

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09045

研究課題名（和文）methylation statusに着目したインスリン産生細胞分化度解明の研究

研究課題名（英文）Evaluation for the maturation of insulin-producing cells differentiated from ADSC by the methylation status

研究代表者

池本 哲也（IKEMOTO, Tetsuya）

徳島大学・病院・特任教授

研究者番号：20398019

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：脂肪由来幹細胞からのinsulin-producing cell (IPC)分化誘導に際し、IPCの methylation statusを定量化することによって、細胞発生系譜との相関が明確となり、細胞成熟度が評価できるのではないかとして研究を行った。IPC成熟過程ではZnイオン濃度に依存すること、また、Znイオン濃度は methylation statusと相関することを確認した。また、膵細胞が破壊を受けると、methylation statusが変化することを見出したため、新生細胞である我々のIPC分化誘導に関して、quality controlの指標として使用できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が研究を進めている脂肪由来幹細胞からのinsulin-producing cell (IPC)分化誘導の臨床応用に際し、ヒトスケール製造においては、そのquality controlが絶対条件である。我々の結果はmethylation statusによってIPCを評価しうることを示唆するほか、破壊される膵島（細胞）を予測しうるというものであり、科学的知見とともに実臨床にも意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：We have investigated the quantification of methylation status for evaluating insulin-producing cell (IPC), which were differentiated from adipose-derived stem cell (ADSC) by our established protocol, because we assumed that the methylation status could be used for an index for evaluating IPC maturation by the revelation of its cell lineage (IPC differentiation lineage). We proved that IPC maturation status depended on zinc-ion concentration, and that could be estimated by zinc-ion in the supernatant of the culture medium, and that zinc-ion were correlated to IPC methylation status. Moreover, we found that the methylation status was changed by the mechanical destruction of pancreatic cells. Thus, the changes of IPC maturation status could be used as an index for IPC quality control during its manufacturing process.

研究分野：消化器外科（移植）、再生医療

キーワード：Insulin producing cell methylation status 成熟度評価 再生医療

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵島移植の臨床的意義と問題点

膵島移植は極めて低侵襲の細胞移植治療であり、1型糖尿病の根治的治療として、欧米ではすでに現実的な治療オプションとして認知されている。現在、豊富な脳死 donor が存在する欧米では複数の異なる donor から 1 人の患者への (multi-donor-one recipient) 移植が行われているが、絶対的 donor 不足である本邦においては、donor source の確保が急務であるにも関わらず、膵臓移植との allocation system が未確立であるために、事実上膵島移植は停滞している。その解決策としては、1. 効果的膵島分離法の確立、2. 移植膵島の graft loss 防止、3. 新たな donor source の開拓が挙げられる。

(2) 現状と研究の背景

新たなドナーソース候補として、研究代表者らは、自己移植が可能であり、また骨髄に比しても幹細胞の採取率が良好と報告されている脂肪由来幹細胞 (adipose tissue derived stem cell: ADSC) に着目し研究を行ってきた。しかし、細胞・細胞・PP 細胞等の複雑な集合体である膵島への分化誘導過程は極めて複雑であり、臨床応用へは程遠い。そこで我々は、細胞に注目しインスリン産生細胞: insulin-producing cell (IPC) への分化誘導を目指すこととした。これまでの細胞分化誘導法は D'Amour らの方法 (Nat Biotechnol. 2008) がその基礎となっており、膵発生プロセスの各段階の進行に必須となる分子メカニズムを模倣し段階的に培地を変える培養法が開発されつつある。具体的には、Activin A と Wnt 3a もしくは PI3K signal の阻害剤を用いて胚体内胚葉を誘導し、続いてレチノイン酸と Noggin を用いて PDX-1 陽性の膵前駆細胞へと分化させる手法である。しかしながら、誘導に 30 日以上 (中には 3 カ月以上) を必要とし、作成効率 (細胞収量) も良好とは言い難いのが現状である。

研究代表者らはすでにこの問題点に着目し、ADSC を用いた IPC 作成の培養期間短縮および作成効率の改善を目指した研究を行ってきた。培養条件の改変としては、これまで研究代表者らが癌幹細胞研究において多数報告 (Cancer Lett. 2016, Surg Today. 2012) してきた epigenetic 修飾に関与し、sphere 形成に大きく関わる Histone deacetylase inhibitor: HDACi につき検討した。HDACi は膵臓正常発生を加速させると報告 (Mol Cell Biol. 2008) されており、検討の結果、HDACi を我々の 2-step の分化誘導条件に添加することで IPC への分化誘導が短縮可能であることを報告した (Ikemoto T, et al. Pancreas 2018)。更に作成効率上昇については、膵島細胞が従来の単層培養法よりも、細胞外マトリクスを介して適切な空間配置を取って細胞凝集体を形成する方が機能的に優れていることが既に報告されていること、また通常、膵島の培養では平面的な培養面で継代を重ねると、細胞の機能が消失してしまうため、生体機能を維持した状態での細胞培養は難しく、現在もなお多くの研究が進められている段階にあることなどから、立体的培養で改善可能であることが予想される。研究代表者らもすでに、ヒト 1 型コラーゲンリコンビナントタンパク (RCP ピース) を 3 次元培養用足場素材として用い、IPC の 3 次元培養による効率的分化誘導に成功し、すでに前臨床を意識した xeno-antigen free protocol への改変も完了している (Ikemoto T, et al. Sci Rep. 2019)。ただし、実臨床応用を考える際に、1. 造腫瘍性の否定をせねばならないこと、2. 患者体内に移植する際には未分化な IPC を排除せねばならないこと、3. IPC lot 間に機能的差異があること、から成熟度の把握と IPC 精製の均質化のために発生系譜の正確な把握は必須である。しかしながら、新生人工細胞である IPC には確立された成熟度の評価方法はなく、培養法が改変されるたびに細胞発生系譜も明確でないのが現状である。従って至適移植時期も明らかではない。すなわち、言い換えれば、臨床応用に際し、ADSC より分化誘導したヒト IPC の分化誘導細胞系譜の普遍的な解明と内分泌的機能と相関した実効的な成熟度評価方法が必須であるということになる。

一方で、細胞の methylation status については様々な知見が蓄積されてきており、これまでに研究代表者らも癌研究において研究を進めてきた。中でも epigenetic 修飾に関与し、sphere 形成に大きく関わる Histone deacetylase inhibitor: HDACi について臨床試験等も行って来た (Anticancer res. 2014)。一般に遺伝子 promotor 領域の CpG islands は発生初期は methylation を受けていないことが多いが、発生に従って methylation を受け、遺伝子発現が抑制される。その機序は DNA methylation によって転写因子の結合が阻害され、さらに MBD (Methyl-CpG-binding domain, HDAC と相互作用を生じる) によって、転写不活性なクロマチン状態が形成されることにより、より安定的に遺伝子発現が抑制されることであるが、当修飾は、核酸修飾酵素などの働きによって、細胞が分裂しても引き継がれていくのが特徴である。このことから HDAC は広く細胞の発生にも重要な役割を持つが、更に HDAC を阻害することが膵臓の正常発生加速にも強く関与することが判明し、研究代表者らは IPC の分化誘導時に HDACi を添加した protocol を発案したことは上述した通りである (Pancreas. 2018)。このことから、DNA の methylation status は IPC 細胞分化に密接に関連していると予想される。そこで研究代表者らは、IPC の methylation status を定量化することによって、細胞発生系譜との相関関係が明確となり、更には IPC としての細胞成熟度が評価できるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

現在、IPCの発生系譜については、mRNAおよびDNAを腓膵細胞正常発生になぞらえて実証し、機能および成熟度については臨床的膵島移植のquality controlに準じてDithizon染色での確認、もしくは異なる糖濃度培養によるinsulin自立的分泌を評価するstimulation index(SI)などがATP assayと併用されている。しかしながら、培養方法が改変されるたびにIPCの発生過程は一定の系譜であるとは言えず(化学的加速や修飾によって、細かく変化する)、最終的にinsulin分泌で評価されるとは言え、その成熟度(すなわち移植至適時期)についてもmorphologyといった経験則的な要素が大きいと、絶対的な指標は未だ存在しない。また、Dithizon染色は細胞障害性が強く、一度染色した細胞は死滅しその後in vitro/in vivo共に使用できないほか、SIも必ずしもcell viabilityと相関しないことも報告されており、IPCの実臨床導入の際のshipping criteriaおよび至適移植時期を決定する際にgolden standardとなる評価系の確立が急務であると言える。研究代表者はこれまでに研究分担者の徳島大学先端酵素学研究所糖尿病臨床・研究開発センターと共同で膵島移植の研究を行ってきたが、膵細胞のINS遺伝子のpromotorの解析を行う中で、methylationの検討も並行して行って来た。同センターがこれまでに発表しているように(Kuroda A, et al. PLoS One. 2009)、膵細胞のINS遺伝子のCpG islandsのdemethylationが膵細胞の成熟に大きな役割を果たしていることが明らかとなっており、IPCにおけるINS遺伝子におけるCpG islandsのmethylation statusを解析することで、IPCも成熟度を評価できるのではないかと考えられた。

これまでに研究代表者はよりの確で簡便な細胞発生系譜と相関する指標の探索を行って来た。中でも膵細胞の代謝機構に関し、近年、亜鉛トランスポーター等の報告が見られる亜鉛イオン(Zn²⁺)の出納に着目してきた。膵細胞ではinsulinは合成される際に亜鉛イオン(Zn²⁺)と結合し小胞内顆粒の形で貯蔵されているため、Zn²⁺はinsulin分泌と同時に細胞外へ放出されるほか膵細胞・細胞へのautocrine/paracrineの作用が報告されている(J Clin Invest. 2013, Diabetol Int. 2017)。そこで研究代表者らは培養液中のZn²⁺濃度をIPCの培養開始時より経時的に計測し、Dithizon染色・mRNA発現およびSI(糖応答能)と相関がないかどうかの検討を行っている。本研究においては、IPCの分化誘導過程におけるZn²⁺の変動、Dithizon染色、mRNAとDNA(genetic profile)との相関も検討することを目的とした。

先述したように、IPCにおけるmethylation statusについての検討はこれまでに報告はないため学術的に独自性が高く、また、上述した研究代表者らの2-step protocolのコンセプトの一つはepigenetic修飾の化学的コントロールであり、IPC各期におけるmethylation statusの評価を行うことで、IPCの成熟度の評価が正確に行えるという意味においては、IPCの実臨床応用に際し、至適な成熟を適切に評価し、移植タイミングを導出できる(すなわち移植成績を向上させる)のみならず、将来的にshippingする際(移植の目的で実験室外もしくは他施設へ)のcriteriaとして必須の指標(quality controlの指標)になる可能性が高い。また、IPCのDNA methylation statusが定量化可能であれば、IPCへの分化誘導過程において詳細な発生系譜を明らかとすることが出来、現在の再生医療および発生学に与えるインパクトも大きいと考えられた。

3. 研究の方法

(1) IPCの発生系譜の確認(各段階におけるgenetic profile)

IPCを我々の3次元培養2-step protocolを用いてADSCより96 well plateにて分化誘導を行う。Step 1(分化増殖期) Step-2(成熟期)共に2日に1回、medium changeを行う際に細胞を8 well分採取し、DNAを保存する。うち一部はwestern blottingを行い、また同時にELISAでmRNA発現(PDX-1, NeuroD3, NGN3, MAFA, INS)を検討する。

採取したDNAはINS遺伝子Exon2領域の増幅過程の後(nested PCR)、1st amplification refractory mutation system: ARMS(+331,+404)および2nd ARMS(+367,+374)を行い、INS遺伝子Exon2領域のdemethylationを行う。その後INS遺伝子標的配列のmethylation patternを確認する。

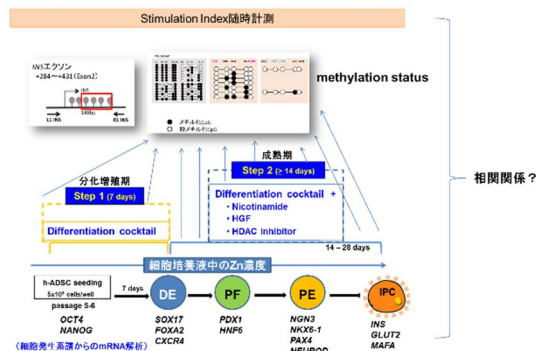
(2) 他成熟指標との比較検討

medium changeを行う際のsupernatantを保存し、メタロアッセイを行い、supernatantに含有されるZn²⁺濃度を測定する。なお、各ポイントで採取したIPCはSIを計測し、また、HEおよび抗insulin抗体染色でinsulin分泌能およびinsulin発現強度を評価する。

遺伝子発現とmethylation statusを比較検討し、相関関係がないかどうか、また、細胞培養液中のZn²⁺濃度、Dithizon染色の結果およびSIとの相関関係につき比較検討を行う。

(3) 各成熟段階のIPCの細胞運命(in vivo study)

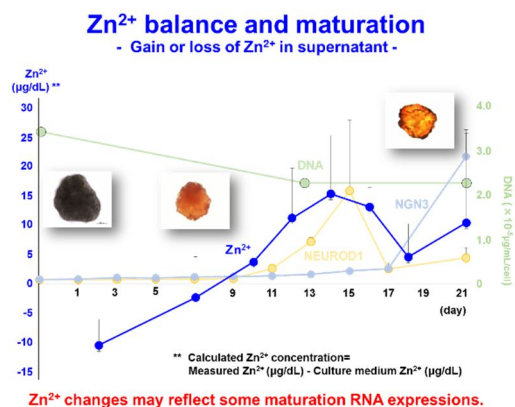
Methylation statusによるIPC分化系譜解析



STZ 誘導糖尿 nude mouse の腎被膜下に 300 IEQ 相当の各成熟段階の IPC を移植し、血糖変動を密に計測する。また、100 日後に担 IPC 腎および移植部位近傍皮下組織を摘出し、血糖再上昇を証明し、摘出組織については組織学的検討を行う (H.E. 染色、抗 insulin 抗体、抗 VEGF 抗体、抗 CD31 抗体染色)。

4. 研究成果

(1) 作成した IPC は蛍光免疫染色および免疫組織化学染色でインスリンの強発現および亜鉛輸送体蛋白 ZnT8、ZIP4 の発現を認めた。電子顕微鏡で細胞質内に膵島細胞に認められる分泌顆粒様の構造を多数認めた。また、培養開始後 17 日目の細胞における PCR で SOX17、NGN3、MAFA の強発現を認めた。分化誘導開始時から経時的に IPC の Dithizon 染色を行ったところ、培養期間に伴い徐々に橙色へ染色され、Image J による画像的解析でも染色における輝度の上昇が示され、第 17 日目にピークに達した ($P < 0.01$)。メタロアッセイによって、IPC 分化成熟誘導の過程における亜鉛イオン濃度変化は初期に負の値を示したのち、13 日目にプラトーに達することが判明した。なお、作成した IPC を糖尿病モデルマウスの腸間膜内に移植したところ、7 日目に血糖正常化を認め、30 日後まで維持された。これらの結果は、機能的に成熟する IPC は分化誘導における培地中亜鉛イオン濃度変化が特有のパターンを示し、分化・成熟・至適移植時期の新たな指標となりうることを示しており、また、少なくとも ADSC から内胚葉系の細胞分化誘導初期 (胚葉転換期) は亜鉛要求量が極めて大きいことが示唆され、細胞発生学・分子細胞学的な新たな知見を与える可能性があると考えられた。



(2) 上記の亜鉛イオン変動は、IPC から分離精製した DNA の methylation status の検討によって、負の相関関係があることが明らかとなった。IPC の DNA 自体は、ADSC (培養開始時) と IPC 完成時 (培養終了時) を比較すると、78.4% が保持されており、また、IPC が破壊を受けると特異的パターンを示すことが明らかとなった。このことは、IPC の quality control として、間接的に培養液上清中の亜鉛イオンを用いることが出来る可能性を示唆しており、今後、膵島特異的 circulating cell-free DNA: cfDNA (膵細胞の成熟に伴い methylation status が変化する) に着目して研究を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Saito Y, Ikemoto T, Tokuda K, Miyazaki K, Yamada S, Imura S, Miyake M, Morine Y, Oyadomari S, Shimada M	4. 巻 28
2. 論文標題 Effective three-dimensional culture of hepatocyte-like cells generated from human adipose-derived mesenchymal stem cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Hepatobiliary Pancreat Sci.	6. 最初と最後の頁 705-715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tokuda K, Ikemoto T, Saito Y, Miyazaki K, Yamashita S, Yamada S, Imura S, Morine Y and Shimada M.	4. 巻 29
2. 論文標題 The Fragility of Cryopreserved Insulin-producing Cells Differentiated from Adipose-tissue-derived Stem Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Transplant.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0963689720954798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ikemoto T, Tokuda K, Wada Y, Gao L, Miyazaki K, Yamada S, Saito Y, Imura S, Morine Y and Shimada M.	4. 巻 49
2. 論文標題 Adipose Tissue from Type 1 Diabetes Mellitus Patients Can Be Used to Generate Insulin-producing Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 1225-1231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wada Yuma, Ikemoto Tetsuya, Morine Yuji, Imura Satoru, Saito Yu, Yamada Shinichiro, Shimada Mitsuo	4. 巻 9
2. 論文標題 The Differences in the Characteristics of Insulin-producing Cells Using Human Adipose-tissue Derived Mesenchymal Stem Cells from Subcutaneous and Visceral Tissues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-49701-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ohta Shogo, Ikemoto Tetsuya, Wada Yuma, Saito Yu, Yamada Shinichiro, Imura Satoru, Morine Yuji, Shimada Mitsuo	4. 巻 9
2. 論文標題 A change in the zinc ion concentration reflects the maturation of insulin-producing cells generated from adipose-derived mesenchymal stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55172-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ikemoto T, Tokuda K, Shimada M, Morine Y, Imura S, Saito Y, Yamada S, Teraoku H, Miyazaki K
2. 発表標題 Clinical application of auto-transplantation of generated insulin-producing cells from ADSC with Tokushima protocol.
3. 学会等名 第33回日本肝胆膵外科学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池本哲也, 島田光生, 徳田和徳, 宮崎克己, 山田眞一郎, 齋藤裕, 居村暁, 森根裕二
2. 発表標題 人工臓器の現状と展開-外科治療のコペルニクス的大転換・再建から再生へ- 再生医療を用いたインスリン枯渇状態の患者に対する自律的インスリン分泌細胞自己移植に関するAMED橋渡し研究
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳田和憲, 池本哲也, 島田光生, 齋藤裕, 吉川雅登, 山田眞一郎, 荒川悠佑, 居村暁, 森根裕二
2. 発表標題 亜鉛イオンに着目したADSCから製造したInsulin-producing cell成熟度に関する検討
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池本哲也, 齋藤裕, 居村暁, 森根裕二, 徳田和憲, 山田眞一郎, 吉川雅登, 島田光生
2. 発表標題 再生医療技術を用いたinsulin-producing cell移植の臨床応用に向けた研究
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池本哲也, 徳田和憲, 吉川雅登, 山田眞一郎, 齋藤裕, 荒川悠佑, 居村暁, 森根裕二, 島田光生
2. 発表標題 insulin-producing cell移植の細胞移植治療への臨床応用に向けた研究
3. 学会等名 第81回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikemoto T, Shimada M, Saito Y, Rui Feng, Yamada S, Iwahashi S, Morine Y, Imura S
2. 発表標題 THE POTNETIALLY CLINICAL APPLICATION OF XENO-ANTIGEN FREE DIFFERENTIATION PROTOCOL FOR INSULINPRODUCING CELLS USING HUMAN RECOMBINANT PEPTIDE PETALOID -PIECE FROM ADIPOSE-TISSUE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL
3. 学会等名 ESOT 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 池本哲也、島田光生	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 734
3. 書名 医学のあゆみ「1型糖尿病 診療と研究の最前線」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋藤 裕 (SAITO Yu) (50548675)	徳島大学・病院・講師 (16101)	
研究分担者	森根 裕二 (MORINE Yuji) (60398021)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授 (16101)	
研究分担者	黒田 暁生 (KURODA Akira) (70571412)	徳島大学・先端酵素学研究所・准教授 (16101)	
研究分担者	居村 暁 (IMURA Satoru) (90380021)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部・徳島大学専門研究員 (16101)	削除：2021年3月8日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関