

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659627

研究課題名（和文）移植膵島を *in vivo* ニッチとした iPS 細胞からインスリン産生細胞の創出

研究課題名（英文） Formation of insulin-producing cells from iPS cells in conjunction with islet transplantation

研究代表者

安波 洋一 (YASUNAMI YOHICHI)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：00166521

研究成果の概要（和文）：本研究では iPS 細胞よりインスリン産生細胞創出にはニッチが必要であり、そのニッチとしての単離膵島と共移植を行い検討した。単離膵島（ラット、ブタ）とマウス iPS 細胞を STZ で糖尿病ヌードマウスの腎皮膜下に移植後 30 日に形成された腫瘍内にサイトケラチン陽性上皮よりなる管状構造組織が存在し、その一部にマウスインスリン陽性細胞が出現することが明らかになった。更に効率を向上する為に現在インスリン産生細胞への分化に必須の転写因子（Pdx1, Ngn3, MafA）を iPS 細胞に同時にトランスフェクションし、その後膵島と共移植する実験を行っている。

研究成果の概要（英文）： In this study, we attempted to generate insulin-producing cells from mouse iPS cells by co-transplantation with isolated islets (rat, porcine) beneath the kidney capsule of STZ-diabetic nude mice since islets may serve to provide an appropriate circumstances as “nitch”. As a result, clusters of insulin producing cells were found in tumors at 30 days after transplantation. Currently, the study with the use of iPS cells transfected with transcription factors including Pdx1, Ngn3 and MafA) is under investigation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植外科学・インスリン産生細胞

## 1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞を用いた再生・移植医療は 21 世紀の新規医療として社会の期待を一心に集めている。多くの難治性疾患が治療対象となるが、その中にインスリン依存糖尿病がある。インスリンは生体内で唯一の血糖降下ホルモンであり、インスリン依存糖尿病はインスリンを産生する

膵島  $\beta$  細胞の消失により、高血糖を生来する疾患である。現在の治療は、不足するインスリンを一日に 4-6 回注射で投与して血糖を是正する方法が主体である。しかしインスリン治療では完全な血糖制御は不可能であり、更には糖尿病血管合併症（網膜症、腎症、神経症）が進行し、失明や血液透析の導入、日常生活の障

害、さらに寿命の短縮を招き、医療費の高騰とともに社会問題となっている。この問題への解決策としてインスリン産生細胞の移植による治療法がある。インスリン産生細胞を移植すれば、細胞自身が血糖値を感知して、インスリンを分泌し血糖値を調節するために、生理的な血糖コントロールを達成できる。移植が成功すればインスリン治療は不要となり、さらに糖尿病性血管病変の改善も期待される。このようにインスリン産生細胞の移植は糖尿病の根本的治療となりうる。糖尿病に対する移植医療は、従来はインスリン産生細胞を含む膵臓器移植が主体であったが、より侵襲が少なく、安全な新規治療法として単離したインスリン産生細胞（膵島）を移植に用いる膵島細胞移植が行われるようになってきている。しかしながらいずれの移植治療においても脳死、もしくは心停止ドナーより提供された膵臓が必須であり、世界的に、特に我が国では臓器不足が深刻な問題となっている。この根本的解決策として iPS 細胞からのインスリン産生細胞の新規創出があり、作成したインスリン産生細胞を膵島細胞移植のドナーとして用いようとするものである。

## 2. 研究の目的

iPS 細胞の臨床応用を目指す研究の一つとして、糖尿病の治療を目的としたインスリン産生細胞の創出があるが、未だ成功例はない。申請者は長年、膵島細胞移植の臨床応用に関する研究に従事し、継続的に成果を上げている (J C I 105: 1761, 2000, J Exp Med 202: 913, 2005, Diabetes 55: 34, 2006, JCI 120:735, 2010) . 本研究では習熟した膵島細胞移植の手法を用いて、iPS 細胞よりインスリン産生細胞を創出する本課題に挑戦する。従来の研究は *in vitro* の試験管内での研究があるが、本研究の独創

性は *in vivo* で単離膵島細胞と iPS 細胞を共存、もしくは融合させ、移植のドナーとして使用する、独自の手法を用いることにある。すなわち移植膵島細胞が提供する *in vivo* の環境下 (ニッチ) では、効率的に iPS 細胞がインスリン産生細胞へ分化するとの作業仮説を立て、実証を試みた。

## 3. 研究の方法と結果

### (1) ラット膵島細胞とマウス iPS 細胞の共培養による混合細胞塊の解析

以前の研究で  $1 \times 10^6$  個/1.5ml 培地/35mm プラスチック培養皿の条件でラット膵島より分散した単細胞を培養すると、数日で細胞塊を形成し始め、4-5 日目には直径 150-250  $\mu$  M となり、膵島様の構造を呈するようになることが判明している。

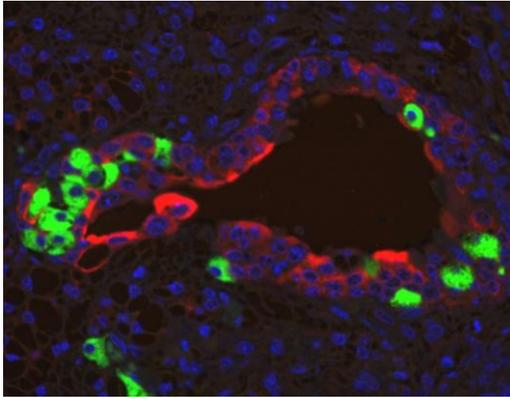
この実験系にマウス iPS 細胞コロニー (1000 細胞) を加え、共培養し、細胞塊を免疫組織学的に検討したが、単離膵島と形態に相違がないことが判明した為、以後は単離膵島に iPS コロニーを 1 個加え移植することとした。

### (2) STZ 糖尿病ヌードマウスへの *in vivo* 移植実験

ラット、後にブタ膵島を用いて移植を行った。ブタ膵島に関しては、新たに創生されたインスリン産生細胞の識別には種族差よりブタ膵島がより有効の可能性があり、また臨床膵島移植のシュミレーションでブタ膵島単離を定期的に行い、ブタ単離膵島が使用可能であったので使用した。単離ラット膵島とマウス iPS 細胞をストレプトゾシン糖尿病ヌードマウスの腎皮膜下に移植し、経時的に観察した。ラット膵島数は単離膵島単独移植では STZ 糖尿病マウス血糖を正常化できない 50 個とした。仮に iPS 細胞から新たに十分量のインスリン産生細胞が創生されれば、レシピエントの血糖は正常化することとなる。結

果としては移植後7日目頃より、腫瘍塊を形成し、30日には腎臓全体を覆うほどになった。レシピエント血糖は正常化せず、高血糖で推移した。

図1. マウス iPS 細胞とラット膵島の共移植

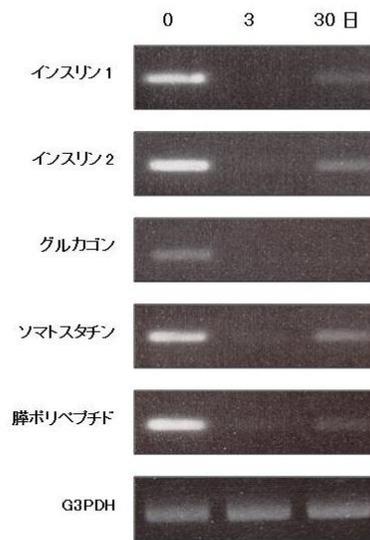


STZ糖尿病ヌードマウスの腎皮膜下に iPS 細胞 (1 コロニー) とラット単離膵島を移植後、30日目の組織像 (蛍光顕微鏡)。腺管構造を有するサイトケラチン (赤色) の近傍にインスリン産生細胞 (緑色) が散在する。青色;核染色 (DAPI)

(3) iPS 細胞の培養条件の検討

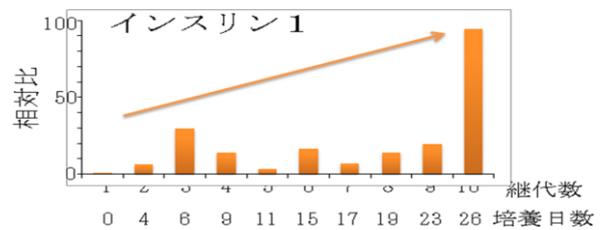
上記結果は iPS 細胞よりインスリン産生細胞への分化を示唆しているが効率性は低いと考えられた為、iPS 細胞より直接 in vitro で インスリン産生細胞へ conversion する方法へ変更して実験を行うこととした。まず、iPS 細胞を亜セレンサン、インスリン、トランスフェリンを含有する特殊培地で培養し、インスリンを含めた膵内分泌ホルモンのメッセージ発現を qPCR で検討した。その結果、上記培養条件で培養30日には iPS 細胞にインスリン I、インスリン II、グルカゴン、ソマトスタチン、PP のメッセージが発現することが判明した。

図2. 培養 iPS 細胞の RT-PCR



Day30 では Day3 に比べて インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチド mRNA 発現が 上昇した

図3. インスリン I mRNA 発現の時間的推移



Day 26 では day0 に比べてインスリン I mRNA 発現が約90倍上昇した。

(4) iPS 細胞に対するインスリン産生細胞に必要な転写因子の導入。

更にインスリン産生細胞創出の効率を上げるために現在インスリン産生細胞への分化に必要な転写因子である Pdx1, Ngn3 ならびに MafA を iPS 細胞に同時に導入 (co-transfection) する実験を行い、それぞれの転写因子が iPS 細胞に導入されていることを確認している。

#### 4. 研究成果 (まとめ)

本研究では iPS 細胞よりインスリン産生細胞創生を試みた。特色として、iPS 細胞からのインスリン産生細胞誘導には環境因子が重要と考え、ニッチとして単離膵島を用いることとし、iPS 細胞と単離膵島をストロプトトシン糖尿病ヌードマウスの腎皮膜下に共移植し、レシピエントの血糖推移、ならびに移植グラフトの組織学検索を行った。その結果、糖尿病レシピエントの血糖は正常化しなかったものの、iPS 細胞から形成されたテラトーマ内に腺管構造を有するサイトケラチン陽性細胞の近傍にインスリン陽性細胞が散在しているのが観察され、これらは iPS 細胞由来と考えられた。

iPS 細胞からインスリン産生細胞を効率よく創生するには iPS 細胞を前処置し、移植に用いれば誘導効率が改善する可能性がある。その最初的手段として、iPS 細胞を特殊培地で培養し、インスリンメッセージ発現を qPCR で検討した。その結果、iPS 細胞を亜セレンサン、インスリン、トランスフェリンを含有する特殊培地で培養するとインスリン I, インスリン I I のメッセージが発現することが判明した。現在までにこの処置をした iPS 細胞の移植実験はまだ行っていないが今後検討したい。

最後に、iPS 細胞を培養ではなく、iPS 細胞に直接、インスリン産生細胞分化に必須な転写因子 (Pdx1, Ngn3, MafA) を導入する実験を行い、実際にそれらの導入を確認している。今後はこれらの転写因子を導入した iPS 細胞を膵島と共に移植する実験を行いたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

なし

[学会発表] (計 0 件)

なし

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

安波 洋一 (YASUNAMI YOHICHI)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：00166521

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし