

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08928

研究課題名(和文) 赤色LEDによる脂肪由来間葉系幹細胞ADSCから肝細胞様細胞HLCへの分化誘導

研究課題名(英文) Effects of light-emitting diode irradiation on hepatic differentiation of hepatocyte-like cells

研究代表者

齋藤 裕 (SAITO, Yu)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：50548675

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)：形態学的には赤色LED非照射群と比較して著変なく、肝細胞成熟遺伝子CPS1の発現がLED照射により有意に上昇していたが、肝細胞機能において有意差は認めなかった。よって、赤色LEDから緑色LEDに照射波長を変更し、同実験を施行。

HLCのアンモニア代謝が非照射群と比較して改善しており、さらに、CYP3A4活性も良好であった。そのメカニズムとして、LED照射群では光受容体であるOPN3が発現上昇していることを免疫組織学的にも評価し、ミトコンドリア機能に關与するPGC1 α のmRNA発現が上昇し、OPN3のGタンパク質共役受容体を介したミトコンドリア機能上昇が肝細胞機能を向上させている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞源から分化誘導方法が試みられている中、機能面で肝機能を上回りすべての機能を保持するHLCはいまだに作製できていない。肝機能を発揮するためには肝細胞が肝特異的遺伝子発現を保持するだけでなく、細胞内小器官の成熟化、肝臓の非実質細胞群との相互作用による機能制御も必要と思われる。

これまで幹細胞からHLC分化を加速する方策としては、遺伝子発現の調整あるいは化学物質の添加などにより、肝発生に準じた至適化学的環境をいかに再現することに主眼が置かれてきた。本研究においては“光LED”という遺伝子的改変を行わない、極めて安全な媒体が、既存の幹細胞研究の概念を大きく塗り替えるブレイクスルーとなりえる。

研究成果の概要(英文)：Red LED (RLED) increased CPS1 mRNA expression levels of HLC. However, There were no significant changes in hepatocyte functions depend on the presence of RLED.

On the other hand, Green LED (GLED) irradiation increased alpha-1 antitrypsin and ornithine transcarbamylase gene expressions, promoted CYP3A3 activity and urea synthesis, elevated intracellular ROS levels, and increased intracellular ATP and Ca²⁺ concentration. OPN3 expression was significantly more upregulated in the GLED irradiated HLCs than in the non-irradiated HLCs. No significant difference in cell viability and apoptosis was observed between GLED irradiated and non-irradiated HLCs.

Therefore, GLED irradiation could promote hepatocyte differentiation through the OPN3 and ROS/Ca²⁺/ATP activation. GLED irradiation might be a potential method to increase hepatocyte maturation and function and support cell-based transplantation in clinical work.

研究分野：肝再生

キーワード：LED 脂肪由来間葉系幹細胞 肝細胞様細胞

1. 研究開始当初の背景

臓器移植・肝細胞移植ともにドナー不足を中心とした臨床的問題を解決するべく、より低侵襲でかつ倫理的にも臨床応用に近い脂肪由来幹細胞 ADSC を Cell source とした肝細胞様細胞 HLC の分化誘導に着目した。ADSC のみならず iPS 細胞含めて様々な分化誘導方法が試みられている中、機能面で肝機能を上回り、すべての機能を保持する幹細胞由来肝細胞はいまだに作製できていない。本研究の先行実験として、ADSC から Insulin producing cell (IPC) への分化誘導において、赤色 LED 照射により内胚葉への胚葉転換が促進されたとのデータをすでに報告している (Saito Y, et al. 19th Congress of the European Society for Organ Transplantation)。

2. 研究の目的

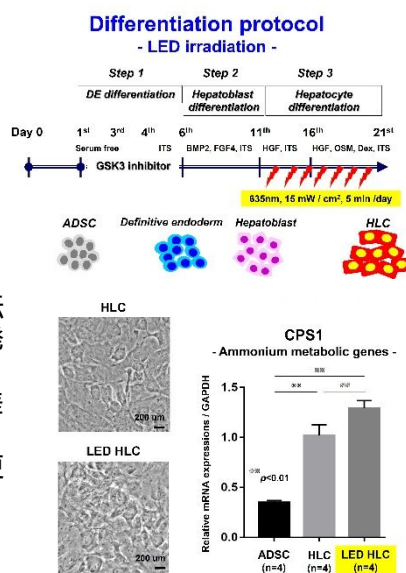
ADSC から HLC への分化誘導において、赤色 LED 光照射により胚葉転換のみならず、肝細胞成熟にも促進的に作用し、より機能的な super HLC の創出を目指す。

3. 研究の方法

ADSC から HLC への分化誘導過程において、肝細胞成熟過程である Step3 に赤色 LED を照射する。

照射条件; 635nm, 15 mW / cm², 5 min / day

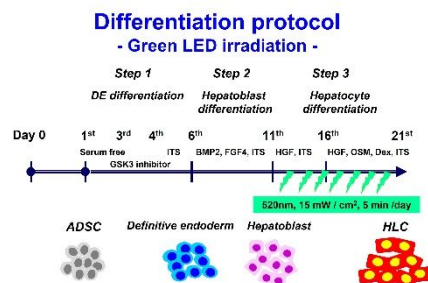
非照射群ならびに照射群の 2 群間で、HLC 形態、肝細胞成熟遺伝子 (AAT/ALB/OTC1/CPS1)、CYP3A4 活性、アンモニア代謝能を比較検討する。



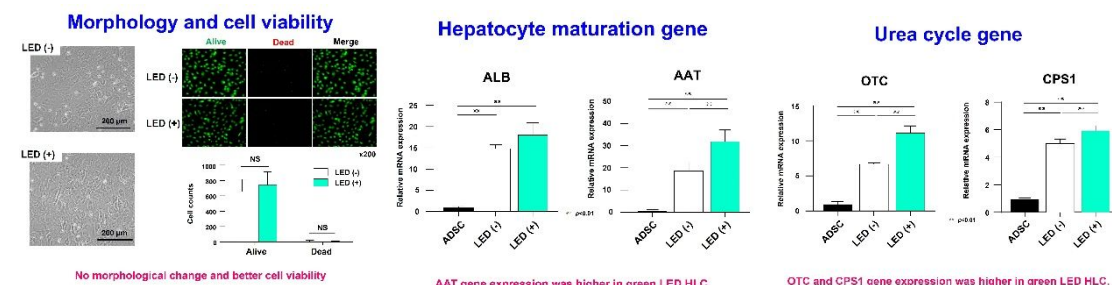
4. 研究成果

形態学的には非照射群と比較して著変なし、肝細胞成熟遺伝子のうち、アンモニア代謝遺伝子の 1 つである CPS1 の遺伝子発現が LED 照射により有意に上昇していた。肝細胞機能 (CYP3A4 活性、アンモニア代謝能) において有意差は認めなかった。

よって、ここから赤色 LED から緑色 LED に照射波長を変更 (520nm, 15 mW / cm², 5 min / day) し、同実験を施行。



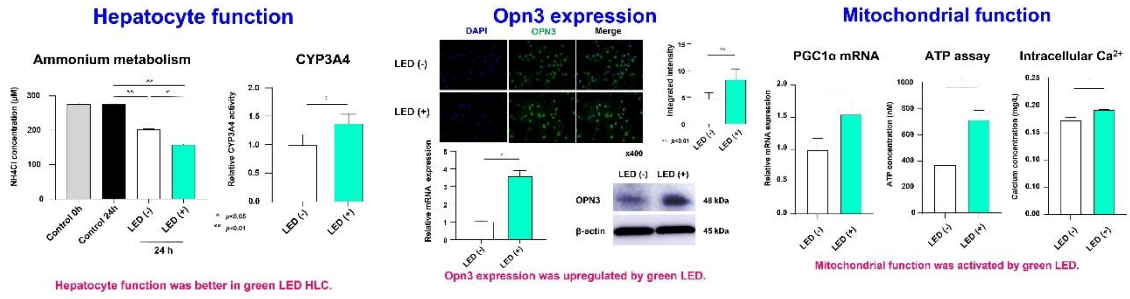
肉眼的には緑色 LED 照射の有無で大差はなく、また、LED 照射によっても、細胞の Viability は落ちることはなかった。肝細胞成熟マーカーのうち AAT は有意に LED 照射により、発現が上昇しており、アンモニア代謝に関与する、尿素サイクル遺伝子の OTC や CPS1 も上昇していた。その結果、HLC のアンモニア代謝が非照射群と比較して改善しており、さらに、CYP3A4 活性も良好であった。そのメカニズムとして、LED 照射群では光受容体である OPN3 が発現上昇していることを mRNA・WB・免疫組織学的にも評価し、ミトコンドリア機能に関与する PGC1 の mRNA 発現が上昇し、その他、ATP assay による ATP 活性や細胞内 Ca²⁺濃度も上昇しており、OPN3 の G タンパク質共役受容体 (GPCR) を介したミトコンドリア機能上昇が、肝細胞機能 (特にアンモニア代謝) を向上させている可能性がある。



No morphological change and better cell viability

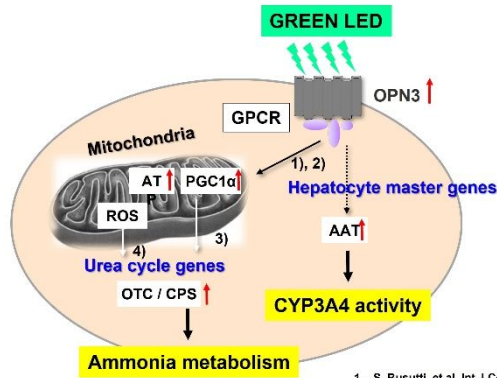
AAT gene expression was higher in green LED HLC.

OTC and CPS1 gene expression was higher in green LED HLC.



緑色 LED の HLC 肝細胞機能向上のメカニズム

Possible mechanism of green LED - HLC differentiation -



1. S. Busutti, et al. Int J Cosmet Sci 2018
2. H. Wu, et al. Science 2002
3. L. Li, et al. Sci Rep 2016
4. J H Cadwell, et al. 2008 J Biol Chem

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Tokuda K, Ikemoto T, Yamashita S, Miyazaki K, Okikawa S, Yamada S, Saito Y, Morine Y, Shimada M | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Syngeneically transplanted insulin producing cells differentiated from adipose derived stem cells undergo delayed damage by autoimmune responses in NOD mice. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 5852-5852 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-09838-x. | 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 Shuhai Chen, Ikemoto T, Tokunaga T, Okikawa S, Miyazaki K, Yamada S, Saito Y, Morine Y, Shimada M | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 Newly Generated 3D Schwann-Like Cell Spheroids From Human Adipose-Derived Stem Cells Using a Modified Protocol. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cell Transplantation | 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） 10.1177/09636897221093312. | 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 Saito Yu, Ikemoto T, Morine Y, Shimada M | 4. 巻 51 |
| 2. 論文標題 Current status of hepatocyte-like cell therapy from stem cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Surgery Today | 6. 最初と最後の頁 340-349 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-020-02092-6. | 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 Saito Yu, Tetsuya Ikemoto, Kazunori Tokuda, Katsuki Miyazaki, Shinichiro Yamada, Satoru Imura, Masato Miyake, Yuji Morine, Seiichi Oyadomari, Mitsuo Shimada | 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） 10.1002/jhbp.1024. | 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 Kazunori Tokuda, Tetsuya Ikemoto, Yu Saito, Katsuki Miyazaki, Shoko Yamashita, Shinichiro Yamada, Satoru Imura, Yuji Morine, Mitsuo Shimada | 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 Transplantation | 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 Tetsuya Ikemoto, Kazunori Tokuda, Yuma Wada, Luping Gao, Katsuki Miyazaki, Shinichiro Yamada, Yu Saito, Satoru Imura, Yuji Morine, Mitsuo Shimada | 4. 巻 49 |
| 2. 論文標題 dipose 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) 10.1097/MPA.0000000000001663. | 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5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 池本哲也, 齋藤裕, 島田光生, 沖川昌平, 寺奥大貴, 山田眞一郎, 森根裕二 |
| 2. 発表標題 再生医療を用いた細胞移植治療確立へ向けた戦略～移植外科医・レシピエント双方の負担軽減という視点から |
| 3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 脇悠平, 齋藤裕, 池本哲也, 陳術海, 寺奥大貴, 山田眞一郎, 森根裕二, 島田光生 |
| 2. 発表標題 ヒト脂肪由来間葉系幹細胞から肝細胞様細胞の創出・肝不全・代謝性肝疾患に対する肝移植から細胞治療へ |
| 3. 学会等名 第58回日本移植学会総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 寺奥 大貴, 齋藤裕, 池本哲也, 宮崎克己, 山田眞一郎, 森根裕二, 三宅雅人, 親泊政一, 島田光生 |
| 2. 発表標題 ヒト脂肪由来間葉系幹細胞を基にした機能的肝細胞様細胞の分化誘導 |
| 3. 学会等名 第57回日本移植学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齋藤 裕, 池本哲也, 宮崎克己, 徳田和憲, 山田眞一郎, 居村暁, 森根裕二, 三宅雅人, 親泊政一, 島田光生 |
| 2. 発表標題 ヒト脂肪由来間葉系幹細胞から肝細胞様細胞の創出 |
| 3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 齋藤 裕, 山田眞一郎, 居村暁, 森根裕二, 島田光生 |
| 2. 発表標題 ヒト脂肪由来間葉系幹細胞から肝細胞様細胞の創出ー肝不全・代謝性肝疾患に対する肝移植から細胞移植へー |
| 3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会 |
| 4. 発表年 2021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 | 池本 哲也 (IKEMOTO Tetsuya) (20398019) | 徳島大学・病院・特任教授 (16101) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 山田 眞一郎 (YAMADA Shinichiro) (30579884) | 徳島大学・病院・特任助教 (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) | |

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 |
|---------|---------|
| | |