

主論文の要旨

**Establishment of a rapid and footprint-free protocol
for differentiation of human embryonic stem cells into
pancreatic endocrine cells with synthetic mRNAs
encoding transcription factors**

転写因子をコードした合成 mRNA を用いたヒト ES 細胞から
膵内分泌細胞への迅速でフットプリントフリーな
分化誘導技術の開発

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：榑野 正人 教授)

井田 英臣

【緒言】

胚性幹 (hES) 細胞や人工多能性幹 (hiPS) 細胞から *in vitro* で分化誘導した膵β細胞の移植治療は、1型糖尿病患者などに対して新しい治療法になりうると考えられている。しかし、既報の技術では成熟細胞の作製に月単位の時間を要することが多いこと、遺伝子改変にウイルスベクターなどを用いるためゲノムに変異が入る可能性を除外できないことなどから、実臨床に応用するには困難が予想される。そこで本研究では、合成 mRNA による転写因子の強制発現を併用することで、ヒト多能性幹細胞から成熟膵内分泌細胞への分化誘導期間を短縮するとともに、宿主のゲノムに改変を起こさないフットプリントフリーな技術開発を目標とした。

【方法】

膵β細胞の発生過程は、胚性内胚葉、原始腸管、後方前腸 (PDX1 陽性細胞)、膵内分泌前駆細胞 (NKX6.1 陽性細胞) を経て、膵β細胞に分化する。また、膵内分泌細胞の分化誘導において、PDX1 は発生初期に重要な因子であり、NKX6.1 は膵β細胞への特異的な分化に重要な因子と考えられている。これまで合成 mRNA を用いたリポフェクション法は、通常の発生過程を経ることなく、目的とする細胞へ footprint free で効率的かつ迅速に分化誘導する方法としてその有効性が示されている。そこで、過去に報告されている分化培地に併用して、これらの因子をコードする合成 mRNA を作製し (Fig.1a)、ヒト ES 細胞にリポフェクション法で導入することで、これらの因子を細胞に発現させた。

RPMI1640 で 12 時間培養後、転写因子をコードする mRNA 導入を開始した。12 時間毎に計 5 回遺伝子導入した。初回のみ PDX1、NKX6.1 に加え多能性幹細胞の幹細胞性を担保する POU5F1 の発現を抑制し、細胞分化を促進するため siPOU5F1 を同時に導入し RNA 干渉によって POU5F1 の発現を抑制した。培養開始から 3 日目 (D3) に当たる最終の遺伝子導入から 12 時間後に single cell にした。細胞を低接着プレートに撒き直し、orbital shaker を用いて凝集させ、分化培地で 10 日間培養した (Fig.2a)。

培養開始 3 日目 (D3) に、胚性内胚葉、原始腸管、後方前腸、膵内分泌前駆細胞を示す他マーカーの発現について、no transfection 群と PDX1+NKX6.1 群で qPCR、免疫染色により各々比較検討した。13 日目 (D13) にインスリン (INS)、グルカゴン (GCG)、ソマトスタチン (SST) などの膵内分泌ホルモンの発現を確認した。マーカー遺伝子の発現は、免疫染色法、qPCR 法で確認した。

【結果】

作成した合成 mRNA による効率的な発現について、ポジティブコントロールとして Emerald と mCherry により確認した。Emerald と mCherry とともにほとんどの細胞にその発現を認め、また、共陽性であることを確認した (Fig.1b)。

遺伝子誘導終了翌日 (D3) において、遺伝子導入をせず分化培地のみでの培養群 (no transfection 群) と遺伝子導入した群 (PDX1+NKX6.1 群) で PDX1 と NKX6.1 の発現

を qPCR、免疫染色により比較検討した。qPCR で PDX1 は 147 倍、NKX6.1 は 286 倍と著明な上昇を認めた (Fig.2b)。免疫染色で no transfection 群は PDX1 陽性細胞、NKX6.1 陽性細胞ともに発現を認めなかったが、PDX1+NKX6.1 群では PDX1 陽性細胞は 23%、NKX6.1 陽性細胞は 20%、PDX1/NKX6.1 陽性細胞は 16%で発現を認めた (Fig.2c)。以上より、通常、分化培地のみでの培養では PDX1 陽性細胞に分化誘導するまで 7 日を要する過程を 3 日に短縮し、PDX1/NKX6.1 陽性細胞への分化誘導が可能となった。さらに膵内分泌前駆細胞への分化の方向付けされていることが確認された。

qPCR で、FOXA2(胚性内胚葉)が 2.5 倍、HNF1B(原始腸管)が 2.4 倍、HNF4A(原始腸管)が 16.5 倍、HNF6(後方前腸)が 1.5 倍、NEUROD1(膵内分泌前駆細胞)が 1.7 倍と有意差を認めた (Fig.3a,b,c)。

これらについて免疫染色で確認し、FOXA2 陽性細胞 (13% vs 94%)、HNF1B 陽性細胞 (13.4% vs 28.2%)、HNF4A 陽性細胞 (1.5% vs 14.1%) については有意な発現を認めた (Fig.3d)。以上より、D3 において遺伝子導入により原始腸管への分化誘導が促進されたことが確認された。

3 次元培養により膵β細胞への分化誘導が促進されることが報告されている。そこで、本研究でも遺伝子導入終了翌日 (D3) に、分化誘導した PDX1/NKX6.1 陽性細胞を single cell にした後、orbital shaker を用いて細胞凝集させることで膵β細胞への分化誘導を図った。

PDX1+NKX6.1 群では、D9 より budding 形成などの形態変化を認めた (Fig.4a)。10 日間の分化培地での培養終了後 (D13) に no transfection 群と PDX1+NKX6.1 群で INS、GCG、SST などの膵内分泌ホルモンの発現を qPCR、免疫染色で比較検討した。qPCR で INS、GCG、SST は培養時間とともに上昇傾向を認め、D13 において INS、GCG、SST はどれも約 10 倍の有意な上昇を認めた。

免疫染色で no transfection 群では INS、GCG、SST 陽性細胞は認めなかったが、PDX1+NKX6.1 群では INS 陽性細胞は 5.6%、GCG 陽性細胞は 2.6%、SST 陽性細胞は 3.4%の発現を認めた。また、INS 単独陽性細胞も一部確認された (Fig.4c)。

【考察】

これまで膵β細胞へ分化誘導するまで分化培地のみでの培養では 1 カ月以上を要してきたが、分化培地に加えて膵内分泌細胞への分化に最も重要な転写因子 PDX1 と NKX6.1 をコードする合成 mRNA を多能性幹細胞に導入し、転写因子の強制発現を併用することで、13 日間に短縮することができた。合成 mRNA を用いた分化誘導方法は footprint free で迅速かつ効率的であることが示された。

ほとんどの INS 陽性細胞は GCG や SST も同時に発現する poly hormonal な細胞であったが、一部ではあるが INS 単独陽性細胞も認めた。過去の報告より、INS 単独陽性は成熟した膵β細胞と考えられているが、本研究でも細胞分化誘導開始後 13 日間という非常に短い期間で、ヒト多能性幹細胞から成熟した膵β細胞への分化誘導が可能であった。

また、NKX6.1 は膵β細胞への成熟化を担うと考えられていたが、その重要性に着目し、NKX6.1 をコードした合成 mRNA を用いて遺伝子誘導を行い、最終的に成熟した膵β細胞を認めたことから、NKX6.1 が膵β細胞の成熟化に寄与することが示唆され、NKX6.1 の重要性についても確認することができた。

今回の方法は、宿主ゲノムの遺伝子改変を行わないという点で安全性の面においても大きな利点があり、再生医療の手段として適していると考えられる。

【結論】

分化培地による細胞分化誘導法に、合成 mRNA を用いた転写因子の強制発現を併用することで、誘導開始 13 日目という非常に短い期間で宿主ゲノムの遺伝子改変リスクのないフットプリントフリーな膵内分泌細胞への分化誘導が可能となった。