

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ヒト多能性幹細胞を用いた膵臓分化を促進する新規化合物の作用機序 解明
Title(English)	Elucidation of the mechanism of action of a novel small molecule that promotes iPS cell differentiation into pancreatic β cells
著者(和文)	島谷幸宏
Author(English)	Yukihiro Shimaya
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京科学大学, 報告番号:甲第238号, 授与年月日:2025年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:糸 昭苑,白木 伸明,山口 雄輝,加納 ふみ,川上 厚志
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Institute of Science Tokyo, Report number:甲第238号, Conferred date:2025/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

Doctoral Degree Dissertation

ヒト多能性幹細胞を用いた膵臓分化を促進する
新規化合物の作用機序解明

Elucidation of the mechanism of action of
a novel small molecule that promotes
iPS cell differentiation into pancreatic β cells

島谷 幸宏

東京科学大学 生命理工学院
生命理工学系 生命理工学コース 博士課程

目次

要旨	4
略語一覧	6
第 1 章 研究背景	7
1-1 糖尿病の概要と治療法について	7
1-2 ヒトの膵臓発生について	7
1-3 ヒト多能性幹細胞を用いた再生医療の現状について	9
1-4 ヒト多能性幹細胞を用いた膵臓 β 細胞への分化誘導と移植の現状	9
1-5 当研究室と製薬企業との共同研究と本研究の目的	11
第 2 章 実験方法	14
ヒト iPS 細胞を用いた膵臓 β 様細胞への分化誘導	14
免疫細胞化学を用いた細胞の分化率評価	15
S3 end の細胞を用いた PDX1 染色強度評価	16
フローサイトメトリーを用いた細胞の分化率評価	16
逆転写定量 PCR を用いた遺伝子発現解析	17
膵臓前駆細胞を用いた Bulk RNA-seq	17
ヒト iPS 細胞由来 β 細胞を用いたグルコース応答性インスリン分泌試験 (GSIS)	18
ダイナミック GSIS	18
DNA 定量による細胞数推定	18
培養 21 日目における細胞数計算	19
Ub-AMC アッセイ	19
ImageJ を用いたスフェロイドの面積・離心率評価	19
統計的解析	19
第 3 章 実験結果	21
3-1. 膵臓前駆細胞期間を含む K-3 添加は、ヒト iPS 細胞の β 細胞への分化誘導効率を向上させる	21
3-2. 膵臓前駆細胞段階におけるトランスクリプトーム解析は、K-3 添加による膵臓分化に関連した遺伝子の発現変動を示す	26
3-3. K-3 添加は膵臓前駆細胞の PDX1 発現を増強する	29
3-4. 膵臓前駆細胞段階での K-3 添加は膵臓内分泌前駆細胞への分化に寄与する	30
3-5. K-3 添加はより成熟した β 細胞の割合を増加させ、 β 細胞特徴的な遺伝子の発現を上昇させる	32
3-6. K-3 を添加した細胞は遺伝子発現の変動に伴い形態が変化する	34
3-7. K-3 の標的候補タンパク質 UCHL1 に関する考察	36
第 4 章 考察	38
第 5 章 結語	41

謝辞	42
学位論文の骨格となる参考論文.....	43
参考文献	44
表	50

要旨

【背景・目的】

血糖値の制御が困難である糖尿病の患者は世界で 5 億人を超えると推定される。重篤な糖尿病患者への根治療法として移植治療が挙げられるが、ドナー不足などの課題により十分に行われていない。そこで新たな移植治療源としてヒト多能性幹細胞から分化し、血糖値を低下させるホルモンであるインスリンを分泌する膵臓 β 細胞に期待が高まっている。ヒト多能性幹細胞の β 細胞への分化誘導研究は世界中で行われており、当研究室においても移植治療を目的とした細胞製造の研究を行ってきた。その過程で、分化誘導に有益な化合物の発見を目的として当研究室と製薬企業との共同研究を行い、マウス ES (Embryonic Stem) 細胞を用いた化合物ライブラリのハイスループットスクリーニングを実施した。膵臓分化誘導過程に添加することでより多くのインスリン陽性細胞を得る候補化合物 K-1 を見出した。化学修飾を行った誘導体についてもヒト iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞を用いたスクリーニングを行った結果、K-1 と比較してより高い薬効と濃度依存性を示した膵臓分化の促進剤 K-3 を得た。しかしながらその作用機序は不明であったため、本研究ではヒト人工多能性幹細胞を用いた膵臓分化誘導に K-3 を添加し、K-3 の作用時期・ β 細胞の収量・機序に着目し解析を行った。その結果、膵臓前駆細胞への分化過程における K-3 添加が膵臓分化促進に重要であることを解明した。また、K-3 の膵臓分化促進は膵臓発生に必須の転写因子である PDX1 の発現増強を介していることを示した。

【手法】

京都大学 iPS 細胞研究所より供与されたヒト人工多能性幹細胞株 CiRA Ff-I01s01 株を実験材料として用いた。ヒト iPS 細胞は平面培養で増殖させた後、浮遊・回転培養によりスフェロイドを形成し分化誘導を開始した。未分化段階から段階的に培地組成の異なる分化培地へと培地交換を行うことで、インスリン分泌能を持つ膵臓 β 細胞への分化誘導実験を行った。分化培養 6 日目の膵臓前駆細胞段階より、DMSO(vehicle)若しくは K-3 を培地に添加し、比較実験を行った。分化培養を行った細胞は分化培養 8 日目 (膵臓前駆細胞段階)、13 日目 (内分泌前駆細胞段階)、21 日目 (膵臓 β 細胞段階) に回収した。各時点において免疫細胞化学とフローサイトメトリーによる、分化マーカー遺伝子を標識しての分化効率の評価、mRNA を抽出後逆転写定量 PCR による遺伝子発現評価を行った。特に膵臓前駆細胞段階の細胞については、K-3 による遺伝子発現変動の影響を調査するため、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。また、膵臓 β 細胞段階の細胞の機能性を評価するため、異なる糖濃度に細胞を曝露した際のインスリン分泌速度の変化を調べる糖応答性インスリン分泌試験 (GSIS) を行った。

【結果】

まず、K-3 添加によるヒト iPS 細胞の膵臓分化促進効果を得るために必要な時期を検証するため、分化段階別に K-3 を添加した細胞のインスリン陽性細胞への分化率をフローサイ

トメトリーと免疫細胞化学により評価した。膵臓前駆細胞段階のみ K-3 を添加した条件と膵臓前駆細胞段階から β 細胞段階まで K-3 を添加した条件で、コントロール条件と比較し有意に β 細胞マーカーの C-pep と β 細胞成熟化マーカー遺伝子の NKX6.1 二重陽性細胞の割合が増加しており、同程度の β 細胞への分化促進効果を確認した。S3 での K-3 による遺伝子発現に対する効果を評価するため RNA-seq を行い、有意に発現の上昇した遺伝子群を用いて GO 解析を行ったところ、“Nerve development”や“Type B pancreatic cell differentiation”などの細胞分化関連の GO term の濃縮が検出された。特に膵臓分化に関連した term には、膵臓分化に必須の転写因子である PDX1 が含まれていた。同じく膵臓前駆細胞段階の細胞について免疫細胞化学により PDX1 タンパク質の検出を行い定量化したところ、K-3 添加条件において、コントロール条件と比較して有意に PDX1 の核内染色強度が増強されていた。膵臓前駆細胞段階から更に 5 日間培養を行った内分泌前駆細胞段階における分化効率を免疫細胞化学により評価したところ、膵臓前駆細胞段階において K-3 を添加した条件では成熟化 β 細胞への分化に重要な転写因子である NKX6.1 と PDX1 の二重陽性細胞の割合が増加しており、内分泌細胞への分化に対する膵臓前駆細胞段階での K-3 の寄与を確認した。また、得られた β 細胞の機能性を評価したところ、膵臓前駆細胞段階を含むように K-3 を添加した細胞はより高い糖応答性のインスリン分泌能を有していた。得られた β 細胞の収量を測定すると、膵臓前駆細胞段階のみの K-3 添加もコントロール条件と比較して増加傾向が見られたものの、膵臓前駆細胞段階から β 細胞段階まで常に添加していた条件が他の全ての条件と比較して有意に高い結果であった。

【考察】

ヒト iPS 細胞株の膵臓 β 細胞への分化誘導において、膵臓前駆細胞段階のみの K-3 添加は膵臓 β 細胞への分化を促進した。膵臓前駆細胞段階における K-3 の添加が PDX1 の発現を増強し、内分泌前駆細胞への分化促進に寄与したことが示唆された。今後は K-3 による PDX1 発現増強のより詳細なメカニズム理解のためにさらなる検証を行う必要がある。

【結論】

ヒト iPS 細胞株を膵臓 β 細胞へと分化誘導する過程において、K-3 を分化培地に添加して培養することでより多くのインスリン陽性細胞を得た。その際、膵臓前駆細胞段階で K-3 を添加することで、膵臓 β 細胞段階まで常に化合物を添加した場合と同程度の分化促進効果を示した。

略語一覽

DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DE	Definitive endoderm
DEG	Differential expression genes
EC	Endocrine cells (β)
EP	Endocrine progenitor
ES cell	Embryonic Stem cell
GCG	Glucagon
GO	Gene ontology
INS	Insulin
iPS cell	induced Pluripotent Stem cell
MAFB	MAF BZIP Transcription Factor B
NEUROG3	Neurogenin-3
NKX6.1	NK6 homeobox 1
PAX4	Paired Box 4
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDX1	Pancreatic and Duodenal Homeobox 1
PP	Pancreatic progenitor
SST	Somatostatin

第1章 研究背景

1-1 糖尿病の概要と治療法について

糖尿病は後述する種々の原因により血糖値の制御が困難になることで、様々な症状を併発する病気である。軽度であれば眩暈や多尿、重度な患者であれば失明や足の壊死、脳梗塞などの発症を伴うため、特に重篤な患者への治療は重要である。現在、糖尿病患者は世界的に増加しており、深刻な問題である。WHOによれば1980年には世界中で1億人程度だった患者が、2014年には4億人を超えている (<https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/diabetes>, 2021)。日本においても糖尿病は国の重要疾患に位置付けられており、厚生省の統計によれば、成人男性の約20%、成人女性の約10%に糖尿病の強い疑いがある（令和元年 国民健康・栄養調査報告）。糖尿病と関わりの深い臓器として膵臓が挙げられる。膵臓にはホルモンを分泌する細胞の集合体である膵島が存在し、膵島内に存在する β 細胞は血糖値を低下させる唯一のホルモンであるインスリンを分泌する。

糖尿病の発症機序は大きく二つに分類される。一つ目は自己免疫疾患により膵臓 β 細胞が失われるなど、体内でインスリンを産生できず絶対的にインスリンが不足する1型糖尿病である。二つ目はインスリンを体内で産生可能なものの十分な効果を発揮できない、インスリンの相対的不足により発症する2型糖尿病である。インスリンの相対的不足にはいくつかの原因があり、生活習慣による β 細胞の機能性低下、遺伝的要因によるインスリン受容体の働きの低下などが挙げられる。

糖尿病はその原因の種類によって治療法が選択される。2型糖尿病では体内にインスリンが存在するため、その働きを助けるような食事療法、運動療法も選択肢に入る。一方でインスリンを産生できない1型糖尿病の患者では、外部からのインスリン注射が必須である。インスリン注射による治療には患者自身による血糖値管理の負担や低血糖のリスクなどの課題があり、特に重篤な患者に対する根治療法として膵臓または膵島を移植する細胞治療に期待が高まっている。しかしながら細胞のドナー数は移植希望の患者に対して大きく不足しており、移植治療は十分に行われていない。新たな細胞治療の移植源として、ヒト幹細胞を分化誘導し作成する幹細胞由来膵臓 β 細胞が近年注目されている。

1-2 ヒトの膵臓発生について

膵臓は血糖値を制御するホルモンを分泌する唯一の臓器であり、糖尿病と深いかわりを持つ。その膵臓の発生の過程について述べる。受精卵は発生の過程において、内胚葉・中胚葉・外胚葉の三胚葉を形成し体を形成していく（図1A）。このうち内胚葉となる領域は原腸形成し、前腸 (foregut)、中腸 (midgut)、後腸 (hindgut)の領域を作る。前腸・中腸の境界領域が、隣接する脊索から分泌されるアクチビンやFGFによりSHH (Sonic Hedgehog) シグナリングが阻害されることで、膵臓のマスター転写因子であるPancreatic and Duodenal Homeobox 1 (*Pdx1*) を発現するようになることがマウスで解明され (Hebrok et al., 1998)、後にヒトについても*PDX1*に関する同様の発生経路が明らかとなった (Jennings et al., 2013, 2015)。

ヒトの発生過程においては妊娠 26 日にまず背側の膵芽突起が観察され、妊娠 29-31 日に PDX1 の発現と腹側での膵芽形成が起きる。妊娠 6-9 週には膵臓前駆細胞が FGF7 や FGF10 のシグナルを受け増殖して膨らんでいく (Ye, Duvill  , and Scharfmann 2005)。妊娠 47 日付近からは将来膵管、若しくは内分泌細胞へと分化する Trunk 領域と、消化酵素を分泌する Tip 領域に性質が分かれていく。内分泌細胞の予定領域では *PDX1* の発現に加え Neurogenin-3 (*NEUROG3*) や Neurogenic differentiation 1 (*NEUROD1*) などの転写因子が段階的に発現するようになる。Paired Box 4 (*PAX4*)、NK2 Homeobox 2 (*NKX2.2*)、NK6 homeobox 1 (*NKX6.1*) などのマーカーを発現する細胞は、インスリン (*INSULIN*, *INS*) を発現する β 細胞へと分化していく (Jennings et al., 2015) (図 1B)。妊娠 7.5 週頃に内分泌細胞からインスリンの発現が検出され始め、グルカゴンやソマトスタチンのホルモンは 8 週目以降に発現が検出され始める (Pan and Wright 2011)。妊娠 12 週ごろから内分泌細胞の集合体である膵島 (ランゲルハンス島) の形成が始まり、14 週ごろに血管と接続される報告がある (Meier et al. 2010)。

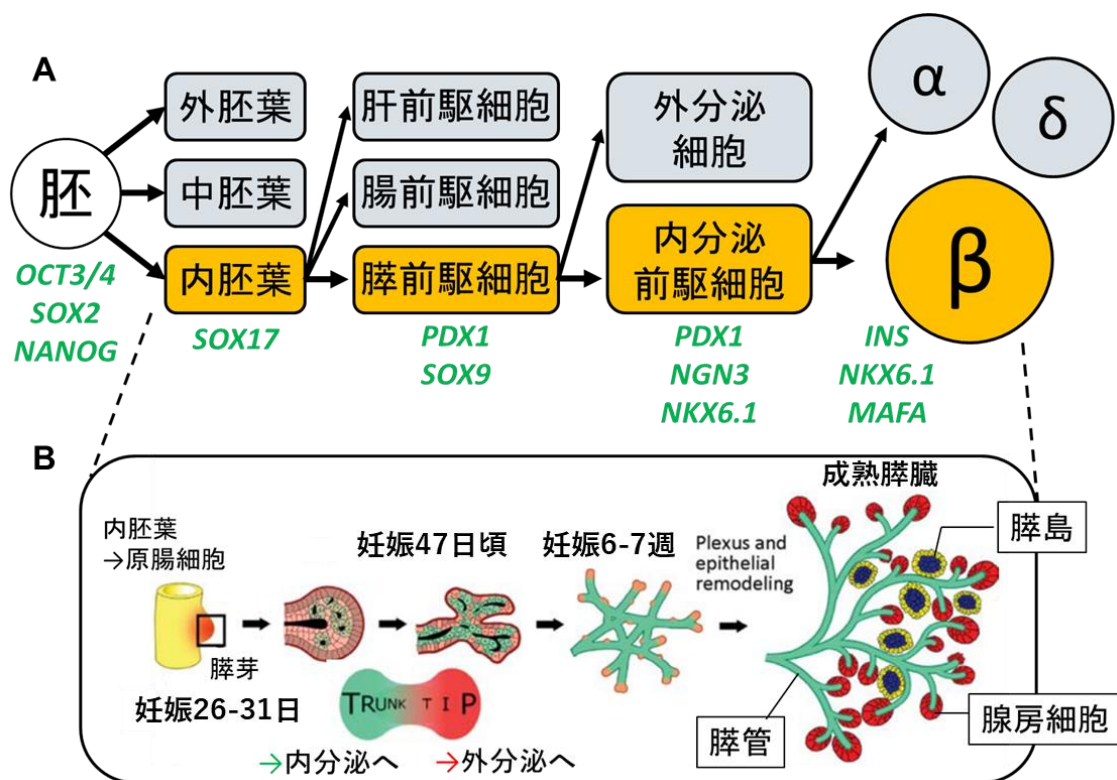


図 1. 膵臓分化概要

- A. 膵臓の発生過程と、各細胞段階におけるマーカー遺伝子。胚から順に内胚葉、膵臓前駆細胞、内分泌前駆細胞を経て、 β 細胞へと分化する。
- B. より詳細な分化過程。内胚葉から消化系の大元である原腸細胞ができ、その一部が SHH シグナルの阻害により膵芽として突出する。妊娠 6-7 週で複雑な枝分かれ構造を形成し始め、内分泌細胞と外分泌細胞の運命決定が進む。最終的に完成した膵臓には、インスリンを分泌する内分泌細胞の集合体である膵島、消化酵素を分泌する

腺房細胞、そして消化酵素の通り道である膵管といった構造を有す。(Pan and Wright 2011)より改変。

1-3 ヒト多能性幹細胞を用いた再生医療の現状について

ヒト多能性幹細胞には胚性幹細胞(Embryonic stem cell、ES 細胞)と人工多能性幹細胞(Induced pluripotent stem cells、iPS 細胞)の二種類が含まれる。これらの多能性幹細胞は胚と同様に栄養外胚葉を除くすべての細胞種へ分化する「分化万能性」と、多能性を維持したまま増殖する「無限増殖能」を持つ。

ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊を培養し株化したものである(Thomson et al. 1998)。遺伝子操作が不要であり安全性が高いと考えられている一方で、受精卵を材料とする点は生命を破壊しているという考えもあり倫理的な議論を呼んでいる(Lo and Parham 2009)。一方の iPS 細胞は山中伸弥教授らのグループにより同定された、生殖細胞を作る際に働くと考えられるリプログラミング因子を体細胞に作用させることで細胞の性質を胚と同程度までリセットしたものである(Takahashi and Yamanaka 2006)。iPS 細胞は体細胞から作成されるためドナーに対する侵襲性が低く、倫理的問題も回避できる。

多能性幹細胞を用いた再生医療研究は盛んであり、特に日本は京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)の存在もあり既に複数の治験が行われている(Tsujimoto and Osafune 2022)。黄斑変性の患者に対する iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞移植(Sugita et al. 2020)や脊椎損傷患者に対する iPS 細胞由来神経前駆細胞移植(Sugai et al. 2021)などが進行している。脊椎損傷の治療に関しては神経の新生ではなく、残存神経の保護と症状の緩和を目的としたものである(Inoue et al. 2023)が、再生医療としての iPS 細胞の利用は現実のものとなりつつある。

1-4 ヒト多能性幹細胞を用いた膵臓β細胞への分化誘導と移植の現状

膵臓β細胞についても、ヒト多能性幹細胞を用いた分化誘導研究が行われている。多能性幹細胞からの分化誘導は実際の生体内での臓器発生の過程を模倣する戦略が取られており、臓器発生に重要な働きを示すシグナルの解析が進められたことで *in vitro* での分化誘導が可能となった(D'Amour et al. 2006; Zaret and Grompe 2008)。その後、糖応答性をもってインスリンを分泌する「機能性を持った」細胞の作製報告もなされた(Pagliuca et al. 2014)。この報告ではヒトの膵島の形態を模倣し浮遊培養によって 3 次元の凝集体を作成しているが、平面での培養を採用する研究グループもある(Hogrebe et al., 2020)。このグループはβ細胞に特異的なマーカーである PDX1、NKX6.1、C-peptide を発現し (図 2A)、ヒト膵島と同様なインスリン分泌能を持つ細胞 (図 2B) の作製に成功したと報告している。また、移植後の生体内での成熟に期待し、β細胞への分化途中である膵臓前駆細胞で *in vitro* での分化培養を終了し移植する作戦を取る報告(Kroon et al. 2008)もあり、糖尿病治療を目的とした細胞作製のための最適な分化誘導系の構築に向けた議論が盛んにおこなわれている。

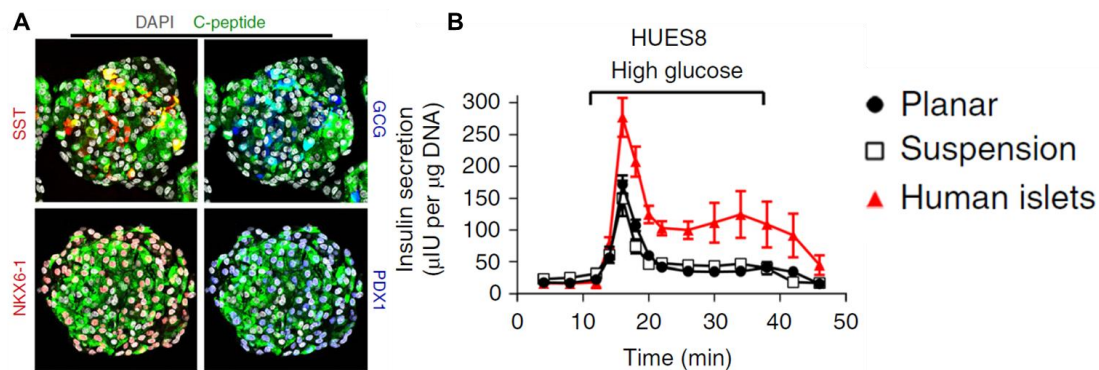


図 2. ヒト多能性幹細胞由来 β 細胞の作製報告(Hogrebe et al., 2020) より引用

- A. *In vitro* で分化誘導された膵臓 β 細胞はマーカー遺伝子である Insulin (インスリンペプチドのプロセッシングにより生成される C-peptide)、*PDX1*、*NKX6.1* といった遺伝子を発現する。
- B. ヒト多能性幹細胞を分化誘導し得られた β 細胞は、ヒト膵島と同様に糖応答性のインスリン分泌能を持つ。

このようにして得られた β 細胞は患者の体内に移植されるが、その際に考慮すべき課題が複数想定されている。まず一つ目は、患者自身の免疫による移植細胞の除去である。免疫拒絶を防ぐため患者への免疫抑制剤の投与が必要な一方で、全身の免疫抑制には感染症やがん細胞への耐性を下げるといった新たな問題が生じる。二つ目は細胞の安全性確保である。万が一移植細胞が腫瘍化した際に、患者の体内で腫瘍が拡散・増殖しないように歯止めをかけておく必要がある。そして3つ目に移植部位である。Vertex Pharmaceuticals は既にヒト多能性幹細胞由来 β 細胞の移植治験を行っており、そのうち VX-880 というパイプラインにおいては肝臓の門脈へと β 細胞を注入している。肝臓はインスリンやグルカゴンに応じて血糖値の制御を担う重要な臓器であり、かつ比較的非侵襲的な手術により移植可能であることが、肝臓が移植場所として選ばれる理由である。しかしながら、肝臓は膵臓と比較して酸素が薄く、移植細胞の半分程度が死ぬ可能性が示唆されている(Kroon et al. 2008; Torsten, Olof, and Torbjörn 2007)。これらの課題を解決することを目指し、免疫隔離デバイスへの細胞の包埋や、酸素を運ぶ血管の誘導を含めた移植環境の研究も同時進行的に進められている(Bruni et al. 2014; Hunault and Hesselson 2024)。

iPS 細胞から作成した β 細胞を人体に移植した治験について、2024 年に中国の研究グループから報告がなされた(Wang et al. 2024)。1 型糖尿病の患者一名に対して、およそ 150 万個の膵島相当の β 細胞を患者由来 iPS 細胞から作成し移植したものである。この患者は免疫抑制剤を処方されており、細胞は直接腹直筋へと注射された。4 か月後には患者のグリコヘモグロビン (HbA1c) 値は非糖尿病患者のレベルまで低下しており、移植の効果を示したものであるとされる。このようにヒトの患者に対する移植治療は現実味を帯びてきているが、移植条件については今後さらなる検討の余地がある。

1-5 当研究室と製薬企業との共同研究と本研究の目的

これまでの分化誘導法開発研究ではハイスループットスクリーニングによる分化誘導剤の発見を目的とした研究が数多く行われている。約4000種の化合物のスクリーニングを行い、多能性幹細胞から内胚葉への分化誘導剤IDEを見出した報告(Borowiak et al. 2009)、約5000種の化合物から膵臓前駆細胞への分化を促進する化合物Indolactam Vを見出した報告(Chen et al. 2009)などである。当研究室でもこれまでに、 β 細胞への分化促進化合物発見を目的としたスクリーニングを行っており(Nakashima et al. 2015; Sakano et al. 2014)、 β 細胞内のモノアミンに関する研究などその後の発展も見られている(Sakano et al. 2016)。

当研究室は製薬企業との共同研究を実施し、改めて膵臓分化を促進する化合物を発見するための実験を行った。インスリン陽性細胞への分化を促進する化合物発見のため、機能未知な低分子化合物55,000種類のライブラリを用いたハイスループットスクリーニングが行われた。まずマウスES細胞を対象に、膵臓前駆細胞段階から β 細胞時点までの期間にスクリーニングを行った(図 3A)。再現性検証や濃度依存性検討など、スクリーニングは複数の段階を踏んだ(図 3B)。第一スクリーニングでは、第一候補の化合物6,500種へと絞り込みを行った(図 3C)。スクリーニングの結果、マウスES細胞をコントロール条件に対しより多くのインスリン陽性細胞へと分化させたヒット化合物K-1を見出した。その後行われた誘導体展開から得られた化合物について、ヒト多能性幹細胞株を用いた分化誘導系を用いたスクリーニングを改めて行ったところ、膵臓前駆細胞段階における培養液への添加により、K-1と比較しより明確な濃度依存性をもってインスリン陽性細胞を増加させる化合物を見出した(図 3D、E)。今後本化合物をK-3と記述する(国際特許公開番号: WO 2021/006268 AI)。構造に基づく大規模データ解析により、K-3の標的として脱ユビキチン化酵素(Deubiquitinase, DUB)の一種であるUbiquitin C-terminal hydrolase L1

(UCHL1)が予想された。しかしながら、K-3処置によるインスリン陽性細胞の増加は確認されるものの、その作用機序は不明である。K-3の作用機序を解明することはヒトiPS細胞由来膵臓細胞の効率的な分化誘導による再生医療への貢献のみならず、ヒトの膵臓発生のメカニズムに対する理解を深めることになると考えた。そこで、K-3の膵臓分化誘導促進メカニズムの解明を目的とし、ヒトiPS細胞分化誘導系を用いて研究を行った。

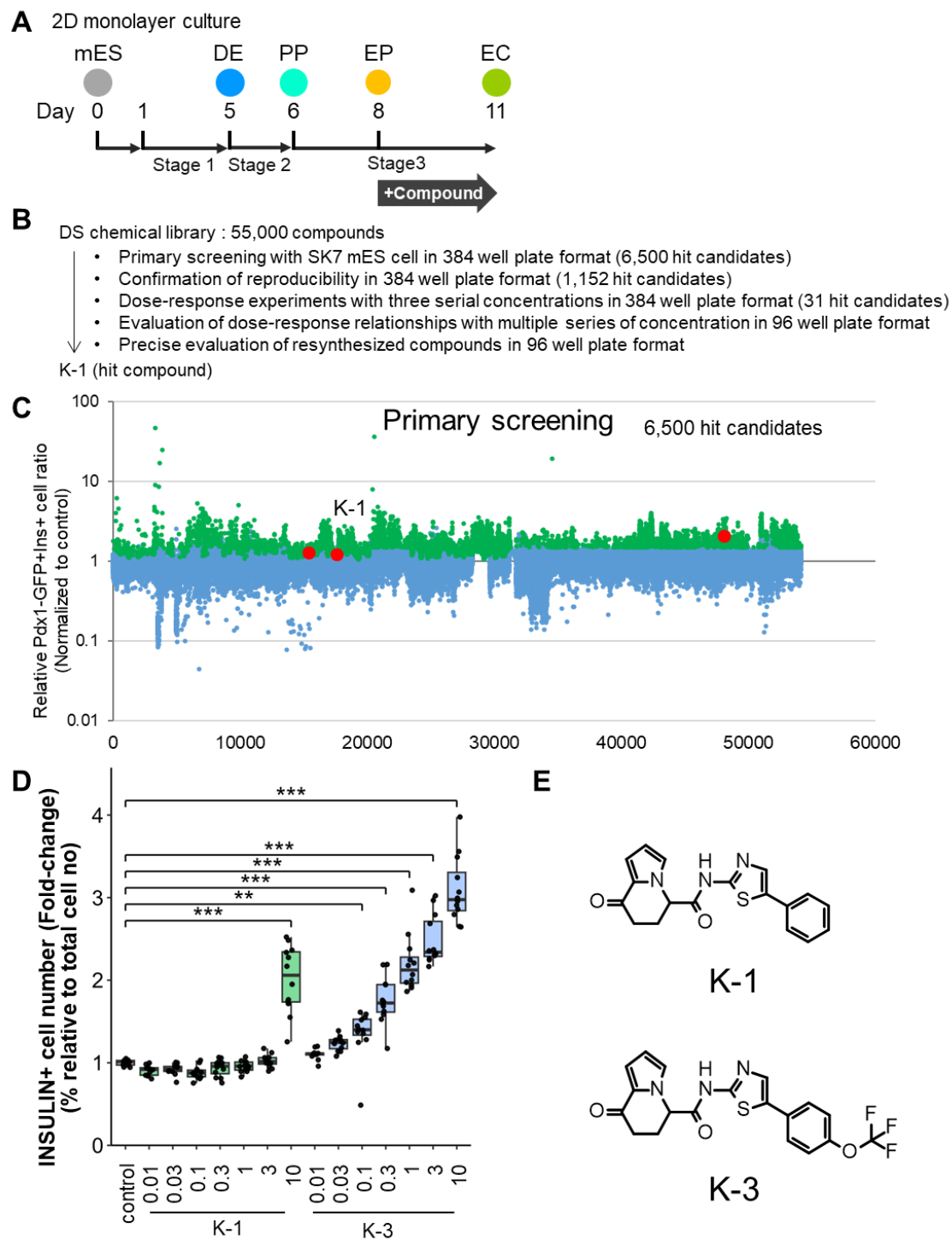


図 3. 膵臓分化促進剤発見を目的とした化合物スクリーニング

- A. マウス ES 細胞株平面培養系を用いた化合物ライブラリスクリーニング実験の概要図。インスリン発現細胞の陽性率を評価することで、化合物のスクリーニングを行った。
- B. 候補化合物スクリーニングの段階。第一スクリーニング、再現性検証、濃度依存性

検証、最終試験を経てヒット化合物 K-1 が見いだされた。

- C. 第一スクリーニングの結果。緑色で示された第一候補化合物はインスリン陽性細胞を増加させた化合物であり、最終的に K-1 として選抜された化合物は第一スクリーニングでは薬効は比較的緩やかであった。
- D. ヒト iPS 細胞株に対し K-1 と K-3 を添加し、インスリン陽性細胞の割合増加効果を検証した実験結果。ヒト iPS 細胞株を用いて行われた K-1 の化学誘導体に対するスクリーニングの結果得られた化合物 K-3 は、K-1 と比較して高い薬効、濃度依存性を示した。
- E. K-1 および K-3 の構造式。

第2章 実験方法

使用した試薬一覧、溶媒組成一覧はそれぞれ表 1、表 2 に示した。

ヒト iPS 細胞を用いた膵臓 β 様細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞の未分化維持培養

ヒト iPS 細胞株は、CiRA hiPS Ff-I 01s01 を用いた。基材には Synthemax II-SC を用い、10 cm dish を 1 時間から一晩 コーティングした。未分化維持培地には StemFit® AK02N 若しくは StemFit® AK03N を使用し、播種時には ROCK 阻害剤 (Y-27632) を 10 μ M で懸濁した。

ヒト iPS 細胞の継代培養

ヒト iPS 細胞の Confluency が目算で 7 割程度の時点で、細胞を継代した。細胞を顕微鏡で観察後培地を除き、D-PBS(-)で細胞を洗浄したのち、TrypLE Select (1X)を 1mL/dish で加え 37°Cで 5 分加温した。その後 TrypLE Select をピペットで除き、Advanced DMEM/F12 を加え Cell scraper もしくはタッピングにより細胞を剥離した。細胞懸濁液はピペッティングの後 15 mL 遠心チューブに回収し、細胞数測定用に 10 μ L サンプルングしたのち遠心した (1000 rpm、5 min)。細胞懸濁液と同量の Trypan Blue Stain (0.4 %)を懸濁し、Countess™ II FL (ThermoFisher)を用いて細胞数を測定した。未分化維持培地には StemFit AK02N 若しくは AK03N を使用し、播種時には ROCK 阻害剤 (Y-27632)を 10 μ M で懸濁した。

未分化細胞剥離とスフェロイド形成 (Day -1)

未分化維持培養しているヒト iPS 細胞を、継代時と同様に TrypLE Select を用いて剥離し、細胞数を測定した。AK02N 未分化維持培地に Y-27632 10 μ M を添加した培地で 1×10^6 cells/mL になるように細胞を懸濁し、Greiner 6 well plate Suspension Culture Plates (Greiner bio one #657185)に 5 mL/well の量の細胞を播種した。37°C、5% CO₂ の細胞インキュベーター内で加湿対応ロータリーシェーカーに乗せ一晩回転させ、未分化細胞のスフェロイドを形成した。回転速度は 95 rpm (Waken #WB101SRC) もしくは 91 rpm (TAITEC CS-LR Cat. #0081704-000) とした。

メチオニン除去と未分化細胞から膵臓 β 様細胞への分化誘導培養

M1-1: 未分化細胞の内胚葉細胞への分化誘導

メチオニン除去を介した、未分化細胞の内胚葉細胞への分化誘導 (Day 0)

iPS 細胞を内胚葉へと効率的に分化誘導するため、5 時間のメチオニン除去を行った後内胚葉への分化培地に交換した (Shiraki et al. 2014; Sim et al. 2022)。スフェロイドを 24 時間形成した未分化細胞を、1 well 分毎に一本の 15 mL チューブに回収し、自然沈降させたのち培地を除いた。D-PBS (+)で一度洗浄後、5 mL/well の KA01 メチオニン除去培地に切り替え、スフェロイド形成時と同様にインキュベーター内で 5 時間の回転培養を行った。5 時間後再び 15 mL チューブに回収し、D-PBS (+)で洗浄後分化培地 M1-1 を 5 mL/well の量で加え、新たな低吸着性 6 well plate (Greiner) に播種しインキュベーター内で回転培養を行った。

M1-2: 未分化細胞の内胚葉細胞への分化誘導 (Day1, 2)

分化培地 M1-1 に切り替えた細胞を、切り替えの 24 時間後に 1 well 毎に一本の 15 mL チューブに回収し自然沈降、もしくは 6 well plate 内で培地を可能な限り除いた。5 mL/well の分化培地 M1-2 を加え、新たな低吸着性 6 well plate (Greiner) に播種し、37°C インキュベーター内で回転培養を行った。

S2 以降: 原腸細胞、膀胱前駆細胞、内分泌前駆細胞、膀胱 β 様細胞への分化誘導

分化中の細胞のスフェロイドに対して、分化誘導法に従い培地交換を行うことで膀胱 β 様細胞への分化誘導を行った (表 3)。分化ステージの切り替わり際には細胞を 1 well 毎に一本の 15 mL チューブに回収し、自然沈降させ培地を除いた後、新たなステージの分化培地を 5 mL/well で加え新たな 6 well plate (Greiner) に播種しインキュベーター内で回転培養を継続した。分化ステージの変更なく、培地交換前後に培地組成に差異がない場合、6 well plate 中から 4.5 mL の培地を回収したのち 5 mL の新たな培地を加え、インキュベーター内で回転培養を継続した。

β 細胞の再凝集

培養 21 日目の β 細胞をより成熟化させダイナミック GSIS を行うため、一度細胞をシングルセル化し S6 成熟化培養を行った。細胞を 15 mL チューブに回収し、TrypLE 1 mL を加え 37°C で 10 分加温した。P1000 もしくは電動ピペッターで細胞に機械的な刺激を与え、分解が不完全であればもう一度 10 分間加温した。概ね 2、3 週の加温とピペティングを行い、細胞をシングルセル化した。Stage 6 培地もしくは Advanced DMEM/F12 を 4 mL 加え、混和後スイングローターで 1000 rpm、5 分間の遠心を行った。遠心後上清をすてペレットをタッピングによりほぐし、もう一度 S6 培地もしくは Advanced DMEM/F12 を 5 mL 加え遠心した。その後細胞を S6 培地に回収し、100 μ m strainer に通して $0.5-1 \times 10^6$ cells/mL に懸濁し低吸着 6 well plate (CORNING, Cat.# 3471) へと 5 mL/well で播いた。37°C インキュベーター内のローテーター (95 rpm (WAKEN) もしくは 91 rpm (TAITEC)) に乗せ 48 時間の培養を行うことで、再びスフェロイドを形成した後次の培地交換を行った。培地交換は 6 well plate 内で行い、可能な限り培地を除去した後 5 mL の新しい S6 培地を添加した。培地交換は 2、3 日に一度行った。

免疫細胞化学を用いた細胞の分化率評価

分化培養 8 日目 (膀胱前駆細胞)、13 日目 (内分泌前駆細胞)、21 日目 (膀胱 β 細胞) の細胞を培地ごと 30 μ L とり 1.5 mL チューブに入れ、上清を廃棄する。TrypLE Select 200 μ L を添加し 37°C インキュベーター内で 5 分間加温する。P200 を用いたピペティングにより、機械的刺激を与えスフェロイドを単細胞化する。その後 Advanced DMEM/F12 800 μ L を添加し、混和後スイングローターにて 1000 rpm で 5 分間の遠心を行う。遠心後上清を破棄しタッピングによりペレットをほぐす。細胞を回収したステージの分化培地で懸濁し、

Synthemax II でコーティングした 96 well plate もしくは 384 well plate へと 100 μ L/well で再播種した。翌日細胞を固定するため、4% Paraformaldehyde in PBS (4% PFA) を添加し (96 well plate の場合はそのまま 100 μ L の 4% PFA 添加、384 well plate の場合は 50 μ L の培地を除いて 50 μ L の 4% PFA 添加)、室温で 15 分静置する。その後 well 内の液をすべてピペットマンで除去し、4% PFA を添加し (96 well plate は 200 μ L、384 well plate は 100 μ L) 室温で 15 分静置する。ピペットマンで well 内の液を除去した後、PBS (-) を添加し (96 well plate は 200 μ L、384 well plate は 100 μ L) 染色作業まで 4°C で保存する。

固定した細胞を 0.1 % Tween-20 in PBS (-) (PBS-T) にて 3 度洗浄し、1% TritonX-100 in PBS (-) を加え室温で 10 分静置した。その後 PBS-T で一度洗浄したのち、5×Blocking One in PBS-T (Blocking One) に置換し室温で一時間静置した。Blocking One に一次抗体を希釈した一次抗体液を作成し、これに置換し 4°C で一晩静置した。翌日 PBS-T で 3 度洗浄し、Blocking One に二次抗体を希釈した二次抗体液を加えた。室温で 1.5 時間、遮光し静置したのち PBS-T で 3 度洗浄し、PBS-T に浸した状態で ImageXpress Micro scanning system (Molecular Devices) で撮影、MetaXpress cellular image analysis software (Molecular Devices) を用いて解析を行った。解析に使用した抗体は表 4 に示す。

S3 end の細胞を用いた PDX1 染色強度評価

S3 end の細胞を 96 plate に再播種した後、上記と同様の手順で免疫細胞化学を行い写真を取得した。各視野における核の位置を染色した DAPI と、PDX1 を染色した単色の Tiff 画像を取得し、ImageJ を用いて解析を行った。まず、DAPI の画像を Threshold から二値化し、核の位置を取得し ROI (Region of Interest) とした。次に同視野の PDX1 染色画像について、Subtract Background により背景ノイズを除去した後 ROI 内の染色輝度を測定した。核毎の平均シグナル強度を集計し、ヒストグラムに示した。

フローサイトメトリーを用いた細胞の分化率評価

分化細胞の分化率を評価するため、フローサイトメトリーを用いて細胞の性質を調査した。分化 21 日目 (Stage 5 end) の細胞を 1 well 毎に 1.5 mL チューブに回収し、培地を除き一度 D-PBS (-) 1 mL を加え洗浄後、TrypLE Select 200 μ L を添加し 37°C インキュベーター内で 5 分間加温する。P200 を用いたピペッティングにより、機械的刺激を与えスフェロイドを単細胞化する。その後 Advanced DMEM/F12 800 μ L を添加し、混和後スイングローターにて 1000 rpm で 5 分間の遠心を行う。遠心後上清を破棄しタッピングによりペレットをほぐす。上清を捨て 4% PFA を加え 30 分室温で静置し、再び同条件で遠心した後 D-PBS(-) に置換し 4°C で保存した。1.5 mL MPC チューブへ 5×10^5 cells/tube の細胞を入れ、スイングローターを用いて 1000 rpm、5 分遠心した後、1% Triton を加え 10 分室温で静置した。その後再びスイングローターで 1000 rpm、5 分遠心し D-PBS (-) wash を行った。1× Blocking One in PBS-T (以下 B.O. と記載) を加え室温で一時間置きブロッキングを行う。液量は、一次抗体を当てないネガティブコントロールを用意する分を含め、1 サンプルあたり 20 μ L とした。Blocking One 中に希釈した一次抗体液 (Rabbit anti-C-peptide: 1/300、Mouse anti-NKX6.1:

1/300) を 5 μ L 加え、軽いピペッティングとタッピングにより懸濁後 4°C で静置した。ネガティブコントロールに関しては一次抗体液の代替として B. O. を 5 μ L 添加した。翌日 Blocking One で 3 度洗浄した後、B. O. 中に希釈した 2 次抗体液 (anti-Rabbit alexa 488: 1/1000、anti-Mouse alexa 647: 1/1000) を 100 μ L/tube の液量で加え、遮光し氷上で 2 時間静置した。Blocking One で 3 度洗浄し、PBS(-)に置換後 Falcon® セルストレーナー 5 mL チューブ用 35 μ m (Cat. #352235)に通した。BIO-RAD S3e セルソーターを用いて細胞評価を行った。FSC、SSC パラメータを用いて単一細胞集団を特定したのち、蛍光強度から C-peptide 若しくは NKX6.1 陽性細胞を特定し定量した。細胞集団のゲーティングには R と、そのパッケージである flowCore を用いた。

逆転写定量 PCR を用いた遺伝子発現解析

評価する細胞から RNA を抽出し、逆転写の後定量 PCR を行うことにより遺伝子発現を解析した。RNeasy Micro Kit (QIAGEN) 若しくはシカジーニアス® RNA プレップキット (組織用) (関東化学株式会社) を用いた。RNeasy Micro Kit については、手法は添付のマニュアルに従った。シカジーニアスについては概ね添付のマニュアルに従った。ただし、Buffer LYS で溶解後一度 SV Column type F にロードし遠心したのち、Qiagen RNeasy Micro Kit 付属の DNase I を Qiagen プロトコルと同様に使用した。次に、PrimeScript™ RT Master Mix (Takara) を用いて、抽出した RNA の逆転写を行った。サーマルサイクラーを用いて、37°C 15 分、85°C 5 秒、4°C 維持の条件で反応を行った。逆転写後の cDNA は -20°C で保存し、定量 PCR に使用した。逆転写の組成は表 5 に示す。

遺伝子発現量の解析のため TB Green® Premix Ex Taq™ II (Takara) を用いた定量 PCR を行った。反応液の組成は表に示す。反応には Takara Dice Real Time System III を使用し、95°C 15 秒、60°C 30 秒を 40 サイクル行った。使用したプライマー配列は表 6、表 7、表 8 に示した。

膵臓前駆細胞を用いた Bulk RNA-seq

K-3 添加後 48 時間後の細胞における遺伝子発現変動を網羅的に解析するため、膵臓前駆細胞の RNA を抽出してトランスクリプトーム解析を行った。サンプルの準備方法は以下の通りである。RNeasy Micro kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。抽出後の RNA の品質・収量は NanoDrop により確認した。回収した RNA は NovoGene 株式会社により RNA-seq にかけて、シグナルデータの解析と遺伝子発現量の定量が行われた。解析には R パッケージの DeSeq2 が用いられ、各遺伝子にマップされたリードナンバーの定量と、100 万個のマップされたフラグメント当たりのエクソン 1 kb のリード数 (fragments per kilobase of exon per million reads mapped, FPKM) の計算が行われた。得られた遺伝子発現データは発現変動の大きさと統計的処理により、有意に発現変動を示した遺伝子 (Differential expression genes, DEG) に絞り込まれた。発現変動の閾値は、コントロール条件と比較して 1.5 倍を超える、もしくは 2/3 未満であることとした。統計的処理は Wald test を行い、p 値の有意水準は 0.05 とした。p 値として adjusted p value を使用した。このように絞り込んだ DEG を用いて、よ

り詳細な解析を行った。Gene ontology 濃縮解析 (GO 解析) は Metascape もしくは R ソフトウェアを利用した。

ヒト iPS 細胞由来 β 細胞を用いたグルコース応答性インスリン分泌試験 (GSIS)

ヒト iPS 細胞から分化誘導し得られた β 細胞を分取し、24 well プレートトランズウェル (CORNING, cat. #3415) の上層に細胞を入れた。反応時の液量は上層 100 μ L、下層 24 well プレートは 600 μ L とした。GSIS の反応中、細胞を入れた 24 well プレートは 37°C インキュベーター内で、70 rpm で回転した。反応に使用した KRB バッファ어의組成は表 9 に示した。3 mM グルコース含有 KRB バッファ어 (低グルコース、LG) で 10 分間のインキュベートを 3 回、30 分間のインキュベートを 1 回行い洗浄した。続けて LG で 30 分間のインキュベート後、下層から 50 μ L の溶液を回収した (LG 30 min)。50 μ L の溶液を回収した下層に対して新たに高濃度のグルコースを含有した KRB バッファ어を添加し、全体のグルコース濃度を 3 mM から 20 mM に調整し、高グルコース刺激を開始した。高グルコース刺激の開始から 10 分後、30 分後、60 分後にそれぞれ下層から 50 μ L の溶液を回収し、それ HG 10 min, HG 30 min, HG 60 min とした。各時点での溶液回収後は等量の 20 mM グルコース含有 KRB バッファ어を補充し、全体の体積は一定に保った。HG 60 min の回収後、下層に KCl 溶液を添加し、系全体を 20 mM KCl として 30 分インキュベートを継続した。KCl を含むすべての溶液を回収した後、測定まで -80°C で保存した。C-peptide 濃度の測定には C-peptide AlphaLISA (PerkinElmer, cat. #AL299 C/F) を使用した。

ダイナミック GSIS

時間分解能をより上げた GSIS を行うため、還流系を用いた GSIS を行った。BRANDEL: SF-6 システムを用いて、ペリスタポンプにより KRB バッファ어를還流した。細胞は LG KRB バッファ어で加水した Bio-Gel® P-4 Media (BIO-RAD, Cat. #150-4124) に挟みチャンバー内に設置し、バッファ어를 100 μ L/min の流速で細胞に処理した。チャンバーは 37.5°C に加温したウォーターバス内に設置し、温度を一定に保った。LG 曝露を 90 分行い安定化させた後、LG を 32 分、HG を 28 分、LG を 32 分、そして 20 mM KCl を 30 分細胞に処理した。細胞の入ったチャンバーを通過したバッファ어は 2 分から 8 分毎に 1.5 mL MPC チューブに回収した。GSIS 後の C-peptide 濃度と細胞数推定は Transwell を用いた GSIS と同様に行った。

DNA 定量による細胞数推定

GSIS を行った後の細胞について、AllPrep DNA/RNA micro kit (Qiagen, cat. #80284) により DNA を抽出した。抽出後の DNA 濃度は Qubit assay (Life Technologies, cat. #Q32854) により測定した。1 細胞当たり 6.6 pg の DNA を持つという先行報告 (Kapp et al. 2015) を元に、定量後の DNA 収量から細胞数を推定した。

培養 21 日目における細胞数計算

iPS 由来 β 細胞の細胞数を、Stage 5 end である培養 21 日目に測定した。スフェロイドは 15 mL チューブに回収後、上清を捨て、TrypLE Select を添加し 37°C で 5 分間インキュベートした。ピペッティングにより細胞塊を分解し、Advanced DMEM/F12 を TrypLE の 4 倍量添加して TrypLE の反応を停止した。単細胞化の完了した β 細胞について、Countess により細胞数を測定した。

Ub-AMC アッセイ

Ub-AMC アッセイは、脱ユビキチン化酵素と基質であるユビキチンを反応させ、その反応速度を測定する試験である。基質であるユビキチンには蛍光色素が結合しており、これはユビキチンと結合している間は蛍光を発さず、脱ユビキチン化酵素により分離されることで蛍光を発する。この蛍光強度を経時的に測定することで、酵素の反応速度を測定する（エラー! 参照元が見つかりません。A）。試験に用いる酵素は Ub-AMC アッセイバッファーで 0.025 μ M に希釈し、4 °C で一晩静置した。翌日、酵素液 40 μ L、最終濃度の 50 倍濃度の化合物(DMSO, 0.1 mM K-3, 0.5 mM K-3) 1 μ L を蛍光測定用 96 well white plate (Thermo Fisher Scientific #236105) に加え振とうし、室温で 30 分間静置した。その後高感度マルチモードプレートリーダー GloMax® Discover System を用いて励起光 365 nm、蛍光 415-445 nm で検出を行った。測定時にはプレートリーダー内の温度を 30 度に設定し、測定前に 10 秒間の振とうを行った。次に Ub-AMC 基質 (R&D) を MilliQ で 2.85 μ M に希釈し、10 μ L 添加した。基質添加前と同様にプレートリーダーで測定を行った。この時の時間を 0 分として、5 分、10 分、その後 10 分置きに 120 分まで測定を行った。

ImageJ を用いたスフェロイドの面積・離心率評価

分化培養を行ったスフェロイドを培養 8 日目 (Stage 3, S3)、13 日目 (S4)、17 日目 (S5-1)、21 日目 (S5-2) に倒立顕微鏡に設置したカメラによって撮影した。撮影した Tiff 画像データを ImageJ に読み込み、以下の手順で解析を行った。スケールバーの長さを直線ツールで選択し、Analyze/Set scale から長さの設定を行う。Image/Type/8-bit で画像を白黒にする。Image/Adjust/Threshold で画像を二値化する。Process/Binary/Watershed でスフェア一つ一つに分離する。Analyze/Analyze particle により解析を行う。その際、exclude on edges にはチェックを入れておく。得られたデータの内 Area、Major、Minor の値を用いて面積、離心率の集計を行う。面積は Area の値をそのまま用いる。離心率は $\frac{\sqrt{Major^2 - Minor^2}}{Major}$ と計算した。集計の際には分離できていないスフェロイドや異常値を除くため、Area < 100,000、Major < 400、Major > 140 の閾値を設け、条件から外れたスフェロイドについては計算から除外した。

統計的解析

N = 3 以上のデータについて、特に記述した場合を除いて平均 $\pm$ 標準偏差で値を示した。

箱ひげ図については中央値を示した。有意差検定は Dunnet's multiple comparison test、Tukey's honestly significant difference test、Welch's t-test、Wald test を用いて行った。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ と示した。

第3章 実験結果

3-1. 膵臓前駆細胞期間を含む K-3 添加は、ヒト iPS 細胞の β 細胞への分化誘導効率を向上させる

当研究室において構築した、段階的に分化培地の組成を変更し培養する膵臓 β 細胞への分化誘導系を用いて、京都大学 iPS 細胞研究所 CiRA より供与されたヒト iPS 細胞株 Ff-I01s01 株の膵臓 β 細胞への分化誘導を行った。ヒト膵臓の発生を模倣し、内胚葉 (Definitive Endoderm: DE)、膵臓前駆細胞 (Pancreatic Progenitor: PP)、内分泌前駆細胞 (Endocrine Progenitor: EP)、内分泌細胞 (Endocrine Cells: EC) (膵臓 β 細胞) の段階を経由し、21 日間の分化培養を行った (図 4A)。K-3 添加による膵臓分化誘導効率への影響を検証するため、膵臓前駆細胞段階である Stage 3 (以下 S3)、内分泌前駆細胞段階である Stage 4 (S4)、膵臓 β 細胞段階である Stage 5 (S5) に時期を区切り、各ステージの分化培地にのみ K-3 を添加する条件と、S3 から S5 すべての分化培地に K-3 を添加する条件 (S345) を比較した。明視野で観察した細胞の写真を図 4B に示す。S3、S4 で K-3 を添加した条件では、S4 の段階からスフェロイドの周辺の輪郭が滑らかになった。S5-2 end の細胞の形態はより球に近くっており、更にスフェロイドの色も黄色がかっているものの割合が大きくなっていることが観察できる。

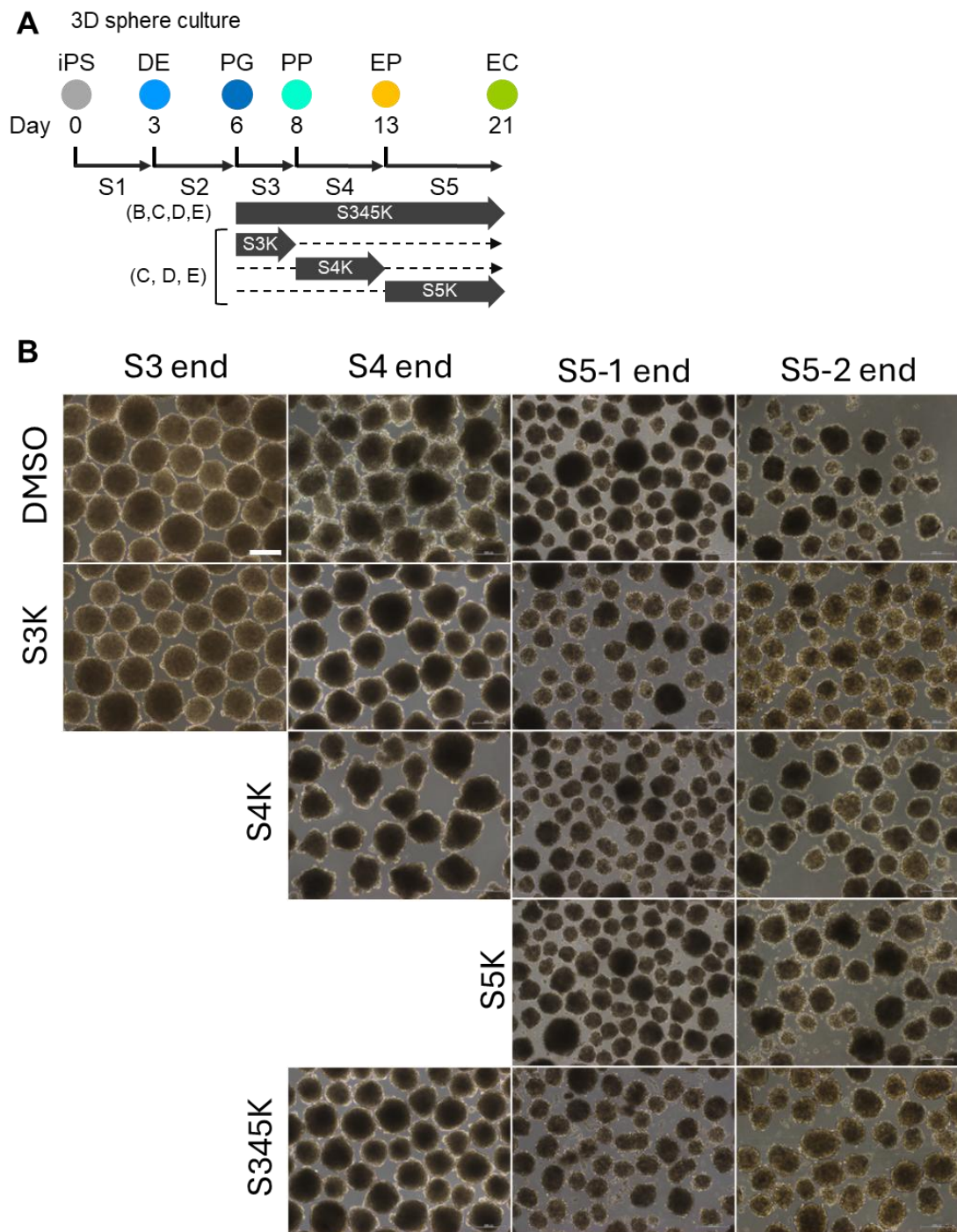


図 4. ヒト iPS 細胞株を用いた膵臓分化誘導の概要図と明視野観察結果

A. ヒト iPS 細胞を用いた分化誘導の実験概要図。K-3 は S3 から添加を開始し、S3 のみの添加 (S3K)、S4 のみの添加 (S4K)、S5 のみの添加 (S5K)、S3、4、5 全ての培地に添加した S345K の 4 種類の添加条件を用意した。iPS: induced Pluripotent Stem cell、DE: Definitive Endoderm、PG: Primitive Gut Tube、PP: Pancreatic Progenitor、EP: Endocrine Progenitor、EC: Endocrine Cell (β 細胞)。

B. S3 (培養 8 日目)、S4 (13 日目)、S5-1 (17 日目)、S5-2 (21 日目) 終了時における

細胞の明視野写真。Scale bar = 200 μ m。

S5 終了時の細胞の分化効率をフローサイトメトリー及び免疫細胞化学により評価した。フローサイトメトリーでは、インスリンペプチドのプロセッシングにおいて産生される C-peptide と、 β 細胞への分化に必須な転写因子である NKX6.1 の二つを検出した。解析のために R を使用し、フローサイトメトリーにより生成されたデータの読み込みとゲーティングによる解析・定量を行った (図 5A)。K-3 が発見されてきたスクリーニング系と同様に、S345 での K-3 添加は、K-3 を添加しないコントロール条件と比較して有意にインスリンを産生する β 細胞への分化効率が向上していた (図 5B)。更に、S3 のみ K-3 を添加していた条件においても、S345 とほぼ同程度に分化効率は向上していた。免疫細胞化学では C-pep、NKX6.1 に加え PDX1 を同時に検出し (図 5C)、これらのマーカータンパク質の陽性率を評価した。こちらでもフローサイトメトリーと同様に、S3 のみ K-3 添加条件において S345 と同等の分化促進効果が得られていた (図 5D)。

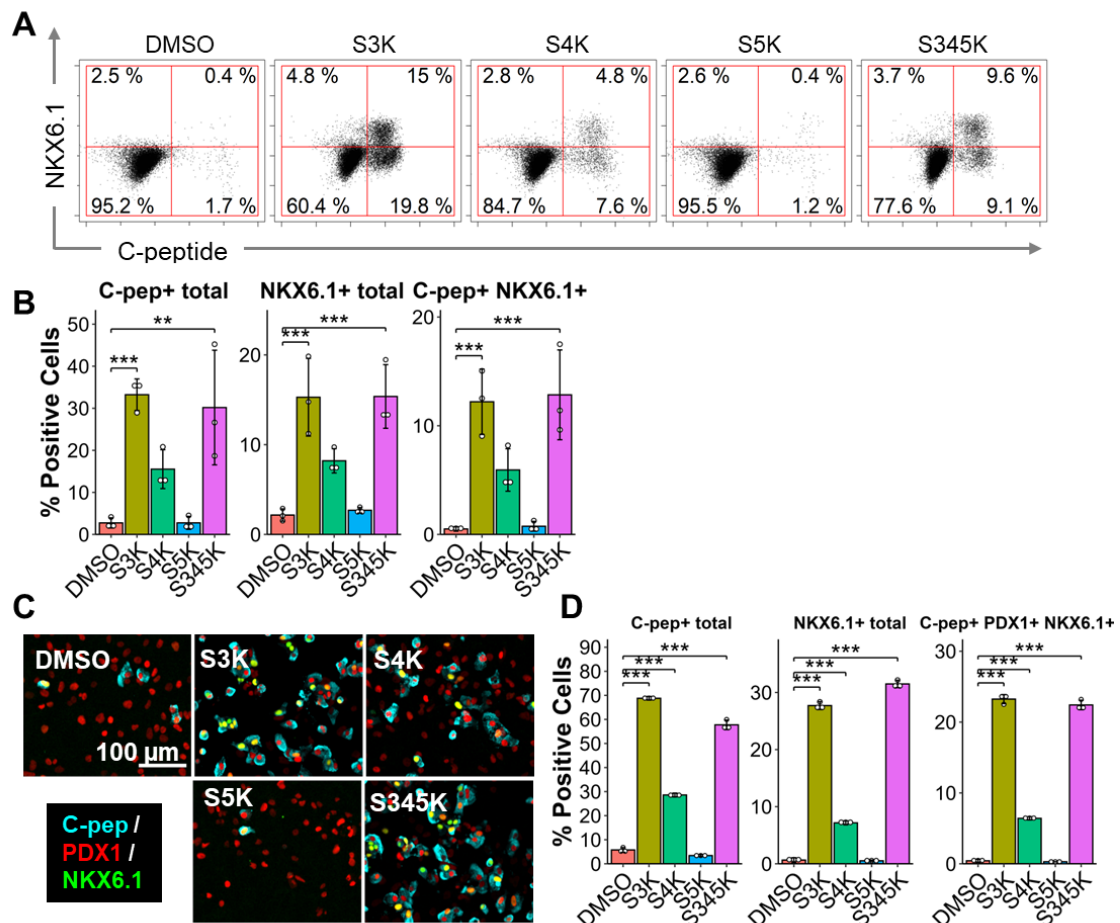


図 5. K-3 添加はヒト iPS 細胞の β 細胞への分化を促進した

A. S5 end の細胞に対し行ったフローサイトメトリーの結果。横軸は C-peptide、縦軸は NKX6.1 の染色強度を示す。四隅の数字は、プロットされた全細胞のうち内各領域

域に含まれる細胞の割合を示す。

B. A に示したフローサイトメトリーの結果を定量した。

C. S5 end の細胞に対し行った免疫細胞化学の写真。シアンは C-peptide、赤は PDX1、緑は NKX6.1 を示す。Scale bar = 100 μ m。

D. C に示した免疫細胞化学の結果を定量した。

B、D について、 $n=3$ 、平均 $\pm$ 標準偏差で示した。統計検定は Dunnett's multiple comparison test を行い、DMSO (コントロール条件) と他条件を比較した。 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 。

分化させた β 細胞の機能性について、グルコース応答性インスリン分泌試験 (GSIS) を行った。ヒト膵臓 β 細胞は血糖値の上昇に応答しインスリンを分泌し血糖値を制御する機能を持つ (Dorrell et al. 2016) ため、作成した iPS 細胞由来 β 細胞もグルコースへの応答性を持つことが期待される。K-3 添加時期毎に比較すると、S3 と S345 で K-3 を添加した条件ではグルコース濃度の変化に応じて C-pep の分泌速度が上昇していた (図 6A)。また、S5 end における細胞の残存数 (図 6B) を測定したところ、S345 での K-3 添加により収量の増加が見られた (図 6C)。収量増加傾向は S3、S4 条件でも見られるものの、その効果は S345 に比較して微弱であった。これらの結果から、ヒト iPS 細胞を用いた分化誘導系に K-3 を添加することで β 細胞への分化効率を向上させることを確認した。また、S3 における K-3 添加は、分化促進効果を発揮するのに十分であることが明らかとなった。一方で、収量改善の面では S3 のみの K-3 添加より S345 での添加がより効果的であった。

また、細胞のより詳細な機能性を評価するため、S345 に K-3 を添加した条件の細胞を S5 終了後に再凝集を行い、さらに成熟化培養を行ったもの (S6) を用いて還流系を用いたインスリン分泌試験であるダイナミック GSIS を行った (図 6D)。ペリスタポンプによりバッファーを還流し、細胞に連続的に曝露させ、時間ごとに区切りフラクションを回収した。フラクションの回収前に 90 分間の低グルコースバッファーを還流した後、108 分間の反応試験を行った。コントロール条件ではグルコースに対する反応性は弱いを示されなかったのに対し、K-3 添加条件では両実験回ともに高グルコースに反応して急峻なインスリン分泌を示し、5 分程度の後その分泌速度はある程度低下した。これはヒト膵島における二相性インスリン分泌に近いものであり、理想的な機能性を持っていることを示唆している。

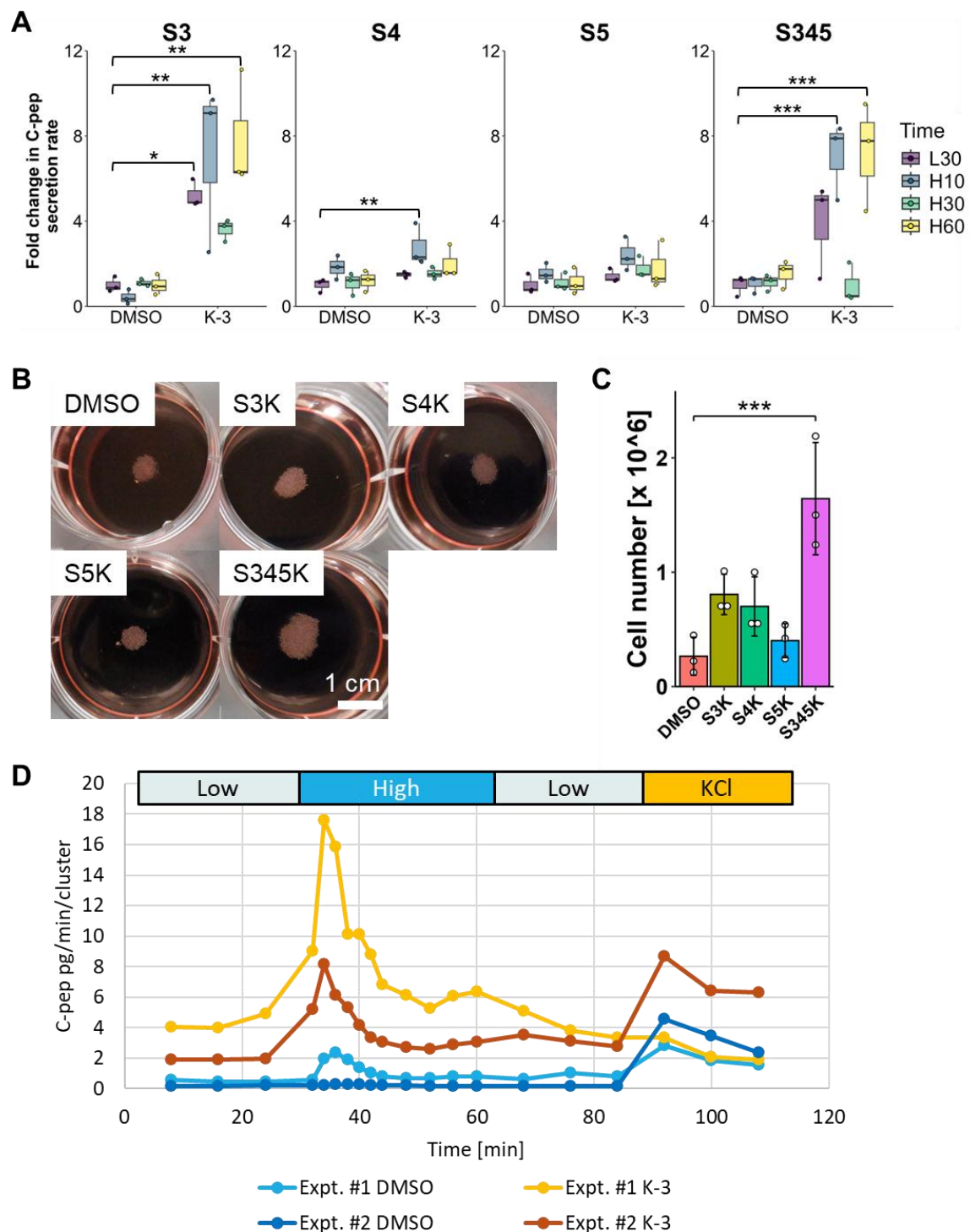


図 6. K-3 添加は β 細胞の機能性と収量を増加させた

A. 糖応答性インスリン分泌試験 (GSIS) 結果。各コントロールの始めの低グルコース曝露 30 分の値 (L30) を基準とし、分当たり、細胞当たりの C-pep 分泌速度を示した。検定は Dunnett's multiple comparison test を用いて行い、各コントロールの L30 と他データを比較した。それぞれ $n = 3$ 。

- B. S5 end での細胞の残量。6 well plate 内で培養していた細胞をデジタルカメラで撮影した。
- C. B の細胞塊を単細胞化し、細胞数測定を行った結果。平均±標準偏差。Dunnett's multiple comparison test により、DMSO（コントロール）と他条件とを比較した。
- D. S6 の細胞を用いたダイナミック GSIS による細胞機能性検証結果。K-3 は S3 から S5 の期間に添加している。二度の実験回から DMSO、K-3 各 n=1 のデータを記載した。

3-2. 膵臓前駆細胞段階におけるトランスクリプトーム解析は、K-3 添加による膵臓分化に関連した遺伝子の発現変動を示す

前項において S3 での K-3 添加が β 細胞への分化促進に十分であることが示されたため、S3 の細胞についてより詳細な解析を行った。S3 終了時における細胞のトランスクリプトーム解析を行うことで K-3 添加による直接的な影響の検出を試みた。K-3 添加後 2 日間の細胞を回収し、バルクでの RNA-seq を行った（図 7A）。定量された遺伝子の発現量をもとに、K-3 添加条件において有意に発現が変動した遺伝子（DEG）を抽出した。K-3 を添加していないコントロール条件と比較して発現比が 1.5 倍を超える、もしくは 2/3 を下回り、p-adj が 0.05 未満であった遺伝子を DEG と定義した。結果、有意に発現が上昇した遺伝子は 82 個（全遺伝子の内 0.46%）、低下したものは 230 個（全遺伝子の 1.29%）であった（図 7B）。発現上昇した DEG は表 10 に、発現低下した DEG は表 11 にそれぞれ示す。DEG から発現変動の比の大きかった遺伝子を 40 個ピックアップし、定量 PCR により検証を行った（図 7C-E）。collagen type IX alpha 2 chain (*COL9A2*)、family with sequence similarity 149 member A (*FAM129A*)、alpha-1-microglobulin/bikunin precursor (*AMBIP*)の有意な発現上昇と、ankyrin repeat domain 1 (*ANKRD1*)、R-spondin 3 (*RSPO3*)、regulator of G-protein signaling (*RGS5*)の有意な発現低下の再現を確認した。これらの遺伝子は β 細胞の性質との関与報告はあるが膵臓分化における直接的な働きは明確に調べられておらず、今後分化との関与を明確にすると興味深い結果が得られる可能性がある。

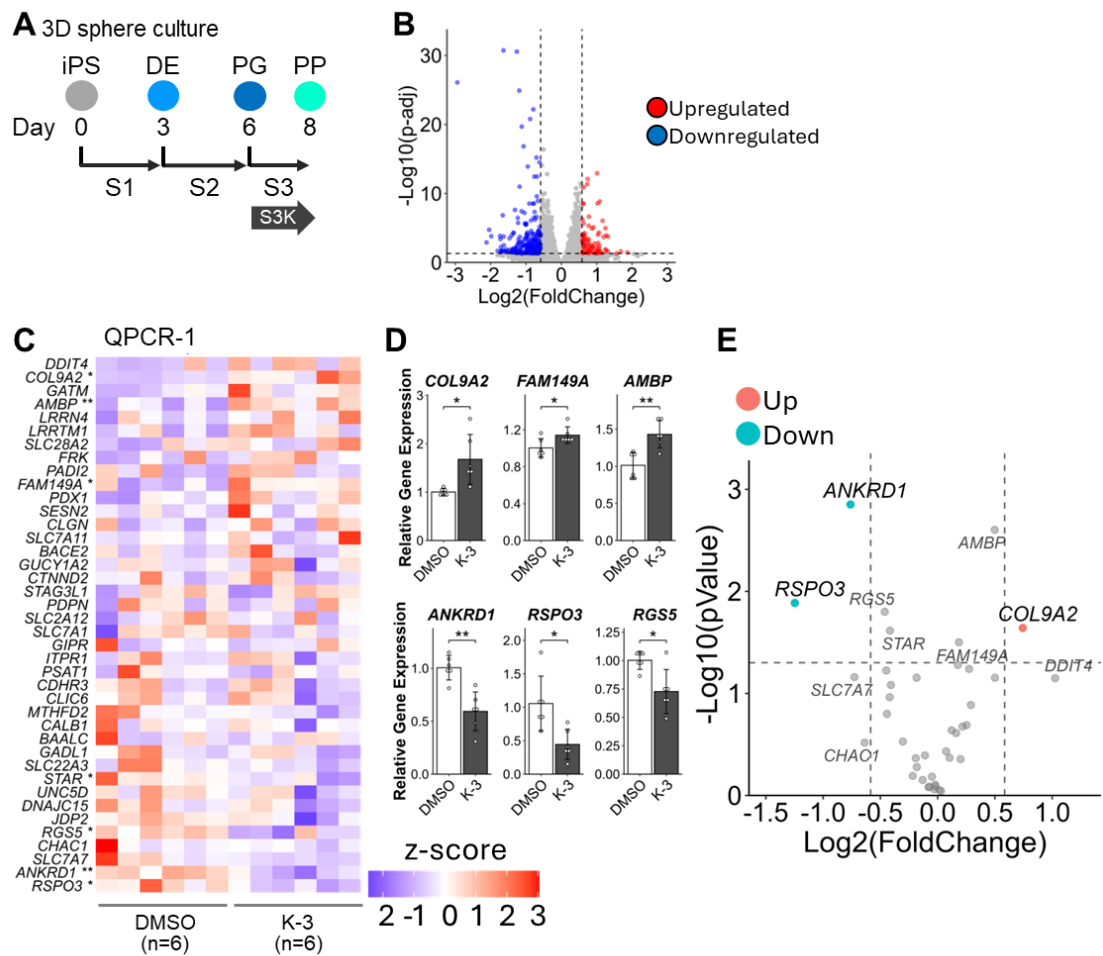


図 7. 膀胱前駆細胞に対する K-3 添加は複数の遺伝子発現を制御した

- A. RNA-seq に向けた細胞培養日程の概要図。培養 6 日目に K-3 添加を開始し、2 日後の培養 8 日目に細胞を回収した。
- B. RNA-seq により定量された遺伝子発現データをボルケーノプロットに示した。横軸は K-3 添加条件におけるコントロール条件と比較した発現の比、縦軸は wald test によって得られた p-adj を示す。発現比が K-3 添加条件で 1.5 倍を超える、もしくは 2/3 を下回り、かつ $p\text{-adj} < 0.05$ であるものを有意に発現が変動した遺伝子 (DEG) として定義した。n = 3。
- C. RNA-seq において発現変動の大きかった遺伝子を選び、定量 PCR により mRNA の発現量を定量した。遺伝子毎に平均 0、標準偏差 1 に標準化した Z-score で示した。各遺伝子の発現変動については Welch's t-test を用いて統計解析を行い、その p 値に応じて遺伝子名の横に記号を付記している。n = 6。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。
- D. C に示した定量 PCR の内、有意差の見られた遺伝子を抜粋し棒グラフで示した。平均 ± 標準偏差。検定については C と同様。
- E. C に示した定量 PCR について、ボルケーノプロットで示した。横軸はコントロール条件と比較した K-3 添加条件における遺伝子発現の比を表す。p 値の計算方法は

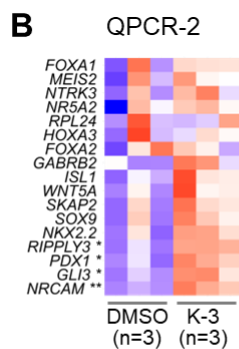
C と同じ。

DEG に含まれる遺伝子リストに対し、R package の clusterProfiler と Web サービスの Metascape を用いて Gene ontology (GO) enrichment 解析を行った。その中でも発現上昇 DEG についての結果を表 12、表 13 にそれぞれ示す。発現が上昇した DEG を用いて行った GO 解析の結果、膵臓分化に関連している type B pancreatic cell differentiation を含む、細胞の分化や発生に関連した GO term の濃縮が確認された (図 8A)。一方で、発現が低下した DEG を用いた GO 解析では、発生に関連した GO term の濃縮は検出されなかった。上昇した DEG から検出された GO term に含まれる遺伝子のリストを R のパッケージである AnnotationDbi により取得し、含まれる遺伝子について定量 PCR により再現性を検証したところ、*PDX1*、*GLI* family zinc finger 3 (*GLI3*)、neuronal cell adhesion molecule (*NRCAM*)、Ripply transcriptional repressor (*RIPPLY3*)の有意な発現上昇を確認した (図 8B-D)。これらの遺伝子は 2 日間の K-3 添加によって発現が変化した遺伝子群であるため、より直接的に K-3 の影響を反映していると考えられる。

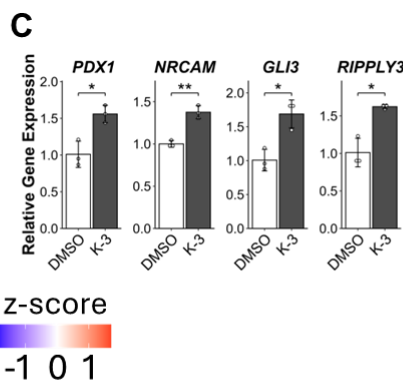
A

Upregulated by K-3		Downregulated by K-3	
Description	p value	Description	p value
nerve development	1.93×10^{-5}	intrinsic component of synaptic membrane	1.05×10^{-4}
integral component of synaptic membrane	2.28×10^{-5}	postsynaptic density membrane	3.58×10^{-4}
intrinsic component of synaptic membrane	3.47×10^{-5}	integral component of postsynaptic density membrane	3.59×10^{-4}
cochlea development	4.17×10^{-5}	extracellular matrix	4.50×10^{-4}
neuron fate specification	7.84×10^{-5}	external encapsulating structure	4.58×10^{-4}
embryonic skeletal system development	1.01×10^{-4}	intrinsic component of postsynaptic density membrane	4.64×10^{-4}
anterior/posterior pattern specification	1.18×10^{-4}	integral component of synaptic membrane	5.08×10^{-4}
type B pancreatic cell differentiation	1.97×10^{-4}	ionotropic glutamate receptor complex	1.88×10^{-3}
enteroendocrine cell differentiation	2.44×10^{-4}	neurotransmitter receptor complex	2.24×10^{-3}

B



C



D

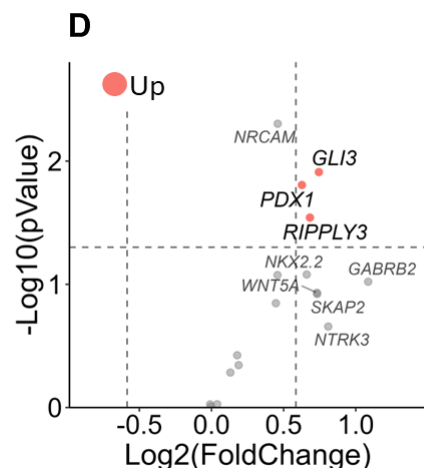


図 8. K-3 により発現が上昇した遺伝子は発生経路に関与した遺伝子が濃縮されていた

A. RNA-seq の結果より、K-3 添加によって有意に発現が変動した遺伝子群について clusterProfiler を用いて行った GO 解析結果。

- B. RNA-seq により、K-3 添加条件で有意に発現が上昇した遺伝子に濃縮されていた GO term に着目し、発生に関連した term に含まれた遺伝子について定量 PCR で検証した結果。発現量は Z-score で示した。Welch's t-test により統計検定を行い、p 値に応じて記号を付記している。n = 3。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。
- C. B に示した定量 PCR より、有意に発現が変動した遺伝子を抜粋したもの。平均 ± 標準偏差。検定については B と同じ。
- D. B に示した定量 PCR について、ボルケーノプロットで示したもの。

3-3. K-3 添加は膵臓前駆細胞の PDX1 発現を増強する

RNA-seq の結果から、K-3 を二日間添加した膵臓前駆細胞では膵臓分化に関連した遺伝子発現変動が起こっていることが明らかになった。そこで、膵臓前駆細胞への分化に必須な転写因子である PDX1 についてより詳細な解析を行った。免疫細胞化学により細胞内の PDX1 タンパク質を染色し、ハイコンテンツイメージングシステムである ImageXpress Micro scanning system (Molecular Devices) で撮影した写真 (図 9A) を ImageJ により解析した。核内に染色された PDX1 の染色強度を定量したところ、K-3 条件ではコントロール条件と比較して PDX1 輝度が増強されていた (図 9B)。また、MetaXpress cellular image analysis software (Molecular Devices) を用いた解析により PDX1 陽性と判定された細胞について、PDX1 の輝度に閾値を設け高輝度と低輝度に分類したところ、K-3 添加条件では PDX1 高輝度の細胞の割合が大きいことが確認できた (図 9C)。また、フローサイトメトリーを用いて PDX1 を検出したところ、免疫細胞化学と同様に K-3 添加による染色強度の増強を確認した (図 9D、E)。前項において定量した *PDX1* の mRNA の発現量の増強をタンパク質の観点からも再現しており、K-3 添加は膵臓前駆細胞での PDX1 の発現を増強していた。K-3 は膵臓前駆細胞に対する添加のみで分化促進効果を示していたが、最もはじめに検出可能な膵臓分化に対する効果が PDX1 の増強であったことを示した。

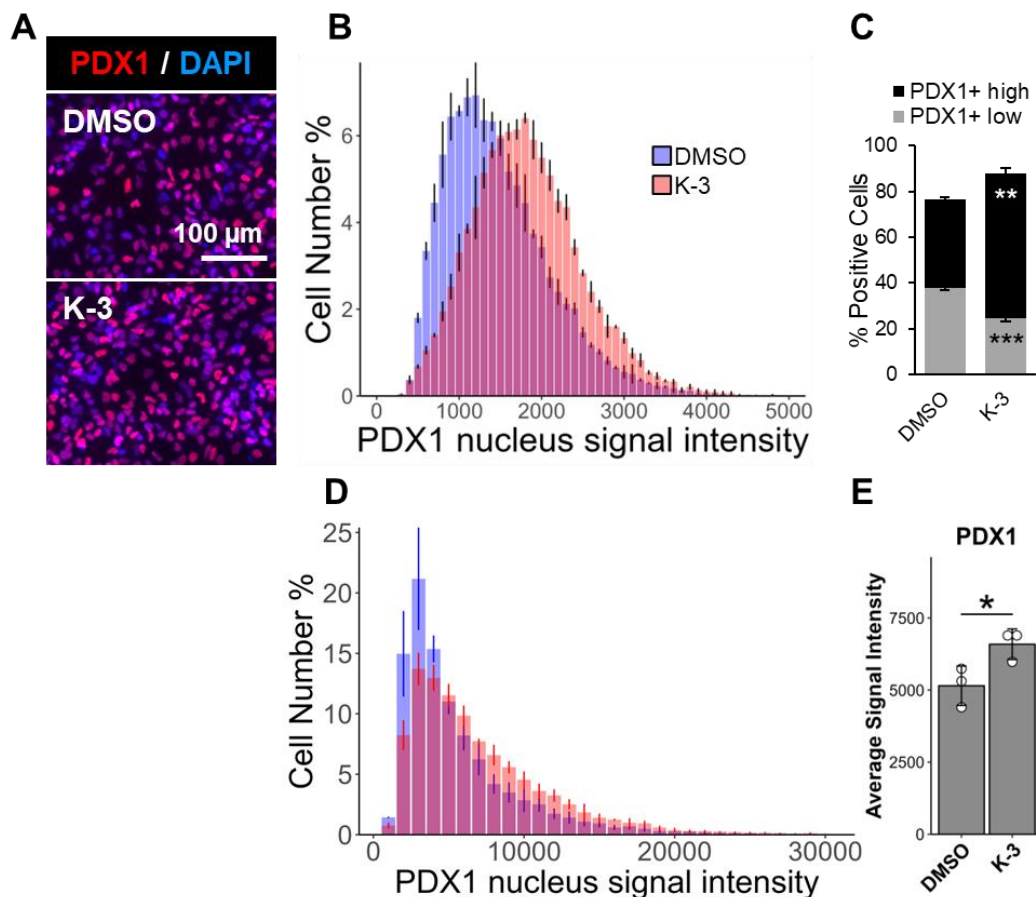


図 9. 膵臓前駆細胞に対する K-3 添加は PDX1 の細胞内存在量を増加させた

- A. S3 end の細胞に対して行った免疫細胞化学の結果。青は核を染色した DAPI、赤は PDX1 を示す。Scale bar = 100 μ m。
- B. ImageJ を用いて集計した細胞内 PDX1 染色強度をヒストグラムに示した。横軸は PDX1 の核内平均強度、縦軸は細胞の存在比率を示す。n = 3。
- C. PDX1 陽性細胞の内、PDX1 の輝度が 1500 未満のものを PDX1+ low、1500 以上の物を PDX1+ high として示した。Low、high どうしを Welch's t-test により比較した。 $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 。
- D. S3 end の細胞に対して行ったフローサイトメトリーにより得られた PDX1 の染色強度をヒストグラムに示した。n = 3。
- E. フローサイトメトリーの結果について、サンプル毎の PDX1 の平均強度を代表値として示した。n = 3。平均 $\pm$ 標準偏差。Welch's t-test により p 値を計算した。 $*p < 0.05$ 。

3-4. 膵臓前駆細胞段階での K-3 添加は膵臓内分泌前駆細胞への分化に寄与する

膵臓内分泌前駆細胞段階である S4 終了時における細胞の分化率について、免疫細胞化学を用いて評価した。添加なしのコントロール条件、K-3 添加条件は S3 のみ (S3K)、S4 のみ (S4K)、S3 と S4 の両方で添加 (S34K) の 4 条件を用意した (図 10A)。NKX6.1 と PDX1

の二つの転写因子を染色し、核内に局在している割合を解析した（図 10B）。結果、K-3 を添加したいずれの条件においても、コントロール条件と比較して有意に NKX6.1+PDX1+ の二重陽性細胞の割合が増加し、膵臓内分泌前駆細胞への分化効率が向上していた（図 10C）。中でも、S3K と S34K の二つの条件では、同程度に二重陽性細胞の割合を大きく向上させていることが判明した。このことから、S3 における K-3 添加は S4 での分化効率向上にも関与していることが示唆された。

更に、S3 と S4 に K-3 を添加し培養した細胞について、S4 終了時の細胞を回収し定量 PCR により膵臓内分泌前駆細胞関連遺伝子の発現量を定量した（図 10D）。Neurogenin-3 (*NEUROG3*)、Paired box gene 4 (*PAX4*)、MAF BZIP Transcription Factor B (*MAFB*) などの遺伝子の有意な発現の上昇が見られ、内分泌細胞としての性質がより強まっていることが示された。一方で NKX6.1 については mRNA レベルでの有意な変動は示されず、その発現上昇はタンパク質レベルに限られたものである可能性が示唆された。

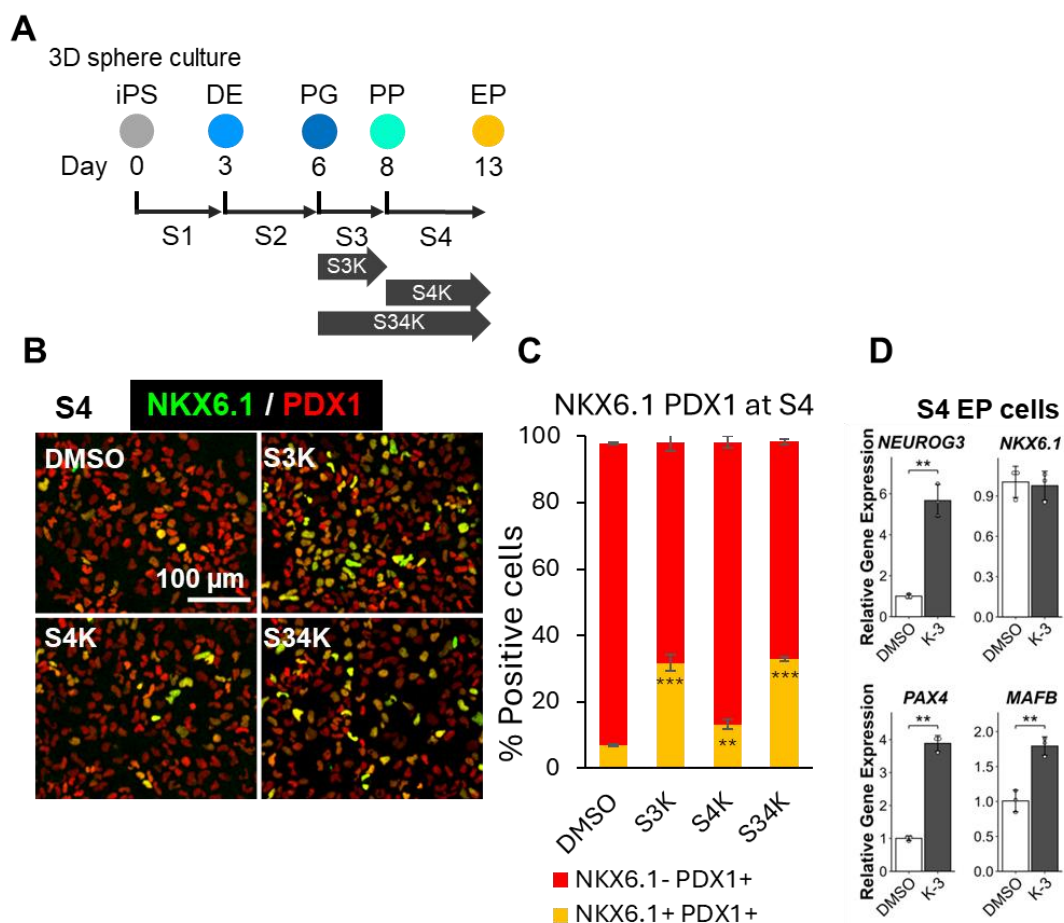


図 10. 膵臓前駆細胞に対する K-3 添加はより効果的に内分泌前駆細胞への分化を促進する

A. S4 までの分化誘導概要図。K-3 添加条件は S3 のみの添加 (S3K)、S4 のみの添加 (S4K)、S3、4 どちらも添加 (S34K) の 3 条件を用意した。培養 13 日目に細胞を

回収し、次の解析を行った。

B. S4 end の細胞に対し行った免疫細胞化学の結果。緑は NKX6.1、赤は PDX1 を示す。

Scale bar = 100 μ m。

C. B に示した免疫細胞化学の結果を定量したもの。黄色は NKX6.1 と PDX1 の二重陽性、赤色は PDX1 単陽性を示す。二重陽性の割合について、Dunnett's multiple comparison test により DMSO と比較して検定を行った。n = 3。** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

D. S4 end の細胞の mRNA 発現量を定量 PCR により定量したもの。平均±標準偏差。

Welch's t-test により p 値の計算を行った。n = 3。** $p < 0.01$ 。

3-5. K-3 添加はより成熟した β 細胞の割合を増加させ、 β 細胞特徴的な遺伝子の発現を上昇させる

ここで改めて膵臓 β 細胞段階の細胞の性質を評価する。S3 から S5 に K-3 を添加して分化誘導を行った細胞を回収し、内分泌細胞において発現するホルモタンパク質を免疫細胞化学により染色した (図 11A)。 β 細胞マーカーの INS、 α 細胞マーカーの Glucagon (GCG)、 δ 細胞マーカーの Somatostatin (SST) 3 種のホルモンを染色した (図 11B)。K-3 を添加し培養した細胞では INS 陽性細胞の割合が増加し GCG 陽性細胞の割合が減少していた。中でも、INS 単陽性の細胞の割合が大きく増加しており、分化が不十分でホルモン多重陽性となっている細胞の割合が K-3 添加により減少していた。

更に、定量 PCR により、 β 細胞関連遺伝子の発現量を定量した。この遺伝子群は、内部標準遺伝子に加え、 β 細胞への分化、成熟化、機能性に重要であると既知であるものを中心に選択した。K-3 添加培養により、INS に加え β 細胞の成熟化に重要である *PDX1*、*NKX6.1*、*PAX4*、*MAFA*、*MAFB*、*ISL1*、*G6PC2*、*GCK*、*PCSK1*、*PCSK2* といった遺伝子群の発現が有意に上昇していた (図 11C、D)。遺伝子発現の観点からも、K-3 添加は β 細胞への分化を促進していたことを示す結果であった。

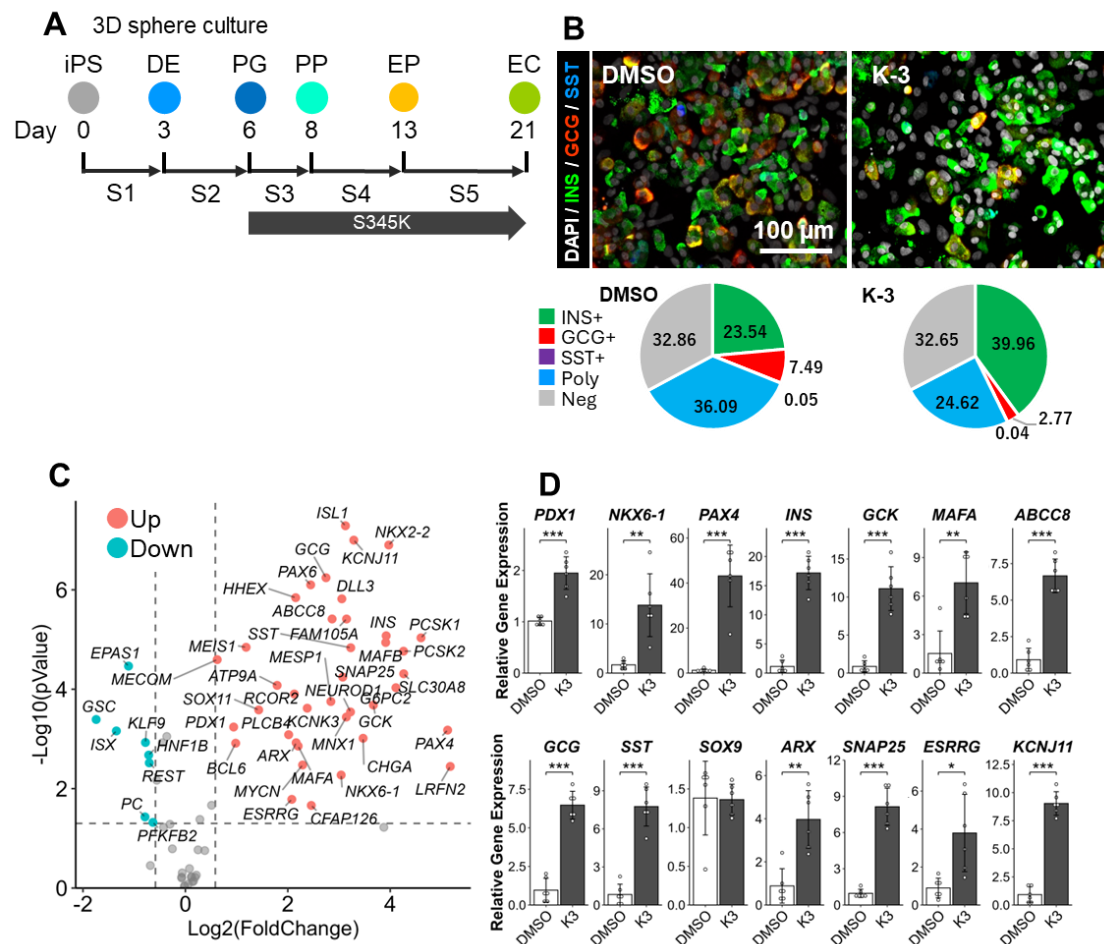


図 11. K-3 の添加はインスリン単陽性細胞を増やし、 β 細胞特異的な遺伝子の発現を上昇させる

- A. S5 までの培養実験の概要図。S3 期間より K-3 を添加開始し、S5 end まで継続して添加した。
- B. S5 end の細胞に対して行った免疫細胞化学の結果。白は核を染色した DAPI、緑は INS、赤は GCG、青は SST を示す。また、円グラフは各ホルモンの単陽性細胞、複数のホルモンの多重陽性、そしていずれのホルモンについても染色されなかった細胞の割合を示す。n = 3。
- C. S5 end の細胞を用いて行った定量 PCR の結果をボルケーノプロットで示したものの。横軸は K-3 条件におけるコントロール条件と比較した発現の比を示す。縦軸は Welch's t-test により計算した p 値を用いた。発現比が 1.5 倍より大きく、p 値 0.05 未満であった遺伝子を有意に発現が変動したものとみなし、プロット上での色を変更している。n = 6。
- D. C に示した定量 PCR の結果から主に有意に発現の変動した遺伝子を抜き出し、棒グラフに示したものの。平均±標準偏差。検定については C と同様。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

3-6. K-3 を添加した細胞は遺伝子発現の変動に伴い形態が変化する

分化培養過程に撮影した細胞の写真を用いて簡易的な画像解析を行い、細胞の形態に明確な変化が発生するタイミングを評価した。K-3 は S3 から S5 まで継続して添加した。S3、S4、S5-1(β 細胞段階前半、培養 17 日目)、S5-2 (β 細胞段階後半、培養 21 日目) 終了時点で撮影した細胞の写真 (図 12A) から、ImageJ を用いてスフェアのサイズを測定し、断面積、離心率を集計した。スフェアの断面積は S3 終了時点では差が見られないが、S4 終了時点では K-3 条件で小さいスフェアの比率が大きくなっていた (図 12B)。この大小関係は S5 終了時まで継続し、一つ一つのスフェアあたりの大きさは K-3 添加条件で小さくなった。離心率は長径と短径の差を示す指標であり、0 に近づくほど真円に近い。離心率については S4 終了時まで K-3 添加有無による差はない (図 12C)。S5 に入ると、K-3 添加条件では離心率が小さくなり、より真円に近づく傾向であった。K-3 添加により細胞塊は小さくまとまり、真円に近い形態へと変化することが分かった。

これは観察して受ける印象と合致しており、K-3 を添加して分化培養を行っている S4 から S5 の時期にかけスフェロイド外郭の細胞の一部が剥離し少し小さいスフェアになる。DMSO 条件は S5 期間に一部スフェアが完全に崩壊してしまうため、最終的に収量が K-3 よりも少なくなる。スフェアの色を見ると K-3 条件では黄色く見えるが、これはヒト臍島やマウス臍島を明視野で観察した様子に類似している。スフェアの色や内部構造まで機械学習して分類することが出来れば、より明確に条件間の差を検出することが出来るのではないかと考える。形態に関しては K-3 添加により均質な最終段階の細胞塊を得ており、ヒトへの移植を想定した大規模培養において均質な細胞製造に有利になると想定される。

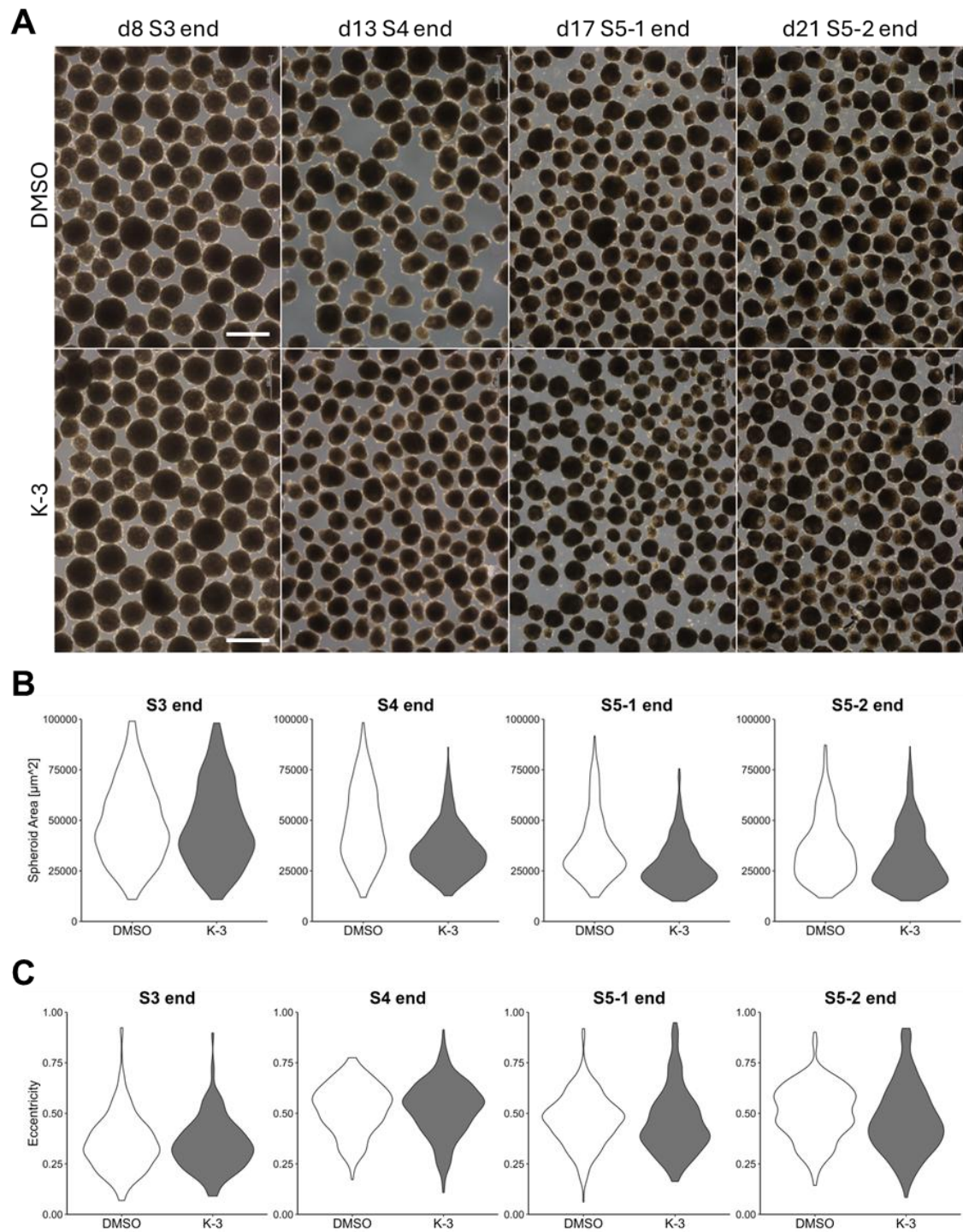


図 12. 膵臓分化に対する K-3 添加はスフェアの大きさ、形に影響を与える

培養過程の S3 end (培養 8 日目)、S4 end (13 日目)、S5-1 end (17 日目)、S5-2 end (21 日目) に撮影した明視野の写真を用いて、スフェロイドの形態の解析を行った。n=5 枚の写真。

A. 培養過程に撮影したスフェロイドの明視野写真。Scale bar = 500 μm

B. スフェロイドの輪郭を元に、球の断面積を求めた。

C. スフェロイドの輪郭の長径と短径を元に、離心率を求めた。

3-7. K-3 の標的候補タンパク質 UCHL1 に関する考察

K-3 が直接結合するタンパク質の候補を大規模データ分析により予測したところ、脱ユビキチン化酵素の UCHL1 が候補として挙げられた。UCHL1 は脱ユビキチン化酵素の 5 つのドメインの一つである UCH ファミリーに属しており、標的タンパク質のリジン残基に結合したユビキチンを加水分解することでプロテアソーム系を介したタンパク質分解の抑制を行う(Goto et al. 2015; Nijman et al. 2005)。このタンパク質は膵臓 β 細胞での発現が知られており、 β 細胞が破壊された際の血中マーカー候補として挙げられている(Leroy et al. 1998)。UCHL1 のノックアウトは脂質ストレス環境下での β 細胞のアポトーシス促進やインスリン分泌機能の低下につながる報告もあり(Chu et al. 2012)、 β 細胞にとって重要な働きをするタンパク質と考えられている。

K-3 が UCHL1 タンパク質の機能性に影響を与えているかどうかを検証するため、ユビキチンの加水分解速度を測定する Ub-AMC アッセイを行った (図 13A)。UCHL1 と、比較のため UCH ファミリーの一員である UCHL5 のリコンビナントタンパク質に対し K-3 を一晩添加し、その後試験を実施した。UCHL1 を用いた実験については、UCHL1 阻害剤(UCHLi)である LDN57444(Liu et al. 2003)を条件に加えた。10 μ M K-3 は UCHL1 の加水分解速度を向上させたため、K-3 による UCHL1 の機能性向上を示唆する結果となった (図 13B)。LDN57444 は文献の通りに UCHL1 の加水分解活性を阻害しており、再現性と実験結果の信頼性の確認ができた。一方で UCHL5 を用いた Ub-AMC アッセイでは、K-3 添加による加水分解速度に変化がなく (図 13C)、K-3 の効果は UCHL1 に特有であることが示唆された。

K-3 が UCHL1 の機能活性化を介して膵臓分化を促進しているという仮説を元に、K-3 と UCHLi は膵臓分化において逆方向の効果を示すと予想した。膵臓分化の S3 期間に UCHLi を添加した細胞を回収し、RNA-seq を行った。p 値が 0.05 を下回りコントロール条件から有意に変動した遺伝子について、K-3 添加条件と UCHLi 添加条件とでどのように重複が発生しているか調査した。興味深いことに、コントロール条件と比較し K-3 条件と UCHLi 条件とで逆向きに変動した遺伝子は非常に少なく (図 13D)、K-3 と UCHLi で同じ発現変動を示す遺伝子は数多くあった (図 13E)。これは *in vitro* で確認した K-3 と UCHLi の逆方向の効果とは異なっており、合理的な説明に困る結果となってしまった。今回の結果からは、培地に添加された K-3 が細胞内で UCHL1 を介して遺伝子の発現を変動させているという結論を得ることはできなかったため、今後新たな標的候補を特定し、K-3 が直接的に作用している経路を発見するための取り組みが期待される。

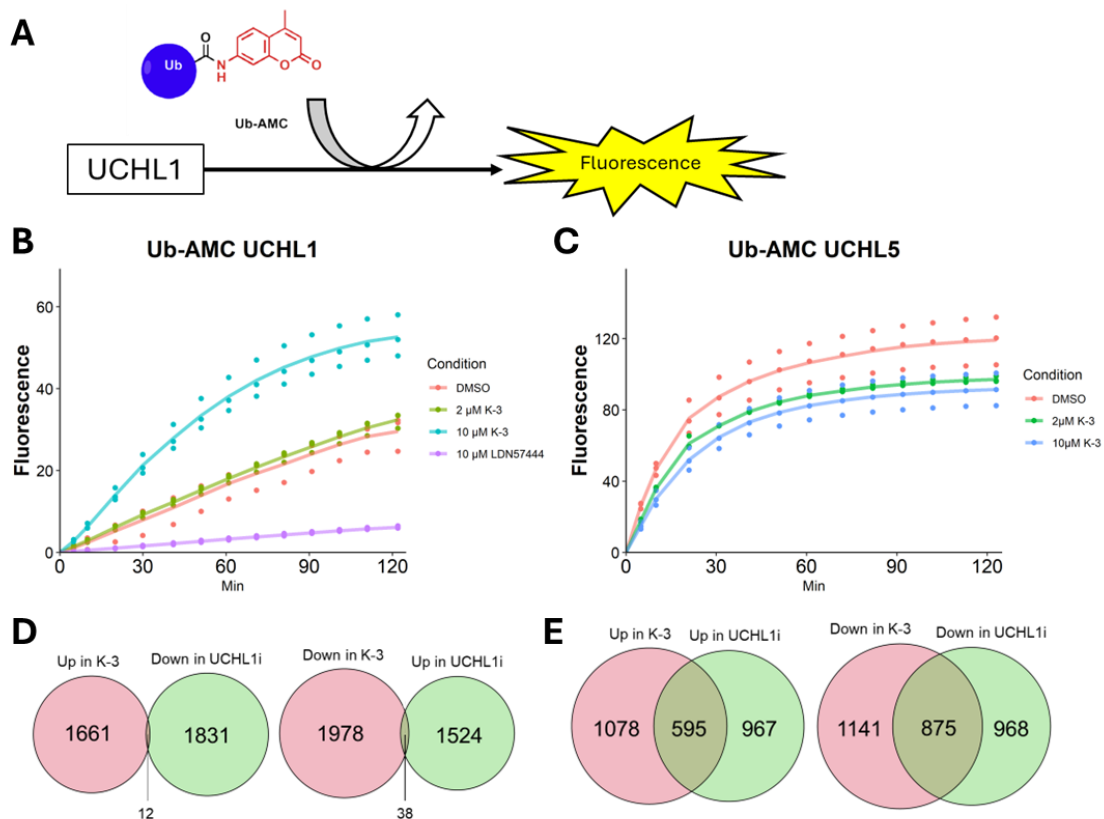


図 13. K-3 標的候補 UCHL1 についての考察

- A. 脱ユビキチン化酵素に加水分解されることで蛍光を発する試薬を用いた、脱ユビキチン化酵素の機能性試験 (Ub-AMC アッセイ) の概要図。
- B. UCHL1 を用いた Ub-AMC アッセイの結果。10 μ M K-3 は UCHL1 の反応性を上げ、阻害剤である LDN57444 は UCHL1 による加水分解反応を阻害していた。n = 3。
- C. UCHL1 と同じ UCH ファミリーの一つである、UCHL5 を用いた Ub-AMC アッセイの結果。K-3 の添加は UCHL5 の反応性に影響を与えなかった。n = 3。
- D. S3 end の細胞を用いて行った RNA-seq の結果。K-3 と同様に LDN57444 を培養 6 日目から 2 日間添加した。コントロール条件と比較して有意に発現が変動した遺伝子のリストを基にベン図を作成した。p < 0.05 である遺伝子を有意に発現の変動 K-3 と UCHL1 阻害剤 (UCHL1i) 添加により、遺伝子発現が逆方向に変動している遺伝子を示した。
- E. K-3 添加と UCHL1i により、同じ方向に発現が変動した遺伝子を示した。

第4章 考察

現在ヒト多能性幹細胞から機能的な膵臓 β 細胞を作成するプロトコルが様々に報告されており、移植の治験を行った報告も上がり始めている(Shapiro et al. 2021; Wang et al. 2024)。移植に向けた細胞製剤の作製はより現場を意識して進めていく段階に入っており、より純度高く、より多くの、機能的な細胞の作製を目指す必要がある。分化誘導を行った細胞の内訳をシングルセル RNA-seq により解析した先行報告(Veres et al. 2019)によると、 β 細胞への分化誘導を行った細胞は全てを目的の細胞種に分化させることはできない。内分泌前駆細胞の時点から α 細胞系譜の細胞が一部出現してきたり、 β 細胞段階では腸でセロトニンを分泌するエンテロクロマフィン細胞のような細胞が出現したりするなど、目的の β 細胞以外の細胞が含まれてしまう。より多くの β 細胞を得るためには、制御が必要な未知の遺伝子経路や細胞の仕組みが存在すると考えられる。これまでの研究で発見され、本研究で主題とした K-3 は、そのようなプロセスに関与する可能性がある。

K-3 による分化促進効果を発揮するには、膵臓前駆細胞段階での添加が非常に重要であった。このことから、K-3 が主に作用するのは膵臓前駆細胞であると考えられる。分化段階が後期に進行してから添加すると、主な標的である膵臓前駆細胞が少なくなってしまう、薬効が減弱すると推定される。一方で、内分泌前駆細胞段階に入っても膵臓前駆細胞が一部残存するために、S3 から S5 までの継続的な K-3 添加は S3 単独添加よりも細胞収量など効果の異なる部分があると考察される。

K-3 添加による遺伝子発現の変動は膵臓前駆細胞段階では限られたものであった。RNA-seq で発現の変動が大きく検出され、定量 PCR によって再現性が確認された遺伝子は、上昇していたものは *COL9a2*、*FAM129A*、*AMBP*、低下していたものは *ANKRD1*、*RSPO3*、*RGS5* であった。*COL9a2* はコラーゲンをコードするタンパク質であり、高脂肪食を与えたマウスの膵臓 β 細胞では発現が低下することが知られている。 β 細胞としての性質維持と関わりがあると考えられ、K-3 添加により発現が上昇したことは β 細胞に有利であると考えられる。*FAM129A* は細胞の増殖に働くが、そのノックダウンは Notch シグナリングの伝達抑制を起こすという報告がある(Liu et al. 2023)。膵臓分化の過程においても Notch シグナリングは運命決定に関与しており(Hosokawa et al. 2014)、K-3 による分化促進効果に直接的・間接的に関係している可能性がある。逆に低下した遺伝子に着目すると、*ANKRD1* は主に心臓に発現する遺伝子である。Wnt シグナリングにより YAP/TAZ 経路が働く際の発現上昇や(Azzolin et al. 2014)Ankrd1 による Wnt シグナリング制御の報告があり(Zhang et al. 2023)、K-3 添加により細胞内において Wnt シグナリングの変動が起きている可能性がある。*RGS5* は膵管細胞で有意に発現が上昇する報告(Mao et al. 2022)があるため、RGS5 の有意な発現低下は内分泌細胞への分化の促進をもたらすと推定される。

また、GO 解析により濃縮が検出されたタームに含まれる遺伝子のうち *RIPPLY3* についても定量 PCR により K-3 添加条件での有意な発現上昇を確認することが出来た。マウス胚での *Ripply3* は膵臓前駆細胞での発現は低い、膵臓内分泌前駆細胞から β 細胞にかけて発現が上昇する(Osipovich et al. 2014)。この先行報告でも *Pdx1* の発現の高い細胞では *Ripply3*

の発現が高い傾向にあるという記述があり、傾向が合致している。一方で *Ripply3* の発現上昇は β 細胞における細胞増殖を抑制する結果も報告されており、今回記載した K-3 による β 細胞の収量増加とは逆の結果と見える。我々の実験系では K-3 による β 細胞への分化促進により後期の分化培地での他系譜細胞の除去が起こりにくくなることで細胞の収量が増加したと考えられ、細胞の増殖が収量にどのような影響を与えたのかはより詳細な解析が必要である。生体内の β 細胞の増殖細胞は 1%未満(Gregg et al. 2012)と言われており、その影響は限定的なものであると考察している。加えて、細胞周期の抑制と細胞の分化は相関すると考えられており(Ruijtenberg and van den Heuvel 2016)、K-3 添加により *RIPPLY3* の発現上昇を介して細胞周期の抑制が起きているならば、これが膵臓分化促進の理由の一つであろうと考えられる。

K-3 添加により S3 の *PDX1* 発現が上昇することにより、その後の膵臓分化が促進されると考察した。膵臓前駆細胞段階では分化に直接関与する転写因子の発現には *PDX1* を除き明確な変化は見られないが、内分泌前駆細胞では *NEUROG3* や *PAX4* などの遺伝子の発現が有意に上昇していた。*NEUROG3* は内分泌前駆細胞に特徴的な遺伝子であり、*NEUROG3* 陽性細胞は α 、 β 、 δ 、PP 細胞全ての細胞種に分化することが知られている(Gu, Dubauskaite, and Melton 2002)。*PAX4* は *NEUROG3* により転写が促進される転写因子であり(Gasa et al. 2004)、*ARX* と拮抗して以降の細胞の運命決定を担う(Collombat et al. 2003)。*PAX4* は $\beta \cdot \delta$ 細胞系譜へ、*ARX* は α 細胞系譜へとそれぞれ誘導する。

β 細胞段階における細胞の遺伝子発現を確認すると、K-3 を添加した条件では β 細胞特徴的な遺伝子である *INS* や *NKX6.1* などの遺伝子の発現の有意な上昇が確認された一方で、*ARX*、*GCG*、*SST* などの他細胞種の遺伝子の発現も上昇していた。これは K-3 添加による分化促進が膵臓前駆細胞段階から始まっていることにより、全体的に内分泌細胞への分化が促進されていることが原因であると考えられる。発現が有意に上昇していた遺伝子の発現比について比較すると、 α 細胞へと細胞を誘導する *ARX* はコントロール条件と比較し約 4 倍の発現量であるのに対し、 β 細胞へと誘導する *PAX4* は約 40 倍であった。また、*GCG* は約 6 倍、*SST* は約 8 倍であるのに対し、*INS* は約 16 倍であった。これらのことから、全体的に内分泌細胞への分化が底上げされた上で、 β 細胞へと細胞を分化させる効果が発揮されているといえる。

K-3 により発現が変動していることが明らかとなった *PDX1* であるが、この転写因子の発現は膵臓分化に必須であり、その後の膵臓分化においても重要な働きをすることは既知である。しかし、分化が終わり成熟した膵臓ではその発現は β 細胞に局限する。マウスを用いた実験では、成熟 β 細胞での *Pdx1* の発現は *MafB* を介した α 細胞への分化転換を抑制する働きを持ち、 β 細胞から *Pdx1* の発現が失われれば細胞のアイデンティティを喪失する(Gao et al. 2014)。以上を踏まえ、K-3 による β 細胞への分化促進は 1. 膵臓前駆細胞における *PDX1* 発現上昇による内分泌細胞への分化促進、2. 内分泌前駆細胞における *NEUROG3*-*PAX4* 経路による β 細胞への運命決定、3. 内分泌細胞において *PDX1* の発現を維持・上昇させることによる、 α 細胞への細胞のリプログラミングの抑制といった様々な複合的な観点から起こ

っていると推察される。

低分子化合物である K-3 のヒト iPS 細胞分化誘導系への添加による分化促進は、今後ヒトレシピエントを想定した培養スケールアップの面から非常に有用である。細胞形態の定量化から、細胞形態の小型化・均一化の傾向を確認することが出来たため、大規模培養においても品質維持に有効であると考えられる。また、分化培養においては成長因子として低分子化合物や、KGF などのタンパク質を培地に加えることで細胞に刺激を与えていく。K-3 の使用により他のシグナルタンパク質の働きを代替することが出来るのであれば、分化効率の改善とはまた別の観点から細胞培養のコスト低減につながると期待される。

これまでに、K-3 の直接の標的分子は特定できていない。標的候補であった UCHL1 に関してリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* の実験を行ったが、RNA-seq の結果とは整合性のある結果を得ることはできなかった。PDX1 の誘導剤としてこれまでに報告された化合物も存在するが、その作用の仕方からこれらとはメカニズムが異なると考えている。BRD7552 は膵臓癌由来細胞株である PANC-1 を用いたスクリーニングによって見いだされてきた PDX1 誘導剤である(Yuan et al. 2013)。PANC-1 は外分泌細胞としての性質を強く示し、1%程度のインスリン陽性細胞も含まれる(Wu et al. 2010)。以上のことを踏まえると、膵臓前駆細胞に対して働きかける K-3 とは作用機序は異なると考えられる。また AT7867 は PDX1 陽性細胞を増殖させる効果を示した(Kimura et al. 2017)。一方で我々の実験系では K-3 添加による細胞の顕著な増殖は観察されなかった。今後の研究では K-3 作用の詳細な経路の解明を進めることで、膵臓分化のさらなる効率改善につながると期待される。

第 5 章 結語

本研究では K-3 という化合物に着目し、ヒト iPS 細胞を用いた膵臓分化誘導系において、膵臓前駆細胞段階から分化培地に添加することで β 細胞への分化を促進する効果をもつことを示した。この作用は膵臓前駆細胞の時期に 2 日間のみ添加することでも発揮されることを確認し、膵臓分化に必須な転写因子である PDX1 の発現を上昇させることが K-3 の薬効に重要であることを示した。K-3 添加により得られた β 細胞は収率や分化率が向上しており、より高い機能性を示した。今後の課題として、まず K-3 の直接の作用分子の解明が期待される。直接の標的の未解明な化合物であるため、膵臓分化においてこれまで重要視されてこなかったシグナル経路に関与している可能性がある。二つ目に、K-3 を添加し作成した β 細胞の治療性能の評価が求められる。K-3 添加なしと同等以上の治療性能を示すことが証明できれば、分化促進と合わせて治療に用いる上で十分な利用価値があることを示すことが可能になる。

謝辞

本研究の実施にあたり、常に重要なご助言ならびにご指導を賜りました、東京科学大学生命理工学院の桑 昭苑教授、白木 伸明准教授、そして第一三共株式会社の矢野 辰也博士研究員に心からの感謝を申し上げます。実験手技のご指導、ご助言を頂きました榎本 孝幸博士に御礼申し上げます。また、研究を遂行するにあたり助言やサポートをしていただいた桑・白木研究室の皆様にも御礼申し上げます。

学位論文の骨格となる参考論文

【主要関連論文】

Tatsuya Yano*, Yukihiro Shimaya*, Takayuki Enomoto, Toshihiro Kiho, Satoshi Komoriya, Ryutaro Nakashima, Nobuaki Shiraki, and Shoen Kume

*: Equal Contribution

A small molecule K-3 promotes PDX1 expression and potentiates the differentiation of pluripotent stem cells into insulin-producing pancreatic β cells. *Stem Cells*, (in press), DOI: 10.1093/stmcls/sxae075

【学会発表】

島谷幸宏、矢野辰也、白木伸明、糸昭苑「新規低分子化合物 K-3 による、膵臓転写因子 PDX1 の発現増強を通じたヒト iPS 細胞の膵臓 β 細胞への分化促進」、第 47 回日本分子生物学会年会、福岡、2024 年 11 月 27 日（ポスター）

参考文献

- Azzolin, Luca, Tito Panciera, Sandra Soligo, Elena Enzo, Silvio Bicciato, Sirio Dupont, Silvia Bresolin, Chiara Frasson, Giuseppe Basso, Vincenza Guzzardo, Ambrogio Fassina, Michelangelo Cordenonsi, and Stefano Piccolo. 2014. “YAP/TAZ Incorporation in the β -Catenin Destruction Complex Orchestrates the Wnt Response.” *Cell* 158(1):157–70. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.013.
- Borowiak, Malgorzata, René Maehr, Shuibing Chen, Alice E. Chen, Weiping Tang, Julia L. Fox, Stuart L. Schreiber, and Douglas A. Melton. 2009. “Small Molecules Efficiently Direct Endodermal Differentiation of Mouse and Human Embryonic Stem Cells.” *Cell Stem Cell* 4(4):348–58. doi: 10.1016/j.stem.2009.01.014.
- Bruni, Anthony, Boris Gala-Lopez, Andrew R. Pepper, Nasser S. Abualhassan, and A. M. James Shapiro. 2014. “Islet Cell Transplantation for the Treatment of Type 1 Diabetes: Recent Advances and Future Challenges.” *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity* 7:211–23. doi: 10.2147/DMSO.S50789.
- Chen, Shuibing, Malgorzata Borowiak, Julia L. Fox, René Maehr, Kenji Osafune, Lance Davidow, Kelvin Lam, Lee F. Peng, Stuart L. Schreiber, Lee L. Rubin, and Douglas Melton. 2009. “A Small Molecule That Directs Differentiation of Human ESCs into the Pancreatic Lineage.” *Nature Chemical Biology* 5(4):258–65. doi: 10.1038/nchembio.154.
- Chu, K. Y., H. Li, K. Wada, and J. D. Johnson. 2012. “Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 Is Required for Pancreatic Beta Cell Survival and Function in Lipotoxic Conditions.” *Diabetologia* 55(1):128–40. doi: 10.1007/s00125-011-2323-1.
- Collombat, Patrick, Ahmed Mansouri, Jacob Hecksher-Sørensen, Palle Serup, Jens Krull, Gerard Gradwohl, and Peter Gruss. 2003. “Opposing Actions of Arx and Pax4 in Endocrine Pancreas Development.” *Genes and Development* 17(20):2591–2603. doi: 10.1101/gad.269003.
- D’Amour, Kevin A., Anne G. Bang, Susan Eliazzer, Olivia G. Kelly, Alan D. Agulnick, Nora G. Smart, Mark A. Moorman, Evert Kroon, Melissa K. Carpenter, and Emmanuel E. Baetge. 2006. “Production of Pancreatic Hormone-Expressing Endocrine Cells from Human Embryonic Stem Cells.” *Nature Biotechnology* 24(11):1392–1401. doi: 10.1038/nbt1259.
- Dorrell, Craig, Jonathan Schug, Pamela S. Canaday, Holger A. Russ, Branden D. Tarlow, Maria T. Grompe, Tamara Horton, Matthias Hebrok, Philip R. Streeter, Klaus H. Kaestner, and Markus Grompe. 2016. “Human Islets Contain Four Distinct Subtypes of β Cells.” *Nature Communications* 7. doi: 10.1038/ncomms11756.
- Gao, Tao, Brian McKenna, Changhong Li, Maximilian Reichert, James Nguyen, Tarjinder Singh, Chenghua Yang, Archana Pannikar, Nicolai Doliba, Tingting Zhang, Doris A. Stoffers, Helena Edlund, Franz Matschinsky, Roland Stein, and Ben Z. Stanger. 2014. “Pdx1 Maintains β Cell Identity and Function by Repressing an α Cell Program.” *Cell Metabolism* 19(2):259–71. doi:

10.1016/j.cmet.2013.12.002.

- Gasa, Rosa, Caroline Mrejen, Nathaniel Leachman, Marc Otten, Michael Barnes, Juehu Wang, Swarup Chakrabarti, Raghavendra Mirmira, and Michael German. 2004. "Proendocrine Genes Coordinate the Pancreatic Differentiation Program in Vitro." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(36):13245–50. doi: 10.1073/pnas.0405301101.
- Goto, Yoko, Lihua Zeng, Chan Joo Yeom, Yuxi Zhu, Akiyo Morinibu, Kazumi Shinomiya, Minoru Kobayashi, Kiichi Hirota, Satoshi Itasaka, Michio Yoshimura, Keiji Tanimoto, Masae Torii, Terumasa Sowa, Toshi Menju, Makoto Sonobe, Hideaki Kakeya, Masakazu Toi, Hiroshi Date, Ester M. Hammond, Masahiro Hiraoka, and Hiroshi Harada. 2015. "UCHL1 Provides Diagnostic and Antimetastatic Strategies Due to Its Deubiquitinating Effect on HIF-1 α ." *Nature Communications* 6. doi: 10.1038/ncomms7153.
- Gregg, Brigid E., Patrick C. Moore, Damien Demozay, Ben A. Hall, Mei Li, Aliya Husain, Amy J. Wright, Mark A. Atkinson, and Christopher J. Rhodes. 2012. "Formation of a Human β -Cell Population within Pancreatic Islets Is Set Early in Life." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97(9):3197–3206. doi: 10.1210/jc.2012-1206.
- Gu, Guoqiang, Jolanta Dubauskaite, and Douglas A. Melton. 2002. "Direct Evidence for the Pancreatic Lineage: NGN3+ Cells Are Islet Progenitors and Are Distinct from Duct Progenitors." *Development* 129(10):2447–57. doi: 10.1242/dev.129.10.2447.
- Hebrok, Matthias, Seung K. Kim, and Douglas A. Melton. 1998. "Notochord Repression of Endodermal Sonic Hedgehog Permits Pancreas Development." *Genes and Development* 12(11):1705–13. doi: 10.1101/gad.12.11.1705.
- Hogrebe, Nathaniel J., Punu Augsornworawat, Kristina G. Maxwell, Leonardo Velazco-Cruz, and Jeffrey R. Millman. 2020. "Targeting the Cytoskeleton to Direct Pancreatic Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells." *Nature Biotechnology* 38(4):460–70. doi: 10.1038/s41587-020-0430-6.
- Hosokawa, Shinichi, Kenichiro Furuyama, Masashi Horiguchi, Yoshiki Aoyama, Kunihiko Tsuboi, Morito Sakikubo, Toshihiko Goto, Koji Hirata, Wataru Tanabe, Yasuhiro Nakano, Haruhiko Akiyama, Ryoichiro Kageyama, Shinji Uemoto, and Yoshiya Kawaguchi. 2014. "Impact of Sox9 Dosage and Hes1-Mediated Notch Signaling in Controlling the Plasticity of Adult Pancreatic Duct Cells in Mice." *Scientific Reports* 5. doi: 10.1038/srep08518.
- Hunault, Lise, and Daniel Hesselton. 2024. "Finishing the Odyssey to a Stem Cell Cure for Type 1 Diabetes." *Npj Metabolic Health and Disease* 2(1). doi: 10.1038/s44324-024-00014-5.
- Inoue, Mitsuhiro, Ryo Yamaguchi, Ching Chi Jimmy He, Atsushi Ikeda, Hideyuki Okano, and Jun Kohyama. 2023. "Current Status and Prospects of Regenerative Medicine for Spinal Cord Injury Using Human Induced Pluripotent Stem Cells: A Review." *Stem Cell Investigation* 10(6).

- Jennings, Rachel E., Andrew A. Berry, Rebecca Kirkwood-Wilson, Neil A. Roberts, Thomas Hearn, Rachel J. Salisbury, Jennifer Blaylock, Karen Piper Hanley, and Neil A. Hanley. 2013. "Development of the Human Pancreas from Foregut to Endocrine Commitment." *Diabetes* 62(10):3514–22. doi: 10.2337/db12-1479.
- Jennings, Rachel E., Andrew A. Berry, James P. Strutt, David T. Gerrard, and Neil A. Hanley. 2015. "Human Pancreas Development." *Development (Cambridge)* 142(18):3126–37. doi: 10.1242/dev.120063.
- Kapp, Joshua R., Tim Diss, James Spicer, Michael Gandy, Iris Schrijver, Lawrence J. Jennings, Marilyn M. Li, Gregory J. Tsongalis, David Gonzalez De Castro, Julia A. Bridge, Andrew Wallace, Joshua L. Deignan, Sandra Hing, Rachel Butler, Eldo Verghese, Gary J. Latham, and Rifat A. Hamoudi. 2015. "Variation in Pre-PCR Processing of FFPE Samples Leads to Discrepancies in BRAF and EGFR Mutation Detection: A Diagnostic RING Trial." *Journal of Clinical Pathology* 68(2):111–18. doi: 10.1136/jclinpath-2014-202644.
- Kimura, Azuma, Taro Toyoda, Yohei Nishi, Makoto Nasu, Akira Ohta, and Kenji Osafune. 2017. "Small Molecule AT7867 Proliferates PDX1-Expressing Pancreatic Progenitor Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells." *Stem Cell Research* 24:61–68. doi: 10.1016/j.scr.2017.08.010.
- Kroon, Evert, Laura A. Martinson, Kuniko Kadoya, Anne G. Bang, Olivia G. Kelly, Susan Eliazer, Holly Young, Mike Richardson, Nora G. Smart, Justine Cunningham, Alan D. Agulnick, Kevin A. D'Amour, Melissa K. Carpenter, and Emmanuel E. Baetge. 2008. "Pancreatic Endoderm Derived from Human Embryonic Stem Cells Generates Glucose-Responsive Insulin-Secreting Cells in Vivo." *Nature Biotechnology* 26(4):443–52. doi: 10.1038/nbt1393.
- Leroy, E., R. Boyer, G. Auburger, B. Leube, G. Ulm, E. Mezey, G. Harta, M. J. Brownstein, S. Jonnalagada, T. Chernova, A. Dehejia, C. Lavedan, T. Gasser, P. J. Steinbach, K. D. Wilkinson, and M. H. Polymeropoulos. 1998. "The Ubiquitin Pathway in Parkinson's Disease [6]." *Nature* 395(6701):451–52. doi: 10.1038/26652.
- Liu, Guohao, Po Zhang, Sui Chen, Zirong Chen, Yanmei Qiu, Peng Peng, Wenda Huang, Fangling Cheng, Yang Zhang, Huan Li, Qungen Xiao, Feng Mao, Baofeng Wang, Xiaobing Jiang, Feng Wan, Dongsheng Guo, and Xingjiang Yu. 2023. "FAM129A Promotes Self-Renewal and Maintains Invasive Status via Stabilizing the Notch Intracellular Domain in Glioma Stem Cells." *Neuro-Oncology* 25(10):1788–1801. doi: 10.1093/neuonc/noad079.
- Liu, Yichin, Hilal A. Lashuel, Sungwoon Choi, Xuechao Xing, April Case, Jake Ni, Li-An Yeh, Gregory D. Cuny, Ross L. Stein, and Peter T. Lansbury. 2003. "Discovery of Inhibitors That Elucidate the Role of UCH-L1 Activity in the H1299 Lung Cancer Cell Line." *Chemistry & Biology* 10:837–46. doi: 10.1016/S.
- Lo, Bernard, and Lindsay Parham. 2009. "Ethical Issues in Stem Cell Research." *Endocrine Reviews*

30(3):204–13.

- Mao, Xiaotong, Shenghan Mao, Lei Wang, Hui Jiang, Shunjiang Deng, Yuanchen Wang, Jun Ye, Zhaoshen Li, Wenbin Zou, and Zhuan Liao. 2022. “Single-Cell Transcriptomic Analysis of the Mouse Pancreas: Characteristic Features of Pancreatic Ductal Cells in Chronic Pancreatitis.” *Genes* 13(6). doi: 10.3390/genes13061015.
- Meier, Juris J., Christina U. Köhler, Bacel Alkhatib, Consolato Sergi, Theresa Junker, Harald H. Klein, Wolfgang E. Schmidt, and Helga Fritsch. 2010. “ β -Cell Development and Turnover during Prenatal Life in Humans.” *European Journal of Endocrinology* 162(3):559–68. doi: 10.1530/EJE-09-1053.
- Nakashima, Ryutaro, Mayu Morooka, Nobuaki Shiraki, Daisuke Sakano, Soichiro Ogaki, Kazuhiko Kume, and Shoen Kume. 2015. “Neural Cells Play an Inhibitory Role in Pancreatic Differentiation of Pluripotent Stem Cells.” *Genes to Cells* 20(12):1028–45. doi: 10.1111/gtc.12308.
- Nijman, Sebastian M. B., Mark P. A. Luna-Vargas, Arno Velds, Thijn R. Brummelkamp, Annette M. G. Dirac, Titia K. Sixma, and René Bernards. 2005. “A Genomic and Functional Inventory of Deubiquitinating Enzymes.” *Cell* 123(5):773–86.
- Osipovich, Anna B., Qiaoming Long, Elisabetta Manduchi, Rama Gangula, Susan B. Hipkens, Judsen Schneider, Tadashi Okubo, Christian J. Stoeckert, Shinji Takada, and Mark A. Magnuson. 2014. “Insm1 Promotes Endocrine Cell Differentiation by Modulating the Expression of a Network of Genes That Includes Neurog3 and Ripply3.” *Development (Cambridge)* 141(15):2939–49. doi: 10.1242/dev.104810.
- Pagliuca, Felicia W., Jeffrey R. Millman, Mads Gürtler, Michael Segel, Alana Van Dervort, Jennifer Hyoje Ryu, Quinn P. Peterson, Dale Greiner, and Douglas A. Melton. 2014. “Generation of Functional Human Pancreatic β Cells in Vitro.” *Cell* 159(2):428–39. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.040.
- Pan, Fong Cheng, and Chris Wright. 2011. “Pancreas Organogenesis : From Bud to Plexus to Gland.” (February):530–65. doi: 10.1002/dvdy.22584.
- Ruijtenberg, Suzan, and Sander van den Heuvel. 2016. “Coordinating Cell Proliferation and Differentiation: Antagonism between Cell Cycle Regulators and Cell Type-Specific Gene Expression.” *Cell Cycle* 15(2):196–212.
- Sakano, Daisuke, Sungik Choi, Masateru Kataoka, Nobuaki Shiraki, Motonari Uesugi, Kazuhiko Kume, and Shoen Kume. 2016. “Dopamine D2 Receptor-Mediated Regulation of Pancreatic β Cell Mass.” *Stem Cell Reports* 7(1):95–109. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.05.015.
- Sakano, Daisuke, Nobuaki Shiraki, Kazuhiko Kikawa, Taiji Yamazoe, Masateru Kataoka, Kahoko Umeda, Kimi Araki, D. Mao, Shirou Matsumoto, Naomi Nakagata, Olov Andersson, Didier Stainier, Fumio Endo, Kazuhiko Kume, Motonari Uesugi, and Shoen Kume. 2014. “VMAT2

- Identified as a Regulator of Late-Stage β -Cell Differentiation.” *Nature Chemical Biology* 10(2):141–48. doi: 10.1038/nchembio.1410.
- Shapiro, A. M. James, David Thompson, Thomas W. Donner, Melena D. Bellin, Willa Hsueh, Jeremy Pettus, Jon Wilensky, Mark Daniels, Richard M. Wang, Eugene P. Brandon, Manasi S. Jaiman, Evert J. Kroon, Kevin A. D’Amour, and Howard L. Foyt. 2021. “Insulin Expression and C-Peptide in Type 1 Diabetes Subjects Implanted with Stem Cell-Derived Pancreatic Endoderm Cells in an Encapsulation Device.” *Cell Reports Medicine* 2(12). doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100466.
- Shiraki, Nobuaki, Yasuko Shiraki, Tomonori Tsuyama, Fumiaki Obata, Masayuki Miura, Genta Nagae, Hiroyuki Aburatani, Kazuhiko Kume, Fumio Endo, and Shoen Kume. 2014. “Methionine Metabolism Regulates Maintenance and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells.” *Cell Metabolism* 19(5):780–94. doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.017.
- Sim, Erinn Zixuan, Takayuki Enomoto, Nobuaki Shiraki, Nao Furuta, Soshiro Kashio, Taiho Kambe, Tomonori Tsuyama, Akihiro Arakawa, Hiroki Ozawa, Mizuho Yokoyama, Masayuki Miura, and Shoen Kume. 2022. “Methionine Metabolism Regulates Pluripotent Stem Cell Pluripotency and Differentiation through Zinc Mobilization.” *Cell Reports* 40(3). doi: 10.1016/j.celrep.2022.111120.
- Sugai, Keiko, Miho Sumida, Tomoko Shofuda, Ryo Yamaguchi, Takashi Tamura, Tsuneo Kohzuki, Takayuki Abe, Reo Shibata, Yasuhiro Kamata, Shuhei Ito, Toshiki Okubo, Osahiko Tsuji, Satoshi Nori, Narihito Nagoshi, Shinya Yamanaka, Shin Kawamata, Yonehiro Kanemura, Masaya Nakamura, and Hideyuki Okano. 2021. “First-in-Human Clinical Trial of Transplantation of iPSC-Derived NS/PCs in Subacute Complete Spinal Cord Injury: Study Protocol.” *Regenerative Therapy* 18:321–33. doi: 10.1016/j.reth.2021.08.005.
- Sugita, Sunao, Michiko Mandai, Yasuhiko Hirami, Seiji Takagi, Tadao Maeda, Masashi Fujihara, Mitsuhiro Matsuzaki, Midori Yamamoto, Kyoko Iseki, Naoko Hayashi, Ayumi Hono, Shoko Fujino, Naoshi Koide, Noriko Sakai, Yumiko Shibata, Motoki Terada, Mitsuhiro Nishida, Hiromi Dohi, Masaki Nomura, Naoki Amano, Hirokazu Sakaguchi, Chikako Hara, Kazuichi Maruyama, Takashi Daimon, Masataka Igeta, Toshihiko Oda, Utako Shirono, Misato Tozaki, Kota Totani, Satoshi Sugiyama, Kohji Nishida, Yasuo Kurimoto, and Masayo Takahashi. 2020. “HLA-Matched Allogeneic IPS Cells-Derived Rpe Transplantation for Macular Degeneration.” *Journal of Clinical Medicine* 9(7):1–18. doi: 10.3390/jcm9072217.
- Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2006. “Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.” *Cell* 126(4):663–76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Thomson, James A., Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall, and Jeffrey M. Jones. 1998. *Embryonic Stem Cell Lines Derived*

from Human Blastocysts.

- Torsten, Eich, Eriksson Olof, and Lundgren Torbjörn. 2007. *Visualization of Early Engraftment in Clinical Islet Transplantation by Positron-Emission Tomography.*
- Tsujimoto, Hiraku, and Kenji Osafune. 2022. “Current Status and Future Directions of Clinical Applications Using IPS Cells—Focus on Japan.” *FEBS Journal* 289(23):7274–91.
- Veres, Adrian, Aubrey L. Faust, Henry L. Bushnell, Elise N. Engquist, Jennifer Hyoje Ryu Kenty, George Harb, Yeh Chuin Poh, Elad Sintov, Mads Gürtler, Felicia W. Pagliuca, Quinn P. Peterson, and Douglas A. Melton. 2019. “Charting Cellular Identity during Human in Vitro β -Cell Differentiation.” *Nature* 569(7756):368–73. doi: 10.1038/s41586-019-1168-5.
- Wang, Shusen, Yuanyuan Du, Boya Zhang, Gaofan Meng, Zewen Liu, Soon Yi Liew, Rui Liang, Zhengyuan Zhang, Xiangheng Cai, Shuangshuang Wu, Wei Gao, Dewei Zhuang, Jiaqi Zou, Hui Huang, Mingyang Wang, Xiaofeng Wang, Xuelian Wang, Ting Liang, Tengli Liu, Jiabin Gu, Na Liu, Yanling Wei, Xuejie Ding, Yue Pu, Yixiang Zhan, Yu Luo, Peng Sun, Shuangshuang Xie, Jiuxia Yang, Yiqi Weng, Chunlei Zhou, Zhenglu Wang, Shuang Wang, Hongkui Deng, and Zhongyang Shen. 2024. “Transplantation of Chemically Induced Pluripotent Stem-Cell-Derived Islets under Abdominal Anterior Rectus Sheath in a Type 1 Diabetes Patient.” *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2024.09.004.
- Wu, Yuexiu, Jinming Li, Saira Saleem, Siu Pok Yee, Anandwardhan A. Hardikar, and Rennian Wang. 2010. “C-Kit and Stem Cell Factor Regulate PANC-1 Cell Differentiation into Insulin-and Glucagon-Producing Cells.” *Laboratory Investigation* 90(9):1373–84. doi: 10.1038/labinvest.2010.106.
- Ye, F., B. Duvillié, and R. Scharfmann. 2005. “Fibroblast Growth Factors 7 and 10 Are Expressed in the Human Embryonic Pancreatic Mesenchyme and Promote the Proliferation of Embryonic Pancreatic Epithelial Cells.” *Diabetologia* 48(2):277–81. doi: 10.1007/s00125-004-1638-6.
- Yuan, Yuan, Kate Hartland, Zarko Boskovic, Yikai Wang, Deepika Walpita, Philippe A. Lysy, Cheng Zhong, Damian W. Young, Young Kwon Kim, Nicola J. Tolliday, Etienne M. Sokal, Stuart L. Schreiber, and Bridget K. Wagner. 2013. “A Small-Molecule Inducer of Pdx1 Expression Identified by High-Throughput Screening.” *Chemistry and Biology* 20(12):1513–22. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.10.013.
- Zaret, Kenneth S., and Markus Grompe. 2008. *Generation and Regeneration of Cells of the Liver and Pancreas.*
- Zhang, Yiqi, Long Zhou, Qin Fu, and Ziyun Liu. 2023. “ANKRD1 Activates the Wnt Signaling Pathway by Modulating CAV3 Expression and Thus Promotes BMSC Osteogenic Differentiation and Bone Formation in Ovariectomized Mice.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1869(5). doi: 10.1016/j.bbadis.2023.166693.

表

表 1. 試薬一覧

用途	試薬	会社	Cat#
細胞培養	AK02N	Ajinomoto	
	AK03N	Ajinomoto	
	Basic03	Ajinomoto	
	KA01 (StemFit, Δ Met)	Ajinomoto	
	KA02 (StemFit, Δ Zn, Δ INS)	Ajinomoto	
	Advanced DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific	12634028
	Penicilin-Streptomycin	Nacalai tesque	26252-94
	D-PBS(-)	Nacalai tesque	14249-24
	D-PBS(+)調製用Ca, Mg溶液(100倍濃縮)	Nacalai tesque	02492-94
	Synthemax II-SC	Corning	3535
	Y-27632	Tocris Bioscience	125450
	TrypLE select	Gibco	12563-029
	Trypan Blue Solution, 0.4%	Gibco	15250-061
	FAF-BSA	Proliant Biologicals	68700-100G
	NaHCO3	Nacalai tesque	31213-15
	L-Glutamine	Nacalai tesque	16948-04
	Non Essential Amino Acid	Gibco	11140050
	10% Glucose (大塚糖液)	大塚製薬	
	Activin A	Ajinomoto	GF-001-050L
	CHIR99021	Wako	034-23103
	IGF1	Ajinomoto	
	ZnSO4	SigmaAldrich	Z0251-100G
	KGF	Ajinomoto	
	Vitamin C	Sigma-Aldrich	A4544-25G
	PdBU	LC laboratories	P4833
	RA	REPROCELL USA Inc.(Stemgent, Inc.)	04-0021
	SANT-1	Sigma-Aldrich	S4572-5MG
	LDN193189	Wako	116-00811
	RepSox (Alk5 inhibitor)	Tocris Bioscience	3742
	GSXXi	Tocris Bioscience	6476
	Betacellulin	PEPROTECH	100-50-100UG
	T3	Sigma-Aldrich	T6397
	Heparin	Sigma-Aldrich	H3149-50KU
免疫染色	Blocking One	Nacalai tesque	03953-95
	6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Roche	10236276001
	Triton X-100	Nacalai tesque	35501-15
	Tween-20	Nacalai tesque	28353-85
Ub	Recombinant Human UCH-L1, CF	R&D systems	E-340-025
	Recombinant Human UCH-L5/UCH37 protein, CF	R&D systems	E-327-025
	Ubiquitin, Human, Recombinant, AMC Conjugate	R&D systems	U-550-050
	DTT	Wako	047-08973
遺伝子実験関連	RNeasy Micro Kit	Qiagen	74106
	シカジーニースRNAプレップキット	関東化学株式会社	08057-96
	PrimeScript RT Master Mix	Takara	RR036B
	TB Green Premix Ex Taq II	Takara	RR820D
	Allprep DNA/RNA Micro kit	Qiagen	80204
	2-メルカプトエタノール	Nacalai tesque	21417-52

表 2. *in vitro* 実験使用バッファー組成

用途	バッファー名	組成
免疫細胞化学	PBS (リン酸緩衝生理食塩水)	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄
	PBS-T	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 0.1% Tween-20
	4% PFA/PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 4% Paraformaldehyde
	1% Triton/PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 1% Triton-X 100
	Blocking One/PBS-T	5x Blocking One (Nacalai tesque #03953-95)をPBS-Tで5倍希釈
Ub-AMCアッセイ	Ub-AMCバッファー	20 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT

表 3. 脾臟分化誘導培地組成

日程	種類	基礎培地		液性因子	濃度
0	M1-1	KA02 (StemFit Δ INS, Δ Zn)		Activin A	100 ng/ml
		Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	1 %	CHIR99021	3 μM
				IGF1	100 ng/ml
1, 2	M1-2	KA02 (StemFit Δ INS, Δ Zn)		Activin A	100 ng/ml
		Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	1 %	IGF1	100 ng/ml
3	S2-1	KA02 (StemFit Δ INS, Δ Zn)		KGF	50 ng/ml
		Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	1 %	Vitamin C	44 μg/ml
5	S2-2	StemFit Basic03		KGF	50 ng/ml
		Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	1 %	Vitamin C	44 μg/ml
6	S3	StemFit Basic03		KGF	50 ng/ml
		Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	1 %	PdBU	500 nM
				RA	2 μM
				SANT-1	250 nM
				Vitamin C	44 μg/ml
				Y27632	10 μM
8, 10, 12	S4	StemFit Basic03		KGF	50 ng/ml
		Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	1 %	RA	100 nM
				SANT-1	250 nM
				Vitamin C	44 μg/ml
				LDN193189	100 nM
				Activin A	5 ng/ml
				Y27632	10 μM
13, 15	S5-1	StemFit Basic03		ALK5 inhibitor	10 μM
		Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	1 %	GSXXi	1 μM
				Betacellulin	20 ng/ml
				RA	100 nM
				T3	1 μM
				Vitamin C	44 μg/ml
				Heparin	10 μg/ml
17, 19	S5-2	StemFit Basic03		ALK5 inhibitor	10 μM
		Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	1 %	GSXXi	1 μM
				Betacellulin	20 ng/ml
				RA	25 nM
				T3	1 μM
				Heparin	10 μg/ml
21以降	S6	MCDB131	500 mL	Glucose	0.23 g
		Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	5.2 ml	FAF-BSA	10.5 g
				L-Glutamine	5.2 mL
				Heparin	10 μg/mL
				Non-Essential Amino Acids	5.2 mL
				ZnSO4(10mM)	1 μM (50ul)
				Trace Elements A	523 μL
				Trace Elements B	523 μL

表 4. 免疫細胞化学及びフローサイトメトリー使用抗体一覧

	抗原	ホスト	会社	Cat#	希釈倍率
一次抗体	PDX1	Goat	R&D Systems, Inc.	AF2419	1/100
	NKX6.1	Mouse	Developmental Studies Hybridoma Bank	F55A1-c	1/100
	INSULIN	Guinea Pig	Dako Cytomation Japan	A0562	1/10
	C-peptide	Rabbit	Cell Signaling Technology	4593S	1/200
	Glucagon	Mouse	Sigma-Aldrich	K79bB10	1/1000
	Somatostatin	Rabbit	Sigma-Aldrich	SAB4502861	1/500
二次抗体	Alexa 488 donkey anti-rabbit IgG	Donkey	Invitrogen	A32731	1/1000
	Alexa 488 donkey anti-mouse IgG	Donkey	Jackson ImmunoResearch Inc.	715-546-150	1/1000
	Alexa 488 donkey anti-guinea pig IgG	Donkey	Jackson ImmunoResearch Inc.	115-605-164	1/1000
	Alexa 568 donkey anti-goat IgG	Donkey	Invitrogen	A11057	1/1000
	Alexa 568 donkey anti-rabbit IgG	Donkey	Invitrogen	A10037	1/1000
	Alexa 647 donkey anti-mouse IgG	Donkey	Jackson ImmunoResearch Inc.	706-546-148	1/1000

表 5. PCR 反应液組成

逆転写	PrimeScript RT Master Mix	3.4
	RNA	X (500 ng分)
	Rnase free water (Qiagen)	13.6-X
	Total	17 [μ L]
qPCR	TB Green Premix Ex Taq II (2x conc.)	10.4
	cDNA	0.4
	MilliQ	6
	Primer (Forward and Reverse) 2.5 μ M	3.2
	Total	20 [μ L]

表 6. 図 7 にて使用したプライマー配列

図 7	Forward	Reverse
SLC28A2	GGAGTCCAAGTTCAAGAGTGAGG	AGGCAATCAGGTTGGCTGCTAC
GATM	CGTGTATGGTGGATGCCAATGA	ACATCGCAGGTCCAGCAATGGA
CTNND2	GCATTCATCACAGGTGCTGCGT	TACAGCAAGGCATCCGTAAGCC
LRRN4	ACTCAGGCTTCCACAGCGTTGA	TGAGCCATCCTCCTTGCGTTCT
AMBP	CCGACAACATCCAAGTGCAGGA	GTGCTCACTGTCATCCTGTCCA
COL9A2	CCTGGTGAGATTGGAATCCGAG	GAAATCCGCACTGCCTTCCAGA
LRRTM1	CAGCCTCAAGTTTCTCGACATCG	GGCGAAGTTCACCTTGACCAAG
BAALC	CAGAATCCACCTGGCTCACCTA	ATTCCACCTGGGGCTGTAGATC
CLIC6	GACATCACCCCTCTTCGTCAAGG	CTTTTCAGGTCCACTGTGGTCAC
GUCY1A2	GCAGACTCTCAAGAGGACACTG	GTTGGAGTGGTCTGCATAGGAG
C1QL3	TGCGCGTCTATTCGAGTTGTGG	CTCTTCTTCGCTCGCTCAGTTC
STAR	TACGTGGCTACTCAGCATCGAC	TCAACACCTGGCTTCAGAGGCA
CLGN	AAACCTGCTGGCTGGCTTGATG	ATCTGAGGTGCCTCCCATTCTC
CACNG6	GCGTCTACAAGTCCAAGAGGAAC	GTTGGCGGAGATGTACACGATC
PDPN	GTGCCGAAGATGATGTGGTGAC	GGACTGTGCTTTCTGAAGTTGGC
FAM149A	TAACGGCACGTTTCATCCCTGGA	ACAGGAGGAAGTCCGAGTTTGC
ITPR1	GTGACAGGAAACATGCAGACTCG	CAGCAGTTGCACAAAGACAGGC
CALB1	TTTCCTGCTGCTCTTCCGATGC	GCTCCTCAGTTTCTATGAAGCCA
GADL1	CCGTTTCTTGTCTGTGCCACTTC	CCTCGACATCAAAGCTGAGCCA
BACE2	GACGAGAACTCCAGCAGGTCAT	ACCGATCACCAGCGCATTTGTG
SLC2A12	GCCACACTGAATACCAGATAGTC	CCACCAGGAAAGATCTCGCTGA
SLC7A11	TCCTGCTTTGGCTCCATGAACG	AGAGGAGTGTGCTTGCGGACAT
MTHFD2	CTCCTTGTTTCAGTTGCCTCTTCC	CTGATCCAAACACATTCGTCTAC
CHAC1	GTGGTGACGCTCCTTGAAGATC	GAAGGTGACCTCCTTGGTATCG
JDP2	CACTTCCTGGAGGTGAACTGG	GAAACTCCGTGCGCTCCTTCTT
DNAJC15	ATGAGTAGGCGAGAAGCTGGTC	GGGTGATTCAAATCATGACTCTC
PSAT1	ACTTCCTGTCCAAGCCAGTGGA	CTGCACCTTGATTCCAGGACC
FLJ22447	CAGTGCTGCTGGACTCAGTT	CTCCCATGGTTTCTGCACCT
DDIT4	GTTTGACCGCTCCACGAGCCT	GCACACAAGTGTTTCATCCTCAGG
SLC22A3	CCTTGCTGTGTCAATGCGTG	CCAACACCAAGGCAGGATAGCA
SLC7A7	TCAATGCCTCCATTGTGGCTGC	AGCAGAGAAGGCACTGGTGTGA
SLC7A1	GCGACTTGCTTCTATGCCTTCG	CCCAAAGTAGGCGATGAAGCAG

ANKRD1	CGACTCCTGATTATGTATGGCGC	GCTTTGGTTCCATTCTGCCAGTG
CDHR3	GTCTGACAGGAAGAAAGCGGAG	TCCTCAGGACCTGATAGGTGAC
ADM2	GGATGGTGGCCGCCAACACTC	ACAGGCGGTGGCTGAGATTCTG
RGS5	GAAGCCAGACTCAGTTGGTGAC	GGAGTTTGTCCAGGAATCACG
SESN2	AGATGGAGAGCCGCTTTGAGCT	CCGAGTGAAGTCCTCATATCCG
GIPR	TGGCATTCTCCTGTCCAAGCTG	GTTCTCTGTACACGGGAGCAAA
RSP03	CCAGAAGGGTTGGAAGCCAACA	CCTTCTTCGTGCATGGACTCCA
PADI2	GATGAGCAGCAAGCGAATCACC	GCTCCTTCTTGAGGATGTCACG
TBX2	AGCAGTGGATGGCTAAGCCTGT	GGATGTCGTTGGCTCGCACTAT
UNC5D	ACTCATACCACACGGTGCCATC	ATGTCTGGAGGACCACAGGTGA
NTNG1	ATGCGCCTGAAGGACTACGTCA	TTGGAGGCGTCACACTCGTTGC
STAG3L1	GCTGTCCTTCTTTGTGGAGAGC	TTGTCAGACCCTCCCAGTCCTT
FRK	CAGAGTTGATGAGACATGGAAGTC	AGTTCCGAGACTCCAGATAGGC
CPED1	TCATTGACGGGCACAGTTTGG	CCTGTTGAGGTGAACTGGCTCT
PDX1	ACTCCACCTTGGGACCTGTTTAGA	CGAGTAAGAATGGCTTTATGGCAGA
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA

表 7. 図 8 にて使用したプライマー配列

図 8	Forward	Reverse
HOXA3	CCTGCTCAACTCACCCACAGTG	TCTTGTCGCCAGCGCAGCTTTC
ISL1	ACAAAGTTACCAGCCACCTTGGA	TCATGCCTCAATAGGACTGGCTA
GLI3	TCAGCAAGTGGCTCCTATGGTC	GCTCTGTTGTCTGGCTTAGGATC
HOXB2	GAAATCCGCCAAGAAACCCAGC	CTGCGTGTTGGTGTAAGCCGTG
GABRB2	GTGCCAACAATGAGAAGATGCGC	TTCCAGTAGGGTCCCACAAGGA
NKX2.2	AACCGTCCCAGCGTTAATGTC	GCTGACAATATCGCTACTCACACAA
RPL24	CTCGGCAGATAAACTGGACTGTC	GCAAGAGATGCACCAGTAATGGC
NTRK3	CCGACACTGTGGTCATTGGCAT	CAGTTCTCGCTTCAGCACGATG
FOXA1	GCAATACTCGCCTTACGGCTCT	GGGTCTGGAATACACACCTTGG
WNT5A	TACGAGAGTGCTCGCATCCTCA	TGTCTTCAGGCTACATGAGCCG
PDX1	ACTCCACCTTGGGACCTGTTTAGA	CGAGTAAGAATGGCTTTATGGCAGA
SOX9	GGAGATGAAATCTGTTCTGGGAATG	TTGAAGGTAACTGCTGGTGTTCTG
IGF2	ACTCGCGTCTATGCAAGTCCAAC	TAAGCAGCAATGCAGCACGAG
MEIS2	GAAAGAGACGGCAGCTCCAAGT	TCATCGTGGTCTCGCCAAGAAG
NR5A2	ATTGTCGAGTGGGCCAGGAG	TGTCGGTAAATGTGGTCGAGGA
NRCAM	TGTGGCTGAAGGACAACAGGGA	AGACGCTGTCCAGAGTGGTGTT
SKAP2	CCTCCAATTGCAGCACAAAGACC	ACTGAGAGCACACCACCGTTTC
RIPPLY3	ATCCAGACACCTGGAGATGCTG	ACTCCGCAGGTATTCTTGACGC
FOXA2	CGTCCGACTGGAGCAGCTACTAT	ATGTACGTGTTTCATGCCGTTCA
ACTB	TGGCACCCAGCACAAATGAA	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA

表 8. 図 11 にて使用したプライマー配列

図 11	Forward	Reverse
ATP2A2	GATGAGACGCTCAAGTTTGTGG	CAGTCATGCACAGGGTTGGTA
EPAS1	CACTGCAGACTTGTCCAGTGCTC	CACTGCTCGGATTGTCACACCTA
MNX1	GAGCACCAGTTCAAGCTCAACAA	CGGTTCTGGAACCAAATCTTCA
MYCN	TGAACACGCTCGGACTTGCTA	GGGACCGATTTGAAAGTAAACCAAC
PC	GAATTACACCCGGGCCTACTCA	ACAGGTGCAGGATGTTCCCATAC
REST	CACCCTATGAATGTTGACAATGGAA	CATCTGCTGAGGTCAACCAGGA
HNF1B	GCTGTGACTCAGCTGCAGAACTC	TGGGCATCACCAGGCTTGTA
CHL1	CAAATTGCCCACTCGTGATAAGTC	TGCCCACCAACCATTCTTGA
SOX17	CTGCAGGCCAGAAGCAGTGTTA	CCCAAAGTGTTCAGTGGCAGA
PPM1K	AAATGGTGCGTTGGTGGTCA	AACAAATGTACACAAGGGCACTTCA
MESP1	GGCTCTGTTGGAGACCTGGAT	CTCACAGAGACGGCGTCAGTT
INS	GAAGCGGCATTGTGGAAC	CTGGTTCAAGGGCTTTATTCCATC
ATP2B2	TTTCAAAGTTCCAAACCAAGCTCTC	AGTCCCAAAGCAGCCTCCAATA
ESRRG	TGATGAAACATCAACCCAGTGCTA	GGGATGTGCCAATTTCTGAACTC
ISL1	ACAAAGTTACCAGCCACCTTGGA	TCATGCCTCAATAGGACTGGCTAC
NDUFS2	CACCTAAGCGAGCAGAGATGAA	TGGGAGCCTCAATGGCAGTA
PCSK1	CTCACCTCACCTGGATGATCACTAA	CCAGCATTGTAGGTGACTGGAGAC
SLC2A2	GCTGCGAATAAACAGGCAGGA	CAGCACAGCAGTGATGACAGTGA
TCF3	GCAGTTCCTGGGAACCACAATTA	CAGCCAGCTGTGTTGACACGTA
PPARGC1A	CACTGGAGGCAAATTCAGCA	ACGGCATGAAGGCAATGG
ELOVL6	TCTGCTGGCTGAGTGGCAATAC	TTCTGAAGCTGACTTGAAGCAGGA
SLC30A8	TGATGAGGCCACTTAACAGTCCAG	GGTGCCCAAGTAACAGAATGACAGA
NEUROG3	GCGAGTTGGCACTGAGCAAG	CCGAGTTGAGGTTGTGCATTC
HPRT1	GGCAGTATAATCCAAAGATGGTCAA	GTCAAGGGCATATCCTACAACAAAC
ATP5B	GGTCCTGAGACTTTGGGCAGAA	CCTCAGCATGAATGGGAGCA
ETV5	TGTGCTGTCACTGGGCATAGG	TCAAATCAGCTGGCAGGTTCA
KCNJ11	GACTGAGGTCCCTGAGGTGAAG	CAGAGTTCTAGGCAAGTTCACACAA
NEUROD1	TTACCTTGGCATATGCTCTTGTC	TGCCGTCCAGTCCCATATTC
PCSK2	CAATGCACATCCATTCCCAAG	AAGGTGCTCCAGGCTAAGCTC
SNAP25	AGAATCGCCAGATCGACAGGA	ACACGGGTGGGCACACTTAAC
TP53	TCGAGATGTTCCGAGAGCTGAAT	GTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTT
LZTS1	ACAGTCCAGACCCAAGTCAAAGATG	ACGGCCTGGTGAAATGAAG

BHLHE41	TGCCAAGGTAGCACTGTGAGAA	ACAGCGTTTGAGGCAAACAGTAG
ARX	CTTCCAGAAGACGCACTACCC	TCGGTCAAGTCCAGCCTCA
SST	CCCAGACTCCGTCAGTTTC	GGACAGATCTTCAGGTTGGAG
PGK1	GACAAGTTTGATGAGAATGCCAAGA	TGCTTTCAGGACCACAGTCCA
BCL6	AGCCCTATCCCTGTGAAATCTGTG	GCTTCTGGCGCAAGTGAAGTC
MECOM	GGAATCCAGTGCTATCCAGTCCA	GCAGGTTTATAAGGCATTCTGCTCA
KCNK1	CAGTCCTGGAGGATGACTGGAAC	GGCAATAAGGCCAAGTAGCAGGT
NKX2-2	AACCGTCCCAGCGTTAATGTC	GCTGACAATATCGCTACTCACACAA
PDGFRA	TTGCTGTGAGCCTTGATGA	CAGGTGGGAGCATTTGTTAGGAC
SOX2	GTGAGCGCCCTGCAGTACAA	GCGAGTAGGACATGCTGTAGGTG
CSR3	TTGAGCTGAACGGAGTCCACA	CCCAGTTTGGCATCTTGAAGACTA
EXOC6B	CACCTTGGGAGCATTACAGCA	TCTCAAGTCGATGAAGGCCAAC
NANOG	TCCAACATCCTGAACCTCAGCTA	TGCGTCACACCATTGCTATTCTT
RAB12	AGTTGGACTGTGAAACGGACAGAG	ACTTGCTTCACAGAACCGCATC
COX6a2	GAGTTCCGTCCCTACCAACACCT	TCACGTGGCTATTGTGGAACAGA
ACTB	TGGCACCCAGCACAATGAA	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA
KLF9	ACGGCTGACTCCAACCTCCAA	TGGACTGCTCCCAGTCCCTAA
G6PD	GGACAACATCGCCTGCGTTA	ATCTGCAGTAGGTGGTTCTGCATC
KCNK3	GTTGGTGCCTGTGTCCCAAGTA	TTCGTCAGCTGCGTTCCATC
NKX6-1	GAGGGCTCGTTTGGCCTATTC	ATCTCGGCAGCGTGCTTCT
PFKFB2	TCAGGACAGGATCTGACTGCAA	AGAGGCACATGCATCAAGTCAA
SOX9	GGAGATGAAATCTGTTCTGGGAATG	TTGAAGGTAACTGCTGGTGTCTG
ACOX2	GGCAAGAACAGCCTACCTGGAC	GCGTTCGTAGACGTTTCCATCATA
GHRL	GCTTTGCACAGTGGATGTTTACTTG	CTCCAGCAGCTTTGGTCCCTA
CYB5B	TGGAACCTATCGTTTGAGCCTGTA	TCATTGTCCCACATTGCAGCTA
CFAP126	CTCCAATGGGCTGTGTCCTG	CTTGAATTATGGTTGGACTTCGTG
UCN3	CGCACCAAGTTCACCCTGTC	TCCCAATTTGCGCATCA
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
CHGA	TCCCTGTGAACAGCCCTATGAATAA	AAAGTGTGTCGGAGATGACCTCAA
GATA4	TGGTCAGATGGCAGCCAGAG	TGCTTCGAATTCGTGTTGCAG
MDH1	CTTCAGTTGCTTGACTCGTTTGGA	TTGGCATGGTTGACATCTGGA
NODAL	GAGGGCGAGTGTCTAATCCTG	AGGAGCACTCTGCCATTATCCA
PLCB4	CCATGTCTCTACCATGCCATCA	CGGAATCTGCAGAAACAATTCTTA
SOX11	CTTGTGCTTCGATCTAACCAGCTTC	ACCCTGAGCATTAACACTGCATACC

MAFB	TTGTAACCAGAATCACCTGAGGTC	CCAGGGTCAGGGATGGCTAA
FAM105A	TCAGCAAACCTTACTGGGCCAAAC	CCTGGCATGGACTTGAAGCA
HOPX	GACCAGGTGGAAATCCTGGAGTA	TTTGCTCCTGGAGATCAAATCACTA
RCOR2	AACCTCACGCTCCGAGGTCTT	CAGGCTGCTGTTCGTCTGCT
GCK	ATGACCGGCACTGCTGAGA	AGCCCTTGGTCCAGTTGAGAA
TBP	TGCTGCGGTAATCATGAGGATA	TGAAGTCCAAGAACTTAGCTGGAA
EGR1	GCCAAGCAAACCAATGGTGA	GCTCTGAGAATACTGGGACTGCTG
GCG	CTTGCCGCCAGGGACTTTA	ACGTGGCTAGCAGGTGATGTTG
MEIS1	CACCATATTTGAATTGGCCTGAAC	TCCTTAAGACACTGCCTGCAACA
PAX4	GTTCCAGCGTGGGCAGTATC	TCTTGCCGACGCCATTTG
PPY	TGTGCATGGCTGTGAAGTGG	CCCAGCAGTGGCTGTAGTAACAGA
ABCC8	TCACACTTTGCCGAAACCGTAG	ATCTGTTGGCAGCTGTGAGGA
ATP9A	TGAATGAACCTGCAAAGCATCC	ATTAACAGACTGCGCCTCAAACC
LRFN2	GGTCAAGTGGTCTGTACGAAGTC	GCACACACAAGTCGTAGCCAGTC
ISX	CAGGCATGCAATATGCCAGA	CTTTCATCCAGCGGTGCTAGAG
GLP1R	GCTGGACCAGGAACTCCAACA	TTGGATACCACGATGCAGATGAC
PDX1	ACTCCACCTTGGGACCTGTTTAGA	CGAGTAAGAATGGCTTTATGGCAGA
B2M	CGGGCATTCTGAAGCTGA	GGATGGATGAAACCCAGACACATAG
ELAVL4	ACCCACTAAGTGCATGTAGACAGGA	GGAGTCTATGATGCAGCCTTGGA
HHEX	TCAGAATCGACGCGCTAAATG	CTCTGATCACAGGAACTGTCCAAAC
NR3C2	CTTAACCAGGTTTGGGATGGAGA	GACTGGGACAGGCATTCAACA
PAX6	TTTAAAGATCCTGGAGGTGGACATA	GCTCAGGTGCTCGGGTTCTA
RASGRF1	ACTGCAAGGCACAACCCACTC	CCCTCAGATCCCAGCACAAAGTA
VAMP2	CAGGGATATCTAAGCTGTGGTGTGA	AATCTGGATGCGCCACAGAA
SIX2	ACAGGTCAGCAACTGGTTCAAGA	ACTTGCCGCTGCCATTCA
G6PC2	GGACCAACAGTGGCTCCAGA	CCAGAAGTGAAGCAGAGGTTCAAG
GSC	ACCTCCGCGAGGAGAAAGTG	GACGACGACGTCTTGTTCCA
DLL3	ACTCCCGGATGCACTCAACA	ACATCTTCAGGGCGATTCCAA
MAFA	TTGAGCCAGGTCTAACTTCTTTCCA	AAGGTGGGAACGGAGAACCAC
PPIA	ATCTGCACTGCCAAGACTGAG	GAAGGAATGATCTGGTGGTTAAGA

表 9. KRB バッファー組成

KRB buffer A solution	NaCl	593.77	
	KCl	23.742	
	KH ₂ PO ₄	5.9372	
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	5.9355	
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	12.7193	
KRB buffer B solution	NaHCO ₃	31.246	
	NaCl	91.495	mM
KRB working solution	KRB sol. A	20	
	KRB sol. B	16	
	1M HEPES	1	
	MilliQ	63	
	30% BSA	0.66	
KRB Low Glc	KRB	50	
	10% Glc	0.27	
KRB High Glc	KRB	5	
	10% Glc	0.18	
KRB Low + KCl	KRB Low Glc	0.76	
	1M KCl	0.24	mL

表 10. 発現上昇 DEG

Gene name	Gene symbol	Gene ID	K-3/Ctrl	p-adj
solute carrier family 28 member 2	SLC28A2	ENSG00000137860	2.02	1.20×10^{-13}
rippy transcriptional repressor 3	RIPPLY3	ENSG00000183145	1.68	8.06×10^{-13}
glycine amidinotransferase	GATM	ENSG00000171766	1.66	4.51×10^{-12}
ribosomal protein L39 pseudogene 3	RPL39P3	ENSG00000235174	1.55	1.28×10^{-11}
catenin delta 2	CTNND2	ENSG00000169862	2.13	1.44×10^{-9}
leucine rich repeat neuronal 4	LRRN4	ENSG00000125872	2.03	2.74×10^{-9}
alpha-1-microglobulin/bikunin precursor	AMBP	ENSG00000106927	1.54	2.90×10^{-9}
collagen type IX alpha 2 chain	COL9A2	ENSG00000049089	1.54	2.94×10^{-9}
long intergenic non-protein coding RNA 607	LINC00607	ENSG00000235770	1.72	2.31×10^{-7}
leucine rich repeat transmembrane neuronal 1	LRRTM1	ENSG00000162951	1.51	6.12×10^{-7}
BAALC, MAP3K1 and KLF4 binding	BAALC	ENSG00000164929	2.25	9.01×10^{-7}
pancreatic and duodenal homeobox 1	PDX1	ENSG00000139515	1.55	2.19×10^{-6}
chloride intracellular channel 6	CLIC6	ENSG00000159212	1.71	4.78×10^{-6}
guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha 2	GUCY1A2	ENSG00000152402	1.88	8.13×10^{-6}
complement C1q like 3	C1QL3	ENSG00000165985	2.38	1.06×10^{-5}
Wnt family member 5A	WNT5A	ENSG00000114251	1.82	1.19×10^{-5}
steroidogenic acute regulatory protein	STAR	ENSG00000147465	2.09	4.58×10^{-5}
calmegin	CLGN	ENSG00000153132	1.58	5.42×10^{-5}
neuronal cell adhesion molecule	NRCAM	ENSG00000091129	1.53	8.39×10^{-5}
calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 6	CACNG6	ENSG00000130433	2.05	9.54×10^{-5}
podoplanin	PDPN	ENSG00000162493	1.54	9.99×10^{-5}
uncharacterized LOC642366	AC010478.1	ENSG00000259663	2.41	1.24×10^{-4}
family with sequence similarity 149 member A	FAM149A	ENSG00000109794	1.58	1.26×10^{-4}
inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	ITPR1	ENSG00000150995	1.51	1.31×10^{-4}
calbindin 1	CALB1	ENSG00000104327	2.50	1.81×10^{-4}
glutamate decarboxylase like 1	GADL1	ENSG00000144644	2.29	2.00×10^{-4}
beta-secretase 2	BACE2	ENSG00000182240	1.58	3.26×10^{-4}
solute carrier family 2 member 12	SLC2A12	ENSG00000146411	1.61	3.93×10^{-4}
GLI family zinc finger 3	GLI3	ENSG00000106571	1.72	4.31×10^{-4}
G protein-coupled receptor 176	GPR176	ENSG00000166073	1.53	4.93×10^{-4}
solute carrier family 27 member 6	SLC27A6	ENSG00000113396	1.67	5.90×10^{-4}
dual specificity phosphatase 10	DUSP10	ENSG00000143507	1.52	7.09×10^{-4}
flavin containing monooxygenase 1	FMO1	ENSG00000010932	1.55	7.82×10^{-4}
cell adhesion molecule 3	CADM3	ENSG00000162706	1.51	1.08×10^{-3}
ring finger protein 157	RNF157	ENSG00000141576	1.70	1.28×10^{-3}
butyrophilin subfamily 3 member A2	BTN3A2	ENSG00000186470	2.05	1.47×10^{-3}
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit	GABRB2	ENSG00000145864	1.55	1.63×10^{-3}
arylsulfatase family member I	ARSI	ENSG00000183876	1.92	1.73×10^{-3}
methyltransferase like 7A	METTL7A	ENSG00000185432	1.55	1.95×10^{-3}
long intergenic non-protein coding RNA 2038	LINC02038	ENSG00000229155	1.63	2.74×10^{-3}
signal transducer and activator of transcription 5A	STAT5A	ENSG00000126561	1.76	2.85×10^{-3}
transmembrane protein 229B	TMEM229B	ENSG00000198133	1.57	3.66×10^{-3}
novel transcript	AC022168.1	ENSG00000285543	2.10	3.82×10^{-3}
transforming growth factor beta induced	TGFB1	ENSG00000120708	1.68	4.23×10^{-3}
cell division cycle 45	CDC45	ENSG00000093009	1.55	4.33×10^{-3}
ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 2	ATP1B2	ENSG00000129244	1.83	4.46×10^{-3}
ATPase phospholipid transporting 10D (putative)	ATP10D	ENSG00000145246	1.55	5.30×10^{-3}
synaptotagmin like 4	SYTL4	ENSG00000102362	1.80	5.54×10^{-3}
calpain 6	CAPN6	ENSG00000077274	1.86	6.13×10^{-3}
family with sequence similarity 162 member B	FAM162B	ENSG00000183807	1.98	6.86×10^{-3}
survival of motor neuron 1, telomeric	SMN1	ENSG00000172062	2.09	7.93×10^{-3}
serine protease 12	PRSS12	ENSG00000164099	1.62	7.93×10^{-3}
TNF superfamily member 15	TNFSF15	ENSG00000181634	1.80	1.10×10^{-2}
popeye domain containing 3	POPDC3	ENSG00000132429	1.76	1.27×10^{-2}
novel transcript	AC254633.1	ENSG00000272482	2.37	1.31×10^{-2}
family with sequence similarity 163 member A	FAM163A	ENSG00000143340	1.69	1.59×10^{-2}
limbic system associated membrane protein	LSAMP	ENSG00000185565	2.41	1.73×10^{-2}
kelch like family member 14	KLHL14	ENSG00000197705	1.58	1.78×10^{-2}

Gene name	Gene symbol	Gene ID	K-3/Ctrl	p-adj
homeobox B2	HOXB2	ENSG00000173917	2.07	1.93×10^{-2}
intestine specific homeobox	ISX	ENSG00000175329	1.74	2.17×10^{-2}
corticotropin releasing hormone binding protein	CRHBP	ENSG00000145708	2.15	2.20×10^{-2}
neurotrophic receptor tyrosine kinase 3	NTRK3	ENSG00000140538	1.92	2.39×10^{-2}
odd-skipped related transcription factor 1	OSR1	ENSG00000143867	2.03	2.43×10^{-2}
homeobox B13	HOXB13	ENSG00000159184	3.21	2.49×10^{-2}
integrin subunit alpha 11	ITGA11	ENSG00000137809	2.49	2.58×10^{-2}
cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 2	CNIH2	ENSG00000174871	2.05	2.60×10^{-2}
NK2 homeobox 2	NKX2-2	ENSG00000125820	1.70	2.66×10^{-2}
neuromedin U	NMU	ENSG00000109255	1.66	3.11×10^{-2}
family with sequence similarity 133, member B (FAM133B) pseudogene	AC122718.1	ENSG00000250461	1.84	3.37×10^{-2}
ependymin related 1	EPDR1	ENSG00000086289	1.75	3.43×10^{-2}
homeobox A3	HOXA3	ENSG00000105997	1.52	3.52×10^{-2}
family with sequence similarity 84 member A	FAM84A	ENSG00000162981	1.51	3.56×10^{-2}
chloride intracellular channel 5	CLIC5	ENSG00000112782	3.66	3.57×10^{-2}
S100 calcium binding protein Z	S100Z	ENSG00000171643	2.02	3.84×10^{-2}
lipase C, hepatic type	LIPC	ENSG00000166035	2.09	4.07×10^{-2}
zinc finger protein 385C	ZNF385C	ENSG00000187595	1.57	4.13×10^{-2}
MLLT3, super elongation complex subunit	MLLT3	ENSG00000171843	1.53	4.15×10^{-2}
fructose-bisphosphatase 1	FBP1	ENSG00000165140	2.20	4.22×10^{-2}
src kinase associated phosphoprotein 2	SKAP2	ENSG00000005020	1.92	4.52×10^{-2}
poly(ADP-ribose) polymerase family member 12	PARP12	ENSG000000059378	1.69	4.74×10^{-2}
kelch like family member 32	KLHL32	ENSG00000186231	1.98	4.78×10^{-2}
insulin like growth factor 2	IGF2	ENSG00000167244	2.95	4.83×10^{-2}

表 11. 発現低下 DEG

Gene name	Gene symbol	Gene ID	K-3/Ctrl	p-adj
solute carrier family 7 member 11	SLC7A11	ENSG00000151012	0.32	1.84×10^{-31}
methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2	MTHFD2	ENSG00000065911	0.42	2.77×10^{-31}
ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1	CHAC1	ENSG00000128965	0.13	8.11×10^{-27}
Jun dimerization protein 2	JDP2	ENSG00000140044	0.44	1.24×10^{-25}
DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C15	DNAJC15	ENSG00000120675	0.58	6.50×10^{-23}
phosphoserine aminotransferase 1	PSAT1	ENSG00000135069	0.54	1.61×10^{-21}
uncharacterized LOC400221	FLJ22447	ENSG00000232774	0.46	2.02×10^{-20}
DNA damage inducible transcript 4	DDIT4	ENSG00000168209	0.48	1.49×10^{-17}
solute carrier family 22 member 3	SLC22A3	ENSG00000146477	0.61	6.21×10^{-16}
solute carrier family 7 member 7	SLC7A7	ENSG00000155465	0.65	3.10×10^{-15}
solute carrier family 7 member 1	SLC7A1	ENSG00000139514	0.52	1.24×10^{-14}
ankyrin repeat domain 1	ANKRD1	ENSG00000148677	0.59	3.61×10^{-13}
cadherin related family member 3	CDHR3	ENSG00000128536	0.62	3.61×10^{-13}
adrenomedullin 2	ADM2	ENSG00000128165	0.44	1.03×10^{-11}
regulator of G protein signaling 5	RG55	ENSG00000143248	0.62	2.63×10^{-10}
sestrin 2	SES2	ENSG00000130766	0.63	1.23×10^{-9}
novel transcript	AL355987.4	ENSG00000273066	0.58	2.90×10^{-9}
gastric inhibitory polypeptide receptor	GIPR	ENSG0000010310	0.53	2.90×10^{-9}
R-spondin 3	RSP3	ENSG00000146374	0.58	2.94×10^{-9}
peptidyl arginine deiminase 2	PADI2	ENSG00000117115	0.40	2.42×10^{-8}
T-box 2	TBX2	ENSG00000121068	0.46	3.73×10^{-8}
unc-5 netrin receptor D	UNC5D	ENSG00000156687	0.59	4.74×10^{-8}
netrin G1	NTNG1	ENSG00000162631	0.49	6.45×10^{-8}
stromal antigen 3-like 1 (pseudogene)	STAG3L1	ENSG00000205583	0.32	1.45×10^{-7}
fyn related Src family tyrosine kinase	FRK	ENSG00000111816	0.62	2.61×10^{-7}
long intergenic non-protein coding RNA 2593	LINC02593	ENSG00000223764	0.59	2.96×10^{-7}
cadherin like and PC-esterase domain containing 1	CPED1	ENSG00000106034	0.43	3.49×10^{-7}
long intergenic non-protein coding RNA 842	LINC00842	ENSG00000285294	0.60	6.21×10^{-7}
membrane associated ring-CH-type finger 1	44621	ENSG00000145416	0.55	7.87×10^{-7}
mucin 6, oligomeric mucus/gel-forming	MUC6	ENSG00000184956	0.43	1.81×10^{-6}
CCDC183 antisense RNA 1	CCDC183-AS1	ENSG00000228544	0.49	2.29×10^{-6}
chromosome 3 open reading frame 52	C3orf52	ENSG00000114529	0.50	2.29×10^{-6}
chromosome 2 open reading frame 88	C2orf88	ENSG00000187699	0.50	2.78×10^{-6}
solute carrier family 6 member 9	SLC6A9	ENSG00000196517	0.50	3.59×10^{-6}
transmembrane protein 198B (pseudogene)	TMEM198B	ENSG00000182796	0.65	6.72×10^{-6}
uncharacterized LOC105370854	AC103740.1	ENSG00000259370	0.24	1.82×10^{-5}
endogenous retrovirus group 48 member 1	ERVH48-1	ENSG00000233056	0.64	2.32×10^{-5}
ring finger protein 224	RNF224	ENSG00000233198	0.55	2.76×10^{-5}
spectrin beta, erythrocytic	SPTB	ENSG00000070182	0.63	3.04×10^{-5}
polo like kinase 2	PLK2	ENSG00000145632	0.65	3.49×10^{-5}
novel transcript, antisense to GET4	AC073957.3	ENSG00000273151	0.51	4.58×10^{-5}
DIO3 opposite strand upstream RNA	DIO3OS	ENSG00000258498	0.39	4.83×10^{-5}
activating transcription factor 3	ATF3	ENSG00000162772	0.64	5.56×10^{-5}
CTBP1 antisense RNA	CTBP1-AS	ENSG00000280927	0.39	5.65×10^{-5}
titin	TTN	ENSG00000155657	0.55	6.56×10^{-5}
phosphatidylinositol 4-kinase alpha pseudogene 1	PI4KAP1	ENSG00000274602	0.58	7.15×10^{-5}
MIR122 host gene	MIR122HG	ENSG00000267391	0.51	7.51×10^{-5}
extracellular matrix protein 2	ECM2	ENSG00000106823	0.67	7.54×10^{-5}
calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 4	CACNG4	ENSG00000075461	0.59	7.80×10^{-5}
ventricular zone expressed PH domain containing 1	VEPH1	ENSG00000197415	0.64	1.01×10^{-4}
shisa family member 9	SHISA9	ENSG00000237515	0.51	1.02×10^{-4}
novel transcript	AL117339.5	ENSG00000283930	0.38	1.16×10^{-4}
nodal growth differentiation factor	NODAL	ENSG00000156574	0.62	1.22×10^{-4}
CD37 molecule	CD37	ENSG00000104894	0.67	1.31×10^{-4}
long intergenic non-protein coding RNA 1108	LINC01108	ENSG00000226673	0.52	1.40×10^{-4}
TEC	AC084759.3	ENSG00000280362	0.30	1.42×10^{-4}
RAB11 family interacting protein 1 pseudogene 1	RAB11FIP1P1	ENSG00000228492	0.25	1.60×10^{-4}
novel transcript	AL645608.2	ENSG00000230699	0.62	1.70×10^{-4}

Gene name	Gene symbol	Gene ID	K-3/Ctrl	p-adj
asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	ASNS	ENSG00000070669	0.32	1.74×10^{-4}
novel transcript, antisense to LAMB1	AC005046.1	ENSG00000273055	0.44	1.94×10^{-4}
ANKRD10 intronic transcript 1	ANKRD10-IT1	ENSG00000229152	0.51	2.27×10^{-4}
MT-CO1 pseudogene 12	MTCO1P12	ENSG00000237973	0.56	2.82×10^{-4}
DNA damage inducible transcript 3	DDIT3	ENSG00000175197	0.64	2.90×10^{-4}
heat shock protein family D (Hsp60) member 1 pseudogene 11	HSPD1P11	ENSG00000251348	0.36	3.12×10^{-4}
FLNB antisense RNA 1	FLNB-AS1	ENSG00000244161	0.49	3.28×10^{-4}
hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 7 pseudogene 2	HSD17B7P2	ENSG00000099251	0.60	3.38×10^{-4}
transmembrane protein 106A	TMEM106A	ENSG00000184988	0.50	3.98×10^{-4}
novel transcript, sense intronic to KLC1	AL049840.5	ENSG00000270108	0.30	3.99×10^{-4}
ankyrin repeat domain 55	ANKRD55	ENSG00000164512	0.58	4.38×10^{-4}
SMG1 pseudogene 7	SMG1P7	ENSG00000261556	0.52	4.45×10^{-4}
prostaglandin D2 receptor	PTGDR	ENSG00000168229	0.43	4.79×10^{-4}
sperm acrosome associated 6	SPACA6	ENSG00000182310	0.58	5.02×10^{-4}
long intergenic non-protein coding RNA 342	LINC00342	ENSG00000232931	0.55	6.65×10^{-4}
MAM domain containing 4	MAMDC4	ENSG00000177943	0.63	6.68×10^{-4}
ankyrin repeat domain 36C	ANKRD36C	ENSG00000174501	0.60	6.74×10^{-4}
chromosome 8 open reading frame 31 (putative)	C8orf31	ENSG00000177335	0.61	7.35×10^{-4}
cysteine rich tail 1	CYSRT1	ENSG00000197191	0.59	7.72×10^{-4}
eukaryotic translation initiation factor 4A1	EIF4A1	ENSG00000161960	0.57	7.73×10^{-4}
DS cell adhesion molecule like 1	DSCAML1	ENSG00000177103	0.65	8.42×10^{-4}
novel transcript	AC007448.3	ENSG00000266473	0.47	9.92×10^{-4}
nucleolin pseudogene 1	NCLP1	ENSG00000213212	0.44	1.06×10^{-3}
leucine rich repeat containing 32	LRRC32	ENSG00000137507	0.46	1.23×10^{-3}
arginine vasopressin receptor 1A	AVPR1A	ENSG00000166148	0.53	1.23×10^{-3}
pleckstrin 2	PLEK2	ENSG00000100558	0.23	1.24×10^{-3}
diacylglycerol kinase beta	DGKB	ENSG00000136267	0.64	1.59×10^{-3}
novel transcript	AC048341.1	ENSG00000257354	0.55	1.63×10^{-3}
RAD51 antisense RNA 1	RAD51-AS1	ENSG00000245849	0.53	1.63×10^{-3}
novel transcript, antisense to EFN2	AL138689.2	ENSG00000284966	0.43	1.70×10^{-3}
novel transcript, sense intronic to KLC1	AL049840.4	ENSG00000269958	0.56	1.81×10^{-3}
coiled-coil domain containing 180	CCDC180	ENSG00000197816	0.43	1.91×10^{-3}
maternally expressed 3	MEG3	ENSG00000214548	0.51	2.04×10^{-3}
novel transcript	AC021078.1	ENSG00000230551	0.62	2.29×10^{-3}
pappalysin 1	PAPPA	ENSG00000182752	0.56	2.35×10^{-3}
FYN binding protein 2	FYB2	ENSG00000187889	0.66	2.46×10^{-3}
solute carrier family 17 member 9	SLC17A9	ENSG00000101194	0.66	2.57×10^{-3}
mitochondrially encoded tRNA tyrosine	MT-TY	ENSG00000210144	0.64	2.62×10^{-3}
STE20-related kinase adaptor alpha	STRADA	ENSG00000266173	0.59	2.72×10^{-3}
endogenous retrovirus group K3 member 1	ERVK3-1	ENSG00000142396	0.63	2.85×10^{-3}
anoctamin 9	ANO9	ENSG00000185101	0.59	2.99×10^{-3}
COBW domain containing 3	CBWD3	ENSG00000196873	0.51	3.02×10^{-3}
NA	RF00019	ENSG00000207146	0.32	3.18×10^{-3}
novel transcript	AP000350.6	ENSG00000273295	0.48	3.32×10^{-3}
coiled-coil domain containing 84	CCDC84	ENSG00000186166	0.63	3.33×10^{-3}
ubiquitin associated protein 1 like	UBAP1L	ENSG00000246922	0.50	3.43×10^{-3}
CDK5 regulatory subunit associated protein 3	CDK5RAP3	ENSG00000108465	0.64	3.66×10^{-3}
novel transcript, antisense to RPA1N	AC004148.2	ENSG00000263272	0.48	3.66×10^{-3}
coiled-coil domain containing 188 (CCDC188) pseudogene	AP000344.2	ENSG00000248409	0.47	3.96×10^{-3}
regulator of G protein signaling 1	RGS1	ENSG00000090104	0.45	4.25×10^{-3}
nucleic acid binding protein 1	NABP1	ENSG00000173559	0.56	4.55×10^{-3}
glutamate ionotropic receptor delta type subunit 2	GRID2	ENSG00000152208	0.41	4.68×10^{-3}
glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	GPD1	ENSG00000167588	0.58	4.84×10^{-3}
RUSC1 antisense RNA 1	RUSC1-AS1	ENSG00000225855	0.50	4.84×10^{-3}
ameloblastin	AMBN	ENSG00000178522	0.31	5.80×10^{-3}
calpain 12	CAPN12	ENSG00000182472	0.52	6.29×10^{-3}
collagen type IV alpha 1 chain	COL4A1	ENSG00000187498	0.66	6.42×10^{-3}
novel transcript, antisense to MTMR3	AC003681.1	ENSG00000279159	0.58	6.68×10^{-3}
TEC	AC004836.1	ENSG00000280439	0.54	6.75×10^{-3}

Gene name	Gene symbol	Gene ID	K-3/Ctrl	p-adj
neuropeptide Y receptor Y4-2	NPY4R2	ENSG00000264717	0.55	7.31×10^{-3}
novel transcript, sense intronic to ZNF83	AC022150.4	ENSG00000269825	0.66	7.62×10^{-3}
TEC	AC005839.1	ENSG00000279089	0.41	7.80×10^{-3}
golgin A8 family member B	GOLGA8B	ENSG00000215252	0.57	8.04×10^{-3}
olfactory receptor family 7 subfamily E member 12 pseudogene	OR7E12P	ENSG00000189398	0.55	8.19×10^{-3}
novel transcript, antisense to UBE2I	AL031714.1	ENSG00000261505	0.57	8.20×10^{-3}
novel transcript, antisense to GATA6	AC091588.1	ENSG00000264012	0.41	8.23×10^{-3}
C-type lectin domain family 2 member D	CLEC2D	ENSG00000069493	0.64	8.46×10^{-3}
uncharacterized serine/threonine-protein kinase SgK494	SGK494	ENSG00000167524	0.61	8.46×10^{-3}
Rho GTPase activating protein 8	ARHGAP8	ENSG00000241484	0.58	8.53×10^{-3}
sprouty RTK signaling antagonist 4	SPRY4	ENSG00000187678	0.45	8.74×10^{-3}
novel transcript	AC084018.1	ENSG00000272849	0.52	9.04×10^{-3}
collagen type IV alpha 3 chain	COL4A3	ENSG00000169031	0.55	9.08×10^{-3}
KCNQ1 opposite strand/antisense transcript 1	KCNQ1OT1	ENSG00000269821	0.39	9.69×10^{-3}
STX16-NPEPL1 readthrough (NMD candidate)	STX16-NPEPL1	ENSG00000254995	0.66	1.01×10^{-2}
nebulin	NEB	ENSG00000183091	0.51	1.02×10^{-2}
regulator of G protein signaling 16	RGS16	ENSG00000143333	0.66	1.05×10^{-2}
regulator of G protein signaling 8	RGS8	ENSG00000135824	0.51	1.07×10^{-2}
DiGeorge syndrome critical region gene 9	DGCR9	ENSG00000273032	0.61	1.08×10^{-2}
chromosome 2 open reading frame 92	C2orf92	ENSG00000228486	0.61	1.09×10^{-2}
canopy FGF signaling regulator 2	CNPY2	ENSG00000257727	0.64	1.11×10^{-2}
novel transcript, sense intronic to EFN2	AL138689.1	ENSG00000274204	0.40	1.22×10^{-2}
novel transcript, antisense to CTBP2	AL731571.1	ENSG00000273599	0.53	1.22×10^{-2}
unc-93 homolog A	UNC93A	ENSG00000112494	0.63	1.27×10^{-2}
novel transcript	AL450306.1	ENSG00000228748	0.34	1.31×10^{-2}
schwannomin interacting protein 1	SCHIP1	ENSG00000151967	0.53	1.36×10^{-2}
novel transcript	AC131212.2	ENSG00000279700	0.38	1.40×10^{-2}
troponin C1, slow skeletal and cardiac type	TNNC1	ENSG00000114854	0.55	1.42×10^{-2}
zinc ribbon domain containing 1 antisense, pseudogene	ZNRD1ASP	ENSG00000204623	0.63	1.47×10^{-2}
EPS8 like 3	EPS8L3	ENSG00000198758	0.36	1.47×10^{-2}
C1GALT1 pseudogene 2	C1GALT1P2	ENSG00000251435	0.41	1.48×10^{-2}
poly(A) binding protein cytoplasmic 1 like	PABPC1L	ENSG00000101104	0.61	1.60×10^{-2}
arylsulfatase D pseudogene 1	ARSDP1	ENSG00000225117	0.53	1.66×10^{-2}
ribosomal protein S7 (RPS7) pseudogene	AL691432.1	ENSG00000269737	0.59	1.68×10^{-2}
angiopoietin 1	ANGPT1	ENSG00000154188	0.44	1.76×10^{-2}
ribosomal protein L36a	RPL36A	ENSG00000241343	0.56	1.77×10^{-2}
TEC	AC118344.2	ENSG00000279759	0.45	1.77×10^{-2}
TBX2 antisense RNA 1	TBX2-AS1	ENSG00000267280	0.64	1.78×10^{-2}
leucine rich repeat containing 77, pseudogene	LRRC77P	ENSG00000244227	0.64	1.82×10^{-2}
coiled-coil domain containing 65	CCDC65	ENSG00000139537	0.60	1.92×10^{-2}
novel transcript	AC023034.1	ENSG00000259594	0.32	1.96×10^{-2}
SH3BP5 antisense RNA 1	SH3BP5-AS1	ENSG00000224660	0.61	1.96×10^{-2}
erb-b2 receptor tyrosine kinase 4	ERBB4	ENSG00000178568	0.60	2.00×10^{-2}
ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit alpha 2	ATP1A2	ENSG00000018625	0.38	2.01×10^{-2}
novel transcript	AC087521.2	ENSG00000246250	0.31	2.05×10^{-2}
endogenous Bornavirus like nucleoprotein 2	EBLN2	ENSG00000255423	0.55	2.09×10^{-2}
MAGE family member D4B	MAGED4B	ENSG00000187243	0.29	2.11×10^{-2}
novel transcript, antisense to SLC16A4	AL355488.1	ENSG00000273373	0.56	2.12×10^{-2}
novel transcript	AC245060.6	ENSG00000279278	0.52	2.13×10^{-2}
monoacylglycerol O-acyltransferase 3	MOGAT3	ENSG00000106384	0.32	2.13×10^{-2}
proline rich transmembrane protein 2	PRRT2	ENSG00000167371	0.53	2.14×10^{-2}
zinc finger protein 385D	ZNF385D	ENSG00000151789	0.39	2.20×10^{-2}
novel transcript, sense intronic to ST20	AC015871.3	ENSG00000278600	0.56	2.27×10^{-2}
novel transcript	AC006059.1	ENSG00000230084	0.31	2.28×10^{-2}
NPTN intronic transcript 1	NPTN-IT1	ENSG00000281183	0.48	2.34×10^{-2}
cytochrome P450 family 2 subfamily C member 8	CYP2C8	ENSG00000138115	0.61	2.35×10^{-2}
novel transcript	AL035448.1	ENSG00000236526	0.35	2.44×10^{-2}
uncharacterized LOC105371492	AC027796.4	ENSG00000262903	0.52	2.49×10^{-2}
forkhead box H1 (FOXH1) pseudogene	AL590627.1	ENSG00000255585	0.40	2.50×10^{-2}

Gene name	Gene symbol	Gene ID	K-3/Ctrl	p-adj
catenin alpha 2	CTNNA2	ENSG00000066032	0.53	2.50×10^{-2}
basic helix-loop-helix family member e41	BHLHE41	ENSG00000123095	0.56	2.53×10^{-2}
UDP glucuronosyltransferase family 2 member B7	UGT2B7	ENSG00000171234	0.63	2.54×10^{-2}
uncharacterized LOC105373958	AC104667.2	ENSG00000234949	0.40	2.55×10^{-2}
programmed cell death 6 (PDCD6) pseudogene	AC124944.3	ENSG00000260261	0.55	2.55×10^{-2}
SGK2, serine/threonine kinase 2	SGK2	ENSG00000101049	0.56	2.60×10^{-2}
C1q and TNF related 12	C1QTNF12	ENSG00000184163	0.57	2.63×10^{-2}
ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 5	ADAMTS5	ENSG00000154736	0.51	2.63×10^{-2}
novel transcript, antisense to PSMD7	AC009120.2	ENSG00000259972	0.56	2.69×10^{-2}
testis specific serine kinase 4	TSSK4	ENSG00000139908	0.54	2.80×10^{-2}
ASMTL antisense RNA 1	ASMTL-AS1	ENSG00000236017	0.52	2.81×10^{-2}
Bruton tyrosine kinase	BTBK	ENSG00000010671	0.34	2.81×10^{-2}
novel transcript, sense intronic to BICD1	AC026356.2	ENSG00000276115	0.37	2.95×10^{-2}
DNA topoisomerase III beta	TOP3B	ENSG00000100038	0.34	2.96×10^{-2}
novel transcript	AP001625.2	ENSG00000235772	0.30	2.96×10^{-2}
elastin microfibril interfacer 2	EMILIN2	ENSG00000132205	0.58	2.98×10^{-2}
TEC	AC020917.4	ENSG00000280332	0.45	3.00×10^{-2}
dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 1	DYNC111	ENSG00000158560	0.63	3.02×10^{-2}
novel transcript	AC092683.1	ENSG00000230606	0.52	3.06×10^{-2}
coiled-coil domain containing 144C, pseudogene	CCDC144CP	ENSG00000154898	0.52	3.10×10^{-2}
novel transcript	AL136964.1	ENSG00000274718	0.39	3.14×10^{-2}
DEAD-box helicase 47	DDX47	ENSG00000213782	0.41	3.18×10^{-2}
TEC	AC020951.1	ENSG00000278897	0.38	3.21×10^{-2}
ribosomal protein S20 pseudogene 22	RPS20P22	ENSG00000239218	0.42	3.27×10^{-2}
nuclear pore complex interacting protein family member B4	NPIPB4	ENSG00000185864	0.62	3.29×10^{-2}
long intergenic non-protein coding RNA 672	LINC00672	ENSG00000263874	0.50	3.35×10^{-2}
very low density lipoprotein receptor	VLDLR	ENSG00000147852	0.50	3.52×10^{-2}
chondroadherin	CHAD	ENSG00000136457	0.38	3.52×10^{-2}
novel transcript, antisense to RARRES1	AC080013.1	ENSG00000240207	0.43	3.58×10^{-2}
olfactory receptor family 51 subfamily B member 5	ORS1B5	ENSG00000167355	0.60	3.77×10^{-2}
semaphorin 6D	SEMA6D	ENSG00000137872	0.57	3.83×10^{-2}
family with sequence similarity 19 member A4, C-C motif chemokine like	FAM19A4	ENSG00000163377	0.56	3.87×10^{-2}
mutS homolog 5	MSH5	ENSG00000204410	0.50	3.99×10^{-2}
GARS divergent transcript	GARS-DT	ENSG00000196295	0.60	4.04×10^{-2}
aquaporin 3 (Gill blood group)	AQP3	ENSG00000165272	0.62	4.07×10^{-2}
novel transcript, antisense to IWS1	AC010976.1	ENSG00000231731	0.49	4.13×10^{-2}
HHIP antisense RNA 1	HHIP-AS1	ENSG00000248890	0.44	4.17×10^{-2}
novel transcript, antisense to ZNF91	AC010300.1	ENSG00000267934	0.41	4.17×10^{-2}
novel transcript	AC122688.3	ENSG00000279233	0.53	4.26×10^{-2}
novel transcript, antisense to REV3L	AL080317.3	ENSG00000272356	0.50	4.31×10^{-2}
interphotoreceptor matrix proteoglycan 1	IMPG1	ENSG00000112706	0.47	4.34×10^{-2}
activator of HSP90 ATPase homolog 2, pseudogene	AHSA2P	ENSG00000173209	0.60	4.35×10^{-2}
angiopoietin like 3	ANGPTL3	ENSG00000132855	0.42	4.38×10^{-2}
long intergenic non-protein coding RNA 894	LINC00894	ENSG00000235703	0.63	4.39×10^{-2}
ubiquitin conjugating enzyme E2 Q2 pseudogene 1	UBE2Q2P1	ENSG00000189136	0.57	4.42×10^{-2}
metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1	MALAT1	ENSG00000251562	0.52	4.47×10^{-2}
novel transcript	AL008721.2	ENSG00000272977	0.56	4.50×10^{-2}
potassium voltage-gated channel subfamily H member 8	KCNH8	ENSG00000183960	0.64	4.54×10^{-2}
SOS1 intronic transcript 1	SOS1-IT1	ENSG00000229692	0.64	4.61×10^{-2}
novel transcript	AP006284.1	ENSG00000254815	0.61	4.61×10^{-2}
SPARC (osteonectin), cwcw and kazal like domains proteoglycan 3	SPOCK3	ENSG00000196104	0.62	4.61×10^{-2}
interleukin 1 alpha	IL1A	ENSG00000115008	0.46	4.87×10^{-2}
TEC	AC145098.2	ENSG00000279821	0.57	4.94×10^{-2}
tyrosinase related protein 1	TYRP1	ENSG00000107165	0.46	4.98×10^{-2}

表 12. clusterProfiler による、発現上昇 DEG を用いた GO 解析

Gene name	Gene symbol	Gene ID	K-3/Ctrl	p-adj
<i>nerve development</i>				
GLI family zinc finger 3	GLI3	ENSG00000106571	1.72	4.31×10^{-4}
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit	GABRB2	ENSG00000145864	1.55	1.63×10^{-3}
homeobox B2	HOXB2	ENSG00000173917	2.07	1.93×10^{-2}
NK2 homeobox 2	NKX2-2	ENSG00000125820	1.70	2.66×10^{-2}
homeobox A3	HOXA3	ENSG00000105997	1.52	3.52×10^{-2}
<i>integral component of synaptic membrane</i>				
leucine rich repeat transmembrane neuronal 1	LRRTM1	ENSG00000162951	1.51	6.12×10^{-7}
neuronal cell adhesion molecule	NRCAM	ENSG00000091129	1.53	8.39×10^{-5}
cell adhesion molecule 3	CADM3	ENSG00000162706	1.51	1.08×10^{-3}
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit	GABRB2	ENSG00000145864	1.55	1.63×10^{-3}
neurotrophic receptor tyrosine kinase 3	NTRK3	ENSG00000140538	1.92	2.39×10^{-2}
cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 2	CNIH2	ENSG00000174871	2.05	2.60×10^{-2}
<i>intrinsic component of synaptic membrane</i>				
leucine rich repeat transmembrane neuronal 1	LRRTM1	ENSG00000162951	1.51	6.12×10^{-7}
neuronal cell adhesion molecule	NRCAM	ENSG00000091129	1.53	8.39×10^{-5}
cell adhesion molecule 3	CADM3	ENSG00000162706	1.51	1.08×10^{-3}
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit	GABRB2	ENSG00000145864	1.55	1.63×10^{-3}
neurotrophic receptor tyrosine kinase 3	NTRK3	ENSG00000140538	1.92	2.39×10^{-2}
cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 2	CNIH2	ENSG00000174871	2.05	2.60×10^{-2}
<i>cochlea development</i>				
Wnt family member 5A	WNT5A	ENSG00000114251	1.82	1.19×10^{-5}
calbindin 1	CALB1	ENSG00000104327	2.50	1.81×10^{-4}
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit	GABRB2	ENSG00000145864	1.55	1.63×10^{-3}
neurotrophic receptor tyrosine kinase 3	NTRK3	ENSG00000140538	1.92	2.39×10^{-2}
<i>neuron fate specification</i>				
GLI family zinc finger 3	GLI3	ENSG00000106571	1.72	4.31×10^{-4}
neurotrophic receptor tyrosine kinase 3	NTRK3	ENSG00000140538	1.92	2.39×10^{-2}
NK2 homeobox 2	NKX2-2	ENSG00000125820	1.70	2.66×10^{-2}
<i>embryonic skeletal system development</i>				
Wnt family member 5A	WNT5A	ENSG00000114251	1.82	1.19×10^{-5}
GLI family zinc finger 3	GLI3	ENSG00000106571	1.72	4.31×10^{-4}
homeobox B2	HOXB2	ENSG00000173917	2.07	1.93×10^{-2}
odd-skipped related transcription factor 1	OSR1	ENSG00000143867	2.03	2.43×10^{-2}
homeobox A3	HOXA3	ENSG00000105997	1.52	3.52×10^{-2}
<i>anterior/posterior pattern specification</i>				
Wnt family member 5A	WNT5A	ENSG00000114251	1.82	1.19×10^{-5}
GLI family zinc finger 3	GLI3	ENSG00000106571	1.72	4.31×10^{-4}
homeobox B2	HOXB2	ENSG00000173917	2.07	1.93×10^{-2}
odd-skipped related transcription factor 1	OSR1	ENSG00000143867	2.03	2.43×10^{-2}
homeobox A3	HOXA3	ENSG00000105997	1.52	3.52×10^{-2}
MLLT3, super elongation complex subunit	MLLT3	ENSG00000171843	1.53	4.15×10^{-2}
<i>type B pancreatic cell differentiation</i>				
pancreatic and duodenal homeobox 1	PDX1	ENSG00000139515	1.55	2.19×10^{-6}
Wnt family member 5A	WNT5A	ENSG00000114251	1.82	1.19×10^{-5}
NK2 homeobox 2	NKX2-2	ENSG00000125820	1.70	2.66×10^{-2}
<i>enteroendocrine cell differentiation</i>				
pancreatic and duodenal homeobox 1	PDX1	ENSG00000139515	1.55	2.19×10^{-6}
Wnt family member 5A	WNT5A	ENSG00000114251	1.82	1.19×10^{-5}
NK2 homeobox 2	NKX2-2	ENSG00000125820	1.70	2.66×10^{-2}
<i>digestive system development</i>				
pancreatic and duodenal homeobox 1	PDX1	ENSG00000139515	1.55	2.19×10^{-6}
Wnt family member 5A	WNT5A	ENSG00000114251	1.82	1.19×10^{-5}
GLI family zinc finger 3	GLI3	ENSG00000106571	1.72	4.31×10^{-4}
NK2 homeobox 2	NKX2-2	ENSG00000125820	1.70	2.66×10^{-2}
insulin like growth factor 2	IGF2	ENSG00000167244	2.95	4.83×10^{-2}

Gene name	Gene symbol	Gene ID	K-3/Ctrl	p-adj
<i>pancreas development</i>				
pancreatic and duodenal homeobox 1	PDX1	ENSG00000139515	1.55	2.19×10^{-6}
Wnt family member 5A	WNT5A	ENSG00000114251	1.82	1.19×10^{-5}
NK2 homeobox 2	NKX2-2	ENSG00000125820	1.70	2.66×10^{-2}
insulin like growth factor 2	IGF2	ENSG00000167244	2.95	4.83×10^{-2}
<i>embryonic skeletal system morphogenesis</i>				
GLI family zinc finger 3	GLI3	ENSG00000106571	1.72	4.31×10^{-4}
homeobox B2	HOXB2	ENSG00000173917	2.07	1.93×10^{-2}
odd-skipped related transcription factor 1	OSR1	ENSG00000143867	2.03	2.43×10^{-2}
homeobox A3	HOXA3	ENSG00000105997	1.52	3.52×10^{-2}
<i>cell fate specification</i>				
Wnt family member 5A	WNT5A	ENSG00000114251	1.82	1.19×10^{-5}
GLI family zinc finger 3	GLI3	ENSG00000106571	1.72	4.31×10^{-4}
neurotrophic receptor tyrosine kinase 3	NTRK3	ENSG00000140538	1.92	2.39×10^{-2}
NK2 homeobox 2	NKX2-2	ENSG00000125820	1.70	2.66×10^{-2}
<i>postsynaptic specialization</i>				
catenin delta 2	CTNND2	ENSG00000169862	2.13	1.44×10^{-9}
leucine rich repeat transmembrane neuronal 1	LRRTM1	ENSG00000162951	1.51	6.12×10^{-7}
BAALC, MAP3K1 and KLF4 binding	BAALC	ENSG00000164929	2.25	9.01×10^{-7}
neuronal cell adhesion molecule	NRCAM	ENSG00000091129	1.53	8.39×10^{-5}
inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	ITPR1	ENSG00000150995	1.51	1.31×10^{-4}
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit	GABRB2	ENSG00000145864	1.55	1.63×10^{-3}
cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 2	CNIH2	ENSG00000174871	2.05	2.60×10^{-2}
<i>neuron to neuron synapse</i>				
catenin delta 2	CTNND2	ENSG00000169862	2.13	1.44×10^{-9}
BAALC, MAP3K1 and KLF4 binding	BAALC	ENSG00000164929	2.25	9.01×10^{-7}
neuronal cell adhesion molecule	NRCAM	ENSG00000091129	1.53	8.39×10^{-5}
inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	ITPR1	ENSG00000150995	1.51	1.31×10^{-4}
calbindin 1	CALB1	ENSG00000104327	2.50	1.81×10^{-4}
ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 2	ATP1B2	ENSG00000129244	1.83	4.46×10^{-3}
cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 2	CNIH2	ENSG00000174871	2.05	2.60×10^{-2}
<i>terminal bouton</i>				
calbindin 1	CALB1	ENSG00000104327	2.50	1.81×10^{-4}
serine protease 12	PRSS12	ENSG00000164099	1.62	7.93×10^{-3}
neuromedin U	NMU	ENSG00000109255	1.66	3.11×10^{-2}
<i>transporter complex</i>				
chloride intracellular channel 6	CLIC6	ENSG00000159212	1.71	4.78×10^{-6}
calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 6	CACNG6	ENSG00000130433	2.05	9.54×10^{-5}
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit	GABRB2	ENSG00000145864	1.55	1.63×10^{-3}
ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 2	ATP1B2	ENSG00000129244	1.83	4.46×10^{-3}
ATPase phospholipid transporting 10D (putative)	ATP10D	ENSG00000145246	1.55	5.30×10^{-3}
cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 2	CNIH2	ENSG00000174871	2.05	2.60×10^{-2}
chloride intracellular channel 5	CLIC5	ENSG00000112782	3.66	3.57×10^{-2}
<i>axon terminus</i>				
calbindin 1	CALB1	ENSG00000104327	2.50	1.81×10^{-4}
serine protease 12	PRSS12	ENSG00000164099	1.62	7.93×10^{-3}
corticotropin releasing hormone binding protein	CRHBP	ENSG00000145708	2.15	2.20×10^{-2}
neuromedin U	NMU	ENSG00000109255	1.66	3.11×10^{-2}
<i>chloride channel complex</i>				
chloride intracellular channel 6	CLIC6	ENSG00000159212	1.71	4.78×10^{-6}
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit	GABRB2	ENSG00000145864	1.55	1.63×10^{-3}
chloride intracellular channel 5	CLIC5	ENSG00000112782	3.66	3.57×10^{-2}
<i>neuron projection terminus</i>				
calbindin 1	CALB1	ENSG00000104327	2.50	1.81×10^{-4}
serine protease 12	PRSS12	ENSG00000164099	1.62	7.93×10^{-3}
corticotropin releasing hormone binding protein	CRHBP	ENSG00000145708	2.15	2.20×10^{-2}
neuromedin U	NMU	ENSG00000109255	1.66	3.11×10^{-2}

Gene name	Gene symbol	Gene ID	K-3/Ctrl	p-adj
<i>GABA-ergic synapse</i>				
leucine rich repeat transmembrane neuronal 1	LRRTM1	ENSG00000162951	1.51	6.12×10^{-7}
calbindin 1	CALB1	ENSG00000104327	2.50	1.81×10^{-4}
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit	GABRB2	ENSG00000145864	1.55	1.63×10^{-3}

表 13. Metascape による、発現上昇 DEG を用いた GO 解析結果

Gene name	Gene symbol	Gene ID	K-3/Ctrl	p-adj
<i>regulation of postsynaptic cytosolic calcium ion concentration</i>				
guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha 2	GUCY1A2	ENSG00000152402	1.88	8.13×10^{-6}
Wnt family member 5A	WNT5A	ENSG00000114251	1.82	1.19×10^{-5}
steroidogenic acute regulatory protein	STAR	ENSG00000147465	2.09	4.58×10^{-5}
calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 6	CACNG6	ENSG00000130433	2.05	9.54×10^{-5}
podoplanin	PDPN	ENSG00000162493	1.54	9.99×10^{-5}
inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	ITPR1	ENSG00000150995	1.51	1.31×10^{-4}
calbindin 1	CALB1	ENSG00000104327	2.50	1.81×10^{-4}
ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 2	ATP1B2	ENSG00000129244	1.83	4.46×10^{-3}
synaptotagmin like 4	SYTL4	ENSG00000102362	1.80	5.54×10^{-3}
insulin like growth factor 2	IGF2	ENSG00000167244	2.95	4.83×10^{-2}
<i>nerve development</i>				
rippy transcriptional repressor 3	RIPPLY3	ENSG00000183145	1.68	8.06×10^{-13}
catenin delta 2	CTNND2	ENSG00000169862	2.13	1.44×10^{-9}
collagen type IX alpha 2 chain	COL9A2	ENSG00000049089	1.54	2.94×10^{-9}
pancreatic and duodenal homeobox 1	PDX1	ENSG00000139515	1.55	2.19×10^{-6}
Wnt family member 5A	WNT5A	ENSG00000114251	1.82	1.19×10^{-5}
neuronal cell adhesion molecule	NRCAM	ENSG00000091129	1.53	8.39×10^{-5}
podoplanin	PDPN	ENSG00000162493	1.54	9.99×10^{-5}
calbindin 1	CALB1	ENSG00000104327	2.50	1.81×10^{-4}
GLI family zinc finger 3	GLI3	ENSG00000106571	1.72	4.31×10^{-4}
dual specificity phosphatase 10	DUSP10	ENSG00000143507	1.52	7.09×10^{-4}
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit	GABRB2	ENSG00000145864	1.55	1.63×10^{-3}
signal transducer and activator of transcription 5A	STAT5A	ENSG00000126561	1.76	2.85×10^{-3}
transforming growth factor beta induced	TGFB1	ENSG00000120708	1.68	4.23×10^{-3}
synaptotagmin like 4	SYTL4	ENSG00000102362	1.80	5.54×10^{-3}
popeye domain containing 3	POPDC3	ENSG00000132429	1.76	1.27×10^{-2}
homeobox B2	HOXB2	ENSG00000173917	2.07	1.93×10^{-2}
neurotrophic receptor tyrosine kinase 3	NTRK3	ENSG00000140538	1.92	2.39×10^{-2}
odd-skipped related transcription factor 1	OSR1	ENSG00000143867	2.03	2.43×10^{-2}
homeobox B13	HOXB13	ENSG00000159184	3.21	2.49×10^{-2}
NK2 homeobox 2	NKX2-2	ENSG00000125820	1.70	2.66×10^{-2}
homeobox A3	HOXA3	ENSG00000105997	1.52	3.52×10^{-2}
MLLT3, super elongation complex subunit	MLLT3	ENSG00000171843	1.53	4.15×10^{-2}
src kinase associated phosphoprotein 2	SKAP2	ENSG00000005020	1.92	4.52×10^{-2}
insulin like growth factor 2	IGF2	ENSG00000167244	2.95	4.83×10^{-2}
<i>type B pancreatic cell differentiation</i>				
leucine rich repeat transmembrane neuronal 1	LRRTM1	ENSG00000162951	1.51	6.12×10^{-7}
pancreatic and duodenal homeobox 1	PDX1	ENSG00000139515	1.55	2.19×10^{-6}
Wnt family member 5A	WNT5A	ENSG00000114251	1.82	1.19×10^{-5}
podoplanin	PDPN	ENSG00000162493	1.54	9.99×10^{-5}
GLI family zinc finger 3	GLI3	ENSG00000106571	1.72	4.31×10^{-4}
dual specificity phosphatase 10	DUSP10	ENSG00000143507	1.52	7.09×10^{-4}
neurotrophic receptor tyrosine kinase 3	NTRK3	ENSG00000140538	1.92	2.39×10^{-2}
odd-skipped related transcription factor 1	OSR1	ENSG00000143867	2.03	2.43×10^{-2}
NK2 homeobox 2	NKX2-2	ENSG00000125820	1.70	2.66×10^{-2}
homeobox A3	HOXA3	ENSG00000105997	1.52	3.52×10^{-2}
insulin like growth factor 2	IGF2	ENSG00000167244	2.95	4.83×10^{-2}
<i>behavior</i>				
glycine amidinotransferase	GATM	ENSG00000171766	1.66	4.51×10^{-12}
leucine rich repeat neuronal 4	LRRN4	ENSG00000125872	2.03	2.74×10^{-9}
leucine rich repeat transmembrane neuronal 1	LRRTM1	ENSG00000162951	1.51	6.12×10^{-7}
calbindin 1	CALB1	ENSG00000104327	2.50	1.81×10^{-4}
GLI family zinc finger 3	GLI3	ENSG00000106571	1.72	4.31×10^{-4}
G protein-coupled receptor 176	GPR176	ENSG00000166073	1.53	4.93×10^{-4}
ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 2	ATP1B2	ENSG00000129244	1.83	4.46×10^{-3}
corticotropin releasing hormone binding protein	CRHBP	ENSG00000145708	2.15	2.20×10^{-2}

Gene name	Gene symbol	Gene ID	K-3/Ctrl	p-adj
<i>regulation of developmental growth</i>				
Wnt family member 5A	WNT5A	ENSG00000114251	1.82	1.19×10^{-5}
neuronal cell adhesion molecule	NRCAM	ENSG00000091129	1.53	8.39×10^{-5}
dual specificity phosphatase 10	DUSP10	ENSG00000143507	1.52	7.09×10^{-4}
ring finger protein 157	RNF157	ENSG00000141576	1.70	1.28×10^{-3}
signal transducer and activator of transcription 5A	STAT5A	ENSG00000126561	1.76	2.85×10^{-3}
odd-skipped related transcription factor 1	OSR1	ENSG00000143867	2.03	2.43×10^{-2}
homeobox B13	HOXB13	ENSG00000159184	3.21	2.49×10^{-2}
fructose-bisphosphatase 1	FBP1	ENSG00000165140	2.20	4.22×10^{-2}
insulin like growth factor 2	IGF2	ENSG00000167244	2.95	4.83×10^{-2}
<i>regulation of synapse organization</i>				
catenin delta 2	CTNND2	ENSG00000169862	2.13	1.44×10^{-9}
leucine rich repeat transmembrane neuronal 1	LRRTM1	ENSG00000162951	1.51	6.12×10^{-7}
complement C1q like 3	C1QL3	ENSG00000165985	2.38	1.06×10^{-5}
Wnt family member 5A	WNT5A	ENSG00000114251	1.82	1.19×10^{-5}
neuronal cell adhesion molecule	NRCAM	ENSG00000091129	1.53	8.39×10^{-5}
podoplanin	PDPN	ENSG00000162493	1.54	9.99×10^{-5}
inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	ITPR1	ENSG00000150995	1.51	1.31×10^{-4}
GLI family zinc finger 3	GLI3	ENSG00000106571	1.72	4.31×10^{-4}
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit	GABRB2	ENSG00000145864	1.55	1.63×10^{-3}
ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 2	ATP1B2	ENSG00000129244	1.83	4.46×10^{-3}
TNF superfamily member 15	TNFSF15	ENSG00000181634	1.80	1.10×10^{-2}
neurotrophic receptor tyrosine kinase 3	NTRK3	ENSG00000140538	1.92	2.39×10^{-2}
<i>regulation of ion transmembrane transport</i>				
leucine rich repeat transmembrane neuronal 1	LRRTM1	ENSG00000162951	1.51	6.12×10^{-7}
chloride intracellular channel 6	CLIC6	ENSG00000159212	1.71	4.78×10^{-6}
calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 6	CACNG6	ENSG00000130433	2.05	9.54×10^{-5}
ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit beta 2	ATP1B2	ENSG00000129244	1.83	4.46×10^{-3}
synaptotagmin like 4	SYTL4	ENSG00000102362	1.80	5.54×10^{-3}
corticotropin releasing hormone binding protein	CRHBP	ENSG00000145708	2.15	2.20×10^{-2}
odd-skipped related transcription factor 1	OSR1	ENSG00000143867	2.03	2.43×10^{-2}
cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 2	CNIH2	ENSG00000174871	2.05	2.60×10^{-2}
chloride intracellular channel 5	CLIC5	ENSG00000112782	3.66	3.57×10^{-2}
<i>NABA MATRISOME ASSOCIATED</i>				
alpha-1-microglobulin/bikunin precursor	AMBP	ENSG00000106927	1.54	2.90×10^{-9}
complement C1q like 3	C1QL3	ENSG00000165985	2.38	1.06×10^{-5}
Wnt family member 5A	WNT5A	ENSG00000114251	1.82	1.19×10^{-5}
serine protease 12	PRSS12	ENSG00000164099	1.62	7.93×10^{-3}
TNF superfamily member 15	TNFSF15	ENSG00000181634	1.80	1.10×10^{-2}
corticotropin releasing hormone binding protein	CRHBP	ENSG00000145708	2.15	2.20×10^{-2}
S100 calcium binding protein Z	S100Z	ENSG00000171643	2.02	3.84×10^{-2}
insulin like growth factor 2	IGF2	ENSG00000167244	2.95	4.83×10^{-2}
<i>response to hormone</i>				
pancreatic and duodenal homeobox 1	PDX1	ENSG00000139515	1.55	2.19×10^{-6}
GLI family zinc finger 3	GLI3	ENSG00000106571	1.72	4.31×10^{-4}
flavin containing monooxygenase 1	FMO1	ENSG0000010932	1.55	7.82×10^{-4}
signal transducer and activator of transcription 5A	STAT5A	ENSG00000126561	1.76	2.85×10^{-3}
corticotropin releasing hormone binding protein	CRHBP	ENSG00000145708	2.15	2.20×10^{-2}
neurotrophic receptor tyrosine kinase 3	NTRK3	ENSG00000140538	1.92	2.39×10^{-2}
NK2 homeobox 2	NKX2-2	ENSG00000125820	1.70	2.66×10^{-2}
fructose-bisphosphatase 1	FBP1	ENSG00000165140	2.20	4.22×10^{-2}
insulin like growth factor 2	IGF2	ENSG00000167244	2.95	4.83×10^{-2}
<i>Signaling by Receptor Tyrosine Kinases</i>				
collagen type IX alpha 2 chain	COL9A2	ENSG00000049089	1.54	2.94×10^{-9}
inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	ITPR1	ENSG00000150995	1.51	1.31×10^{-4}
gamma-aminobutyric acid type A receptor beta2 subunit	GABRB2	ENSG00000145864	1.55	1.63×10^{-3}
signal transducer and activator of transcription 5A	STAT5A	ENSG00000126561	1.76	2.85×10^{-3}

Gene name	Gene symbol	Gene ID	K-3/Ctrl	p-adj
neurotrophic receptor tyrosine kinase 3	NTRK3	ENSG00000140538	1.92	2.39×10^{-2}
insulin like growth factor 2	IGF2	ENSG00000167244	2.95	4.83×10^{-2}