

論 文 内 容 要 旨

題目 The Differences in the Characteristics of Insulin-producing Cells Using Human Adipose-tissue Derived Mesenchymal Stem Cells from Subcutaneous and Visceral Tissues
(脂肪由来間葉系幹細胞からインスリン産生細胞への分化誘導に際しての皮下および腹腔内脂肪の特性の差異に関する研究)

著者 Yuma Wada, Tetsuya Ikemoto, Yuji Morine, Satoru Imura, Yu Saito, Shinichiro Yamada and Mitsuo Shimada.
令和元年9月13日発行 Scientific Reports 第9巻第1号13204
ページに発表済

内容要旨

我々はこれまでに幹細胞の中でも、倫理的問題が少なく、安全かつ十分な収量が確保可能な脂肪由来幹細胞 (adipose-derived stem cell: ADSC) に着目した糖尿病研究を行ってきた。基礎的研究から ADSC より膵β細胞様機能を持つ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、この作成された IPC の実臨床応用に際して、ADSC の確保は解決すべき喫緊の課題である。ADSC は脂肪組織から得られるが、いずれの部位が最適な脂肪採取部位であるかを科学的に検証することは非常に重要である。そこで、今回、脂肪の由来部位に着目し、皮下脂肪と腹腔内脂肪のどちらが IPC 作成に適しているかの検証とその機序解明を目指した研究を行った。

対象は当科で手術を施行した4名の患者であり(徳島大学病院 IRB 承認番号3090)、手術中に廃棄される皮下脂肪組織と腹腔内脂肪組織(各々0.1g)を無菌的に採取し、脂肪幹細胞分離キットを用いて分離培養した。ADSC(2.0×10^6 個)を単離した後、これまでに我々が確立した分化誘導法(3次元培養条件下: recombinant peptide micro piece 使用、xeno-antigen free 条件下)により21日間で IPC へ分化誘導を行った。各々の IPC につき、cell quality(morphology、糖応答能、サイトカイン解析)、薬剤誘導糖尿病ヌードマウスへの移植による in vivo function test を行った。

得られた結果は以下の通りである。

1. 皮下脂肪と腹腔内脂肪から単離した ADSC を比較すると、肉眼的な形態に

差異は認めず、フローサイトメトリー解析でも、細胞表面マーカー

(CD31-CD34-CD45-CD90+CD105-CD146-)に差異は認めなかった。しかし、ADSC の細胞倍加速度を検討すると、皮下脂肪由来の ADSC が有意に迅速であり、また、ADSC の培養液上清をサイトカインアッセイで検討すると、腹腔内脂肪から採取した ADSC において、炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, TGF- β , MCP-1, TNF- α) が有意に多く分泌されていた。

2. 各々の脂肪から精製した ADSC から分化誘導した IPC を比較すると、肉眼的な形態に差異は認めなかったが、グルコース応答試験では、皮下脂肪由来の IPC がインスリン分泌能が高いという結果であった (stimulation index: 3.8 ± 0.9 vs. 1.5 ± 0.4)。IPC の蛍光免疫染色で検討すると、皮下脂肪由来の IPC で有意に高発現であり、皮下脂肪由来の IPC では、細胞質で C-ペプチドと PDX-1 が強発現であった。
3. ストレプトゾトシン 200mg/kg の腹腔内投与により糖尿病誘導した 1 型糖尿病モデルヌードマウス (n=4) の腎被膜下にヒト皮下脂肪から分離した ADSC から分化誘導した 96 個の IPC を移植し、血糖値の推移を観察したところ、9 日目までに血糖の正常化 (<200mg/dl) を認め、30 日後まで維持された (4/4, 100%)。移植後 30 日の IPC は腎被膜下に確認でき、インスリン抗体および HLA class I が強陽性であった。

皮下脂肪由来の ADSC は有意に細胞倍加速度に優れ、炎症性サイトカインの分泌が少なく、それは分化誘導した IPC の糖応答能機能が優れるという点に反映されていた。実際に in vivo でも糖尿病動物を正常化することも証明され、実際のヒト脂肪組織から機能的 IPC が分化誘導可能であること、またその際には皮下の脂肪が適していることが示された。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1500 号	氏名	和田 佑馬
審査委員	主査 高山 哲治 副査 松久 宗英 副査 秦 広樹		

題目 The Differences in the Characteristics of Insulin-producing Cells Using Human Adipose-tissue Derived Mesenchymal Stem Cells from Subcutaneous and Visceral Tissues
(脂肪由来間葉系幹細胞からインスリン産生細胞への分化誘導に際しての皮下および腹腔内脂肪の特性の差異に関する研究)

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

令和元年9月13日発行 Scientific Reports 第9巻第1号13204
ページに発表済

(主任教授 島田 光生)

要旨 申請者らはこれまでに幹細胞の中でも、倫理的問題が少なく、安全かつ十分な収量が確保可能な脂肪由来幹細胞(adipose-derived stem cell: ADSC)に着目し、ADSCより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。しかしながら ADSC の単離に関して、いずれの部位が最適な脂肪採取部位かについては未だ不明である。

申請者らは、皮下脂肪と腹腔内脂肪のどちらが IPC 作成に適しているかを明らかにするため以下の検討を行った。手術を施行した患者から皮下脂肪組織と腹腔内脂肪組織を採取し、脂肪幹細胞分離キットを用いて ADSC (2.0×10^6 個)を単離した後、申請者らが確立した分化誘導法 (3次元培養)により21日間でIPCへ分化誘導を行った。単離したADSCと作成したIPCを比較検

討した。

得られた結果は以下の如くである。

1. 皮下脂肪と腹腔内脂肪から単離した ADSC を比較すると、肉眼的形態や、フローサイトメトリー解析による細胞表面マーカーに差を認めなかった。しかし、皮下脂肪由来 ADSC は、腹腔内脂肪由来 ADSC に比し細胞倍加速度は速く、ADSC の培養液上清中の炎症性サイトカイン分泌量が少なかった。
2. 分化誘導した IPC を比較すると、肉眼的な形態に差を認めなかったが、皮下脂肪由来 IPC の方がグルコース刺激試験でのインスリン分泌能が高かった(Stimulation index: 3.8 ± 0.9 vs. 1.5 ± 0.4)。IPC 中のインスリン陽性細胞は皮下脂肪由来の IPC で高値であった(43.0 vs. 5.0 /high power field)。また皮下脂肪由来 IPC では、細胞質に C-ペプチドと pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX-1) の強発現を認めた。
3. 皮下脂肪由来 IPC をストレプトゾトシン 200mg/kg の腹腔内投与により糖尿病を誘導した 1 型糖尿病モデルヌードマウスの腎被膜下に移植したところ、9 日目までに血糖値の正常化を認め、30 日後まで維持された。移植後 30 日の IPC は腎被膜下に確認でき、インスリン抗体および HLA class I が強陽性であった。

以上から、皮下脂肪由来 ADSC は細胞倍加速度に優れ、炎症性サイトカインの分泌が少なく、分化誘導した IPC のグルコース応答性機能が優れ、糖尿病モデルマウスの血糖値を正常化できることが明らかとなった。

本研究は皮下脂肪が IPC 作成には優れているという医師主導臨床試験に向け重要な知見を示しており、その科学的・臨床的意義は大きく学位授与に値すると判定した。