

サブテーマ名：ES細胞からの内胚葉系細胞の分化誘導技術の確立

小テーマ名：ES細胞からのインスリン産生細胞の分化

テーマリーダー：(財) 先端医療振興財団、客員研究員、宮崎 純一

研究従事者：(財) 先端医療振興財団、客員研究員、倭 英司

(財) 先端医療振興財団、客員研究員、宮崎 早月

(財) 先端医療振興財団、特別研究員、蔭 菁菁

(財) 先端医療振興財団、特別技術員、高山いずみ

(財) 先端医療振興財団、特別技術員、大西 幸子

● 研究の概要

糖尿病はわが国においても急増の一途をたどり、それに伴う合併症が増加し、罹患患者の QOL の低下のみならず、医療費の増大にもつながり、今後の大きな問題になる。その原因の多くは膵β細胞からのインスリン分泌不全が関係し、インスリン産生細胞を補充することで血糖制御は改善する。ES 細胞は多分化能を持ち、様々な細胞に分化することが知られている。そこで、本研究では ES 細胞からインスリン産生細胞を再現性よく効率的に分化させる手段を考案することを目標とする。

転写因子は細胞分化に必須の因子であるため、我々は転写因子遺伝子導入による分化誘導を行うこととした。しかし、ES 細胞はクローンによりその分化形質が異なることや外来遺伝子の発現が抑制されることなどが知られており、フェーズ I では遺伝子導入の方法論の確立を目指した。またフェーズ II では、それらの方法論を用いて、インスリン産生細胞の分化誘導方法の確立を目指した。

1. フェーズ I

(1) 研究の目標

ES 細胞の転写因子遺伝子導入系の確立とその評価法の確立、および転写因子遺伝子導入のためのアデノウイルスベクターの作製

(2) 実施内容

1. β細胞への分化に関係すると考えられる転写因子の cDNA のクローニング
2. 転写因子遺伝子の polyoma T 発現 ES 細胞系を用いた分化に対する影響のスクリーニング。
3. テトラサイクリンにより外来遺伝子の発現制御を行うことのできる ES 細胞の実験系の構築。
4. pdx-1 をこの誘導発現系に組み込み、ES 細胞で制御的に pdx-1 を発現できることを示した。
5. MaCay らの方法に準じて、ES 細胞からインスリン産生細胞の分化誘導することが可能であることを確認するとともに、ES 細胞にマーカー遺伝子を導入し、インスリン産生細胞に分化した細胞を EGFP でマーキングすることができることを示した。
6. 将来的にヒト ES 細胞に遺伝子導入するためには、一過性の外来性遺伝子発現が必要になるアデノウイルスベクターに、β細胞への分化に関係すると考えられる転写因子 pdx-1, isl-1, Pax4, neurogenin3, HNF1α, HNF3α, HNF3β, HNF4α の遺伝子を組み込んだ。

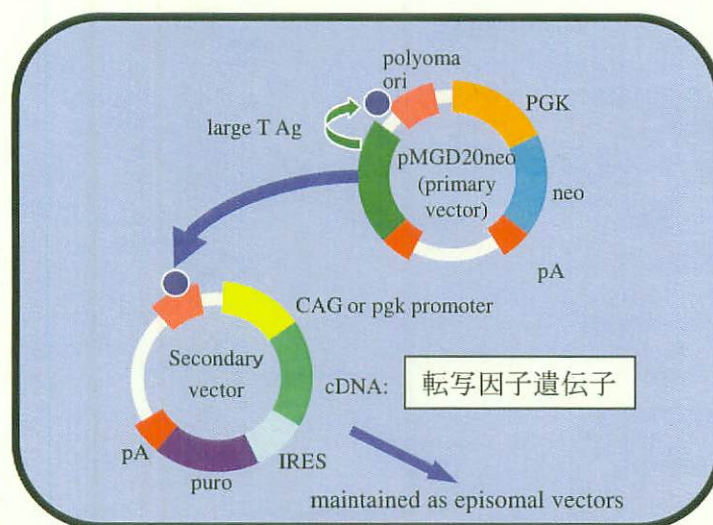
(3) 成 果

1. ベータ細胞分化関連遺伝子の単離

ベータ細胞への分化に関係すると考えられる転写因子 pdx-1, isl-1, neurogenin3, Beta2/NeuroD1, Pax4, Pax6, HNF3 α , HNF3 β , HNF4 α , GATA4, GATA6, sox17 の cDNA をクローニングした。またこれらの遺伝子配列はシーケンサーにて確認を行った。

2. Polyoma プラスミドシステムを用いた転写因子遺伝子のスクリーニング

次に、これらの転写因子を ES 細胞初期分化に関する影響を検討するために、polyoma T 発現プラスミドを episomal に維持している ES 細胞 (MG1.19 細胞) に、さらに各種の転写因子遺伝子を polyoma ori を持つ発現ベクターを episomal に導入し、分化に対する影響を検討した。



本細胞系では polyoma T 抗原を安定して発現するので、polyoma ori を持つプラスミドを episomal に長期間維持できる。そのため、外来性遺伝子を polyoma ori をもつ発現ベクターに組み込み、リポフェクションにて導入し、薬剤選択をするだけで、簡易に当該遺伝子を発現する ES 細胞を得ることが可能であり、スクリーニングに適している。

本細胞を用いて、種々の転写因子遺伝子を検討した結果、GATA4, GATA6 遺伝子を導入すると内胚葉細胞になることが判明した。胚ベータ細胞は内胚葉から分化するためこの検討は重要であると考えられる。また、GATA4 を導入すると GATA6 遺伝子が誘導され、GATA6 を導入すると GATA4 遺伝子が誘導され、それぞれが強調して分化を誘導することが示唆された。しかし、これらの細胞は増殖せず、この細胞を用いた検討はできなかった。

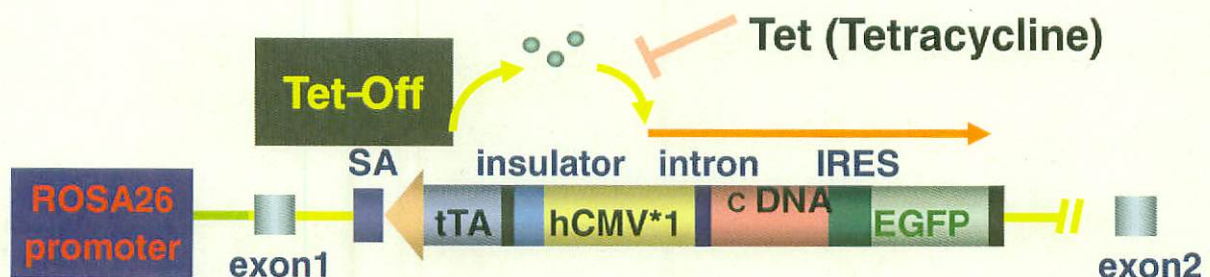
また、我々が以前より確立していた ZHTc6 細胞に GATA 遺伝子発現ユニットを導入し、薬剤にて GATA 遺伝子制御可能な細胞を用いて、同様な検討を行ったところ、MG1.19 細胞で観察されたのと同様に内胚葉細胞に分化誘導しえた。しかし、この細胞では導入遺伝子発現が分化に伴い低下する現象が認められた。

3. 薬剤誘導にて安定した外来遺伝子発現を保つ ES 細胞株の確立

これまでの検討で分化に伴い外来遺伝子が低下することが判明したため、ES 細胞が分化した後も

外来遺伝子発現を維持する細胞系の確立がインスリン産生細胞分化の検討においても重要であると考えた。また諸外国の検討では遺伝子を導入したクローンでの分化形質を検討しているものが多い。ES 細胞の分化形質は、クローン間で異なることがわかってきたため、同一クローンで、遺伝子の発現制御が可能な細胞での検討が必須であると考えた。

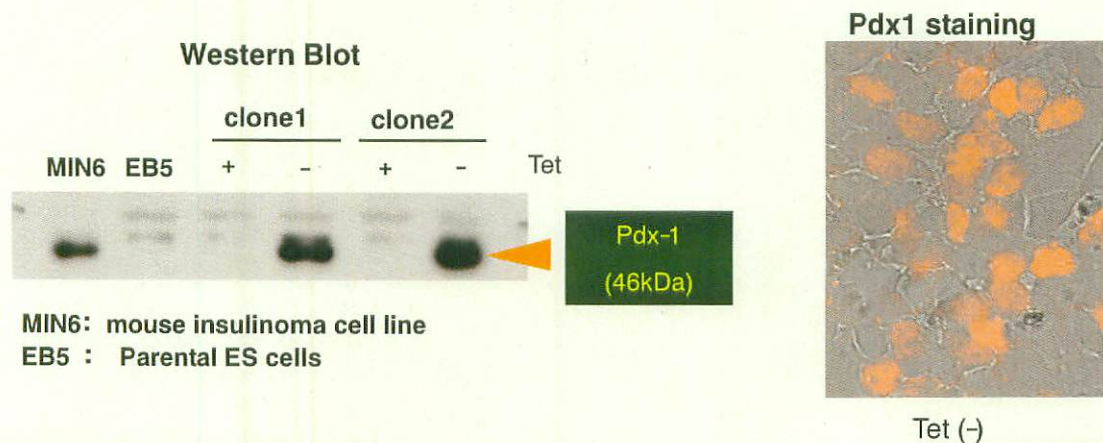
ROSA26 遺伝子は初期発生から成体にいたるまで発現が一様であり、ここに外来遺伝子を導入すると安定した発現が得られることがわかってきた。そこで、我々は ROSA26 遺伝子座に以下に示す遺伝子発現制御ユニットを導入した。ROSA26 遺伝子のプロモーターで tTA (テトラサイクリン感受性遺伝子発現抑制因子) を発現させ、ROSA プロモーターの影響を排除するために、その後ろに insulator を導入し、続けて tTA がその発現を抑制する hCMV-1 プロモーターを置いた。その後に発現させたい外来遺伝子をおき、続けて、その発現をモニターする目的で IRES EGFP をつないだ。この発現ユニットをノックイン手法により ES 細胞に導入した。



この細胞はテトラサイクリンを培養液中から除去することにより外来遺伝子および EGFP を発現する。

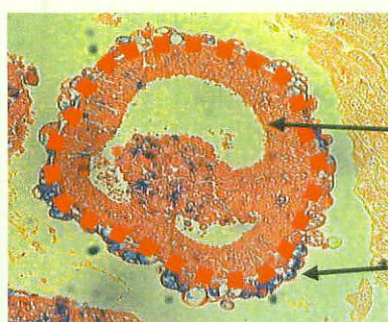
4. ROSA-Pdx ES 細胞の characterization

以上の方法で確立した ES 細胞に対し、本実験では、Pdx-1 遺伝子を導入した (ROSA-Pdx ES 細胞)。Pdx-1 伝子は膵発生に必須の遺伝子であり、Pdx-1 遺伝子の欠損は膵の形成が著しく障害される。また、Pdx-1 は同時にインスリンプロモーターに働き、インスリン遺伝子転写を促進し、膵β細胞の機能維持にも必須の因子である。ROSA-Pdx ES 細胞の Pdx-1 蛋白の発現を下記のように Western blotting および免疫染色にて確認を行った。その結果、この ES 細胞ではテトラサイクリンにより Pdx-1 遺伝子の制御が良好に行われていることが確認された。



5. フィーダーなし ES 細胞におけるインスリン産生細胞分化についての検討

Lumelsky らは ES 細胞からインスリン産生細胞が分化することを示したが、彼らの検討ではフィーダー細胞を除去することで pdx-1 遺伝子が発現しインスリン産生細胞が出現するとされた。一方でヒト ES 細胞は一般的にはマウスのフィーダー細胞と共培養されるが、ヒトへの移植を考えると、異種動物の細胞の混入の可能性が完全に否定できないので、フィーダー細胞非依存性 ES 細胞の確立が急がれる。そこで、フィーダー細胞非依存性の ES 細胞が Lumelsky らの方法で分化可能か否かを検討し、あわせてこれらのインスリン産生細胞の細胞系譜を検討する目的で、ES 細胞にマウスインスリン 2 プロモーター下に lacZ 遺伝子を発現するレポーターコンストラクトを導入し、分化誘導を行った。その結果、フィーダー非依存性 ES 細胞でもインスリン産生細胞に分化すること、またこれらのインスリン産生細胞は胚様体の最外層細胞である原始内胚葉由来であることが確認できた。また、これらのインスリン産生細胞から分泌されるインスリン量は少ない。また、これらの細胞は散在しており、すべての細胞を分化させるには至っていない。



原始外胚葉

原始内胚葉

insulinII

青く染色されるのがインスリン遺伝子の発現が認められる細胞

6. 転写因子発現アデノウイルスベクターの作製

持続的な転写因子遺伝子の分化に対する影響を検討する一方で、任意の分化状態で一過性に遺伝子導入の効果を検討する場合にはアデノウイルスベクターによる遺伝子導入が効果的である。また、アデノウイルスベクターは染色体内に取り込まれないため、ヒト ES 細胞の分化を検討する際にも重要なツールになりうる。そこで、我々の考案した効率よく簡易なアデノウイルスベクター作製法を用いて、pdx-1, isl-1, Pax4, neurogenin3, HNF1 α , HNF3 α , HNF3 β , HNF4 α の各遺伝子発現アデノウイルスベクターを作製した。

2. フェーズII

(1) 研究の目標

ES 細胞からインスリン産生細胞分化の方法論の確立

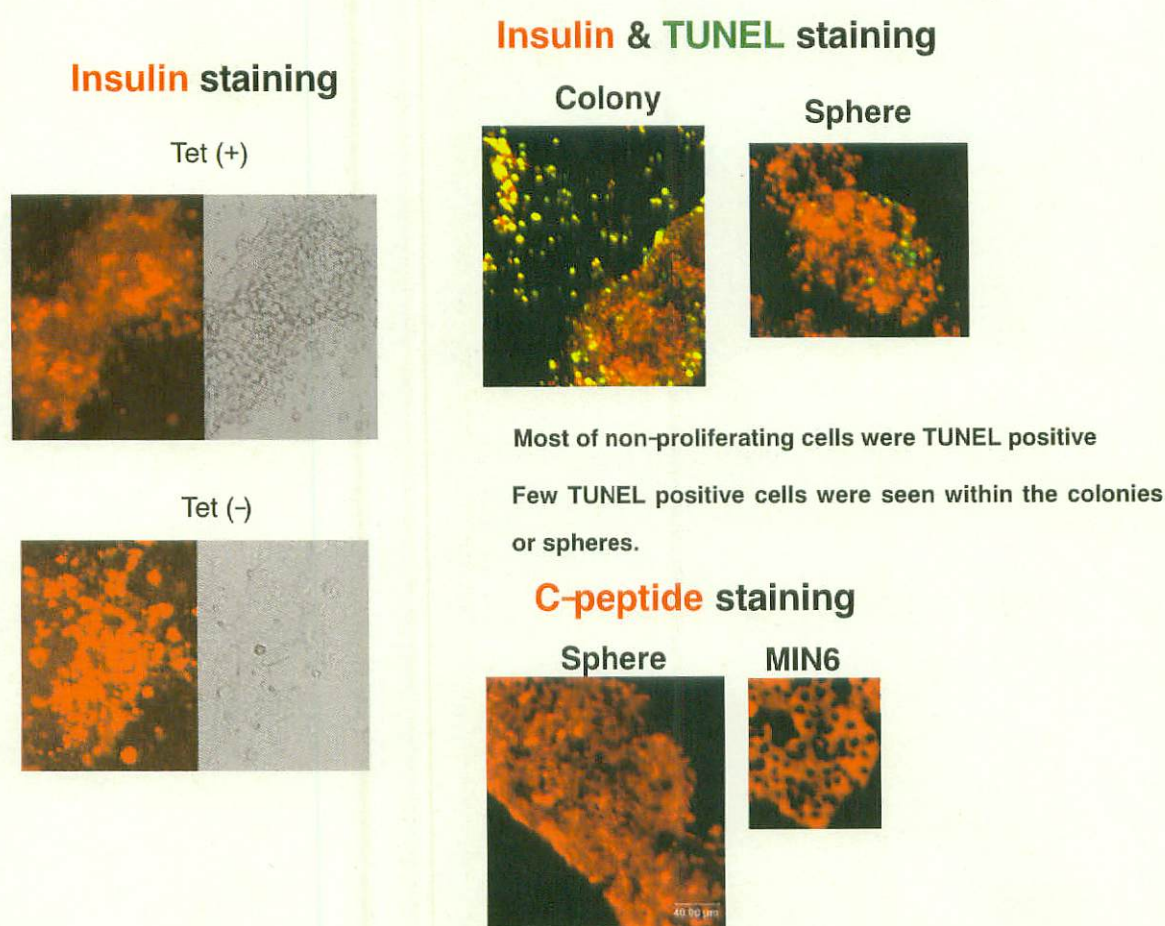
(2) 実施内容

1. Pdx-1 遺伝子発現誘導可能な ES 細胞を用いたインスリン産生細胞分化の検討
2. Pdx-1 遺伝子ノックアウト ES 細胞を用いたインスリン産生細胞分化の検討
3. Sox17 遺伝子発現誘導可能な ES 細胞を用いた内胚葉細胞分化の検討
4. Sox17 遺伝子発現 ES 細胞由来内胚葉細胞を用いたインスリン産生細胞分化の検討

(3) 成 果

1. Pdx-1 遺伝子発現誘導可能な ES 細胞を用いたインスリン産生細胞分化の検討

フェーズ I で作製した ROSA-Pdx1 ES 細胞を用い、Lumelsky らの方法に準じてインスリン産生細胞分化を試みた。その結果、Pdx-1 遺伝子を強制発現させることによりインスリン遺伝子発現が誘導され、またインスリン産生細胞も増加した。Melton らのグループが、Lumelsky らの方法で分化させた細胞は、apoptosis を起こした細胞で、培養液中のインスリンを取り込んだために、インスリン染色で陽性になるとの報告を行った。そこで、本研究では、我々の得た分化細胞について、apoptosis の有無、インスリン染色、およびインスリンが de novo で産生される時に同時に産生される C-peptide の染色を行った。Pdx-1 の強制発現で誘導される細胞のうちコロニー状で増殖するものは apoptosis もなく c-peptide も陽性で、de novo でインスリンを産生するインスリン産生細胞であることを確認した。



これらの細胞からはグルコースに反応してインスリンは分泌されるものの、その分泌量は少なく、これらのインスリン産生細胞は十分に成熟したものであるとは言えない。

2. Pdx-1 遺伝子ノックアウト ES 細胞を用いたインスリン産生細胞分化の検討

Pdx-1 遺伝子の強制発現によりインスリン産生細胞が分化誘導可能であるが、これらの細胞は十分

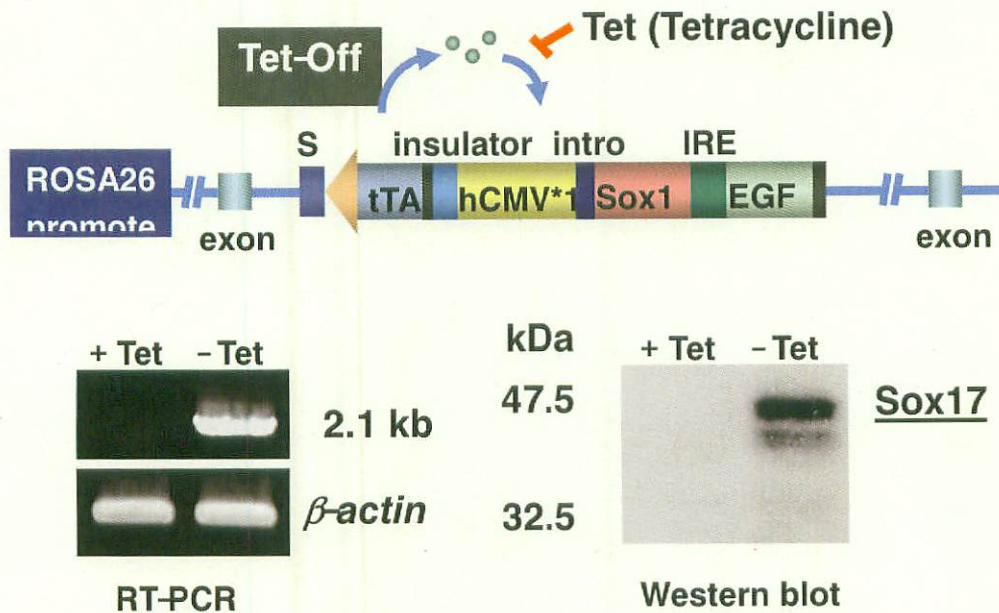
に成熟したものであるとは言えない。そこで、膵ベータ細胞の発生および機能に必須の役割を果たしている Pdx-1 を欠損させた場合のインスリン産生細胞分化誘導が可能である可否かを検討した。Pdx-1 遺伝子座に IRES-beta geo 遺伝子を挿入したコンストラクトを作製し、ES 細胞に導入し、まず、1 対の Pdx-1 遺伝子座が破壊された ES 細胞を定法通り作製後、この細胞に高濃度の薬剤選択を行うことにより、2 対の Pdx-1 遺伝子座が破壊された Pdx-1 ノックアウト ES 細胞を作製した。この細胞を Lumelsky らの方法を用いて分化誘導を試みたところ、Pdx-1 ノックアウト ES 細胞のインスリン遺伝子発現量は野生型 ES 細胞を分化させたものと有意な差を認めなかった。Proper な発生で生ずる膵ベータ細胞の分化には Pdx-1 が重要であることを考えると、本方法にて得られるインスリン陽性細胞はその分化過程において膵ベータ細胞とは異なるものであると考えられた。

3. Sox17 遺伝子発現誘導可能な ES 細胞を用いた内胚葉細胞分化の検討

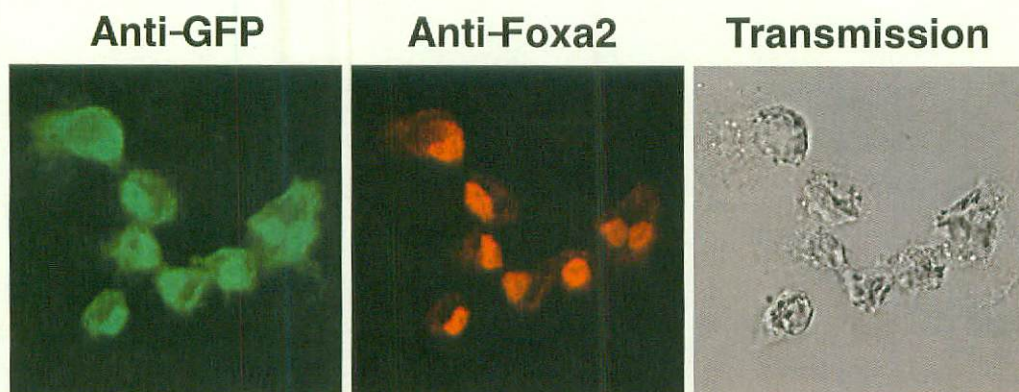
これまでの我々の検討で従来の分化誘導方法では、十分なインスリン分泌能を持ったインスリン産生細胞を得ることが困難である可能性があるため、次に Proper な発生に順ずる方法で分化させるストラテジーを考案した。そこで、膵ベータ細胞が発生する内胚葉細胞に着目し、ES 細胞からまず内胚葉細胞を分化増殖させ、その後、その内胚葉細胞をインスリン産生細胞に分化させるという 2 段階の方法をとった。

分化過程における内胚葉細胞は発生における空間的・時間的に Primitive endoderm と Definitive endoderm に分けることができる。Sox17 はこの両者に発現する遺伝子として知られているため、Sox17 遺伝子を ES 細胞に導入することにより、内胚葉細胞を得ることを考えた。

前述した Pdx-1 遺伝子における方法と同様に ROSA26 locus に Sox17 遺伝子をテトラサイクリンで誘導可能な ES 細胞を確立した (ROSA-sox17 ES 細胞)。

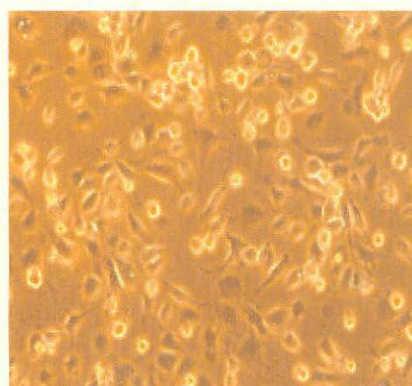


図に示すように、テトラサイクリン除去により Sox17 遺伝子および Sox17 蛋白が誘導されることを確認した。しかし、この細胞はテトラサイクリン除去のみでは内胚葉細胞には分化しない。興味深いことに、この細胞はテトラサイクリン除去し、高密度培養を行えば、LIF 存在下でも内胚葉細胞に分化し、その細胞は増殖も可能である。また、遺伝子発現による解析からこの内胚葉細胞は壁側原始内胚葉の性質を持つものであることが判明した。同時に下図に示すように、この細胞を Foxa2 染色してみると、分化細胞の 97% は Foxa2 が核に染色され、ほぼすべての細胞を内胚葉細胞に分化誘導可能であることが判明した。



4. Sox17 遺伝子発現 ES 細胞由来内胚葉細胞を用いたインスリン産生細胞分化の検討

上記の内胚葉細胞は高密度培養により得られるが、この方法では細胞の収量は必ずしも多くはない。そこで、細胞の培養方法に工夫を加え、内胚葉細胞を大量に分化誘導させる方法を考案した。この方法で得られる内胚葉細胞も増殖力を保っている。

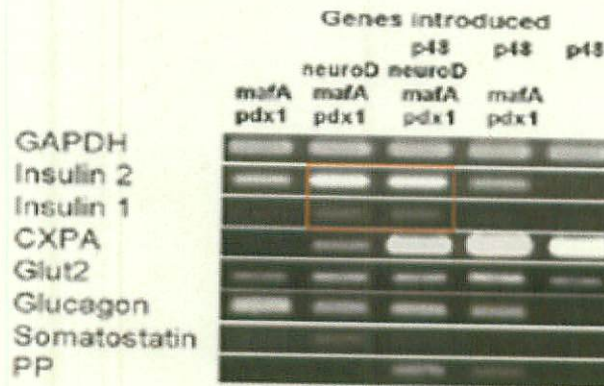


紡錘形をした細胞が
内胚葉細胞

次にこの細胞を分化させる目的で、フェーズ I で作製した各種転写因子を発現するアデノウイルスベクターによる遺伝子導入を試みた。コントロールとして LacZ 遺伝子や EGFP 遺伝子を発現するアデノウイルスベクターで感染を試みたところ MOI 5-10 で良好に遺伝子が導入されることが判明した。

これまでのアデノウイルスベクター導入による結果から、Pdx-1、NeuroD1、MafA 遺伝子を共に発現させるとインスリン 2 遺伝子のみならずインスリン 1 遺伝子も発現することを確認している。インスリン 1 遺伝子はマウスにおいて膵外では発現しないことがわかっている。また、これまでの ES 細

胞を直接分化させる方法ではインスリン2遺伝子の発現は誘導できるがインスリン1遺伝子発現誘導はできない。以上のことから本方法で得られたインスリン産生細胞はより膵β細胞に近いものである可能性もある。



3. 今後の展望

本研究により、ES細胞をインスリン産生細胞に分化誘導する方法論の改善と今後の方法論を決定することができた。今後はさらにこの細胞の Characterization を行い、インスリン産生細胞としての成熟度を判定し、今後の細胞治療の材料として適切であるか否かの検討が必要である。