



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on removal of off-target cells for clinical application of pluripotent stem cell-derived pancreatic islet cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	日吉, 秀行
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第7224号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95535
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hideyuki_Hiyoshi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：日吉 秀行

学位論文題名

Studies on removal of off-target cells for clinical application of pluripotent stem cell-derived pancreatic islet cells

（多能性幹細胞由来の膵島様細胞の臨床応用に向けた
目的外細胞除去に関する研究）

ヒト人工多能性幹細胞（iPSCs, induced pluripotent stem cells）は、無制限に増殖可能であり、なおかつ種々の細胞への分化能を持つ。この性質により、iPSCsを用いた細胞医療の開発が、ドナー不足という課題を抱える臓器移植の代替候補として進められている。しかし、iPSCsの無限の増殖能や分化能は、目的外の細胞への分化や増殖、さらには腫瘍形成のリスクを内包する。そのため、iPSCs由来製品の開発においては、目的外細胞の汚染リスクを最小限に抑えることが不可欠である。特に、多能性幹細胞由来の膵内分泌細胞を用いた細胞医療に関しては、1型糖尿病に対する臨床試験がすでに開始されており、潜在的な目的外細胞の同定と除去が急務である。そこで本論文では、iPSCs由来の膵内分泌細胞の誘導過程で混入する目的外細胞を幅広く同定し、その特性解析を行った。さらに、目的外細胞の特性に基づく除去方法を提案し、これらの除去方法が *in vivo* 移植試験においても有効かどうかを検証した。

第1章では、iPSCs由来膵内分泌細胞の誘導過程で混入する主要な目的外細胞である、CHGA陰性の非内分泌細胞に焦点を当てた。単一細胞レベルの解析から、非内分泌細胞の大部分は、膵管様細胞や膵前駆細胞といったPDX1陽性の膵臓系譜の細胞であることが明らかとなった。また、これらの膵臓系譜の非内分泌細胞は、*FGFR2*、*PLK1/4*、ならびに解糖系の遺伝子を特異的に高発現していた。そこで、それぞれの遺伝子に対応する化合物処理を行った結果、非内分泌細胞を特異的に減少させることに成功した。このように、目的外細胞の除去には、その特性に応じた蛋白質や代謝経路を標的とする化合物処理が有効であることが示された。

膵臓系譜の非内分泌細胞削減に有効であった化合物の中には、キナーゼ阻害薬である PD-166866 および TR06141363 が含まれる。これらのキナーゼ阻害薬の処置を介して作成した s7-iPICs (seven-stage iPSC-derived pancreatic islet cells) では、CHGA 陰性の非内分泌細胞が *in vitro* においてほとんど検出されないレベルにまで減少した。さらに s7-iPICs を 10^6 オーダーで移植した場合、膵臓系譜の目的外細胞の増殖による移植片の明確な異常は認めなかった。そのため、s7-iPICs では移植後の安全性に関する懸念は解消されたと思われた。しかし、臨床応用時には 10^8 オーダーの細胞移植が想定される。そこで、s7-iPICs を繰り返し移植することで、大量の細胞を移植した際の安全性評価を試みた。その結果、s7-iPICs の移植片において時折、膵臓系譜ではない予期せぬ目的外細胞が増殖することが判明した。したがって、第 2 章では、この膵臓系譜外の新規目的外細胞の詳細な解析および除去方法の検討を行った。

新たに同定された目的外細胞は、間葉系幹細胞 (MSCs, mesenchymal stem cells) と平滑筋細胞 (SMC, smooth muscle cells) の形質を有することが明らかとなったため、PMSCs (proliferative MSC- and SMC-like cells) と呼称した。PMSCs は、臨床応用を想定して 10^8 オーダーの s7-iPICs を移植した場合には、ほぼ 100% 出現することが示唆された。したがって、PMSCs を除去しない限り、臨床応用の安全性を担保するのは困難であると考えられた。また、PMSCs は移植前にはその特徴である形質を発現しておらず、移植前の検出が極めて困難であることが判明した。そこで、移植に依らない PMSCs 検出方法として、4 週間の延長培養系を確立した。延長培養系を介して PMSCs 除去に有効な化合物を探索した結果、特にタキサン系抗がん剤であるドセタキセルが PMSCs 除去に有効であることを見出した。最後に、ドセタキセル処理を施した s7-iPICs の移植試験を繰り返し実施し、累計で 10^8 オーダーの細胞を移植した場合であっても、PMSCs が出現しないことを確認した。

以上より、本研究では、多能性幹細胞由来の膵内分泌細胞の臨床応用に向け、分化誘導過程や移植後に生じる目的外細胞の特性を詳細に分析した。得られた特性に応じた目的外細胞の除去方法の中から、最終的に辿り着いたドセタキセル処理と s7-iPICs の組み合わせは、想定されるすべての目的外細胞に対処可能であった。したがって、ドセタキセル処理を施した s7-iPICs を用いることで、高い安全性を担保しつつ、1 型糖尿病の寛解を目指した臨床応用を進めることが可能と思われる。また、ドセタキセル処理を施した s7-iPICs を見出す過程において確立した、目的外細胞の検出と除去に関する方法論は、多能性幹細胞由来製品を用いた細胞医療の分野で広く応用可能である。本研究で得られた知見により、多能性幹細胞由来の膵内分泌細胞の臨床応用が加速し、将来的には獣医療を含め、糖尿病に苦しむ患者様に対する根治療法の提供が一日でも早く実現することを期待する。