

Table S1, related to Figure 4.

Gene profiling analysis of cells deprived of amino acid

(A) Cell cycle- and apoptosis- related genes up-regulated under Met deprivation conditions. (B) Enrichment analysis of genes showing > 3-fold change in expression in Met deprivation conditions. (C) Seventeen genes were up-regulated under both Leu and Lys deprivation but not Met deprivation, compared to that under complete conditions.

Table S2, related to Experimental Procedure.

PCR primers used for gene expression analyses.

Table S2. PCR primers used for gene expression analyses

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>AFP</i>	TGCCAACTCAGTGAGGACAA	TCCAACAGGCCTGAGAAATC
<i>ALB</i>	GATGTCTTCCTGGGCATGTT	ACATTTGCTGCCCACTTTTC
<i>DDIT3</i>	AGGAGGAAGAGGAGGAAGAC	TGGGAAAGGTGGGTAGTGTG
<i>DNMT3B</i>	ACTGGATTACACTCCAGGAACCGT	AACCGTGAAGCACGAGGGGAATA
<i>GAPDH</i>	CGAGATCCCTCCAAAATCAA	CATGAGTCCTTCCACGATACCAA
<i>MAP2</i>	GACATGCAAGGCACAGAAGA	TTTTCCCTCATGGGAGTCAG
<i>MAT2A</i>	CCACGAGGCGTTCATCGAGG	AAGTCTTGTAGTCAAAACCT
<i>MAT2B</i>	TGGGGAGCACTTGAAAGAG	CTTAGCGGCAACATGGG
<i>NANOG</i>	AAAGAATCTTCACCTATGCC	GAAGGAAGAGGAGAGACAGT
<i>OCT3/4</i>	GTATTCAGCCAAACGACCATC	CTGGTTCGCTTTCTCTTTTCG
<i>PAX6</i>	GTCCATCTTTGCTTGGGAAA	TAGCCAGGTTGCGAAGAACT
<i>SMS</i>	TGAAAGTGTTGAAACAGGATGG	AGCTGTTCTTCATAGAGCGACA

AFP, alpha-fetoprotein; *ALB*, albumin; *DDIT3*, DNA damage-inducible transcript 3; *DNMT3B*, DNA methyltransferase 3B; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *MAP2*, microtubule-associated protein 2; *MAT*, methionine adenosyltransferase; *SMS*, spermine synthase

Table S3, related to Experimental Procedure.

Antibodies used for immunocytochemistry and western blot analyses

Table S3. Antibodies used for immunocytochemistry and western blot analyses

Name	Supplier	Cat. #
<i>Immunocytochemistry</i>		
rabbit anti-AFP	Dako, Glostrup, Denmark	A0008
mouse anti-OCT3/4	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA	sc-5279
rabbit anti-OCT3/4	Cell Signaling Technology (CST), Beverly, MA	2750S
goat anti-SOX17	R&D Systems, Minneapolis, MN	AF1924
goat anti-T	R&D Systems	AF2085
mouse anti-pH3	Millipore Corporation, Billerica, MA	05-806
<i>Western blot analysis</i>		
rabbit anti-GAPDH	CST	2118
mouse anti-H3	Wako	MABI0301
mouse anti-H3K4me3	Wako	MABI0304
mouse anti-H3K9me3	Wako	MABI0308
mouse anti-H3K27me3	Wako	MABI0323
mouse anti-H3K36me3	Wako	MABI0333
rabbit anti-NANOG	Reprocell	RCAB0003P
rabbit anti-P38	CST	9212P
rabbit anti-Phospho-P38	CST	4511P
rabbit anti-p53	CST	9282

Supplemental Experimental Procedures

Definitive endoderm and hepatic differentiation of hES and hiPS cells

Differentiation was performed as described (Shiraki et al., 2008; Shiraki et al., 2011). In brief, ES/iPS cells were plated onto mitomycin C-treated M15 at $3.5 \times 10^4/\text{cm}^2$, and switched to differentiation media the next day. For definitive endoderm differentiation, RPMI 1640 (Invitrogen, San Diego, CA) supplemented with 100 ng/mL Activin (R&D systems, Minneapolis, MN), 2% B27 (Invitrogen) was used. For methionine deprivation, control complete RPMI 1640 was substituted with the methionine (Met) deprived-RPMI (CSTI). At differentiation day (D)10, cells were switched to hepatic differentiation medium, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 1 μM dexamethazone (Sigma), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ human recombinant hepatocyte growth factor (Peprotech, Rocky Hill, NJ), 10% Knockout Serum Replacement (KSR, Invitrogen).

For feeder-free endoderm differentiation, ES/iPS cells were plated onto fibronectin-coated plate at 1.6×10^5 cells/ cm^2 , and switched to differentiation media the next day. RPMI 1640 supplemented with 100 ng/mL Activin, 2% B27 was used. For Met deprivation, cells were culture using Met deprived-maintenance media (CSTI) for 10 hr, and then media was switched to differentiation medium.

Mesoderm and ectoderm differentiation

ES/iPS cells were plated onto fibronectin-coated plates at 1.6×10^5 cells/ cm^2 , and switched to differentiation media the next day. For mesoderm differentiation, Stemline II serum-free medium (Sigma) supplemented with 50 ng/mL BMP4 (Peprotech) and

ITS (Invitrogen) was used (Niwa et al., 2011). For ectoderm differentiation, RPMI1640 (Invitrogen) supplemented with 10 μ M SB431542 (Merck), 0.2 μ M Dorsomorphin (sigma), 1%N2 (Invitrogen), 2% B27 (Invitrogen) was used (Chambers et al., 2009). For Met deprivation, cells were cultured using Met deprived-maintenance media (CSTI) for 10 hrs, and then media was switched to differentiation medium.

Transfections with siRNA

Prior to transfection, the khES3 cells were incubated with ROCK inhibitor Y-27632 (10 μ M) for 4 hour and dissociated with TrypLE (Invitrogen). To prepare siRNA/lipid solutions, 50 pmol of non-silencing siRNA (sc37007, Santa Cruz), p53 KD siRNA (sc29435, Santa Cruz), MAT2A (#4144, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA), MAT2B (#27430, Thermo Fisher Scientific Inc.) or SMS (#6611, Thermo Fisher Scientific Inc.) were diluted in 100 μ l of medium. In a separate tube, 6 μ l of Dharmafect1 (Dharmacon, Chicago, USA) was diluted in 100 μ l of medium. The solution of the two tubes were mixed and incubated at room temperature for 30 mins. The resulting 200 μ l of siRNA/lipid solution in medium was used to resuspend the cell pelleted containing 1.0×10^5 cells, and suspension incubated at room temperature for 10 min. After incubation, 800 μ l of medium containing ROCK inhibitor was added and the suspension transferred into a 24-well plate, followed by culture for 24 hr. Cells were transfected again at 24 hours.

Supplemental Reference

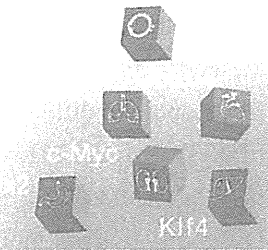
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 27, 275-280.
- Niwa, A., Heike, T., Umeda, K., Oshima, K., Kato, I., Sakai, H., Suemori, H., Nakahata, T., and Saito, M.K. (2011). A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS One* 6, e22261.
- Shiraki, N., Umeda, K., Sakashita, N., Takeya, M., Kume, K., and Kume, S. (2008). Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages. *Genes Cells* 13, 731-746.
- Shiraki, N., Yamazoe, T., Qin, Z., Ohgomori, K., Mochitate, K., Kume, K., and Kume, S. (2011). Efficient differentiation of embryonic stem cells into hepatic cells in vitro using a feeder-free basement membrane substratum. *PLoS One* 6, e24228.

ES/iPS 細胞を用いた 内胚葉細胞(膵, 肝, 小腸)への分化誘導

Pancreatic, hepatic and intestinal differentiation of ES/iPS cells

白木伸明 桑 昭苑 Nobuaki SHIRAKI and Shoen KUME

熊本大学発生医学研究所幹細胞部門多能性幹細胞分野



◎消化器官である膵・肝・小腸は内胚葉由来の臓器であり, ES 細胞 (embryonic stem cell) および iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell) からの分化誘導技術の開発は再生医療分野において非常に注目されている。さらに, 医薬品安全性および毒性試験の材料としてヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞を用いる試みもすでにはじまっている。著者らはそれぞれの組織への分化に適した培養基材と培養液を組み合わせることで, ES/iPS 細胞から膵・肝・小腸への分化誘導方法を構築してきた。本稿では, 著者らが研究を展開してきた内胚葉組織への分化誘導について現状を概説する。各臓器への分化に関して分化誘導のアプローチの違いに分けて説明する。具体的には支持細胞を利用した分化誘導, 低分子化合物スクリーニング, ゼノフリー培養, メチオニン除去培地を用いた分化促進, 目的細胞の純化, 中間細胞の維持および増幅について述べる。

Keywords M15 細胞, 低分子化合物, ゼノフリー培養, メチオニン除去

消化管組織の再生医療において, ヒト多能性幹細胞に多くの期待がなされている。膵においては糖尿病患者への根治療法として膵移植, あるいは膵島移植が有効であり, 移植後のかなり早い時期からインスリン治療から離脱できることや移植前に比べ血糖のコントロールが容易になる利点がある。しかし, ドナー不足という大きな問題点があるために, 移植細胞を得る方法としてヒト ES/iPS 細胞からの膵β細胞誘導が注目されている。肝は薬物代謝の中心的な臓器であり, 十分な機能を有する肝細胞が分化誘導できれば, 薬物動態試験および毒性試験などに利用することで効率的な創薬研究が可能となる。小腸は食物や薬物を吸収・代謝する重要な組織である。ヒト ES/iPS 細胞由来の小腸上皮細胞は発生研究や薬物動態研究において有用であり, 重度の炎症性腸疾患などを対象とした再生医療の材料としても期待される。

本稿では, 内胚葉由来臓器である膵・肝・小腸への分化誘導について, これまでの研究の推移および著者らが構築してきた技術について紹介する。

胚性幹細胞から膵・肝・小腸へ

ヒト ES/iPS 細胞からの消化管組織への分化誘導については, 2005 年に D' Amour らにより報告された高濃度アクチビン添加による胚性内胚葉の

サイトメ1

胚性内胚葉への分化

膵・肝・小腸は胚性内胚葉由来の臓器であるが, ES/iPS 細胞からは胚性内胚葉のほかにも将来, 胚体外組織を形成する胚体外内胚葉が分化してくる(図1)。この胚体外内胚葉は多くの胚性内胚葉マーカーを発現しており, ES/iPS 細胞から胚性内胚葉を介した消化管分化を行おうとしても, はじめにできた内胚葉が胚性内胚葉なのか胚体外内胚葉なのかを区別することが困難な時期が続いた。この問題は 2005 年に D' Amour らによりヒト ES 細胞から胚性内胚葉への効率的な分化誘導方法および胚性内胚葉特異的マーカーとして Cxcr4 が見出されて解決した。

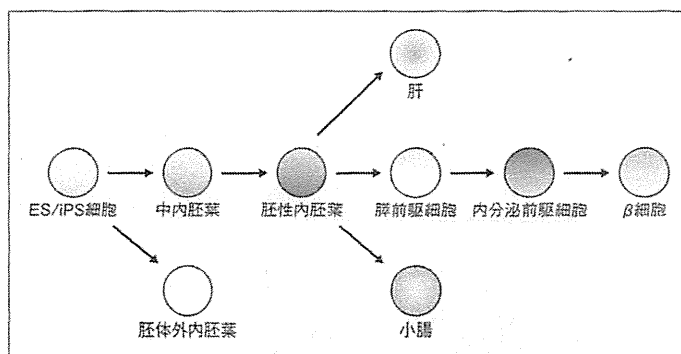


図 1 膵・肝・小腸の発生細胞系譜

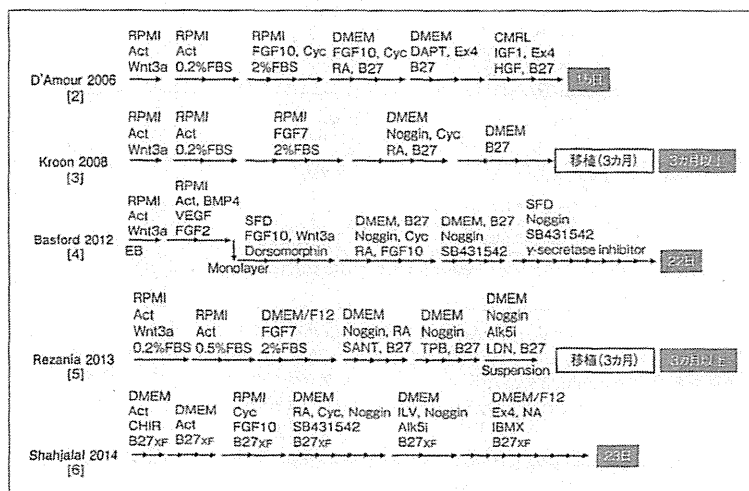


図 2 ヒトES/iPS細胞から膵への分化誘導法

Act : Activin, Cyc : Cyclopamine, RA : Retinoic acid, IGF : Insulin-like growth factors, Ex4 : exendin-4, NA : Nicotinamide, Alk5i : Alk5 インヒビター, ILV : Indolactam V.

効率的な分化誘導方法¹⁾をもとにさまざまな分化誘導方法が開発されてきた。図2~4に膵・肝・小腸への分化に関するおもなプロトコルを示す。膵に関しては肝・腸に先行して研究が進み、2006年にはヒトES細胞から胚性内胚葉を介した膵β細胞への分化誘導方法が報告された²⁾。しかし、得られた膵β細胞は成熟しておらず糖濃度に応じたインスリン分泌はみられなかった。より成熟した細胞を得るために *in vivo* 環境の利用が試

みられた結果、ヒトES細胞由来の内分泌前駆細胞をマウス体内に移植すると、3カ月後には糖濃度に依存してインスリンを分泌する成熟した膵β細胞へと分化することが示された³⁾。図2にはこれまで報告されているヒトES細胞から膵β細胞への分化誘導方法について模式的にまとめたが、2006年の方法を基本として、さまざまな改良がなされてきたことがわかる²⁻⁶⁾。

肝に関しても内胚葉分化誘導後にさまざまな液

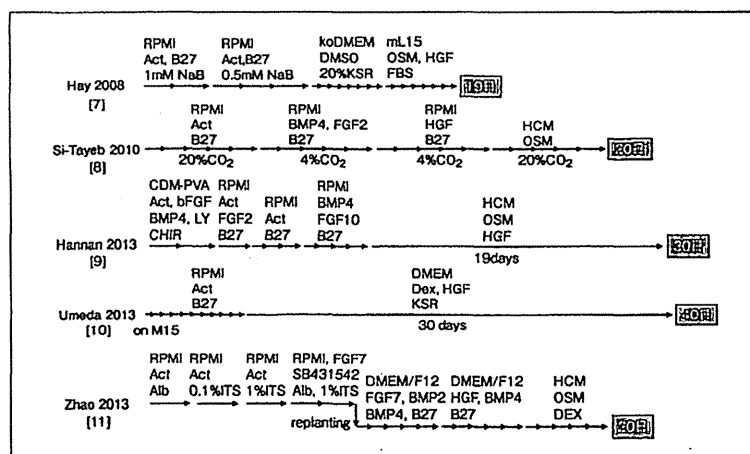


図3 ヒトES/iPS細胞から肝への分化誘導法

NaB : sodium butyrate, OsM : Oncostatin M, HCM : Hepatocyte culture medium, Alb : Albumin fraction V, ITS : Insulin-Transferrin-Selenium, CDM-PVA : Conditioned defined medium-polyvinyl alcohol, LY : LY294002.

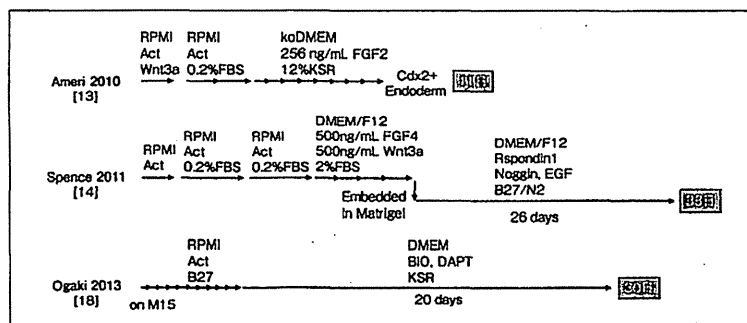


図4 ヒトES/iPS細胞から小腸への分化誘導法

性因子を添加することで分化が試みられている⁷⁻¹¹⁾(図3)。さらに、*in vivo* 環境における成熟化も研究されており、谷口らのグループはヒトiPS細胞由来肝前駆細胞・血管内皮細胞・間葉系幹細胞を混ぜてマウス頭部へ移植することにより成熟した肝細胞を作製することに成功した¹²⁾。

小腸に関しては2009年に胚性内胚葉からCdx2陽性初期小腸上皮細胞への分化誘導が報告され¹³⁾、2011年にはSpenceらが成熟した小腸細胞への分化を報告した(図4)。彼らはCdx2陽性小腸上皮細胞を分化誘導し、それをすでに確立され

ていたEGF, Noggin, R-spondin 1を含んだ無血清培地による腸管上皮幹細胞培養方法(オルガノイド培養)により長期間培養した¹⁴⁾。小腸への分化誘導研究は脾および肝に比べて後れをとっていたものの、成人の腸管幹細胞に関しては上記のオルガノイド培養のように解析技術が非常に進んでいるため、今後は分化誘導研究が加速すると期待される。

上記のように、内胚葉組織についてさまざまな分化誘導方法が報告されているが、ヒトES/iPS細胞の細胞株間には分化の指向性において大きな

差が存在することが明らかとなっている。そのため消化管組織への分化誘導研究を行う場合はまず利用する細胞株の内胚葉分化指向性を評価すべきである。著者らは内胚葉マーカーである Cerberus1 分泌量がヒト iPS 細胞由来胚性内胚葉の割合と相関することを見出し、培養上清のみで内胚葉の分化状態を評価することが可能である ELISA を作成した¹⁵⁾。本方法を利用することで内胚葉への分化指向性を簡便に評価することで可能となり、分化細胞を大量に調製する際の精度管理としても利用できる。

● 支持細胞を用いた膵・肝・小腸への分化誘導

正常発生において内胚葉は近接する中胚葉および外胚葉からの分化シグナルを受けて前後軸に沿った領域化が決定される。そこで著者らは、中胚葉由来の培養細胞株を誘導シグナル源として利用する内胚葉分化方法の構築を試みた。検討の結果、マウス胎児腎由来培養細胞株 M15 細胞に胚性内胚葉への分化誘導活性を見出した。さらに、M15 細胞とアクチビンおよび Fibroblast growth factors (FGF) の添加を組み合わせることで ES 細胞から効率よく内胚葉および膵前駆細胞を分化誘導することに成功した¹⁶⁾。続いて肝分化に最適な培養液の組成を探索した結果、アクチビンと FGF の代わりに Hepatocyte growth factor (HGF)、デキサメタゾン (Dex) を添加することで効率よく肝細胞を誘導できた^{10,17)}。小腸に関しては、内胚葉分化誘導後に WNT シグナルを活性化する化合物 BIO と Notch シグナルを抑制する化合物 DAPT を加えることにより約 90% の細胞が Cdx2 陽性の小腸上皮細胞へと分化した¹⁸⁾。この M15 細胞を用いた膵・肝・小腸への分化誘導方法の構築により、同一の足場環境においても添加する液性因子の変更により目的の細胞系譜への分化が可能であることを明らかにした。

● 低分子化合物スクリーニング

ES/iPS 細胞の培養には正常発生における分化誘導シグナルであるアクチビンなどの分泌蛋白質が多く利用されている(図2~4)。現在、これらに加えて低分子化合物の利用が検討されている。膵分化に関しては大規模な化合物スクリーニングの結果、ヒト ES 細胞由来の内胚葉から膵前駆細胞を効率よく分化誘導できる化合物が見出されている¹⁹⁾。著者らは、マウス ES 細胞を用いて膵前駆細胞から膵β細胞への分化を促進する低分子化合物を探索した。検討の結果、小胞型モノアミントランスポーター VMAT2 の阻害剤が膵前駆細胞から内分泌前駆細胞への分化を促進する効果があり、cAMP 添加により膵β細胞の成熟化が促進され、糖濃度に応じたインスリン分泌能を獲得することを見出した。さらに、VMAT2 阻害剤および cAMP を併用して分化誘導した膵β細胞を移植することにより、糖尿病モデルマウスの高血糖を正常化できることも確認した²⁰⁾。

肝に関しては、ヒト初代培養肝細胞に約 12,500 種類の化合物を添加してアルブミンの分泌を促進する化合物が探索された²¹⁾。見出された化合物はヒト iPS 細胞由来肝細胞の成熟化にも効果があり、多くの薬物を代謝する CYP3A4 の活性を約 45 倍増加したと報告した。さらに、彼らは初代培養肝細胞の機能を維持したまま、増殖を促進する化合物も同時にみつけており、化合物スクリーニングが分化誘導方法の構築において強力なツールであることを示した。

● 異種成分不含(ゼノフリー)培養システムの構築

臨床応用を見据えた研究では動物由来の病原体や患者の免疫拒絶反応のリスクを回避するためにゼノフリーの培養システムの構築が望まれる。ヒト ES/iPS 細胞の未分化維持培養に関しては支持細胞の替りに細胞外マトリックスを利用する方法が開発され、動物成分を含まない培養液を用いた

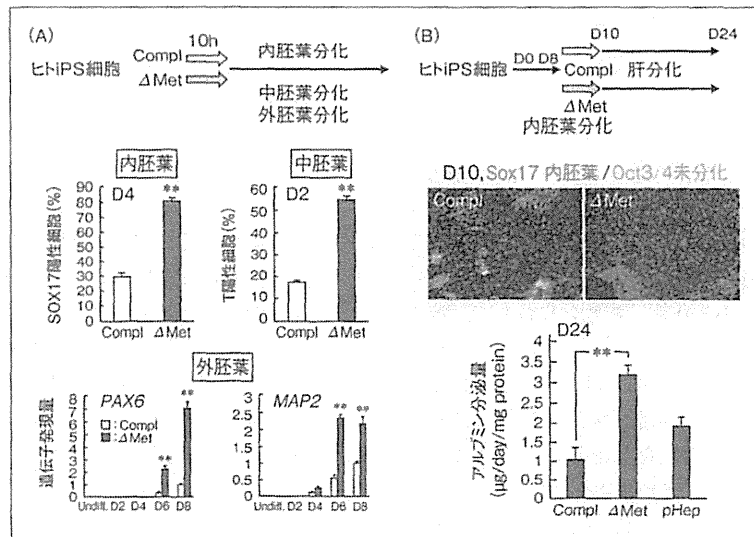


図 5 メチオニン除去培地を利用した分化誘導
 Compl: 完全培地, ΔMet: メチオニン除去培地, undiff: 未分化細胞, pHep: 初代培養肝細胞.
 **: $p < 0.01$.

培養方法が検討されている。著者らは、ヒト iPS 細胞から膵β細胞への分化誘導方法のゼノフリー化を試みた。足場素材としては、ヒト ES/iPS 細胞

の未分化維持培養において実績のあるゼノフリー合成基質 Synthemax (Corning 社) を利用した。培養液については、通常の膵分化誘導で栄養因子として利用している B27 の替りにゼノフリー-B27 (B27XF) を用いた。構築したゼノフリー分化誘導方法で得られたヒト iPS 細胞由来の膵β細胞は糖濃度に応答したインスリン分泌を示し、異種成分の指標である非ヒト型シアル酸の量が顕著に減少することを確認した⁶⁾。著者らが用いた Synthemax やゼノフリー-B27 については他の組織の培養にも利用可能であり、肝・小腸への分化誘導方法のゼノフリー化にも応用可能であると考えられる。

ウイットメモ

代謝の違いに着目した分化制御

ヒト iPS 細胞と分化した心筋細胞の糖代謝の違いを利用したグルコース不含培地による心筋細胞の選別が報告された³²⁾。著者らも未分化細胞のメチオニン代謝について研究を進めていた際に、メチオニン除去培地を分化誘導に用いることができないかと考えた²⁴⁾。本文にも記載したが、未分化過程におけるメチオニン除去処理による三胚葉への分化促進は細胞の複製期間短縮および分化効率化につながり、ヒト ES/iPS 細胞を利用した創薬研究および再生医療に寄与できる。また、分化過程における未分化細胞の除去は分化誘導への利用のみならず、再生医療において残存した未分化細胞に由来するテラトーマが発生するリスクの低減に大きく寄与することが期待できる。

● メチオニン除去培地による分化促進

未分化細胞から胚性内胚葉への分化は細胞周期により制御されており、CDK4/6 阻害薬の利用により低濃度アクチビンによる内胚葉分化が可能であることが報告された²²⁾。そこで著者らは、未分化細胞の状態を変化させることによりその後の内

胚葉分化が促進できるのではないかと考え、培養液に含まれるアミノ酸に着目した。アミノ酸代謝と幹細胞との関係については2009年にマウスES細胞の生存にスレオニンが必須であることが明らかにされたが²³⁾、ヒトES/iPS細胞におけるアミノ酸代謝については不明であった。著者らは、未分化なヒトES/iPS細胞においては必須アミノ酸のひとつであるメチオニンの代謝が非常に盛んであることを明らかにした。未分化細胞をメチオニン除去培地で培養すると、速やかに細胞内メチオニン代謝が止まり細胞周期停止、未分化マーカーであるNANOGの発現低下が引き起こされた。著者らはこの増殖性の低下およびNANOG発現低下を分化促進に利用できるのではないかと考えた。そこで、ヒトiPS細胞を未分化状態においてメチオニン除去培地で培養した後に内胚葉、中胚葉、外胚葉への選択的な分化誘導を行った。その結果、それぞれの胚葉への分化の効率は約3倍に上昇した(図5-A)²⁴⁾。

● 細胞の純化

ヒトES/iPS細胞は各種細胞に分化させることが可能であるが、分化効率は100%ではなく目的以外の細胞が残存することがある。そのため、目的の細胞のみを選別するためにflow cytometryが利用されている。ヒトES細胞由来の膵細胞に関してはCD200とCD142に対する抗体を利用することで内分泌前駆細胞を分取できることが報告されている²⁵⁾。肝については肝細胞特異的に発現するアシアロ糖蛋白受容体の発現を指標としてヒトES細胞から分化誘導した肝細胞を濃縮可能であることが報告されている²⁶⁾。

著者らは、未分化なヒトES/iPS細胞と比べ分化した内胚葉細胞はメチオニンの要求性が低いという性質を利用した新規な純化方法を開発した²⁴⁾。ヒトiPS細胞から内胚葉への分化誘導過程において、メチオニン除去培地で2日間培養することにより残存する未分化な細胞に対し特異的に細胞死を誘導することができ、後に肝へと効率的

に分化させることに成功した(図5-B)。本方法はさまざまなヒトES/iPS細胞株に利用でき、内胚葉への分化指向性が悪い細胞株においても効率的な分化が可能となった。

● 中間細胞の維持および増幅

再生医療および創薬研究にヒトES/iPS細胞由来細胞を利用する場合には、高品質で均質な細胞を大量に準備する必要がある。そのため、培養期間の短縮や目的細胞の大量調製を目的として前駆細胞の維持および増幅培養が試みされている。ChenらはヒトES細胞由来内胚葉をBone morphogenetic protein(BMP)4, Epidermal growth factor(EGF), FGF2, vascular endothelial growth factor(VEGF)を含む培地で維持培養し、増幅が可能であることを示した²⁷⁾。また、Hannanらは、分化がより進んだ前腸細胞の状態においてもアクチビン, BMP4, FGF2, EGF, HGFを含んだ培地で培養することで維持および増幅が可能であると報告した²⁸⁾。肝に関しても肝前駆細胞の状態での維持培養が複数のグループにより報告されている²⁹⁻³¹⁾。今後は増幅した中間細胞から医療および創薬に利用可能なレベルの成熟した膵β細胞, 肝, 小腸細胞を分化誘導する技術の開発が求められている。

● おわりに

本稿では内胚葉組織である膵・肝・小腸への分化誘導の現状と、著者らが開発してきた分化誘導技術について解説した。ES/iPS細胞を用いた再生医療の実現のためには、より成熟した細胞の調製や大量培養技術の開発などが課題である。今後、上記問題が解決され、ES/iPS細胞由来細胞が臨床応用されることを期待する。

文献

- 1) D'Amour, K. A. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **23**: 1534-1541, 2005.

- 2) D' Amour, K. A. et al. : *Nat. Biotechnol.*, **24** : 1392-1401, 2006.
- 3) Kroon, E. et al. : *Nat. Biotechnol.*, **26** : 443-452, 2008.
- 4) Basford, C. L. et al. : *Diabetologia*, **55** : 358-371, 2012.
- 5) Rezania, A. et al. : *Stem Cells*, **31** : 2432-2442, 2013.
- 6) Shahjalal, H. M. et al. : *J. Mol. Cell. Biol.*, 2014.
- 7) Hay, D. C. et al. : *Stem Cells*, **26** : 894-902, 2008.
- 8) Si-Tayeb, K. et al. : *Hepatology*, **51** : 297-305, 2010.
- 9) Hannan, N. R. et al. : *Nat. Protoc.*, **8** : 430-437, 2013.
- 10) Umeda, K. et al. : *Stem Cell Res.*, **10** : 179-194, 2013.
- 11) Zhao, D. et al. : *Cell Res.*, **23** : 157-161, 2013.
- 12) Takebe, T. et al. : *Nature*, **499** : 481-484, 2013.
- 13) Ameri, J. et al. : *Stem Cells*, **28** : 45-56, 2010.
- 14) Spence, J. R. et al. : *Nature*, **470** : 105-109, 2011.
- 15) Iwashita, H. et al. : *PLoS One*, **8** : e64291, 2013.
- 16) Shiraki, N. et al. : *Stem Cells*, **26** : 874-885, 2008.
- 17) Shiraki, N. et al. : *Genes Cells*, **13** : 731-746, 2008.
- 18) Ogaki, S. et al. : *Stem Cells*, **31** : 1086-1096, 2013.
- 19) Chen, S. et al. : *Nat. Chem. Biol.*, **5** : 258-265, 2009.
- 20) Sakano, D. et al. : *Nat. Chem. Biol.*, **10** : 141-148, 2014.
- 21) Shan, J. et al. : *Nat. Chem. Biol.*, **9** : 514-520, 2013.
- 22) Pauklin, S. et al. : *Cell*, **155** : 135-147, 2013.
- 23) Wang, J. et al. : *Science*, **325** : 435-439, 2009.
- 24) Shiraki, N. et al. : *Cell Metab.*, **19** : 780-794, 2014.
- 25) Kelly, O. G. et al. : *Nat. Biotechnol.*, **29** : 750-756, 2011.
- 26) Basma, H. et al. : *Gastroenterology*, **136** : 990-999, 2009.
- 27) Cheng, X. et al. : *Cell Stem Cell*, **10** : 371-384, 2012.
- 28) Hannan, N. R. et al. : *Stem Cell Reports*, **1** : 293-306, 2013.
- 29) Zhao, D. et al. : *PLoS One*, **4** : e6468, 2009.
- 30) Takayama, K. et al. : *Stem Cell Reports*, **1** : 322-335, 2013.
- 31) Yanagida, A. et al. : *PLoS One*, **8** : e67541, 2013.
- 32) Toyama, S. et al. : *Cell Stem Cell*, **12** : 127-137, 2013.

* * *

特集 器官の発生と再生の基礎

ES 細胞・iPS 細胞を用いた発生分化の研究と再生医学への応用

坂野 大介 桑 昭 苑

現在、再生医療を目的に様々な臓器の細胞を分化誘導する研究が進められている。幹細胞とは造血幹細胞や間葉系幹細胞などの体性幹細胞、ヒトの受精卵の胚から作る embryonic stem cell (ES 細胞)、ヒトの皮膚などの細胞をリプログラミングして作製する induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) が含まれる。現在では多くの臓器の細胞を iPS 細胞から分化誘導する研究が進められている。これらの再生医療に向けた研究は発生学的視点からみても重要である。分化誘導過程で発生を模倣しながら分化することで生体内と等価な細胞が誘導できると考えられているからである。本稿では細胞分化を進める手法の構築について、膵臓の発生生物学の見地から述べたい。

I. 再生医学での多能性幹細胞研究の役割—膵β細胞を例に

ES 細胞・iPS 細胞は多能性幹細胞と呼ばれる。多能性幹細胞からの分化誘導研究は再生医療への応用が期待されている。最近では臓器ごとの研究の進行度に合わせて臨床研究の目標となる時期が示されている(表)。その中の一つである膵臓への分化誘導研究は、糖尿病治療に貢献できる

膵臓は食物を消化するための各種消化酵素や、血中の糖濃度を調整するための各種ホルモンを分泌する重要な臓器である。糖尿病は主に遺伝因子と環境因子が原因とされている。そして、膵臓のβ細胞から分泌されるインスリンの量的な不足

表 iPS 細胞の臨床研究に向けた目標開始時期

分化させる細胞種	治療する疾患	臨床研究の目標開始時期
網膜色素上皮細胞	加齢黄斑変性	1年以内
血小板	血小板減少症	2年後
角膜	角膜混濁	3年後
心筋	心筋梗塞	2-4年後
神経細胞	パーキンソン病	2-4年後
中枢神経幹細胞	脊髄損傷	4年以内
肝細胞	肝不全	4年後以降
膵β細胞	糖尿病	4年後以降
造血幹細胞	白血病, 再生不良性貧血	6年後以降
骨, 軟骨	骨折, 関節症	6年後以降
骨格筋	筋ジストロフィー	6年後以降
腎臓細胞	腎不全	9年後以降

(文部科学省発表の資料より引用)

または機能低下によって発症する。治療法としては、運動療法、食事療法、経口血糖下降薬、インスリン注射などが行われている。重篤な糖尿病患者に対しては、細胞移植療法も実施されている。方法では、脳死患者あるいは近年では親族あるいは夫婦間での生体膵を用いた膵臓β細胞を移植している。しかし、根治治療とはならず、再度の移植が必要であるためドナー不足が問題になっている。これを克服する方法の一つとして、ES 細胞や iPS 細胞から機能的な膵β細胞を分化誘導して移植する治療法の確立が望まれている。

II. 膵前駆細胞への分化と前腸の領域化

内胚葉は中胚葉と共に原条(primitive streak)

Differentiation of ES/iPS Cells for the application to regenerative medicine

Sakano Daisuke, Kume Shoen: 熊本大学 発生医学研究所多能性幹細胞分野 (〒 860-0811 熊本県熊本市中央区本荘 2-2-1)

0370-9531 06 ¥500 論文 JCOPY

に由来し、中胚葉および内胚葉はそれぞれ原条の後方と前方に位置する細胞に由来する。膵臓、肺、甲状腺、肝臓、食道、および胃は内胚葉由来の臓器であり、前腸から領域化によって派生する。マウス ES 細胞を用いた研究によると、ActivinA および BMP4 を処理することにより原条を誘導することが可能である¹¹。このとき、ActivinA は後に内胚葉へと分化する前部原条への分化を誘導することがアフリカツメガエルの外植体検定で示されている。ActivinA は用量依存的に中胚葉および内胚葉の両方を誘導し、ActivinA が高濃度であれば背側中胚葉および内胚葉が、低濃度であれば腹側中胚葉が誘導されることが明らかにされている²¹。一方で BMP4 は原条の後方が中胚葉へと分化するのを促す。また、Wnt シグナルも原条への分化を誘導することが、ヒトおよびマウスの ES 細胞の研究により知られている³¹。

Wnt3 は原始線条および発達中の中胚葉に発現し、Wnt3 欠失マウスは中胚葉も内胚葉も形成しない⁴¹。一方で先に述べたように初期の内胚葉への運命決定は、とりわけ Wnt3 を必要とするが、一方で Wnt は膵臓内胚葉への分化を阻害する場合がある。事実、正常な発生では Pdx1 を発現する膵臓の前駆細胞に Wnt1 または Wnt5a を強制発現すると前腸領域が変化する。これは胃が後部に伸長することによって膵臓が小さくなるか欠失するのである。

これらの発生学的な知見から現在の ES・iPS 細胞を用いた多くの分化誘導法は第一段階に ActivinA と Wnt3a もしくは PI3K シグナルの阻害剤を用いて胚性内胚葉を誘導している^{3,61}。

胚性内胚葉より先の膵前駆細胞や内分泌細胞への分化過程も細胞内シグナルの連携によって制御されている。膵臓は消化酵素を分泌する外分泌細胞、消化酵素を十二指腸へと導く導管、ホルモンを分泌する内分泌細胞から成る。すべての細胞は Pdx1 陽性細胞から分化する。腹側ならびに背側前腸内胚葉からの膵臓への運命決定は、sonic hedgehog (SHH)⁷¹によって阻害される。SHH の受容体である Patched (Ptc) の発現が抑制されると、膵臓上皮への分化が亢進する。脊索からの ActivinA⁸¹または FGF2⁹¹シグナルは予定膵臓領

域における SHH の発現を抑制する働きを持つ。また、腹側前腸内胚葉から膵臓および肝臓に分化する。この過程では隣接する心臓内胚葉により産生される FGF2 によって少なくとも部分的に決定される¹⁰¹。腹側内胚葉では膵臓への分化が既定の分化系譜であり、FGF2 によって膵臓へ分化が抑制されると肝臓に分化する。一方、低用量の FGF2 は背側前腸内胚葉からの膵臓への分化を促す。このように膵臓を構成する細胞が分化する過程では前腸内胚葉の後部に PDX1 陽性細胞が領域化することが重要である(図 1)。分化誘導研究において、このように内胚葉から膵前駆細胞を誘導する液性因子の研究が行われ、レチノイン酸 (RA)、Shh 阻害剤である cyclopamine に膵前駆細胞の誘導作用があることが明らかにされている¹¹¹。現在では最も効率が良い分化法ではヒト ES 細胞由来の細胞の 90% の PDX1 陽性の PDX1 陽性細胞が誘導されている^{12,131}。

同時に腸管の領域化によってそれぞれの臓器への特異化がなされている。この臓器の特異化に最も重要であるのが特定のマスター転写因子の発現量の前後軸に沿った発現差異である(図 1)¹⁴⁻¹⁷¹。この領域化をコントロールする機構の理解が現在の ES・iPS 細胞を用いた分化誘導手法の基礎をなしている。前腸内胚葉の前部では、肺および甲状腺になる予定領域は、NK2 ホメオボックス 1 (NKX2.1) を発現し、肝臓は造血組織発現ホメオボックス (HHEX1) を発現する領域から発生する。腸内胚葉の後部は中腸および後腸に成長して caudal ファミリー遺伝子 (*CDX1*) および *CDX2* を発現する小腸と大腸になる。

III. 膵前駆細胞から膵内分泌細胞へ

膵前駆細胞が誘導されると、続いて外分泌または内分泌膵臓への運命が決定する。膵臓外分泌細胞への分化には Ptf1a/P48¹⁸¹、内分泌細胞への分化には Ngn3¹⁹¹ の発現が必要である(図 2, 3)。細胞系譜追跡実験から、すべての膵内分泌細胞は Neurogenin3 (Ngn3) 発現細胞に由来すると示されている²⁰¹。Ngn3 は basic helix-loop-helix 型の転写因子であり、Ngn3 遺伝子を欠損すると Isl1, Pax4, Pax6, NeuroD など転写因子の発現が失わ

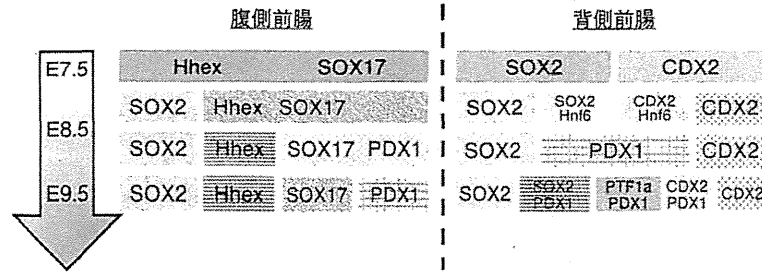


図 1 転写因子の発現による腸管の領域化

れる。この場合、すべての膵臓内分泌細胞が分化しない²⁰⁾。したがってヒトの ES 細胞・iPS 細胞においても、Ngn3 陽性細胞を効率的に分化誘導させるかが重要である。そして、ヒトの ES 細胞・iPS 細胞からの分化誘導方法の確立も発生学的な解析が基礎となっている(図 2)。

膵臓への分化は Notch シグナルにより制御されることが示されている²¹⁾。Notch シグナルによって発現が調節されている転写因子の一つに *Hes1* がある。そして、膵臓への分化に必要な *Ptfla* 遺伝子のプロモーター領域には、*Hes1* によって認識される配列が存在している。*Hes1* の結合により、*Ptfla* の発現は抑制される。*Hes1* 遺伝子のノックアウトマウスでは胃前庭部や十二指腸、胆管に異所性の *Ptfla* が発現する。この *Ptfla* の発現により異所性膵組織(内分泌・外分泌組織の両方を含む組織)が形成される^{22,23)}。また、Dll1、や *Hes1* など Notch シグナルの伝達にかかわる因子の発現が抑制されると *Ngn3* の発現が上昇し、内分泌前駆細胞への分化が促進される。そして、Notch シグナルは fibroblast growth factor (FGF)10 によって阻害されることも示されている。FGF10 ノックアウトマウスでは膵臓の形成不全や膵島の欠失などが起こる²⁴⁾。逆に、FGF10 を過剰発現すると Notch シグナルが抑制され、Pdx1 陽性の膵前駆細胞や *Ngn3* 陽性の内分泌前駆細胞が増加する^{25,26)}。そこで近年のヒト ES 細胞の分化培養手法は FGF10 など Notch シグナル阻害剤を用いている。ほかにも exendin-4 や bone morphogenetic protein (BMP) 阻害剤、プロテインキナーゼ C (PKC) 活性化剤、epidermal growth factor (EGF) を用いることで *Ngn3* 陽性細胞が効率的に分化できる^{11,12)}。

IV. 膵β細胞の分化

Ngn3 陽性の内分泌前駆細胞から成熟化した膵β細胞を誘導することが近年の分化誘導研究の重要な課題となっている。成熟した膵β細胞とは高血糖に反応してインスリンを分泌できる細胞を意味する。内分泌細胞への分化は胚形成の間、細胞種ごとに順番に形成される。E9.5 からα細胞；E10.5 からβ細胞；E14.5 からδ細胞；そして、PP細胞はE18.5から分化する。また、E13.5-14.5日ごろには、膵前駆細胞からごくわずかではあるがインスリン産生細胞に分化する細胞が形成される(図 2)。この細胞は“primary endocrine cells”と呼ばれ、低いレベルでインスリンを生産し、かつグルカゴンも生産する。しかも成熟β細胞のマーカである *Nkx6.1*、*MafA* や *Pdx1* を欠損している。そして、これらの細胞は生後の膵島には存在しない^{27,28)}。“Secondary transition”と呼ばれる過程を経て、*Ngn3* を発現する内分泌前駆細胞から成熟したβ細胞が分化してくる。こちらのインスリン産生細胞は primary endocrine cells と異なり、*Ngn3* によって発現が制御される *NeuroD1*、*Nkx2.2*、*Nkx6.1*、*MafA*、*Pax4* を発現する(図 3)。このような *Ngn3* を介した細胞分化は E15.5 ごろに最も盛んとなり E18 までには完了する^{21,29,30)}。その後、β細胞でのインスリン産生能の上昇やβ細胞の複製による細胞数の増加は生後 2-3 週間をかけて進行する^{31,32)}(図 2)。

さらにマウスではインスリン分泌能が加齢と共に向上することが知られている。最近では加齢と共に膵島内で発現上昇する遺伝子として *urocortin 3 (Ucn3)* が発見された。この遺伝子は今後成

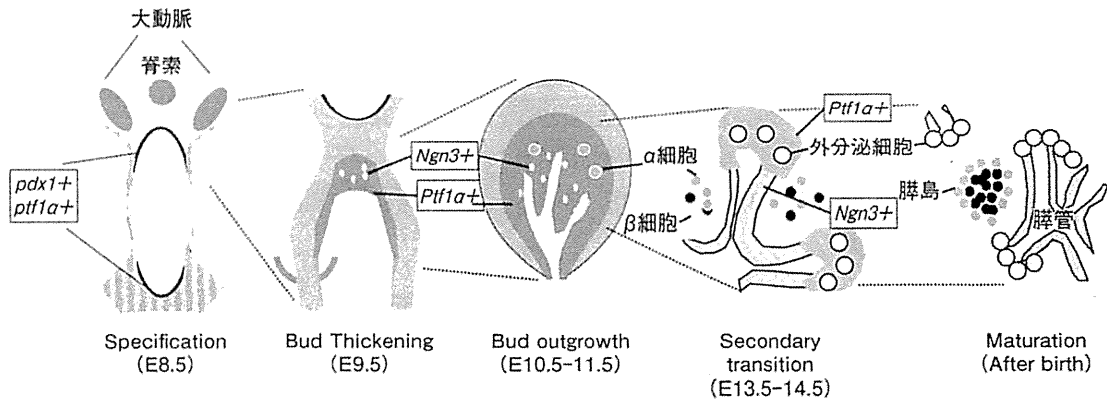


図 2 マウスにおける膵臓の発生過程

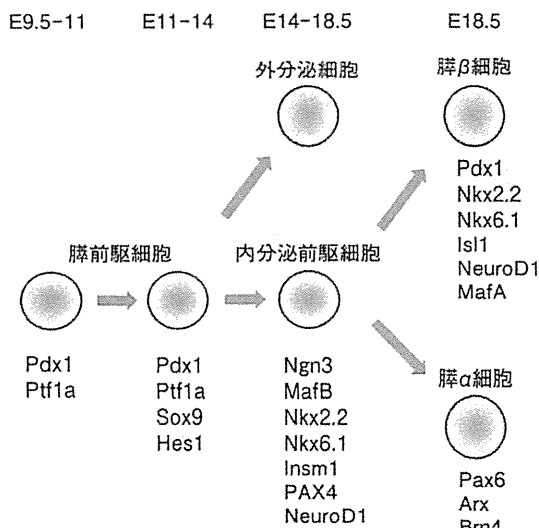


図 3 膵臓の発生過程における細胞分化と主要なマーカー遺伝子

熟した膵β細胞を見分ける一つのマーカーとなるであろう³³⁾。

V. 成長因子から低分子化合物へ

最近では多能性幹細胞の分化に成長因子のみならず化合物を用いたアプローチが試みられている。細胞膜透過性の低分子化合物は成長因子を用いることに比べて低価格で細胞分化を進められ、臨床応用へより近づくことであろう。

大規模な化合物ライブラリーを用いたスクリーニングが2009年以降進められており、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である inducer of defini-

tive endoderm (IDE1) と IDE2 が最初に報告された。これらの化合物はマウス ES 細胞から sex determining region Y-box 17 (Sox17) 陽性の胚体内胚葉への分化を通常の 10% から 70-80% へと効率化できると報告された³⁴⁾ (図 1)。続いて胚性内胚葉から Pdx1 陽性細胞への分化を促進する protein kinase C 活性化剤である indolactam V も報告された³⁵⁾。また、ヒト iPS 由来の膵前駆細胞にフォルスコリン (プロテインキナーゼ C 阻害剤)、デキサメサゾン (糖質コルチコイドのアゴニスト)、TGF-β 阻害剤を添加すると膵前駆細胞からβ細胞への分化が促進され、全体の 10% 程度の細胞がインスリン陽性になった。しかし、誘導されたβ細胞は未熟でグルコースに依存したインスリン分泌能はみられなかった³⁶⁾。

これに対して筆者らは最近、マウス ES 細胞を用いたスクリーニング実験を行った。この研究では前述の先行研究で克服されていない次の二点について検討した。まず、膵前駆細胞まで効率的に分化が可能となったもののβ細胞までの分化効率を改善すること。そして、グルコースに依存したインスリン分泌能を有する膵β細胞を誘導できるかである。

そこで、この研究ではまず膵前駆細胞まで分化させた後、培地に低分子化合物を添加する実験を行った。すると小胞モノアミントランスポーター 2 (VMAT2) 阻害剤であるレセルピンおよびテトラベナジン (TBZ) に膵臓前駆細胞から内分泌前駆細胞への分化促進効果があった。VMAT2 は

ヒトの膵臓ではβ細胞に発現していることが知られている³⁷⁾。VMAT2は細胞質内に存在する小胞内にモノアミンを貯留するため機能する。貯留したモノアミンは開口分泌によって細胞外で何らかのシグナル伝達に関与していると思われる。また、E11.5-12.5のマウス膵原基にVMAT2阻害剤存在下で培養したところ、ES細胞由来の膵前駆細胞の場合と同じく内分泌前駆細胞への分化が促進された。

一方で、われわれのES細胞由来の細胞を用いた実験ではドーパミン、ヒスタミン、セロトニンなどのモノアミンはβ細胞への分化を抑制した。すなわち、モノアミンを介する細胞間のシグナル伝達は膵内分泌細胞の分化に抑制的であることが示唆された。さらにレセルピンやTBZは、細胞透過性cAMP類似体であるdBu-cAMPとの相乗効果によりGSIS細胞を作り出すことができた。これらの細胞の機能評価として、分化した膵β細胞を糖尿病モデルマウスに移植した。すると血糖値が正常なレベルに回復した。今回の研究成果は将来的な多能性幹細胞を用いた再生医療に貢献できる可能性を示した³⁸⁾。

VI. 患者からのiPS細胞の樹立とそれを利用した創薬研究

創薬の観点からみるとヒトES細胞は倫理的な観点などから利用制限がある材料である。それに対してヒトiPS細胞はとても魅力的なツールではないだろうか。疾患モデルのES細胞株が着実に増加しているが、iPS細胞を用いることで任意の疾患の遺伝的原因をより広範囲にスクリーニングすることが可能となる^{39,40)}。

2009年にハーバード大学の研究グループが、1型糖尿病の患者の皮膚細胞からiPS細胞を樹立した。さらに、彼らはそのiPS細胞をインスリン産生細胞に分化誘導できることを示した³⁹⁾。日本でも疾患特異的iPS細胞を患者の体細胞から作製するプロジェクトが進められている。疾患の原因細胞へ分化させることで病態を再現することから、創薬に向けた研究などに活用できる(図4)。

また、2型糖尿病にとってもiPS細胞株の樹立は重要である。現在までに2型糖尿病の原因とな

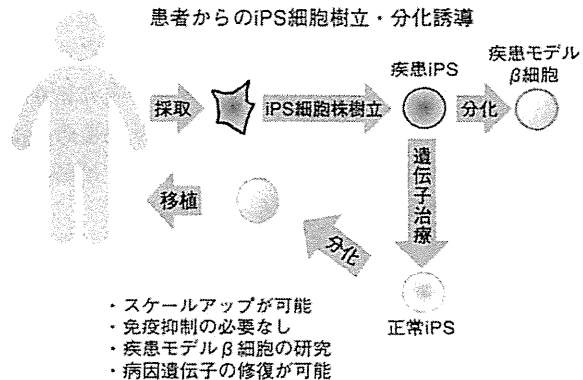


図4 iPS細胞を用いたβ細胞誘導研究の利点

る遺伝子座は50か所以上が明らかにされている。これらの多くがインスリン分泌やインスリン前駆体のプロセッシングに関与している。今後、これらに対する創薬がiPS細胞由来のβ細胞をモデル細胞として用いて行われていくことであろう。

さらに長期的な視点で移植治療に応用可能にするために、たくさんの細胞を分化誘導することが求められる。遺伝的な疾患を修復(治療)したうえで分化誘導し患者に移植することもiPS細胞研究が目指すものの一つである。実際にそのような観点から研究が進んでいる。ヒトの鎌状赤血球症遺伝子を組み込んだモデルマウスの尾からiPS細胞を樹立した研究である。この研究では相同組換えにより原因遺伝子を野生型へと置き換えた。そして、造血幹細胞に分化させた後、モデルマウスに移植すると表現型が正常となった⁴¹⁾。この報告以降、糖尿病治療においても同様の研究が進められ遺伝子修復が現実のものになりつつある(図4)。

おわりに

近年の多能性幹細胞研究が目覚ましく進歩していることは疑う余地もない。今後、われわれの課題を挙げるとすれば次のようなことではなかるうか。現在多くの研究者が取り組んでいるヒトES・iPS細胞を用いた分化研究では主にマウスの発生をもとに研究が進められている。もちろん多くの分化の仕組みは多くの種間で共通のことであろう。一方で動物種間での臓器の構造が異なり、それにつながる発生過程ももちろん異なる。実験動物を用いて研究を進める中でES・iPS細胞で起