

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10470

研究課題名(和文) ユビキチン-プロテアソーム系小胞体ストレス応答制御による膵島移植成績の向上

研究課題名(英文) Improvement of islet transplantation results by controlling ubiquitin-proteasome endoplasmic reticulum stress response

研究代表者

伊勢 一哉 (Ise, Kazuya)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90363746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞移植の基礎実験として、分泌系細胞シートの作成とシート化した細胞の機能評価を目的とした。細胞培養および回収時の小胞体ストレス関連研究を行う前段階として、培養細胞(間葉系幹細胞)を用いて、シート化細胞の評価モデルを作成した。細胞培養室にて間葉系幹細胞を2週間培養後、細胞を回収し、温度応答性培養皿(Up Cell)に播種して細胞シートを作成した。播種3日後、Cell Shifterにて細胞シートを回収し、ゼラチンゲル上に転写した。作成過程の条件による細胞の状態を光学顕微鏡で観察し、主に重積シート作成の条件を決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵島移植は1型糖尿病に対する治療法として実施されている。膵島細胞は、精製の過程で受ける、酸化ストレス、虚血、小胞体ストレスなどに対して、脆弱な細胞である。そのため、膵島分離から移植までに、細胞の喪失やインスリン分泌低下が生じ、治療成績に影響を与えている。一方、近年膵島細胞の生存には小胞体ストレスが深く関わっていること、インスリン分泌においてユビキチン-プロテアソームシステムが関与していることが示されている。膵島分離、培養、単離、シート作成の各ステップでの小胞体ストレス反応について、分子生物学的手法を用い明らかにすることが期待される。

研究成果の概要(英文)：As a basic experiment of cell transplantation, we aimed to make a secretory cell sheet and evaluate the function of the sheeted cells. As a pre-stage for carrying out endoplasmic reticulum stress-related studies during cell culture and recovery, an evaluation model for sheet cells was prepared using cultured cells (mesenchymal stem cells). After culturing the mesenchymal stem cells for 2 weeks in the cell culture room, the cells were collected and seeded on a temperature-responsive culture dish (Up Cell) to prepare a cell sheet. 3 days after seeding, the cell sheet was collected by Cell Shifter and transferred onto a gelatin gel. The condition of the cells under the preparation process was observed with an optical microscope, and the conditions for preparing the stacking sheet were mainly determined.

研究分野：膵島移植

キーワード：細胞培養 細胞シート

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

1. 研究開始当初の背景

膵臓移植において、膵臓摘出 保存 膵臓分離 純化 移植という過程で、虚血、低酸素、機械的刺激、酸化ストレス、炎症といった様々な障害を受ける。膵臓移植には、インスリン分泌能を保持した十分な膵臓が必要である。これらの過程において、障害を制御するために様々な工夫が行われてはいるが、移植基準を満たすことは本邦でも海外でも50%程度で、一人のレシピエントに複数のドナーが必要になっている(N Eng J Med, 355:1318-30,2006)。膵臓移植成績を向上させるためには、摘出・分離・移植の過程における膵臓細胞死による細胞数の減少、インスリン分泌能を制御し、one donor/one recipient の膵臓移植を可能にすることが最大の課題である。日常診療で小児外科を専門とし、小児糖尿病の悲惨さは痛感しており、小児膵臓移植の可能性を明らかにしたいと考えている。以前より、1型糖尿病に対する治療を目指し、移植膵臓に対する免疫寛容誘導の研究を行ってきた。しかし、膵臓はクラスターを形成しているため、細胞に対する影響にばらつきが生じる。膵臓に対してジェノトキシックストレスを加えるとセントラルダメージが生じることを確認し(Pancreas. 41(2):245-252,2012)、膵臓に対する効率的な修飾には限界があり、単細胞の形が有利であると考察した。近年、細胞の生存とインスリン分泌に深く関わっていると言われているユビキチン-プロテアソームシステム系小胞体ストレス応答の制御を、膵臓細胞レベルで行えば、膵臓細胞喪失とインスリン分泌低下を食い止めることができるのではないかと考えに至った。

2. 研究の目的

これまでの実験でマイトマイシンC処置膵臓が、レシピエントの免疫抑制なく、長期生着が可能であることを報告している(Ise K et al. Transpl. 77(6):907-14,2004)。さらに、単離膵臓細胞シートの作成に成功している(特許第5717253、Biomaterials. 30(30):5943-9,2009)。in vitro においてはインスリン分泌機能を持つこと、in vivo においても糖尿病マウスへの移植実験で血糖の正常化と長期生着に成功した(Transpl. 92(11):1231-6.2011)。膵臓細胞レベルでユビキチン-プロテアソームシステム系小胞体ストレス応答を制御した膵臓細胞を用いた機能的細胞シートの作成を試みる。膵臓細胞のユビキチン-プロテアソームシステム系小胞体ストレス応答を把握するため、各種 阻害剤の介入を行い、介入のタイミングやターゲットを明らかにする。虚血や低酸素、再灌流などの刺激侵襲により生じた異常タンパクが小胞体に蓄積すると小胞体ストレス反応が起こり、ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク分解が亢進する。この小胞体ストレス反応の機能不全が糖尿病をもたらすと言われている。膵臓分離・移植過程では、様々な小胞体ストレスが負荷されると想定されるが、小胞体ストレスの関与に関する知見は極めて少ない。膵臓細胞のタンパク質分解レベルでの保護は極めて独創的なアプローチと考える。さらに糖尿病の病態生理学に関する分子・細胞レベルにおける知見の蓄積や、ユビキチン-プロテアソームシステム系小胞体ストレス応答に関する知見が蓄積され得る可能性がある。

3. 研究の方法

(1)膵臓移植の対象となる症例の膵組織の遺伝子変異の有無の解析 (2)小胞体ストレス下での遺伝子変異発生の有無の解析 (3)細胞シート作成実験方法の検討。

(1)(2) ClearSeq SS Comprehensive Cancer キャプチャライブラリ (Agilent社) を用いて実施。変異頻度の高い151の遺伝子を標的とした次世代シーケンサーによる変異解析用の遺伝子パネルで、Whole genome sequenceやexome sequenceによる遺伝子解析より、効果的な変異解析を行った。

(3)細胞移植の基礎実験として、分泌系細胞シートの作成とシート化した細胞の機能評価を目的としている。細胞培養および回収時の小胞体ストレス関連研究を行う前段階として、培養細胞(間葉系幹細胞、樹状細胞)を用いて、シート化細胞の評価モデルを作成する。細胞培養室にて間葉系幹細胞を培養後、細胞を回収し、温度応答性培養皿(Up Cell)に播種して細胞シートを作成する。Cell Shifter、Cell Stamp、流水法にて、細胞シートを回収し、ゼラチンゲル上に転写して、作成過程の条件による細胞の状態を光学顕微鏡で観察し記録する。樹状細胞を温度応答性培養皿(Rep Cell)に播種し、細胞回収後、間葉系幹細胞と共培養し細胞シートを作成する。作成過程の条件による細胞の状態を光学顕微鏡で観察し記録する。

4. 研究成果

(1)(2)について、遺伝子解析中。施設異動のため、小胞体ストレス応答制御による細胞死回避の検証(N-Acetyl-L-cysteineおよびL-glutathioneを細胞シート作成時に添加しストレス緩和を図り、細胞死の検出)を行うことができなかった。隣組織遺伝子は現在解析中。

(3)細胞培養および回収時の小胞体ストレス関連研究を行う前段階として、培養細胞(間葉系幹細胞)を用いて、シート化細胞の評価モデルを作成した。細胞培養室にて間葉系幹細胞を2週間培養後、細胞を回収し、温度応答性培養皿(Up Cell)に播種して細胞シートを作成した。播種3日後、Cell Shifterにて細胞シートを回収し、ゼラチンゲル上に転写した。作成過程の条件による細胞の状態を光学顕微鏡で観察し、主に重積シート作成の条件を決定し細胞シートの積層化に成功した。

完成したモデルを用いて、培養、単離、シート作成によって小胞体ストレスシグナルがどのように活性化するかをWestern blot法で解析し、小胞体ストレスセンサーとして同定されている3種の小胞体膜貫通タンパク質(IRE1アルファ、PERK、ATF6)それぞれの上流、下流のタンパク質発現の変化を検討している。



(コンフルエント状態)

(温度応答下細胞剥離)

(三重二重単層連続シート)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5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 安藤 亮、伊勢 一哉	4. 巻 55
2. 論文標題 小児急性虫垂炎の進行に伴う虫垂内細菌叢の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本小児外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 231 ~ 235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11164/jjsps.55.2_231	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 伊勢一哉	4. 巻 51
2. 論文標題 腸重積症，器質的疾患がないのに繰り返す	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 小児外科	6. 最初と最後の頁 1001-1004
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 無
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 伊勢一哉	4. 巻 27
2. 論文標題 移植医療の現状と課題	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 仙台赤十字病院医学雑誌	6. 最初と最後の頁 3-9
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 伊勢一哉、安藤亮、岡村敦	4. 巻 27
2. 論文標題 高位気管切開術後の難治性誤嚥に対する誤嚥防止術の1例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 仙台赤十字病院医学雑誌	6. 最初と最後の頁 81-85
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 安藤 亮、伊勢 一哉、遠藤 尚文	4. 巻 54
2. 論文標題 再発を繰り返す腸重積症に対して腹腔鏡下回盲部固定術を施行した1例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本小児外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 268 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11164/jjsps.54.2_268	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 Sato M, Hamada Y, Kohno M, Ise K, Uchida K, Ogata H, Masuyama H, Morotomi Y, Yasufuku M, Wada M.	4. 巻 33
2. 論文標題 Neonatal gastrointestinal perforation in Japan: a nationwide survey.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatr Surg Int.	6. 最初と最後の頁 33-41
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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 伊勢一哉、岡村敦、安藤亮、遠藤尚文
2. 発表標題 卵巣奇形腫症例の遠隔期成績の問題点
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊勢一哉、内田恵一、上原秀一郎、渡邊稔彦、照井慶太、藤代準、小笠原友紀、平原憲道、渡辺栄一郎、富田紘史、古村眞、臼井規朗
2. 発表標題 日本小児外科学会による新生児外科全国集計について
3. 学会等名 第56回日本小児外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊勢一哉、岡村敦
2. 発表標題 気管切開先行例に対する誤嚥防止術
3. 学会等名 第56回日本小児外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊勢一哉、岡村敦
2. 発表標題 肛門周囲膿瘍に対する漢方治療の成績と工夫
3. 学会等名 第119回日本外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊勢一哉、岡村敦
2. 発表標題 腸間膜リンパ管血管奇形の検討
3. 学会等名 第60回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊勢一哉、岡村敦
2. 発表標題 重症心身障害児者の嚥下障害に対する気管切開先行例の検討
3. 学会等名 第24回日本摂食嚥下リハビリテーション学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊勢一哉
2. 発表標題 重症心身障害児の気管切開後嚥下障害に対するスピーチバルブの使用経験
3. 学会等名 第13回日本小児耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊勢一哉、内田恵一、上原秀一郎、渡邊稔彦、照井慶太、藤代準、小笠原友紀、平原憲道、渡辺栄一郎、富田紘史、八木實、古村真、石井智浩、井上幹大、大橋祐介、小林めぐみ、望月響子、矢本真也、臼井規朗
2. 発表標題 本小児外科学会による新生児外科全国集計について
3. 学会等名 第55回日本小児外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊勢一哉、安藤亮
2. 発表標題 重症心身障害児者の嚥下障害に対する外科治療
3. 学会等名 第118回日本外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuya Ise, Nobuyuki Sano, Takamichi Kamiyama
2. 発表標題 The results of novel surgical closure of the larynx technique for intractable aspiration pneumonia in neurologically impaired patients
3. 学会等名 50thPAPS
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊勢一哉、石井希代子、廣瀬千穂、氏家二郎
2. 発表標題 重症心身障害児の嚥下障害に対する治療成績
3. 学会等名 第54回日本小児外科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊勢一哉、石井希代子、廣瀬千穂、氏家二郎
2. 発表標題 重症心身障害児の嚥下障害に対する治療結果
3. 学会等名 第117回日本外科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊勢一哉、斎藤敬弘、清水裕史、花山寛之
2. 発表標題 機能的細胞シート開発
3. 学会等名 第58回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 伊勢一哉、石井勉、河原田勉、石井希代子、山下方俊、石井証、清水裕史、氏家二郎
2. 発表標題 重症心身障害児の胃食道逆流と嚥下障害に対する漢方薬の使用経験
3. 学会等名 第53回日本小児外科学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 伊勢一哉、小林めぐみ、水野大、佐々木章、清水裕史、石井証、山下方俊
2. 発表標題 小児脾膿瘍に対する外科的治療
3. 学会等名 第116回日本外科学会
4. 発表年 2016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	佐々木 章 (Sasaki Akira) (40275540)	岩手医科大学・医学部・教授 (31201)	