

課題番号 : 27指1201  
研究課題名 : 膵島移植を目指した機能性  $\beta$  細胞の大量培養法の開発  
分担研究課題名 : ヒト iPS 細胞から膵臓  $\beta$  細胞の大量培養法の検討  
主任研究者名 : 大河内仁志  
分担研究者名 : 大河内仁志、霜田雅之、安田和基、矢部茂治

キーワード : iPS 細胞、膵  $\beta$  細胞

研究成果 :

ヒト iPS 細胞から膵臓  $\beta$  細胞を分化誘導できるようになったので、さらなる分化法の改善と膵島移植を目指すために大量培養法の開発を目的とした。また細胞移植後の拒絶反応を抑制するための免疫隔離膜の検討も行い、膵  $\beta$  細胞の転写因子の検討も行った。

### 1 浮遊培養法

これまでに接着培養ではブドウ糖濃度に応じてインスリンの分泌量を変化させられるヒト機能性  $\beta$  細胞の分化誘導に成功しているが、マウス 1 匹に必要な細胞数を確保するためには 6cm の培養皿で 1 枚必要である。ヒトに対してはマウスに必要とされる細胞数の約 2000 倍が必要となるため、培養皿では枚数が多くなりすぎて、対応が難しい。また接着培養の最終段階で細胞塊を形成させて 3 次元培養をした方が  $\beta$  細胞の機能が上昇することが判明した。そこで大量培養という観点から浮遊培養に注目し、6 段階からなる全分化過程を細胞凝集塊を形成させて浮遊培養を行うことにした。まず基本的な浮遊培養法として回転翼で容器内を攪拌するエイブル社の 30ml 用の自動攪拌培養装置と培養皿全体を回転させる旋回培養装置を購入して、比較検討した。いずれの浮遊培養装置でも細胞凝集塊が形成されるが、後者では細胞凝集塊が中央に集まる傾向にあり、お互いに接着しやすくなってしまうために、前者の浮遊攪拌培養法を選択した。東大医科研で樹立された iPS 細胞 (TKDN4-M) については接着培養の培養条件が概ね適用でき、浮遊培養においても *in vitro* で機能性  $\beta$  細胞の分化誘導が可能であった。回転数を調節することによって、なるべく細胞にストレスをかけないようにするとともに凝集塊の大きさを揃えることも可能になった。STZ (ストレプトゾトシン) を投与した糖尿病モデルマウス (NOD-SCID) の腎被膜下に細胞移植をして、細胞生着を確認した。マウス血中にヒト C-peptide を検出したが、検出濃度としては数十 pM 程度であり、まだ血糖値を正常化するためには不十分な量しかインスリンが分泌されていないと考えられた。*In vitro* でインスリンを多く分泌する細胞がマウスへの移植後に必ずしも同等の機能を発揮するとは限らないという結果が得られた。分化法をさらに改善することとともに移植法も試行錯誤して、細胞移植後にマウス血中のヒト C-peptide 濃度を上昇させることができた。また 100 日以上 of 随時血糖の正常化を確認した。組織学的な検討においてインスリン陽性細胞とグルカゴン陽性細胞、ソマトスタチン陽性細胞が検出され、ヒト膵島様組織が確認できた。ブドウ糖負荷試験 (OGTT) においても、細胞移植群は 2 時間後に血糖値は正常化した。

浮遊培養においても最初の分化段階での細胞の状態がその後の分化誘導に大きく影響を与えること、すなわち最初の内胚葉への分化条件が重要であることを立証し、definitive endoderm への新規分化誘導法として特許を出願した。エイブル社の 30ml

用の自動攪拌培養装置は100ml、500mlにもスケールアップが可能なので、今後は100mlの容器で検討していく予定である。またスケールアップの際には酸素濃度などのモニターも必要とされるので、品質管理に向けてさらなる検討が必要であると考えている。

## 2 誘導した細胞機能評価

移植直前の細胞塊を用いてブドウ糖によるインスリン分泌刺激試験(GSIS)を行った。NKX6.1の発現が十分でない時にもGSISにて高血糖に対してインスリン分泌が大きく上昇することがあり、機能性が保たれていると判断していたが、移植後のマウス血中のヒトC-peptide濃度を測定してみるとそれほどでもなく、必ずしも*in vitro*のGSISが移植後の効果判定の指標にならないことが示唆された。一方、NKX6.1の発現を上昇させることができた細胞塊ではGSISに対する反応性はあまり見られない場合でも、移植後に徐々にマウス血中のヒトC-peptide濃度が上昇して、随時血糖が正常化するものが現れた。マウス生体内でヒト膵島細胞が成熟化している可能性が示唆された。そこでSTZがマウスの膵β細胞に感受性が強く、ヒトβ細胞には感受性が低いことを利用して、ヒトβ細胞移植後にSTZを投与すれば、マウスのβ細胞は破壊され、ヒトのβ細胞だけが残る実験系を構築した。通常のNOD-SCIDマウスにヒトiPS細胞由来の細胞塊を移植して2、4、6週間後にそれぞれSTZを投与したところ、細胞移植後2週間では血糖の上昇が見られたのに対して、4週間後と6週間後にSTZを投与した場合は、血糖値が上昇しなかった。このことから移植前の細胞の状態はまだ未分化な状態のβ細胞である可能性が高く、生体内で4週間程度かけてβ細胞は成熟化することが示唆された。この実験の過程でβ細胞の成熟化のマーカーとなりうる候補分子を幾つか見出したので、今後さらに検討していきたいと考えている。

## 3 CiRA株の検討

京都大学CiRAで樹立されたHLAホモの臨床グレードiPS細胞を用いて同様に30mlの浮遊培養を行った。10種類のiPS細胞を検討したが、同一個体由来でも、株間の差が認められ、それぞれの株に対して培養条件を最適化させる必要があることが判明した。臨床応用に向けて、最も効率良く高機能な膵島を誘導できる最適なiPS細胞株を選択するため、浮遊培養への適応力と内胚葉系の細胞への分化しやすさを指標にして、15M63を選択した。TKDN4-M株で得られた培養条件をもとにして培養を行い、6段階に渡る分化過程でそれぞれ細胞塊をサンプリングしてRNA発現を検討した。最終分化段階のβ細胞に対してブドウ糖によるインスリン分泌刺激試験を行った。15M63から分化した細胞においても*in vitro*でインスリン産生が認められた。iPS細胞から分化誘導したこれらの細胞塊を東大生産研にてアルギン酸でできたファイバーに封入した。NOD-SCIDマウスにSTZを投与して1型糖尿病モデルを作成し、腹腔内に6~12x10<sup>6</sup>個の細胞を含んだファイバーを移植したところ、随時血糖が正常化した。マウス血中にヒトC-peptideが検出でき、移植後120日以上正常血糖を維持できた。腹腔内からファイバーを取り出し、別のNOD-SCIDマウスの腹腔内に再移植して、生体内で機能を発揮し続けるかを継続観察中である。

## 4 免疫隔離膜の開発

免疫抑制剤を使用しない新規膵島移植法の確立を目指して、細胞を包む免疫隔離膜の開発も行った。ブタ膵島およびMIN6細胞を用いて、①ハイドロゲルカプセルに細胞を封入し、*in vitro*で培養するとカプセル内で細胞は生存して機能を維持し、インスリンを放出することを確認した。

さらにカプセル化細胞を糖尿病化ヌードマウスおよび免疫正常マウスに移植し、最高3か月以上の血糖値の改善効果を認めた。ハイドロゲルのみでも免疫隔離機能も示した。ゲル周囲の癒着や線維化はほとんど認めなかった。しかし、移植後長期的にはゲルが次第に溶解縮小し、グラフト機能が低下していくことが課題であった。

②マクロカプセル（デバイス）に細胞を封入し、*in vitro*で培養するとカプセル内で細胞は生存して機能を維持し、インスリンを放出することを確認した。

さらにマクロカプセル化細胞を糖尿病化ヌードマウスおよび免疫正常マウスに移植し、最高6か月以上の血糖値の改善効果を認めた。しかし、ハイドロゲルと異なり半透膜性カプセルは長期的に破損することなく強度的には安定であったが、移植後長期的には次第にグラフト周囲の線維化や癒着が発生し、グラフト機能が低下していくことが課題であった。

さらに半透膜性マクロカプセル化β膵島を健常マウスの腹腔内に移植し、癒着や線維化を起こさず2か月間グラフト内部のβ膵島を生存させた。今後さらに長期の評価が必要である。

## 5 β膵細胞の転写因子研究

β膵細胞やラズ氏島における重要性が従来から示されている MafA 及び MafB について、β膵細胞株および発生工学的手法も駆使して詳細に解析した。その結果 MafA は、インスリン遺伝子の転写に重要な因子として同定された分子であるが、β膵細胞の成熟及び維持に重要であること、その発現維持には DNA メチル化も寄与していること、などを明らかにした。MafA 自体は少なくともヒト MODY の主要な原因遺伝子ではないが、β膵細胞機能のコアとなる転写因子ネットワークを形成しており、MODY 患者由来 iPS 細胞から分化させたβ膵細胞の機能解析においても有用な知見である。なおこの研究の過程で、本研究の準備として、バイサルファイト法及び PyroMarkQ24 を用いた、ヒト DNA メチル化の解析系を立ち上げた。

平成 29 年度には、こうした研究をさらに進展させたほか、ヒト MODY のより広いスペクトルの臨床像を得るために、MODY の遺伝子異常のスクリーニング系をより整備した。具体的には、特に MODY5 に多い遺伝子の部分欠失、または全欠失は、従来のサンガー法では検出できない可能性があるため、MLPA (multiple ligation-dependent) 法を導入した。既に *HNF1B* 遺伝子のヘテロ欠失が同定されている患者 DNA をポジティブコントロールとして用いて、その妥当性を確認した。その上で、若年発症糖尿病患者(腎障害もあり MODY5 疑い)でサンガー法により異常が抽出できなかった患者から、この方法により *HNF1B* の欠失を新たに同定し、MODY5 の確定診断を得て、学会報告を行った。*HNF1B* 遺伝子の存在する染色体 17 番長鎖 17q12 領域は、表現型変化を伴う微笑欠失が多く、「17q12 microdeletion syndrome」と呼ばれている。したがってこの方法は、特に MODY5 の診断に有用と考えられた。

Subject No. : 27A1201

Title : Large scale culture of functional pancreatic beta cells from iPS cells for islet transplantation

Researchers : Hitoshi Okochi, Shigeharu Yabe, Masayuki Shimoda, Kazuki Yasuda

Key word : iPS cells, pancreatic beta cells, diabetes mellitus

Abstract :

We aimed at the large-scale culture of functional pancreatic beta cells from human iPS cells for islet transplantation.

### 1 Floating culture system

We succeeded in differentiating functional pancreatic beta cells from human iPS cells in adherent culture. We can provide enough cells for mouse transplantation experiment with one 6cm culture dish. Since the number of islet required for transplantation is 2000 times more in human than in mice, it is not reasonable to use culture dishes manually. We determined to use floating culture system because scaling up was relatively easier in floating system than in adherent culture. We compared the floating culture methods between 30ml spinner type culture vessels and gyrating culture dishes. We chose 30ml spinner type culture vessels for floating culture methods, because cell aggregates (spheroid) were easier to form and less adhesive each other. We had to optimize the rotation speed of the fan in the vessel to minimize the shear stress to the cells. Although the basic protocols of adherent culture could be applied to the floating culture, the expression level of NKX6.1, one of the important markers of the pancreatic beta cells, was needed to improve. After many trials and errors, we managed to line up the islet-like spheroids which were almost the same size and we could enhance the expression level of NKX6.1. Consequently, we detected certain amount of human C-peptide in vitro secretion experiments (GSIS:Glucose

stimulated insulin secretion). We applied the patent regarding new method for inducing definitive endodermal cells from iPS cells because we found the first differentiation step was very important. When we transplanted human islet-like spheroids ( $4-6 \times 10^6$  cells) under the kidney capsule of STZ-induced diabetic NOD-SCID mice, non-fasting blood glucose gradually lowered and kept normal level more than 100 days.

## 2 Functional analysis of induced islet-like cells

We also noticed that good response of GSIS before transplantation did not always correlate with the rapid lowering the blood glucose level after transplantation. The possible reasons are difficulty of survival of injected cells and immaturity of the cells. We improved the methods of injecting cells to avoid the mechanical damage and survival rate of cells increased. Next, we injected human iPS-derived islet-like cells into normal NOD-SCID mice and STZ was administered 2, or 4, or 6 weeks later. Since STZ is sensitive to mouse pancreatic  $\beta$  cells while it is resistant to human pancreatic  $\beta$  cells, administration of STZ led to remove mouse pancreatic  $\beta$  cells. When STZ was administered 2 weeks after cell transplantation, non-fasting blood glucose level was elevated more than 200mg/dl. However, when STZ was administered 4 or 6 weeks after cell transplantation, blood glucose level was not elevated and remained within normal range. These results suggest that it takes about 4 weeks for human iPS-derived islet-like cells to mature in vivo.

## 3 Use of iPS cell lines established by CiRA

We started to use clinical grade iPS cell lines established by CiRA. However, we had to optimize culture conditions for each iPS cell line because it has own characteristics for proliferation and differentiation. Among 10 cell lines tested, we chose one cell line, 15M63, because it was easily adapted for

floating culture and it was shown for endodermal differential potential. We differentiated these cells into islet-like cells as spheroid and made fibers in which these spheroids were encapsulated with alginate. Then we transplanted these fibers into intraperitoneal space for STZ- induced diabetic NOD-SCID mice. Non-fasting blood glucose gradually lowered and kept normal level more than 120 days.

#### 4 Separation devices against immune cells

We developed micro and macro devices for avoiding attack of immune cells after cell transplantation. As a micro device, porcine islets or MIN6 cells were encapsulated with hydrogel and transplanted into diabetic nude mice. Although we found improvement of blood glucose level more than 3 months, hydrogel tended to melt gradually and lose cell function. When these cells were encapsulated into macrodevices and transplanted into diabetic nude mice, blood glucose level improved more than 6 months without damage of device. However, fibrosis and adhesion were noted around the device long time after transplantation.

#### 5 Study for transcription factors regarding pancreatic $\beta$ cells

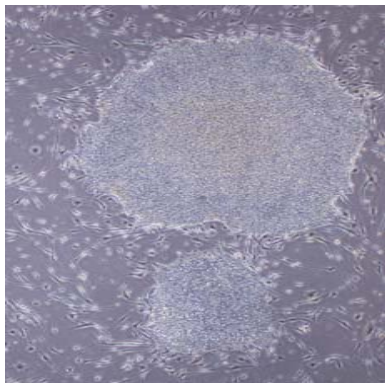
We investigated the important transcription factors for pancreatic  $\beta$  cells such as MafA and MafB. They are identified as the important factors for insulin gene expression, however, we found they played important roles on the maturation and maintenance of pancreatic  $\beta$  cells. We also found MafA formed the core transcription network for the pancreatic  $\beta$  cell function.

# 27指1201: 膵島移植を目指した機能性β細胞の 大量培養法の開発

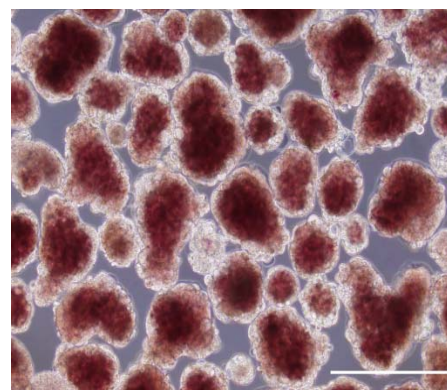
## ヒトiPS細胞から膵臓β細胞の6段階分化法



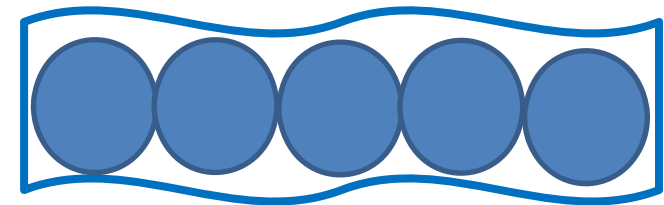
iPS細胞



iPS細胞由来膵島



隔離膜による細胞性免疫回避



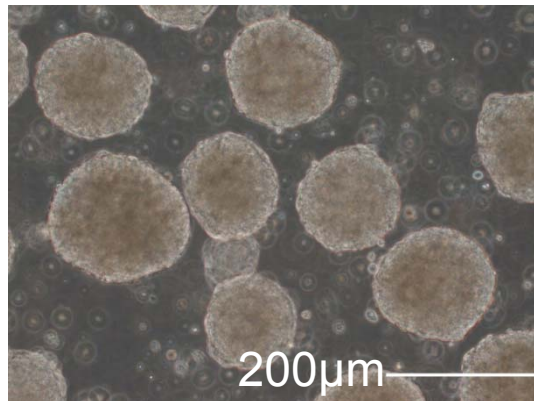
Spinner型容器を使用した浮遊回転培養

Spinner culture



30ml

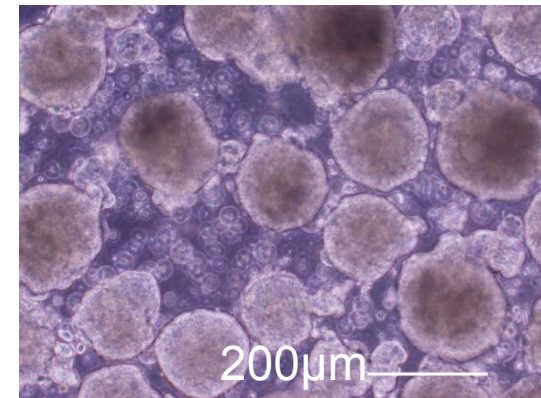
Undiff.



differentiation

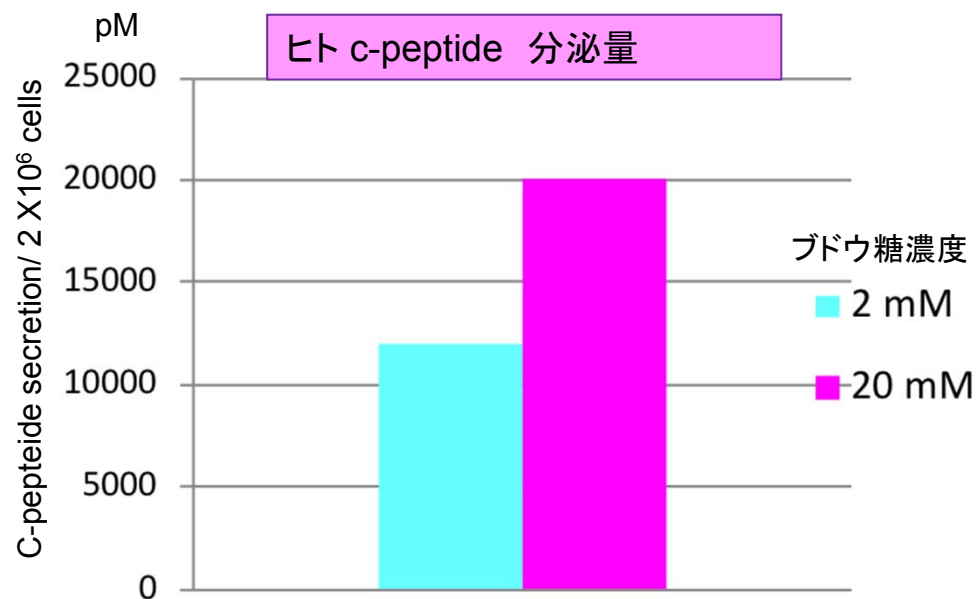
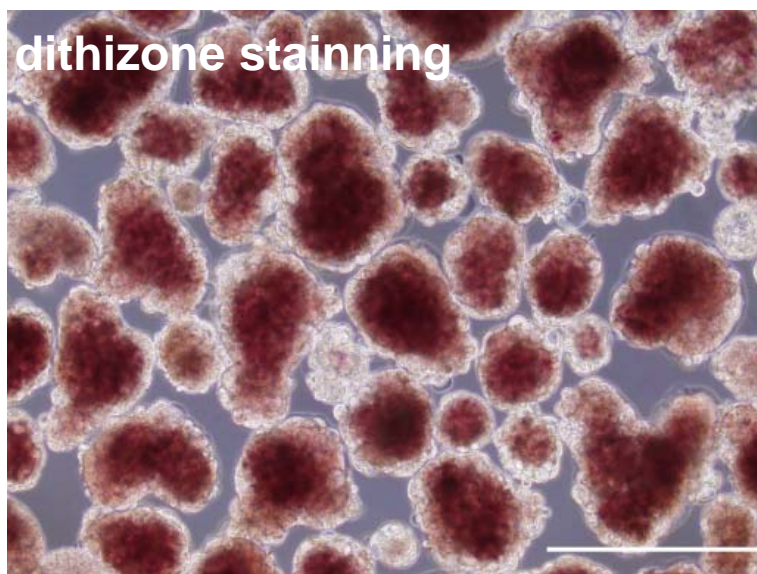
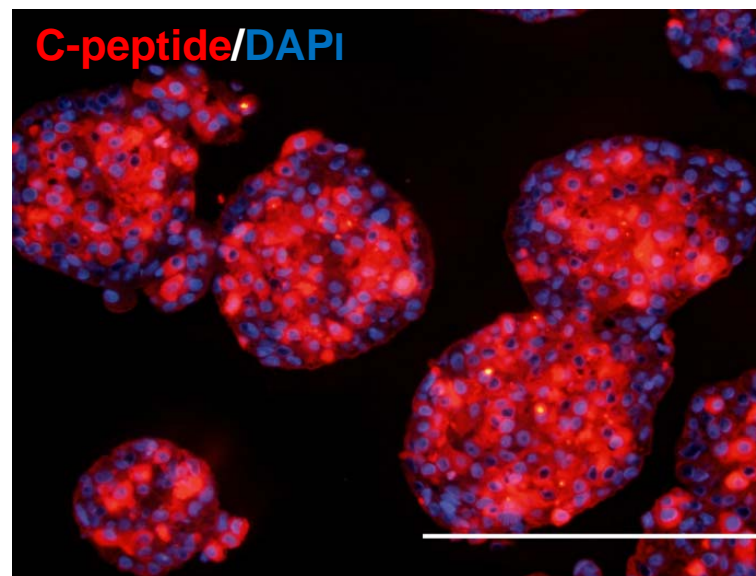
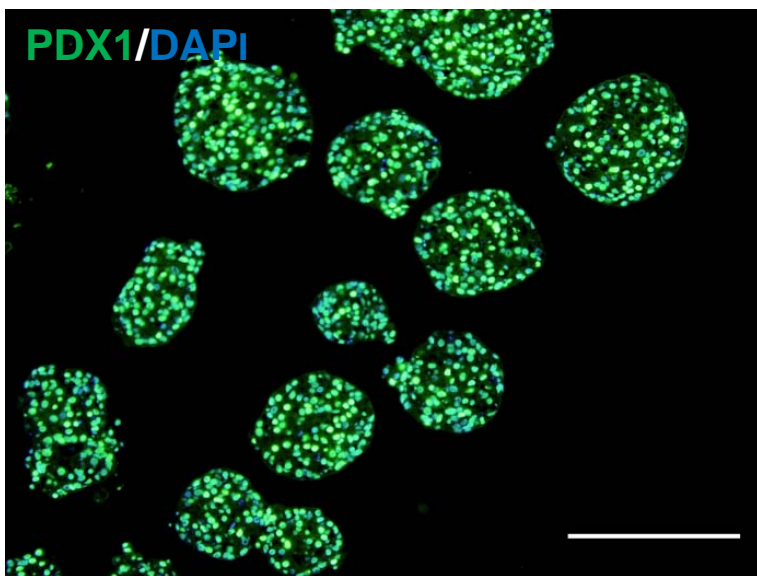


beta

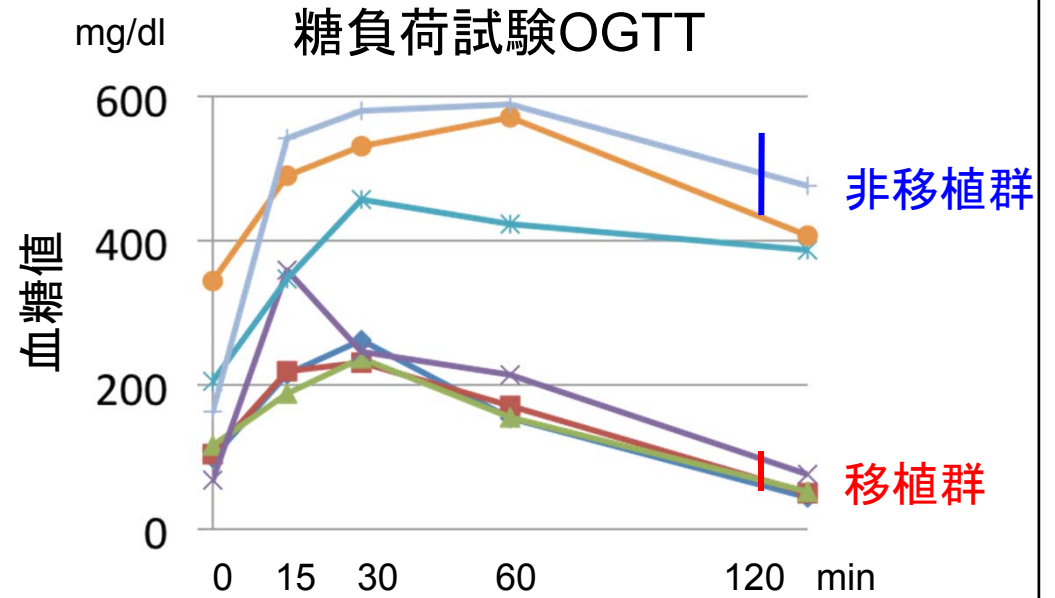
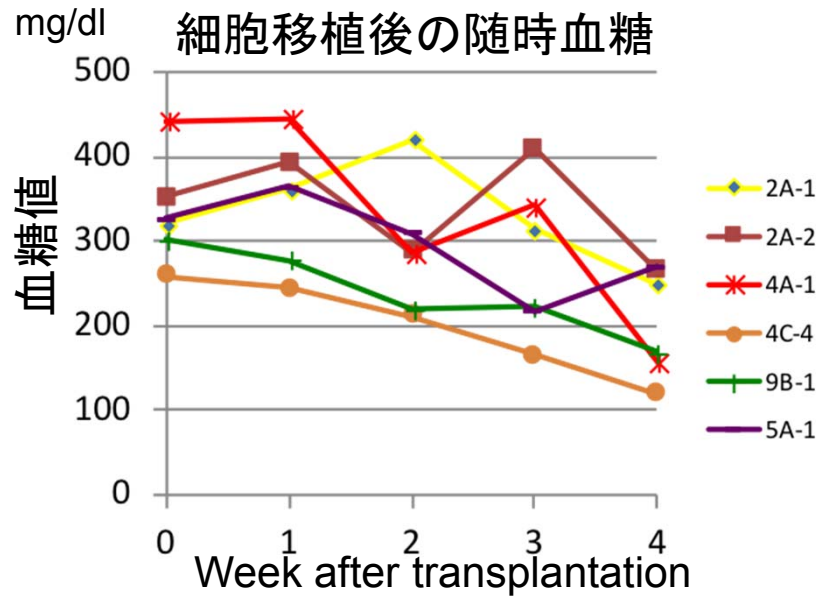




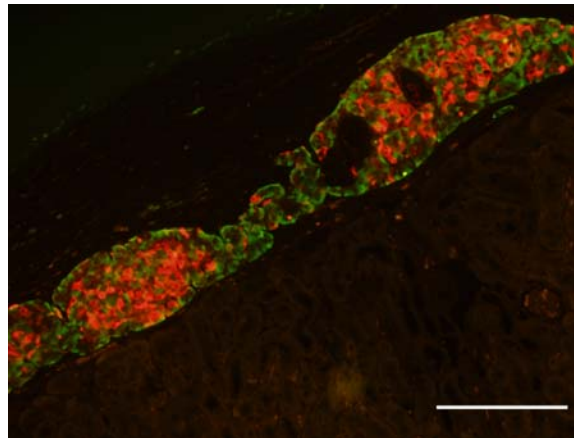
# ヒトiPS細胞から誘導した膵島様細胞の免疫染色とインスリン分泌実験



# 糖尿病モデルマウス(NOD-SCID)への細胞移植実験



細胞移植後4週の腎組織の免疫染色像



C-peptide / Glucagon

課題番号 : 27指1201  
研究課題名 : 膵島移植を目指した機能性β細胞の大量培養法の開発  
分担研究課題名 : ヒトiPS細胞から膵臓β細胞の大量培養法の検討  
主任研究者名 : 大河内仁志  
分担研究者名 : 大河内仁志

キーワード : iPS細胞、膵β細胞

研究成果 :

ヒトiPS細胞から膵臓β細胞を分化誘導できるようになったので、膵島移植を目指すために大量培養法の開発を目的とした。

これまでに接着培養ではヒトiPS細胞からブドウ糖濃度に応じてインスリンの分泌量を変化させられる機能性β細胞の分化誘導に成功しているが、ヒトに対してはマウスに必要とされる細胞数の約2000倍が必要となるため、培養皿では対応が難しいと考えられた。そこで大量培養という観点から浮遊培養に注目し、回転翼で容器内を攪拌するエイブル社の30ml用の自動攪拌培養装置と培養皿を回転させる旋回培養装置を購入して、比較検討した。いずれの浮遊培養装置でも細胞凝集塊が形成されるが、後者では細胞凝集塊がお互にくっつきやすくなってしまいうために、前者の浮遊攪拌培養法を選択した。東大医科研で樹立されたiPS細胞(TKDN4-M)については接着培養の培養条件が概ね適用でき、浮遊培養においても*in vitro*で機能性β細胞の分化誘導が可能であった。回転数を調節することによって、凝集塊の大きさを揃えることも可能になった。糖尿病モデルマウスの腎被膜下に細胞移植をして、細胞生着を確認し、マウス血中にヒトC-peptideを検出したが、検出濃度としては数十pM程度であり、まだ生体における機能としては不十分と考えられた。*In vitro*でインスリンを多く分泌する細胞が移植後に必ずしも同等の機能を発揮するとは限らないという結果が得られた。分化法を改善することにより、移植後にマウス血中のヒトC-peptide濃度を上昇させることができ、100日以上 of 随時血糖の正常化と細胞生着も確認した。浮遊培養においても最初の分化段階がその後の分化誘導に重要であることを立証し、definitive endodermへの新規分化誘導法として特許を出願した。

また京都大学CiRAで樹立された10種類の臨床グレードiPS細胞を用いて同様に30mlの浮遊培養を行ったが、株間の差が認められ、それぞれの株に対して培養条件を最適化させる必要があることが判明した。臨床応用に向けて、最も効率良く高機能な膵島を誘導できる最適なiPS細胞株を選択する必要があるため、浮遊培養への適応力と内胚葉系への分化しやすさを指標にして、15M63を選択した。TKDN4-M株で得られた培養条件をもとにして培養を行い、6段階に渡る分化過程でそれぞれ細胞塊をサンプリングしてRNA発現を検討した。最終分化段階のβ細胞に対してブドウ糖によるインスリン分泌刺激試験を行った。15M63から分化した細胞においても*in vitro*でインスリン産生が認められた。iPS細胞から分化誘導したこれらの細胞塊を東大生産研にてアルギン酸でできたファイバーに封入した。NOD-SCIDマウスにSTZを投与して1型糖尿病モデルを作成し、腹腔内に6~12x10<sup>6</sup>個の細胞を含んだファイバーを移植したところ、随時血糖が正常化した。マウス血中にヒトC-peptideが検出でき、移植後120日以上正常血糖を維持できた。ホストのマウスに胸腺腫が認められたため、腹腔内からファイバーを取り出し、別のNOD-SCIDマウスの腹腔内に再移植して、生体内で機能を発揮し続けるかを継続観察中である。

また分化した膵島の移植部位の検討については、TkDN4-M株由来の膵島細胞を用いて、腎被膜下移植と同様に皮下移植においても血管新生を誘導することなしに細胞が生着することを確認した。ファイバー化した細胞塊では腹腔内の方が皮下よりも血糖降下作用が強いことが判明した。

エイブル社の 30ml 用の自動攪拌培養装置は 100ml、500ml にもスケールアップが可能なので、今後は 100ml の容器で検討していく予定である。またスケールアップの際には酸素濃度などのモニターも必要とされるので、品質管理に向けてさらなる検討が必要であると考えている。

課題番号 : 27指1201  
研究課題名 : 創薬を指向したヒト膵β細胞機能評価系の構築  
主任研究者名 : 大河内 仁志  
分担研究者名 : 安田 和基

キーワード : 転写因子、MafA、MafB、脱分化、DNA メチル化  
研究成果 :

本分担課題では、全体課題の中で作成される予定の、iPS 細胞由来ヒト膵β細胞について、オミックス解析の手法等を用いて機能と発現分子との関係について解析し、普遍的な指標を抽出して、病態評価や創薬への応用を目指す。

当初の予定では、研究期間前半では、ヒト iPS 細胞から作成した「正常膵β細胞」について、in vitro でトランスクリプトームやエピゲノムなどの分子的解析、インスリン分泌能などの細胞学的解析を行い、各分化・成熟段階における特徴を得ること、期間後半ではこの情報を元にして、健常人と MODY 患者 iPS 細胞由来の膵β細胞を比較検討すること、としていた。しかし作成したβ細胞の「量」及び「質」が必ずしも常に安定しないという事情もあり、本解析に十分な量の細胞を有することでできなかった。そのため、前年度までは、本研究で対象とする MODY 原因遺伝子は転写因子であることから、基盤的研究として、膵β細胞や膵ラ氏島における重要性が従来から示されている MafA 及び MafB について、膵β細胞株および発生工学的手法も駆使して詳細に解析した。その結果 MafA は、インスリン遺伝子の転写に重要な因子として同定された分子であるが、膵β細胞の成熟及び維持に重要であること、その発現維持には DNA メチル化も寄与していること、などを明らかにした。MafA 自体は少なくともヒト MODY の主要な原因遺伝子ではないが、膵β細胞機能のコアとなる転写因子ネットワークを形成しており、MODY 患者由来 iPS 細胞から分化させた膵β細胞の機能解析においても有用な知見である。なおこの研究の過程で、本研究の準備として、バイサルファイト法及び PyroMarkQ24 を用いた、ヒト DNA メチル化の解析系を立ち上げた。

平成 29 年度には、こうした研究をさらに進展させたほか、ヒト MODY のより広いスペクトルの臨床像を得るために、MODY の遺伝子異常のスクリーニング系をより整備した。具体的には、特に MODY5 に多い遺伝子の部分欠失、または全欠失は、従来のサンガー法では検出できない可能性があるため、MLPA (multiple ligation-dependent) 法を導入した。既に *HNF1B* 遺伝子のヘテロ欠失が同定されている患者 DNA をポジティブコントロールとして用いて、その妥当性を確認した。その上で、若年発症糖尿病患者（腎障害もあり MODY5 疑い）でサンガー法で異常が抽出できなかった患者から、この方法により *HNF1B* の欠失を新たに同定し、MODY5 の確定診断を得て、学会報告を行った。*HNF1B* 遺伝子の存在する染色体 17 番長鎖 17q12 領域は、表現型変化を伴う微小欠失が多く、「17q12 microdeletion syndrome」と呼ばれている。したがってこの方法は、特に MODY5 の診断に有用と考えられた。

課題番号 : 27指1201  
研究課題名 : 膵島移植を目指した免疫隔離膜の開発  
主任研究者名 : 大河内仁志  
分担研究者名 : 霜田雅之

キーワード : 膵島移植、免疫隔離膜、再生医療、ヒト iPS 細胞

研究成果 : 平成 29 年度の研究成果

研究開始時の研究目的 :

ヒト iPS 細胞から機能的な膵臓  $\beta$  細胞を大量に培養する方法を開発し、平行して細胞を包む免疫隔離膜の開発も行い、免疫抑制剤を使用しない新規膵島移植法の確立を目指す。分担研究者は、3 年以内に誘導した膵臓  $\beta$  細胞を半透膜に包んで、霊長類のマーマセット糖尿病モデルに移植して、前臨床データを取得することを目的とする。

・担当する分担研究 :

免疫隔離膜の開発

・分担研究内容 :

半透膜はグルコースやインスリンなど低分子は透過するが、細胞や免疫グロブリンは透過しないものとする。物質の透過性やデバイス封入時の細胞生存をまずはマウスインスリノーマ細胞株である MIN6 細胞 (インスリンを分泌する細胞株) や動物の膵島を用いて、in vitro の培養系で評価する。

・研究成果

ブタ膵島および MIN6 細胞を用いて、

① ハイドロゲルを用いたカプセル

② 半透膜性のポリマー樹脂を用いたマクロカプセル (デバイス)

の 2 種類の開発を行った。

① ハイドロゲルカプセルに細胞を封入し、in vitro で培養するとカプセル内で細胞は生存して機能を維持し、インスリンを放出することを確認した。

さらにカプセル化細胞を糖尿病化ヌードマウスおよび免疫正常マウスに移植し、最高 3 か月以上の血糖値の改善効果を認めた。ハイドロゲルのみでも免疫隔離機能も示した。ゲル周囲の癒着や線維化はほとんど認めなかった。しかし、移植後長期的にはゲルが次第に溶解縮小し、グラフト機能が低下していくことが課題であった。

② マクロカプセル (デバイス) に細胞を封入し、in vitro で培養するとカプセル内で細胞は生存して機能を維持し、インスリンを放出することを確認した。

さらにマクロカプセル化細胞を糖尿病化ヌードマウスおよび免疫正常マウスに移植し、最高 6 か月以上の血糖値の改善効果を認めた。しかし、ハイドロゲルと異なり半透膜性カプセルは長期的に破損することなく強度的には安定であったが、移植後長期的には次第にグラフト周囲の線維化や癒着が発生し、グラフト機能が低下していくことが課題であった。

さらに半透膜性マクロカプセル化ブタ膵島を健常マウスの腹腔内に移植し、癒着や線維化を起さず2か月間グラフト内部の膵島を生存させた。今後さらに長期の評価が必要である。

考察：

①②とも有望なカプセルであり、特に異種細胞であっても免疫抑制剤なしで数か月以上のグラフト機能の維持が可能である点が優れていた。反面、それぞれにカプセルの物性による課題が明らかになった。特に長期的に機能を維持するためにはさらなる技術開発が必要である。

課題番号 : 27指1201  
研究課題名 : 膵島移植を目指した機能性  $\beta$  細胞の大量培養法の開発  
分担研究課題名 : ヒト iPS 細胞から膵臓  $\beta$  細胞の分化法の検討  
主任研究者名 : 大河内仁志  
分担研究者名 : 矢部茂治

キーワード : iPS 細胞、膵  $\beta$  細胞

研究成果 :

ヒト iPS 細胞から膵臓  $\beta$  細胞を分化誘導できるようになったので、膵島移植を目指すために大量培養法の開発を目的とした。臨床応用を視野に入れると、 $10^9$  以上の細胞数が必要となるため、コストも意識する必要が生じる。より高機能な  $\beta$  細胞の誘導が望ましく、そうすれば必要細胞数を減らせることになり、コストの削減にもつながる。

これまでにヒト iPS 細胞の接着培養ではブドウ糖濃度に応じてインスリンの分泌量を変化させられる機能性  $\beta$  細胞の分化誘導に成功しているが、ヒトに対してはマウスに必要とされる細胞数の約 2000 倍が必要となるため、培養皿では対応が難しいと考えられた。そこで大量培養という観点から浮遊培養に注目し、エイブル社の 30ml の自動攪拌培養装置を購入して、浮遊培養を行った。東大医科研で樹立された iPS 細胞 (TKDN4-M) については接着培養の培養条件が概ね適用でき、浮遊培養においても *in vitro* で機能性  $\beta$  細胞の分化誘導が可能であった。糖尿病モデルマウスの腎被膜下に細胞移植をしたところ、細胞生着を確認し、マウス血中にヒト C-peptide を検出していたが、検出濃度としては数十 pM 程度であり、随時血糖を正常化するには十分量とは言えないと考えられた。まだ生体における機能としては改善の余地があると考えられ、特に誘導した  $\beta$  細胞において転写因子の NKX6.1 の発現が十分でないために、細胞の成熟度が低いことが一つの原因ではないかと考えられた。そこで NKX6.1 の発現を指標にして細胞の分化法を改善することにより、NKX6.1 の発現を上昇させることができた。実際に改善したプロトコールで誘導した細胞をマウスに移植したのち、血中のヒト C-peptide 濃度が経時的に上昇し、数百 pM まで達することが確認された。徐々に随時血糖の降下も認められ、120 日以上 of 細胞生着も確認した。浮遊培養においても 6 段階のうち最初の分化段階がその後の  $\beta$  細胞への分化誘導に重要であることを立証し、definitive endoderm への分化誘導法で特許を出願した。

移植前の細胞塊を用いてブドウ糖によるインスリン分泌刺激試験 (GSIS) を行った。NKX6.1 の発現が十分でない時にも GSIS にて高血糖に対してインスリン分泌が大きく上昇することがあり、機能性が保たれていると判断していたが、移植後のマウス血中のヒト C-peptide 濃度を測定してみるとそれほどでもなく、必ずしも *in vitro* の GSIS が移植後の効果判定の指標にならないことが示唆された。一方、NKX6.1 の発現を上昇させることができた細胞塊では GSIS に対する反応性はほとんどない場合でも、移植後に徐々にマウス血中のヒト C-peptide 濃度が上昇して、随時血糖が正常化するものが現れた。そこで移植後の  $\beta$  細胞の成熟化には時間が必要と考え、まず通常の NOD-SCID マウスにヒト iPS 細胞由来の細胞塊を腎被膜下に移植し、2 週間または 4 週間または 6 週後に STZ (ストレプトゾトシン) を投与して、血糖値が上昇するか否かの実験を行った。マウスの  $\beta$  細胞は STZ によってダメージを受けるので、インスリンを分泌できなくなって STZ 投与で通常は血糖値が上昇する。ヒトの  $\beta$  細胞は STZ に耐性を示すことから、もしヒト  $\beta$  細胞がマウス内で機能を発揮していれば、STZ 投与後も血糖値の上昇は見られないと予想した。細胞移植後 2 週間では STZ 投与にて血糖の上昇が見られたのに対して、4 週間後と 6 週間後に STZ を投与した場合は、血糖値が上昇しなかった。マウス血中に確かにヒト C-peptide が検出され、マウス C-peptide は検出されていないことを ELISA で確認した。このことから移植前の細胞の状態はまだ



未分化な状態の $\beta$ 細胞である可能性が高く、生体内で4週間程度かけて $\beta$ 細胞は成熟化することが示唆された。この実験の過程で $\beta$ 細胞の成熟化のマーカーとなりうる候補分子を幾つか見出したので、今後さらに検討していきたいと考えている。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 27指1201

研究課題名： 膵島移植を目指した機能性β細胞の大量培養法の開発

主任研究者名： 大河内仁志

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Optical clearing of the pancreas for visualization of mature β-cells and vessels in mice.	Nishimura W, Sakaue-Sawano A, Takahashi S, Miyawaki A, Yasuda K, Noda Y.	Islets,	(10)3: 106-112	2018
Efficient Generation of Functional Pancreatic β Cells from Human iPS Cells.	Yabe SG, Fukuda S, Takeda F, Nashiro K, Shimoda M, Okochi H	J Diabetes	9 : 168-179	2017
Methods for Microencapsulated Porcine Islet Production.	Shimoda M, Matsumoto S.	Methods Mol Biol.	1479:347-356.	2017
Microencapsulation in Clinical Islet Xenotransplantation.	Shimoda M, Matsumoto S.	Methods Mol Biol.	1479:335-345.	2017
Genome-wide association studies in the Japanese population identify seven novel loci for type 2 diabetes.	Imamura M, Takahashi A, Yamauchi T, Hara K, Yasuda K, et al	Nature Commun	7: 10531	2016
Pancreatic developmental defect evaluated by celiac artery angiography in a patient with MODY5	Iwasaki N, Tsurumi M, Shimizu W, Watanabe A, Ogata M, Takizawa M, Ide R, Yamamoto T, Saito K	Human Genome Variation	DOI:10.1038/hg.v.2016.22	2016

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Generation of the hiPS cells derived pancreatic beta (hiPS-beta) cells by 3D spinner culture.	Yabe SG, Fukuda S, Shimoda M, Okochi H	Kyoto Diabetes Mini-Symposium Beta-Cell Replacement Strategies	Kyoto	2017/6/5

研究発表及び特許取得報告について

<p>A novel beta cell replacement therapy with human iPS cells.</p>	<p>Shimoda M, Yabe SG, Shinohara K, Yuan W, Fukuda S, Watanabe A, Ozawa F, Shinohara M, Inoue T, Ibuki M, Sakai Y, Takeuchi S, Michiue T, Okochi H, Sasaki E, Nakatani M and Miyajima A</p>	<p>Kyoto Diabetes Mini-Symposium Beta-Cell Replacement Strategies</p>	<p>Kyoto</p>	<p>2017/6/5</p>
<p>浮遊培養系によるヒトiPS細胞由来膵β細胞の分化誘導</p>	<p>矢部茂治、福田沙月、霜田雅之、大河内仁志</p>	<p>第16回日本再生医療学会総会</p>	<p>仙台</p>	<p>2017年3月</p>
<p>「遺伝子cis調節領域の網羅的エピゲノム解析と膵島代償機序に関する転写因子モチーフの検討」</p>	<p>南茂隆生、宇田川陽秀、舟橋伸昭、川口美穂、上番増喬、平本正樹、西村渉、安田和基</p>	<p>第60回日本糖尿病学会年次学術集会</p>	<p>名古屋</p>	<p>2017年5月</p>
<p>「糖尿病の遺伝素因-最新のトピックスと展望-」</p>	<p>安田和基</p>	<p>第5回Diabetes Research Conference in Tochigi</p>	<p>宇都宮</p>	<p>2017年6月</p>
<p>「肥満や関連疾患の遺伝素因は、どこまでわかったのか」</p>	<p>安田和基</p>	<p>肥満と糖尿病を考える会</p>	<p>佐倉</p>	<p>2017年12月</p>
<p>「リラグルチドが有効であったMODY5疑いの1例」</p>	<p>寺川瞳子、中條大輔、仲村明香、菊地智彦、上野圭佑、濱野頌子、安田和基、植木浩二郎、梶尾裕</p>	<p>第55回日本糖尿病学会関東甲信越地方会</p>	<p>新潟</p>	<p>2018年1月</p>
<p>iPS細胞を用いた次世代型膵島移植療法の開発</p>	<p>霜田雅之、矢部茂治、篠原孝也、元文姫、福田沙月、渡邊亜美、渡邊貴一、篠原満利恵、井上貴史、伊吹将人、酒井康行、竹内昌治、道上達男、大河内仁志、佐々木えりか、加藤智久、宮島篤.</p>	<p>第59回日本糖尿病学会総会</p>	<p>京都</p>	<p>2016年5月</p>
<p>Development of small non-human primate diabetes model (Common marmoset).</p>	<p>Masayuki Shimoda</p>	<p>Laboratory Animal Research Center Symposium in Samsung Medical Center.</p>	<p>Seoul</p>	<p>2016年8月</p>

研究発表及び特許取得報告について

Analysis of post-transplant islet by organ transparency and macro three-dimensional image.	Koya Shinohara, Masayuki Shimoda.	26th International Congress of The Transplantation Society	Hongkong, China	August 17-23, 2016
The availability of marmoset diabetes modeling as a transplantation model.	Wenji Yuan, Satsuki Fukuda, Takashi Inoue, Hitoshi Okochi, Erika Sasaki, Masayuki Shimoda.	26th International Congress of The Transplantation Society	Hongkong, China	August 17-23, 2016
「ゲノム網羅的解析結果を用いた膵島代償機序の検討」	南茂隆生、宇田川陽秀、舟橋伸昭、川口美穂、上番増喬、平本正樹、西村渉、安田和基	第59回日本糖尿病学会年次学術集会	京都	2016年5月
「脂肪細胞培養上清によるグルココルチコイド受容体を介した膵β細胞機能変化」	宇田川陽秀、舟橋伸昭、西村渉、平本正樹、川口美穂、南茂隆生、安田和基	第59回日本糖尿病学会年次学術集会	京都	2016年5月
Prevalence of MODY subtype and clinical characteristics in patients with early onset diabetes in Japanese	Iwasaki N, Ogata M, Fujimaki R, Uchigata Y, Saito K	The 13th International Congress of Human Genetics	Kyoto	April, 2016

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
「膵臓・膵島」	大河内仁志	『移植』第52巻4/5号		2017年10月1日
「1型糖尿病」根治 ふるさと納税が後押し	霜田雅之	佐賀新聞		4-6-2016
「1型糖尿病」根治 ふるさと納税が後押し	霜田雅之	NHK佐賀版		4-8-2016
「インスリン分泌不全の感受性遺伝子のゲノム検索」	安田和基	Diabetes Frontier 27巻4号 特集：糖尿病の遺伝素因の解明研究		2016年8月
「発症遺伝子の解析」	安田和基	『糖尿病専門医研修ガイドブック改訂第7版』診断と治療社、P92-94		2017年5月
企画編集『糖尿病の「体質」：発症する人としない人の違いはなにか?』	安田和基	月刊糖尿病19巻7号(P7-P109)		2017年7月
「DTC(direct-to-consumer)検査としての遺伝子検査」	安田和基	糖尿病診療マスター 15巻7号		2017年7月

研究発表及び特許取得報告について

「2型糖尿病全ゲノム解析の現状と今後の展望」	安田和基	Medical View Point 39巻 3号.P1-2		2018年3月
------------------------	------	--------------------------------	--	---------

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
内胚葉系細胞集団、及び多能性細胞から三胚葉のいずれかの細胞集団を製造する方法。	特許特願2017-012802	大河内仁志、矢部茂治、伊吹将人	2017年1月27日	日本