

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細胞および組織幹細胞からインスリン産生細胞への分化誘導に関する遺伝子の網羅的解析

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、田代 文

(財)先端医療振興財団、特別研究員、齋藤 弘一

## ● 研究の概要

糖尿病治療の課題である機能的な細胞の不足を解消するための一つの方法としてES細胞からインスリン産生細胞の作製が考えられている。そこで、我々はES細胞に膵臓の発生に重要な転写因子であるpdx-1を強発現させsphere状インスリン産生細胞(ROSA-PDX-1 ES sphere細胞)を作製した。さらにアデノウイルスベクターを用いて膵β細胞の分化に重要な遺伝子を導入し、効率よく機能的な細胞に分化誘導されるかを検討した。

### 1. 研究の目標

マウスES細胞を用いて、効率の良い膵β細胞への分化誘導方法を確立する。また、分化誘導した細胞からβ細胞のみを純化する方法を開発する。

### 2. 実施内容

外来性pdx-1とEGFPの発現を同時にテトラサイクリンにより制御することのできるES細胞を用いて分化誘導実験を行い、インスリン産生細胞を作製することができた。Pdx-1誘導発現細胞からは、sphere状に浮遊するインスリン産生細胞が得られ、この浮遊細胞はsphere状のまま長期に増殖維持できる。しかしながらインスリン発現量は生体内のβ細胞には及ばない。また、インスリン産生能は次第に低下する(Fig. 1)。

そこでGFP強発現すなわちPDX-1強発現株を濃縮することを目的とし、EGFPをマーカーとしてソーティングを試みた(Fig. 2)。ソーティングした細胞は再培養しても増殖する。またソーティングにより単離したGFP発現株についてRT-PCR解析を行った。GFP発現株はインスリン2を強発現する事が示された。しかしながらインスリン1の発現は確認されなかった。この結果から、PDX-1のみが強発現してもインスリン1の発現は誘導されず、膵β細胞に近いインスリン産生細胞を分化誘導するためには他の遺伝子の発現も重要である可能性が示唆された。

継代数の違うROSA-PDX-1 ES sphere細胞をRT-PCRにより解析した結果、インスリン遺伝子の発現の低下に伴い、β細胞の分化に必須な遺伝子のいくつかが発現していないことがわかった(Fig. 1)。

そこで、効率よくインスリン産生細胞を誘導するため、この細胞にアデノウイルスベクターを用いてβ細胞の分化に必要とされる遺伝子群を導入し、遺伝子発現を解析した。PDX-1は発現し続け、また導入したneuroD1も強発現していることが確認された。また、neuroD1を導入した細胞においては非導



入細胞と比べて、インスリン 1 については 100-200 倍、インスリン 2 については 1000-2000 倍発現量が増加していた。インスリン 2 のみでなくインスリン 1 も発現していることから、neuroD1 導入細胞は生体内のベータ細胞により近い細胞に分化した可能性が示唆された (Fig. 3)。neuroD1 導入 sphere 状細胞及び非導入 sphere 状細胞の凍結切片を作製し免疫染色を行った。neuroD1 導入細胞では非導入細胞に比べ抗 insulin 抗体、抗 C-peptide 抗体で染まる像が見られた。このことから、neuroD1 の導入によって、遺伝子レベルのみではなく蛋白レベルにおいてもインスリンが誘導されることが示唆された (Fig. 4)。neuroD1 導入細胞、及び非導入細胞についてグルコース応答性を調べた。neuroD1 の導入により量的には非常に少ないがインスリンの分泌量のベースは上がる傾向が見られた。また、グルコース応答性も弱いながらも上昇する傾向が見られた。このことより neuroD1 の導入により ROSA-PDX-1 ES sphere 細胞は機能は弱いながらも insulin 産生細胞に分化した可能性が示唆された。

### 3. 成果

これまで ES 細胞からインスリン産生細胞を分化誘導する方法は機材に接着させる方法が多く、本研究において発生した sphere 状細胞で培養できる細胞は大量に培養する際、付着系細胞に比べ有利である。また neuroD1 を導入した細胞においてインスリン 1、インスリン 2 両方の発現が見られたことから、生体内の膵ベータ細胞に近い性質の細胞に誘導できたと考えられる。

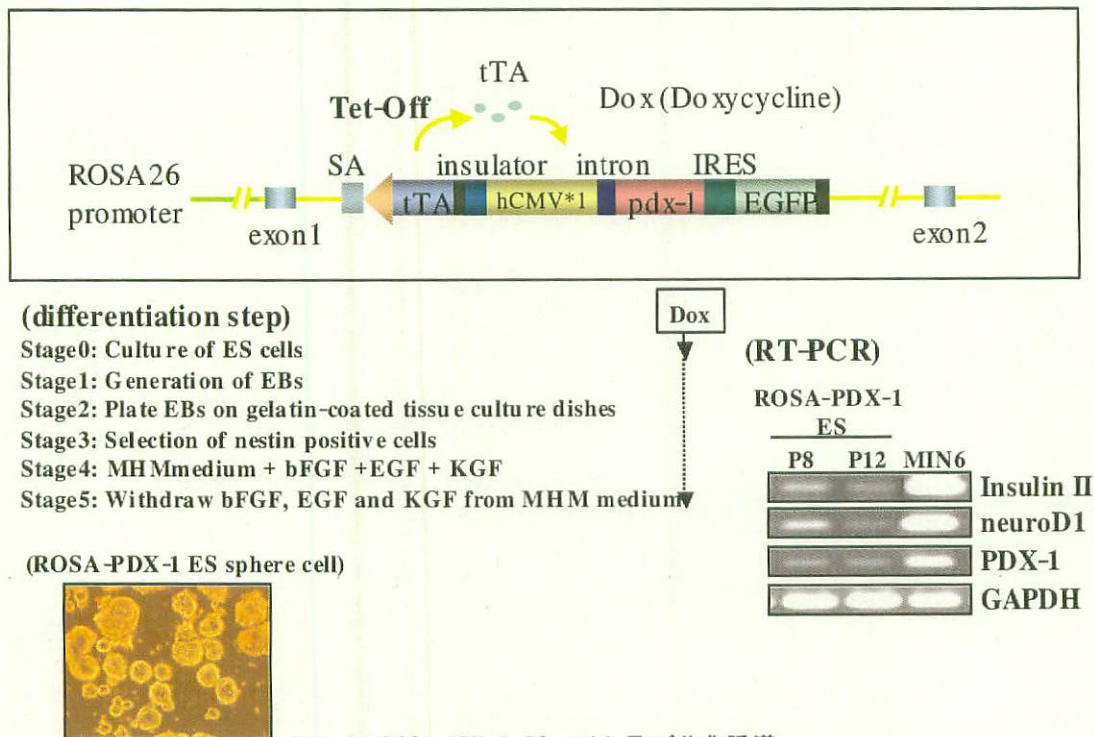


Fig. 1 ROSA-PDX-1 ES cell 及び分化誘導

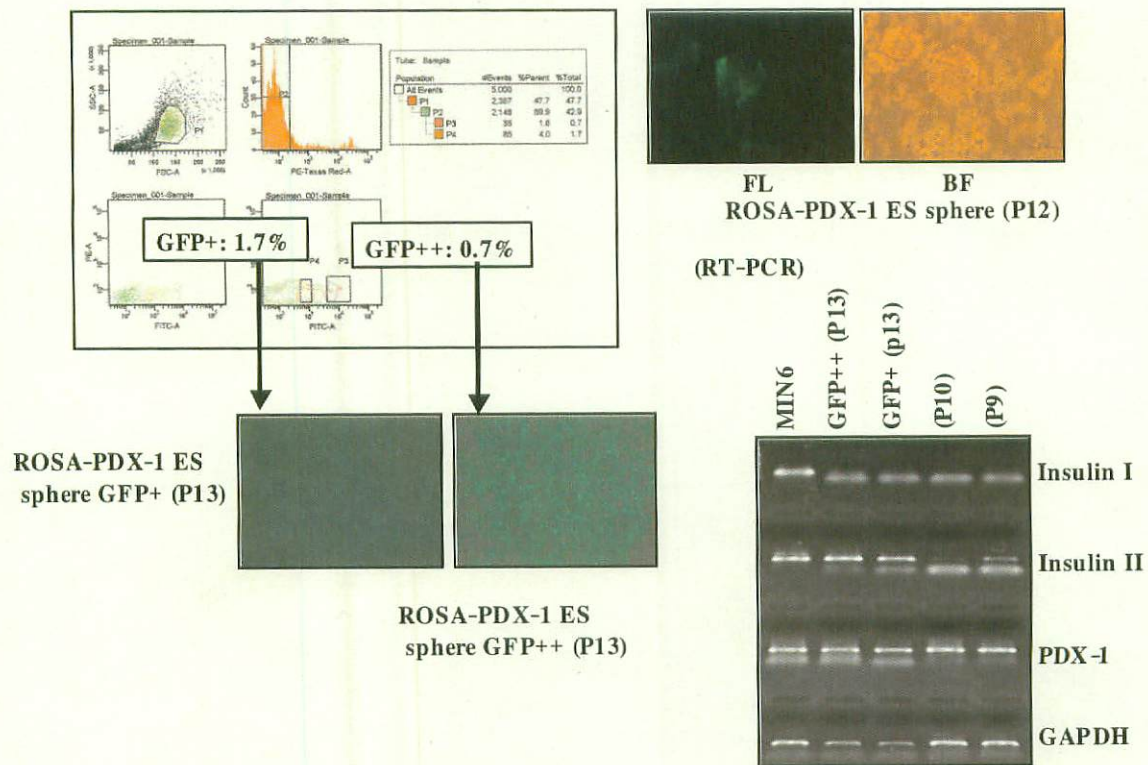


Fig. 2 GFP 強発現ROSA-PDX-1ES 細胞の単離および遺伝子発現

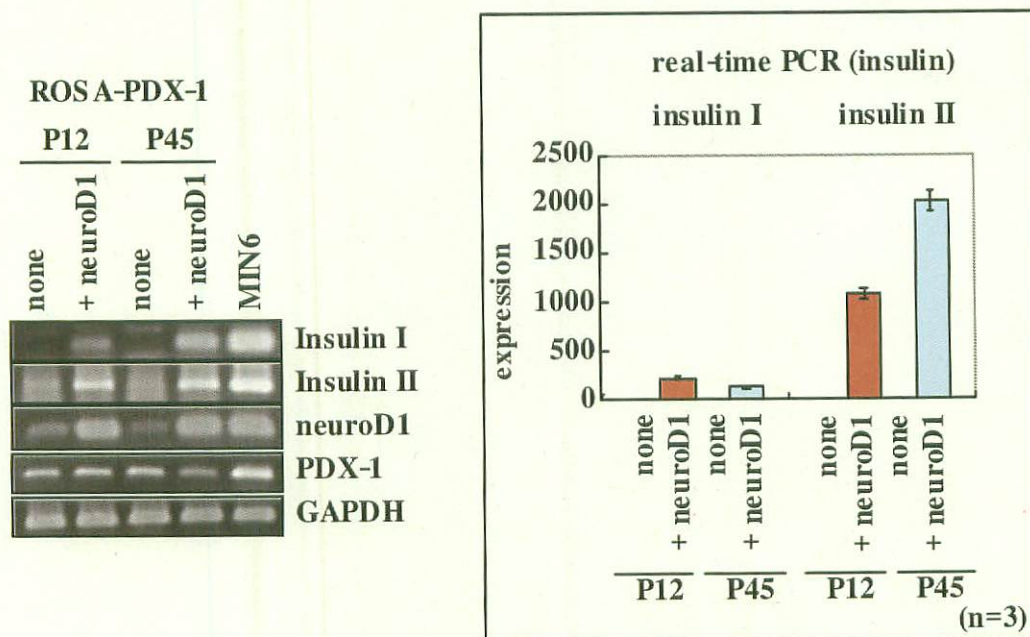


Fig. 3 遺伝子導入後4日目の遺伝子発現



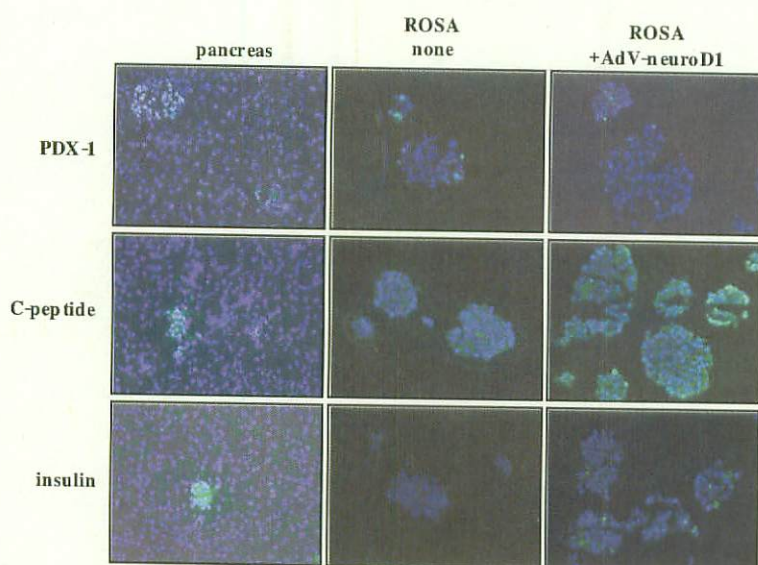


Fig. 4 neuroD1 導入細胞の免疫染色

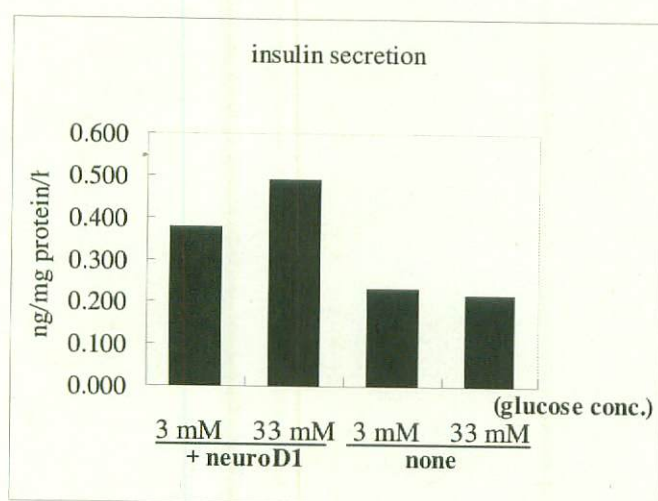


Fig. 5 グルコース応答性

#### 4. 今後の展望

マウスES細胞から膵β細胞に近いと思われる細胞を得た。しかしながら、インスリン含量やグルコース応答性などは生体内の膵β細胞の100分の1程度であり、まだまだ機能的には不完全であると考えられる。更なる既知の内胚葉分化に関連する転写因子の検討や、新規遺伝子の探索が必要と考えられる。

また、分化効率も100%ではない為、分化したインスリン産生細胞のみを純化するシステム作りも必要であると考えられる。さらに今回用いた細胞は浮遊培養が可能であり、培養技術の改善により大量培養が可能となりうる。再生医療の糖尿病治療の分野において細胞ソースの不足が課題となっている現状を考えると、大量培養技術の開発も視野に入れなければならないと思われる。