

海外共同研究報告書

(WEB サイト公開用)

2024 年 12 月 21 日

氏 名	青木 那菜子
所 属	医学部医学部 5 年
研 究 先	イタリア トリエステ大学
期 間	9 月 16 日~11 月 22 日
研 究 課 題	チオプリン誘発性膵炎の病理モデルにおける免疫機構の役割

内 容

私は今回トリエステ大学にて 3 か月、iPS 細胞を用いたチオプリン誘発性膵炎の病態の解明を目的とした研究に参加させて頂きました。

チオプリン製剤は、体内で代謝されることにより細胞毒性を発揮するプロドラッグであり、炎症性腸疾患を含む様々な治療に用いられています。しかし、その副作用の一つでありクローン病 (CD) 患者の 3~5%が罹患しているという、チオプリン誘発性膵炎 (TIP) のメカニズムは未だ解明されていません。現在までにいくつかの仮説が提示されていますが、本研究では、その中でも特に免疫系と TIP との関わりを明らかにすることに焦点を当てています。具体的には、induced pluripotent cells (iPS)細胞由来の膵外分泌細胞の条件培地 (CM) と、活性化型 THP-1 細胞を用いて、免疫細胞と膵外分泌細胞が放出する炎症性因子との相互作用を調査することを目的としていました。iPS 細胞は薬剤誘発性副作用を解明するにあたり、個人の遺伝的特性を維持しながら臓器モデルを再現できる点において有用なツールとなります。

以下に 3 か月間で行った実験の概要について述べます。私はその中でも特に、iPS 細胞や THP1 細胞の解凍・継代・培地交換といった基本的なお世話に加え、RNA 抽出や real time PCR、MTT assay といった手技も経験させて頂きました。

・手法

細胞ライン

① iPS 細胞由来の膵外分泌細胞 (非 tip 患者)

本研究では、2 名の CD 患者の末梢血単核細胞 (PBMCs) から再プログラムされた 2 つの iPS 細胞株を使用しました。これらの膵外分泌細胞への分化終了後、膵外分泌細胞を Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 培地で 48 時間培養しました。その後、培地を

遠心分離にかけ、上清をろ過しました。こうして得られた CM は後の実験で用いるため、 -80°C で保存しました。

② THP-1 細胞株と M0 マクロファージへの分化

ヒト単球系細胞株 THP-1 は RPMI 培地で培養しました。THP1 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、その陽性対照として、LPS で 3 時間刺激し活性化させました。また、フォルボール 12-ミリスチン酸 13-酢酸エステル (PMA) とともに 48 時間インキュベートし M0 へと分化させ、その陽性対照として、20 ng/ml の IFN および 10 pg/ml の LPS で 24 時間刺激することで M1 表現型に極性化させました。

RNA 抽出と qPCR

THP-1 細胞、M0・M1 マクロファージの全 RNA を抽出し濃度と純度を測定したのち、逆転写反応を行うことで cDNA を得ました。最終的に SYBR Green を用いてリアルタイム PCR 実施し、M1 型の典型的なマーカーである IL1b、IL6、TNFa の発現量を測定しました。

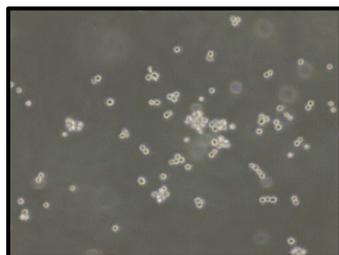
MTT アッセイ

MTT アッセイは、THP-1 細胞および M0 マクロファージに対する、2 つの iPS 細胞由来の腺外分泌細胞から得られた CM の細胞毒性効果を定量化するために行いました。細胞を 7 種類の異なる濃度の CM で 48 時間処理し、最後の 4 時間は MTT 試薬と共にインキュベートしました。最終的に MTT のレベルを測定し評価を行いました。

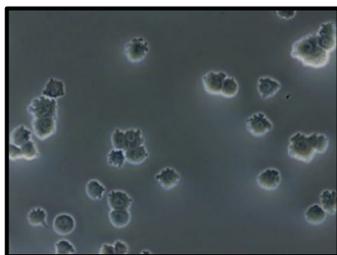
・結果

① THP-1 細胞および M0、M1 マクロファージの特徴

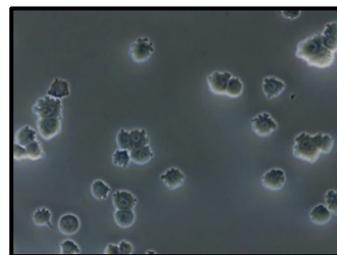
細胞形態は、マクロファージへの分化過程で浮遊型から接着型へと変化し、細胞が拡大しました。さらに、一部の細胞はマクロファージにより特徴的な紡錘形の形態を示しました。



THP1



M0



M1

② Real time PCR

IL1b、TNFa、および IL6 の発現は、陰性コントロールとして使用された THP-1 細胞株と比較して、活性型細胞で増加しました。

③ MTT アッセイ

高濃度の CM は THP1 細胞および M0 マクロファージの生存率を低下させましたが、低濃度 (20-30%) の CM は細胞の生存率を維持することが分かりました。

・結論

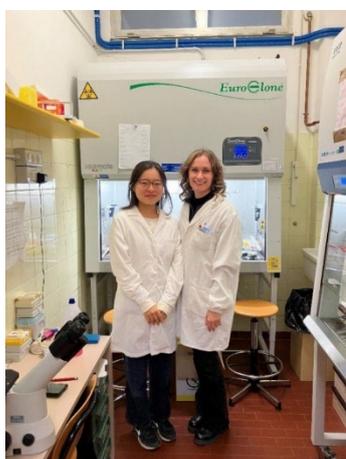
私に関与した部分は予備実験でした。まず、非 TIP 患者の iPS 細胞株を膵外分泌細胞に分化させ、その CM を収集することに成功しました。その間、膵炎の炎症過程に関与する免疫系細胞の不死化モデルとして使用される THP-1 細胞を、M0 および M1 マクロファージに分化させるプロトコルをいくつか試しました。結果として、活性型は光学顕微鏡および qPCR で特徴づけられ、分化に成功したことを確認できました。

膵外分泌細胞の CM と、THP-1 単球およびその活性化型にて行った MTT アッセイでは、細胞の生存率を維持するのに最適な濃度をスクリーニングしました。その結果、低濃度の CM が細胞の生存率を維持することが分かりました。この濃度は今後の主実験において、TIP 患者 iPS 細胞由来の膵外分泌細胞モデルにて、チオプリン製剤の存在下で免疫細胞の反応がどのように変化するかを調べるために用いられる予定です。

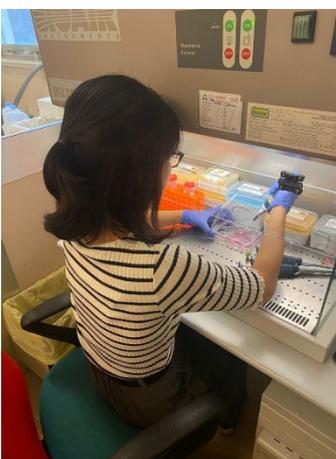
私が参加させて頂いたプログラムを担当していた PhD の学生は、私の質問に丁寧に答えて下さり、プロトコルも紙で頂くだけでなく具体的に説明して下さいたため、安心して実験に参加していくことができました。ただ、実験以外の面でのコミュニケーションに関しては正直なところ最初は、難しく感じていました。英語に自信がなく、またイタリア語での会話に割り入っていくのも勇気が必要であったためです。しかし、この問題を克服しようと自分なりに努力し、最終的には友達を作ることで乗り越えることができました。この経験を通じて、その人の国や文化に興味を持ち、積極的に話しに行くことが、海外の人と友達になるために重要であることを学びました。

イタリアでの生活はシェアルームで、スウェーデンやポーランドの学生と交流がありました。メンバーが入れ替わることの負担はありましたが、様々なバックグラウンドを持つ学生と話せたのは貴重な経験となりました。

このイタリアでの3か月の留学という経験を通して得たことは主に二つあります。まず、研究者が研究を行う際に踏むステップを臨床医学の場でも応用し、論理的な考えを意識したいと思うようになりました。次に、外国での生活や英語でのコミュニケーションを通し以前より自分に自信が持てるようになりました。この経験を基に、これからも新しいことに果敢に挑戦し自己実現を達成しつつ、社会に貢献するために何ができるか、自分の役割を模索し続けたいと考えています。最後になりましたが、この貴重な機会にご尽力くださった田中先生をはじめとする全ての先生方、そして大きな支援をくださったバイオメディカル研究所の皆さまにこの場をおかりし、心から感謝申し上げます。ありがとうございました。



お世話になった Phd の学生、アレッシアさんと



実験を行っているところ



モデナにて



ラボの皆さんと aperitivo