

論文の内容の要旨

論文題目：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

氏名：三原裕一郎

「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。膵臓の分野では、2000年にエドモントンプrotocolが発表され、一型糖尿病患者に対する膵島移植が現実のものとなった。しかしながら、グラフトに用いる膵島は複数のドナーからの臓器提供が必要であり、インスリン離脱には反復での移植を必要とする。グラフトの確保が大きな問題としてあることから、現在は限定された施設で行われているにとどまる。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する。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、この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膵島細胞に分化したとの報告がなされた。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、効率的な誘導方法の研究が世界各国で行われている。一方で、多能性幹細胞由来膵島細胞をヒトへの臨床応用の段階に進めるには大量の細胞を確保が必要とすることから、効率的な大量培養技術の構築が求められる。我々は、東京女子医科大学との共同研究により独自の三次元浮遊攪拌培養装置を用いて、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膵前駆細胞の大量作成を試みた。

「培養方法」

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。同培養槽は小型 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った、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。培養温度は 37°C に設定した。

多能性幹細胞の未分化維持培養：ヒト iPS 細胞 253G1 株を用いて実験を行った。253G1 株は培養皿上での On feeder 条件で継代維持を行った。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、細胞を剥離した。コロニー

を 50 μ m 程度の小凝集塊とし培養槽(培地量 : 100ml)に播種した。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。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。Stage1(Day3-6)では、Day3-4.5 の期間は ActivinA 100ng/ml に GSK3 阻害剤である 3 μ M CHIR 99021 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, 10 mM SB431542, 1 μ M dorsomorphin を加えた。Stage3 (days 9-12) では 3 nM TTNPB, 2.5 μ M cyclopamine, and 50 ng/mL Noggin を添加した。Stage4 (Day 12-17) では 50 ng/mL KGF, 50 ng/mL Noggin, and 50 ng/mL EGF を添加。Stage5 (Day 17-31), では 10 μ M forskolin, 10 mM nicotinamide, 10 μ M dexamethasone, and 5 μ M TGF β RI kinase inhibitor II を添加した。溶存酸素は Stage1 のみ DO60%とし、以降は 40%で培養をおこなった。

「評価方法」

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観察・計測を行った。RNA 抽出及び quantitative RT-PCR : RNA 抽出は本論文記載のプロトコル通り行い、Primer pairs および Taqman MGB probes は Taqman gene expression assay を用いた。Quantitative PCR には StepOne™ 及び StepOnePlus™ Real Time PCR Systems (Applied Biosystems)を用いた。インターナルコントロールに GAPDH を用いて、 $\Delta\Delta$ CT 法で RNA の発現評価を行った。免疫蛍光染色法による評価 : 二重染色法による免疫染色を本論文記載の手順・抗体を用いておこなった。細胞の観察には共焦点顕微鏡を用いた。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 にて分散させて単一浮遊細胞を得た。本論文記載のプロトコルにて各マーカーでの染色を行い、Gallios および Kaluza software を用いて解析を行った。グルコース負荷試験 : Day31 の時点の誘導細胞を 2.5mM のグルコースを含有する培地で 37°C・2 時間にて培養した後、この培地をサンプリングし、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 1 時間・37°Cで培養し、培養後の培地をサンプリングした。Ultrasensitive human C-Peptide ELISA kit を用いて ELISA を行い、培地中の C-Peptide 濃度の変化を比較した。統計解析 : 標準偏差および有意差については、Student' s t-test にて評価をおこない、<0.05 を以て、有意差ありと判断した。

「結果」

三次元浮遊攪拌培養による iPS 細胞の増殖・凝集塊形成 : 培養槽 1 基あたり、約 3.7×10^7 cells/100mL の細胞を播種すると三日間の未分化培養で、細胞数は 8×10^7 cells/100 mL まで小さな細胞凝集塊の形で増加することがわかった。得られた細胞凝集塊では、ほぼ全ての細胞で

NANOG、OCT3/4といった未分化マーカーが確認できた。iPS細胞からの胚性内胚葉への分化誘導:初期播種段階から6日目(Day6)の時点で細胞評価を行った。細胞数は 2.3×10^8 個/100mlまで増殖し、胚性内胚葉の段階で発現する免疫染色にてSOX17やFOXA2が核内で高効率に発現していることが確認できた。またrt-PCRでも同因子が発現亢進していることが確認できた。FACS解析では、約82% (± 10.8, n = 5)の細胞がSOX17陽性細胞であり83% (± 11.1, n = 4)の細胞がFOXA2陽性細胞であった。胚性内胚葉から膵前駆細胞への分化誘導:前述のプロトコルにて細胞培養を行ったところ、Day17の時点で約 1.6×10^8 cells/100 mLの細胞を回収することができた。PDX-1およびNKX6.1は膵臓発生において非常に重要な転写因子であり、PDX-1・NKX6.1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。Day17時点までの、mRNAの発現を経時的に観察するとこの時点まで経時的にPDX1およびNKX6.1の発現が亢進していた。また、Day17に得られた細胞塊に免疫染色を行うと、ほとんどすべての細胞で核内にPDX1が発現していることが確認でき、一部のものではNKX6.1が発現していることが確認できた。FACS解析に各転写因子の発現割合を確認すると95%の細胞がPDX-1陽性細胞であり22%の細胞がNKX6.1陽性細胞であった。また、NKX6.1はすべてがPDX1と共発現していることから、これらの細胞は免疫学的特徴から膵前駆細胞であることが推測された。膵前駆細胞から成熟膵臓細胞への分化誘導:三次元浮遊攪拌培養で得られた、膵前駆細胞の特徴を保持する細胞塊が実際に膵臓に分化する「膵前駆細胞」であるかを評価するために、更に前述のプロトコルで更に17日間の培養をin vitroの条件で行った。31日目の時点ではmRNAの解析では膵臓に特有の遺伝子が経時的に亢進していることが確認できた。また、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。これらの存在から、膵島細胞特にα細胞やβ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-Pepitdeの分泌が亢進した。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り、分泌されるC-Peptideの量は微量であった。このことから、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。

「考察」

ヒトへの臨床応用を目指す上では、大量の膵前駆細胞の培養・分化誘導が必要であることは言う

までもない。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 3.5×10^7 個の膵前駆細胞が回収できた。さらに追加で2週間の培養を行うと、細胞凝集塊ではわずかながらもインスリン陽性細胞やグルカゴン陽性細胞が確認でき、同細胞塊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。一方、Day31の時点での免疫染色ではほとんどの細胞でトリプシン・アミラーゼといった膵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。このことから、Day17に得られた細胞塊は膵前駆細胞として膵臓に分化する能力を有していることを示すことができた。胎児期の膵臓分化過程においては膵房細胞・膵管細胞は同時に発現し、のちに成熟した膵臓構造が形成される。今回我々の誘導系では、膵管のマーカーでもあるCK19がトリプシンと同時に出現していることが確認できた。炎症性疾患や腫瘍性疾患によって広範な膵臓切除術を受けた患者では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。このことから、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膵房細胞・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。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できたが、膵前駆細胞から先の膵内分泌細胞・膵房細胞・膵管細胞への分化については更なる培養条件・誘導因子を検討が必要であると考えている。