

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390056

研究課題名(和文) インスリン抵抗性惹起因子・改善因子による生体内幹細胞機能への影響

研究課題名(英文) Effects of insulin resistance-related factors on the stem cell functions in vivo.

研究代表者

今村 武史 (Imamura, Takeshi)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00552093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)： 本実験計画では、糖尿病等のインスリン抵抗性状態下における幹細胞障害の有無を検証することを目的として、カニクイザルiPS細胞を用いた幹細胞機能評価を培養条件下、およびインスリン抵抗性を有するカニクイザル生体内環境下で評価した。その結果、培養条件下においてインスリン抵抗性惹起因子であるサイトカイン附置により幹細胞分化能の低下が生じた。同様に、インスリン抵抗性個体へ移植したiPS細胞は健常個体へ移植した細胞に比し分化能低下が認められ、生体内インスリン抵抗性因子により幹細胞の分化障害が生じる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： In this study, we planned to investigate whether the stem cell functions are damaged under the diabetic and/or insulin resistant conditions. Using the iPS cells established with the skin fibroblast of cynomolgus monkey, we identified the inhibitory effects of insulin resistant factor, IL-1 β on the ability of differentiation from iPS cells in vitro and in vivo. Thus, it is suggested that the stem cell functions are modified by the insulin resistant factors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：幹細胞 インスリン抵抗性因子 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

幹細胞を用いた再生医療は、閉塞性動脈疾患に対する血管内皮前駆細胞 (EPC: endothelial progenitor cell) 投与など、すでに臨床応用が開始されている。しかし、糖尿病患者において血中 EPC 数の減少が報告されるなど (BMC Endo. Dis. 10:5-15, 2010)、ある種の疾患・病態を有する患者症例では、投与した幹細胞に機能障害を生じる可能性が考えられる。例えば、糖尿病患者における外傷治癒の遷延や、インスリン抵抗性症候群に認められる血管内皮障害もその一つと捉えることができるが、現時点では幹細胞障害を合併する疾患はまだ認知されていない。しかし、幹細胞治療、再生医療の確立には、各種疾患・病態による生体内環境の変化が幹細胞に与える影響を把握しておくことが重要であると考えられる。更に、幹細胞機能障害を引き起こす疾患、病態因子が明らかとなれば、患者自身が有する内在性幹細胞を活性化し治療法開発にもつながると考えられる。

2. 研究の目的

iPS 細胞由来の機能細胞・組織の移植による再生医療の準備が進められているが、これまでに多様な組織・臓器より内在性幹細胞が分離・同定されていることから、移植対象患者において内在性幹細胞がなぜ十分に機能しないのかという疑問が湧いてくる。その答えの一つとして、ある種の疾患・病態においては幹細胞障害が生じるという仮説が考えられる。もしこの仮説が真実であれば、幹細胞による移植治療を行っても十分な効果が得られない場合があることを意味する。従って、幹細胞移植、再生医療に先立ち、各種疾患・病態が移植幹細胞に与える影響を把握しておくことは必須であると考えに至った。特に、糖尿病患者においては手術創の治癒遷延などが高頻度に認められ、組織再生能力の低下や組織接着過程の障害が示唆される。患者数の点からも、糖尿病病態が幹細胞移植治療に与える影響を詳細に評価する必要性が高いと考えられる。

本研究では臨床へのフィードバックに直結する成果を得るためにカニクイザルを利用する。本学動物生命科学センターではすでに、同一 MHC ハプロタイプを有するカニクイザル個体群を人工繁殖させ、コロニーの構築を進めている。本研究ではクローニングが容易である iPS 細胞の特徴を生かして、同一クローンの MHC ホモ・カニクイザル iPS 細胞を健常個体、および糖尿病個体あるいは病態因子負荷個体に移植することにより、糖尿病環境が与える生体内幹細胞機能への影響を可能な限り正確に定量評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 幹細胞治療が実用化されている現在、本研究では臨床応用に直結する成果を得るた

めに、実験動物の中でヒトに最も近似するサルを利用する。本研究計画では、カニクイザルに食餌性負荷 (高脂肪高フルクトース食) を6ヶ月~1年間継続することにより、インスリン抵抗性を誘導して II 型糖尿病モデルを作出する。食餌性負荷のみでは不十分な場合、サイトカインの持続皮下投与 (皮下埋め込みポンプ使用) 等の薬剤負荷を併用する。インスリン抵抗性発症の確認には、月1回の血液検査 (空腹時血糖値、インスリン値、HbA1c、グリコアルブミン) に加え、3ヶ月に1度の糖負荷試験 (ivGTT 法) を実施する。

(2) メタボリック症候群、肥満症を含め、糖尿病などインスリン抵抗性を有する患者症例には、脂肪組織の増大を認めない場合でも異所性脂肪沈着が亢進しており、筋組織内にも多量の脂肪細胞が出現することが知られている。この現象に関して、iPS 細胞に転写活性レポーターとして pGL4.26 ルシフェラーゼ発現遺伝子を組み込む。プロモーター認識配列の差異により本研究計画では以下の2種類を準備する: (i) 脂肪細胞への分化活性定量目的には、コア転写因子 PPAR- γ の認識配列である PPRE (PPAR Response Element) 配列を、(ii) 筋細胞への分化活性測定目的には、コア転写因子 MyoD 遺伝子クローンを入手し、ピギーバックベクターのマルチプルクローニングサイトに組み込み、トランスポゼース共発現によりカニクイザル iPS 細胞に安定発現させる。形質転換した iPS 細胞は、発現標識として Venus 蛍光を示す。

(3) 1x10⁶ 個の iPS 細胞を丸底の 96 ウェルプレート (non-coating) で 1-2 日培養することにより、iPS 細胞塊を得る。これを生理食塩水で 2 回洗浄後、18G 針内に吸い取り、皮下あるいは筋内に注入する。注入 (移植) 部位は原則として上腕背側皮下、あるいは上腕 2 頭筋内とし、剃毛後に刺入点を India-ink でマークしておく。一定期間後に刺入部皮下組織、あるいは筋組織を部分切除し、1~2 mm 厚の組織切片とする。これを反応液中に浸潤させ、ImagEM・CCD カメラシステム (浜松フォトニクス) を取り付けた蛍光顕微鏡下で観察する。Venus 蛍光を有する移植細胞を含む切片を用いて、ルシフェリン (VivoGlo, Promega) を反応液に加え、生細胞における発光反応を定量する。同時に蛍光量を定量することで、移植細胞当たりの細胞分化活性 (発光量 (活性) / 蛍光量 (細胞数) の比) を定量評価する。引き続き、細胞増殖能・生存活性をレゾルフィン蛍光アッセイを用いて蛍光反応を定量測定する。

4. 研究成果

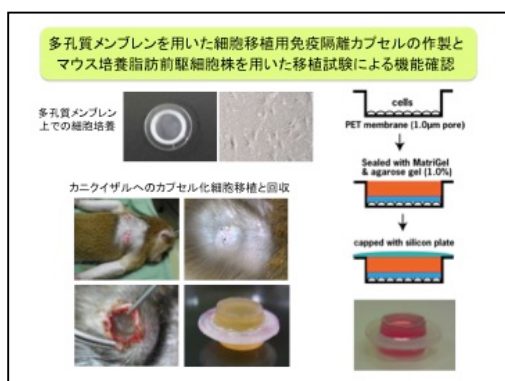
(1) 本研究は、糖尿病を含むインスリン抵抗性状態において幹細胞障害が合併するという仮説を生体内移植により検証するために、

免疫拒絶反応を生じない幹細胞移植システムを樹立する必要がある。そこでまず、同一MHC ハプロタイプをホモに有するカニクイザル個体由来の皮膚繊維芽細胞に SOX2、KLF4、OCT4、NANOG の4因子を導入し、iPS細胞を樹立することに成功した。

(2) 樹立したカニクイザル iPS 細胞を用いた幹細胞機能評価を培養条件下で行った。iPS細胞の培養液中にインスリン抵抗性惹起因子 IL-1beta、IL-6、TNF-alpha、Resistin、adiponectin 等のサイトカインあるいはアディポカインを24時間附置した結果、IL-1beta 附置ではiPS細胞から脂肪細胞への分化誘導において、脂肪細胞特異的遺伝子の発現低下が認められた。しかし、アディポカインの1つであるアディポネクチン附置では有意な変化は認められなかった。更に、内因性未分化マーカーの発現レベルを検討した結果、サイトカインおよびアディポカインの附置では有意な変化は認められなかった。従って培養条件下では、特定のサイトカインが幹細胞機能、特に分化能に障害を与えることが示唆された。

(3) カニクイザル iPS 細胞を健常および糖尿病カニクイザル個体へ生体内移植することにより、糖尿病病態因子による *in vivo* での影響評価を実施する予定であった。生体内移植実験では移植免疫を回避するために、主要組織適合性抗原(MHC)ホモ個体由来細胞より樹立した iPS 細胞を、同一 MHC ホモあるいはヘテロ個体 (レシピエント) に移植する方法を採用した。ただし、MHC ホモ個体は1頭しか存在しないため、同個体より採取した精液を用い、人工繁殖によって同一 MHC をヘテロに有するレシピエント個体の作出を試みた。通常のカニクイザル雌個体より腹腔鏡下に卵子を採取し、人工授精によって2細胞への卵割を確認後、仮親子宮への胚移植を実施した。その結果、妊娠成立個体を少数確認することができたが、すべて死産したために MHC ヘテロ個体を作成するには至らなかった。

(4) カニクイザル MHC 個体の作出に代わる移植免疫回避の代替法として、細胞移植用免疫隔離カプセルの開発を進めた。



1 µm径の多孔質ポリエチレンテレフタレート製メンブレン上に iPS 細胞を接着培養し、マトリゲル、アガロースゲルによって封入された移植用カプセルを作成することに成功した。

(5) カニクイザル背部肩甲骨下部の皮下脂肪組織内に iPS 細胞カプセルの生体内移植を実施した。移植用カプセルの強度上の問題により2週間以上の生体内移植は困難であったが、健常カニクイザル脂肪組織内に移植された iPS 細胞では脂肪細胞特異的遺伝子の発現亢進を認めた。II型糖尿病モデルとして、6頭のカニクイザルに24週間の高脂肪食負荷を実施後に糖負荷試験(ivGTT)による判定を行ったところ、顕性糖尿病には至らなかったが2頭に耐糖能障害の出現を認めた。

(6) 健常およびインスリン抵抗性個体に対する iPS 細胞カプセル移植の結果、インスリン抵抗性個体に移植した iPS 細胞は健常個体に移植した iPS 細胞に比べ、脂肪細胞特異的遺伝子マーカーの発現レベルが減少していた。同時に、内因性未分化因子の遺伝子発現が亢進していたことから、インスリン抵抗性を有する生体内環境下では、幹細胞分化能が抑制される可能性が示唆された。今後、インスリン抵抗性個体数を増やした確認実験を要する。

上記同様に、生体内幹細胞から血管内皮前駆細胞への分化にも抵抗性に働くと考えられ、HMG-CoA還元酵素阻害薬によるラット大動脈血管内皮機能の改善効果を見出した。組織内幹細胞機能との関連については更に追加検討を要する。また、iPS細胞から誘導した脂肪細胞分化過程の解析により、GPR120以外にGPR43の発現レベルが有意に変動することを見出した。脂肪細胞におけるGPR43機能についてはマウス脂肪細胞を用いた解析の結果、インスリン代謝作用に対して抑制的作用を有することが判明した。

5. 主な発表論文等 (計6件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

① Okamura T, Tawa M, Gedday A, Shimosato T, Iwasaki H, Shintaku H, Yoshida Y, Masada M, Shinozaki K, Imamura T. : Effects of atorvastatin, amlodipine, and their combination on vascular dysfunction in insulin-resistant rats. J Pharmacol Sci., 124: 76-85, 2014. (査読有)

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/124/1/124_13178FP/_article

② Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, Terasawa K, Kashihara D, Hirano K, Tani T, Takahashi T, Miyauchi S, Shioi G, Inoue H, Tsujimoto G. : The gut

microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nature Commun.*, 4: 1829-1840, 2013 (査読有)
DOI: 10.1038/ncomms2852.

③ Tawa M, Shimosato T, Gedday A, Imamura T, Okamura T. : Influence of hypoxia on endothelium-derived NO-mediated relaxation in rat carotid, mesenteric and iliac arteries. *Pharmacology*. 2013; 91: 322-30. (査読有)
DOI: 10.1159/000351706.

④ Shimosato T, Gedday A, Tawa M, Imamura T, Okamura T. : Chronic Administration of Nicotine-Free Cigarette Smoke Extract Impaired Endothelium-Dependent Vascular Relaxation in Rats via Increased Vascular Oxidative Stress *J Pharmacol Sci.*, 118: 206-214, 2012 (査読有)

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/118/2/118_11187FP/_article

⑤ Tawa M, Fukumoto T, Ohkita M, Yamashita N, Gedday A, Imamura T, Ayajiki K, Okamura T, Matsumura Y. : Contribution of nitric oxide in big endothelin-1-induced cardioprotective effects on ischemia/reperfusion injury in rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 57: 575-578, 2011 (査読有)

DOI:10.1097/FJC.0b013e31821325ad.

⑥ Tawa M, Yamamizu K, Gedday A, Shimosato T, Imamura T, Ayajiki K, Okamura T. : Impairment by hypoxia or hypoxia/reoxygenation of nitric oxide-mediated relaxation in isolated monkey coronary artery: the role of intracellular superoxide. *J Pharmacol Sci.*, 116: 188-196, 2011 (査読有)

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/116/2/116_11031FP/_article

[学会発表] (計6件)

① 発表者: 今村 武史、演題名: Glycogen Synthase Kinase-3 beta differentially modifies early and late stages of adipogenesis from the pluripotent stem cells to mature adipocytes. 第87回日本薬理学会総会 (2014年3月20日、仙台国際センター)

② 発表者: 今村 武史、演題名: Effects of diabetic conditions on the stem cell functions transplanted in diabetic monkeys. キーストン・シンポジウム (2014年1月14日、Keystone 米国コロラド州)

③ 発表者: 田和 正志、演題名: インスリン抵抗性ラットにおける血管機能障害に及ぼす

アトロバスタチンおよびアムロジピンの併用効果 第13回日本NO学会学術集会 (2013年6月28日、沖縄県医師会館)

④ 発表者: 今村 武史、演題名: Effects of insulin resistance on adipogenic differentiation of the stem cells transplanted in cynomolgus monkeys. 第86回日本薬理学会総会 (2013年3月22日、福岡国際会議場)

⑤ 発表者: 今村 武史、演題名: Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 beta enhances adipogenesis via the stimulation of glucose transport in mesenchymal stem cells. キーストン・シンポジウム (2013年2月26日、Keystone 米国コロラド州)

⑥ 発表者: 今村 武史、演題名: Activity of fat cell differentiation in diabetic conditions. 第85回日本薬理学会総会 (2012年3月16日、国立京都国際会議場)

[産業財産権]

特記なし

[その他]

ホームページ

<http://www.shiga-med.ac.jp/pharm/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 武史 (IMAMURA, TAKESHI)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00552093

(2) 研究分担者

鳥居 隆三 (TORII, RYUZOU)
滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授
研究者番号: 50106647

(3) 連携研究者

吉田 善紀 (YOSHIDA, YOSHINORI)
京都大学・iPS細胞研究所・講師
研究者番号: 20447965

岡村 富夫 (OKAMURA, TOMIO)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70152337

田和 正志 (TAWA, MASASHI)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号: 10510274