

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：82506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10530

研究課題名(和文)細胞外マトリックス(ECM)を利用した新たな膵ランゲルハンス島移植の研究

研究課題名(英文)Creation of new islet enveloped with extracellular matrix

研究代表者

坏 尚武(Akutsu, Naotake)

独立行政法人国立病院機構(千葉東病院臨床研究部)・その他部局等・部長

研究者番号：00344979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病に対する膵島移植が保険収載され、注目が集まっているが、大きな問題はドナー不足である。一般的に、インスリン離脱のためには複数のドナーからの移植が必要とされ、その一つの原因は、移植時の膵島の障害と拒絶反応にあると考えられる。ECM膵島の作成によりこれらの問題点の回避でき、単一ドナーからの膵島移植で、インスリン離脱に十分な膵島を長く正着させることが可能となり、膵島移植を普及させることが期待できる。ラットより良好な膵島分離を行うことができたが、マウスの滑膜細胞から間葉性幹細胞の分離培養ができず、ECM膵島の作成に至っていない。今後、更なる検討によりECM膵島の作成を期待する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵島移植の大きな問題はドナー不足である。一般的に、インスリン離脱のためには複数のドナーからの移植が必要とされることも拍車をかけている。ECM膵島が開発されれば、移植時の膵島の障害と拒絶反応が回避され、一人のドナーから分離された膵島を、一人のレシピエントのインスリン離脱に十分な膵島を長く正着させることができ、1型糖尿病に対する膵島移植を普及させることが期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Islet transplantation for type 1 diabetes has been covered by health insurance and is attracting attention in Japan, however, severe donor shortage hampers the progress. Multiple donors is generally required for insulin withdrawal in the recipient. one of the reasons is thought to be islet damage and rejection during the transplantation. In this study, we devised the manipulation of ECM-islets for the purpose of avoiding transplant islet injury and rejection at the transplantation. As a result, islets from one donor can be enough for insulin withdrawal in one recipient, and it is expected that islet transplantation will become radical treatment for type 1 diabetes. Although we were able to isolate islets better than in rats, we were unable to isolate and culture mesenchymal stem cells from mouse synovial tissues, and we have not yet manipulated ECM-islets. In the future, we expect to manipulate ECM-islets through further studies.

研究分野：膵島移植

キーワード：膵島移植 細胞外マトリックス 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

2000年、エドモントンプロトコールが報告されて、その高い生着率や安全性などから1型糖尿病に対する治療法として膵ランゲルハンス島(膵島)移植が注目されてきた。国内では、2004年膵島移植が初めて行われ、2013年に初めて脳死ドナー下の膵島移植が行われ、2017年に保険収載がなされ、今後、1型糖尿病の標準治療として、脳死ドナーからの膵島移植に期待が集まると考えられる。一方、依然としてドナー不足が問題であり、条件の悪い脳死ドナーや心停止ドナーからの膵島移植の成績向上が膵島移植を推進していく上での課題である。膵島移植の成績向上のためには、1)採取膵臓の保存、2)良好な膵島の分離、3)移植床での長期正着、の3点が重要であると考えられる。1)、2)に関しては、これまでの研究で、LifePortや新たな分離法の有効性を示してきた。今研究では、3)膵島の移植床での長期正着に関する研究を行ってゆくことを目的とした。この膵島移植の長期正着の課題が解決されることが、膵島移植を推進、発展させる上で不可欠であると考えられる。

軟骨細胞外マトリックスは、主にコラーゲンやコンドロイチン硫酸などのプロテオグリカンなどより構成されており、水分やミネラルを豊富に含み、mesenchymal stem cell (MSC)より作られる。この組織は、細胞の自由な移動を妨げる一方、酸素や栄養素、ホルモン等は自由に移動でき、膵島にとってよりよい環境を確保することができると考えられる。そこで本研究では、高分子膜の代わりにレシピエント自己の軟骨細胞外マトリックスにより移植膵島の周囲を囲こむことによって、免疫担当細胞からの隔離と移植膵島の長期正着のための環境確保の両立を目的とした。この方法により、移植膵島の移植床での長期正着を可能とし、膵島移植の成績向上と膵島移植の推進のために寄与することができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、ラットとマウスを使用し、ラットから膵島を分離し、マウスより分離し増殖させたMSCとコラーゲンGelとともに培養・処理をすることによって、マウス軟骨細胞外マトリックスに被われたラット膵島を作成(細胞外マトリックス化(ECM)膵島)することを主な目的とした。

3. 研究の方法

(1)動物：ラット(Slc:SD)、マウス(Balb/c)を使用した。

(2)膵臓摘出と膵島分離：ラットを麻酔下に開腹し、膵臓にCollagenase P(Roche)コラゲナーゼを溶解した溶液(1.0mg/ml)を注入し膨化させる。膨化した膵臓を摘出し、コラゲナーゼ溶液にて膵組織を温消化、冷消化し、消化膵組織をHistopaque-1077(Sigma)を使用した比重遠心法で膵島精製を行った。

(3)膵島機能評価：

分離・純化膵島の収量：純化した膵島懸濁液を Dithizone 染色液にて染色し、膵島数の算定を行い、光学顕微鏡にて膵島の形態を観察し形態評価を行った。

Static incubation:膵島を低グルコース培養液(RPMI-1640 with 3.3mM D-glucose)にて 60 分間 pre-incubation した後、高グルコース培養液(RPMI-1640 with 16.7mM D-glucose)内で 60 分間 incubation、その後再度低グルコース培養液にて 60 分間 incubation した。各相のインスリン濃度を測定し、stimulation index (S.I.)を算出した。

(4)軟骨滑膜脂肪組織から Mesenchymal stem cell(MSC)の分離、培養

マウスから膝関節の滑膜脂肪組織を採取。

採取した組織を細かく切り刻む。

0.1% collagenase, 0.005% DNase I にて消化。

70-m filter にて分離した MSC を培養液にて培養。

(5)ECM 膵島の作成

精製したラット膵島と分離したマウス MSC を混合培養(chondrogenic medium)。

21 日間培養後、インスリン分泌機能の評価。

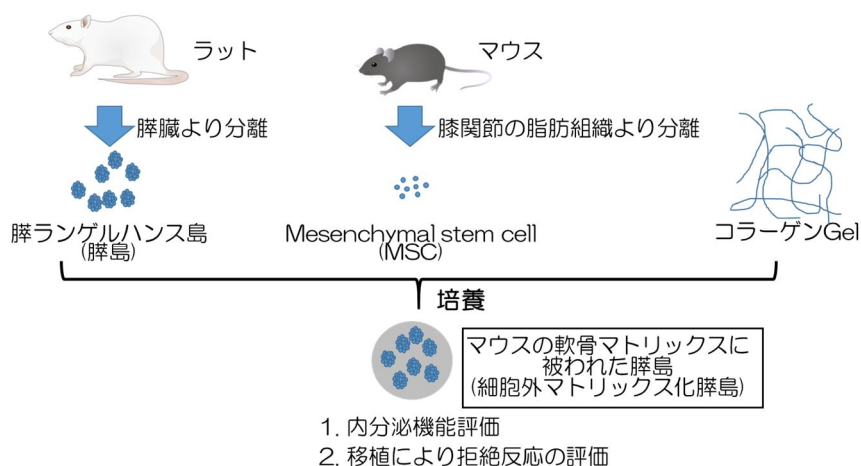


図 1 実験方法の概要

4. 研究成果

(1)膵島分離：

ラットにイソフルレンにて麻酔をかけ、U 字開腹し、膵臓に collagenase 溶液を注入し、in situ 膨化を行った後に、膵臓を摘出し、37 °Cにて温消化を 30 分間行った後に、20 分の冷消化し、Histopaque-1077 にて膵島を精製した。

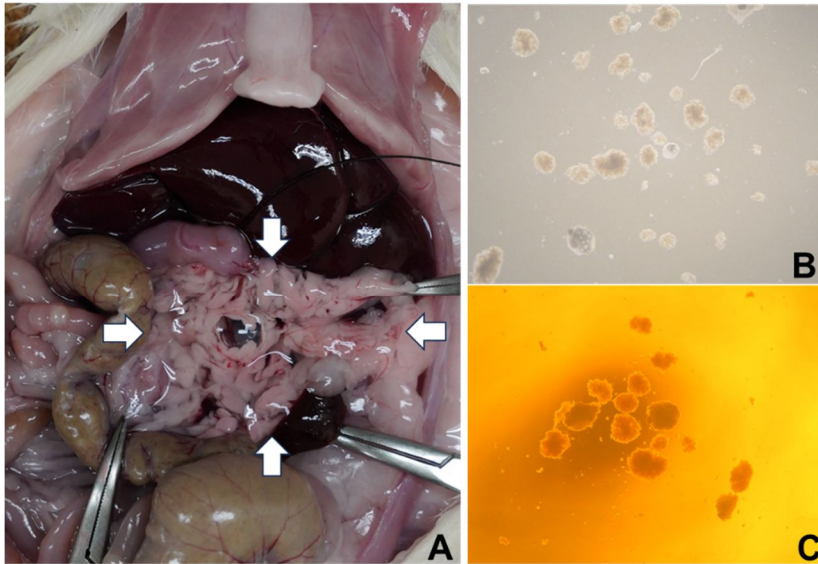


図2 膵島分離 A:膨化した膵臓(矢印)、B:分離した膵島、C:Dithizone 染色

(2)分離膵島の評価：

分離した膵島の形態は良好で、Dithizone 染色にて純度も良好であった(図2)。一匹のラットより $1,575 \pm 171$ IEQ の膵島を分離でき、収量も良好であった(図3)。分離膵島の機能評価として Static Incubation を行った(図3)。Stimulation Index (S.I.) が 1.08 ± 0.12 と分離膵島のインスリン分泌機能も良好であった。

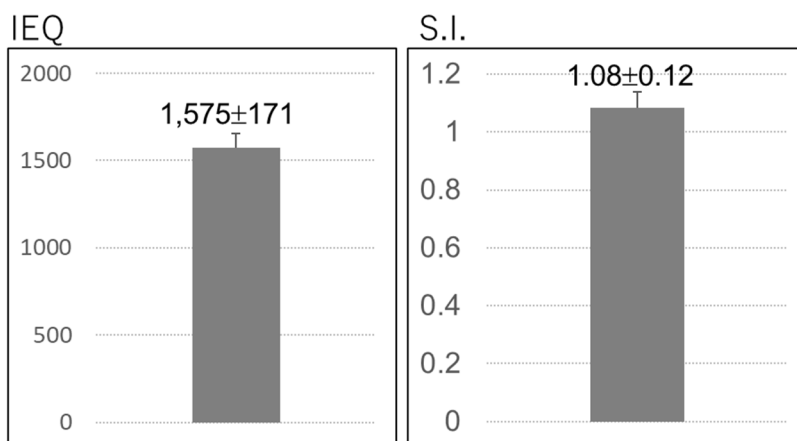


図3 分離膵島の収量と膵島機能

(3)軟骨細胞の分離：

膝関節より滑膜組織の採取や MSC の培養がうまくゆかず、軟骨細胞の分離、培養、増殖に至っていない。採取法の検討などを行い軟骨細胞の培養を行う予定である。

(4)ECM 膵島の作成：

軟骨細胞の増殖ができず、ECM 膵島の作成に至っていない。軟骨細胞の培養ができれば、ECM 膵島の作成は可能と考える。

1 型糖尿病の根本的な治療として膵島移植が保険収載され、注目されている。しかし、膵島移植の長期正着・機能維持等のさらなる成績の向上のためには、レシピエントにおける免疫担当細胞や炎症細胞による傷害の回避と移植膵島のための環境確保が重要な課題である。

現在、移植膵島の生検が困難であるため移植後膵島の病理学的モニタリングがほぼ不可能であるが、免疫担当細胞に直接に暴露されることにより、炎症や拒絶反応によって短期間で、移植膵島が傷害され、失われる可能性が考えられている。それを回避するため、以前より膵島を高分子膜などで隔離し、免疫担当細胞からの傷害を防ぐ、バイオハイブリッド膵島の移植が考案され、多くの実験的検討がなされてきた。しかしながら、いまだに臨床応用はなされていない。もっとも重要な原因として、免疫担当細胞からの隔離は十分に達成できてはいるが、そのために膵島を維持するための栄養や酸素供給等の環境の確保と、移植膵島より分泌されたインスリン等のホルモンがレシピエントに十分に供給できていない等が考えられる。

本研究は、レシピエントからの免疫反応や炎症反応の回避のために、自己軟骨の細胞外マトリックス(ECM)を利用すると同時にこの ECM が膵島組織の維持・機能発現のための環境を提供することになり、これまで解決できなかった問題点を解消できる可能性がある。すなわち、グラフト生検などの移植後モニタリングが困難な膵島移植にとって、拒絶反応を回避でき、長期正着が約束されれば、モニタリングの必要がないばかりでなく拒絶反応を考慮することが必要なくなり、免疫抑制剤が不要になる可能性がある。また、移植後の良好な膵島機能維持は、膵島移植後の生存率、生着率の改善に寄与する。さらには、本研究成果は、膵島移植だけでなく、膵島移植以外の細胞移植においても応用可能であり、移植医療の発展に貢献し、レシピエントに多大な恩恵を供与することが期待できると考えられる。

本研究は、まだ ECM 膵島の作成に至っていないが、ECM 膵島は、膵島移植の成績向上に寄与し、その他の細胞移植に応用できる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0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 坏尚武	4. 巻 9
2. 論文標題 臓器保存	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腎臓内科・泌尿器科	6. 最初と最後の頁 155-159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 坏尚武、丸山通広、大月和宣、石田健倫、齊藤友永、西郷健一、長谷川正行、青山博道、剣持 敬、野口洋文	4. 巻 2424
2. 論文標題 心停止下膵島移植に向けた持続冷却灌流保存法による膵臓保存	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Organ Biology	6. 最初と最後の頁 869-871
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 丸山通広、坏尚武、大月和宣、青山博道、西郷健一	4. 巻 38
2. 論文標題 自家膵島移植Up-to-Date	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 869-871
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 坏尚武
2. 発表標題 緊急セミナー「心停止後の献腎摘出」カニューレシオン適応と手技
3. 学会等名 第36回腎移植・血管外科研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坏尚武
2. 発表標題 緊急セミナー「心停止後腎摘出について」カニューレーション
3. 学会等名 第53回日本臨床腎移植学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坏尚武
2. 発表標題 心停止下腎移植における持続冷却灌流保存法の臨床成績
3. 学会等名 第45回日本臓器保存生物医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akutsu N
2. 発表標題 Effectivity of hypothermic machine perfusion preservation for non-heart-beating donor kidney transplantation in Japan
3. 学会等名 27th International Congress of The Transplantation Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akutsu N
2. 発表標題 Hypothermic machine perfusion preservation of pancreas for islet transplantation in non-heart-beating canine donor model
3. 学会等名 IPITA 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akutsu N
2. 発表標題 Hypothermic machine perfusion preservation of kidney from non-heart-beating donor in Japan
3. 学会等名 CAST 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究分担者	赤津 頼一 (Akatsu Yorikazu) (20795190)	東邦大学・医学部・助教 (32661)	
研究分担者	丸山 通広 (Maruyama Michihiro) (40399754)	独立行政法人国立病院機構(千葉東病院臨床研究部)・その他部局等・研究員 (82506)	
研究分担者	大月 和宣 (Otsuki Kazunori) (50399755)	独立行政法人国立病院機構(千葉東病院臨床研究部)・その他部局等・研究員 (82506)	
研究分担者	西郷 健一 (Saigo Kenichi) (60323424)	独立行政法人国立病院機構(千葉東病院臨床研究部)・その他部局等・研究員 (82506)	
研究分担者	青山 博道 (Aoyama Hiromichi) (80598243)	独立行政法人国立病院機構(千葉東病院臨床研究部)・その他部局等・研究員 (82506)	

6. 研究組織（つづき）

	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	長谷川 正行 (Hasegawa Masayuki) (80648030)	独立行政法人国立病院機構（千葉東病院臨床研究部）・その他部局等・研究員 (82506)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関