

令和 6 年 4 月 18 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02373

研究課題名（和文）インスリン産生細胞へと分化誘導可能な間葉系幹細胞の特性解析と移植療法の構築

研究課題名（英文）Characteristic analysis of canine mesenchymal stem cells capable of differentiating into insulin-producing cells and establishment of transplantation therapy

研究代表者

手嶋 隆洋 (Teshima, Takahiro)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80610708

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：犬の糖尿病の新たな治療法として、脂肪由来間葉系幹細胞から作製したインスリン産生細胞の移植療法の実現を目指して本研究を実施した。間葉系幹細胞に4種類の転写因子を遺伝子導入することでインスリン産生細胞への誘導効率を高めることに成功した。分化誘導したインスリン産生細胞の分泌因子は糖尿病マウスの血糖降下作用が認められたが、移植後に正常血糖値までの十分な血糖降下作用を実現することはできなかった。また、細胞ソースの十分な確保を目的に樹立した不死化間葉系幹細胞を用いてもインスリン産生細胞への分化誘導が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は犬の代表的な内分泌疾患であり、その治療にはインスリン注射が不可欠である。そのため、飼い主は毎食後に必ずインスリン投与を実施する必要があり、その負担は非常に大きい。そこで、インスリン注射に代わる新たな治療法の確立を再生医療によって実現することを目標に本研究に取り組んだ。本研究結果として、犬の脂肪由来間葉系幹細胞から分化誘導したインスリン産生細胞によって血糖降下作用が確認できた。しかし、糖尿病マウスへの移植では、正常血糖値までの十分な血糖降下作用を実現するには至らなかった。本研究結果はインスリン注射に代わる新たな移植療法の可能性を示唆し、今後さらなる研究を継続する価値があると考えている。

研究成果の概要（英文）：This research was conducted to realize transplantation therapy of insulin-producing cells produced from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a new treatment for diabetes mellitus in dogs. We succeeded in increasing the efficiency of induction of mesenchymal stem cells into insulin-producing cells by gene transfection of four transcription factors (Pdx1, Neurog3, MafA, Pax4). Secreted factors from differentiated insulin-producing cells showed hypoglycemic effects in diabetic mice, but could not achieve sufficient hypoglycemic effects to normoglycemia after cell transplantation. Immortalized mesenchymal stem cells established to ensure a sufficient cell source were also able to induce differentiation into insulin-producing cells.

研究分野：獣医再生医療学

キーワード：糖尿病 インスリン 間葉系幹細胞 犬 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医療の進歩に伴い、インスリン注射を必要としない糖尿病治療の実現が期待され、人医学では、インスリン投与に替わる新たな糖尿病の治療法が iPS 細胞を用いて盛んに研究されている。しかし、安全性への懸念や作製に長期間を要するといった iPS 細胞自体の問題がまだまだ完全には払拭されていない。一方、生体内から分離可能な間葉系幹細胞は、iPS 細胞に比べて安全性が高いものの、間葉系以外への分化能に限界があった。そのため、幹細胞から内胚葉系のインスリン産生細胞を創出するには、多分化能をもつ iPS 細胞に頼らざるを得ない状況であった。しかし、間葉系幹細胞の多様性が明らかになるにつれ、その分化能に新たな可能性が広がり始めている。

獣医療においても犬や猫の糖尿病は代表的な内分泌疾患であり、生涯にわたってインスリン注射を必要とする症例がほとんどである。食後のインスリン投与を欠かさず実施することや生涯にわたって安定した血糖コントロールを実現することは動物と飼い主双方にとって非常に大きな負担となる。

2. 研究の目的

本研究では、インスリン産生細胞への分化誘導の鍵となる遺伝子を特定し、間葉系幹細胞からインスリン産生細胞への分化誘導効率の向上と安定化の確立、さらには移植療法の構築を目的とする。

3. 研究の方法

間葉系幹細胞から誘導可能なインスリン産生細胞の検討

ナイーブな間葉系幹細胞を細胞ソースとした場合にどの程度の分化誘導が可能であるかを始めに検討した。インスリン産生細胞への分化誘導を促進する物質 (bFGF, EGF, B27 supplement, N2 supplement, excendin-4, betacellulin, activinA, nicotinamide, HGF) を様々な条件で培養液中に添加し、インスリン産生細胞への分化誘導を観察した。また、培養液の組成とともに培養ディッシュの違いについても、通常の接着プレート、超低接着プレート、超低接着プレートを用いたスフェロイド形成について比較した。

インスリン産生細胞への誘導効率を向上するための転写因子の検討

インスリン産生細胞は内胚葉由来と細胞系譜が異なるため、転写因子の導入によって誘導効率が向上するかを検討した。過去の報告等を参考に、Pdx1, Neurog3, MafA, Pdx4 を候補遺伝子として、間葉系幹細胞に遺伝子導入した際のインスリン産生細胞への分化効率を検討した。間葉系幹細胞への遺伝子導入を行うにあたり、プラスミド DNA を用いた遺伝子導入法では効率的な導入ができなかったことから、アデノウイルスベクターを用いた方法で導入を行った。

In vitro におけるインスリン産生細胞の検討

間葉系幹細胞から分化誘導したインスリン産生細胞について検討した。のナイーブな間葉系幹細胞から分化誘導した細胞と の遺伝子導入後に分化誘導した細胞について、グルコース刺激によるインスリン産生能、抗インスリン抗体を用いた免疫染色、インスリン関連遺伝子の mRNA 発現量を解析した。

In vivo におけるインスリン産生細胞の検討

a. 間葉系幹細胞から分化誘導したインスリン産生細胞が分泌するインスリンの血糖降下作用はじめに犬の脂肪由来間葉系幹細胞から分化誘導したインスリン産生細胞の分泌因子がマウスの血糖降下作用を示すのかを検討した。ストレプトゾトシン投与によって誘発した糖尿病マウスに対して、インスリン産生細胞の分泌因子を腹腔内投与し、経時的な血糖値の変化を観察することで、血糖降下作用を確認した。

b. 糖尿病マウスに対する移植効果

鼠径部脂肪組織内、もしくは腸間膜にインスリン産生細胞を移植した際の治療効果について検討した。ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスを用いて、移植後の血糖値を経時的に測定するとともに、移植部位への生着を検討した。

不死化間葉系幹細胞の作製

細胞ソースとなる間葉系幹細胞は増殖能に制限があることから安定的な細胞ソースの供給を目的に不死化間葉系幹細胞を作製した。従来までの TERT, SV40, HPV E6/7 等の遺伝子導入による細胞の不死化方法とは異なり、K4DT 法 (CDK4R24C, CCND1, TERT) によって不死化間葉系幹細胞を作製し、元の間葉系幹細胞との性状を比較した。

不死化間葉系幹細胞から分化誘導したインスリン産生細胞の性状解析

の検討からインスリン産生細胞への誘導効率が向上した転写因子群 (Pdx1, Neurog3, MafA, Pdx4) を遺伝子導入した不死化間葉系幹細胞について、グルコース刺激によるインスリン産生能、抗インスリン抗体を用いた免疫染色、インスリン関連遺伝子の mRNA 発現量を解析した。

4. 研究成果

分化誘導培養法の確立

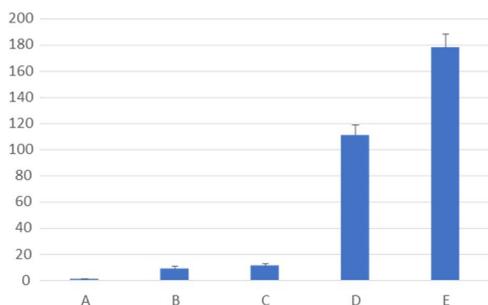
培養法について検討した結果、右図に示した培養液組成によって超低接着プレートを用いた培養法が最も誘導可能であった（膵β細胞を DTZ 染色によって確認）。超低接着プレートを用いた場合は、2日間培養することでスフェロイド形成を実施したの後に Step1の培養へと移行した。

分化誘導後の細胞について Pdx1, Nurog3, Glut2 mRNA 発現量をリアルタイム PCR によって比較した結果、全ての遺伝子発現量に明らかな増加が認められた。

分化誘導を施した細胞のインスリン分泌能について、グルコース刺激試験を用いて検討した結果、グルコース濃度の増加に伴い、インスリン分泌量の上昇が認められた。また、スフェロイド形成を行う際に基材(μ-piece)を用いることで、インスリン分泌量が増加する結果であった。これは、基材を用いることでスフェロイド塊内部の培養液や酸素循環が促進されることで、細胞死が減少したためと考えられた。

インスリン産生細胞への分化誘導を促進する転写遺伝子群の決定

候補遺伝子として Pdx1, Neurog3, MafA, Pdx4 の 4 遺伝子を選定し、導入遺伝子を組み合わせることで分化誘導効率の上昇を検討した。その結果、4 遺伝子全てを導入した場合に最も誘導効率が高まる結果が得られた（下図：インスリン遺伝子発現量）。また、遺伝子導入効率を検討した結果、間葉系幹細胞への導入はプラスミド DNA では非常に低い結果であったため、アデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入を実施した。本研究に使用したウイルスベクターを右に示す（VectorBuilder, vector ID: VB211201-1607thh, VB211202-1289tby）。



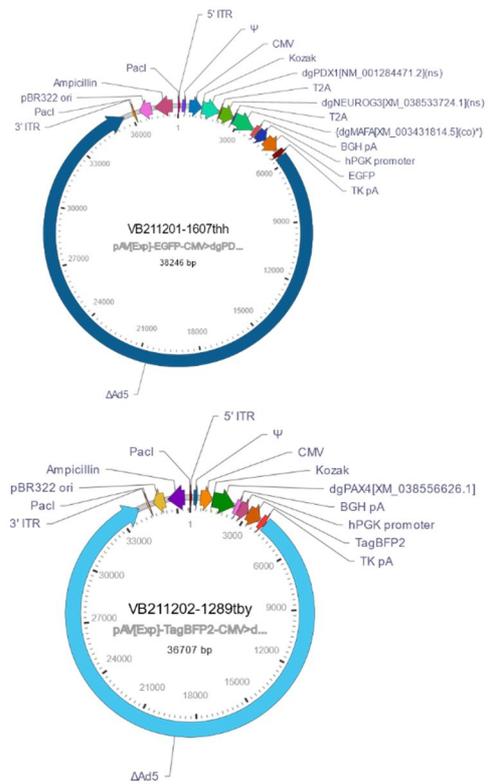
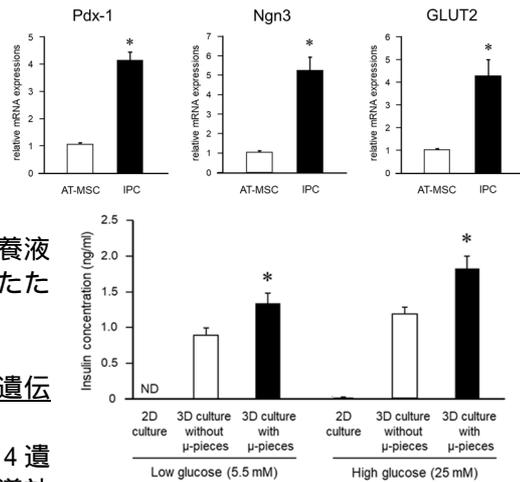
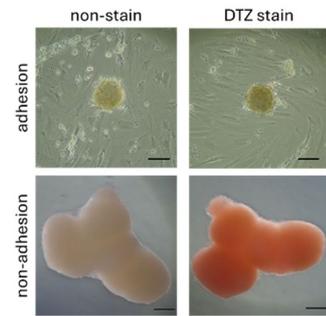
- A: non-transfected
- B: Pdx1
- C: Pdx1+Pax4
- D: Pdx1+Nurog3+MafA
- E: Pdx1+Nurog3+MafA+Pax4

Step1_7日間

- DMEM/F12に下記を添加
- ・ 1% FBS
- ・ 1% B27 supplement
- ・ 1% N2 supplement
- ・ 50ng/mL activinA
- ・ 10nM exendin4

Step2_15日間

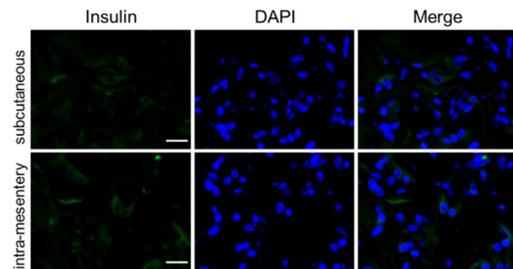
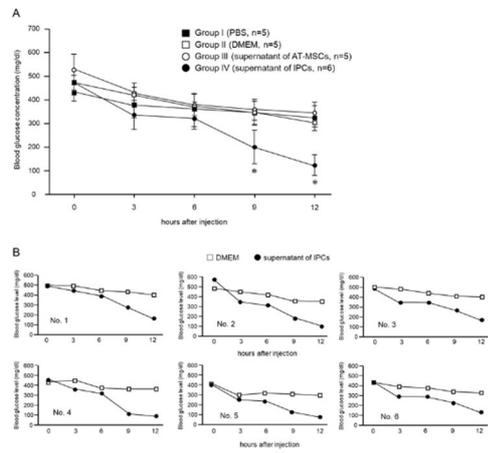
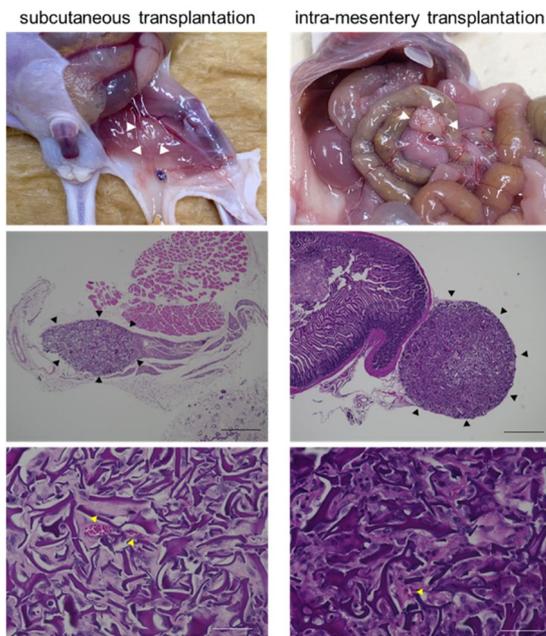
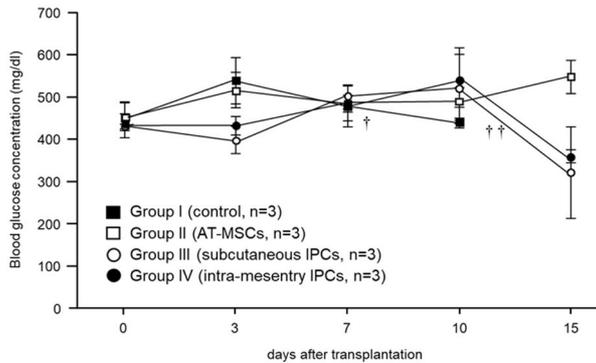
- DMEM/F12に下記を添加
- ・ 1% FBS
- ・ 1% B27 supplement
- ・ 50ng/mL activinA
- ・ 10nM exendin4
- ・ 50ng/mL HGF
- ・ 10mM nicotinamide



インスリン産生細胞の分泌因子による血糖降下作用

ストレプトゾトシン誘発性糖尿病マウスに対する血糖降下作用を検討した。インスリン産生細胞をグルコース 25mM で刺激した後の培養上清を腹腔内投与した後の血糖値を経時的に測定した結果、明らかな血糖値の減少が確認できた（下図）。そのため、犬の間葉系幹細胞から分化誘導したインスリン産生細胞の分泌因子はマウスモデルを用いた in vivo 試験においても検討可能であることが明らかとなった。次に、糖尿病マウスの鼠径部脂肪組織内もしくは腸間膜にイン

スリン産生細胞を移植した際の血糖降下作用を検討した。その結果、移植後に血糖値の減少傾向はみられるものの、正常血糖値範囲までの十分な減少は得られなかった（下図）。

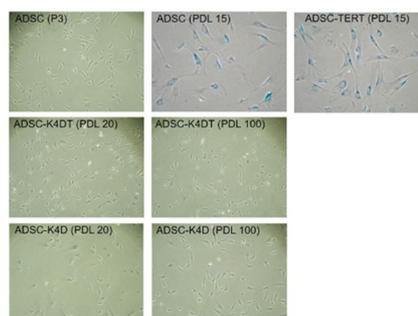
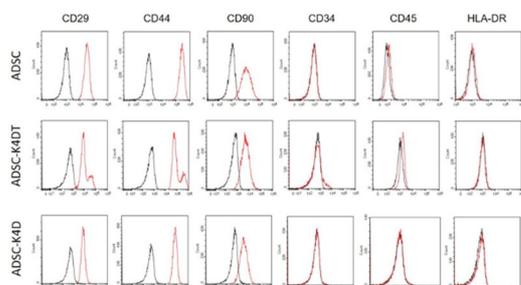
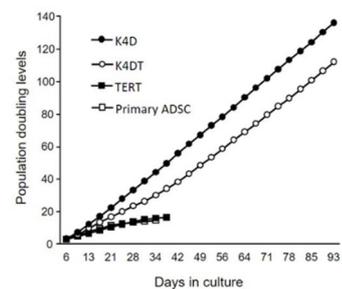


右図：移植 15 日目のインスリン産生細胞（スフェロイド塊）。鼠径部、腸間膜ともに移植部位への生着がみられた。

上図：移植 15 日目のスフェロイド塊のインスリン染色。鼠径部、腸間膜ともに抗インスリン抗体での染色が確認されるが、in vitro に比べると陽性細胞の割合は少ない傾向であった。

不死化間葉系幹細胞の樹立

ナイーブな間葉系幹細胞では増殖能の制限からインスリン産生細胞への分化誘導に使用する細胞ソースの確保が難しい状況であるため、細胞ソースの十分な確保を目的に不死化間葉系幹細胞の樹立を試みた。TERT, CDK4R24C, CCND1 の遺伝子導入を検討した結果、CDK4R24C と CCND1 の 2 遺伝子の導入によって不死化が誘導できた（右上図：PDL の推移，左下図：細胞表面抗原の発現，右下図：細胞老化アッセイ）。



不死化間葉系幹細胞から分化誘導したインスリン産生細胞

不死化間葉系幹細胞に上述した方法と同様に転写遺伝子群 (Pdx1 , Neurog3 , MafA , Pax4) を遺伝子導入し、インスリン産生細胞への分化誘導を実施した。グルコース刺激後のインスリン分泌能はナイーブな間葉系幹細胞と同様の結果を示し、細胞ソースとして利用可能であることが明らかとなった。しかし、in vivo における糖尿病マウスへの移植では、ナイーブな間葉系幹細胞を細胞ソースとして用いた場合と同様に正常血糖値までの十分な血糖降下作用を得ることはできなかった。

本研究の結果から、犬の間葉系幹細胞はインスリン産生細胞へと分化誘導が可能であり、転写因子群の導入によって誘導効率の上昇が得られることが明らかとなった。また、細胞ソースとして不死化間葉系幹細胞が利用できる結果であった。分化誘導を施す細胞形態については、通常の単層接着細胞の状態ではなくスフェロイド形成の状態がインスリン産生細胞の分化には適していることが明らかとなった。現時点での研究成果として、in vivo モデルにおける生着は確認できているが、十分な血糖降下作用の実現には至っていない。そのため、分化誘導法を改めて再検討し、インスリン分泌能に優れたインスリン産生細胞の誘導を確立する必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yasumura Yuyo, Teshima Takahiro, Taira Yoshiaki, Saito Takahiro, Yuchi Yunosuke, Suzuki Ryohei, Matsumoto Hirota	4. 巻 23
2. 論文標題 Optimal Intravenous Administration Procedure for Efficient Delivery of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 14681 ~ 14681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232314681	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 Yasumura Yuyo, Teshima Takahiro, Nagashima Tomokazu, Takano Takashi, Michishita Masaki, Taira Yoshiaki, Suzuki Ryohei, Matsumoto Hirota	4. 巻 24
2. 論文標題 Immortalized Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Novel Candidate Cell Source for Mesenchymal Stem Cell Therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2250 ~ 2250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24032250	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 Yasumura Yuyo, Teshima Takahiro, Nagashima Tomokazu, Michishita Masaki, Takano Takashi, Taira Yoshiaki, Suzuki Ryohei, Matsumoto Hirota	4. 巻 24
2. 論文標題 Immortalized Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Maintain the Immunomodulatory Capacity of the Original Primary Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 17484 ~ 17484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242417484	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 Teshima Takahiro	4. 巻 304
2. 論文標題 Heterogeneity of mesenchymal stem cells as a limiting factor in their clinical application to inflammatory bowel disease in dogs and cats	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Veterinary Journal	6. 最初と最後の頁 106090 ~ 106090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tvjl.2024.106090	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takahiro Teshima
2. 発表標題 Investigation of the immunomodulatory effects of immortalized canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on CD4+ T cells
3. 学会等名 North American Veterinary Regenerative Medicine Association (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuyo Yasumura
2. 発表標題 Immunomodulatory Functions of Canine Adipose tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Are Enhanced by Priming with Inflammatory Colon Tissues
3. 学会等名 North American Veterinary Regenerative Medicine Association (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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	高野 貴士 (Takano Takashi) (20462781)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師 (32669)	
研究分担者	道下 正貴 (Michishita Masaki) (50434147)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授 (32669)	
研究分担者	佐々木 崇 (Sasaki Takashi) (50723897)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	

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
---------	---------