

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：幹細胞からインスリン産生細胞への分化誘導過程での細胞表面マーカーの 検索・解析

テマリーダー：(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、客員研究員、山本 恒彦

(財)先端医療振興財団、特別研究員、齋藤 弘一

ステムセルサイエンス(株)、共同研究員、堀 洋

ステムセルサイエンス(株)、共同研究員、中山 直憲

● 研究の概要

胚性幹(ES)細胞や幹細胞を用いた再生医療・細胞治療の実現を考えた場合、これら細胞の大量維持・増殖培養技術及び分化誘導培養技術、最終分化機能細胞の安定的な確保や治療用途における安全性保証が必要と考えられる。分化誘導インスリン産生細胞を用いた糖尿病治療においても、これら課題の克服は必須の要項となり、また、世界的な糖尿病患者の罹患患者数及び増加傾向に鑑み、細胞治療のモデルケースと考えられている。弊社においても、糖尿病治療に対する細胞治療用細胞の研究開発は事業基本としており、既に理化学研究所との共同研究でも成果の一部を発表するに至っている(Yasunaga M et al., Nature Biotechnol. *in press*)。

本事業においてもES細胞や体性幹細胞からインスリン産生細胞へと分化途中にある細胞に発現する特異的遺伝子の同定をDNA array法等を用いて網羅的に検索する研究が展開されており、さらに、本研究においては、分化誘導過程の細胞表面タンパク質マーカーの検索及び解析を課題に糖尿病に対する細胞治療のトランスレーショナルリサーチを推進すべく研究展開を遂行した。すなわち、ES細胞から、インスリン産生細胞や内胚葉系細胞への強制分化誘導方法を検討し、あるいは、膵臓に存在するといわれている膵幹細胞の高純度かつ高増殖・長期間維持できるような単離・維持方法の確立と得られた膵管由来の膵幹(様)細胞から、インスリン産生細胞や内胚葉系細胞への安定的な分化誘導方法をの広範な検討を行い、各分化誘導各段階で特徴的な細胞表面タンパク質を検索した。なかでも特に、膵管由来の膵幹(様)細胞の無血清培養条件下での分化誘導において分化培養過程である種の分化誘導因子の添加のみで膵内分泌細胞の正常発生に類似する分化を誘導し得る可能性を示唆した。しかしながら、最終的なインスリン産生細胞への安定的な分化誘導には至らず、先行している分化誘導過程で消長する関連発現遺伝子の成果とこれら発現タンパク質のさらに詳細な相関解析を実施することが、糖尿病治療に対する細胞治療用細胞の開発を推進すると結論した。

1. 研究の目標

再生医療・細胞治療への利用を目的として、ES細胞や体性幹細胞が大きな期待を持たれている。なかでもES細胞は、強力な自己増殖性、多分化能を維持したままの増殖という特性が有用とされる一方、倫理的な問題、目的とする機能細胞への安全で確実な分化誘導方法の確立及び既存の細

胞培養技術とは異なる培養環境や培地を駆使した手法が必要である問題などに多くの研究労力を割かれている。また、体性幹細胞は、倫理的な問題はES細胞に比較すると格段に低減されることや機能性細胞へのある程度の分化方向が規定できるという有用性が示される一方、ES細胞の場合と同様に目的とする機能細胞への安全で確実な分化誘導方法の確立が最大の課題とされている。これら細胞治療への応用が期待される両ソース細胞に関して、標的機能性細胞への安全で確実な分化誘導法の確立が急務である点は、我が国においても潜在患者を入れて1,620万人が罹患しているといわれている糖尿病患者に対する細胞治療であるインスリン産生細胞の調製に関しても同様の状況にあり、インスリン産生細胞、すなわち、膵β細胞への安全で確実な分化誘導法の確立が急務とされている。

本、トランスレーショナルモデルの確立事業においては、これらの背景を踏まえて、ES細胞及び体性（組織）幹細胞からインスリン産生細胞調製を目指した内胚葉系細胞の誘導方法の開発を目指して種々グループが研究を展開しており、我々は特に、ES細胞に遺伝子を導入した細胞から内胚葉系細胞への誘導過程での細胞表面タンパク質の検索・解析、及び、膵臓細胞の体性（組織）幹細胞である膵幹細胞の単離・樹立を試みるとともに、この細胞から膵臓細胞群への分化誘導過程での細胞表面タンパク質の検索・解析を試みた。すなわち、内胚葉系細胞への分化過程の細胞に関して、先行している分化過程での発現遺伝子の消長情報の確認、これら遺伝子情報に則ったタンパク質発現の動態確認、またこの過程で新規な特異性マーカータンパク質の検索を実施し、ES細胞や体性（組織）幹細胞からインスリン産生細胞への分化過程での普遍的マーカーの確認を行うことを目標に検討を進めた。さらに、これらの情報を詳細に解析、統合し、安全でかつ確実に膵β細胞調製が可能となるマーカーの確認・樹立を究極の目標として検討を進めた。

2. 実施内容

ES細胞から内胚葉系細胞への分化誘導モデルとして、EB3 ES細胞に *insulin 2-β geo gene* を組み込んだ「Ins2βgeo細胞」(Moritoh Y *et al. Diabetes* 52:1163-1168, 2003) を用いて検討を行った。Ins2βgeo細胞から内胚葉系細胞への分化誘導も Moritoh らの報告(ref. 上記)に従って実施した。また、体性（組織）幹細胞の樹立は、山本らが開発した方法(特願 2004-80781 及び 山本恒彦他. *Diabetes Frontier* 15:565-566, 2004)に従って単離したマウス膵管由来膵幹(様)細胞の凍結保存株(duct細胞: clone No. 12)を用いて検討を行った。この膵管由来膵幹(様)細胞から内胚葉系幹細胞への分化誘導は、ダルベッコ修飾イーグル培地(DMEM:Gibco)とHam's F-12(Gibco)の1:1ミックス(DMEM/F12)にCholera toxin (CTx:Wako)、ITS (Insulin:Sigma-Aldrich、transferrin:Sigma-Aldrich、sodium selenite:Sigma-Aldrich)、0.2%ウシ血清アルブミン(BSA:Sigma-Aldrich)、ケラチノサイト増殖因子(KGF:Sigma-Aldrich)を添加した duct細胞無血清維持培地に以下の種々分化誘導因子を添加して検討を実施した。

(分化誘導条件) 分化誘導因子として HGF (peprptec)、Activin (R&D) および Betacellulin (R&D) を組合わせた。

- ① HGF の単独添加 (H)
- ② HGF+Activin 添加 (HA)
- ③ Betacellulin+Activin 添加 (BA)

分化誘導各段階細胞の発現遺伝子は、一般的な分子生物学的解析方法により、PCR, Real time PCR

による遺伝子発現の確認・定量を行った。また、分化誘導各段階細胞の発現タンパク質の解析は、一般的な生化学的解析方法により、SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングによる発現タンパク質の検出・分析を試みた。特に、duct 細胞の解析には、上記各分化誘導条件に転換し、20 日後 (Day 20) まで分化誘導の各段階の細胞から経時的にサンプルを回収した。すなわち、発現遺伝子解析用として mRNA を TRIzol (Sigma) で抽出を行い、PCR および Real time PCR による解析を行った。また同時期の細胞から、全タンパク質を細胞溶解液により回収し、得られたタンパク質サンプルでタンパク質量測定後に、SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングを行った。なお、ウエスタンブロッティングは PVDF 膜へセミドライ法で転写後、抗 PDX-1 抗体 (CHEMICON)、抗 MafA 抗体 (BETHTL)、抗 Nkx2.2 抗体 (CHEMICON) はじめ、抗各関連因子抗体を用いて検出を試みた。

3. 成果

内胚葉系細胞への分化誘導モデル ES 細胞である Ins2 β geo 細胞の分化誘導検討では、凍結保存細胞の再培養において微細な培養条件の統一を規定する尺度の設定が困難を極め、共同研究施設間で発現遺伝子情報と発現タンパク質情報を比較検討するに至るスケジュールが大幅に変更を余儀なくされた。これらは施設間の細胞保存条件のごく微細な相違、培養条件のわずかな相違等が原因とは考えられ得るが、いずれにおいても、多能性の増殖性細胞である ES 細胞特有の原因が大きいと考えられた。さらに、Ins2 β geo 細胞は、無フィーダー細胞かでの培養ではあるものの、ウシ血清存在下での培養を余儀なくされ、目的とする発現タンパク質の詳細な解析に当たっては、培養条件の無血清化、あるいは、低血清化の検討が先決であると思われ、本事業かでの検討では、事業途中で山本らが樹立した体性 (組織) 幹細胞であるマウス膵管由来膵幹 (様) 細胞 (duct 細胞) からの分化誘導における発現タンパク質の解析を優先して検討することとした。

この duct 細胞は、無血清培地で維持培養可能であり、シングルセルクローニングでも細胞の増殖能が確認されている。そこで、この細胞を用いて内胚葉系細胞、すなわちインスリン産生細胞への分化誘導を試み、その過程の発現タンパク質の広範な検出に着手した。まず、樹立・維持培養後保存されている duct 細胞株のうちクローン番号 12 (clone No. 12) の株を用いて検討を実施し、常法により凍結融解し再培養後、その特性を検討した。Fig. 1 は、凍結・再培養後の膵幹 (様) 細胞の形態を示す。樹立後の状態と同様、典型的に数石状に増殖する様態を示し、duct 細胞の特性が維持されていることが確認された。また、この培養 duct 細胞中の転写因子、分化特有マーカー等発現遺伝子を PT-PCR により解析したところ (Fig. 2)、樹立時に規定された、膵管細胞のマーカーである、サイトカイン 19 (CK19) や炭酸脱水素酵素 II (CAII) はじめ、HGF 受容体である c-Met、膵発生のマスターキー遺伝子といわれている PDX-1 が再培養した duct 細胞においても同様に発現していることが確認できた。また一方で、樹立時の検討で発現が認められなかった、膵内分泌細胞のマーカーである Ins-1 や Ins-2 及び膵外分泌細胞のマーカーである Amylase は同様に発現が認められなかった。さらに、膵や胆管系の器官形成・分化を制御する Hes-1 の発現が確認されたとともに低いレベルではあるが膵発生関連の転写因子である、Ngn3 も確認することが出来た。これらのことから再培養した duct 細胞も樹立時の特性を形態的にも遺伝子発現の観点からも維持していると考えられ、以後の検討に用いることは可能と判断した。

次に、この様にして得られた再培養 duct 細胞の培養条件に種々分化誘導因子を添加することによりインスリン産生細胞等、機能性細胞への分化能力を検討した (Fig. 3)。各分化誘導因子添加条件 (HGF のみ [H]、HGF+Activin [HA] 及び Betacellulin+Activin [BA]) とともに分化誘導開始直後から細胞形態の

変化が見られ、duct 細胞に特徴的な敷石状 (最右列が典型的) から、紡錘形に変化し、その形態変化の様子は、H→HA→BA の順に顕著であった。また、誘導が進むにつれ、条件間に差が無く、ほぼすべての分化細胞が紡錘形へと変化することも明らかになった。さらに、未分化状態維持条件での duct 細胞の培養では約 7 日 (Day 7) までにコンフルエントとなるのに対して、これら分化誘導条件の細胞では、一部未分化な状態で残っている細胞が増殖している様に見受けられ、分化系に転じた細胞が増殖能を失うという一般論が厳密に当てはまると考えられた。

続いて、継時的な分化誘導過程で発現・消出している遺伝子に関して検討した。すなわち、分化誘導の各段階の細胞から発現遺伝子解析用として mRNA を TRIzol で抽出を行い、PCR および Real time PCR による解析を行った。なお、Real time PCR は、Rotor-Gene 3,000 (Corbett Research) を用いた。その結果、検討した各分化培養条件間で分化誘導速度の相違 (遅延) が認められた。さらに、分化誘導により発現する種々遺伝子の時期で樹立時細胞との相異が認められ、用いた細胞クローン、clone No. 12 細胞は、凍結保存細胞を用い再培養すると必ずしも樹立時に見られた分化誘導特性の再現を示さないことが示唆された。そこで、分化誘導速度の遅延に合わせた検討期間で発現タンパク質を検出・解析し、発現遺伝子との相違を検討することとし、インスリン産生細胞への分化誘導期間を 20 日まで延長した培養とこの分化条件での各段階の遺伝子発現解析及びタンパク質発現解析を実施し、発現遺伝子解析結果の一部を Fig. 4 にまとめた。

Fig. 4 では、膵発生のマスターキー転写因子といわれている PDX-1 及び同じく膵内分泌系細胞の発生関連転写因子として重要である Nkx2.2 の Real time PCR の継時的解析推移を、各々コントロールとして用いたマウスインスリノーマ細胞株 MIN6 細胞の発現量を 100 とした時の相対量としてまとめている。まず、PDX-1 (上段) においては、検討した、H、HA 及び BA の各条件とも概ね分化誘導 10 日 (Day 10) 前後までは徐々にその発現が低下していき、その後上昇に転じ Day 16 から Day 18 まで発現が上昇することが明らかとなった。しかし、その後の発現量の上昇は停滞気味で、観察した Day 20 まででは MIN6 細胞で観られた量の PDX-1 遺伝子の発現を得ることは出来なかった。また、H を用いた場合には Day 10~Day 12 前後に、及び HA を用いた場合には、Day 8~Day 10 前後に PDX-1 の一過性発現が認められた (BA では明確な一過性発現は観察し得なかった)。一方、膵内分泌細胞の発生に必須な転写因子のうちの一つとして既によく知られている Nkx2.2 (下段) においては、ほとんど大きな発現が認められず、H 及び HA の分化培養条件のみ Day 16~Day 18 に発現の上昇が認められるに過ぎなかった。また、Nkx2.2 においても、観察した Day 20 まででは MIN6 細胞で観られた量の遺伝子発現を得ることは出来ず、さらに、その他の Ngn3、Pax4 はじめとする種々膵発生関連の転写因子の発現様態が認められなかった点と併せて、発現遺伝子的にはインスリン産生細胞への分化誘導が観察期間では達成し得なかったように考えざるを得なかった。樹立時の duct 細胞ではインスリン産生細胞誘導まで 72hr という報告があり、大きな相違点として種々検討を重ねたが、インスリン産生細胞への分化は少なくとも 10 数日以上を要する長期に渡る分化培養を実施する以外では解決する様相もないことが示唆された。これらのことは、用いた凍結保存 duct 細胞において、樹立時に認められた PDX-1 の発現が未だ安定しておらず、凍結融解後の再培養において必ずしも安定した分化誘導状態の安定・再現が得られないことが原因の一つとしてあげられるのではないかと推測された。実際に、何度かの検討で実施した Day 0 における PDX-1 遺伝子の発現は対 MIN6 細胞に対する値でも安定しておらず、傾向をつかむデータしか得られていない。

次いで、発現遺伝子の解析結果を基に発現したタンパク質の確認を行った。発現遺伝子の解析で回収したのと同じタイミングで細胞溶解液 (PIERCE:M-PER) を用いて全タンパク質を回収し発現タンパ

ク質解析用とした。得られたサンプルのタンパク質量は、Bradford 試薬 (BIO-RAD) により定量し、SDS-PAGE 及びウエスタンブロッティングを行った。SDS-PAGE はタンパク質量として $1 \mu\text{g}/\text{lane}$ で泳動し、ウエスタンブロッティング用には、 $2 \mu\text{g}/\text{lane}$ で泳動を行い、PVDF 膜 (Bio-Rad) へセミドライ法で転写後、抗各種関連因子抗体を用いて検出を試みた。発現タンパク質の検出・定量解析には、ジアミバンジジン染色法 (DAB 法) 及び化学発光法 (ECL 法) により行い、GS-800 Calibrated Densitometer (BIO-RAD)、あるいは、ImageQuant ECL (アマシャムバイオサイエンス) を用いて行った。DAB 法により得た結果の一部を Fig. 5 に、ECL 法で得た結果の一部は Fig. 6 にまとめた

まず、分化誘導段階での発現タンパク質の経時変化は DAB 法で検出できることが明らかに出来た (Fig. 5)。図は、ウエスタンブロッティングによる検討で、抗 PDX-1 抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識 2 次抗体 (Jackson Immuno Research) を用いて発色した場合の結果を示すが、用いた分化誘導因子条件 (H と HA) の相違によって、発現タンパクの動態が異なることが認められた。しかしながら、この方法では定量性に欠けることが認められ、再現性のさらなる確認を兼ねるとともに定量的な扱いを ECL 法による検討も併せて考察することとした。

Fig. 6 に ECL 法 (Amersham biosciences: ECL plus) で検討した結果を示す。また、MIN6 細胞での各タンパク質発現量を 100 としたときの相対比で各分化段階のタンパク質発現量を解析した。PDX-1 について、分化誘導条件がいずれの場合も分化誘導中すべての期間で概ね発現が確認できた。また、定量解析した結果、H を分化因子として添加した場合とその他の HA や BA を分化誘導因子として添加した場合で様相が異なることが明らかとなった。このような二大別化は、発現遺伝子の解析結果と類似するものの、詳細に観てみると PDX-1 遺伝子発現に伴った PDX-1 タンパク質の発現が反映されているとは考えにくい結果であった。すなわち、H 条件での PDX-1 タンパク質は Day 6 と Day 20 で高値を示すのに対し、PDX-1 遺伝子は期間のいずれでも MIN6 のそれよりかなり低値と言わざるを得ない結果を示している。また、HA の場合の Day 10 と Day 14 の PDX-1 タンパク質の高値及び BA の場合の Day 10 から 12 の PDX-1 タンパク質の高値においても PDX-1 遺伝子は MIN6 のそれは多少の変動 (上昇) を認めるとはいえ、かなり低値のままである。しかしながら、分化過程で PDX-1 タンパク質が一過性に上昇後成熟インスリン産生細胞 (MIN6 の場合も発現している) に分化した場合に再度発現するということを考えると HA 等の分化条件はインスリン産生細胞への分化過程の一部 (初期段階とは考えられるが) を反映している可能性が充分考えられる。

また、Nkx2.2 に関しては、発現 Nkx2.2 タンパク質の発現傾向が、発現 Nkx2.2 遺伝子の動向と BA 条件を除いて類似する部分が存在し、Day 16 から 18 で一過性の上昇を認める点が確認しうらと思われる。また、インスリン遺伝子の発現制御をしている可能性も示唆されている MafA タンパク質についても検討を試みたが、こちらは一過性の発現を呈するタンパク質とも考えられ、やはりタンパク質レベルでの的確な検出は今回の検討では成し得なかった。

以上、一連の期間内の検討においては、特にマウス膵管由来幹 (様) 細胞、いわゆる duct 細胞が非遺伝子導入技術による分化誘導因子の添加のみでインスリン産生細胞に分化誘導する可能性が充分あることを確認した。ただし、樹立した duct 細胞は凍結保存条件が必ずしも最適化されていない可能性があり、凍結融解後の再培養においては、形態学的な劇的な変化や増殖能が極端に落ち分化ステージに移行したように見受けられるものの、長期間 (少なくとも分化誘導 20 日以上) の分化誘導期間条件を要する必要が予測された。発現遺伝子や発現タンパク質の分化誘導中の推移においても、凍結再培養 duct 細胞の不安定性がデータの再現性確保の点で、混乱を来している可能性は高く、今後も十分な検討が必要であると思われるものの、用いた分化誘導因子 HGF、Activin および Betacellulin

を組み合わせた条件下でインスリン産生細胞への分化に向けた動態に差が認められたことも事実であり、定量には至らず、十分な再現性も獲得はしていないが、各条件間で分化誘導速度の相違を支持するものであろう。

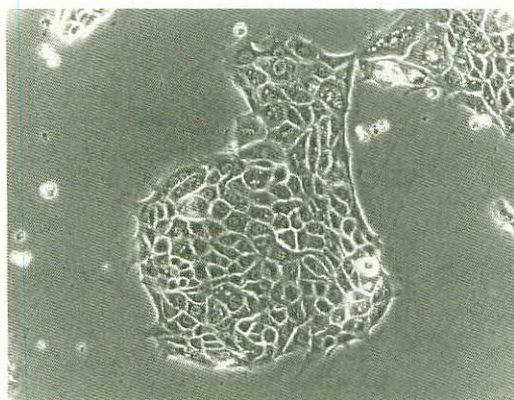


Fig. 1 凍結・再培養後の膵幹(様)細胞 x200

	PDX-1	CK19	Ins1	Ins2	CAII	Ngn3	Amylase	c-Met	Hes-1
樹立細胞	○	○	×	○	○	×	×	○	
凍結保存細胞	○~△	○	×	○	○	×	×	○	○

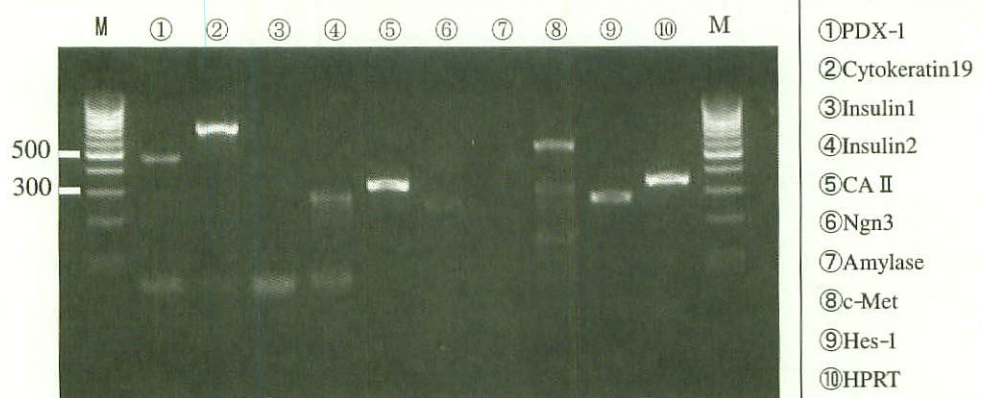


Fig. 2 無血清培地で培養された膵幹(様)細胞の RT-PCR

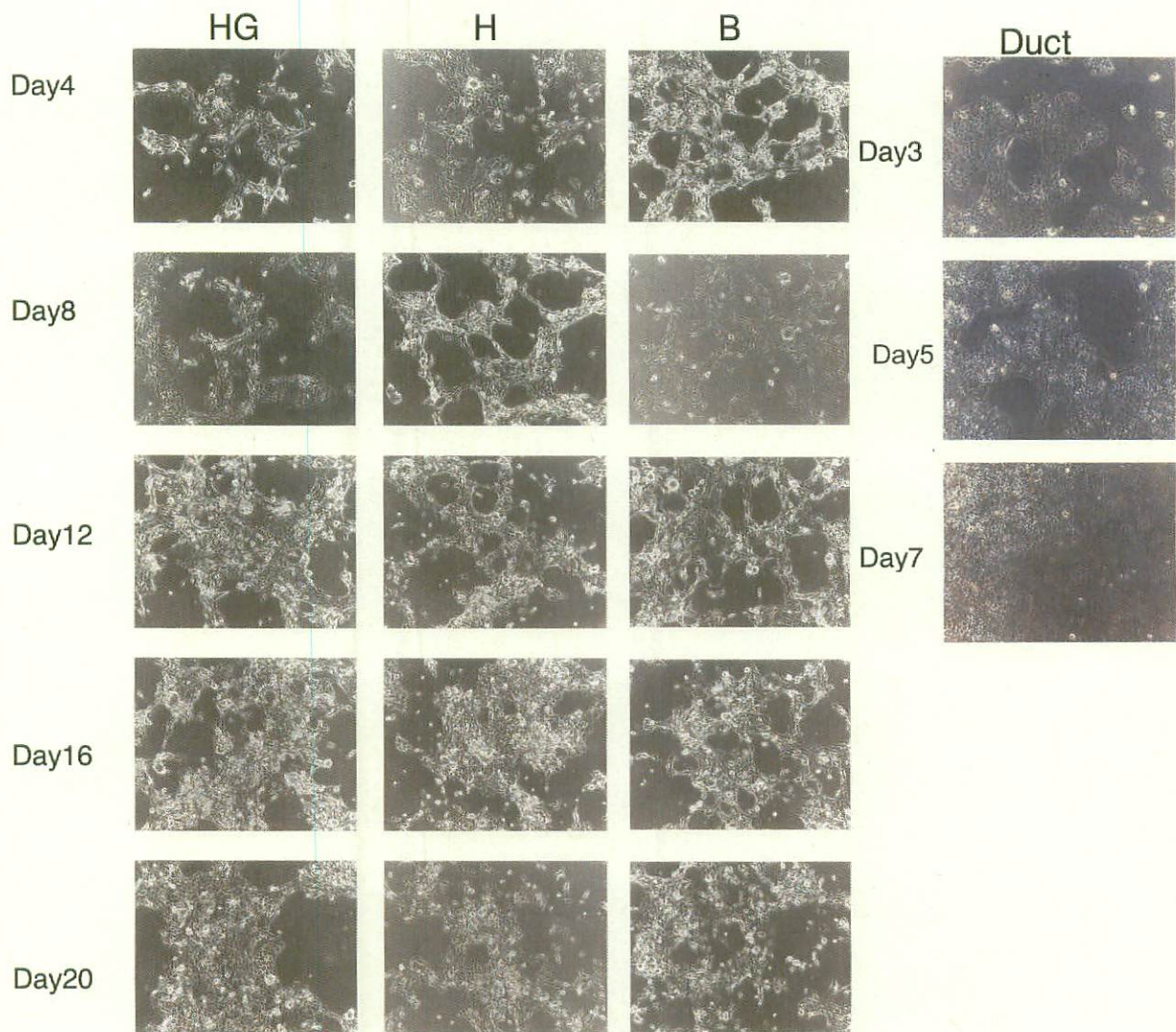


Fig. 3 各種分化誘導因子添加によるインスリン産生細胞への分化誘導過程 x100

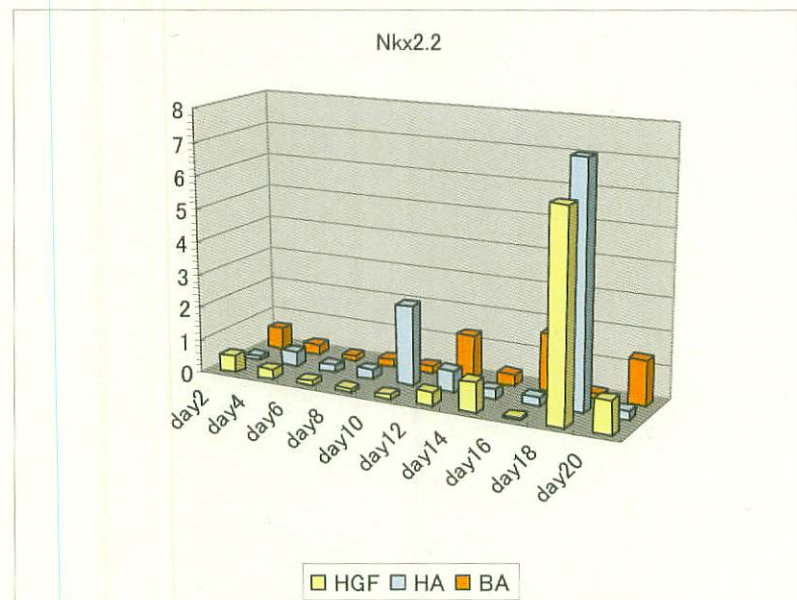
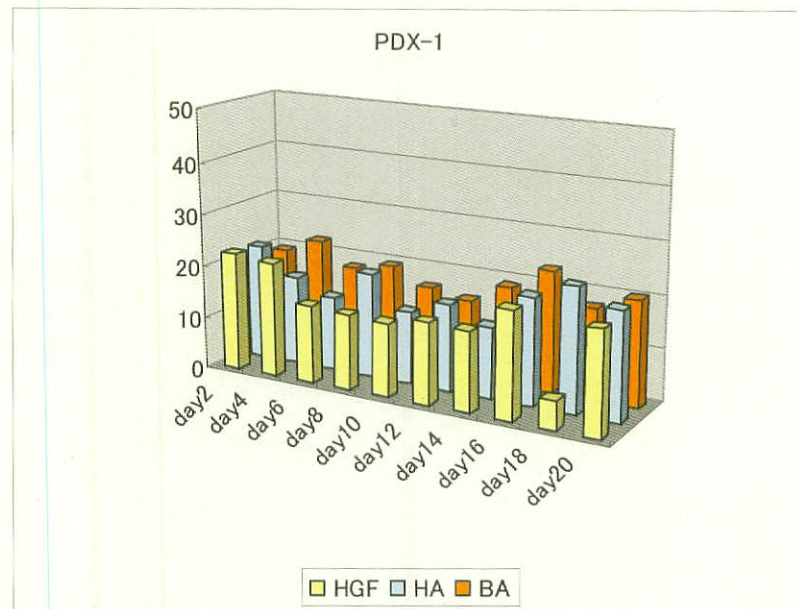


Fig4. 分化誘導過程における各種遺伝子発現の経時変化 (Real time PCR 法による発現解析)

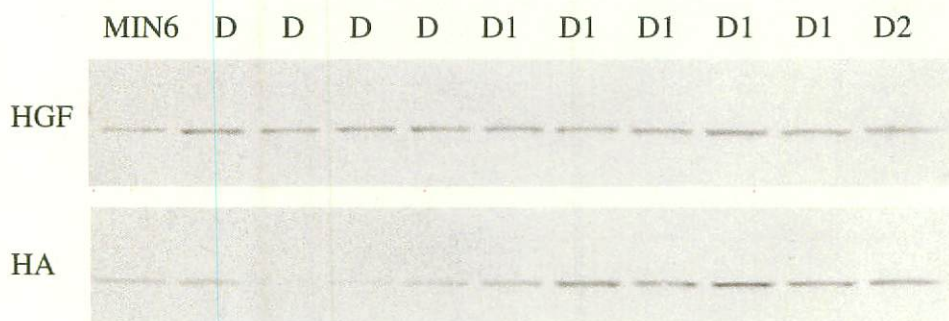
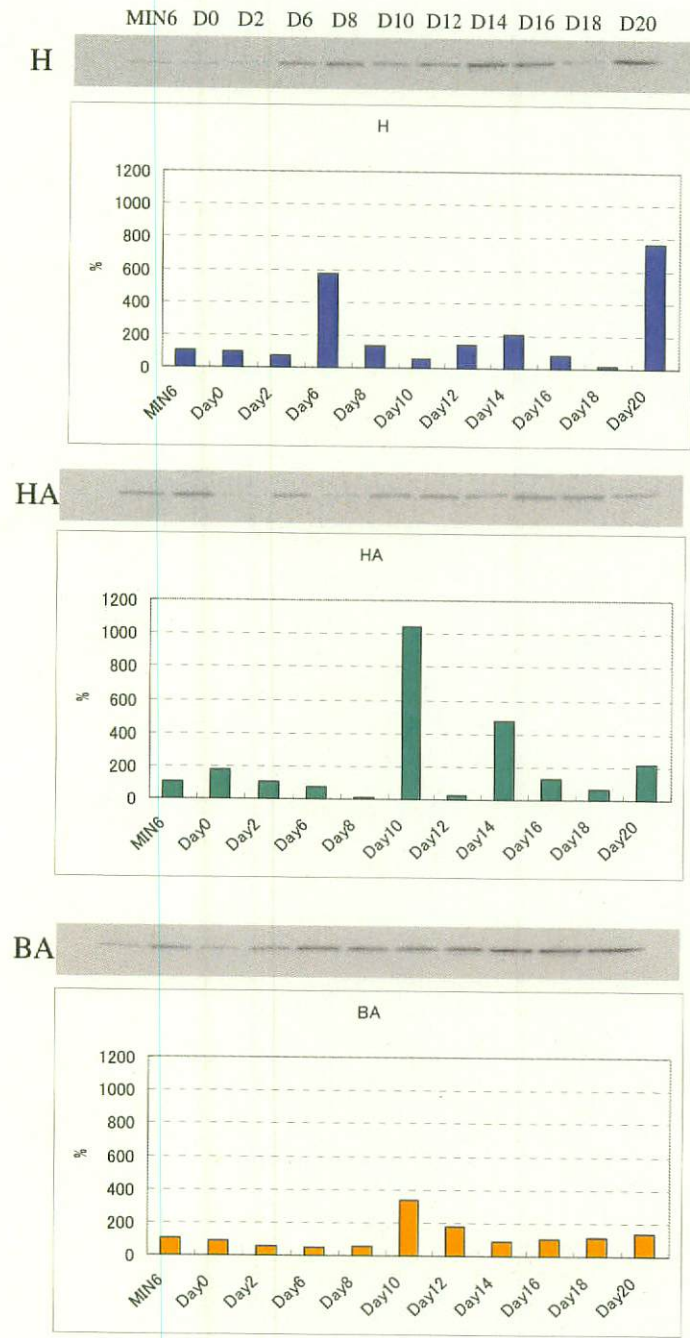
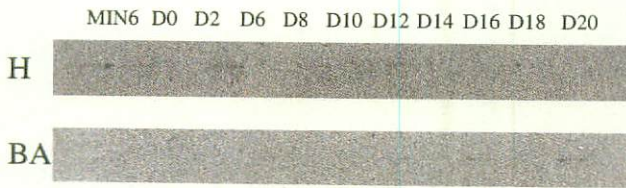


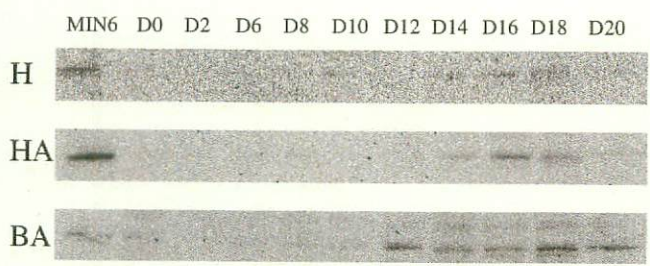
Fig. 5 分化誘導過程における PDX-1 タンパク発現の経時変化 (ウエスタンブロット : DAB 法)



PDX-1

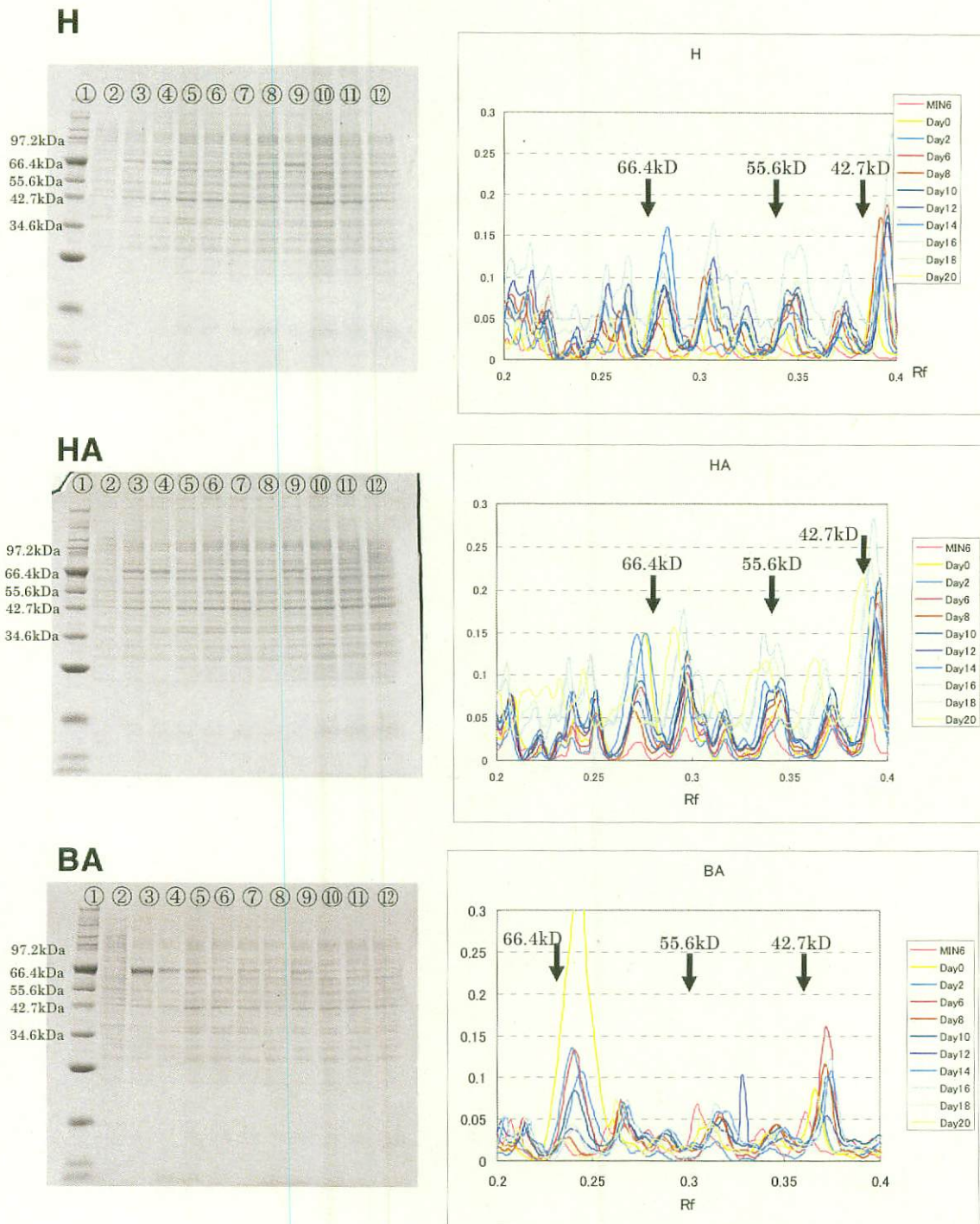


MafA



Nkx2.2

Fig. 6 分化誘導過程における PDX-1, MafA および Nkx2. 2 タンパク発現の経時変化



①Marker,②MIN6,③Duct cell Day0,④Day2,⑤Day6,⑥Day8,⑦
Day10,⑧Day12,⑨Day14,⑩Day16,⑪Day18,⑫Day20

Fig. 7 分化誘導過程におけるタンパク質発現の経時変化
(SDS-PAGE とそのデンストメトリー)

4. 今後の展望

本事業で開発した、幹細胞前駆細胞の取得及び維持方法（特願 2004-80781(平成 16 年 3 月 19 日)）は、ES 細胞と並び、再生医療・細胞治療に向けたインスリン産生細胞調製技術開発の検討に充分応用可能である細胞ソースであることが確認できたと考える。またさらに、将来的な臨床応用を考えると既知成分のみで構成された無血清培地を既に応用していることや、非遺伝子導入技術、すなわち、培養条件への分化誘導因子の添加コントロールのみで、現段階では長期間を要するとしても、臨床に則したより安全な治療用細胞の調製の可能性が示されたことは有意義であると考えられる。これら本事業の一部で得た成果は、さらに臨床応用に向けた安全性の確立への展開を開くことも充分可能と考えられる。

今後は本事業参画者・団体が各々の領域でその成果をさらに研究開発展開し、安定的なインスリン産生細胞への最終分化誘導が完全に確立できたとは言い難い今回の研究開発の展開を行うとともに、ヒト膵幹細胞における研究の展開を実施すること、さらには、これらの目標に向かって共同者・団体、特に特許出願者が今後相互に協力することも含めて解決に向けて努力して行くことが必要と感じる。