

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870158

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来膵島の形成メカニズム解析と高効率誘導系の開発

研究課題名(英文) High efficiency differentiation of functional islets from human iPS cells and hiPS-endocrine progenitor cells in vitro.

研究代表者

渡邊 亜美 (Watanabe, Ami)

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任研究員

研究者番号：40611421

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)：本研究では当研究室で樹立したヒトiPS細胞からの膵島形成培養系をベースとし、ヒト膵島前駆細胞から膵島様構造物形成に至るまでのメカニズムを解析すること、および得られた知見を応用して生体外で大量に膵島を作製する系を確立することを目的に研究を行なった。その結果、分化誘導系において内分泌前駆細胞は、自己凝集することで膵島様構造物を形成することを見出した。この結果をもとに膵島形成培養系を改良したところ、膵島形成効率を向上させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：We previously showed that functional islets with a 3-dimensional structure consisting of multiple endocrine cells were formed in vitro from mouse fetal pancreatic bud cells. Based on this finding, we have developed a culture system to generate functional islet from human iPS cells. In this study, we isolate highly enriched population of pancreatic endocrine progenitor cells from endocrine progenitor cell culture stage cells by cell sorting. These cells can differentiate into the functional islet-like cell cluster. This result indicate that the iPS-islets can be generated from endocrine cells efficiently. Furthermore, we found that Ngn3 positive cells formed islet-like cell aggregate autonomously in this differentiation system. We are currently trying to scale up the culture system for production of a large quantity of islets.

研究分野：再生医療

キーワード：膵臓 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、重症糖尿病の治療として膵島移植が行われているが、絶対的なドナー不足および、拒絶反応が本治療法の普及を妨げている。そこで、ヒト iPS 細胞から 細胞を作る試みが国内外で行われている。しかし、既報の分化誘導法では、細胞の分化誘導効率が数%から最大 25%と低く、さらにグルコース濃度応答性のインスリン分泌能が低いといった重大な問題がある。また、移植治療において、膵臓内分泌細胞を単独で移植するよりも膵島単位で移植する方が細胞の生着率が高いことが知られているが、既報の方法では膵臓内分泌細胞を単独で誘導する系であり、ヒト iPS 細胞から機能的な膵島を形成できる系はなかった。

申請者の所属する研究室では、マウス胎児膵細胞より *in vitro* で膵島を作製する実験から得た知見を元に、マウス iPS 細胞から血糖値是正機能を持つ膵島様構造を作る事に成功している。(Saito *et al.* PLoS one 2011)。申請者は、この培養系をヒト iPS 細胞に忠実に適用したが膵島はできなかった。その後、検討を重ねた結果膵臓系の細胞を含む独自の付着細胞シートをフィーダーとして用いることで、生体内同様の構造を持った膵島ができ、既報の系を用いた場合と比較して分泌機能が劇的に向上することを見いだした。しかし本培養系での膵島形成効率は数%と低い。本方法をヒトの再生医療に資する為には数百倍以上の効率向上が必須である。

申請者はこの現状を打開する為に、膵島形成過程を理解し、膵島前駆細胞を効率的に膵島にする系を構築する事、膵島の種となる膵島前駆細胞を無尽蔵に増やす系を作る事が有効であると考えている。しかし、現在までに膵島となる細胞がどれか、どのように膵島構造が形成されるのか、など、現状の系で膵島が形成されるメカニズムはほとんど不

明である。これが解明でき構造形成に必須の要素がわかれば、この要素を凝集し、より膵島を作りやすい環境を整える事で効率よく膵島形成に至る培養系を構築できる事が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、当研究室で確立したヒト iPS 細胞からの三次元膵島形成系において、

膵島前駆細胞から膵島様構造形成に至るまでのメカニズムを理解し、得られた知見を元に系を再構築する

ヒト膵島前駆細胞を無尽蔵に増やす系を開発する

以上を行うことで、*in vitro*でのヒト iPS膵島形成効率を劇的に向上させることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、当研究室で樹立した三次元膵島形成系において、ヒト膵島前駆細胞から膵島様構造形成に至るまでのメカニズムを理解し、これを応用して生体外で高効率、かつ大量に膵島を作製する系を確立する。

申請者らは現在までにマウス iPS細胞からの膵島分化誘導系を確立しており、さらに、ヒト iPSから膵島を形成する改良系を開発している。この系では、単層培養で iPS細胞から、

内胚葉系細胞 原始腸管系細胞 膵臓前駆細胞 膵臓内分泌前駆細胞と膵臓発生のステージを模倣した分化誘導を行う。細胞を剥離分散させたのち iPS細胞由来の付着細胞シート上に撒き直す。これで、インスリン産生能を備え、複数の内分泌細胞によって構成される膵島様構造が形成される。しかし、この培養系では膵臓系のみならず様々な細胞が混在しており、膵島を形成する前駆細胞ならびにこれと相互作用する細胞種は不明である。以上の事から、本誘導系における膵島形

成過程を詳細に解析することで、*in vitro*における膵島の形成メカニズムを理解する。

具体的には以下の項目を明らかにする(図1)。

ヒトiPS細胞由来膵島前駆細胞からの膵島様構造形成メカニズム解析と系の最適化

- a) 膵島前駆細胞からの膵島形成過程の観察
- b) 分化支持フィーダー細胞中の膵島形成を支持する細胞種同定と分子メカニズムの解析

- c) 膵島前駆細胞からの膵島形成系の最適化

膵島種細胞の大量培養法の開発

自己増殖可能な膵島前駆細胞の分取、維持培養系の確立と大量培養法への応用

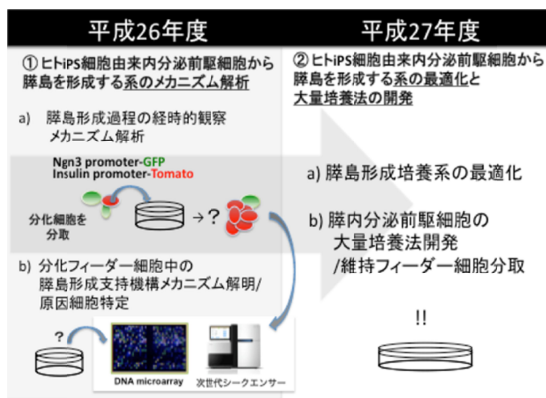


図1 研究計画の概要

4. 研究成果

- a) 膵島前駆細胞からの膵島形成過程の観察
内分泌前駆細胞マーカー (NGN3) と、内分泌細胞マーカー (インスリン) の発現を検出可能な発現ベクターを組み込んだヒト iPS 細胞を用いて実験を行なった。iPS 細胞を内分泌前駆細胞ステージまで誘導した後、セルソータを用いて内分泌前駆細胞マーカーを発現する細胞のみを純化した。この細胞が膵島様構造物を形成可能な細胞か検討するために、低接着培養器材を用いて Ngn3 陽性細胞と陰性細胞を凝集塊にし、成熟培養した。その結果 Ngn3 陽性細胞においてのみ、インスリン発現細胞が認められた。そこで次に、これら

前駆細胞がどのように膵島様構造を形成するかインキュベーター型共焦点顕微鏡を用いてリアルタイムで追跡、観察した。その結果、複数の内分泌細胞が集合して膵島を形成する様子が認められた。細胞密度の重要性を検討するために、撒き直す内分泌前駆細胞の数を増やしたところ、内分泌前駆細胞は巨大な凝集塊を形成するにとどまり、効率が向上するような様子は認められなかった。

- b) 分化支持フィーダー細胞中の膵島形成を支持する細胞種同定と分子メカニズムの解析

当フィーダー細胞シート内に存在する細胞種、構造体のうち、膵島形成過程において膵島前駆細胞に何が、どのように作用するのかは不明である。しかし、申請者は予備的な実験で細胞シートと膵島前駆細胞との直接的な接触を阻害すると効率が下がるという結果を得ており、フィーダー細胞、もしくはフィーダー構造体との直接的な相互作用が膵島形成に必要であると考えている。この詳細を特定する為に前述の内分泌細胞マーカーを組み込んだ iPS 細胞を膵島形成系に移行した後、フィーダー上で膵島が形成されやすい部位がどこか観察した。しかし予想に反して、セルソータを用いて純化した内分泌前駆細胞をフィーダー細胞上に播種したところ、細胞はフィーダー細胞にほとんど付着し、細胞塊は形成されなかった。細胞純化を行わない従来の培養系においては細胞塊が形成されることから、細胞分散時に含まれる内分泌細胞以外の細胞が膵島様構造物の形成に有利にはたらいっている可能性が考えられた。

- c) 膵内分泌前駆細胞からの膵島形成系の最適化

上記の知見を元に膵島形成系をさらに改良した。膵島形成過程において、複数の内分泌前駆細胞が凝集した上で膵島を形成すると

という結論であったため、内分泌前駆細胞を分取した上で効率的に膵島を形成可能である細胞播種密度、培養形態等を検討した。その結果内分泌前駆細胞を浮遊培養条件で培養することでインスリン分泌可能な膵島様構造物を効率的に培養可能であることがわかった(図2)。

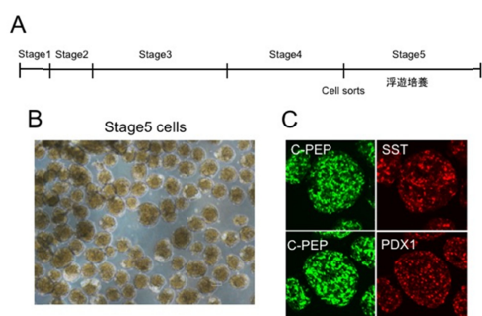


図2 内分泌前駆細胞由来の膵島様構造物
A. 分化誘導scheme B. Stage5 cellsの顕微鏡写真 C. Stage5 cellsの免疫染色

膵島種細胞の大量培養法の開発

1) 自己増殖可能な膵島前駆細胞の分取、維持培養系の確立と大量培養法への応用

膵島を効率的、かつ大量に得る為に、自己複製する膵島前駆細胞を大量に培養する系の開発を試みた。最近、マウス間葉系細胞をフィーダーとして用いて膵内分泌前駆細胞を増殖させることが可能であると報告された

(Sneddon *et al.* Nature 2012)。この膵島前駆細胞は膵内分泌前駆細胞、もしくはこれに近い細胞であると考えられるので、この系の応用が有効である可能性が高い。膵島前駆細胞をセルソーターで分取し、これを各種マウス細胞株と共培養することでNGN3陽性のまま維持増殖可能か検討した。しかし内分泌前駆細胞は平面培養条件下で速やかに分化、あるいは増殖停止し、Ngn3陽性細胞の自己増殖の様子は認められなかった。現在培養器材および条件を変更することで増殖が可能かを検討するとともに、外来性遺伝子発現によって無限増殖可能となるかについても検討を行っているまた、ヒトiPS細胞由来の間葉系幹細胞を

増殖フィーダーとして利用できるか検討を行っている。

2) 内分泌前駆細胞以外のステップの細胞
膵前駆細胞と内分泌前駆細胞の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析によって検討した。その結果、膵内分泌前駆細胞特異的に発現する遺伝子発現が認められた。現在この遺伝子発現変動を解析し、細胞増殖に必須の遺伝子発現を外来性に模倣する系の確立を目指している。また、ngn3 陽性細胞をセルソーターにて純化し、この細胞に各種不死化遺伝子および細胞増殖因子を外来性に発現することで無限に増殖可能な細胞株を得ることが可能か検討した。その結果、ngn3 陽性細胞は緩やかに増殖することがわかったものの、その増殖速度は極めて遅かった。現在導入遺伝子を検討することで、株化細胞と同等の増殖速度で前駆細胞を増殖可能か検討している。

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)

[学会発表](計4件)

渡邊亜美, 田中杏奈, 大坪寛之, 太田正広, 山下-菅原泉, 三谷幸之介, 中西真人, 岡崎 康司, 宮島篤

ヒト iPS 細胞由来の膵内分泌前駆細胞を用いた機能的膵島分化誘導系の開発, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017 年 03 月 07 日~2017 年 03 月 09 日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

Ami Watanabe, Anna Tanaka, Hiroyuki Otsubo, Masahiro Ohta, Yzumi Yamashita-Sugahara, Kohnosuke Mitani,

Mahito Nakanishi, Yasushi Okazaki,
Atsushi Miyajima
Differentiation of functional islets from
human iPS cells and hiPS-endocrine
progenitor cells in vitro. ISSCR 2016(国
際学会), 2016年06月22日~ 2016年06月
25日(USA, San Francisco)

Ami Watanabe, Atsushi Miyajima,
Differentiation of functional islets
from human iPS cells in vitro. ISSCR
2015(国際学会) 2015年06月24日~ 2015
年06月27日 (Sweden, Stockholm).

渡邊亜美, 小高晃弘, 大坪寛之, 田中
杏奈, 宮島篤 ヒト iPS 細胞からの機能的
な膵島分化誘導系の改良と膵島形成効率
の改善 第14回日本再生医療学会 2015年
03月20日 パシフィコ横浜 (神奈川県横
浜市)

〔図書〕(計1件)

渡邊亜美, 宮島篤, 医学出版 月刊糖尿病 特
集:糖尿病領域における再生医療の現状と展
望』(「多能生幹細胞からの膵島組織作成」)
2015 96(16-24)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊亜美 (WATANABE, Ami)

東京大学・分子細胞生物学研究所・発生・再
生研究分野・特任研究員

研究者番号: 40611421

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()