

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18056

研究課題名(和文)細胞極性に着目したインスリン分泌細胞効率的分化誘導のための新規培養法の研究

研究課題名(英文)a novel culture method for efficient differentiation of insulin producing cells (IPC) focusing on cell polarity.

研究代表者

岩橋 衆一 (IWAHASHI, Shuichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・徳島大学専門研究員

研究者番号：30531751

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):電気刺激が細胞接着を強化し、細胞内シグナル伝達の活性化をすることにより、間葉系幹細胞(MSC)からインスリン産生細胞(IPC)への分化誘導が効率的に行われ、細胞機能の強化が図れると考えた。文献で既に報告されている条件の100Hz、200mVの電流を72時間刺激し、IPCの成熟度を検討したが生細胞数が減少し、1V/cm、0.1ms、55ppsのより微弱な条件に変更したが、細胞に過度のストレス負荷がみられ、IPCの効率的な分化誘導促進は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者はこれまでに間葉系幹細胞(MSC)から膵細胞様の機能を持つInsulin producing cell(IPC)への分化誘導実験に着手し、Histone deacetylase inhibitorを添加した2 step protocolを確立している。一方で電気刺激が細胞に与える影響として抗細胞死効果や、他細胞への分化が起こることが報告されている。電気刺激の適切な条件を同定することにより、胚葉転換のメカニズム解明やIPCへの効率的な分化誘導が可能となり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文):We assumed that electrical stimulation could enhance cell adhesion and activation of intracellular signal pathways to promote efficiently differentiation of insulin-producing cells (IPCs) for boost up of cell function. The stimulating condition (100 Hz, 200 mV for 72 hours) was determined by previous report, but the number of survival cells significantly decreased. Then, the conditions were changed to mild condition of 1 V / cm, 0.1 ms, 55 pps reported by another previous report. However, electrical stimulation induced excessive ER stress on the cells, and reduced secretion of insulin and expression of ZO-1, which is cell adhesion protein. Electrical stimulation could not enhance differentiation of IPC under this condition. Further investigation is needed for appropriate condition.

研究分野：再生医療(内分泌細胞の効率的分化誘導法の確立)

キーワード：インスリン分泌細胞 細胞極性

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 新たな donor source の必要性 (MSC から IPC への分化誘導)

I 型糖尿病の根治的治療法として膵臓移植および膵島移植があるが、2000 年に発表された **Edmonton protocol (N Engl J Med. 2000)** は、膵島移植の 5 年後の **insulin** 完全離脱率は **10%** 以下と満足できるものではない (**Diabetes. 2005**)。豊富な **donor source** の存在する欧米であれば **multi donor-one recipient** の移植が可能であるが、本邦においては、**donor source** 不足による十分な膵島確保の困難さが問題点として挙げられる。その根本的解決策としては、新たな **donor source** の開拓が挙げられる。膵島の **donor source** として、**iPS** 細胞・胚性幹細胞・間葉系幹細胞 (**MSC: mesenchymal stem cell**) が挙げられる。**iPS** 細胞における遺伝子的ダメージ・拒絶の可能性、また、胚性幹細胞における倫理的問題など、様々な問題点が指摘されており、臨床応用には未だ長い道のりである。これらの諸問題を解決するのが **MSC** であり、特に脂肪由来の **MSC** は低侵襲かつ容易に患者から採取可能である。研究代表者はこれまでに **MSC** から膵島細胞様の機能を持つインスリン産生細胞 (**IPC: insulin producing cell**) への分化誘導実験に着手しているが、分化効率の改善、自律的インスリン分泌能の証明、安全性の担保など、分化誘導因子や培養条件などの改良が不可欠であり、**IPC** 分化誘導のメカニズム自体未だ不明な点が多いのが現状である。

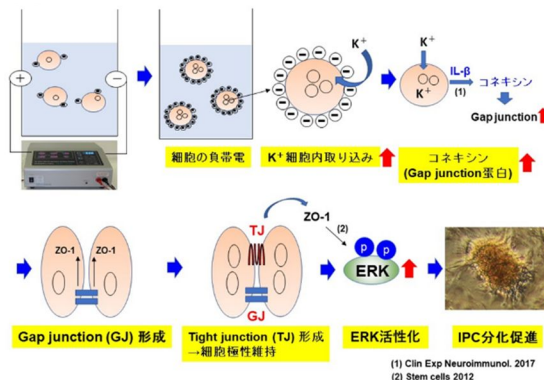
### (2) 細胞分化における細胞極性

ヒトにおける組織構築は幹細胞が増殖分化をして秩序だった細胞同士の集団としての配列を形成する過程である。組織構築の分化過程では、互いに同じ幹細胞から産み出された細胞同士は、上下の別を生じさせるような段階が存在する。このような分化過程での細胞が有する特性を「細胞極性 (**cell polarity**)」と呼ぶ。細胞極性は正常な組織発生や生理機能に必須であり、膵細胞にも細胞極性が重要であることが報告されている (**Cell Metab. 2009**)。細胞極性の維持には **tight junction (TJ)** が重要とされており、細胞同士が TJ で結合することで細胞を機能的に頂端側と基底部の 2 つに区分することにより極性を確立し維持している。また TJ 蛋白である **Claudin6** による細胞接着シグナルが幹細胞の上皮分化を誘導するといった報告 (**Plos One 2013**)、**ZO-1** が幹細胞分化に働く報告 (**Stem cells 2012**) もある。これまでに研究代表者はポリウレタン素材の培養装置が高い比表面積を持ち、細胞が負帯電することで有効な肝細胞培養に働くことを報告してきたが (**J Surg Res. 1999**)、**IPC** における細胞極性維持の詳細なメカニズム・意義については依然不明な点が多いのが現状である。

## 2. 研究の目的

**MSC** を培養するシステムにおいて大量培養を達成する観点から浮遊培養に利があると考えられるが、浮遊培養において細胞表面は接着開始前は負電荷である性質を持つ (**医機学 2015**)。ここで浮遊している状態が長く続くことで自然死 (アポトーシス) が誘導されるため、迅速な細胞同士の細胞接着が必要となる。今回細胞凝集のために細胞表面の負の帯電を維持するメカニズムとして研究代表者は電流に着目した。細胞と電気誘導に関しては、高圧静電誘導が生細胞の抗アポトーシス効果をもたらす報告 (**Current Tissue engineering 2014**) や、電界が均一に発生する培養システムの開発 (**Scientific Rep 2014**) が報告されている。今回は電気刺激に注目し、**1. 負電荷の維持による細胞接着の強化**、**2. TJ 蛋白発現増加による細胞内シグナル伝達の活性化**により、間葉系幹細胞 (**MSC**) からインスリン産生細胞 (**IPC**) への分化誘導をより効率的にし、細胞機能の強化につながるものと考えられる (図 1)。

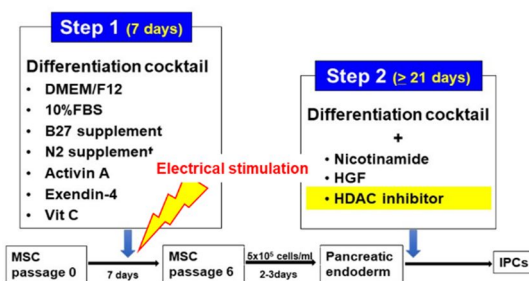
図 1. 仮説



## 3. 研究の方法

研究代表者の開発した **HDACi** を含む **differentiated medium** を用いて 2-step で三次元培養システムを用いて培養を行い、Step1 で電気刺激を行う電気刺激群 (ES 群) および通常通りの control 群とを比較検討した (図 2)。電気刺激条件は、骨芽細胞様細胞の骨芽細胞および骨への分化において分化促進作用を認めたと既報にある 100Hz, 200mV の電流で 3 日間連続刺激するものと、1V/cm, 0.1ms, 55pps で 1 日 10 分の刺激を 3 日間のより微弱なものの 2 種類で検討した。検討項目としては、Cell quality 測定 (細胞形態・dithizon 染色・グルコース刺激試験によるインスリン分泌測定) および mRNA 測定 (ZO-1, CHOP, sXBP-1) を行った。

図 2. 電気刺激による IPC 分化の促進



## 4. 研究成果

### (1) 電流条件設定

ES 群では細胞集塊の辺縁不整で色調も粗悪な sphere が誘導された。dithizone 染色では染色強度が control 群と比べて ES 群で有意に低下し ( $P < 0.01$ , 図 3)、生細胞数は 20% と有意に低下していた ( $P < 0.01$ )。ATP assay は control 群と比べて ES 群では有意な低下を認めた ( $P < 0.01$ )。糖応答能を評価する SI (Stimulation Index: グルコース濃度を低いものから高いものへ変えて培養した際の上清のインスリン分泌量の比をとることにより、作成した IPC の糖応答能を評価する指標) は、control 群の 2.8 に対し、ES 群は 2.2 と有意に低下した ( $P < 0.05$ , 図 4)。本条件ではインスリン産生細胞を分化誘導するには電気刺激が強すぎるため、細胞が破壊され生存率が著明に低下し、形態・機能が悪化していた可能性が考えられた。

図 3. Dithizone Staining

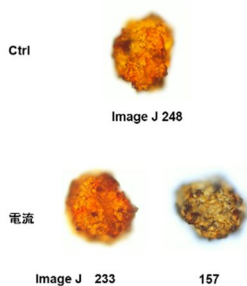
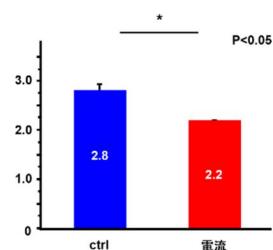


図 4. Stimulation Index(SI)



### (2) 微弱電流条件の検討

電気刺激の強度、時間についてより微弱な条件が至適であると考え、胚性幹細胞において、膵細胞に分化可能な pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (Pdx1) 発現細胞への分化促進効果が以前に報告のある 1V/cm、0.1ms、55pps で 1 日 10 分の刺激を 3 日間行う条件に変更した。dithizone 染色は ES 群で有意に低下し ( $P < 0.01$ )、SI は control 群で 2.9、ES 群で 2.1 と有意に低下した ( $P < 0.05$ , 図 5)。細胞内シグナル伝達の活性化に繋がるとして着目した細胞間接着蛋白 ZO-1 の発現は ES 群で有意に低下し ( $P < 0.05$ , 図 6)、小胞体ストレスマーカーである sXBP1、CHOP の mRNA の有意な上昇を認めた ( $P < 0.05$ , 図 6)。これらの結果から、微弱な電気刺激であっても、インスリン産生細胞分化誘導に対しては過度なストレスが細胞に負荷され分化誘導が促進されることはなかったものと考えられた。

図 5. Stimulation Index(SI)

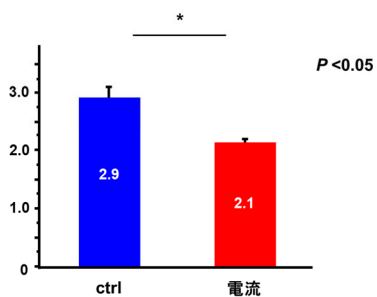
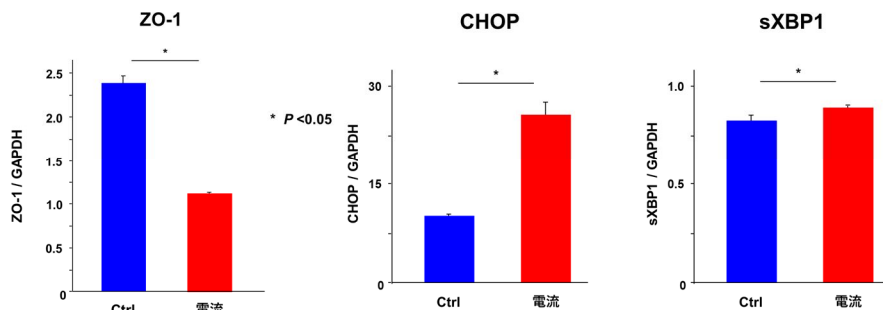


図 6. mRNA expression in IPC



\*  $P < 0.05$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikemoto Tetsuya, Feng Rui, Iwahashi Shu-ichi, Yamada Shinichiro, Saito Yu, Morine Yuji, Imura Satoru, Matsuhisa Munehide, Shimada Mitsuo	4. 巻 9
2. 論文標題 In vitro and in vivo effects of insulin-producing cells generated by xeno-antigen free 3D culture with RCP piece	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/s41598-019-47257-7	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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