

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293277

研究課題名(和文)臓器再生・移植医療を目指したiPS腸管を用いた機能的膵臓の臓器分化誘導法の開発

研究課題名(英文) Development of organ regeneration and transplantation of functional pancreas from iPS cells

研究代表者

山田 高嗣 (Yamada, Takatsugu)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20316061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、iPS細胞より作製した腸管(iGut)から膵臓(iPanc)を作製することを目的に計画した。当初は臨床応用を目指して、ヒトiPS細胞を用いて研究を開始したが、iPancの作製には至らなかった。一方、マウスiPS細胞を用いた実験の過程で、iPS細胞から作製した心臓(iHeart)及びiGutの運動は、体内の臓器と同様に、低体温症の限界温度である35℃以下で減弱し、30℃で停止することを見出した。さらに、膵臓の細胞が緑色に光るマウス由来のiPS細胞を樹立できる見込みである。本研究で得られた成果及び培養技術は、iGutからiPancを臓器として再生する研究に大いに役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to induce organ regeneration of "iPanc" from "iGut" by using iPS cells. For clinical application, we tried to induce iPanc by using human iPS cells, but failed to induce human iPanc. We found that mouse iPS-derived heart (iHeart) and iGut have temperature-sensitive ability in motion, which were decreased under 35℃ and failed to move under 30℃. Now we are establishing iPS cells from mouse insulin promoter (MIP)-green fluorescence protein (GFP) mouse. Our results would provide useful information for organ regenerative medicine of iPanc from iGut.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 糖尿病 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)我々は iPS 細胞から、腸管に特異的な三胚葉系の全ての細胞で構成される「管腔状構造の蠕動運動する機能的な腸管」iPS 腸管(iGut)の臓器分化誘導に成功した。

(2)幹細胞研究の飛躍的な進歩により ES/iPS 細胞から神経や心筋細胞をはじめとする様々な『細胞』への分化誘導が報告されている。しかし、複雑な機能をもつ細胞複合体である『臓器』の分化誘導に関しては、我々の作製した腸管(iGut)のほかは大脳と網膜の再生が報告されているのみである。

(3)膵臓の再生医療の研究においては、これまで iPS 細胞からインスリン産生細胞(β 細胞)のみの分化誘導は報告されているが、 α 細胞や β 細胞で構成され、協調作用により高いグルコース応答性をもつ『膵島』のような機能的な膵臓を臓器として効率よく分化誘導する技術は確立されていない。

2. 研究の目的

(1)発生生物学的に膵臓は胎生期に前腸から発生することに着目すると、胎生期の腸管の発生過程を *in vitro* で再現できる画期的な臓器分化誘導システムである iGut は、膵臓を臓器として分化誘導する高い臓器再生ポテンシャルを有するものと期待できる。

(2)そこで、我々は iPS 細胞を用いて作製した iGut から機能的な膵臓 (iPanc)を効率よく臓器として分化誘導するという全く新しい臓器再生医療を実現するために本研究を計画した。

3. 研究の方法

(1)インスリンプロモーターの下流に GFP 遺伝子を組み込んだ MIP-GFP トランスジェニックマウスを用い、皮膚の線維芽細胞および膵外分泌細胞由来の iPS 細胞から作製した iGut に各種増殖因子を添加することにより、機能的な膵臓(iPanc)の分化誘導能を *in vitro* および *in vivo* 移植モデルで明らかにする。

(2)また、臨床応用を目指してヒト iPS 細胞から作製した iGut を用いて、iPanc の *in vitro* での臓器分化誘導能およびマウスの腎被膜下に移植して生体内での機能性を明らかにする。

4. 研究成果

(1)マウス iPS 細胞から管腔状構造を有する蠕動運動する機能的な腸管 (iGut) の臓器分化誘導に成功した実績から、臨床応用を目指して、ヒト iPS 細胞を用いてヒト iGut の作製

を試みた結果、形態的には誘導できたものの、当初予想していた蠕動運動する機能的なヒト iGut の効率的な作製には至らなかった。マウス iPS 細胞とヒト iPS 細胞の維持培養の条件の違いだけでなく、臓器分化誘導のための培養条件、培養期間などの違いが、大きく影響することが示唆された。各種増殖因子や抑制因子、分化誘導因子などを改良して、機能的なヒト iGut の効率的な誘導技術を開発中である。

(2)そこで、当初の研究計画のとおり、マウス iPS 細胞を用いて、マウス iGut および iPanc を作製することとした。インスリンプロモーターの下流に GFP 遺伝子を組み込んだ MIP-GFP トランスジェニックマウスの胎児線維芽細胞から iPS 細胞の樹立を行った。現時点では、iPS 細胞様コロニーの段階ではあるが、iPS 細胞として樹立できる見込みである。これと同時に、MIP-GFP トランスジェニックマウス由来の ES 細胞を海外の研究機関から譲渡してもらった。これまでの予備実験で、この ES 細胞から作製した ES-Gut に増殖因子を加え、GFP 陽性の膵臓様組織 (iPanc) を作製できたことから、MIP-GFP トランスジェニックマウス由来の iPS 細胞からの iGut および iPanc の分化誘導も大いに期待できるとともに、同じトランスジェニックマウス由来の iPS 細胞と ES 細胞の iPanc の誘導効率を比較することにより、幹細胞の違いが分化誘導能に及ぼす影響を解明できる可能性があるものと考ええる。

(3)また、既存のマウス iPS 細胞を用いた研究では、拍動する心筋 (iHeart) および蠕動運動する腸管 (iGut) は作製できたものの、iPanc を分化誘導するまでには至らなかった。しかし、この実験過程で、iHeart および iGut は培養温度によって機能的な変化が現れるという当初予期していない事象を見出した。iHeart の拍動および iGut の蠕動運動は、低体温症の限界温度である 35 以下で運動能が減弱し、30 でほとんど停止するが、36 以上では運動能が回復し、温度依存性に亢進することがわかった。培養皿で iPS 細胞から作製した iHeart および iGut が、生体内の心臓や腸管と同様の温度感受性を有する機能的な臓器として再生することができたことを示すとともに、iPS 細胞から臓器を再生するためには、環境因子として培養温度が重要な役割を果たしている可能性を示唆する重要な知見であるものと考ええる。本研究で得られたこれらの成果および培養技術・条件は、iGut から iPanc を臓器として再生する研究にとって大いに役立つものと考ええる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

Cavelti-Weder C, Li W, Zumsteg A, Stemman-Andersen M, Zhang Y, Yamada T, Wang M, Lu J, Jermendy A, Bee YM, Bonner-Weir S, Weir GC, Zhou Q. Hyperglycaemia attenuates in vivo reprogramming of pancreatic exocrine cells to beta cells in mice. *Diabetologia* 査読有 59, 2016, 522-532

DOI: 10.1007/s00125-015-3838-7

Cavelti-Weder C, Li W, Zumsteg A, Stemmann M, Yamada T, Bonner-Weir S, Weir G, Zhou Q. Direct reprogramming for pancreatic beta-cells using key development genes. *Curr Pathobiol Rep* 査読有 3, 2015, 57-65

DOI: 10.1007/s40139-015-0068-0

Yamada T, Cavelti-Weder C, Caballero F, Lysy PA, Guo L, Sharma A, Li W, Zhou Q, Bonner-Weir S, Weir GC. Reprogramming mouse cells with a pancreatic duct phenotype to insulin- producing beta-like cells. *Endocrinology* 査読有 156, 2015, 2029-2038

DOI: 10.1210/en.2014-1987

Li W, Cavelti-Weder C, Zhang Y, Clement K, Donovan S, Gonzalez G, Zhu J, Stemman M, Xu K, Hashimoto T, Yamada T, Nakanishi M, Zhang Y, Zeng S, Gifford D, Meissner A, Weir G, Zhou Q. Long-term persistence and development of induced pancreatic beta cells generated by lineage conversion of acinar cells.

Nature Biotechnology 査読有 32, 2014, 1223-1230

DOI: 10.1038/nbt.3082

Cavelti-Weder C, Shtessel M, Reuss JE, Jermendy A, Yamada T, Caballero F, Bonner-Weir S, Weir GC. Pancreatic duct ligation after almost complete beta-cell loss: Exocrine regeneration but no evidence of beta-cell regeneration. *Endocrinology* 査読有 154, 2013, 4493-4502

DOI: 10.1210/en.2013-1463

Caballero F, Siniakowicz K, Hollister-Lock J, Duran L, Katsuta H, Yamada T, Lei J, Deng S, Westermarck GT, Markmann J, Bonner-Weir S, Weir GC. Birth and death of human β -cells in pancreas from cadaver donors, autopsies, surgical specimens, and islets transplanted into mice. *Cell Transplantation* 査読有 23, 2014, 139-152

DOI: 10.3727/096368912X659916

山田高嗣, Direct Reprogramming - 生体内臓器再生の将来展望 -

Medical Science Digest 査読無 43, 2017, 10-11

http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/05msd/msd2017_1.html

山田高嗣, 植田剛, 中島祥介, iPS 細胞と消化器疾患 iPS 細胞と腸疾患 - 臓器としての腸管の再生 -

G.I. Research 査読無 24, 2016, 112-119

<http://www.sentan.com>

山田高嗣, 中島祥介, 消化管の再生医療

iPS 細胞による消化管再生医療 *G.I. Research* 査読無 22, 2014, 443-449

<http://www.sentan.com>

山田高嗣, 中島祥介, 消化器研究における最新技術 iPS 細胞技術による消化管臓器の作製

G.I. Research 査読無 22, 2014, 185-192

<http://www.sentan.com>

山田高嗣, 植田剛, 中島祥介, 消化器領域における再生医工学 腸管再生医療 - iPS 細胞から腸管の臓器再生 -

G.I. Research 査読無 21, 2013, 166-170

<http://www.sentan.com>

[学会発表] (計 9 件)

Yamada T, Ueda T, Nakamoto T, Zhou Q, Gordon Weir, Nakajima Y. Organ regenerative medicine of "iGut" from iPS cells and "new islets" using reprogramming technology. CiRA/ISSCR International Symposium 2016, March 22-24, 2016, Kyoto, Japan.

Yamada T, Cavelti-Weder C, Hollister-Lock J, Sullivan B, Bonner-Weir S, Nakajima Y, Weir GC. *Ex vivo* pancreatic regeneration of branching morphogenesis by three-dimensional ductal cell culture system. The 13th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June 24-27, 2015, Stockholm, Sweden.

Yamada T, Cavelti-Weder C, Hollister-Lock J, Sullivan B, Bonner-Weir S, Weir GC. Pancreatic branching morphogenesis in three-dimensional ductal cell cultures. The 75th Scientific Sessions of American Diabetes Association (ADA), June 5-9, 2015, Boston, Massachusetts, USA.

Yamada T, Ueda T, Nakamoto T, Nakajima Y. Organ regeneration of functional gut (iGut) from mouse iPS cells. The 12th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June 18-21, 2014, Vancouver, BC, Canada.

Yamada T, Cavelti-Weder C, Sharma A, Li W, Zhou Q, Bonner-Weir S, Weir GC. Direct reprogramming of adult pancreatic

duct cells to insulin-producing beta-cells by defined transcription factors. The 74th Scientific Sessions of American Diabetes Association (ADA), June13-17, 2014, San Francisco, California, USA.

Yamada T, Cavelti-Weder C, Guo L, Sharma A, Li W, Zhou Q, Bonner-Weir S, Weir GC. In vitro reprogramming of adult pancreatic duct cells to insulin-producing beta cells by defined transcription factors. The 11th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June 12-15, 2013, Boston Massachusetts, USA.

山田高嗣、植田 剛、中本貴透、Gordon Weir、中島祥介、iPS 細胞/リプログラミング技術を応用した臓器再生医療-新しい外科学の創造 第116回日本外科学会定期学術集会 2016.4.15 大阪国際会議場(大阪)

山田高嗣、Gordon Weir、中島祥介、リプログラミング技術を用いた新たな膵島の臓器再生誘導システムの開発 第43回日本膵・膵島移植研究会 2016.3.5 ホテルグランピア広島(広島)

山田高嗣、植田 剛、中本貴透、Qiao Zhou、Gordon Weir、中島祥介、iPS 細胞を用いた人工腸管(iGut)とリプログラミング技術を応用した人工膵島の臓器再生誘導システムの開発

第71回日本消化器外科学会総会
2016.7.15 アスティ徳島(徳島)

〔図書〕(計2件)

山田高嗣、中島祥介、診断と治療社、iPS/iGutからの膵β細胞の再生誘導 膵島の再生医療-膵β細胞の発生と再生をめぐる新展開 2015、27-35

山田高嗣、中島祥介、中外医学社、消化管領域における iPS 細胞の応用 Annual Review 消化器、2014、7-13

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 高嗣 (YAMADA, Takatsugu)
奈良県立医科大学・消化器・総合外科・講師
研究者番号：20316061

(2)研究分担者

中島 祥介 (NAKAJIMA, Yoshiyuki)
奈良県立医科大学・消化器・総合外科・教授
研究者番号：00142381

植田 剛 (UEDA, Takeshi)
奈良県立医科大学・消化器・総合外科・助教
研究者番号：40526810

(3)研究協力者

中本 貴透 (NAKAMOTO, Takahiro)

粕田 承吾 (KASUDA, Shogo)