

令和元年5月28日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10429

研究課題名(和文) ADSCを用いた3次元培養による効果的膵島様細胞作成に関する研究

研究課題名(英文) Effective differentiation of insulin-producing cell from ADSC with three dimensional culture method

研究代表者

池本 哲也 (IKEMOTO, Tetsuya)

徳島大学・病院・特任准教授

研究者番号：20398019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病治療における、細胞置換療法として、再生医療技術を用いた insulin-producing cell (IPC)の作成が期待されるが、そのcell sourceとして脂肪由来幹細胞の使用が挙げられる。各種3次元培養を比較検討し、最も効果的なものを我々の分化誘導方法に採用することで、臨床応用可能な短期間かつ効果的IPC誘導法の樹立を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADSCは、採取量が豊富・倫理的問題が少ない・遺伝子導入などのDNAダメージがない、といった有用性のために臨床応用が比較的容易である。上記の実験結果から得られる知見は、安全性が担保され、脳死アロ膵島移植と同等もしくはそれ以上の成績であることが実証されれば、即臨床応用可能である。今後、donor sourceの問題解決のみならず、膵島移植自体へのブレイクスルーとなる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Generation of insulin-producing cells (IPCs) is expected as the new option for the radical therapy of type 1 DM patients. Technique of regenerative medicine is considered as useful for generating these IPCs from mesenchymal stem cells. Among these cells, we have focused on adipose-derived stem cells (ADSCs) due to its multipotency and easy-procurement, thus we have already established an easy and rapid 2-step differentiation protocol for IPCs from ADSC. However, some issues which should be resolved still remain such as the poor cell expansion rate and the lot equalization of generated IPCs. For solving these issues, here we are investigating to establish a rapid and more effective protocol of generating IPCs from ADSCs with choosing the best procedure among three dimensional culture systems which are many reported, by modifying our 2-step protocol.

研究分野：再生医療、インスリン産生細胞分化誘導、脂肪由来幹細胞、膵島移植(実験的細胞移植)

キーワード：インスリン産生細胞 脂肪由来幹細胞 3次元培養 RCPピース

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵島移植は極めて低侵襲の細胞移植治療であり、1型糖尿病根治的治療として、欧米ですでに現実的な治療オプションとして機能している。2000年に発表された Edmonton protocol (Shapiro AM, *N Engl J Med.* 2000) は Steroid free での膵島移植をなし得た偉業ではあるが、5年のフォローアップ後に同施設から発表された成績によると、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かった(Ryan EA, *Diabetes* 2005)。しかしながら、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、絶対的ドナー不足である本邦においては、ドナーソースの確保が急務であるにも関わらず、膵移植との allocation system が未確立であるために、実質上膵島移植に用いられるドナーはマージナルドナーが多い。その解決策としては、(1) 効果的膵島分離法の確立、(2) 移植膵島のグラフトロス防止、(3) 新たなドナーソースの開拓が挙げられる。

新たなドナーソース開拓としては、ブタ膵島の使用や、異種膵島を分離しアルギニン酸などでコーティングするマイクロカプセル化などが行われてきたが、いずれも倫理的問題や人畜共通感染症などのハードルがあり、Xenograft は現実的でない。近年の研究によって、採取が容易で、(1) iPS 細胞のような遺伝子操作が不必要、(2) ES 細胞のような倫理的問題が少ない、といった特徴を持つ間葉系幹細胞に注目が集まり、一部は臨床試験が行われている。このような間葉系幹細胞の中で、我々は、特に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) を用いた実験を行って来た。ADSC の Trophic effect に着目した膵島保護効果や、サイトカインカクテルにより Alb 産生機能肝細胞への分化誘導の試みであるが (*Surg Today.* 2011) 膵島への幹細胞分化過程は複雑であり、単細胞集塊でない膵島細胞に分化誘導は極めて困難である。そこで、近年、報告されているように、膵島細胞様の機能を持つ膵細胞様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。我々が取扱いに慣れている ADSC を用いたとしても、新たなドナーソースとして幹細胞から IPC への安定した分化誘導を行うには、数サイクル(数週間)に亘る培養期間の短縮、幹細胞からの分化効率の改善、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な状況である。

現在のところ、ES および iPS 細胞をもってしても、完全な膵島細胞作製は困難であるばかりか、DNA ダメージ・遺伝子操作によって発癌や未知の細胞への分化の危険性がある。現在の IPC 誘導は D'amour らの方法 (*Nat Biotechnol.* 2008) がその基礎となっており、まず Pancreatic Endoderm を作成し、その後成熟を行うという方法が取られている。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することが試行されており、段階的に培地を変える培養法が徐々に開発されつつある。

具体的には、第一段階にアクチピン A と Wnt3a もしくは PI3K シグナルの阻害剤を用いて胚体内胚葉を誘導し、つづ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が開発されている。

しかしながら、誘導に多くは1か月以上の期間を必要とし、作成効率も40%台と expansion も良好とは言い難いのが現状である。

2. 研究の目的

我々は、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て研究を行ってきた。培養条件の改変としては、これまで我々が癌幹細胞研究において多数報告してきたエピジェネティック修飾に関与し、スフェア形成に大きく関わる Histone deacetylase inhibitor:HDACi について検討した。HDACi は膵臓正常発生を加速させるとも報告(Haumaitre C, et al,*Mol Cell Biol.*2008)されており、HDACi を後述する我々の分化誘導条件 (differentiation medium) に添加することで IPC への分化誘導が有意に短縮可能であることを確認し報告した (Ikemoto T, et al. *Pancreas.* 2018)が、この培養方法によって培養時間短縮が得られたとしても、作成効率は不良で、機能的な IPC 作成は達成できていない。

この問題点は、膵島細胞が平面培養(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培養を重ねると、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。我々もすでに、FUJI FILM 株式会社の開発した RCP ピースを用いた ADSC の3次元培養に着手しており、既にスフェロイド作成に成功している。そこで、近年特にその有用性が着目されている各種3次元培養のうち最も効果的なものを比較検討し、HDACi を用いた我々の新規 2-step 培養法において、細胞外マトリクス使用によって得られる IPC 作成効率上昇と機能の優位性を in vitro で証明する。また、得られた IPC をヌードマウスに移植し in vivo functional assay を行う。3次元培養法の基材によっては、移植後の血管新生および細胞保護効果に差異があるため、この差異についても詳細に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(in vitro)

市販のラット由来 ADSC を解凍・培養し、Dulbecco's modified Eagle's medium:DMEM に10%

濃度の胎仔牛血清 (fatal bovine serum: FBS) を添加した基本培養培地に浮遊させて、37 °C、5% CO₂ の条件下で培養保存し、我々の開発した HDACi を含む differentiated medium を用いて 2-step protocol 培養を行うが、この際、市販の培養基材を含む 4 群に分け、分化誘導を行う。

- (1) Control 群 (これまで到我々が報告した通常の単層培養法)
- (2) FUJI FILM RCP ピース群
(96 well U 字底のプレートに、1well に ADSC 2x10⁴cells と RCP ピース 0.02mg を入れて 37 °C で培養)
- (3) X 社海藻由来多糖類群
(96 well U 字底のプレートにて、1well に ADSC 2x10⁴cells と海藻由来多糖類 (アルギン酸) 0.01mg を入れて 37 °C で培養)
- (4) Y 社 3 次元培養用 96 well U 字プレート
(96 well U 字底の専用プレートに、1well に ADSC 2x10⁴cells を入れて 37 °C で培養)

細胞形態 (Dithizone 染色) 細胞倍加速度、総 DNA 量、mRNA 発現 (Pdx1、Ngn3、NeuroD1、MAFA) を確認し分化状態の評価を行う。
また、Stimulation index (糖濃度を変えて培養し、上清のインスリン分泌度により作成された IPC の糖応答性を評価する指標) を計測する。

(in vivo)

最適な 3 次元培養方法を選定後、Streptozotocin (STZ) 誘導糖尿病ヌードマウスに得られた IPC の移植を行い、in vivo functional test を行う。経時的に血糖測定を行いその効果を検討するが、その際、

- (1) 至適 IPC 移植数
(段階的に移植 IPC 数を振り分け、マウスにおけるマージナルナンバーを確認する)
- (2) 至適移植部位の検討
(マージナルナンバーが判明したところで、完全に血糖を正常化させる IPC の個数において、腎被膜下・腸間膜内・大腿筋内・皮下に移植を行い、至適移植部位を検討する) を検討する。

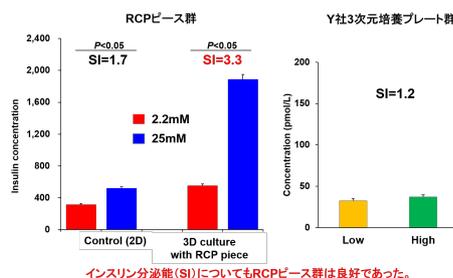
4. 研究成果

(1) 有効な 3 次元培養用基材の比較検討

予備実験において RCP ピース (FUJI FILM 株式会社) によって培養された IPC は他 3 次元培養用プレート単独と比して理想的に培養期間の短縮が得られた他、インスリンの糖応答性も良好であった (右図)。このため、以後、当 RCP ピースのみで分化誘導実験を行うこととした。

その結果、RCP ピース群は Control 群 (通常平面培養群) に比して培養期間を有意に減少し (21 日 vs 28 日, $P < 0.05$)、また培養効率も良好であった。糖応答性 (stimulation index: SI) も 3.1 と良好であった。免疫組織学的検討でも、作成された IPCs はインスリンに強く染色され、機能的 β 細胞様集塊であることが示された。各 Step において、Pdx1、Ngn3、NeuroD1、insulin1、MAFA の mRNA 発現を確認し分化状態の評価を行った。その結果、通常培養群と比して、RCP ピース群が各段階における mRNA の発現が加速され、特に Step 2 の培養期間短縮が得られるという結果が得られた。

Insulin secretion ability (SI) - RCP piece and commercial 3D plate -



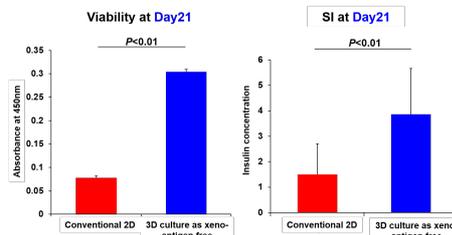
インスリン分泌能 (SI) についても RCP ピース群は良好であった。

(2) Xeno-antigen free 3 次元培養プロトコルによるヒト IPC の作成

上記の結果をもとに、より臨床応用に近い形にするべく、我々は報告した 2-step プロトコルを Xeno-antigen free に改変した上で、同様の分化誘導比較実験を行った。具体的には Xeno-antigen free の 2-step プロトコルとし、これまでの培養法 (平面培養) と RCP ピースを用いた 3 次元培養で IPC を作成し、同様に Cell quality、SI の比較検討を行ったところ、3 次元培養では、経時的 (Day 1, Day 5, Day 7, Day 10, Day 14, Day 17, Day 21, Day 24, Day 28) で Dithizon 染色に強く染色される細胞集塊が作成可能であり、viability および SI も有意に良好 (各々 $P < 0.01$) という結果であった (右図)。インスリン染色および MAFA mRNA 解析によれば、Day 21 まで培養期間が短縮されたことが実証された。

Cell quality

- Xeno-antigen free & 3D culture protocol for IPCs -



Cell quality は明らかに 3 次元培養群で良好で、特許申請を行った (データは投稿済み)

(3) 同プロトコルによって作成されたヒト ADSC 由来 IPC の移植実験

in vivo functional assay として、得られた IPC の 96 個を Streptozotocin (STZ) 誘導糖尿病 nude mouse

の腎被膜下に移植を行うと血糖降下が得られ、正常血糖へ7日間 convert させることが可能であったが、移植 IPC 数が48個では血糖を正常化させることが困難であった。このことから、安全域（マウスの高血糖を正常化させるのに十分なIPCの数）は96個であり、これまでの我々のマウス膵島移植実験および文献学的報告から考えて、1個のIPCはおよそ10 international equivalent (IE)の機能的膵島に相当すると考えられた。

そこで、作成されたヒトIPC96個について、至適移植部位の検討を行った。同様に、96個のIPCをSTZ誘導ヌードマウスの腎被膜下、腸間膜内、大腿筋内、腹膜前脂肪織内に移植を行い、血糖変動を追跡した。その結果、大腿筋内および腹膜前脂肪織内移植では十分な血糖降下を確認することはできなかったが、腎被膜下移植群では10日以内に100%の血糖降下効果が得られ、正常血糖状態は移植後120日にわたり維持された。また、腸間膜内移植群は更に血糖降下作用が良好であり（平均で35%の低い血糖値）、同様に9日以内に100%の血糖降下作用が確認された。この正常血糖状態は同様に移植後120日にわたり維持された（以上のデータは論文投稿中である）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Wada Y, Takata A, Ikemoto T, Morine Y, Imura S, Iwahashi S, Saito Y, Shimada M.
The protective effect of epigallocatechin 3-gallate on mouse pancreatic islets via the Nrf2 pathway. Surg Today. 2019 Feb 7. doi: 10.1007/s00595-019-1761-0.
[Epub ahead of print] PubMed PMID: 30730004. 査読有
2. Ikemoto T, Feng R, Shimada M, Saito Y, Iwahashi S, Morine Y, Imura S.
A new established 2-step acceleration protocol with HDAC inhibitor for generating insulin-producing cells from adipose derived mesenchymal stem cells. Pancreas. 2018. doi: 10.1097/MPA.0000000000001017. Apr;47(4):477-481. 査読有

〔学会発表〕(計17件)

1. 第18回日本再生医療学会総会 2019年 神戸
和田佑馬, 池本哲也, 居村暁, 岩橋衆一, 齋藤裕, 山田眞一郎, 太田昇吾, 岩橋祥子, 島田光生
脂肪由来幹細胞からのインスリン産生細胞分化誘導に関する研究
2. 第18回日本再生医療学会総会 2019年 神戸
太田昇吾, 島田光生, 池本哲也, 森根裕二, 居村暁, 岩橋衆一, 齋藤裕, 山田眞一郎, 和田佑馬, 良元俊昭, 岩橋祥子
Insulin-producing cell(IPC)分化成熟と亜鉛イオン濃度相関に関する研究
3. 第54回日本移植学会総会 2018年 東京
池本哲也, 島田光生, 居村暁, 森根裕二, 岩橋衆一, 齋藤裕, 和田佑馬, 太田昇吾
臨床応用を目指した間葉系幹細胞から創生されるインスリン産生細胞による糖尿病の治療法確立に関する研究
4. 第54回日本移植学会総会 2018年 東京
和田佑馬, 池本哲也, 森根裕二, 岩橋衆一, 齋藤裕, 山田眞一郎, 居村暁, 島田光生
Nrf2経路によるEGCGの膵島保護効果
5. 第53回日本移植学会総会 2018年 旭川
池本哲也, 島田光生, 居村暁, 森根裕二, 岩橋衆一, 齋藤裕, 寺奥大貴
膵島移植に対するブレイクスルーとしての Adipose tissue derived stem cells からの効果的 Insulin-producing cells 創生
6. 第53回日本移植学会総会 2018年 旭川
寺奥大貴, 池本哲也, 森根裕二, 岩橋衆一, 齋藤裕, 和田佑馬, 太田昇吾, 居村暁, 島田光生
Nrf2-Keap1 制御系を介した Epigallocatechin-3-gallate(EGCG)による膵島保護作用に関する検討
7. 第72回日本消化器外科学会総会 2018年 金沢
高田厚史, 池本哲也, 岩橋衆一, 齋藤裕, 森根裕二, 居村暁, 島田光生
Epigallocatechin-3-gallate(EGCG)による Nrf2-Keap1 制御系を介した膵島保護作用に関する検討

8. 第 118 回日本外科学会定期学術集会 2018 年 東京
池本哲也, 島田光生, 森根裕二, 居村暁, 岩橋衆一, 齋藤裕, 和田佑馬, 寺奥大貴, 太田昇吾
臨床応用を目指した間葉系幹細胞から創生されるインスリン産生細胞による糖尿病の治療法確立に関する研究
9. 第 118 回日本外科学会定期学術集会 2018 年 東京
第 5 回「臨床研究助成」及び「若手外科医のための臨床研究助成」
齋藤裕, 池本哲也, 岩橋衆一, 寺奥大貴, 居村暁, 森根裕二, 島田光生
Epigallocatechin gallate(EGCG)による脂肪由来間葉系幹細胞 (ADSC) から Insulin producing cell(IPC)への効率的な分化誘導に関する研究
10. 第 44 回 日本膵・膵島移植研究会 2018 年 京都
池本哲也, 島田光生, 岩橋衆一, 良元俊昭, 吉川雅登, 齋藤裕, 森根裕二, 居村暁
ADSC による Insulin-producing cell(IPCs)作成における効果の新規分化誘導方法に関する検討
11. 第 44 回 日本膵・膵島移植研究会 2018 年 京都
高田厚史, 池本哲也, 岩橋衆一, 森根裕二, 齋藤裕, 居村暁, 島田光生
Epigallocatechin-3-gallate(EGCG)による Nrf2-Keap1 制御系を介した膵島保護作用に関する検討
12. 第 16 回日本再生医療学会総会 2018 年 仙台
池本哲也, 島田光生, 岩橋衆一, 齋藤裕, 良元俊昭
ADSC による Insulin-producing cell(IPCs)作成における効果の新規分化誘導方法に関する検討
13. 18th Congress of the European Society for Organ Transplantation(ESOT) 2017 年 バルセロナ
Ikemoto T, Shimada M, Iwahashi S, Feng R, Saito Y, Imura S, Morine Y.
The establishment of effective differentiation protocols for insulin-producing cells using 3D culture system from rat adipose-tissue derived mesenchymal stem cell.
14. 18th Congress of the European Society for Organ Transplantation(ESOT) 2017 年バルセロナ
Shimada M, Feng R, Ikemoto T, Morine Y, Imura S, Iwahashi S, Saito Y, Yoshimoto T, Higashijima J.
A new 2-step protocol for human adipose derived mesenchymal stem cell differentiation to insulin-producing cells using xeno-antigen free reagents.
15. 18th Congress of the European Society for Organ Transplantation(ESOT) 2017 年 バルセロナ
Feng R, Shimada M, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Iwahashi S, Saito Y, Yoshikawa K, Yoshimoto T, Higashijima J.
The impact of red LED irradiation on hepatocytes preservation.
16. 第 52 回日本移植学会総会 2016 年 東京
池本哲也, 島田光生, 居村暁, 森根裕二, 岩橋衆一, 齋藤裕, 吉川雅登, 良元俊昭
脂肪由来幹細胞による Insulin-producing cell 作成における新規分化誘導方法に関する検討
17. 第 71 回日本消化器外科学会総会 2016 年 徳島
池本哲也, 島田光生, 居村暁, 森根裕二, 齋藤裕, 山田眞一郎, 吉川雅登, 寺奥大貴.
A new strategy for achieving effective islet transplantation with adipose tissue derived stem cells.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：間葉系幹細胞からインスリン産生細胞を製造する方法、インスリン産生細胞および細胞構造体

発明者：国立大学法人徳島大学・富士フィルム株式会社

権利者：同上

種類：開発予定の医薬品の物質特許 (基本特許)

番号：特願 2017-216927

出願年：2017 年

国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：居村 暁

ローマ字氏名：(IMURA, Satoru)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：病院

職名：特任教授

研究者番号（ 8 桁）: 90380021

研究分担者氏名：森根 裕二

ローマ字氏名：(MORINE, Yuji)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部(医学域)

職名：准教授

研究者番号（ 8 桁）: 60398021

研究分担者氏名：斎藤 裕

ローマ字氏名：(SAITO, Yu)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：病院

職名：特任助教

研究者番号（ 8 桁）: 50548675

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山田 眞一郎

ローマ字氏名：(YAMADA, Shinichiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。