

# 博士論文

ヒト iPS 細胞由来腭前駆細胞の大量生産に向けた三次元浮遊攪拌培養装置による分化誘導系の開発

三 原 裕 一 郎

論文のタイトル：

ヒト iPS 細胞由来膵前駆細胞の大量生産に向けた三次元浮遊攪拌培養装置による分化誘導系の開発

所属： 東京大学大学院 医科学系外科学専攻 肝胆膵外科・人工臓器移植外科

指導教員名： 國土典宏・阪本良弘

申請者名： 三原裕一郎

## 「要旨」

---

再生医療の急速な発展に伴い膵島細胞や膵前駆細胞を多能性幹細胞から作成することが現実となりつつある。一方で、臨床応用に必要な大量の誘導細胞をどのように確保するのかについては未解決の課題である。我々は三次元浮遊攪拌培養装置を用いて、ヒト iPS 細胞から大量の膵前駆細胞を作成することを試みた。誘導因子・培地条件の最適化を行い三次元浮遊攪拌培養装置で 17 日間の培養を行うことで、ヒト iPS 細胞から大量の膵前駆細胞を作成することが可能であった。更に 2 週間、培養を継続すると膵内分泌細胞・膵外分泌細胞へ分化することも確認した。三次元浮遊攪拌培養にて多能性幹細胞を膵前駆細胞へ分化させる本手法は大量培養方法として有用であることが示唆された。

目次	Page
要旨	3
目次	4
略語一覧	6
第一章 序文	8
第二章 方法	
第一節 細胞培養	
第一項 多能性幹細胞の未分化維持培養	13
第二項 三次元浮遊攪拌培養装置	13
第三項 三次元浮遊攪拌培養による多段階誘導法	15
第二節 細胞塊の評価方法	
第一項 細胞数のカウント・細胞凝集塊の計測	18
第二項 RNA 抽出及び quantitative RT-PCR	18
第三項 免疫蛍光染色法による評価	20
第四項 フローサイトメトリーでの細胞評価	21
第五項 グルコース負荷試験	22
第六項 誘導細胞(Day31)の移植	22
第七項 統計解析	22

第三章 結果	Page
第一項 三次元浮遊攪拌培養による iPS 細胞の凝集塊形成	23
第二項 iPS 細胞からの胚性内胚葉への分化誘導	26
第三項 胚性内胚葉から膵前駆細胞への分化誘導	29
第四項 膵前駆細胞から成熟膵臓細胞への分化誘導	32
第四章 考察	36
引用文献	45
本研究の公表について	56
謝辞	58

## 略語一覧

本論文で使用した略語は以下のとおりである。

bHLH : basic Helix-loop-helix

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DO : Dissolved Oxygen

EGF : Epidermal Growth Factor

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ES: Embryonic stem

FOXA2 : Forkhead box protein A2

GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GCG : Glucagon

GSIS : Glucose stimulated insulin secretion

INS : Insulin

iPS: Induced Pluripotent Stem

KGF : Keratinocyte growth factor

NANOG: Nanog homeobox

NGN3 : Neurogenin 3

NKX6.1 : NK6 homeobox 1

Oct : Octamer-binding transcription factor

PBS : Phosphate buffered saline

PDX-1 : Pancreatic and duodenal homeobox 1

PFA : Paraformaldehyd

PTF1A : Pancreas Specific Transcription Factor, 1a

QOL : quality of life

RNA : Ribonucleic acid

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SOX17 : Transcription factor SOX-17

TTNPB : 4-[(E)-2-(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)

-1-propenyl] benzoic acid, Arotinoid acid

## 第一章：序文

多能性幹細胞の発見・開発により、再生医療の分野では疾患や外科的処置により失われてしまった臓器を作成する事が現実味を帯びてきた。

膵島細胞の絶対量が減少することにより発症する1型糖尿病では、ヒトの膵島細胞の他家移植が1974年が世界で初めて行われた(1)。当初の移植方法や免疫抑制の方法では、膵島細胞の生着・機能維持が困難であったが2000年にエドモントンプロトコル(2)が発表され、膵島移植によりインスリン依存状態から離脱する事が現実のものとなった。しかしながら、膵島移植は心臓移植や肝移植と異なり、摘出した膵臓から膵島細胞を抽出・純化する必要がある。移植に用いるグラフトは、他の臓器移植同様に脳死ドナーもしくは生体ドナー(3)からの提供が必要であるが、1度の移植で11000個/Kgの膵島（総β細胞数 $1.3E+8$ 個/body）が必要であり、インスリン離脱のためには複数のドナーと2回以上の反復での移植を必要とすることが特徴である。エドモントンプロトコルによる膵島移植方法では膵島を門脈内に注入し、肝臓血管内に膵島が生着することでインスリン分泌が可能となるが、移植された膵島細胞は数年で免疫応答などにより減少・機能低下する。エドモントンプロトコルでの移植方法をもってしても移植後5年目のインスリン離脱率は10%台と低いのが現状である。長期間のインスリン離脱が難しい点もさることながら、複数のドナー・大量の膵島細胞を

必要とする事は膵島移植が一般化する上では大きな障害となっている。

移植に必要な膵島グラフト不足の問題を解決するために、医療工学・薬学・再生医療といった様々な分野で研究が行われてきた。特に、再生医療の領域では多能性幹細胞から膵島細胞を作成する方法や肝臓(4)・膵管上皮細胞(5)などからダイレクトリプログラミングの手法で多能性幹細胞を経ず膵島細胞に直接誘導する方法などが模索されている。

近年は特に多能性幹細胞を用いた手法で目覚ましい進展が見られている。多能性幹細胞由来の成熟膵島細胞作成の研究では、多能性幹細胞に様々な因子を段階的に加える多段階誘導法によって膵島細胞を作成する手法や胚盤胞補完法によってキメラ動物から臓器を得る方法などが報告されている。

ES 細胞や (6) や iPS 細胞(7)といった多能性幹細胞は未分化な段階ではほぼ無限に増殖する事から脳死・生体ドナーを必要としない無尽蔵な臓器提供を可能としよう。

特に、iPS 細胞は患者本人の細胞から作成することも可能であることから、iPS 由来の誘導細胞は **Allogenic Donor** のグラフトよりも良好な生着が期待できることも報告されている(8)。

2008 年には多能性幹細胞に様々な因子を作用させることで膵前駆細胞を作成し、得られた膵前駆細胞をマウスに移植すると数ヶ月の経過で生体内で膵前駆

細胞が機能的インスリン分泌を示す細胞に分化することに成功したとの報告がみられた(9)。この事から、多能性幹細胞から機能的な膵島細胞を作成することが現実のものとなり、培養・誘導方法について多くの施設で研究がなされるようになった。in vitro でのインスリン分泌細胞誘導での報告では、2011年マウスの iPS 細胞から高いグルコース応答性インスリン分泌能力を保持する誘導膵島細胞を作成したとの報告を行った (10)。2014年にはヒトの iPS 細胞をソースとしてグルコース応答性インスリン分泌能を保持する成熟膵島細胞を作成したとの報告がなされた(11)。また同年、ヒト由来多能性幹細胞を in vitro 条件のみで高効率に機能的膵島細胞の分化誘導に成功したとの報告がなされた(12)。多能性幹細胞由来の膵島細胞による一型糖尿病治療が現実のものとして考慮される段階に到達している。

一方、多能性幹細胞を用いてキメラ動物を作成する手法については、2010年胚盤胞補完法にて膵臓発生の重要遺伝子である PDX1 を欠損させたマウスの胚盤胞にラットの iPS 細胞を移植する事でマウスにラットの膵臓を作成させることに成功したとの報告がなされた(13)。当初はヒトの ES/iPS 細胞は Epiblast stem cell (14)の状態であるためヒトへの応用は困難と考えられていたが、2014年には Epiblast stem cell の段階よりもさらに発生の前段階にあたる naive 型のヒト多能性幹細胞を作成したとの報告(15)がなされ、胚盤胞補完法によるヒト臓器創

出も現実の選択肢として考慮されうる段階に到達している。

膵島細胞の移植効率そのものを向上させる試みも多くなされており、膵島細胞と脂肪肝細胞を融合させることで必要細胞数や長期成績を向上させられる可能性について報告しているグループや(16)、組織工学的な手法で、膵島細胞を再構築し機能的な膵島細胞として生体内に移植する手法についても研究がなされている。特に、共同研究を行った東京女子医科大学のグループからは膵島細胞を温度応答性培養皿に播種して細胞シートの状態で皮下組織に移植することで機能的な膵島機能を示すことも報告(17)している。

このように、再生医療技術を応用して、様々な方法で膵島移植を更に現実的な治療の選択肢として考えられるようになりつつあるが、ヒトへの臨床応用に向けては大量の細胞の確保が必要不可欠である。臨床応用に向けては誘導の高効率化と大量培養方法の構築が必要である。多能性幹細胞から膵前駆細胞への分化を細胞培養皿上の二次元空間で行っている報告が多くみられるが、同手法は空間的制約や培養にかかる手間の面から臨床応用に必要なだけの大量の細胞確保には適さないと考えられる。

一方で、三次元浮遊攪拌培養は、高密度培養が可能であり単一の培養槽内で大量の細胞を培養することが特徴として挙げられる。

東京女子医科大学先端生命医科学研究所では独自に三次元浮遊攪拌培養装置

(Figure1)を開発し、同装置での未分化培養や多能性幹細胞由来誘導心筋細胞の培養研究を行っている。

同培養装置では、持続的に酸素濃度・pH・温度といった培地条件のモニタリングすることで、コンピューターによる培地条件の自動制御も可能である。培地条件を安定的に管理する事が可能な細胞培養技術の開発は、産業化・臨床化に寄与できると考える。共同研究者の松浦らは同培養装置を用いた、多能性幹細胞の大量培養方法やヒト由来 iPS 細胞由来誘導心筋細胞の大量培養・誘導法について報告している(18)。誘導心筋細胞は機能的にも優れた成績を示すことから、三次元浮遊攪拌培養装置による培養方法は様々な細胞腫に対する分化誘導方法として有用な方法である可能性がある。

今回我々は同培養装置を用いて、臨床応用にむけた三次元浮遊攪拌培養での多能性幹細胞由来臍前駆細胞の大量作成を試みた。

本論文では、三次元浮遊攪拌培養により大量のヒト iPS 細胞由来臍前駆細胞を分化誘導したことを報告する。

## 第二章：方法

### 第一節 細胞培養

#### 第一項 多能性幹細胞の未分化維持培養

理化学研究所 (Tsukuba, Japan)から購入した、ヒト iPS 細胞 253G1 株(19)を用いて実験を行った。253G1 株は培養皿上での 2 次元培養で mitomycin C-treated mouse embryonic fibroblasts(ReproCELL)との共培養による On Feeder 条件での維持培養を行った。iPS 細胞の接着培養では、培地として Primate ES Cell medium(ReproCELL, Yokohama, Japan)に 5ng/ml の basic fibroblast growth factor (bFGF; ReproCELL)を添加した物を用いた。3-4 日間の培養の後、Dissociation Solution(ReproCELL)によるコロニーの剥離・小凝集塊へのクランプ処理を行い一日間培養したマウス胎児繊維芽細胞上に播種し、継代を行った。

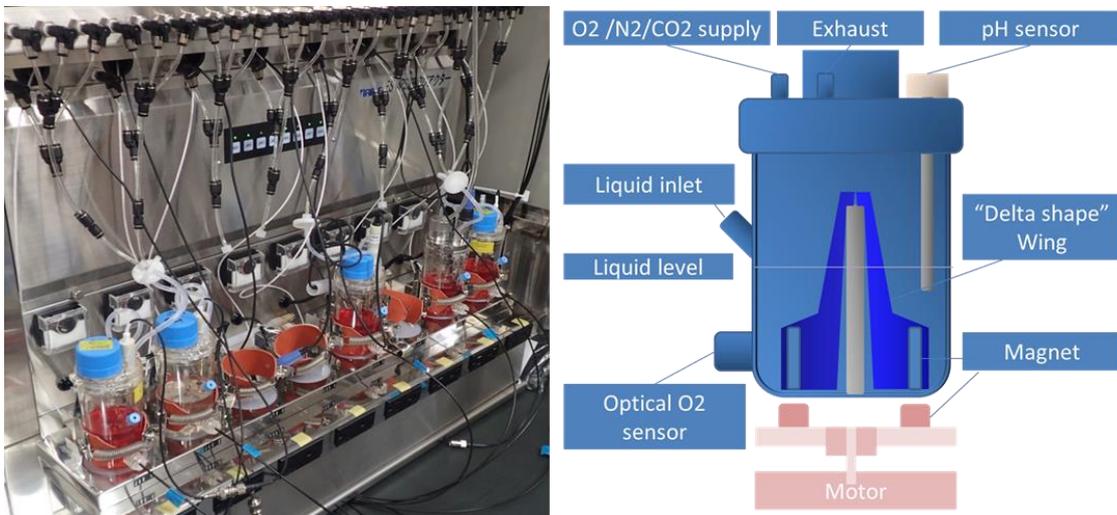
#### 第二項 三次元浮遊攪拌培養装置

東京女子医科大学先端生命医科学研究所により開発された、三次元浮遊攪拌培養装置を使用した。Figure 1 に示す如く、250ml の培養槽の中に、デルタ型の攪拌翼が備え付けられている。同培養槽の攪拌では層流の安定化が可能である。培養槽の軸中心では培養槽内側へ向かう層流が生じ、基層からの物質の浸透効率が上昇する。同培養槽での培養では細胞凝集塊が中層に集まるが、中層での

攪拌は層流での攪拌となり、攪拌翼への物理的な刺激によるストレスが軽減される。また、小型 pH センサー・非接触型蛍光式溶存酸素濃度センサーにて培養条件を持続モニタリングし、このデータを基に pH・酸素濃度の自動調整を行うことが可能である。

本研究では、攪拌速度は 40rpm、自動調整による酸素および窒素供給により溶存酸素は 40%もしくは 60%で維持し、pH は二酸化炭素の自動供給により pH7.2 で維持した。また、細胞培養においては培養温度を 37°Cで維持した。

Figure 1)



### 第三項 三次元浮遊攪拌培養による多段階誘導法

培養皿上で培養した iPS 細胞がコンフルエントな状態となった段階で、Dissociation solution を用いて細胞を剥離した。ピペッティング操作にてコロニーを  $50\ \mu\text{m}$  程度の小凝集塊とし 250ml の培養槽(培地量 : 100ml)に播種した。培地 100ml あたり、iPS 細胞がコンフルエントな状態の 10 cm培養皿 10 枚を要した。Day1-3 の期間は、未分化維持培養を行い多能性幹細胞は凝集塊の形態で増殖させた。未分化維持培養では mTeSR1(Stem Cell technologies)を使用した。培地は毎日交換し、播種初日の段階のみ培地中に Rho-associated coiled-coil forming kinase 阻害剤である Y-27632(Wako,Japan)を  $10\ \mu\text{M}$  添加し,Day2,Day3 では mTeSR1 単独で培養を行った。得られた未分化状態の iPS 細胞凝集塊に以下の条件で 5 段階の多段階誘導を加えた (Figure2)。

使用した培地は、Stage1 及び Stage 2 の段階では、StemPro34 medium (Life Technologies)に  $50\ \mu\text{g/mL}$  ascorbic acid (Sigma–Aldrich),  $2\ \text{mM}$  L-glutamine, 及び  $400\ \mu\text{M}$  1-thioglycerol (Sigma–Aldrich)を添加した培地を使用した。また、Stage3,Stage4,Stage5 の各段階では improved MEM medium に 1% B27 supplement (Life Technologies) ,  $400\ \mu\text{M}$  monothioglycerol を添加したものを培地として用いた。

多段階誘導で用いる因子については、過去の報告(20) (21) (22)を参考に因子の種

類・投与量・投与時期を設定した。

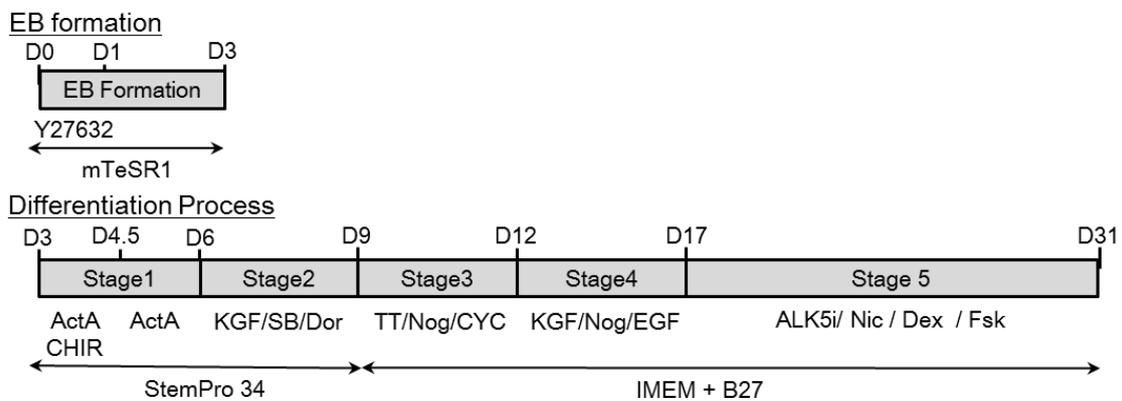
Stage1(Day3-6)では、Day3-4.5の期間は ActivinA 100ng/ml に GSK3 阻害剤である 3  $\mu$ M CHIR 99021 (TOCRIS Bioscience)を添加し、続く Day 4.5-6 は CHIR99021 を除いた 100 ng/ml Activin A のみを添加して培養した。Stage2 (Day6-9)では、50 ng/mL KGF (Peprotech), 10 mM SB431542 (TOCRIS), and 1  $\mu$ M dorsomorphin (Calbiochem)を加えた。Stage3 (days 9-12) では 3 nM TTNPB (Sigma-Aldrich), 2.5  $\mu$ M cyclopamine (Sigma-Aldrich), and 50 ng/mL Noggin (StemRD)を添加した。

Stage4 (Day 12-17) では 50 ng/mL KGF, 50 ng/mL Noggin, and 50 ng/mL EGF (Peprotech)を添加。Stage5 (Day 17-31),では 10  $\mu$ M forskolin (FOCUS Biomolecules), 10 mM nicotinamide (PhytoTechnology Laboratories), 10  $\mu$ M dexamethasone (Wako), and 5  $\mu$ M TGF $\beta$ RI kinase inhibitor II (Calbiochem)を添加した。培地交換のタイミングは、Stage2 および Stage3 では各ステージ初日のみ、Stage4 および Stage5 では 2,3 日ごとに交換を行った。溶存酸素は Stage1 のみ DO60%とし、以降は 40%で培養をおこなった。

Figure 2) 誘導プロトコル

接着培養から浮遊攪拌培養に移行したのち、三日間の培養で細胞凝集塊を形成し、多段階誘導法により Definitive endoderm(Day6), Primitive foregut(Day9), Posterior foregut(Day12), を経て膵前駆細胞(Day17)を誘導。更に、二週間の培養を行うことで膵島細胞・腺管細胞・膵管細胞へ誘導する(Day31)。

ActA: ActivinA, CHIR:CHIR99021, SB: SB431542, Dor; Dorsomorphin, TT; TTNPB, Nog; Noggin, CYC; Cyclopamine ALK5i: TGF $\beta$ RI kinase inhibitor II, Nic; Nicotinamid, Dex; Dexamethasone, FSK; Forskolin



## 第二節 細胞塊の評価方法

### 第一項 細胞数のカウント・細胞凝集塊の計測

各段階の細胞塊は光学顕微鏡(Nikon, Tokyo, Japan)により撮影を行い細胞径はNIS-Elements software (Nikon)にて計測した。細胞数のカウントはAccumax(innovative cell technologies, CA)で凝集塊を分散させた上、One cell counterで行った。

### 第二項 RNA 抽出及び quantitative RT-PCR

得られた凝集塊は、遠心分離にてペレット化し培養液を除去後に RNAprotect Cell Reagent(Qiagen, Hilden, Germany)を添加して-20°Cで保存した。RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて、逆転写は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いてプロトコル通りに行った。定量的ポリメラーゼ連鎖反応は Taqman gene expression assay (Applied Biosystems)より購入した Primer/probes set および TaqMan®Fast Advanced Master Mix を用い、StepOne™ 及び StepOnePlus™ Real Time PCR Systems (Applied Biosystems)で反応・解析を行った。インターナルコントロールにはハウスキーピング遺伝子の GAPDH を用いて、 $\Delta\Delta$ CT 法で RNA の発現評価を行った。次項に使用した Primer/probes set のリストを掲載する。

List) Taqman gene expression assays のプライマーリスト

Gene	Assay ID
SOX 17	Hs00751752_s1
FOXA 2	Hs00232764_m1
PDX1	Hs00236830_m1
NKX6-1	Hs00159616_m1
NGN3	Hs01875204_s1
PTF1A	Hs00603586_g1
INS	HS02741908_m1
GCG	HS01031536_m1
GAPDH	HS00266705_g1

### 第三項 免疫蛍光染色法による評価

細胞塊は4%PFAにて固定を行い、ブロッキング液には5% Donkey serum に0.1% Triton X100 を添加したものを使用した。二重染色法による免疫染色を行ったが、一次抗体はブロッキング液に溶解して overnight 4°C で反応させた。PBS で三階洗浄した後、ブロッキング液に溶解した二次抗体を室温で1時間反応させた。

一次抗体としては anti-Oct4, anti-NANOG, anti-SOX17 and anti-PDX1 goat polyclonal antibodies (R&D Systems, Minneapolis, MN), anti-HNF3 $\beta$ /FOXA2 (Millipore, Temecula, CA), anti-NKX6.1(Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden) and anti-C-peptide (GeneTex, CA) rabbit polyclonal antibodies, PE-conjugated anti-CD142 (BD Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ), anti-GCG HGL-B5 mouse monoclonal antibodies (Abnova, Taipei, Taiwan), anti-Trypsin1 sheep polyclonal antibody (R&D Systems) Anti-Pancreatic alpha amylase (Abcam)を用いた。

二次抗体には、Alexa Fluor® 488 conjugated donkey anti-Goat IgG and anti-rabbit IgG antibodies, Alexa Fluor® 555 conjugated donkey anti-rabbit IgG and anti-Mouse IgG antibodies, Alexa Fluor® 568 conjugated donkey anti-mouse IgG and anti-sheep IgG antibodies, Alexa Fluor 647 conjugated donkey anti-sheep IgG antibody (Life technologies, CA) and PE conjugated anti-mouse IgG1 antibody (BD Pharmingen,

Franklin Lakes, NJ)を用いた。

ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen)を用いて、核の染色および封入を行い共焦点顕微鏡(Carl Zeiss, Germany)による評価を行った。

#### 第四項 フローサイトメトリーでの細胞評価

得られた細胞凝集塊は、Acuumax(innovative cell technologies)を用いて 37°Cで 10 分間反応させたのちピペッティングを行うことで分散させ単一浮遊細胞を得た。PBS にて洗浄を行ったのち、4%PFA にて固定しブロッキング液として 5% donkey serum に 0.1% Triton X100 を添加したものをを用いた。一次抗体は、ブロッキング液に添加して 4°C Overnight で反応させた。PBS にて三回洗浄後、ブロッキング液に溶解した二次抗体を室温で 60 分間反応させた。一次抗体としては、anti-human SOX17 and anti-human PDX1 goat polyclonal antibodies (R&D, Minneapolis, MN), anti- HNF3 $\beta$ /FOXA2 (Millipore, Temecula, CA) and anti-NKX6.1 rabbit polyclonal antibodies (Atlas antibodies, Stockholm, Sweden)を用いた。二次抗体では Alexa Fluor® 488 conjugated donkey anti-Goat IgG and Alexa Fluor® 555 conjugated donkey anti-rabbit IgG (life technologies, CA)を用いた。フローサイトメトリーでの解析は、Gallios および Kaluza software (Beckman Coulter, CA)を用いて解析を行った。

#### 第五項 グルコース負荷試験

Day30 の時点の誘導細胞を 2.5mM のグルコースを含有する乳酸リンゲル液にて 37°C・2 時間にて培養した後、この培地をサンプリングした。次いで、高グルコース群では 25mM、低グルコース群では 2.5mM のグルコースを含む乳酸リンゲル液にて 1 時間・37°C で培養し、培養後の培地をサンプリングした。

これらのサンプルを用いて Ultrasensitive human C-Peptide ELISA kit にてプロトコルに通り ELISA を行い、Emax にてサンプル中の C-Peptide 濃度の解析を行った。本研究では培地交換前後の C-Peptide 濃度の変化を比較した。C-Peptide の濃度は、DNA 量で定量化した。DNA の抽出は DNeasy Blood and tissue Kit (Qiagen, Germany)を用いた。抽出した DNA は NANO Drop 2000 spectrometer (Thermo scientific, MA)で測定した。

#### 第六項 統計解析

標準偏差および有意差は Student's *t*-test で評価し、 $<0.05$  を持って、有意差ありと判断した。

## 第三章 結果

### 第一項 三次元浮遊攪拌培養による iPS 細胞の増殖・凝集塊形成

10cm 細胞培養皿 10 枚で培養したコンフルエントな状態の iPS 細胞を三次元浮遊攪拌培養槽（未分化維持培地 100ml）に移行させる段階では、約  $3.7 \times 10^7$  cells/100mL 程度の細胞が播種される。三日間の未分化培養で、細胞数は  $8 \times 10^7$  cells/100 mL まで増加する(Figure3a) 。 得られた細胞凝集塊を未分化マーカーである Oct3/4 や NANOG の発現を調べたところ、ほとんど全ての細胞で同マーカーが発現していることがわかった (Figure 4),

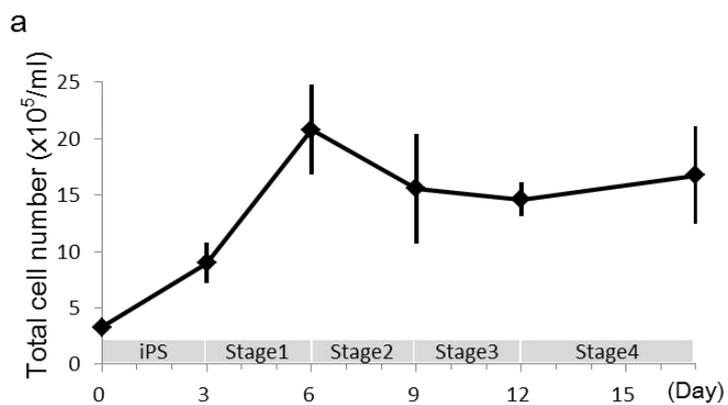
このことから、浮遊攪拌培養に移行させた後も Day0-3 の段階では未分化性が維持されたまま細胞の増殖・凝集塊の巨大化が行えていることが確認できた。

Figure 3)細胞数と凝集塊の変化

a) 細胞数の推移

Y-axis: 総細胞数( $\times 10^5/\text{mL}$ ) X-axis: 浮遊攪拌培養に移行後の日数

b) 各段階における細胞塊の変化 Scale bar: 500  $\mu\text{m}$



b

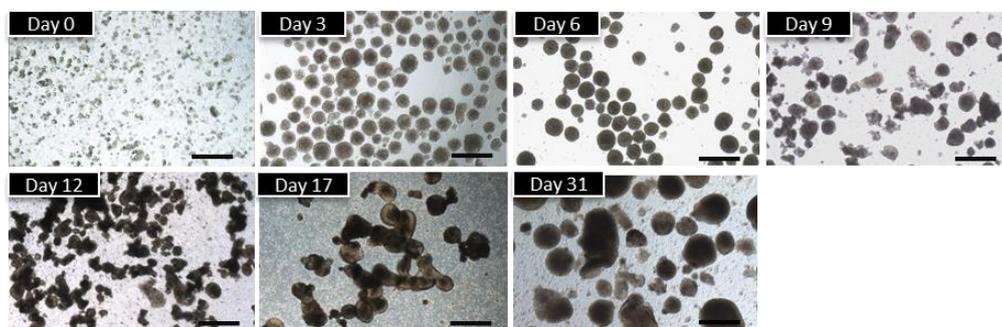
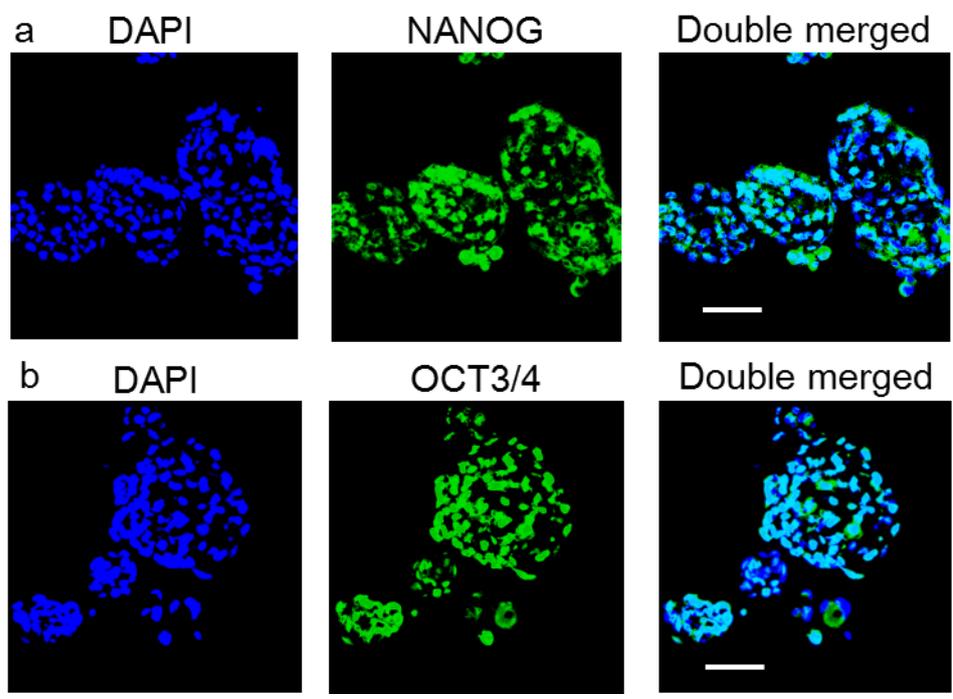


Figure4) 未分化培養での未分化凝集塊形成(Day3)

NANOG:Green OCT3/4:Green DAPI :Blue Scale bar: 20  $\mu$ m



## 第二項 iPS 細胞からの胚性内胚葉への分化誘導

膵臓細胞の発生は、胚性内胚葉・原腸・前腸を経て膵前駆細胞に分化するが我々は先ず得られた未分化な細胞塊を胚性内胚葉の段階に分化させる事を試みた。iPS 細胞塊に対して ActivinA および GSK3B 阻害剤 (CHIR99021) を作用させ、初期播種段階から 6 日目の時点で細胞評価を行った。胚性内胚葉の段階で発現する SOX17 や FOXA2 は免疫染色にて核で高効率に発現していることが確認でき (Figure 5 a)、mRNA の発現も著明に亢進していた (Figure 6)。

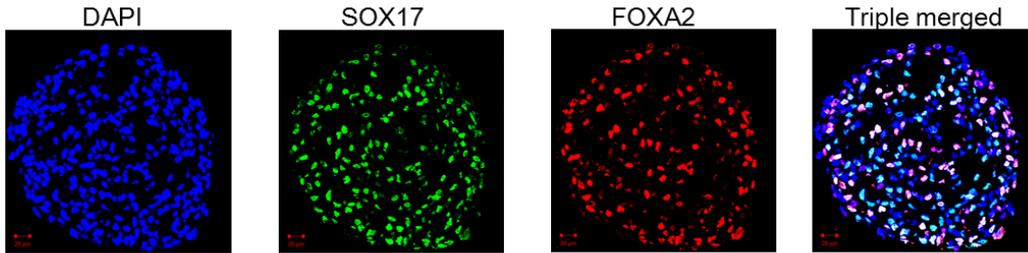
フローサイトメトリーで評価を行ったところ、約 82% ( $\pm 10.8$ ,  $n = 5$ ) の細胞が SOX17 陽性細胞であり 83% ( $\pm 11.1$ ,  $n = 4$ ) の細胞が FOXA2 陽性細胞であった (Figure 5b)。この段階では、100ml 培地の培養槽一基あたり  $2.3 \times 10^8$  個の細胞まで増殖することが確認できた。ここまでの段階で、本法は高密度培養条件で極めて大量の胚性内胚葉を高効率に誘導できることを示すことができた。

Figure 5) Day6 時点での細胞凝集塊

a) 免疫染色結果

SOX17: Green FOXA2 : Red DAPI :Blue Scale bar: 20 $\mu$ m

a



b) フローサイトメトリー解析による Day17 時点での SOX17+/FOXA2-,

SOX17-/FOXA2+ and SOX17+/FOXA2+ 細胞の割合 (n = 4)

b

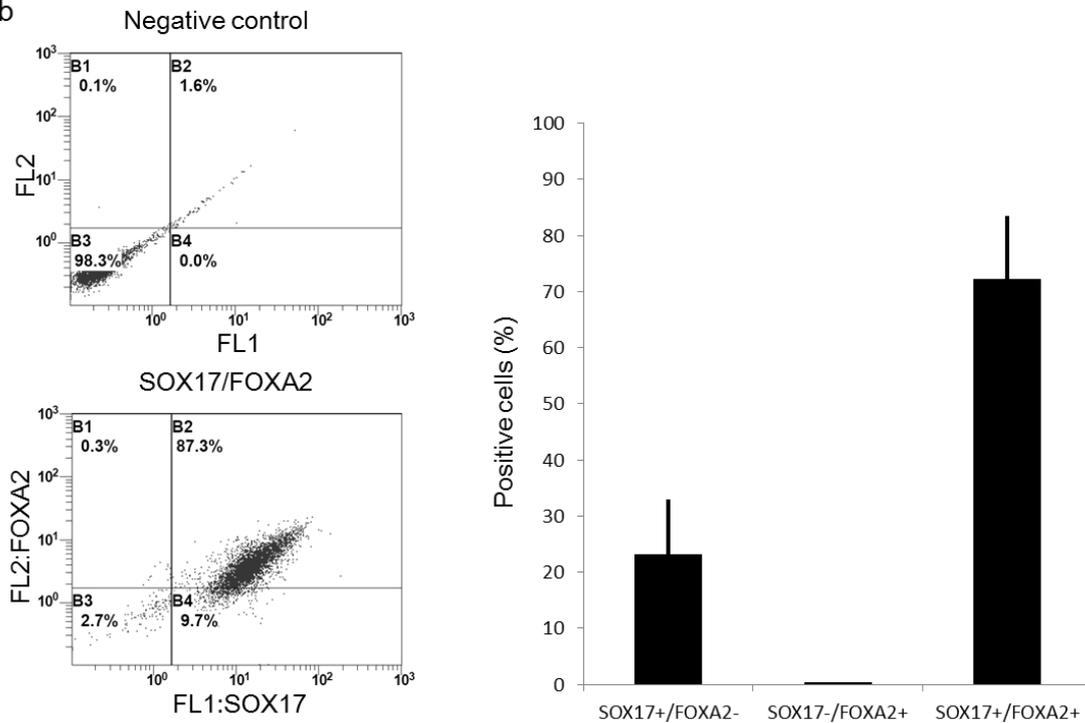
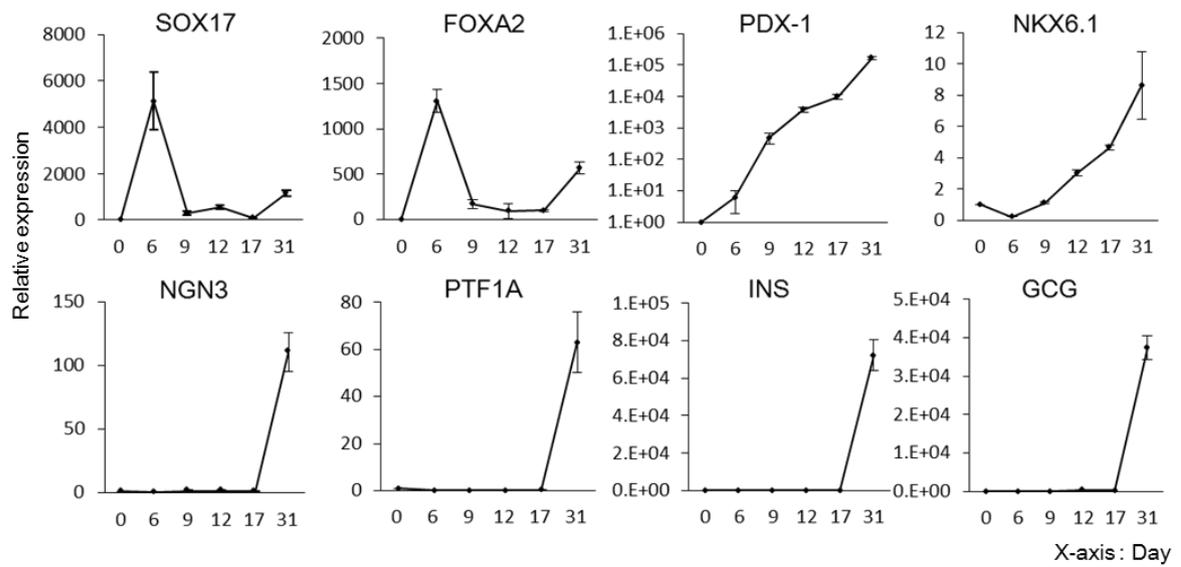


Figure6) qPCR による mRNA 発現の経時的な推移

Y軸: 各段階における relative mRNA expression (Day0 = 1)

X軸: 浮遊攪拌培養に移行させてからの日数



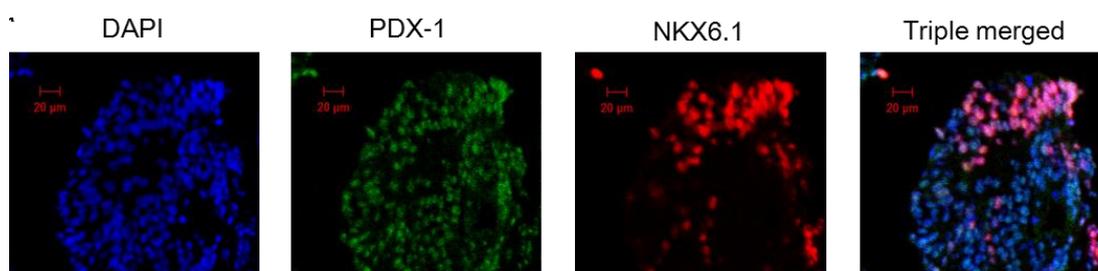
### 第三項 胚性内胚葉から膵前駆細胞への分化誘導

Pancreatic and duodenal homeobox factor 1 (PDX-1) は膵臓発生において非常に重要な転写因子である (23) (13)。PDX-1 を発現する細胞は膵内分泌細胞・外分泌細胞・ductal cell に分化することが報告されている事から(23), 我々は誘導した胚性内胚葉の特徴を示す細胞凝集塊を PDX-1 陽性細胞に分化させることを試みた。胚性内胚葉から PDX-1 陽性細胞への分化では Stage2,Stage3,Stage4 の3つの段階を経た Stage2(days 6-9)では KGF, SB431542, and dorsomorphin を添加し、Stage3(days 9-12)では;TTNPB, Noggin, and cyclopamine を添加。Stage4 (days 12-17) では KGF, Noggin, and EGF を添加した。各段階を経て、経時的に PDX-1 の mRNA 発現が亢進していることが確認できた(Figure6), 免疫染色で PDX-1 の局在を確認すると核内で発現していることが確認できる。(Figure7a) またフローサイトメトリーでの評価では、Stage4 が終了した時点 (Day17) で、95% の細胞が PDX-1 陽性細胞であることが確認できた (Figure 7c)。この段階での細胞数は 100ml の培地あたり、約  $1.6 \times 10^8$  cells/100 mL に達し(Figure 3)、PDX-1 陽性細胞への大量かつ高効率な分化が示された。NKX6.1 も膵発生で重要な転写因子である(24)。NKX6.1 を発現する細胞はグルコースに応答する mono-hormonal な細胞に分化や Acinar cell や Ductal cell に分化する運命をもつ (25)。このことから、PDX-1 と NKX6.1 を共発現する細胞は膵前駆細胞

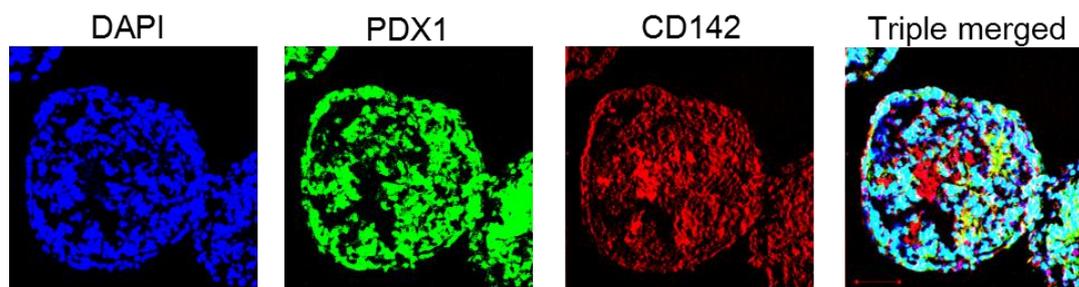
胞であると考えられる。 Figure 6 で示す如く、NKX6.1 の mRNA 発現は各段階を経て経時的に上昇していることが 確認できる。また、免疫染色でも Day17 の時点で PDX-1 と共発現している事が確認できた(Figure 7a)。フローサイトメトリーでの解析では 22%の細胞が NKX6.1 陽性細胞でありこれらの細胞は PDX-1 と共発現していることが確認できた(Figure 7c)。これらの知見から、三次元浮遊攪拌培養で多段階誘導を行うことで大量の膵前駆細胞を分化誘導することが可能であることが示された。

Figure7) Day17 時点での細胞凝集塊

a) PDX-1: Green NKX6.1:Red DAPI :Blue Scale bar: 20  $\mu$ m

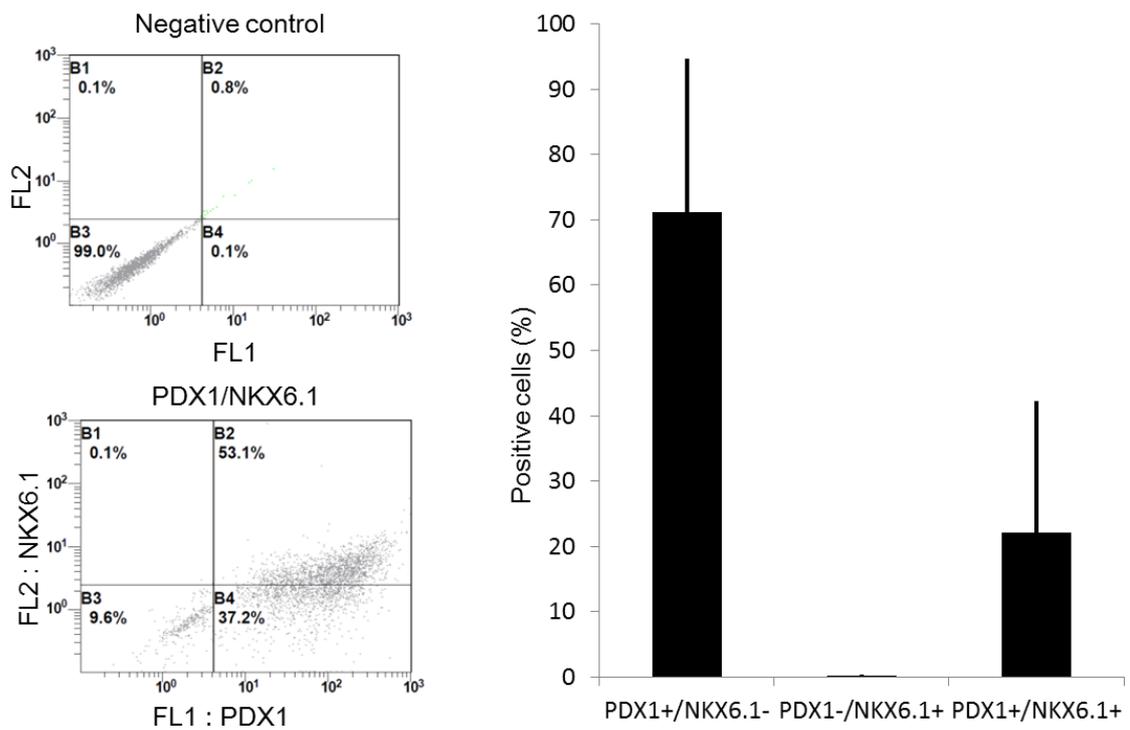


b) PDX-1 :Green CD142:Red DAPI :Blue Scale bar: 20  $\mu$  m



c) フローサイトメトリー解析

Day17 時点での PDX-1+/NKX6.1-, PDX-1-/NKX6.1+ , PDX-1 +/NKX6.1+ 細胞の割合。(n = 4)



#### 第四項 膵前駆細胞から成熟膵臓細胞への分化誘導

253G1 株のヒト iPS 細胞が三次元浮遊攪拌培養による未分化維持培養・凝集塊形成を経て、4 段階の多段階誘導を加えることで多くの細胞で膵前駆細胞に特徴的な転写因子を発現していることが確認できたが、これらの細胞が膵臓に分化する能力を保持する事を証明するため、膵前駆細胞から膵島細胞への分化を *in vitro* の条件で行った過去の報告(21)を参考に、更に誘導を加えた。17 日間培養した細胞塊に対して、更に 2 週間、ALK5 inhibitor II, nicotinamide, dexamethasone や forskolin, を添加して培養を行った。

浮遊攪拌培養開始後、31 日目の時点では NGN3, PTF1A, INS, GCG といった膵臓に特有の遺伝子発現が経時的に亢進していることが確認できた (Figure 6)。さらに、免疫染色では C-ペプチドやグルカゴンといった膵内分泌細胞に特徴的なホルモンが細胞質内に存在していることも確認できた (Figure 8a)。これらの存在から、膵島細胞特に  $\alpha$  細胞や  $\beta$  細胞が分化誘導されたことが示唆される。Day31 の時点での細胞凝集塊に含まれる C-peptide 細胞がグルコース濃度に応答してインスリンの分泌を促すかを調べたところ、ELISA による GSIS では高濃度グルコース条件でヒト特異的 C-Peptide の分泌が亢進した (Figure 8b)。しかしながら、膵内分泌細胞への誘導効率は著しく低く複数視野での観察でごく一部に認めるにとどまった。分泌される C-Peptide の量は微量であった。

この事から、内分泌細胞以外の細胞への分化が示唆され追加の免疫染色を行った。Trypsin および Amylase は膵外分泌細胞（腺房細胞）に発現するマーカーであるが、ほとんどの細胞の細胞質でこれらのマーカーが細胞質に発現していた。また、胆管や膵管に発現する CK19 の存在を確認すると多くの細胞で Trypsin と共発現していることが確認できた(Figure 9a,b)。

この事から、本法では Day17 で得られた細胞塊は膵前駆細胞の性質を保持し、その後の誘導ではほとんどのものが膵臓の腺房細胞・膵管細胞に分化することが分かった。

Figure 8) Day 31 時点での膵内分泌能評価

a) C-peptide : Green , Glucagon : Red (middle panel, red) DAPI :Blue

Scale bar: 20  $\mu$ m

b) グルコース負荷試験

同一濃度で培養した同細胞数の細胞凝集塊を高グルコース群と低グルコース群

で分け、1 時間培養した時点での C-Peptide の濃度比較

Y-軸:反応させた細胞凝集塊中の Total DNA 量で定量化した C-Peptide の分泌量

(n=3). \*p<0.05.

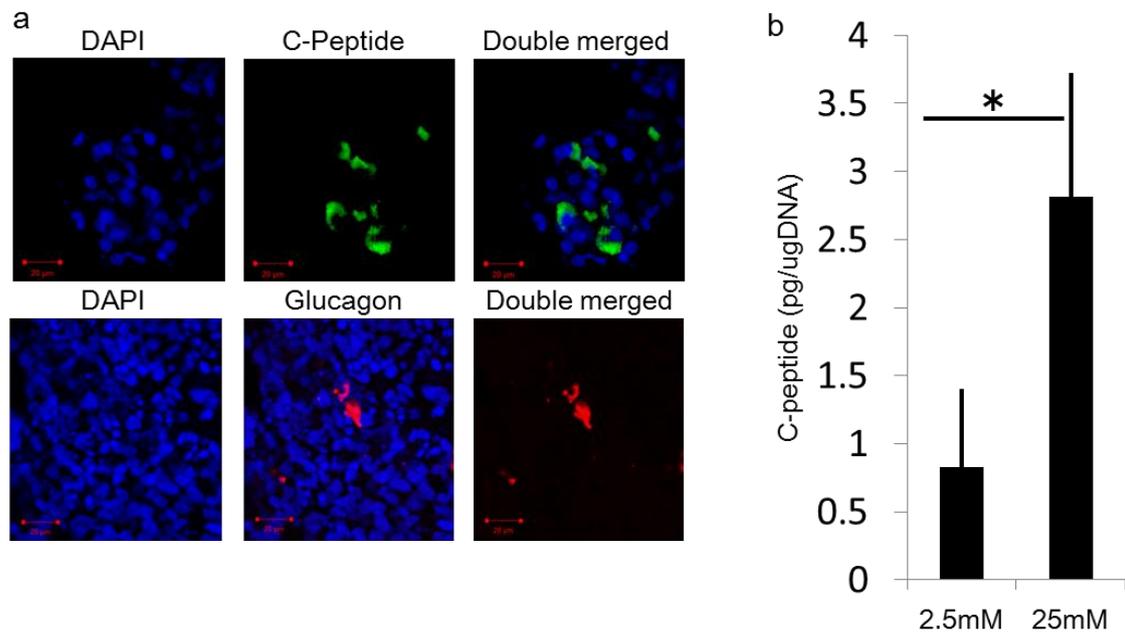
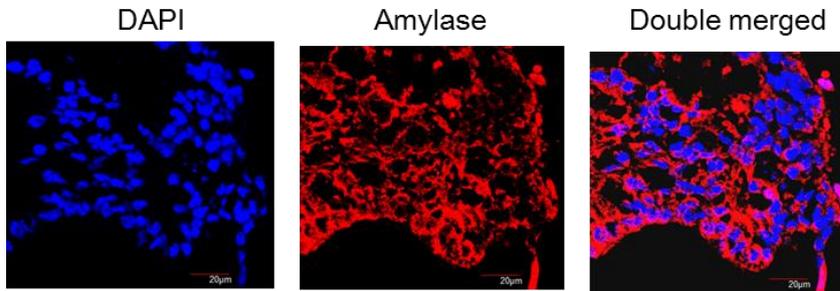
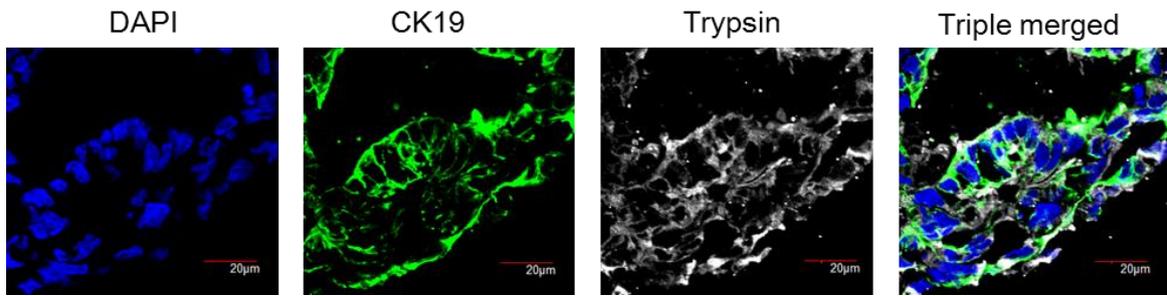


Figure 9) Day 31 時点での細胞凝集塊の膵外分泌系免疫染色結果

a) Amylase : Red DAPI : Blue Scale bar : 20 $\mu$ m



b) CK19 : Green Trypsin : Gray DAPI : Blue Scale bar : 20 $\mu$ m



## 第四章 考察

今回の実験では、三次元浮遊攪拌培養での細胞培養を行うことでヒト iPS 細胞から膵前駆細胞を大量に分化誘導する事が可能であることを示すことができた。さらなる分化誘導で、得られた膵前駆細胞が腺房細胞・膵管細胞およびごく一部ではあるがグルコース応答性のインスリン分泌を示す  $\beta$  細胞への分化も確認することができた。1 型糖尿病に対する、膵島移植において脳死・生体ドナーを必要としないグラフト供給を実現する上では、多能性幹細胞由来の PDX-1/NKX6.1 が共発現している膵前駆細胞を大量に分化誘導することが可能な本法は非常に重要な技術であると考えられる。

PDX-1/NKX6.1 陽性細胞をストレプトゾシン誘発 1 型糖尿病モデルのマウスに移植すると、二ヶ月程度でマウスの血糖を降下させる事が可能な成熟膵島細胞に *in vivo* 条件で分化誘導する事が可能であることが報告されている(9)。同手法では、一匹のマウスに対し、PDX-1/NKX6.1 陽性細胞は約  $1 \times 10^7$  cell 個程度が必要であったが、ヒトに対しては  $5 \times 10^8$  個程度の膵前駆細胞が必要なのではないかと思われていた(26)。

今回の研究では、17 日間の浮遊攪拌培養を経て 100ml の培地（培養槽 1 基）あたり  $1.6 \times 10^8$  個の細胞を得ることが可能であった。この内 95% の細胞は PDX-1 陽性細胞であり、22% の細胞は NKX6.1 を共発現していた。このことか

ら、一度に  $3.5 \times 10^7$  個の腓前駆細胞が回収できている事になる。

本法のように細胞凝集塊の状態です導因子を作用させて培養する場合、凝集塊外側と内部で導因子の濃度勾配や Cell-cell interaction の影響も考慮する必要があります。

導因子・培養期間は若干異なるが Takeuchi らは今回我々が用いた hiPSCs 253G1 株を用いて培養皿上の単層培養で腓前駆細胞への分化誘導を行っている(27)。評価のタイミングが異なるため、単純な比較は難しいが同報告では PDX1 陽性細胞への分化誘導効率は分化誘導開始後 10 日時点で 78% だった。同じ細胞株を用いた今回の三次元浮遊攪拌培養では PDX1 陽性細胞率は 95% と高率であることが確認できた事から、三次元浮遊攪拌培養は PDX1 陽性細胞までの分化では培養効率において劣らないことが示された。一方で、培養皿上での単層培養での NKX6.1 陽性細胞への分化効率は 6-45% との報告(28)もなされている。Schulz らのグループからは hESC を非接着培養皿上で細胞凝集塊を維持したまま水平攪拌培養を行い、16-47% の効率で NKX6.1 陽性細胞を作成したとの報告(22)がなされている。このことから、多能性幹細胞段階から細胞凝集塊の状態です導因子を作用させて腓前駆細胞へ分化誘導する手法は単層培養と比較して誘導効率の面で大きく劣るものではないと考える。

同じプロトコルを用いても、細胞株によって誘導効率が大きく異なることが

知られていることから高効率な誘導には多能性幹細胞の種類・株についても十分な検討が必要である。

今回の実験では、ストレプトゾシン誘発 1 型糖尿病モデルに対する膵前駆細胞移植で長期経過での血糖降下能力獲得を証明していないが膵前駆細胞獲得後、二週間の *in vitro* での培養で一部の細胞はグルコース濃度応答性のインスリン分泌を示すことを証明することができた。このことから、得られた PDX1/NKX6.1 陽性細胞は膵内分泌細胞にも分化するポテンシャルがあることがわかる。PDX-1 は膵臓内分泌・外分泌細胞（腺房細胞）・膵管細胞への分化で最も重要な転写因子であるが(23)、NKX6.1 の共発現も膵臓分化に重要である。PDX-1/NKX6.1 共陽性の細胞は、グルコースに応答する成熟膵島細胞同様の *mono-hormonal* な細胞へ分化する一方、で PDX1 陽性であっても NKX6.1 が発現していない細胞はグルコース負荷に対して応答しない *poly-hormonal* な細胞へ分化する可能性が報告(25)されている。また、同報告からは PDX-1/NKX6.1 が共発現している細胞は、*in vivo* 条件で膵内分泌細胞のみならず膵外分泌細胞にも分化し得ることが示されている。ヒト多能性幹細胞から膵島細胞を分化誘導したとの報告の多くでは、最終的な分化細胞で *mono-hormonal* な細胞と *Poly-hormonal* な細胞の両方が確認されている (12) (29)。本法での分化誘導では Day31 の段階で、グルコース応答性のインスリン分泌が示されていることから

PDX-1/NKX6.1 共陽性の膵前駆細胞から分化誘導された mono-hormonal な細胞成分が含まれていることが示唆される。しかしながら、本法でも Day17 の時点では PDX-1/NKX6.1 共陽性の細胞のみならず、PDX-1+/NKX6.1-の細胞も混在しているため、最終分化段階で poly-hormonal な細胞が混在していると考えられる。

Ngn3 は bHLH transcription factor であり、膵発生では重要な役割を担っている。

(30). NGN3 は発生の embryo の段階で発現亢進し、膵の成熟段階では発現の低下がみられる (31) また、NGN 3 が発現する pancreatic precursors は将来的に膵内分泌細胞に分化することが報告されている (32). このことから、NGN3 の発現は多段階誘導の途中で亢進し、Day31 の時点で低下する必要があるが、本法では Day17 の時点よりも Day31 の時点の方が NGN3 の mRNA 発現が亢進していることが確認できている。(Figure 6)。NGN3 発現時期が遅い原因は明らかではないが、Day31 の時点では特に膵内分泌細胞については成熟化が十分ではない細胞が混在している可能性も示唆される。また、我々は NGN3 発現が他の報告とくらべて遅い段階から亢進する原因として、酸素分圧の影響や誘導因子の問題を考えている。近年、ヒト iPS 細胞から効率的にインスリン分泌細胞への分化での NGN3 の発現亢進については酸素濃度が重要であることが示された (33)。我々のグループの過去の研究では三次元浮遊攪拌培養の条件においては、マウス ES 細胞の増殖では低酸素状態で増殖能・EB 形成に効果的であること

を報告している(18)。今回、我々は同知見から低酸素状態での細胞培養を行っていたが、溶存酸素の最適化で更に早い時期での NGN 発現亢進や最終段階での膵内分泌細胞の誘導効率の向上に期待ができると考えている。

今回の研究では、膵前駆細胞の分化能力の確認のために行った追加の2週間の培養で得られた細胞塊 (Day31) に対するグルコース負荷試験では、濃度に応じた C-Peptide の分泌亢進は確認できたものの絶対量は少なかった。また、免疫染色においてもごく一部の細胞でインスリン陽性細胞が確認できるに留まった。近年、当研究と同様に三次元浮遊攪拌培養で高効率に多能性幹細胞由来の成熟膵島細胞を作成したとの報告(29)もなされている。同手法では誘導因子として、本法では使用しなかった Betacellulin・ヘパリン・SANT-1・T3・ $\gamma$ -secretase XXI などが使用されている。本法では膵島細胞の分化誘導効率が満足なものではなかったが、誘導因子の最適化で更なる誘導効率向上に期待ができる。

本法では、ほとんどの細胞が膵外分泌細胞 (腺房細胞) および腺管細胞に分化していた。腫瘍性疾患や外傷による膵損傷・炎症性疾患に対する膵全摘出症例では、膵外分泌細胞も全て除去されるため、術後には生涯に渡る経口での膵酵素の補充およびインスリンの投与が必要となる。また、膵内分泌機能および膵臓外分泌機能が大幅に低下するため糖尿病を発症し、消化酵素の分泌低下に伴う消化・吸収障害によって低栄養状態や脂肪肝に進展することがある(34)。

治療に有効である可能性があっても、膵外分泌機能・内分泌機能の双方が喪失してしまう膵臓全摘出術を選択することは一般化しがたいのが実情である。この事から、細胞シートをはじめとした組織工学的な手法で膵内分泌細胞のみならず腺房細胞・膵管細胞を含めた組織構築が可能となれば同病態の患者に対して福音となりうる。本法で得られた大量の誘導膵外分泌細胞の分化機構の解明・得られた細胞の機能的評価を行うことは意味があるものと考えている。

近年の報告では、分化段階からの PTF1A の発現は膵外分泌細胞（腺房細胞）の発生に重要であることが報告されている(35)。本法でも、PTF1A の mRNA が Day31 の時点で発現が亢進していることが確認でき、Day31 の時点で多くの細胞がトリプシン・アミラーゼといった腺房細胞で発現するタンパク質が出現していることが確認できている。胎児期の膵臓分化過程においては腺房細胞・膵管細胞は同時に発現し、のちに成熟した膵管構造が形成される(36)。また、リパーゼの染色も試みたがこの段階では染色されなかった。ヒトの発生においてリパーゼの分泌は幼児期から始まることから、Day31 の細胞凝集塊の構成成分の多くは胎児期の腺房細胞・腺管細胞の形成過程を見ているもの考察される。

また、近年の報告では膵外分泌細胞の発生を阻害したマウスモデルでは、糖尿病が引き起こされることが明らかとなった。このことは、膵内分泌細胞の機能維持には何らかの機序で膵外分泌細胞の存在が必要であることが示唆されて

いる(37)。iPS 細胞から分化誘導した膵外分泌細胞が同じく iPS 細胞から分化させた膵内分泌細胞の機能にどのような影響を及ぼしうるのかについては、依然として明らかではないが本法では膵内分泌細胞および腺房細胞・腺管細胞の作成が可能であったことから、今後の検証を必要とする。

日々進化する再生医療技術を臨床適応の段階に進めるには、十分な量の細胞提供が必要不可欠である。今回使用した三次元浮遊攪拌培養システムは、高密度培養を可能とし 1 基の培養槽のみでも同時に移植に大量の細胞を取り扱うことが可能であることからコスト・手間の面でも非常に大きなメリットがあると考えられる。共同研究者の松浦らは、同バイオリアクターシステムで ES 細胞由来の機能的な心筋細胞の培養についての報告を行っている。この中で、最適な攪拌速度・溶存酸素濃度・pH について言及しているが膵臓細胞の分化誘導でもこれらの条件をさらに検証する必要がある。なお、培養槽のスケールアップによりさらなる同時培養も可能であり、松浦らのグループは一度に  $10^8$  個以上の iPS 細胞由来の心筋細胞の分化誘導を行うことに成功している(38)。このことから、三次元浮遊攪拌培養のさらなる誘導条件の検討により移植に足るだけの大量のヒト iPS 細胞由来の膵臓細胞を同時に回収することも十分に可能である。

iPS 細胞由来の膵島細胞を臨床応用するためには、作成した細胞から目的とする細胞をソーティングしなければならない。CD142 や CD200 は Pancreatic

endoderm や Pancreatic endocrine cell の抽出に有用であることが報告されている、(28)。Day17 時点の細胞凝集塊で CD142 の発現を調べたところ、多くの細胞で PDX-1 および CD142 が陽性であることが確認できた (Figure 7b), このことから膵前駆細胞を Day17 時点でソーティングすることも現実的な選択肢である。

また、多能性幹細胞から作成した誘導細胞の細胞集団の中には分化が十分に行われない未分化な細胞が残存する可能性がある。これらの細胞が残存した場合には、奇形腫などの腫瘍が発生する危険性がある。今回の研究では、各段階での OCT4・NANOG の残存率等については評価していないが多能性幹細胞由来の誘導細胞の臨床応用では未分化細胞の残存評価および未分化細胞を除去する方法の十分な検討が必要である。

今回の研究では、三次元浮遊攪拌培養装置を用いてヒト iPS 細胞から膵前駆細胞を大量に分化誘導することが可能であった。また、これらの細胞は膵臓細胞（膵内分泌細胞・腺房細胞・膵管細胞）に分化しうることを示すことができた。

更なる培養条件・誘導因子を検討することで、ヒトの多能性幹細胞由来の膵細胞の大量供給・臨床応用につながることを期待できると考えている。

## 引用文献

1. Najarian JS, Sutherland DE, Matas AJ, Steffes MW, Simmons RL, Goetz FC. Human islet transplantation: a preliminary report. *Transplantation proceedings*. 1977;9(1):233-6. PubMed PMID: 405770.
2. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *The New England journal of medicine*. 2000;343(4):230-8. doi: 10.1056/NEJM200007273430401. PubMed PMID: 10911004.
3. Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Yonekawa Y, Liu X, Kamiya H, Ueda M, Hatanaka N, Kobayashi N, Yamada Y, Miyakawa S, Seino Y, Shapiro AM, Tanaka K. Follow-up study of the first successful living donor islet transplantation. *Transplantation*. 2006;82(12):1629-33. doi: 10.1097/01.tp.0000250547.52725.ff. PubMed PMID: 17198249.
4. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*. 2008;455(7213):627-32. doi: 10.1038/nature07314. PubMed PMID:

18754011.

5. Inada A, Nienaber C, Katsuta H, Fujitani Y, Levine J, Morita R, Sharma A, Bonner-Weir S. Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105(50):19915-9. doi: 10.1073/pnas.0805803105. PubMed PMID: 19052237; PMCID: 2604974.

6. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981;292(5819):154-6. PubMed PMID: 7242681.

7. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006;126(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024. PubMed PMID: 16904174.

8. Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Okita K, Hotta A, Kawasaki T, Hayashi T, Onoe H, Shiina T, Yamanaka S, Takahashi J. Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a non-human primate. Stem cell reports. 2013;1(4):283-92. doi:

10.1016/j.stemcr.2013.08.007. PubMed PMID: 24319664; PMCID: 3849265.

9. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nature biotechnology*. 2008;26(4):443-52. doi: 10.1038/nbt1393.

PubMed PMID: 18288110.

10. Saito H, Takeuchi M, Chida K, Miyajima A. Generation of glucose-responsive functional islets with a three-dimensional structure from mouse fetal pancreatic cells and iPS cells in vitro. *PloS one*.

2011;6(12):e28209. doi: 10.1371/journal.pone.0028209. PubMed PMID:

22145030; PMCID: 3228734.

11. Takeuchi H, Nakatsuji N, Suemori H. Endodermal differentiation of human pluripotent stem cells to insulin-producing cells in 3D culture. *Sci Rep-Uk*. 2014;4. doi: Artn 4488

Doi 10.1038/Srep04488. PubMed PMID: WOS:000333460500009.

Doi 10.1038/Srep04488. PubMed PMID: WOS:000333460500009.

12. Rezania A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A, O'Dwyer S, Quiskamp N, Mojibian M, Albrecht T, Yang YH, Johnson JD,

Kieffer TJ. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*.

2014;32(11):1121-33. doi: 10.1038/nbt.3033. PubMed PMID: 25211370.

13. Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Ibata M, Sato H, Lee YS, Usui J, Knisely AS, Hirabayashi M, Nakauchi H.

Generation of Rat Pancreas in Mouse by Interspecific Blastocyst Injection of Pluripotent Stem Cells. *Cell*. 2010;142(5):787-99. doi: DOI

10.1016/j.cell.2010.07.039. PubMed PMID: WOS:000281523200021.

14. Chia NY, Chan YS, Feng B, Lu X, Orlov YL, Moreau D, Kumar P, Yang L, Jiang J, Lau MS, Huss M, Soh BS, Kraus P, Li P, Lufkin T, Lim B,

Clarke ND, Bard F, Ng HH. A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity. *Nature*.

2010;468(7321):316-20. doi: 10.1038/nature09531. PubMed PMID: 20953172.

15. Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, Kalma Y, Viukov S, Maza I, Zviran A, Rais Y, Shipony Z, Mukamel Z, Krupalnik V, Zerbib M, Geula S, Caspi I, Schneir D, Shwartz T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Benjamin S, Amit I, Tanay A, Massarwa R,

Novershtern N, Hanna JH. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*. 2013;504(7479):282-6. doi:

10.1038/nature12745. PubMed PMID: 24172903.

16. Yanai G, Hayashi T, Zhi Q, Yang KC, Shirouzu Y, Shimabukuro T, Hiura A, Inoue K, Sumi S. Electrofusion of mesenchymal stem cells and islet cells for diabetes therapy: a rat model. *PloS one*. 2013;8(5):e64499. doi:

10.1371/journal.pone.0064499. PubMed PMID: 23724055; PMCID: 3665804.

17. Shimizu H, Ohashi K, Utoh R, Ise K, Gotoh M, Yamato M, Okano T. Bioengineering of a functional sheet of islet cells for the treatment of diabetes mellitus. *Biomaterials*. 2009;30(30):5943-9. doi:

10.1016/j.biomaterials.2009.07.042. PubMed PMID: 19674781.

18. Matsuura K, Wada M, Konishi K, Sato M, Iwamoto U, Sato Y, Tachibana A, Kikuchi T, Iwamiya T, Shimizu T, Yamashita JK, Yamato M, Hagiwara N, Okano T. Fabrication of Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Layered Cardiac Cell Sheets Using a Bioreactor Culture System. *PloS one*. 2012;7(12). doi: ARTN e52176

DOI 10.1371/journal.pone.0052176. PubMed PMID:

DOI 10.1371/journal.pone.0052176. PubMed PMID:

WOS:000312794500106.

19. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts.

Nature biotechnology. 2008;26(1):101-6. doi: 10.1038/nbt1374. PubMed

PMID: 18059259.

20. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart

NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE. Production of

pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. Nature biotechnology. 2006;24(11):1392-401. doi: 10.1038/nbt1259.

PubMed PMID: 17053790.

21. Kunisada Y, Tsubooka-Yamazoe N, Shoji M, Hosoya M. Small

molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from

human induced pluripotent stem cells. Stem Cell Res. 2012;8(2):274-84. doi:

DOI 10.1016/j.scr.2011.10.002. PubMed PMID: WOS:000300761900012.

22. Schulz TC, Young HY, Agulnick AD, Babin MJ, Baetge EE, Bang AG,

Bhoumik A, Cepa I, Cesario RM, Haakmeester C, Kadoya K, Kelly JR, Kerr

J, Martinson LA, McLean AB, Moorman MA, Payne JK, Richardson M, Ross

KG, Sherrer ES, Song X, Wilson AZ, Brandon EP, Green CE, Kroon EJ, Kelly OG, D'Amour KA, Robins AJ. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PloS one*. 2012;7(5):e37004. doi: 10.1371/journal.pone.0037004. PubMed PMID: 22623968; PMCID: PMC3356395.

23. Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BLM, Wright CVE. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*. 1996;122(3):983-95. PubMed PMID: WOS:A1996UB28600026.

24. Henseleit KD, Nelson SB, Kuhlbrodt K, Hennings JC, Ericson J, Sander M. NKX6 transcription factor activity is required for alpha- and beta-cell development in the pancreas. *Development*. 2005;132(13):3139-49. doi: 10.1242/dev.01875. PubMed PMID: 15944193.

25. Nostro MC, Sarangi F, Yang C, Holland A, Elefanty AG, Stanley EG, Greiner DL, Keller G. Efficient generation of NKX6-1+ pancreatic progenitors from multiple human pluripotent stem cell lines. *Stem cell reports*. 2015;4(4):591-604. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.02.017. PubMed PMID: 25843049; PMCID: 4400642.

26. Tuch BE, Hughes TC, Evans MD. Encapsulated pancreatic progenitors derived from human embryonic stem cells as a therapy for insulin-dependent diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2011;27(8):928-32. doi: 10.1002/dmrr.1274. PubMed PMID: 22069287.
27. Takeuchi H, Nakatsuji N, Suemori H. Endodermal differentiation of human pluripotent stem cells to insulin-producing cells in 3D culture. *Sci Rep*. 2014;4:4488. doi: 10.1038/srep04488. PubMed PMID: 24671046; PMCID: PMC3967149.
28. Kelly OG, Chan MY, Martinson LA, Kadoya K, Ostertag TM, Ross KG, Richardson M, Carpenter MK, D'Amour KA, Kroon E, Moorman M, Baetge EE, Bang AG. Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 2011;29(8):750-U114. doi: Doi 10.1038/Nbt.1931. PubMed PMID: WOS:000293696500028.
29. Pagliuca FW, Millman JR, Gurtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu JH, Peterson QP, Greiner D, Melton DA. Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro. *Cell*. 2014;159(2):428-39. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.040. PubMed PMID: 25303535; PMCID: 4617632.

30. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(4):1607-11. doi: DOI 10.1073/pnas.97.4.1607. PubMed PMID: WOS:000085409600059.
31. Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development*. 2002;129(10):2447-57. PubMed PMID: 11973276.
32. Desgraz R, Herrera PL. Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors. *Development*. 2009;136(21):3567-74. doi: 10.1242/dev.039214. PubMed PMID: 19793886; PMCID: 2761107.
33. Hakim F, Kaitsuka T, Raeed JM, Wei FY, Shiraki N, Akagi T, Yokota T, Kume S, Tomizawa K. High oxygen condition facilitates the differentiation of mouse and human pluripotent stem cells into pancreatic progenitors and insulin-producing cells. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(14):9623-38. doi: 10.1074/jbc.M113.524363. PubMed PMID: 24554704; PMCID: 3975012.
34. Takemura N, Saiura A, Koga R, Yamamoto J, Yamaguchi T. Risk

Factors for and Management of Postpancreatectomy Hepatic Steatosis.

Scandinavian journal of surgery : SJS : official organ for the Finnish

Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society. 2016. doi:

10.1177/1457496916669630. PubMed PMID: 27651297.

35. Schaffer AE, Freude KK, Nelson SB, Sander M. Nkx6 transcription

factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in

multipotent pancreatic progenitors. *Developmental cell*. 2010;18(6):1022-9.

doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.015. PubMed PMID: 20627083; PMCID:

3133668.

36. Cleveland MH, Sawyer JM, Afelik S, Jensen J, Leach SD. Exocrine

ontogenies: on the development of pancreatic acinar, ductal and

centroacinar cells. *Seminars in cell & developmental biology*.

2012;23(6):711-9. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.06.008. PubMed PMID:

22743232; PMCID: 3470423.

37. Kodama S, Nakano Y, Hirata K, Furuyama K, Horiguchi M, Kuhara

T, Masui T, Kawaguchi M, Gannon M, Wright CV, Uemoto S, Kawaguchi Y.

Diabetes Caused by Elastase-Cre-Mediated Pdx1 Inactivation in Mice. *Sci*

*Rep*. 2016;6:21211. doi: 10.1038/srep21211. PubMed PMID: 26887806;

PMCID: 4758062.

38. Matsuura K, Wada M, Shimizu T, Haraguchi Y, Sato F, Sugiyama K, Konishi K, Shiba Y, Ichikawa H, Tachibana A, Ikeda U, Yamato M, Hagiwara N, Okano T. Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;425(2):321-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.089.

PubMed PMID: 22842572.

## 本研究の公表について

本研究の結果は以下の形で公表した

論文：

2016年 Y Mihara, K Matsuura, Y Sakamoto, T Okano, N Kokudo, and T Shimizu “Production of pancreatic progenitor cells from human induced pluripotent stem cells using a three-dimensional suspension bioreactor system” Journal of tissue engineering and regenerative medicine (accepted at 2016.4.25)

出版：

2014年8月 三原裕一郎 阪本良弘 松浦勝久 清水達也 國土典宏 “多能性幹細胞からの成熟膵島細胞作成の試みと移植医療の未来” 分子細胞治療フロンティア 2015

2015年3月 三原裕一郎 松浦勝久 ”再生医療製品の大量生産技術開発” 月刊糖尿病 vol7 : page 56-62

学会発表：

2014年 Y Mihara, K Matsuura, Y Sakamoto, T Okano, N Kokudo, and T

Shimizu "Production Of Glucose Stimulated Insulin Secreting Cells From  
Hipses By Scalable Three Dimensional Suspension Bioreactor System"  
TERMIS-America 2014 (Washington DC)

2015 年三原裕一郎 <sup>1)2)</sup>,松浦勝久 <sup>1)</sup>,阪本良弘 <sup>2)</sup>,國土典宏 <sup>2)</sup>,清水達也 <sup>1)</sup>

“バイオリアクターを用いた hiPSCs 由来インスリン産生細胞作成の試み”

日本再生医療学会総会(Yokohama, JAPAN)

2016 年 Y Mihara, K Matsuura, Y Sakamoto, T Okano, N Kokudo, and T  
Shimizu “ Producing the regenerated pancreatic cells for the next  
generation islet transplantation ” TSS Asian Regional Meeting 2016  
(Tokyo,JAPAN)

授賞 :

2016 年 12 月 日本膵臓病研究財団 研究奨励賞

## 謝辞

本研究に関する全面的な御指導・サポートを頂いた東京女子医科大学先端生命医科学研究所清水達也教授・松浦勝久准教授および本研究の遂行と学位論文をまとめるにあたり御指導を頂いた指導教官である、東京大学肝胆膵外科・人工臓器移植外科國土典宏教授・阪本良弘准教授に深く感謝いたします。

また、一部の免疫染色に際しては東京大学医学系大学院 伊藤橋司氏にも御協力を頂きました。この場をお借りして、感謝の意を表します。