

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04276

研究課題名（和文）新規デバイスおよびコーティング法を用いたバイオ人工膵島開発

研究課題名（英文）Development of bioartificial pancreatic islets using a novel device and coating method

研究代表者

霜田 雅之（Shimoda, Masayuki）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・膵島移植プロジェクト長

研究者番号：40640529

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：生体適合性の高いポリエチレングリコール結合脂質（PEG脂質）と分岐型PEG誘導体などを用いて膵島表面をコーティングすることにより超薄層構造のコーティング化膵島の実現を目指した。両親媒性ポリマーであるPEG脂質を細胞表面にのみ導入して、そのミセル状分子を細胞表面上で、分岐型PEG誘導体と反応させることで、表層にのみ薄膜の形成が可能になった。PEG脂質と分岐型PEG誘導体の条件を検討したところ、最適な条件が見つかった。カプセル化したブタ膵島を糖尿病化マウスに移植してグラフトの機能、安全性評価を行った。移植後3か月までグラフトに起因する重篤な有害事象は認めず、3か月間血糖値の正常化する個体を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のアプローチは多くの1型糖尿病患者、さらに日本人に多いインスリンが不足するタイプの2型糖尿病患者の根治治療につながる。ドナー不足の問題が解消され、免疫抑制剤が不要になれば安全性が高いのみならず医療コストも低く、社会に与えるインパクトが大きい。さらに本研究のコーティング・カプセル技術はiPS細胞由来膵島などの再生医療にも応用可能である。一方、本研究は異種移植・再生医療の実用化を目指すものであり、最先端のフロンティア領域である。

研究成果の概要（英文）：An ultra-thin coating islet structure was achieved by coating the surface of the islet with biocompatible polyethylene glycol-bound lipids (PEG lipids) and branched PEG derivatives. The optimal conditions for the PEG lipid and the branched PEG derivative were investigated and found. Encapsulated porcine pancreatic islets were transplanted into diabetic mice to evaluate the function and safety of the graft. There were no serious adverse events attributable to the graft until 3 months after transplantation, and individuals with normalized blood glucose levels for 3 months.

研究分野：膵島移植

キーワード：バイオ人工膵島 1型糖尿病 膵島移植 ランゲルハンス島

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病に対する移植治療：膵島移植は近年 1 型糖尿病に対する細胞治療として確立されつつあるが、ドナー不足が大きな問題である。加えて、移植後、一生免疫抑制剤を服用する必要があり、その副作用やコストが問題である。

バイオ人工膵島：近年、次世代糖尿病治療としてブタ膵島を用いてカプセル等で被覆したバイオ人工膵島が研究されている。異種移植であり臨床応用へのハードルは高いと考えられがちだが、(株)大塚製薬工場の子会社である DIATRANZ OTSUKA Ltd. が、近年ニュージーランド政府の承認のもと臨床治験を実施し、安全性の確認及び有効性の示唆が論文発表され世界的に注目されている。このような状況の中、日本でも再生医療等安全性確保法が施行され、2016 年には「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」が改訂されたことにより、異種移植を行う法整備が整った。

バイオ人工膵島には以下の特徴がある。

1. 細胞源として大量入手可能なブタ膵島を用いてドナー不足を解消。iPS 細胞由来再生膵島も使用可能。
2. 免疫細胞を通さない半透膜やゲルでデバイスを作成し、さらに表面コーティングして移植することにより、免疫抑制剤が不要。
3. グラフト機能低下時や腫瘍化した際に、デバイスやカプセルを回収除去でき、再移植も可能。これらにより、ドナー不足と免疫抑制という 2 大問題を一気に解決し、多くの糖尿病患者への応用が期待される。ただし現在のバイオ人工膵島のグラフト機能は低い。原因として、カプセル表面の線維化などで内部の酸素や栄養素が不足すること、カプセルの免疫・炎症防御が不完全なこと、内部の膵島の品質が一定でないことの 3 つがあげられる。

2. 研究の目的

糖尿病に対する全く新しい移植療法としてバイオ人工膵島を開発する。膵島移植の課題は、ドナー不足、免疫抑制剤の副作用であるが、本研究でこれらの解決を目指す。すなわち、ブタ膵島を用いることによりドナー不足を解決し、コーティングした免疫隔離カプセルを用い免疫抑制剤を不要とする。これまでのカプセル化膵島は、移植後線維化を完全には防げず長期的な機能低下が問題であった。本研究では全く新しいコンセプトのコーティング・素材技術を用いて線維化を長期間抑制するデバイスを開発し、さらに高品質の安定したブタ膵島を使用することで実用可能なバイオ人工膵島を開発する。

3. 研究の方法

in vitro 実験とマウス移植実験でカプセル化膵島の評価を行い、次に中動物移植実験で検証する。

平成 29 年度 ブタ膵島、インスリン産生細胞株等を用い、デバイスとして複数の素材、複数のポリマーの組み合わせを比較して最適なコーティング・カプセル法を開発する。in vitro 評価および糖尿病マウスに移植してその機能評価を行う。並行して最適なブタ膵島分離法を開発する。

平成 30 年度 前年度の結果を基に引き続きブタ膵島等を用いて最適なデバイスを用いたバイオ人工膵島を開発する。in vitro での評価および糖尿病マウスに移植してその機能評価を行う。平成 31 年度 マウス移植実験で最適化した「バイオ人工膵島」の中動物（サルまたはミニブタ等）への移植実験を行い、有効性と安全性を評価する。

・ブタ膵島等を新規デバイスに封入したバイオ人工膵島の作成と評価

前年度の結果を基に、ブタ膵島およびその他のインスリン産生細胞をコーティング・カプセル化し、バイオ人工膵島を作成する。In vitro 評価を行い、最適化したバイオ人工膵島を作成する。

・バイオ人工膵島の糖尿病モデルマウスへの移植

バイオ人工膵島を糖尿病にしたマウスに移植する。グラフトの機能、安全性評価を行う。安全性評価項目には、細胞の毒性、腫瘍化の有無、炎症反応、免疫に及ぼす影響、細胞の遊走性、あとで移植片を除去可能かどうか、追加移植可能か、併用する薬剤の副作用、感染症の有無など多岐にわたるが、これらの検証を行う。移植後観察期間は 1～3 ヶ月を基本とし、短～中期的な効果と安全性を検証する。

4. 研究成果

カプセル化方法の開発

本研究におけるカプセル化方法 (Fig. 1) の大きな特徴は、実質体積変化が起きず、免疫系から細胞を保護する事ができるカプセルを作成できる点である。PEG 脂質を PBS に溶解させると PEG 脂質溶液内ではミセルが形成される。PEG 脂質溶液内で形成された多数のミセルを過剰量のポリマーで固定する事で実質体積変化が起きない免疫隔離膜を作成した。免疫隔離機能を有する且つ、数ミクロンの超薄膜を実現する為には積層過程を繰り返す必要があった。そこで、モデル細胞として、ヒト赤血球とインスリン産生細胞を用いて検討した。

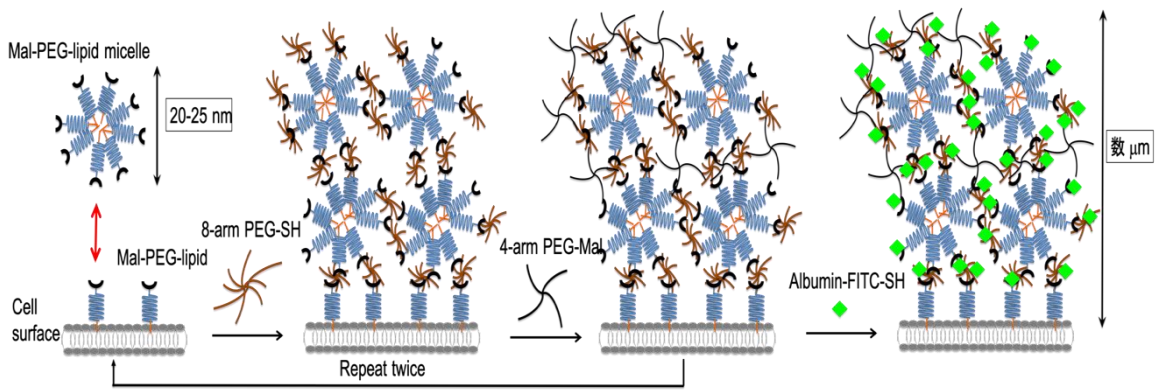


Fig. 1 高分子薄膜の積層方法

まず、Mal-PEG-conjugated phospholipid (Mal-PEG-lipid, maleimidyl polyethyleneglycol-conjugated phospholipid) (Fig. 2) を以下のように合成した。N-Hydroxysuccinimidyl- ω -maleimidyl polyethylene glycol (200 mg, NHS-PEG-Mal, Mw: 5000, NOF Corporation, Tokyo, Japan) と triethylamine (50 mL, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) と 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylethanolamine (20 mg, DPPE, NOF Corporation) を dichloromethane (Sigma-Aldrich Chemical Co) に溶解させ、48 時間室温でかき混ぜた。沈殿後、Mal-PEG-lipid は白色粉末として得られた (190 mg, 収率 80%)。予め、採取したヒト全血から白血球、血小板、血漿を EDTA 入り PBS と遠心分離を数回繰り返し、取り除いておく。細胞 (200 μ L, 7.8×10^9 cells/mL) を Mal-PEG-lipid (100 μ L, 50 mg/mL in PBS) と混合させ、穏やかに攪拌を行い、氷上で 30 分間静置した。その後、8-arm PEG-SH (100 μ L, 5 mg/mL, in PBS, pH 7.4; hexaglycerol octa(mercaptoethyl) polyoxyethylene, MW: 20 kDa, NOF Corporation) (Fig. 3) を添加し、即座に激しく攪拌を行い、5 分間氷上で静置した。PBS containing bovine serum albumin (BSA; 10 mg/mL, Sigma-Aldrich Chemical Co.) (BSA/PBS) を加え、遠心分離する事で細胞を 2 回洗った。その後、4-arm PEG-Mal (100 μ L, 50 mg/mL, in PBS, pH 7.4; pentaerythritol tetra[3-(3-maleimido-1-oxopropyl)amino]propyl}-polyoxyethylene, MW: 40 kDa, NOF Corporation) を加え、穏やかに攪拌を行い、氷上で 5 分間静置した。その後、BSA/PBS で細胞を 2 度洗った (積層工程 1 回のサンプル)。膜厚を厚くするために、この工程を繰り返した。細胞に Mal-PEG-lipid (100 μ L, 50 mg/mL in PBS) を加え、穏やかに攪拌を行い、氷上で 5 分間静置した。細胞懸濁液に 8-arm PEG-SH 溶液 (100 μ L, 5 mg/mL, in PBS) を加え、即座に激しく攪拌を行い、5 分間氷上で静置した。その後、BSA/PBS で細胞を 2 度洗った。4-arm PEG-Mal 溶液 (100 μ L, 50 mg/mL, in PBS) を添加し、穏やかに攪拌を行い、氷上で 5 分間静置した。その後、BSA/PBS で細胞を 2 度洗った (積層工程 2 回のサンプル)。更に、膜厚を厚くするために、この工程を繰り返した。細胞に Mal-PEG-lipid (100 μ L, 50 mg/mL in PBS) を加え、穏やかに攪拌を行い、氷上で 5 分間静置した。赤血球懸濁液に 8-arm PEG-SH 溶液 (100 μ L, 5 mg/mL, in PBS) を加え、即座に激しく攪拌を行い、5 分間氷上で静置した。その後、BSA/PBS で細胞を 2 度洗った。4-arm PEG-Mal 溶液 (100 μ L, 50 mg/mL, in PBS) を添加し、穏やかに攪拌を行い、氷上で 5 分間静置した。その後、BSA/PBS で細胞を 2 度洗った (積層工程 3 回のサンプル)。その後、それぞれのサンプルに以下のように合成した Albumin-FITC 溶液 (20 μ L, 4.0 mg/mL) を添加し、穏やかに攪拌を行い、氷上で 5 分間静置後、BSA/PBS で細胞を 2 度洗った。

Albumin-FITC は、予め Albumin-FITC 溶液 (10 mg/mL, 1.2 mL, Sigma-Aldrich) と Traut's reagent (10 mg/mL, 25 μ L, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) から作製した。その溶液を 1 時間室温で穏やかに攪拌した。その後、Thiolated albumin (albumin-SH) は spin column (Thermo Fisher Scientific) で精製した。

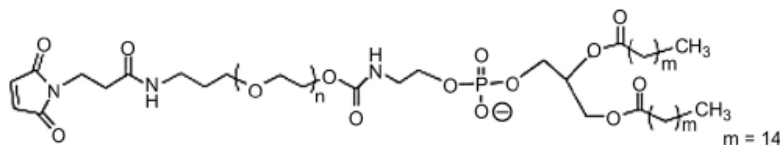


Fig. 2 Mal-PEG-lipidの構造式

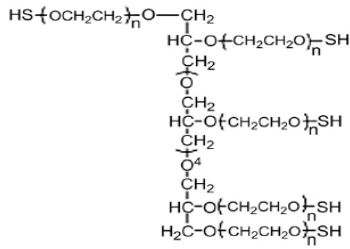


Fig. 3 8-arm PEG-SHの構造式

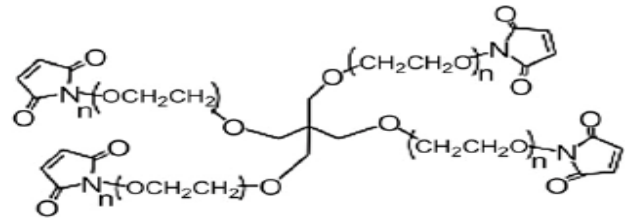


Fig. 4 4-arm PEG-Malの構造式

本研究で行った積層回数による超薄膜カプセルの変化では、20 nm～25 nm のミセルを積層過程でより多く取り込んだ方が長期的に安定であった。また、細胞の径に対してミセルの径は非常に小さいので、実質的な体積変化が起きない長期安定的な薄膜が形成されたと考えられた。また、10、20、40 kDa の異なる分子量の 4-arm PEG-Mal を用いたカプセル化細胞（赤血球）を 44 日間観察した結果、40 kDa の 4-arm PEG-Mal が最も強い蛍光を保持していることが明らかになった。また、インスリン分泌細胞である beta-TC-6 も同様の結果であった。

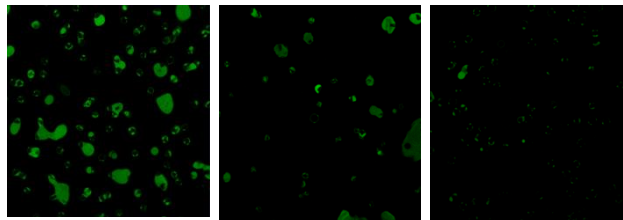


Fig. 2 架橋剤の分子量による影響 (Day 28、左から PEG 鎖：40 kDa、20 kDa、10 kDa、赤血球)

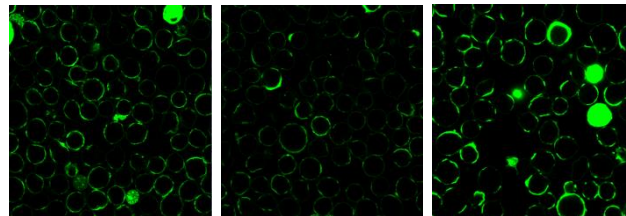


Fig. 3 架橋剤の分子量による影響 (Day 0、左から 40 kDa、20 kDa、10 kDa、beta-TC-6 細胞)

4 分岐型高分子の分子量はスペーサーの長さに関係していて、分子量が大きいとスペーサーが長くなる。つまり、最もスペーサーが長い 40 kDa の 4-arm PEG-Mal の反応性が高く、より多くの架橋箇所が存在したと考えた。また、このカプセルに結合したヘパリンは活性を持っていたことも確認でき、他の生理活性物質との高い適合性を示した。

超薄膜カプセルの作成には 40 kDa の 4-arm PEG-Mal で構成された超薄膜が最も長期安定的であった。また、このカプセルは生理活性物質と高い適合性があったので、その物質由来の新たな機能を持つ事ができると期待される。

動物実験

移植用の糖尿病動物モデルについては、マウスモデルを確立した。ブタ膵島分離法をさらにカプセル・コーティング化に最適な膵島となるように改良を行った。高純度、被膜が保たれること、膵島細胞同士の分離が起きないこと、外分泌組織から遊離していることなどの点を改善した。in vitro におけるインスリン分泌を確認し、さらに糖尿病免疫不全マウスの腎被膜下に移植して血糖値が改善することを確認した。カプセル化したブタ膵島については、まずハイドロゲルポリマーに包埋したブタ膵島を糖尿病

化マウスに移植してグラフトの機能、安全性評価を行った。安全性については、細胞の毒性、腫瘍化の有無、炎症反応、免疫に及ぼす影響、細胞の遊走性、あとで移植片を除去可能かどうか、追加移植可能か、併用する薬剤の副作用、感染症の有無などを評価した。移植後3か月までグラフトに起因する重篤な有害事象は認めなかった。移植後のグラフト除去については一部は困難であった。移植効果については、3か月間血糖値の正常化する個体を認めた。ただし個体間にはばらつきを認めたため、その検証が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimoda Masayuki	4. 巻 Edited Volume
2. 論文標題 Pig Islet Transplant	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Xenotransplantation - Comprehensive Study	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5772/intechopen.88324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shota Toda, Artin Fattah, Kenta Asawa, Naoko Nakamura, Kristina N. Ekdahl, Bo Nilsson, and Yuji Teramura	4. 巻 10(11)
2. 論文標題 Optimization of Islet Microencapsulation with Thin Polymer Membranes for Long-Term Stability	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Micromachines (Basel)	6. 最初と最後の頁 755
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi10110755	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kristina N Ekdahl, Karin Fromell, Camilla Mohlin, Yuji Teramura, and Bo Nilssona	4. 巻 20(1)
2. 論文標題 A human whole-blood model to study the activation of innate immunity system triggered by nanoparticles as a demonstrator for toxicity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Technol Adv Mater	6. 最初と最後の頁 688-698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14686996.2019.1625721	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimoda M, Matsumoto S	4. 巻 2(2)
2. 論文標題 Islet xenotransplantation for the treatment of type 1 diabetes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 OBM Transplantation	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21926/obm.transplant.1802008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makoto Noiri, Kenta Asawa, Naoya Okada, Tomonobu Kodama, Yuichi Murayama, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, Kristina N Ekdahl, Bo Nilsson, and Yuji Teramura	4. 巻 107, 8
2. 論文標題 Modification of human MSC surface with oligopeptide-PEG-lipids for selective binding to activated endothelium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biomed Mater Res Part A	6. 最初と最後の頁 1779-1792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.36697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue T, Ishizaka Y, Sasaki E, Lu J, Mineshige T, Yanase M, Sasaki E, Shimoda M	4. 巻 Feb 21
2. 論文標題 Thioacetamide-induced hepatic fibrosis in the common marmoset	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Anim	6. 最初と最後の頁 321-327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.17-0156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	寺村 裕治 (Teramura Yuji) (10365421)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授 (12601)	
連携研究者	石原 一彦 (Ishihara Kazuhiko) (90193341)	東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (12601)	