課題番号	２２若７

若手研究者助成金　実績報告書

令和　６年　４月３０日

氏　　名：	太向　勇
所属・資格：	医学部・助教
実施研究所：	医学部・総合医学研究所

１　研究課題

和文表記（40 字以内） 羊膜上皮細胞からの膵β細胞への分化誘導法の開発
英文表記 Development of the direct reprograming method of pancreatic β-cells from amniotic epithelial cells.

２　研究期間

令和４年度

※令和４年度　～　令和５年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

３　研究目的

膵β細胞から分泌されるインスリンは血糖値を下げる唯一のホルモンであり、その分泌不全は糖尿病の原因となる。重症インスリン依存性糖尿病に対する治療法として膵島移植があるが、ヒト膵島はドナー膵臓から分離する必要があり、有効な移植効果を得るためには複数回の膵島移植が必要であるため絶対的なドナー不足が最大の課題である。このため、腫瘍原性が無く、簡便かつ大量に作出することが可能な細胞が求められている。本研究では胎盤から簡便かつ大量に採取でき、未分化で様々な細胞種へと分化誘導することができる胎盤由来幹細胞である羊膜上皮細胞からβ細胞を分化誘導する方法の開発を目的として研究を行った。現状のβ細胞作の出法に関する研究は分化誘導効率を少しでも上げ、腫瘍原性を少しでも下げることに主眼が置かれているが、既に限界は近い。本研究はこれらとは異なり、これまで着目されていなかった羊膜上皮細胞から直接β細胞を作出するという新しい取り組みである。本研究では羊膜上皮細胞をβ細胞へと分化誘導することが可能な遺伝子及び小分子や成長因子の探索を行った。

課題番号	２２若７

４　研究概要

インスリン分泌不全を原因とする糖尿病に対する治療法として膵島移植があるが、ヒト膵島はドナー膵臓から分離する必要があり、ドナー不足が課題となっている。近年 iPS 細胞など幹細胞からインスリンの分泌細胞である β 細胞を作出することが試みられている。しかしながら、安定した品質の β 細胞を作出することは難しく、治療に応用できるほどに量産するのは難しい。このため、腫瘍原性が無く、簡便かつ大量に作出することが可能な細胞が求められている。羊膜上皮細胞は胎盤から簡便かつ大量に採取でき、未分化で様々な細胞種へと分化誘導することができる胎盤由来幹細胞である。本研究では羊膜上皮細胞からβ細胞を分化誘導する方法の開発を目的として研究を行った。申請者はβ細胞におけるインスリン分泌機構の研究に携わる中で、ββ細胞の再生に関する研究も計画していた。本研究で用いる羊膜上皮細胞は多分化能を有しており、倫理的な問題なく非侵襲的な方法で得ることができる。羊膜上皮細胞がβ細胞への分化が可能であれば腫瘍原性や量産の難しさなどの問題が解決できると考え本研究を着想した。これまでに、羊膜上皮細胞からβ細胞に類似の機能を有する細胞を作出した例はなく、世界初の試みである。羊膜上皮細胞がグルコース反応性β細胞へと分化誘導が可能であることが明らかになった時のインパクトは大きく、その後臨床応用に向けた更なる研究への発展へとつながることが期待される。申請者はこれまでβ細胞領域の研究を続けており、β細胞の機能解析に精通している。本研究課題の達成はこれまでに申請者が主にマウスのβ細胞で行ってきた研究をヒトのβ細胞へと拡張させることができる。このように獲得した科研費の課題と本課題は相互に関連し、相乗効果は大きく同時に研究を進める合理性は高い。

本研究では羊膜上皮細胞の大きな利点の一つである非腫瘍原性を活かすために、遺伝子導入によるダイレクトリプログラミングを試みる。この方法は細胞種特異的な転写因子を導入することで未分化な細胞を経ることなく、特定の細胞種へと直接分化誘導を行う方法であり、これにより羊膜上皮細胞の非腫瘍原性は保たれることが期待される。βββ細胞の機能に重要な働きをしていることが示されている転写因子の中からβ細胞へと分化誘導が可能な遺伝子群を絞り込むことに成功した。これに加え、βββ細胞への誘導効率を上昇させる小分子化合物の探索を行い、TGFβ シグナリングの抑制が誘導効率を上昇させることを見出した。今後は本研究で分化誘導することに成功した細胞の機能的な妥当性を調べるために、分化誘導を行った細胞（候補βββ細胞）が実際に高濃度グルコースに応答して適切な量のインスリンを分泌するかを ELISA 法により確認する。候補 β 細胞が適切な Ca2+オシレーションを示すかを Ca2+イメージングにより評価する。以上により機能的な検証を行った後に、候補 β 細胞の遺伝子発現プロファイルがβ 細胞と類似していることを RNA-sequencing 解析により確認する。

５　研究結果

先行研究により、膵β細胞への分化及び膵β細胞としての性質を維持するために必須であると考えられている転写因子の中から、ヒト羊膜上皮細胞で発現していない 5 種類の転写因子（MAFA・NKX2-1・NKX6-1・PAX6・PDX1）に着目した。ヒト羊膜上皮細胞への効率的な遺伝子導入を実現するために、これら 5 因子について CMV プロモーター依存的に遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを作製した。遺伝子を導入するのに最適なレンチウイルスの濃度を確認するために GFP 遺伝子を保持するレンチウイルスを様々な感染多重度（Multiplicity of infection, MOI）で感染させ、蛍光顕微鏡で透過光画像と GFP の蛍光画像を比較することで GFP の蛍光を保持する細胞の割合を確認した。その結果、MOI15 以上であれば 99%以上の細胞で遺伝子を導入できることが確認された。この結果からレンチウイルスを用いることによってヒト羊膜上皮細胞に効率的に遺伝子を導入することができることが示された。

上記 5 種類の転写因子の導入によりヒト羊膜上皮細胞が実際に膵 β 細胞の性質を獲得し得るかどうか確認するためにレンチウイルスを作製し、ヒト羊膜上皮細胞に導入した。遺伝子導入の純粋な影響を確認するために、細胞培養条件はヒト羊膜上皮細胞に最適な条件（DMEM、高グルコース、+　5 ng/ul EGF、55 uM　2 -メルカプトエタノール）で培養した。レンチウイルスにより遺伝子を導入後 2 週間培養し、細胞の形態の観察と遺伝子の発現を確認した。その結果 5 因子の中で MAFA を導入したヒト羊膜上皮細胞は、通常は単層（モノレイヤー）で生育するはずのヒト羊膜上皮細胞が 2〜3 層構造を形成するという顕著な形態の変化を示した。他の遺伝子を導入した細胞では顕著な形態変化は観察されなかった。次に膵 β 細胞に特徴的な遺伝子の発現変化を観察するために、レンチウイルスによる遺伝子導入後 2 週間培養した細胞から RNA を抽出し逆転写した後、qPCR を行った。導入したそれぞれの遺伝子が発現しているかどうかを確認したところ、いずれも内在性コントロールとして用いた GAPDH と比較しうるほどの強い遺伝子の発現が観察された。次に膵 β 細胞に関連した性質を獲得しているかどうかを確認するためにインスリン遺伝子の発現を確認した。qPCR で確認したところ、5 因子のいずれを導入した細胞でも遺伝子を導入していないコントロール細胞と比較して有意な発現は確認できなかった。驚くべきことに、ヒト羊膜上皮細胞は通常の培養条件でも 2 週間培養することで僅かながらインスリン遺伝子を発現することが明らかとなった。2 週間の培養期間が不十分であった可能性があるため、さらに 2 週間培養し、計 4 週間培養したが、インスリン遺伝子の発現の有意な上昇は確認されなかった。

以上の結果から、1 種類の遺伝子の導入ではインスリン遺伝子の発現の向上が見られなかったことから 2 種類の遺伝子の組み合わせでインスリン遺伝子の発現を誘導できないかを調べるために上記 5 因子の中でそれぞれ 2 種類の組み合わせ（MAFA+NKX2-1、MAFA+NKX6-1、MAFA+PAX6、MAFA+PDX1、NKX2-1+NKX6-1、NKX2-1+PAX6、NKX2-1+PDX1、NKX6-1+PAX6、PAX6+PDX1）で遺伝子を導入した。上記同様の条件で 2 週間、4 週間培養したが、インスリン遺伝子の有意な発現上昇は認められなかった。2 組の遺伝子の導入でもインスリン遺伝子の発現を誘導することができなかったので次に 5 因子全てを同時に導入するこ

〔５　研究結果（つづき）〕

とを試みた。5 種類もの遺伝子を同時に導入することが可能であるかを確認するために、4 種類の蛍光タンパク質（励起と蛍光の波長の重複という光学的性質の制限により、5 種類の蛍光タンパク質を用いることは不可能であるため）を同時に導入し、それぞれの蛍光を指標にどの程度の細胞集団で 4 種類の遺伝子が導入されるかを確認した。遺伝子導入した細胞の透過光画像と蛍光画像を比較したところ、およそ 50%の細胞集団で 4 種類の蛍光が確認された。これらのことから 5 種類の遺伝子を同時に導入することは可能であると判断し、実際の 5 因子を同時に導入した。これまでと同様の条件でレンチウイルスによる遺伝子導入後それぞれ 2 週間と 4 週間培養した後インスリン遺伝子の発現を調べたところ 2 週間でコントロールと比べて 2〜4 倍に上昇していることが確認された。4 週間の培養でも同程度であったことから培養期間を延ばすことで更なるインスリン遺伝子の発現の上昇は見込めないことが示唆された。以上のことから、上記 5 因子を同時にヒト羊膜上皮細胞に導入することでインスリン遺伝子の発現を誘導することが可能であることが示された。

次に上記 5 因子の導入加えて、更なるインスリン遺伝子の発現を上昇させることが可能な小分子化合物の探索を行った。先行研究により、以下のことが報告されている。①Wnt/β-カテニンシグナリングの活性化②TGFβ シグナリングの抑制③BMP シグナリングの抑制④甲状腺ホルモンによる刺激。これらの中で、①Wnt/β-カテニンシグナリングに関してはヒト羊膜上皮細胞は内在的に活性化されているため除外し、他の②〜④について検証した。TGFβ シグナリングの抑制については SB-431542 及び ALK5 Inhibitor II により、BMP シグナリングの抑制は LDN-193189、甲状腺ホルモンはトリヨードチロニン（T3）を培養液に添加することで行った。それぞれの小分子を培養液に添加後レンチウイルスにより上記 5 因子を導入し、同様の条件で 2 または 4 週間培養したところ、TGFβ シグナリングを抑制した条件でコントロールと比べて 10〜15 倍のインスリン遺伝子の発現の上昇が確認された。一方で、BMP シグナリングの抑制は大きな効果はなく、甲状腺ホルモンの添加はむしろインスリン遺伝子の発現を抑制した。TGFβ シグナリングのインヒビターでは SB-431542 よりも ALK5 Inhibitor II の方がインスリン遺伝子の発現誘導の効果は高かった。また培養期間による有意な変化はなく、培養期間の延長による効果は確認できなかった。また、驚くべきことに甲状腺ホルモンの添加は上記 5 因子の導入に加え、TGFβ シグナリングの抑制によるインスリン遺伝子の発現上昇の効果を完全に抑え込み、インスリン遺伝子の発現に対し強い抑制効果を示した。

以上より本研究で羊膜上皮細胞に 5 種類の転写因子（MAFA・NKX2-1・NKX6-1・PAX6・PDX1）をレンチウイルスにより導入し、ALK5 Inhibitor II を加えて培養することで、顕著なインスリン遺伝子の発現誘導を行うことが可能であることを示した。今後は本法により誘導した細胞についてインスリン遺伝子以外の膵 β 細胞の機能の土台となっている遺伝子群の発現を調べる。さらには RNA-sequencing 法により網羅的な遺伝子発現プロファイルを調査する。加えて、グルコース依存的なインスリンの分泌とそれに先立って起こる細胞内カルシウム濃度の上昇とオシレーションが見られるかどうかを確認する。

課題番号	２２若７

6　将来獲得を目指す学内外の競争的資金の種類　（※研究計画書に記載したものを記入すること）

戦略的創造研究推進事業（さきがけ）・研究成果最適展開支援プログラム A-STEP

7　本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

氏　　名	申請年度	研 究 種 目	研　究　課　題	採・否

8　学会発表等

要旨集の抜き刷り，発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会，発表会名等	発表テーマ	発表年月
太向勇	第 97 回日本薬理学会年会	膵β細胞におけるコリン作動性カルシウム抑制	2022 年 12 月
太向勇	第 100 回日本生理学会年会	膵 β 細胞におけるアセチルコリン作動性のカルシウムシグナリング抑制	2023 年 3 月
太向勇	第 98 回日本薬理学会年会	膵β細胞における MICU1 によるミトコンドリアカルシウムシグナルの厳密な制御	2023 年 12 月
九鬼直人	第 23 回日本再生医療学会総会	転写因子を用いたヒト羊膜上皮細胞の肝細胞の分化経路の解明	2024 年 3 月
野本正幸	第 23 回日本再生医療学会総会	ヒト羊膜上皮細胞を用いた II 型肺胞上皮細胞への分化誘導	2024 年 3 月

9　著書・雑誌論文

著書，雑誌，抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
Isamu Tiko	Scientific reports	On line （doi: 10.1038/s41598-022-24297-0.）	2022 年 11 月	Nature Publishing Group

１０　本研究課題に関するその他の発表（新聞，一般雑誌掲載等）

課題番号	２２若７

１１　他の研究への発展

本研究により、β細胞への分化誘導にはTGFβ シグナリングの抑制が重要な役割を果たすことを明らかにした。このことは、羊膜上皮細胞を他の内胚葉系の細胞へと分化誘導を行う際に有用な情報となった。また、甲状腺ホルモンの添加がインスリン遺伝子の発現を重度に抑制するという知見を得た。この知見は β 細胞におけるインスリン分泌メカニズムを研究する際の単離膵島の培養方法の改善に有用な情報となった。

１２　その他の成果

本研究を行う中で作製したプラスミドベクターは発表後数週間の内に外国の研究機関から供与の申し出を受けており、世界的に注目されているといえる。

１３　本研究課題による発明届の提出及び知的財産権の出願・取得状況

名　　称	知的財産の種類	発　明　者 （考案者・創作者）	権　利　者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日

※ホームページ等での公開（☑可・□否）いずれかをチェックしてください。
否の場合は，理由書を別途添付のこと。