

特別講演 I

第49回 日本赤十字社医学会総会

「多能性幹細胞を用いた 糖尿病治療法開発の展望」

京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 教授

かわぐち よしや
川口 義弥

ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞を用いて in vitro で機能的膵島細胞を作成し、糖尿病患者に移植するという夢はまだ実現されていない。膵島細胞に限らず、多能性幹細胞から目的の細胞を作り出して再生医療に役立てようという考え方は、「発生現象を培養皿上で再現する」という根本理念に基づいている(図1)。

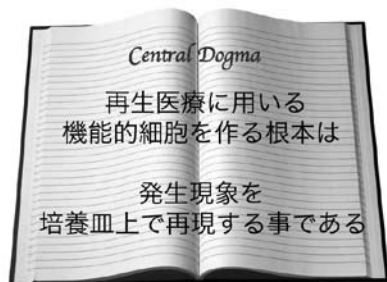


図1

つまり、受精卵から臓器が形成される機構を可能な限り丸ごと(或は一部のみを)再現してヒト ES/iPS 細胞から臓器を作るという戦略である。本稿を進める前に、まず指摘しておくべき点は、この根本思想自体が孕む矛盾である。第一に、受精卵由来の ES 細胞を材料とする場合だけでなく、自然階界には存在しない iPS 細胞を源としてでも機能的細胞/組織/臓器の作製を目指そうとしている点。第二に、ここで言う“発生現象”を我々はどこまで正確に理解しているのか?という点である。確かに遺伝子ノックアウトマウス作製技術などを含む発生学的解析技術の進歩は、我々の発生現象に対する理解を大きく深めて来た。しかしながら、未だマウス発生学の全容が解明されたとは言えず、ましてやマウス発生学の知見がそのままヒト臓器発生機構に当て嵌

まるという保証はどこにもない。再生医療の実現を目指す私たち研究者は、実に頼りないマップやコンパスを頼りに暗黒大陸を切り開こうとしている訳である。こうした場合、あらゆる情報を収集して進むべきルートを決定せざるを得ないが、最も信頼できるのは自分自身の着想と実験データに基づいて詳細な書き込みを加えた“手書きの地図”となる。日々の研究活動は、そのような作業の連続でゴールを目指す事に他ならない。

膵島細胞作製に向けたこれまでの研究も、マウス発生学で示された細胞系譜を再現する方針で推進されてきた。図2に多くの研究者

ヒトES/iPS 細胞を用いたインスリン陽性細胞誘導



図2

がとって来たインスリン陽性細胞誘導戦略を示す。本領域の研究の歴史は、多能性幹細胞から内胚葉上皮へ、更に膵前駆細胞を経てインスリン産生細胞へという多段階分化の各ステップにおいて、その誘導効率の改善を図る事によって最終的に「より高いインスリン産生細胞誘導効率」を目指すものであった。各段階での分化誘導の具体的な方法としては、発生学の情報から重要と分かっていたシグナルの添加だけでなく、目的細胞の発現マーカー

の promoter 支配下に蛍光蛋白を発現させることで細胞を可視化し、蛍光蛋白の発現を指標として分化効率を高める低分子化合物の同定を行う技術も導入された。この方法で得られる知見は、マウス発生学から得られた知見とは独立したものであるが、逆にヒト発生学の理解を深める可能性がある。これまでの多くの研究者の努力により、最近ではヒト多能性幹細胞からようやく 10% 程度の効率でインスリン陽性細胞を誘導する事が可能になっている。しかしながら、作成された多くのインスリン産生細胞はグルコース応答性に欠き、医療に使える機能的細胞にはなっていない。この事は、先に述べた再生医療の根本思想、つまり「発生機構を培養皿の上で再現すること」が不完全にしか出来ていない事、言い換えれば、これまでの発生学の知見からは不完全なマップしか描き出せていなかった事を端的に示している。 β 細胞作製を自動車工場に例えると、各ステップの作業工程は、“見かけ上” それらしい物を作ろうとはしているが、肝心のエンジンを欠いた車しか出来ていない現状である。明らかに設計図の不備であり、これではせっかく苦労して作った自動車も動かない (図 3)。

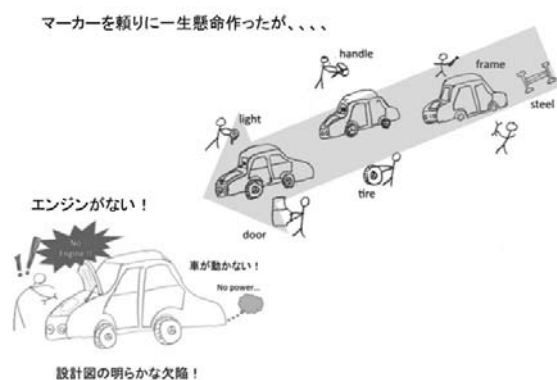
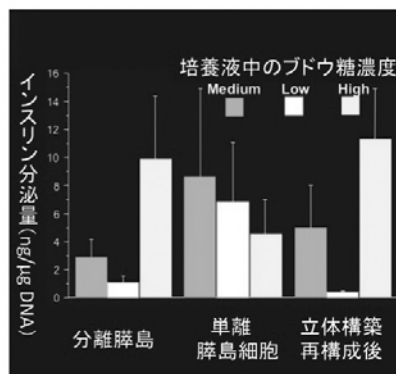


図 3

本講演ではこれまで重視されてこなかった 2 つの視点を提案し、今後の展望を述べたい。私の“手書きの地図”、設計図についてお話する。まず、本研究においては、「このようなものを作りたい。そのためにはどうすれば良いか?」を徹底的に考え、試行錯誤する」という取り組み方をすべきであると私は考える。これは全ての研究に当て嵌まる事ではないが、

このような“もの作り”を目指した研究開発においては、「現状の知見／技術を最大限駆使して何とか良いものを作り出そう」という姿勢では不十分であり、ゴールの達成は覚束ない。「最初にゴールの設定を明確にし、それに向けて全力で立ち向かう姿勢」が極めて重要である。そこで、本研究では“発生を再現して機能的膵島細胞を作製する”という基本方針は変わらないが、その最終目標設定には、一旦発生学から離れる勇気を持つ必要がある。その為には、まずは既に存在する“完成品”たる成熟膵島の特性をしっかりと見定める事が肝要である。最終ゴールに求められる特性として第一に指摘すべき事は、組織構築 (三次元立体構築) の形成である。哺乳類の膵島は一定の立体構造を持つ。マウス膵島を分離し、更に細胞一つ一つのバラバラの状態にまで分離すると、周囲のブドウ糖濃度に応じたインスリン分泌能が著明に低下する。一旦バラバラにした細胞を超低接着性 V 字底培養皿を用いて細胞塊を形成させると、再びブドウ糖応答性が回復する (図 4)。



分離膵島の in vitro ブドウ糖応答性の検討:
培養液中のブドウ糖濃度を M→L→H の順番に変化させ、インスリン分泌量を測定

図 4

膵島構造は一つの機能的単位 (mini organ) であると同時に、膵島細胞では互いの接触が機能維持に有利に働く。これまでの戦略では主として平面培養での β 細胞の誘導を主眼としていたが、立体構造の獲得が必要である事は明白である。二つ目の視点は非内分泌細胞 (特に、外分泌細胞) の必要性である。脊椎動物の進化を見てみると、ヤツメウナギ以前の無顎類は内分泌組織のみを有し、サメ以降の有顎類になって外分泌組織を獲得する。おそら

く進化によって顎を獲得した生物は、咀嚼摂取した食べ物を有効に消化するための新たな消化組織（外分泌腺）を必要としたと考えられる。哺乳類の膵臓は1つの臓器の中に独立した構造的機能単位（膵島／外分泌組織）が混在し、別個の機能（内分泌／外分泌機能）を果たす極めてユニークな臓器である事は注目すべき点であり、ここに両組織間の発生学的、或は機能的相互関係を想定することは突飛な発想とは言えない。この仮説を支持する臨床事実として、ヒト臨床膵島移植の長期成績があげられる（図5）。臨床膵島移植におけ

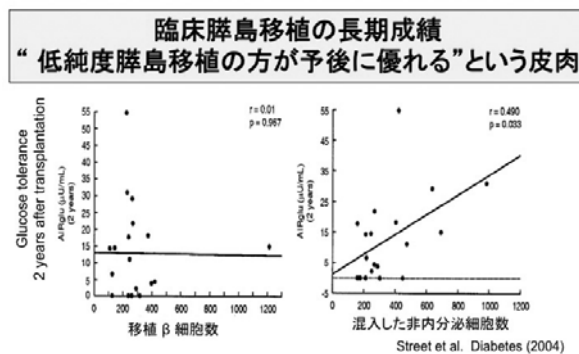


図5

る技術革新では、如何に膵島を純化／分離するかが大きなテーマであり、多くの研究者が努力してきた歴史がある。しかしながら、その長期成績は皮肉にも移植されたβ細胞の数とは相関せず、混入した非内分泌細胞の数が多い程優れるという結果であった。混入する非内分泌細胞のほとんどが外分泌細胞であることを鑑みると、どうやら膵島細胞の機能維持には外分泌組織との共存が有利に働くと考えられる。

上記は“完成品たる”成熟した膵島細胞の機能維持に立体構築と外分泌組織との共存が必要である事を示しており、我々が目指す最終ゴールである（図6）。では次に、この2つ

設定すべき最終目標

- ①細胞塊として存在し、
- ②外分泌組織と共存する膵島細胞！

図6

のポイントが機能的膵島細胞の作製過程においても重要であるかどうか？手にしている地図のどこに書き込めばよいか？が問題となる。そこで遺伝子改変マウスを用いた in vivo の検証実験を想定したが、受精卵以降の発生過程は全て細胞塊として進行することから、膵島細胞をバラバラのまま形成させるような遺伝子改変は不可能と考えた。第二のポイントについては、膵形成に必須である遺伝子 *pdx1* を Cre/loxP システムを用いて胎生期外分泌組織特異的にノックアウトすれば外分泌低形成となる事が期待でき、このマウスを用いた検証が可能と考えた。図7に Elastase-Cre を用い

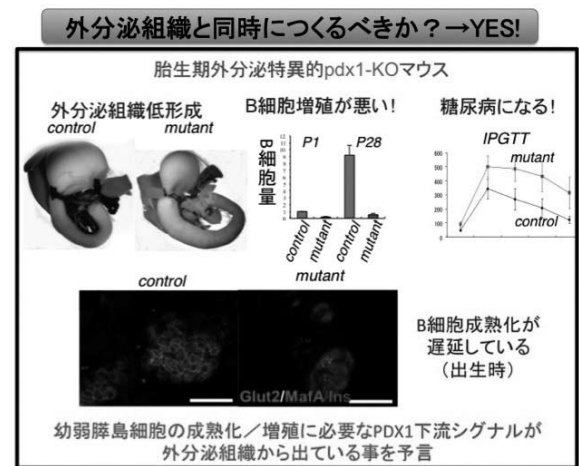


図7

た胎生期外分泌組織特異的 *pdx1* ノックアウトマウスの解析結果を示す。このマウスは予想通り外分泌組織の著明な低形成を示した。興味深い事に、同マウスの膵島細胞は機能的成熟マーカーである GLUT2 や MafA の発現が遅延するだけでなく、生後のβ細胞増殖能が極めて悪く、結果的に糖尿病となった（論文投稿中）。これらの結果は、胎生期臓器形成において外分泌組織と共存する事が膵島細胞の成熟と増殖に有利に働く事を示しており、外分泌組織由来で内分泌組織に働きかけるシグナルの存在を予言している。同時に、前述の「哺乳類の膵臓では、何故2つの異なった組織が1つの臓器に存在するのか？」という疑問に対する1つの答えを提供していると言えよう。

斯くして、私の手書きの地図”には「立体構築形成の重要性」と「外分泌組織との共存」というこれまで無視（或は軽視）されてきた

2つの重要項目が書き込まれる事となった。ただし、これは突飛な事では全くなく、発生過程で通常に見られる現象である（膵発生は細胞塊として進行し、内分泌細胞と外分泌細胞はほぼ同時に形成され、終生共存する）。あらためて図1に示した再生医療の根本理念の重要性が身にしみる。これまでの多くの研究者がとって来た方法では機能性を獲得していない以上、いくら誘導効率を上げようと努力しても0×100=0であり、それだけでは最終ゴール到達は覚束ないと考えた私は“愚直なまでに再生現象を再現する事”を研究方針とする決意に至った。



図8

図8に膵発生の概略を示す。膵発生は既に3次元構造を獲得した原腸（内胚葉臓器で最初の立体構築）より上皮細胞が発芽し、膵原基を形成することに始まる。私は過去の研究で、転写因子 *Ptf1a* が膵への運命決定遺伝子として機能する事を示した。遺伝子ノックアウト技術は生体内における遺伝子機能の解明に極めて優れた実験手法ではあるが、限界がある。すなわち、ある遺伝子をノックアウトした場合に特定の細胞が形成されなかった場合、該当遺伝子はその細胞形成（或は維持）に必要であることは分かるが、遺伝子ノックアウトされた細胞が（①死んでしまった②未分化な状態に留まっている③他の細胞に運命転換して生存している）上記3つの区別が出来ない。我々は *Cre/loxP* システムを用いた lineage tracing（細胞系譜解析）手法を遺伝子ノックアウトと組み合わせた独自の方法を開発し、その回答を得る手段を得た。それ以前の報告では *Ptf1a* 遺伝子ノックアウトでは膵外

分泌細胞が欠失することから、「*Ptf1a* は外分泌細胞の形成に必須の遺伝子である」との理解に留まっていた。ところが、我々は *Ptf1a* 発現細胞の lineage tracing で全種類の膵細胞が標識された事から、「*Ptf1a* は膵前駆細胞に発現する」ことを示したのみならず、*Ptf1a* ノックアウト細胞の大部分が十二指腸へ運命転換した事から、2つの結果を合わせて「*Ptf1a* が膵臓への運命を決定している」と結論した（図9）。次いで、「ヒト胃前庭部や十二指腸、ま

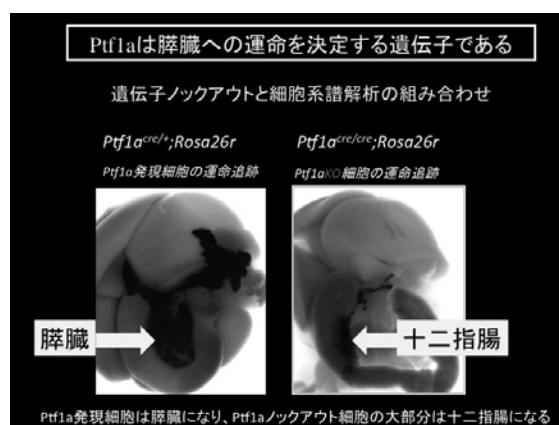


図9

れに胆管に発見される異所性膵組織の形成にも *Ptf1a* が機能している」と仮説したが、*Ptf1a* 上流の制御因子が分からずにいた。そんな中、筑波大学のグループより、Notch シグナルの主要な effector である *Hes1* をノックアウトすると胆管組織が膵組織（内分泌/外分泌細胞の両方を含む）に置換されるとの興味深い報告に接し、「この現象の本態は、*Hes1* ノックアウトによる異所性 *Ptf1a* 発現である」と直感し、*Hes1* ワイルドタイプと *Hes1* ノックアウトの両方の条件下で *Ptf1a* 発現細胞の lineage tracing を行い、両者を比較する実験を行なった。その結果、予想された胆管だけでなく、ヒト臨床でしばしば経験する胃前庭部や十二指腸にも異所性 *Ptf1a* 発現を介した異所性膵組織形成が確認された（図10）。すなわち、*Hes1* を介した Notch シグナルは膵臓形成の位置決定機構として機能している事になる。ここで注意すべき事は、*Hes1* 発現領域の全てが膵組織に置き換わった訳ではなく、その一部の部位に極めて再現良く形成された事であった。そこで、*Hes1* は *Ptf1a* 発現を負に制御しており、未知の *Ptf1a* positive regulator

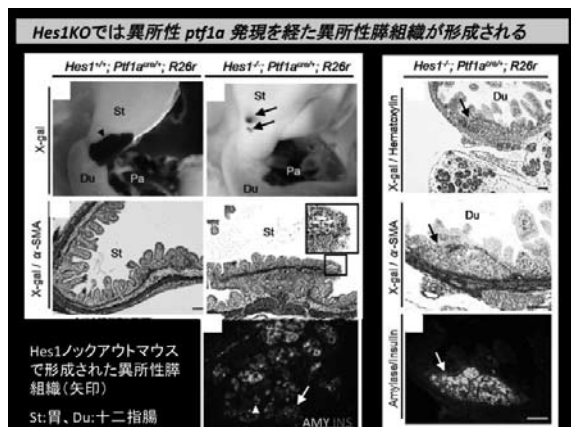


図 10

とのバランスによって規定された *Ptf1a* 発現量が或る一定の閾値を超えた場合に膵細胞への運命を辿ると考え、この概念は *Ptf1a* 低発現アレルと用いた lineage tracing 実験で確認された。さて、ほとんどのヒト異所性膵組織は無症状であるが、まれに異所性膵炎を発症する事が報告されている。異所性に生じた内分泌細胞が機能を有するかどうかは未確定ではあるが、我々は *Ptf1a* を使って異所性膵組織を作製することを試みた。

Ptf1a は胎生期膵前駆細胞に発現するが、分化が進むに従って外分泌細胞には発現が維持される一方、内分泌細胞では発現消失する。そこで、*Ptf1a* 陰性である胎生 11.5 日の胃前庭部から十二指腸組織を培養し、非増殖型アデノウイルスを用いて *Ptf1a* 発現を一過性に引き起こす実験を行なった (図 11)。その結果、

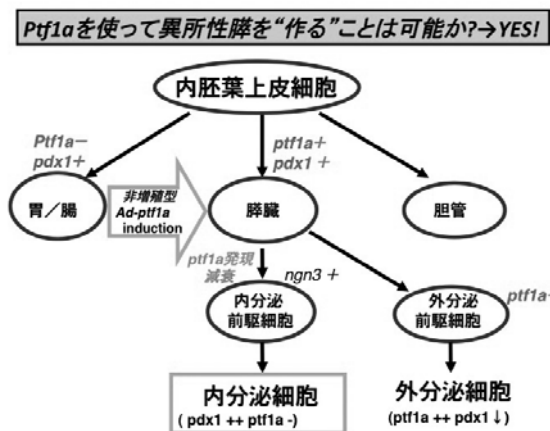


図 11

インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン陽性細胞に加えてアミラーゼ陽性腺房細胞も誘導される事が確認された。重要な事にインス

リン陽性細胞は細胞塊として存在し、GLUT2 陽性であった。誘導された異所性膵組織は培養液の糖濃度に応じたインスリン分泌を示し、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ヌードマウスへの移植で血糖値を改善した。すなわち、マウス胎生組織 (胃～十二指腸) の組織培養で“膵臓を丸ごと作る”ことが可能であり、機能的 β 細胞が出来る事が証明された (論文投稿準備中)。

これで私の歩むべき道はハッキリとした。マウス組織培養での成功をヒト ES/iPS 細胞の系に持ち込めば良い訳である。先に述べた通り、マウス発生とヒト発生が全く同じであるという保証はどこにもないものの、“愚直なまでの発生現象の再現”を心がけ、“膵臓を丸ごと作る”ことを目指す。現在、以下の“手書きの地図”に従って研究を進めている。①ヒト ES/iPS 細胞から立体構築を伴う原腸 (原腸オルガノイド) を作製する。② *Ptf1a* を用いて膵細胞への運命決定を行なう③内分泌細胞と外分泌細胞を同時に誘導し、機能的成熟化を図る (図 12)。論文未発表のため、本稿で詳

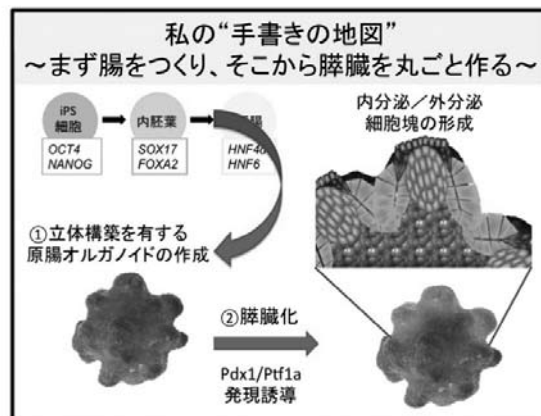


図 12

細なデータを示せない事が心苦しいが、これまでに以下の結果を得ている。①二次元培養で内胚葉上皮を経て、原腸上皮に分化させると培養皿の上で所々細胞の盛り上がりが生じる。これを Matrigel を用いた三次元培養系に移行させると球状の原腸オルガノイドとなる。②培養条件を工夫すると *Pdx1* 陽性領域が出現し、(おそらく引き続き *Ptf1a* が誘導されて) 膵原基類似の細胞発芽が見られる。更に培養を続けると球状の立体組織は辺縁部が外分泌

組織となり、中心部には内分泌細胞が散見される状態となる。我々は立体組織培養においては培養液のシグナルの濃度勾配と酸素化状態の勾配が自然と形成され、それが組織パターンニングに寄与しているものと考えている（図13）。それにしても周囲のシグナルに反応して自然と立体構造を形成する細胞の能力には驚嘆の念を禁じ得ない。自己組織化現象のメカニズムは全く未解明であるが、現在、顕微鏡下の細胞に愛情すら覚えつつ（！）、更なる培養条件の工夫で内分泌細胞の細胞塊形成、機能的成熟化を目指している。

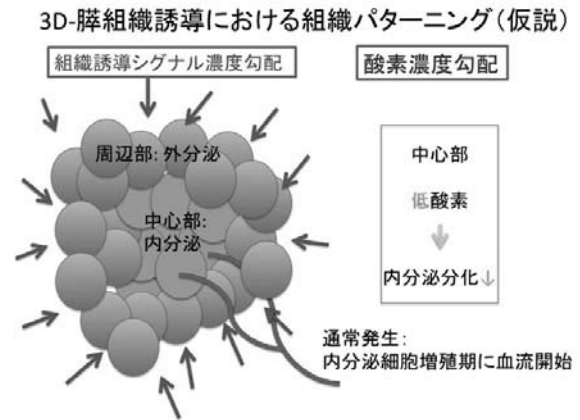


図 13