

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10527

研究課題名(和文) ヒト型糖尿病ブタモデルの作出とガラス化凍結保存膵島細胞シートの移植後の検証

研究課題名(英文) Production of mini-pig models exhibiting phenotypes resembling those of human diabetes mellitus and investigation of the effects of islet cell sheets post-transplantation

研究代表者

長屋 昌樹 (Masaki, NAGAYA)

明治大学・研究・知財戦略機構(生田)・特任教授

研究者番号：90329300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：重症の心不全患者に対し心筋細胞シート治療の医療保険が承認された。今後、細胞シートの技術は多岐の疾患に応用されるであろう。本申請は(A)配偶子卵管内移植法(GIFT法)によるヒトの体重に見合った“ヒト型糖尿病ミニブタ”の作出、(B)ガラス化凍結にて保存可能な膵島シートの作製、(C)糖尿病ブタへ鏡視下手術による膵島シートの移植を行い、移植後の膵島シートの機能の検証、を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病患者には、生活の質を改善させるべく膵ランゲルハンス島(膵島)移植療法が行われている。2011年、米国では8000件の心停止ドナーがあったにもかかわらず、僅か1562人の膵臓しか取り出されていない。バーチャル・クロスマッチ陰性の患者が待機リストにいなかったことが主な理由である。膵臓が簡便、かつ高品質で banking できれば、80%のドナー膵は無駄にならず、細胞の移送もできるなど、移植の柔軟性は高くなる。糖尿病治療の分野においても、膵島シートの研究は進んでいるが、評価できるモデル、移植法も不明である。糖尿病治療の効果を正当に評価できる“モデル”の作出が不可欠である。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that transplantation of islet cell sheets would be a feasible, safe, and therapeutically effective approach for the treatment of diabetes mellitus (DM). Islet cell sheet was created from transgenic (tg) pigs with a pancreas-specific expression of green fluorescent protein.

Besides, we have previously generated transgenic cloned pig models for maturity-onset diabetes of the young type 3 (MODY3). The tg pigs carrying a dominant-negative HNF1 gene developed complications similar to those in human DM patients, such as diabetic retinopathy, cataract, and nodular lesions in the renal glomeruli. However, rearing these pigs is expensive and technically difficult. As the micro-mini pigs handling is easier than that of wild type pigs, gamete intrafallopian transfer (GIFT), a tool of assisted reproductive technology against infertility in humans, was used to produce mini pig models for investigating human DM and the efficacy of islet cell sheet implantation therapy.

研究分野：一般外科

キーワード：糖尿病 膵島移植 細胞シート 細胞凍結 細胞移植 異種移植 鏡視下手術 膵島シート

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病患者(以下、本症)には、生活の質を改善させるべく膵ランゲルハンス島(以下、膵島)移植療法が行われている。一方で、2011年、米国では8000件の心停止ドナーがあったにもかかわらず、僅か1562人(20%)の膵臓しか取り出されていない。バーチャル・クロスマッチ陰性の患者が待機リストにいなかったことが主な理由である。膵島が簡便、かつ高品質で banking できれば、80%のドナー膵は無駄にならず、主要組織適合遺伝子複合体の適合率は圧倒的に上昇し、細胞の移送もできるなど、移植の柔軟性は高くなる。ドナー膵島を安定して保存でき、簡便に移植できる技術が待ち望まれている。重症の心不全患者に対し心筋細胞シート治療の医療保険が承認された。今後、細胞シートの技術は多岐の疾患に応用されるであろう。糖尿病治療の分野においても、膵島を用いた細胞シートの研究は進んでいるが、一方で、膵島シートを正当に評価できるモデルはなく、さらには移植法は不明のままである。糖尿病治療の効果を正当に評価できる“モデル”があれば、膵島シートの機能の評価が可能となり、さらには、現在行われている膵島移植に必要な細胞数、工程、移植部位、免疫抑制剤の使用時の生殖能など、さまざまな検証も可能となる他、新規薬の評価などにも有用となる。

2. 研究の目的

(A) 配偶子卵管内移植法(GIFT法)によるヒトの体重に見合った“ヒト型糖尿病ミニブタ”の作出、(B) ガラス化凍結にて保存可能な膵島シートの作製、(C) 糖尿病ブタへ鏡視下手術による膵島シートの移植を行い、移植後の膵島シートの機能の検証、を目的とした。

3. 研究の方法

(A) GIFT法によるヒト型糖尿病ミニブタの作出: 我々はこれまでに出生後5ヶ月以内に腎臓の結節性病変、網膜症等、糖尿病に特異的な所見を呈す糖尿病モデルブタ(変異型ヒトHepatocyte Nuclear Factor 1(HNF-1) α transgenic (tg)ブタ)(Transgenic Research.2009;18:697-706, J Diabetes Complications. 2017 ;31:796-803.)を作出、精子の凍結保存にも成功している(J Reprod Dev. 2013;59:599-603.)。このHNF α tgブタの凍結精子を融解後、精子運動解析システムを用い、運動性、回転性等を指標に融解条件の検討を行った。マイクロミニブタ(富士マイクラ、静岡)に対しウマ絨毛性性腺刺激ホルモン、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)を投与しマイクロミニブタに発情を促した後、全身麻酔下で開腹、卵丘卵子複合体(COCs)を排卵前卵胞から吸引、あるいは卵管を上行性に灌流し、GIFT法を応用し、マイクロミニブタの卵管膨大部にHNF-1 α tgブタの精子とCOCs(3~6個/卵管)を媒精液と共に注入。適宜妊娠診断を行い帝王切開でヒトサイズ糖尿病ブタの胎仔を獲得した。

(B) ガラス化凍結にて保存可能な膵島シートの作製: 膵島分離は我々が作出したPancreatic and duodenal homeobox 1(Pdx-1)-Venus Tgブタ(J Reprod Dev. 2014;60:230-7.)の膵臓よりを行った(Pancreas. 2015; 44: 778-85.)。生体内をヘパリン化、ET-Kyoto液を大動脈から灌流した後に膵臓を摘出した。膵管よりコラゲナーゼを注入した膵臓を細切、Ricordi®チャンパーで機械的に組織を破壊し、濃度勾配法により膵島を分離。膵島は緑色発光しているため、簡易のスクープ下で膵島のみを回収、膵島はUltra-Low Attachment flask(Corning Incorporated, Corning, NY)で、CMRL1066(Corning Incorporated)を基本培地とした血清含有培養液にて培養した。膵島シートの作成は、我々がマウスの膵島でシートを作成した手法にて行った(J Surg Res. 2018;227:119-129.)。簡潔に、膵島の分離を行った翌日にコラゲナーゼにて膵島を分散、温度感受性プレート(UpCell®、株式会社セルシード、東京)を数種のマトリックスでコーティング後、コンフルエントになるように播種した。シートは培養後、1週目に回収した。

膵島シートの機能の検証; 膵島シートの移植: 膵島シートの凍害保護剤による超低温保存を行う前に、作成した膵島シートの機能評価を行った。腹腔内にストレプトゾトシン(180mg/kg)を投与し、糖尿病化したICR SCIDマウス(350mg/dl以上)に、上述の方法で作成したブタ膵島シートを1)腹腔内移植群、2)肝前面貼り付け群、とし移植を行った。移植前、移植翌日より、連日、Glucocard™ G+meter(ARKRAY, Inc., 京都、日本)を用いて血糖の推移を追跡した。血糖の低下が認められなかった場合には開腹し、シートを肉眼的観察、引き続き、膵島シートを摘出、免疫組織学的検証を加えた。ブタの膵島シートの機能の評価に先立ち、まずはマウス膵島シートを作成し、マウス膵島シートの機能評価をin vitroならびに移植により行った。

(C) 糖尿病ブタへ鏡視下手術による膵島シートの移植を行い、移植後の膵島シートの機能の検証: 鏡視下手術による膵島シートの適切な移植方法、部位、機能の検証を行うべく、ブタに対しヒトの腹腔鏡に用いられるシステム、高速気腹装置(オリンパス、UHI-3)、内視鏡統合ビデオシステム(オリンパス、VISERA ProOTV-S7Pro)、高輝度光源装置(オリンパス、VISERA Pro. OLYMPUS CLV-S40Pro)、ビデオプリンター(オリンパス、Olympus OEP-3)、その他、トロッカー類、鉗子類を準備し、ブタでの腹腔鏡手術を行える準備、試験的な手術などを行った。

4. 研究成果

(A) ヒト型糖尿病ミニブタの作出: 3頭のマイクロミニブタに対し GIFT 法を行い、2頭の母体が妊娠、2頭から各々3頭の産仔を得た(図. 1)。4ヶ月齢の体重は野生型: 約 60kg、マイクロミニブタ: 約 8kg、であるのに対しヒト型糖尿病ミニブタは約 12kg であった。ヒト型糖尿病ミニブタの随時血糖は 400mg/dl を超えており、食後は約 600-800mg/dl まで上昇した。インシュリン値は、1ヶ月時: 0.30 μ U/ml (野生型: 6.8 \pm 1.8 μ U/ml)、4ヶ月時: 0.42 μ U/ml (野生型: 8.2 \pm 3.2 μ U/ml)と、ヒト型糖尿病ミニブタではインシュリンの分泌は認められなかった。ヒト型糖尿病ミニブタの組織に対する病理組織学的検査では免疫組織学的検証を行い、以下の結果を得た。膵臓ではインシュリン染色に対し陽性を示す細胞は認めなかった。肝臓に対する Oil red O 染色では脂肪肝の所見を認めた。腎臓に対するマッソントリクローム染色では結節性病変を示唆する所見を得た。眼球に対する肉眼的所見では水晶体に混濁が見られ、ヘマトキシリンエオジン染色では水晶体皮質領域全体に水晶体線維細胞の膨化と配列の乱れが観察された。

(B) ガラス化凍結にて保存可能な膵島シートの作製: 基礎検証でのマウス膵島シートは、1. β 細胞にまつわる遺伝子発現は膵島シート膵島に比べ有意に低下、2. β 細胞にまつわる遺伝子発現 *Pdx-1* のメチル化レベルは膵島と変わりなし、3. β 細胞にまつわるタンパク質の発現は膵島同様に正常、4. 糖尿病マウスへの膵島シートの移植では高血糖を改善できず、が判明した(J Surg Res. 2018; 227: 119-129.)。ブタ膵島のシートは作製可能で、*Pdx-1-Venus tg* ブタから膵島分離を行い、作成したシートは Venus による発光が確認できている(図. 2)。ブタ膵島シートに対する組織学的評価では NeuroD、*Pdx-1*、インシュリン、C-peptide、グルカゴンの発現は確認できたが、マウスでの結果と同様、ブタの膵島と比較ではそれらの発現は低下していた。また、ブタ膵島シートの糖尿病化した ICR SCID マウスへの移植では、膵島シートは生体内で安定的に生着し、移植部位で緑色発光をしていたが(図. 2)、高血糖の改善には至らなかった。我々はマウス膵島も安定的に凍結保存、そしてその凍結保存した膵島が機能することも確認し(Horm Metab Res. 2016 Aug;48(8):540-9.)、本手法を膵島シートへ応用する予定であったが、本結果を得たため膵島シートの凍結保存は断念した。

(C) 糖尿病ブタへ鏡視下手術による膵島シートの移植を行い、移植後の膵島シートの機能の検証: 同時に進行していた腹腔鏡手術を行うための麻酔濃度、体位、ポート位置、至適腹腔内圧、必要なデバイスの検証を行っていたが、ブタに対する鏡視下手術ではヒトの鏡視下における中難易度手術が行える状態まで到達した。

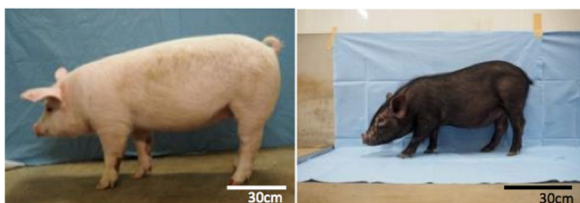


図 1. 配偶子卵管内移植法 (GIFT 法)により作出したヒト型糖尿病ミニブタ. 左: 正常ブタ、右: ヒト型糖尿病ミニブタ.

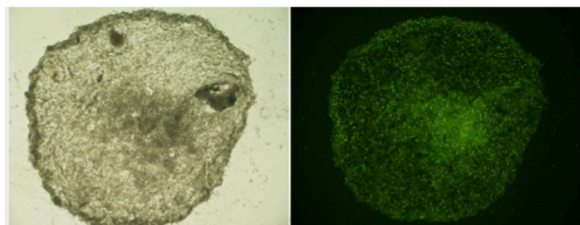


図 2. *Pdx-1-Venus tg* ブタより作成したブタ膵島シート.

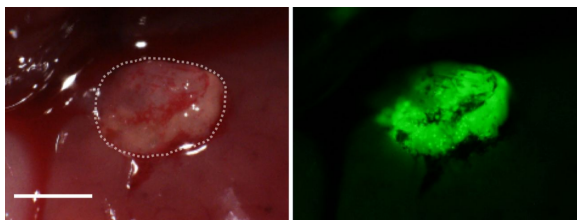


図 3. マウスの肝表面移植されたブタ膵島シート. 左: 肝表面に接着しているブタ膵島シート、右: Venus を発光しているブタ膵島シート. bar: 1cm.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagaya M, Hayashi A, Nakano K, Honda M, Hasegawa K, Okamoto K, Itazaki S, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Nagashima H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Distributions of endocrine cell clusters during porcine pancreatic development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0216254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0.1371/journal.pone.0216254.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsunari H, Watanabe M, Nakano K, Enosawa S, Umeyama K, Uchikura A, Yashima S, Fukuda T, Klymiuk N, Kurome M, Kessler B, Wuensch A, Zakhartchenko V, Wolf E, Hanazono Y, Nagaya M, Umezawa A, Nakauchi H, Nagashima H.	4. 巻 115
2. 論文標題 Modeling lethal X-linked genetic disorders in pigs with ensured fertility.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 708-713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1715940115.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nagaya M, Katsumata Y, Arai Y, Umeki I, Nakano K, Kasai Y, Hasegawa K, Okamoto K, Itazaki S, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Nagashima H.	4. 巻 227
2. 論文標題 Effectiveness of bioengineered islet cell sheets for the treatment of diabetes mellitus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Surg Res.	6. 最初と最後の頁 119-129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jss.2018.02.019.	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 Umeyama K, Nakajima M, Yokoo T, Nagaya M, Nagashima H.	4. 巻 31
2. 論文標題 Diabetic phenotype of transgenic pigs introduced by dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1 .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Diabetes Complications.	6. 最初と最後の頁 796-803.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhep.2016.12.017. Epub 2016 Dec 24	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakano K, Hasegawa K, Inoue R, Yamada T, Ebisutani R, Hiraide K, Uchikura A, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Robersts A, Morooka A, Nagaya M, Nagashima H:
2. 発表標題 Production of medical grade pigs using the uterectomy-isolated rearing (U-iR) method.
3. 学会等名 15th Congress of the International Xenotransplantation Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1. 中野和明, 長谷川航希, 山田孟, 戎谷力也, 平出恭我, 松成ひとみ, 渡邊將人, 梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志
2. 発表標題 SCIDブタのヒト細胞受容性
3. 学会等名 第46回臓器保存生物医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1. 入澤奏, 中野和明, 徳山雄紀, 長谷川航希, 岡本一駿, 武藤智之, 中西信夫, 大原聡美, 松成ひとみ, 渡邊將人, 梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志
2. 発表標題 糖尿病発症トランスジェニック雄ブタの生殖能の解析
3. 学会等名 第111回 日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 2. 徳山雄紀, 中野和明, 岡本一駿, 入澤奏, 長谷川航希, 武藤智之, 松成ひとみ, 渡邊將人, 梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志
2. 発表標題 ブタ射出精子の保存に関する研究: GPロング液の評価.
3. 学会等名 第111回 日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 入澤奏, 中野和明, 徳山雄紀, 長谷川航希, 岡本一駿, 武藤智之, 中西信夫, 大原聡美, 松成ひとみ, 渡邊將人, 梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志:
2. 発表標題 子宮深部注入法による糖尿病発症トランスジェニックブタの再産出.
3. 学会等名 In: 第6回 日本先進医工学ブタ研究会: 19-20 Oct 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 徳山雄紀, 中野和明, 岡本一駿, 入澤奏, 長谷川航希, 武藤智之, 松成ひとみ, 渡邊將人, 梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志
2. 発表標題 ミニブタ射出精子の低温保存に関する研究
3. 学会等名 第6回 日本先進医工学ブタ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 1. 梅山一大, 中島正巳, 中野和明, 渡邊將人, 松成ひとみ, 横尾隆, 長屋昌樹, 長嶋比呂志
2. 発表標題 ドミナントネガティブ変異HNF1A遺伝子導入トランスジェニックブタの表現型と合併症
3. 学会等名 . In: 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中野和明, 梅山一大, 長谷川航希, 小見山泰史, 井上亮, 小林良奈, 山田孟, 湯, 松成ひとみ, 渡邊將人, 長屋昌樹, 西村崇史, 佐竹典明, 三宅眞佐男, 長嶋比呂志
2. 発表標題 子宮全摘法とアイソレーター内飼育によるDPFブタの生産.
3. 学会等名 第20回日本異種移植研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川航希, 中野和明, 梅山一大, 梅木育磨, 福田暢, 岡本一駿, 松成ひとみ, 渡邊將人, 小見山泰史, 湯, 山田孟, 長屋昌樹, 小林英司, 中内啓光, 長嶋比呂志
2. 発表標題 膵臓形成不全トランスジェニックブタの重症糖尿病モデルとしての可能性.
3. 学会等名 第20回日本異種移植研究会
4. 発表年 2018年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----