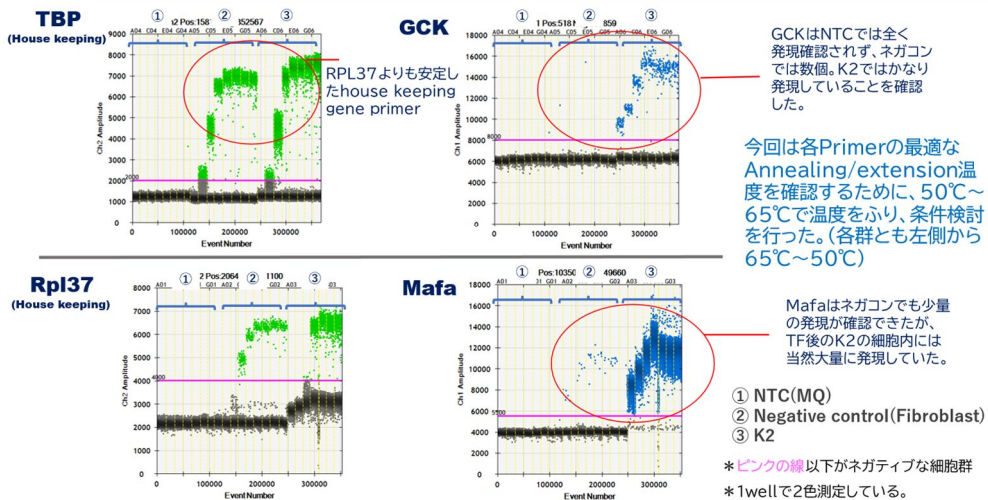
Doxの添加量依存的にInsulin発現量は変化するか？ (q-PCRによる解析)



4. 研究成果

本研究により、本法で作出した細胞の遺伝子発現の概要が明らかとなった。しかし、細胞により成熟度が異なることもあり、詳細に成熟度による遺伝子発現の違いはいまだに不明である。この課題については、今後の研究課題としていきたい。

ddPCR Gene expression data



新たなる必要とされる研究項目

K因子による細胞を再生医療へ	非臨床POCの確立	非臨床での有効性、安全性の証明
	品質管理	移植の部位、生着率の検討細胞機能性の
	安全性	免疫、造腫瘍性試験
	再生医療承認	臨床試験での有用性の証明
K因子有用性を高める研究と知財	分化細胞の追加	細胞、神経細胞、脂肪細胞以外の分化細胞の追加
	体細胞の追加	MSC,以外の脂肪細胞等の体細胞から細胞種の追加
	移植技術	細胞のキャリアー(担体の検討)、移植部位等
	転写因子Vector	安全性を高めるための各種ベクターの評価
K因子のバックアップ	K因子の改良開発	最も有用な移植部位の探索
	K因子の代用	低分子因子の開発 マイクロRNA等を使った遺伝子発現を制御する因子の共同開発

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