

## 論 文 内 容 要 旨

題目 A change in the zinc ion concentration reflects the maturation of insulin-producing cells generated from adipose-derived mesenchymal stem cells

(亜鉛イオン濃度変化は脂肪由来幹細胞から作成するインスリン産生細胞の成熟を反映する)

著者 Shogo Ohta, Tetsuya Ikemoto, Yuma Wada, Yu Saito, Shinichiro Yamada, Satoru Imura, Yuji Morine and Mitsuo Shimada.

令和元年 12 月 10 日発行 Scientific Reports 第 9 巻第 1 号 18731 ページに発表済

### 内容要旨

I 型糖尿病の根治的治療としての膵島移植における絶対的ドナー不足の新たな解決策として、再生医療を用いた脂肪由来幹細胞(adipose derived stem cell:ADSC)の利用が挙げられる。我々は基礎的研究から ADSC より膵β細胞様のインスリン産生細胞(insulin producing cell:IPC)の簡便かつ迅速な 2-step 分化誘導法(3 次元培養・xeno-antigen free protocol)を確立した(*Pancreas*. 2018, *Sci Rep*. 2019, *Sci Rep*. 2019)が、この作成された IPC の成熟度評価法の確立は喫緊の課題である。ジチゾン染色は膵島β細胞の検出法として臨床的にも用いられているが、強い細胞障害性・催奇形性があり、評価した細胞を移植に用いることはできない。また、最適な移植時期を科学的に証明することは臨床応用に関し重要である。我々は IPC における亜鉛イオン動態が細胞成熟に伴い変化するという仮説の下、非侵襲的評価法の樹立及び IPC 分化成熟・亜鉛イオン濃度相関とその機序解明を目指した研究を行った。

ヒト ADSC 細胞( $2.0 \times 10^6$  個)を 3 次元培養条件下(RCP $\mu$  ピース:富士フィルム株式会社)で我々の確立した分化誘導法により 21 日間で IPC へ分化誘導した。培養過程において、2 日ごとにジチゾン染色を行いその写真をデジタル化し画像解析ソフト(Image J)で染色強度を定量した。得られた細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR を行い膵β細胞成熟マーカー遺伝子(SOX17、NGN3、MAFA)の発現を確認した。更に得られた細胞集塊の免疫組織化学染色(インスリン・ZIP4・ZnT8)・蛍光免疫染色・電子顕微鏡による原理検証を行った。さらに IPC を低濃

## 様式(8)

度(2.2mM)および高濃度グルコース液(22mM)と順次1時間ずつ培養し、それぞれの培養上清中に放出されたインスリン量をELISA法で測定しその商で表すStimulation index(SI)を培養期間中経時的に算出した。同時に培地における亜鉛イオン含有量をキレート定量法で測定し、培養期間中の推移を検討した。ADSCから肝細胞様細胞(hepatocyte like cell:HLC)分化誘導過程でも同様に亜鉛イオン濃度変化量を測定しその推移を比較検討した。In vivoの機能試験として、ストレプトゾトシン 200mg/kgの腹腔内投与により糖尿誘導した1型糖尿病モデルヌードマウスにIPCを移植し、血糖値の推移を観察した。

得られた結果は以下の如くである。

1. 作成したIPCは蛍光免疫染色および免疫組織化学染色でインスリンの強発現および亜鉛輸送体蛋白ZnT8、ZIP4の発現を認めた。電子顕微鏡で細胞質内に膵島β細胞に認められる分泌顆粒様の構造を多数認めた。
2. 17日目の細胞におけるPCRでSOX17、NGN3、MAFAの強発現を認めた(SOX17,  $P<0.01$ ; NGN3, MAFA,  $P<0.001$ )。
3. IPCのジチゾン染色を行ったところ、培養期間に伴い徐々に橙色へ染色され、画像的解析でも染色における輝度の上昇が示され、第17日目にピークに達した( $P<0.01$ )。
4. IPC分化成熟誘導の過程における亜鉛イオン濃度変化は初期に負の値を示したのち、13日目にプラトーに達した。
5. 同じADSCから作成したHLCの亜鉛イオン濃度変化は同様に初期に負の値を示すものの正転化することはなかった。
6. 作成したIPCを糖尿病モデルマウスの腸間膜内に移植したところ、7日目に血糖正常化を認め、30日後まで維持された。

以上より、機能的に成熟するIPCは分化誘導における培地中亜鉛イオン濃度変化が特有のパターンを示し、分化・成熟・至適移植時期の新たな指標となりうる。また、少なくともADSCから内胚葉系の細胞分化誘導初期(胚葉転換期)は亜鉛要求量が極めて大きいことが示唆され、細胞発生学・分子細胞学的な新たな知見を与える可能性がある。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 <b>1458</b> 号	氏名	太田 昇吾
審査委員	主査 丹黒 章 副査 松久 宗英 副査 常山 幸一		

題目 A change in the zinc ion concentration reflects the maturation of insulin-producing cells generated from adipose-derived mesenchymal stem cells

(亜鉛イオン濃度変化は脂肪由来幹細胞から作成するインスリン産生細胞の成熟を反映する)

著者 Shogo Ohta, Tetsuya Ikemoto, Yuma Wada, Yu Saito, Shinichiro Yamada, Satoru Imura, Yuji Morine and Mitsuo Shimada.  
 令和元年12月10日発行 Scientific Reports 第9巻第1号18731ページに発表済  
 (主任教授 島田光生)

要旨 1型糖尿病の新たな治療法として、脂肪由来幹細胞(adipose derived stem cell: ADSC)の利用が挙げられる。申請者らはADSCより膵β細胞様のインスリン産生細胞(insulin producing cell: IPC)の簡便かつ迅速な分化誘導法を確立したが、臨床応用にはIPCの成熟度評価法の開発が喫緊の課題である。

申請者らは、IPCにおける亜鉛イオン動態が細胞成熟に伴い変化するという仮説の下、ヒトADSC細胞を3次元培養下にIPCへ分化誘導し、培養過程におけるdithizoneの染色強度を定量化し、膵β細胞成熟マーカー遺伝子(SOX17, NGN3, MAFA)の発現を確認した。また培養中の細胞集塊の亜鉛膜輸送タンパク(ZRT-, IRT-like protein 4 (ZIP4)、Zn transporter 8 (ZnT8))の発現を検討

し、培地における亜鉛イオン含有量をキレート定量法で測定した。

得られた結果は以下の如くである。

1. IPC はインスリンの発現ならびに *SOX17*、*NGN3*、*MAFA* の強発現を認めた。電子顕微鏡で細胞質内に膵島  $\beta$  細胞に認められる分泌顆粒様構造を多数認め、IPC を糖尿病モデルマウスの腸間膜内に移植したところ、7 日目に血糖は正常化し 30 日後まで維持された。
2. IPC は dithizone 染色で徐々に橙色へ染色され、染色強度は第 17 日目にピークに達した。
3. IPC 分化成熟誘導の過程における亜鉛イオン濃度は負の値を示したのち、正に転じ 13 日目にプラトーに達した。
4. 亜鉛輸送体蛋白 *ZIP4* の発現は培養期間中ほぼ一定であったが、*ZnT8* の発現は培養 7 日目に発現強度が上昇し、その後低下した。
5. ADSC から 2 次元培養で作成した IPC や肝細胞様細胞の亜鉛イオン濃度は初期から負の値を示し、正転化することはなかった。

以上より、IPC の分化誘導では初期の培地中亜鉛イオン濃度は負になり成熟に伴い正に転じる特有のパターンを示し、至適移植時期決定の新たな指標となる可能性がある。本研究は ADSC から IPC 作成における新たな非侵襲的分化評価法の可能性を示しており、再生医学研究における意義は大きく学位授与に値すると判定した。