

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16281

研究課題名（和文）Nrf2を介した間葉系幹細胞からIPCへの効率的な分化誘導

研究課題名（英文）An effective differentiation protocol of insulin producing cells from adipose derived stem cells with Nrf2 inducer

研究代表者

齋藤 裕 (SAITO, Yu)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：50548675

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Nrf2 inducer (EGCG) が、ADSCに対して、1. 内胚葉への形質転換を促進する2. 胚葉転換後、IPCへの成熟過程を促進することでIPCへの分化効率が上昇すると考えた。マウスisletに対するEGCGの保護効果を認めた100uMとし、胚葉転換時、IPC成熟過程時での効果を検討したが、細胞毒性を示し、10uMに減量し、その効果を検討したが、EGCGに明らかな分化誘導促進作用は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MSCは中胚葉性組織（間葉）に由来する体性幹細胞であり、通常は間葉系に属する細胞へと分化するが、微小環境の変化により中胚葉性でない組織にまで分化可能である。これまでに、MSCにNrf2を過剰発現させることで、骨芽細胞への分化誘導を促進することが報告されている。Nrf2 inducerが、MSCからIPCへの分化誘導の促進することで、低侵襲かつ迅速に移植が可能となり得ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate the effectiveness of 3D culture system with Nrf2 inducer on differentiation of human ADSCs to functional IPCs. EGCG was used as Nrf2 inducer. EGCG was added into Step 1 (germ layer conversion), Step 2 (IPC maturation), and Step 1/2. In terms with dose of EGCG, we have previously reported the islet protective effect of EGCG with 100uM dose (Surgery Today 2019), and that dose was also chosen in this study. As a result, EGCG addition (100uM) decreased cell viabilities and insulin secretary function of IPCs. 100uM was thought to be cytotoxic for IPC differentiation. A low dose EGCG (10uM) also did not stimulate IPCs differentiation from ADSCs in both germ layer conversion and maturation steps. In conclusion, Nrf2 inducer, EGCG, did not stimulate IPC differentiation from ADSC. Further investigations were necessary to examine the EGCG effect for IPC differentiation.

研究分野：再生医療

キーワード：Nrf2 inducer 間葉系幹細胞 インスリン産生細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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・ES 細胞・MSC** 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、**ES 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。**MSC** から膵島細胞様の機能を持つ **IPC** 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。

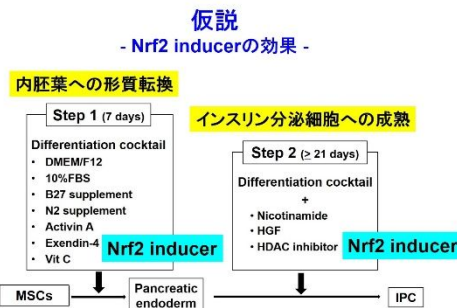
(2) Nrf2 による酸化ストレス制御 (膵島保護効果)

非ストレス状態下では、**Nrf2** は **Keap1** に捕捉されプロテアソームによって分解される。細胞に酸化ストレスにさらされると、**Keap1** による **Nrf2** 抑制機構は解除され、**Nrf2** は分解されずに安定化し、核移行した **Nrf2** が防御遺伝子の発現を誘導する。**Nrf2** の活性化による **Antioxidant** や **Heat Shock Protein (HSP)** の発現誘導は、活性酸素種 (**ROS**) への耐性による細胞保護効果や **DAMPs** などによる炎症 **Cascade** の抑止効果が期待され、包括的治療の **target** として期待できる。我々はすでに、マウスから単離した膵島の培養液内に **Nrf2 inducer** である **Epigallocatechin gallate (EGCG)** を添加することで、**Nrf2** の核内移行を促進し、さらに、インスリン産生能が維持されることをすでに報告している (*Surg Today.* 2019)。

2. 研究の目的

MSC は中胚葉性組織 (間葉) に由来する体性幹細胞であり、通常は間葉系に属する細胞 (骨細胞、心筋細胞、軟骨細胞、腱細胞、脂肪細胞など) へと分化する。しかし、微小環境の変化によりグリア細胞 (外胚葉由来) 肝細胞 (内胚葉由来) など、中胚葉性でない組織にまで分化できる可塑性を持っていることが示されている。これまでに、**MSC** に **Nrf2** を過剰発現させることで、骨芽細胞への分化誘導を促進し (*Biochem Biophys Res Commun.* 2017) また、**iPS** 由来神経幹細胞から神経細胞・星状細胞への分化を刺激すること (*Neurochem Int.* 2017) などが報告されている。

今回 **Nrf2 inducer** が、**MSC** から **IPC** への分化誘導の過程において、**1. 内胚葉への形質転換を促進する**、あるいは、**2. 胚葉転換後、IPC への成熟過程を促進する**、ことで **IPC** への分化効率が上昇すれば、低侵襲かつ迅速に移植が可能となり、画期的な治療につながり得ると考えられる。



IPC differentiation with EGCG

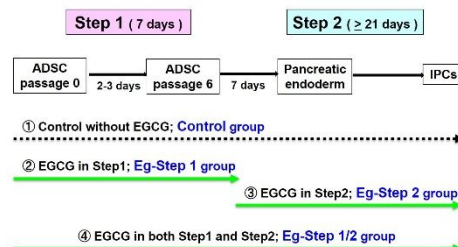
3. 研究の方法

Nrf2 inducer として **Epigallocatechin gallate (EGCG)** を使用

EGCG 濃度は、100uM マウス islet に対する **EGCG** の保護効果あり (*Surg Today.* 2019)

IPC の differentiated medium を用いて 2-step で培養を行い

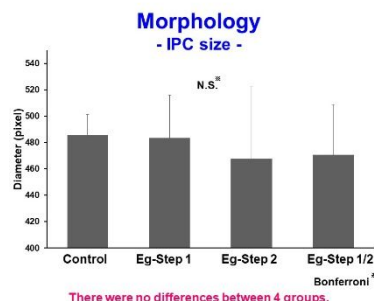
(1) Step1 のみ **EGCG** 投与、(2) Step 2 のみ **EGCG** 投与、(3) Step1 / Step2 ともに **EGCG** 投与の 3 群間で比較検討する。評価項目は、形態、Viability、グルコース刺激試験を行った。



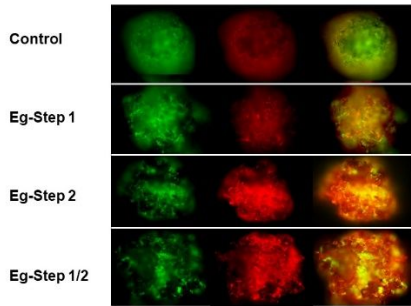
4. 研究成果

1st in vitro study (100uM)

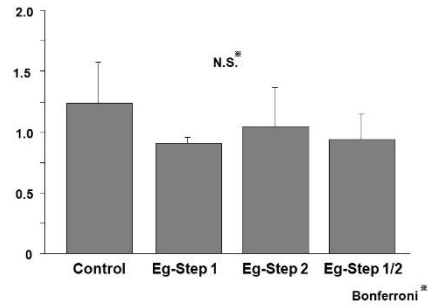
IPC のサイズは 4 群間で有意差なく、形態学的にも差は認めず、いずれの Group も **EGCG** 非投与群と比較して Viability 低下していた。グルコース負荷試験においても、有意差はないものの、**EGCG** 投与群で **SI** 低下傾向であり、幹細胞は通常の上皮細胞と比較して **EGCG** 濃度は、低濃度である必要性があると考えられる。



Cell viability
- PI staining -

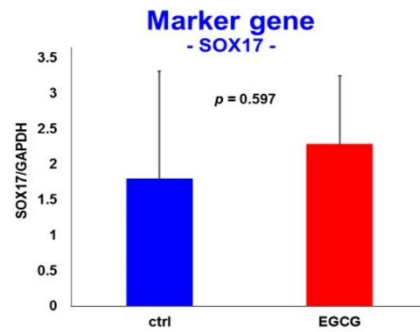
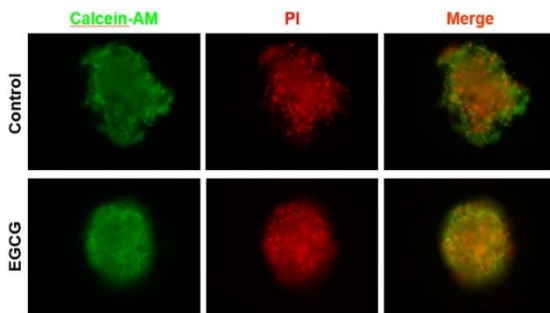


Static glucose stimulation test



2nd in vitro study (10uM)

10uM (Low dose) で Step1 のみ EGCG 投与、IPC 誘導開始後 7 日目に、Defenitive endoderm marker である SOX17 を非投与群と比較



投与群と非投与群で内胚葉転換時に、形態学的にも、また、SOX17 の発現量に有意差はなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Saito Yu, Sugimoto Maki, Imura Satoru, Morine Yuji, Ikemoto Tetsuya, Iwahashi Shuichi, Yamada Shinichiro, Shimada Mitsuo	4. 巻 271
2. 論文標題 Intraoperative 3D Hologram Support With Mixed Reality Techniques in Liver Surgery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 e4 ~ e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000003552	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 Wada Yuma, Takata Atsushi, Ikemoto Tetsuya, Morine Yuji, Imura Satoru, Iwahashi Shuichi, Saito Yu, Shimada Mitsuo	4. 巻 49
2. 論文標題 The protective effect of epigallocatechin 3-gallate on mouse pancreatic islets via the Nrf2 pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 536 ~ 545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-019-1761-0	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 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 10759
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 Ohta Shogo, Ikemoto Tetsuya, Wada Yuma, Saito Yu, Yamada Shinichiro, Imura Satoru, Morine Yuji, Shimada Mitsuo	4. 巻 9
2. 論文標題 A change in the zinc ion concentration reflects the maturation of insulin-producing cells generated from adipose-derived mesenchymal stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55172-0	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 Wada Yuma, Ikemoto Tetsuya, Morine Yuji, Imura Satoru, Saito Yu, Yamada Shinichiro, Shimada Mitsuo	4. 巻 9
2. 論文標題 The Differences in the Characteristics of Insulin-producing Cells Using Human Adipose-tissue Derived Mesenchymal Stem Cells from Subcutaneous and Visceral Tissues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-49701-0	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, Morine Yuji, Iwahashi Shuichi, Ikemoto Tetsuya, Imura Satoru, Yamanaka-Okumura Hisami, Hirayama Akiyoshi, Soga Tomoyoshi, Tomita Masaru, Shimada Mitsuo	4. 巻 2
2. 論文標題 Changes of liver metabolites following hepatectomy with ischemia reperfusion towards liver regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 204 ~ 211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/ags3.12058	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, Yamada Shinichiro, Imura Satoru, Morine Yuji, Ikemoto Tetsuya, Iwahashi Shuichi, Shimada Mitsuo	4. 巻 3
2. 論文標題 A learning curve for laparoscopic liver resection: an effective training system and standardization of technique	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Translational Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 45 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.21037/tgh.2018.07.03	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018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
研究協力者	池本 哲也 (IKEMOTO Tetsuya)		