

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18359

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来膵島組織を用いた炎症による糖尿病モデル膵島組織構築

研究課題名(英文) Development of inflamed pancreatic islet tissues using human iPS cells derived pancreatic cells

研究代表者

篠原 満利恵 (Shinohara, Marie)

東京大学・生産技術研究所・助教

研究者番号：00789133

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)：本研究では、膵島の炎症によって起こる膵細胞の細胞死と免疫細胞の膵島への浸潤をin vitroで再現する培養系の開発を行った。まず、マイクロウェルを底面に持つプレート上で各種膵島構成細胞を用いて膵島様凝集体を形成した後、IL-1 やIFN- 刺激により炎症を惹起し、マクロファージと共培養を行った。膵細胞のIL-1 刺激によりCCL2やCCL3といった炎症性の因子の産生能が増加し、マクロファージとの共培養によりアポトーシス、細胞死が顕著にみられた。すなわち、マクロファージからのIL-1 刺激による膵細胞障害を再現できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病研究や新規糖尿病治療薬の開発において、専ら動物実験や動物由来の初代膵島を用いた検討が行われているが、ヒトでの生理的な応答を十分に再現することは難しい。そして、初代培養では単離後に機能が著しく低下するため、評価系として均質性を維持することは困難である。本研究の成果は、生体内の炎症による膵細胞の細胞死と機能障害を再現する膵島組織培養の可能性を示すものであり、ヒトiPS細胞由来膵島構成細胞や細胞株など様々な細胞種に応用が可能であることから、糖尿病研究や創薬分野の加速化につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, a culture system was developed that reproduces in vitro cell death of pancreatic β -cells and infiltration of immune cells into the islets, which caused by the inflammation. After formation of pancreatic islet-like aggregates using several kinds of endocrine pancreas cells on a plate with microwells on the bottom surface. The inflammation was induced by IL-1 and IFN- stimulation, and co-culture with macrophages was performed. IL-1 stimulation of pancreatic β cells increased the productivity of inflammatory factors such as CCL2 and CCL3, and co-culture with macrophages markedly caused apoptosis and cell death. It was suggested that pancreatic β -cell damage could be reproduced by IL-1 stimulation from macrophages in vitro.

研究分野：生体医工学関連

キーワード：膵島 炎症 マクロファージ

様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、総じて血糖値のコントロールが困難となり高血糖が維持される疾患であるが、その主な分類である、1型、2型糖尿病のどちらも膵島での炎症が起きた後、膵β細胞の細胞死や機能障害が起こっていることが知られている(Cnop et al., 2005, Eguchi et al., 2012). 1型糖尿病は自己免疫により膵β細胞が破壊され、インスリンが欠乏することで発症する。2型糖尿病は肥満・運動不足・ストレスなどをきっかけに発病する。このように、1型、2型糖尿病における発症機序は異なるものの、1型糖尿病では発症の初期に膵島炎がおきてリンパ球が浸潤し、2型糖尿病においても炎症により膵島にマクロファージが浸潤し(Donath et al., 2008), 膵β細胞のアポトーシスが進行していることが報告されている。しかしながら、炎症による膵島組織の機能障害や膵島へのリンパ球、マクロファージの浸潤に関する研究では、専ら動物実験が行われており、*in vitro*における膵島組織の検討はあまり行われていない。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病治療の基礎研究や創薬応用に役立つ膵島組織構築にむけた、*in vitro*における膵島の炎症反応を再現する培養手法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1)膵島構成細胞を用いた培養膵島様凝集体形成

均一な大きさの膵島様凝集体を形成するため、底面がマイクロウェル構造となっている培養基板(Shinohara et al., 2014)を用いて膵島構成細胞を培養した。膵島構成細胞として、マウスインスリンノーマ細胞株 MIN6-m9, マウス膵α細胞株 alpha TC1 clone 6, ヒトインスリン産生細胞株 iGL 細胞, ヒト iPS 細胞由来膵β細胞を用いた。

(2)ヒト iPS 細胞からの膵β細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞 TkDN4-M を未分化状態から内胚葉, 膵前駆細胞, 内分泌前駆細胞, 膵β細胞と順に分化誘導し, 膵β細胞を調製した。分化誘導方法は, 先行研究を元に最適化した(Kunisada et al., 2012, Jacobson et al., 2017)。特に内胚葉分化の際に, 一般的にはアクチビンを使用するが, 高額な分化誘導費用のうちアクチビンにかかる費用の占める割合は高い。そこで, GSK-3 阻害剤である小分子化合物のみを使用した培養手法(Siller et al., 2015)を用いた。

(3)膵β細胞への炎症の惹起と評価

マイクロウェル上で膵島組織を形成した後, IL-1β を添加することで膵β細胞の炎症を惹起した。その後, あらかじめヒト単球由来細胞株 THP-1 から誘導した M1 マクロファージと共培養した。共培養組織について, 炎症性サイトカインの産生, グルコース応答性インスリン分泌能, アポトーシス細胞の割合について IL-1β 刺激, マクロファージの有無での比較を行った。マクロファージは M1 型の際には炎症性サイトカインを産生し, M2 型の際には抗炎症性サイトカインを産生する。そのため, 炎症を惹起された凝集体との共培養では, M 型のマクロファージが炎症部分へ遊走していき, 浸潤するほど膵β細胞のアポトーシスが進行し, 機能障害が誘発されると考えられる。

4. 研究成果

(1)アクチビンを用いないヒト iPS 細胞からの膵島構成細胞への分化誘導

内胚葉マーカーである SOX17 の発現は Wnt シグナル伝達系で制御されているが(Hannan et al., 2013), Siller らは, GSK-3 阻害剤を用いることでアクチビンを使わずに内胚葉への分化誘導ができることを示した(Siller et al., 2015)。本研究においても, 内胚葉への分化誘導にアクチビンを用いず, GSK-3 阻害剤の CHIR-99021 を用いて分化誘導を行った。本研究の分化誘導方法により, インスリン, グルカゴン産生細胞の形成に成功した

(図1)。アクチビンは分化誘導に用いる培養液の費用の約半分を占めているため, アクチビンを使用しない分化誘導方法では, 培養費用を約半分削減できる。

また, 本手法で調製したヒト iPS 細胞由来膵島細胞は, マイクロウェル上に再播種することで, 凝集体の形成が可能であった(図2)。

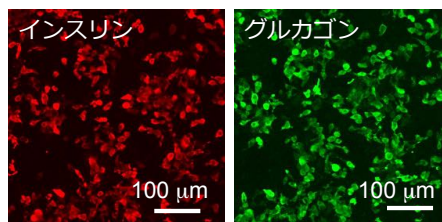


図1. 分化誘導したヒト iPS 細胞由来膵β細胞の免疫染色像

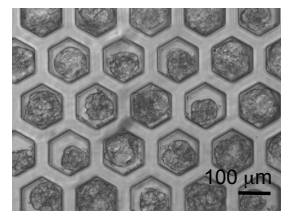


図2. マイクロウェル上のヒト iPS 細胞由来膵β細胞凝集体

(2) 膵島様凝集体の炎症の惹起とマクロファージの影響評価

①膵β細胞のケモカイン産生とインスリン分泌障害

膵β細胞は、グルコース応答性インスリン分泌能を有するが、膵島の炎症時には、M1マクロファージが集積し、IL-1βなど炎症性サイトカインを産生することで、インスリン分泌不全など膵β細胞の機能障害が起こることが報告されている(Eguchi et al., 2017). また、M1マクロファージから産生されるIL-1βにより、膵β細胞がCC2などケモカインを産生することで、よりマクロファージの取り込みが促進される(Burke et al., 2015).

そこで、本研究では、マイクロウェル上で膵β細胞の凝集体を形成させた後、100 ng/mL IL-1βで膵β細胞を刺激し、さらにあらかじめM1マクロファージに誘導したTHP-1を共培養させた際のケモカイン産生量、インスリン分泌能を比較した。IL-1βの刺激により、CCL2, CCL3産生量が増加した。また、膵β細胞のみの凝集体は、低濃度グルコース(2 mM)、高濃度グルコース(20 mM)で約4倍のインスリン分泌量の差があり、グルコース応答性インスリン分泌能を維持しているが、IL-1βで膵β細胞を刺激することで、インスリン分泌能自体が著しく低下していた。さらに、IL-1β刺激がない場合でもM1マクロファージとの共培養によりインスリン分泌能が低下し、IL-1βの刺激によりさらにインスリン分泌能が障害されることが示唆された(図3)。

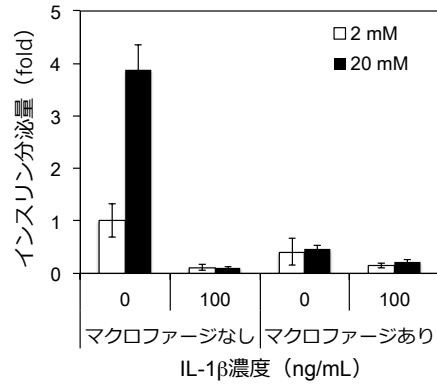


図3. マクロファージとの共培養によるインスリン分泌能の変化

②膵β細胞のアポトーシス

IL-1βの膵β細胞への影響は、インスリン分泌障害以外にアポトーシスの誘発、細胞増殖の低下などが報告されている(Li et al., 2019). 本研究において、マイクロウェル上で形成させた膵β細胞に対して、IL-1βの刺激、M1マクロファージの共培養を行なった場合、正常な膵β細胞凝集体に比べて凝集体の形状が崩れ、細胞死が誘発されている様子が確認された(図4). また、生細胞数、アポトーシス細胞数を比較したところ、IL-1βの刺激やM1マクロファージとの共培養により、生細胞数が減少し、アポトーシス細胞数が増加した(図5). 一方、IL-1βの刺激を行いかつ、M1マクロファージとの共培養を行なったものについて、IL-1β刺激のみを行なったものとあまり差が見られなかった。マクロファージは炎症初期にM1型マクロファージとして炎症を起こした細胞を貪食、浸潤し炎症性サイトカインを産生するが、炎症後期にはM2型に変化し、抗炎症性のサイトカインを産生することが知られている(Cao et al., 2015). あらかじめIL-1β刺激を行なった系については、M1型からM2型へのskewingが起こっている可能性が考えられる。

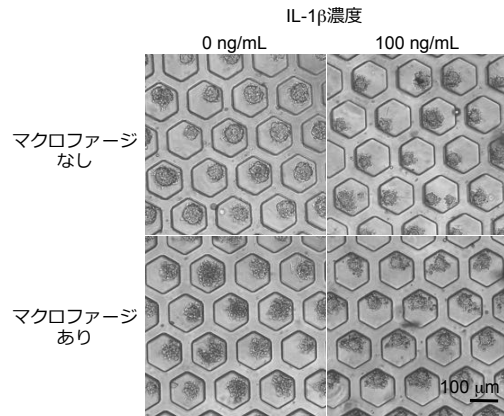


図4. マクロファージ共培養後の膵β細胞凝集体の形態変化

本研究は、膵島構成細胞を用いた凝集体形成と炎症性サイトカイン、M1マクロファージとの共培養により、膵島炎症時の膵β細胞のケモカイン産生、機能障害、アポトーシスを再現する培養系の実現可能性を示すものであり、特にマクロファージからのIL-1β刺激による膵β細胞障害を再現できる可能性が示唆された。本研究の培養系は、膵島炎症時のマクロファージと膵島の相互作用を再現する培養系として糖尿病研究や創薬の加速化につながることを期待される。

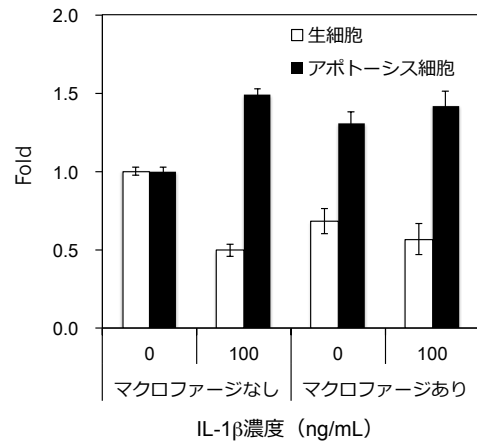


図5. マクロファージ共培養による生細胞数、アポトーシス細胞数の割合

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shinohara Marie, Choi Hyunjin, Ibuki Masato, Yabe Shigeharu G., Okochi Hitoshi, Miyajima Atsushi, Sakai Yasuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Endodermal differentiation of human induced pluripotent stem cells using simple dialysis culture system in suspension culture	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 14 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.05.004	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 チェ ヒョンジン、篠原 満利恵、酒井 康行	4. 巻 26
2. 論文標題 多能性幹細胞の大量培養法の現状：透析浮遊培養を用いたヒトiPS細胞の分化誘導	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organ Biology	6. 最初と最後の頁 175 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11378/organbio.26.175	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Marie Shinohara, Thalia Nghiem, Qiao You Lau, Fumiya Tokitou, and Yasuyuki Sakai
2. 発表標題 Macrophage aceralates inflamemation of pancreatic -cell aggregates
3. 学会等名 microTAS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 時任文弥, 篠原満利恵, 丸山優史, 酒井康行, 大竹勝人
2. 発表標題 酸素透過性多孔質担体を用いた膵島様組織培養
3. 学会等名 化学工学会第84年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 チェ ヒョンジン, 酒井 康行, 篠原 満利恵
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来膵 細胞凝集体の効率的調製のための透析浮遊培養
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hyunjin Choi, Marie Shinohara, Yasuyuki Sakai
2. 発表標題 Cost-effective differentiation of human iPS cells to pancreatic β -cells based on aggregate suspension culture with dialysis operations
3. 学会等名 ISSCR 17th Annual Meeting
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----