

令和 元 年 6 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16507

研究課題名(和文)細胞積層技術を用いた三次元膵島組織の構築

研究課題名(英文)Fabrication of pancreatic islet-like tissue using layer-by-layer cell coating technique

研究代表者

福田 泰也(Fukuda, Yasunari)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20768973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵島移植に代わる膵 細胞の再生医療の技術向上は重要な課題である。本研究では、交互積層(layer-by-layer;LbL)細胞コート法とスフェロイド技術を組み合わせて、高機能な三次元膵島組織を構築することを目的とした。膵 細胞株を用いて、LbL細胞コート法併用群(LbL併用群)と非併用群で、膵 細胞スフェロイドの形態的、機能的な違いを比較検討した。その結果、LbL併用群で早期より密な細胞凝集を認め、高いインスリン感受性を示した。また、糖尿病マウスへの移植実験では、腹腔内グルコース刺激試験において血糖値の上昇を抑えた。本手法は再生医療の一翼を担う新たな技術として有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大阪大学大学院 生命機能研究科 明石満 教授らにより開発された細胞外マトリックスによる交互積層細胞コート法は、手技が簡便で、生体適合性が高い細胞表面修飾技術である。この交互積層細胞コート法にスフェロイド技術を組み合わせることで、早期から細胞密度が高く機能性が高い膵島細胞類似組織の構築が可能であった。今後、ES細胞やiPS細胞由来の膵 細胞を細胞資源にして本手法を用いることで臨床応用可能な膵島細胞類似組織を構築し、重症1型糖尿病患者の治療に大いに役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Development of emerging techniques in tissue engineering for pancreatic -cells alternatives to islet transplantation is becoming increasingly important. The purpose of this study is to fabricate functional islet-like tissue using layer-by-layer (LbL) cell coating technique in combination with spheroid technique using a mouse pancreatic -cell line. The well-structured and dense spheroids could immediately be constructed by the LbL-coated -cells. In the functional analysis, spheroids with the LbL-coated -cells improved the insulin sensitivity compared to spheroids with non-coated -cells. When spheroids with the LbL-coated -cells were syngeneically transplanted in diabetic mice, glucose sensitivity improved after intraperitoneal glucose stimulation compared to spheroids with non-coated -cells. This cell coating technique would be a frontier approach in fabricating clinically applicable islet-like tissue.

研究分野：再生医療

キーワード：交互積層細胞コート法 スフェロイド 膵 細胞 インスリン感受性 コネキシン36

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫等による膵島細胞破壊によって発症する1型糖尿病は、内因性インスリン分泌能が枯渇した状態にある。インスリン投与による治療でも血糖コントロールが困難で、繰り返す低血糖昏睡や糖尿病性ケトアシドーシスにより生活の質(quality of life; QOL)が著しく低下している患者に対する根本的治療として、膵臓移植と膵島細胞移植が行われているが、本邦における臓器提供数は年間50例程度で、依然としてドナー不足の問題がある。また、膵島移植は、膵臓移植に比して手術侵襲は低いものの、その生着率の低さが課題となっており、国際多施設共同試験である Edmonton Protocol (Shapiro AM et al. N Engl J Med. 2006;355:1318-30)によると、1年生着率は44%であり、膵臓移植の85.5%と比較して著しく低い。故に、膵島細胞の長期生着に向けた技術開発は急務であり、長期生着により、ドナー不足の解消と患者のQOLおよび生命予後の改善につながると考えられる。

近年、生体外で人工的に培養した細胞およびそれらの細胞から構築した組織体を患者の体内に移植することで、失われた生体機能を回復させる再生医療や組織工学技術の開発が盛んに行われている。生体は、個々の細胞の空間的配置を制御し、生体環境に近い三次元的な培養を行うことで、1細胞では得られない多様かつ高い機能を示すことが知られている。特に、細胞凝集体(スフェロイド)形成は、三次元組織の根幹を成し、膵島細胞と類似した構造を持ち、作成した組織を簡易に体内に注入することが可能であり汎用性が高い。しかし、作成過程における組織が脆弱であること、構築に時間を要すること、機能が十分でないことなど問題点も多い。そこで我々は大阪大学大学院 生命機能研究科 明石 満教授らにより開発された、2種類の細胞外マトリックス(extracellular matrix; ECM)を用いた交互積層(layer by layer; LbL)細胞コート法に着目した(Matsusaki M et al. Angew Chem Int Ed Engl. 2007;46:4689-92、Nishiguchi A et al. Adv Mater. 2011;23:3506-10)。これは、ECM成分であるフィブロネクチン(fibronectin; FN)とゼラチン(gelatin; G)によるナノ薄膜を細胞表面へ形成させる、細胞表面修飾技術の一つである。

この技術は、ナノ薄膜が接着剤の働きをすることで、早い細胞接着を実現させ、かつ、1細胞レベルで空間配置を自由に制御できる。成熟膵β細胞およびembryonic stem (ES)細胞やinduced pluripotent stem (iPS)細胞由来膵β細胞を組織化し生体内に移植する際に、*in vitro*での組織構築は迅速に作成することが細胞の機能維持のためにも重要である。スフェロイドにLbL細胞コート法を活用することで、より迅速に機能性の高い組織が構築できることが期待される。

## 2. 研究の目的

- (1) 膵β細胞スフェロイド作成過程におけるLbL細胞コート法併用の有用性を形態的、機能的な違いから検証し、そのメカニズムを解明する (*in vitro*)。
- (2) 1型糖尿病マウスへの移植後の機能的な違いを検証する (*in vivo*)。

## 3. 研究の方法

膵β細胞には、C57BL/6 マウス由来膵β細胞株であるMIN6を用いた。

### (1)

*In vitro* におけるLbL細胞コート法併用の有無によるスフェロイドの形態的、機能的な違いの検証

膵β細胞スフェロイド作成にはPrime Surface 96well plate®を用いて、LbL細胞コート法併用の有無によるスフェロイドの形態的、機能的な違いを*in vitro*で比較検証した。形態評価としては、培養1、3日目の組織を薄切し、Hematoxylin-Eosin (HE)染色にて評価し、定量化には、細胞空隙率をImage Jにて算出した。機能評価としては、培養1、3日目の培養上清中のインスリ

ン濃度および培養 3 日目に、グルコース刺激試験(低グルコース:3.3mM、高グルコース:20.0mM のグルコース刺激下で 2 時間培養)を行い、培養上清中のインスリン濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した。また、quantitative real-time PCR (qRT-PCR)を用いてインスリン分泌に関わる insulin1、insulin2 および glucose transporter 2 (GLUT2)、glucokinase (GK) の遺伝子発現を比較した。

#### 機能向上のメカニズム解明

機能解析としては細胞間相互作用に着目し、adherens junction に関わる E-cadherin (E-cad)および gap junction に関わる connexin 36 (Cx36)の発現について qRT-PCR および蛍光免疫染色法、ウェスタンブロット法を用いて比較した。

#### (2) 糖尿病マウスへの移植実験

LbL細胞コート法を併用して作成した膵β細胞スフェロイドの有用性を*in vivo*で検証した。レシピエントにはC57BL/6マウスにストレプトゾシンを投与して作成した同種同系糖尿病マウスを用いて、左腎被膜下移植を行い、sham operation群、LbL細胞コート法併用無しの膵β細胞スフェロイド60個投与群、100個投与群およびLbL細胞コート法併用有りの膵β細胞スフェロイド60個投与群、100個投与群の5群で比較検討した。随時血糖値の推移および移植7日目の腹腔内グルコース負荷試験(intraperitoneal glucose tolerance test; IPGTT)による耐糖能および移植前、移植7、21日目の血清インスリン濃度(ELISA法で測定)の違いをLbL細胞コート法の併用の有無で比較検討した。

### 4 . 研究成果

#### (1)

LbL 細胞コート法を併用することにより、培養 1、3 日目いずれにおいても密度が高い、構造的に安定した細胞凝集塊が作成可能であった。また、組織内空隙率を Image J を用いて算出すると、培養 1、3 日目いずれにおいても LbL 細胞コート法併用群において有意に低値であった(併用群において細胞密度が高い)。機能評価では、LbL 細胞コート法併用群において、培養 1、3 日目の培養上清中のインスリン濃度は有意に高値であった。またグルコース刺激試験においては低グルコース刺激(3.3mM)下では培養上清中のインスリン濃度に差を認めなかったものの、高グルコース刺激(20mM)下では LbL 細胞コート法併用群でインスリン濃度は有意に高く、stimulation index(高グルコース刺激下インスリン濃度/低グルコース刺激下インスリン濃度)も LbL 細胞コート法併用群で有意に高値であった。さらに、LbL 細胞コート法併用群において、GK の発現上昇は認めなかったものの、insulin1、insulin2 および GLUT2 の遺伝子発現上昇を認めた。

E-cad については LbL 細胞コート法の併用の有無で遺伝子、蛋白レベルに差を認めなかったが、Cx36 の発現が LbL 細胞コート法併用群で高い結果であった。E-cad に差を認めないことから LbL 細胞コート法は膵 β 細胞同士の直接的な接着を強化しているわけではなく、介在している ECM 同士が接着することで細胞密度が高い組織が作成されていると考えられた。また、Cx36 は  $\text{Ca}^{2+}$  の振動を同期させることでインスリン分泌と関与している(Alessandrea C et al Diabetes 2003;52:417-424)と報告されており、本研究における LbL 細胞コート法併用による機能向上の一要因であると考えられた。

(2) ストレプトゾシンで 1 型糖尿病を誘導したマウスに膵 β 細胞スフェロイドを腎被膜下に移植すると、LbL 細胞コート法併用群ではスフェロイドを 60 個、100 個投与したいずれにおいても、より早期から血糖値の低下を認めた。スフェロイドを 100 個投与したマウスにおいて、移植 7 日目に行った IPGTT では、LbL 細胞コート法併用群でグルコース投与 15 分、30 分後の血

糖値の上昇が有意に抑えられ、移植 7 日目のマウス血清中のインスリン濃度も併用群で有意に高値であった。また、移植 7 日目において、移植組織内 Cx36 の発現(蛍光免疫染色法で評価)が LbL 細胞コート法併用群で高値を維持しており、高機能維持の一要因であると考えられた。

### (3) 今後の展望

本研究においてはマウス由来膵 β 細胞を用いて、LbL 細胞コート法を併用することによる膵 β 細胞スフェロイドの形態的、機能的有効性を証明した。今後は臨床応用に向け、細胞資源として ES 細胞や iPS 細胞由来膵 β 細胞を用いて同様の検証を行う必要がある。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yasunari Fukuda , Takami Akagi , Tadafumi Asaoka , Hidetoshi Eguchi , Kazuki Sasaki , Yoshifumi Iwagami , Daisaku Yamada , Takehiro Noda , Koichi Kawamoto , Kunihito Gotoh , Shogo Kobayashi , Masaki Mori , Yuichiro Doki , Mitsuru Akashi. “Layer-by-layer cell coating technique using extracellular matrix facilitates rapid fabrication and function of pancreatic β-cell spheroids” Biomaterials. 2018;160:82-91. 査読あり

### 〔学会発表〕(計 5 件)

福田 泰也、浅岡 忠史、江口 英利、川本 弘一、後藤 邦仁、小林 省吾、赤木 隆美、明石 満、森 正樹、土岐 祐一郎．交互積層法を用いた膵 β 細胞スフェロイドの構築、第 73 回日本消化器外科学会総会、2018 年 7 月 13 日、かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)

福田 泰也、浅岡 忠史、江口 英利、岩上 佳史、山田 大作、野田 剛広、川本 弘一、後藤 邦仁、小林 省吾、伊藤 壽記、赤木 隆美、明石 満、森 正樹、土岐 祐一郎．交互積層技術を用いた膵 β 細胞スフェロイドの構築とその有効性、第 45 回日本膵・膵島移植研究会、2018 年 3 月 2 日、江陽グランドホテル(宮城県仙台市)

福田 泰也、浅岡 忠史、江口 英利、佐々木 一樹、岩上 佳史、山田 大作、野田 剛広、和田 浩志、川本 弘一、後藤 邦仁、伊藤 壽記、赤木 隆美、明石 満、森 正樹、土岐 祐一郎．細胞外マトリックスを用いた交互積層法による高機能三次元膵島組織構築の試み、第 27 回日本サイトメトリー学会学術集会、2017 年 6 月 10 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

福田 泰也、浅岡 忠史、江口 英利、岩上 佳史、山田 大作、野田 剛広、和田 浩志、川本 弘一、後藤 邦仁、伊藤 壽記、赤木 隆美、明石 満、森 正樹、土岐 祐一郎．交互積層法を用いた三次元膵島組織構築の試み、第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017 年 4 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

福田 泰也、浅岡 忠史、江口 英利、岩上 佳史、山田 大作、野田 剛広、和田 浩志、川本 弘一、後藤 邦仁、伊藤 壽記、赤木 隆美、明石 満、森 正樹、土岐 祐一郎．交互積層法を用いた高機能三次元膵島組織の構築、第 44 回日本膵・膵島移植研究会、2017 年 3 月 10 日、芝蘭会館(京都府京都市)

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。