

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12057

研究課題名(和文) 膵島に対するHGFの作用と応用可能性

研究課題名(英文) Effect of HGF on islet and its applicability

研究代表者

角 昭一郎 (Sumi, Shoichiro)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：80252906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞増殖因子(HGF)が、膵島細胞の低酸素によるアポトーシスを阻害することを示し、HGFを徐放するキトサンゲルにHGFを添加することによって、EVOHバッグに当該ゲルを封入したマクロカプセル化膵島の一次的皮下移植で移植効果を確認することに成功した。また、この移植効果は5ヶ月程度で消失することを観察し、この種のカプセル化においてはゲル素材の安定性が効果の持続に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HGFが膵島細胞の低酸素によるアポトーシスを防止することは、知る限り初めての知見で、今後の膵島移植やカプセル化膵島移植の成績向上に資する可能性がある。また、マクロカプセル化膵島の一次的皮下移植に成功したことは、1型糖尿病の患者や家族、その医療者にとって大きな進歩であり、今後、この種のカプセル化膵島が研究の主体となる可能性があり、それが持つ細胞を漏らすことなく全て回収できる機能を応用して、異種移植や未分化細胞から文化誘導した細胞の移植などに応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study showed that hepatocyte growth factor (HGF) inhibits hypoxia-induced apoptosis of islet cells. In chitosan gel that slowly releases HGF, addition of HGF into the gel enabled primary subcutaneous transplantation of macro-encapsulated islets. However, this effect lasted about 5 months and this observation suggested that durability of gel material is important for the sustained transplantation effect of this kind of macro-encapsulated islets.

研究分野：再生医療

キーワード：肝細胞増殖因子(HGF) マクロカプセル化膵島 エパール膜 キトサンゲル 皮下移植 血管新生 低酸素

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) HGF については PI3K/AKT 経路を介して細胞保護作用を発揮するとの平滑筋腫細胞での報告¹がある。膵島移植と HGF の関連についても、HGF の投与²や膵島での強発現³が移植効果を増強するとの報告がある。一方、HGF/c-Met 経路を遮断すると妊娠糖尿病が増悪するとの報告⁴や、膵臓特異的 c-Met-KO マウスで部分膵切除後の膵島再生が阻害されたとの報告⁵がある。また、研究代表者も膵島の HGF・c-MET の免疫染色が移植後に増強するとの報告を行っているが⁶、膵島細胞に対する HGF の直接作用や細胞内情報伝達経路はほとんど検討されていない⁷。

(2) また、カプセル化膵島の移植における HGF の添加も過去に例がなく、b-FGF (塩基性線維芽細胞増殖因子)と同様に酸性ゼラチンで徐放化することで皮下などの血管新生に応用できるとの報告⁸があるのみである。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、HGF の膵島に対する作用を検討し、その後に、HGF を併用したマクロカプセル化膵島の皮下移植実験を行って、この臨床応用に向けた proof of concept の実験結果を得ることである。

(2) 研究代表者らの過去の研究や、他の研究者によるカプセル化膵島移植の研究により、生体における異物反応を抑制することが、移植したカプセル化膵島の機能をより長く発揮させることに非常に重要であることが示されている。このため、研究代表者は、これまでの研究で異物反応をほとんど起こさないことが知られていた EVOH でバッグを作成し、この中に免疫隔離機能を有するゲルを充填することで異物反応が非常に弱いマクロカプセル化膵島を作成しようと考え、EVOH 製透析膜等を製作した実績がある株式会社クラレに、多孔質 EVOH 膜の試作を依頼した。また、HGF は様々な作用を有するが、抗炎症作用も知られており、その血管新生作用と共に、デバイスに添加する増殖因子としては良い作用を有していると言える。一方、HGF は非常に高価な増殖因子で、大量に増殖因子を使う本研究のような研究には向かないものであったが、臨床グレードのリコンビナント-ヒト-HGF の製品化を目指しているクリングルファーマ社から HGF 提供の内諾を得ているため、このような研究を実現させることができた。

3. 研究の方法

(1) マクロカプセル化デバイスは、EVOH バッグ (最初の腹腔内移植の研究では EVOH の多孔質膜の提供をクラレ社から受けて、研究室においてヒートシールでバッグを作成した。その後の皮下移植実験では、クラレ社でバッグに整形して提供を受けた。約 10×10mm 大)の中で、ラット膵島を懸濁したキトサン溶液をインキュベータ内で 35 以上 (実際には 37) にすることでゲル化して作成した。キトサン溶液は、0.1 規定の酢酸に溶解したキトサン (2.5% wt/vol) をグリセロリン酸溶液 (80% wt/vol) で低温にて滴定し、pH7.4 付近とすることで作成した。デバイス内に入れた膵島の機能を評価するため、低 (60mg/dL) - 高 (300mg/dL) - 低 (60mg/dL) の順でグルコース液 (RPMI-1640 培地) に 1 時間ずつ浸漬して、その培養液中のインスリン濃度を測定した。

(2) デバイスの腹腔内移植でマウス糖尿病が軽快するかどうかを確認した。具体的には、Lewis ラット (11~13 週齢) から分離した膵島 (460~570 個) を上記デバイス内に入れて、糖尿病モデルラット (移植 7 日前にストレプトゾトシン 180mg/kg で糖尿病とした) の腹腔内に移植した。4 週間後に腹腔内ブドウ糖負荷試験を行い、採血してインスリン濃度等を測定し、デバイスを摘出して実験を終了した。

(3) このデバイスの皮下移植において、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) の作用を検討した。具体的には、正常マウスおよび糖尿病マウスモデルをコントロールとして、1 回手術群 (キトサンゲル内に 10 µg の b-FGF を含むデバイスを一期的に移植) と 2 回手術群 (前処置として b-FGF に浸漬したゼラチンシートを移植し、10 日後にデバイスを移植) を作成し、4 週後に腹腔内ブドウ糖負荷試験・血中インスリン等を測定した。

(4) キトサンゲルから HGF が徐放化されるかどうかを確認した。具体的には、100 µL のキトサンゲルに 10 µg の HGF を添加してゲル化させた後、28 日間 HGF リン酸バッファー (PBS) 中でインキュベートし、PBS 中の HGF 濃度を測定した。

(5) 低酸素による膵島の細胞死に対する HGF の作用を確認した。具体的には、BIONIX-1 (n B-1) キットを使用して、酸素濃度 1% で HGF (200ng/mL) を含むあるいは含まない CMRL-1066 培地で一夜培養し、Live/Dead 染色を行った。

(6) 一期的皮下移植における HGF の作用を検討した。具体的には、HGF を (10 µg/100 µL) 含むあるいは含まないマクロカプセル化膵島のデバイスを作成し (10×20mm の EVOH バッグ内に 100 µL のキトサン溶液を入れて作成) これを糖尿病マウスモデルの背部皮下に移植。移植後 4 週で腹腔内ブドウ糖負荷試験と血中インスリン濃度を測定した。

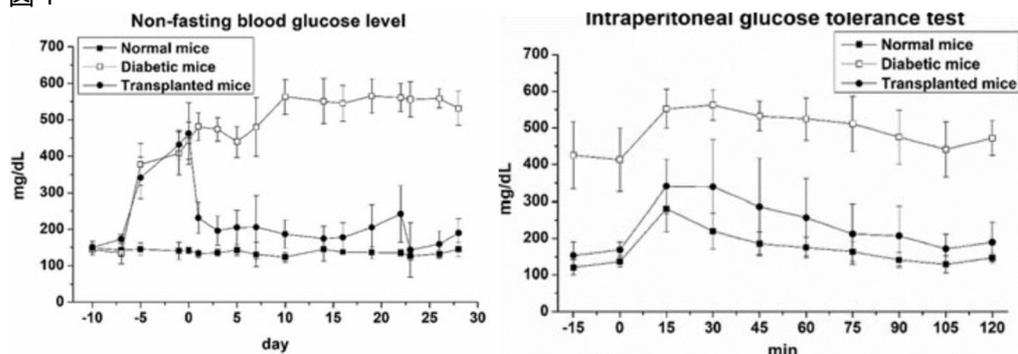
4. 研究成果

(1) 作成したデバイスは良好にゲル化し、*in vitro* でマクロカプセル化膵島として機能した。ゲルに入れない膵島、EVOH バッグに入れずキトサンゲルのみに入れた膵島と EVOH バッグ内でキトサンゲルに入れた膵島をそれぞれ 7 日間培養して、ブドウ糖負荷試験を行ったところ、ゲルに入れない膵島は培養 5 日後にはブドウ糖応答性インスリン分泌がほぼなくなったのに対し、キトサンゲル中あるいは EVOH バッグに入れたキトサンゲル中の膵島は 7 日後にもブドウ糖応答性インスリン分泌を維持した。また、同じ群で培養液中のインスリン濃度を 30 日間測定したところ、ゲルに入れない膵島は 7 日以降著明に低下、EVOH バッグに入れずキトサンゲルのみに入れた膵島も 18 日以降著明に低下したが、EVOH バッグに入れてキトサンゲルで包埋した膵島は 30 日後でも初期のころと同様のインスリン濃度を維持した。以上の結果は、キトサンゲルに包埋することで膵島機能の劣化は強く抑制され、EVOH バッグに入れてもインスリン放出量は変化しない。さらに、EVOH バッグに入れることでキトサンゲルが培養液中でより長く維持され、その結果、膵島機能もより長く保たれることを示している。

(2) このデバイスを腹腔内に移植して、マウス糖尿病の治療に成功した。図 1 左に正常群、糖尿病群および移植群の血糖の推移を示し、図 1 右に腹腔内ブドウ糖負荷試験の血糖値の推移を示す。

血糖の推移では、移植群の血糖の平均値はデバイス移植後に血糖値は速やかに低下し、実験が終了する 28 日後まで 200 mg/dL 程度で推移しており、糖尿病の改善が示されている。また、腹腔内ブドウ糖負荷試験の結果では、負荷前の血糖値は正常群に近く、負荷後も正常群に近い所で推移しており、糖尿病群からは明らかに低下している。この時のグラフ下面積 (Area under curve) でも糖尿病群と正常群および移植群の間には有意の差 ($p < 0.001$) がある。ただし、正常群と移植群の間にも有意の差 ($p < 0.01$) がある。また、K 値は、正常群 0.91 ± 0.31 、移植群 0.71 ± 0.12 でこれらに有意差 ($p < 0.05$) は認められなかった。また、糖尿病群では K 値は求められなかった。さらに、負荷前の血糖値が正常に近いことは、一夜の絶食時にもマクロカプセル化膵島の機能が発揮されていることを示しており、非常に興味深い。即ち、これを患者の血糖値に置き換えると、夜間の絶食中にもデバイスの機能が維持されて血糖値が低下していることが示されており、絶食している夜間にはインスリンを効かせておく必要がないことを示唆している。夜間にインスリンを効かせておく必要がなくなれば、低血糖発作などの危険が大きく低下し、患者の QOL 改善に大きく寄与できることが示唆される。

図 1



(3) b-FGF は前処置として血管新生を誘導した場合には有効であったが、一次的皮下移植では有効性は示されなかった。図 2 左に b-FGF を使った実験の血糖値の推移を、図 2 右に 28 日後の血中インスリン値を示す。移植後の血糖値の推移をみると、ほぼ一貫して血管新生前処置を行った群 (Two time Tx) が低い。また、血中インスリン値をみると、血管新生前処置を行った群 (Two time Tx) が無治療の糖尿病群や b-FGF 入りデバイスを一次的に移植した群よりも高くなっている。また、28 日の経過中、糖尿病群・一次的移植群・血管新生前処置群のいずれも、移植時に比べて体重は減少しているが、減少率をみると、糖尿病群 $-17 \pm 8\%$ 、一次的移植群 $-12 \pm 3\%$ 、血管新生前処置群 $-9 \pm 2\%$ で、糖尿病群と血管新生前処置群の間に有意差 ($p < 0.001$) を認めた。これらの結果から、b-FGF は血管新生前処置に使う場合には移植結果を改善するが、これを添加したデバイスを一次的に皮下移植しても効果が期待できないと結論した。

(4) キトサンゲルは HGF を徐放した。即ち、1 日後には大量の HGF が放出されるが、その後はほぼ一定量の放出が続き、観察した 28 日間にゲルに投与した HGF の約 5.5% が放出された。

(5) HGF の添加は低酸素による膵島細胞の細胞死を抑制した。図 3 に Live/Dead 染色の赤色 (死んだ細胞が発する) / 緑色 (生きている細胞が発する) の値を記したグラフを示す。

このように、HGF が培養液中に存在すると、1% というかなりの低酸素状態で膵島に起こる細胞死を有意に ($p < 0.0001$) 抑制することが示された。膵島細胞に対して HGF がこのような作用を有するとの報告は我々の知る限りこれまでに知られておらず、おそらくこれが初めての報告ではないかと考えている。

図 2

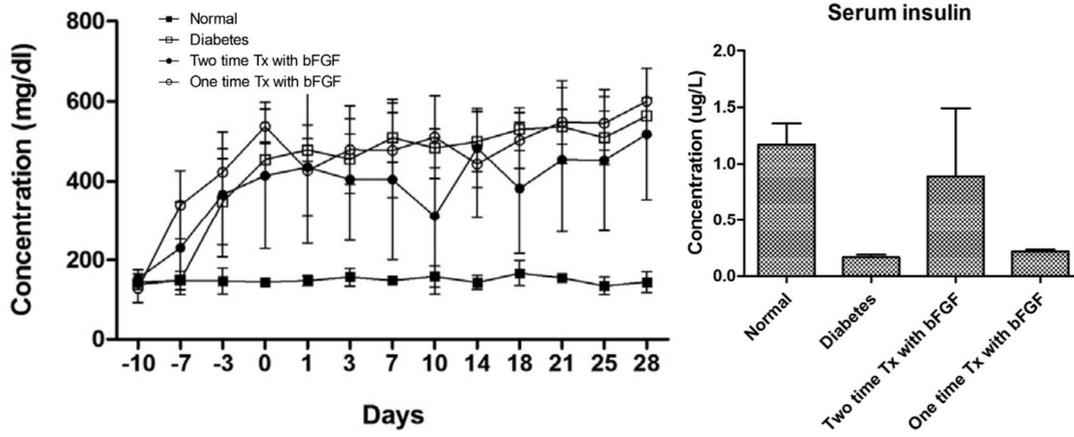
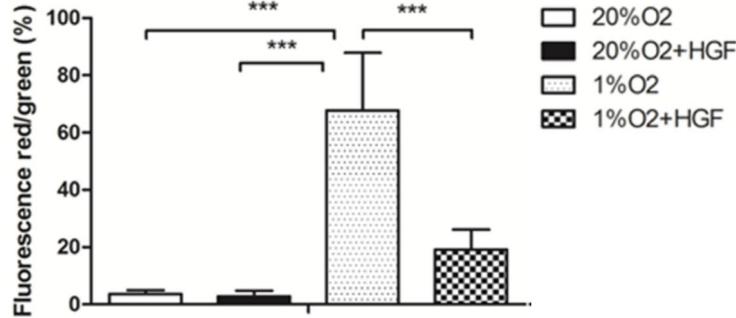
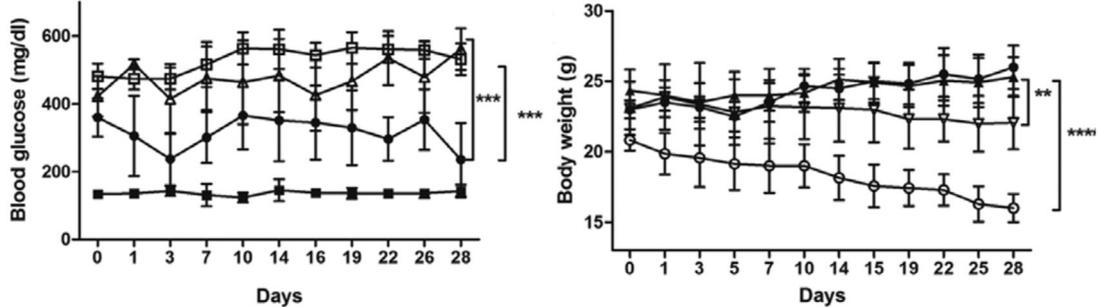


図 3



(6) HGF を添加したデバイスの一次的皮下移植は移植効果が認められた。図 4 にこの実験における血糖値 (図 4 左) と体重 (図 4 右) の推移を示す。

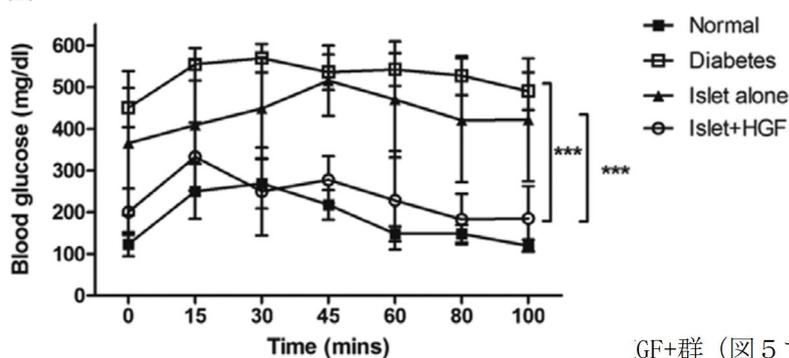
図 4



血糖値の推移では、HGF + 群で有意に血糖が低下して正常群に近づいているが、300 mg/dL 程度で推移しており、繰り返し測定のある 2 元配置分散分析で糖尿病群や HGF-群との間に有意差 ($p < 0.0001$) を認めた。また、体重の推移では、HGF+群は正常群とほとんど差がなく推移し、糖尿病群とは $p < 0.0001$ 、HGF-群とは $p < 0.001$ の有意差を認めた。

腹腔内ブドウ糖負荷試験の血糖変動を図 5 に示す。

図 5



GF+群 (図 5 では Islet+HGF) で一夜絶食後

の血糖値が正常群に近づいており、良好な治療効果を示すものと思われる。一方、HGF - 群（図5では Islet alone）では一夜絶食後の血糖値が糖尿病群に近く、負荷後の推移も糖尿病群に近い。この結果、K 値は HGF+群 0.817 ± 0.101 と正常群 1.074 ± 0.374 で有意差なく、糖尿病群と HGF-群では K 値は計算できなかった。また、組織学的検討では、HGF+群のデバイスからはインスリンやグルカゴン陽性の細胞を有する膵島が多数みつかったが、HGF-群のデバイスからはそのような組織はみられず、血中インスリン値も HGF+群と正常群でゆういさがなかった一方、糖尿病群と HGF-群でも有意差はなく、HGF+群と糖尿病群および HGF-群との間には有意差（共に $p < 0.0001$ ）を認めた。

以上のとおり、HGF を添加したマクロカプセル化膵島は一期的皮下移植によって移植効果を発現し、効果がある間は、夜間にインスリンを効かせておく必要がないなど低血糖の発生を抑える効果が示唆され、患者の QOL を著明に改善する効果が強く期待される。

<引用文献>

- 1 . Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A, et al. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 247-252, 2001.
- 2 . Nakano M, Yasunami Y, Maki T, et al. Hepatocyte growth factor is essential for amelioration of hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice receiving a marginal mass of intrahepatic islet grafts. *Transplantation*. 69: 214-221, 2000.
- 3 . García-Ocaña A, Vasavada RC, Cebrian A, et al. Transgenic overexpression of hepatocyte growth factor in the beta-cell markedly improves islet function and islet transplant outcomes in mice. *Diabetes*. 50: 2752-2762, 2001.
- 4 . Demirci C, Ernst S, Alvarez-Perez JC, et al. Loss of HGF/c-Met signaling in pancreatic beta-cells leads to incomplete maternal beta-cell adaptation and gestational diabetes mellitus. *Diabetes*. 61: 1143-1152, 2012.
- 5 . Alvarez-Perez JC, Ernst S, Demirci C, et al. Hepatocyte growth factor/c-Met signaling is required for β -cell regeneration. *Diabetes*. 63: 216-223, 2014.
- 6 . Watanabe H, Sumi S, Kitamura Y, et al. Immunohistochemical analysis of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor, and their receptors, in transplanted islets in rats. *Surg Today*. 33: 854-860, 2003.
- 7 . Viticchie G, Muller PAJ. c-Met and other cell surface molecules: Interaction, activation and functional consequences. *Biomedicines* 3: 46-70, 2015.
- 8 . Ozeki M, Tabata Y. Interaction of hepatocyte growth factor with gelatin as the carrier material. *J Biomater Sci Polym Ed*. 17: 163-175, 2006.

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 3件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Sumi S, Yang SY, Canning P, Yang KC. | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Our Steps toward Subcutaneous Transplantation of Macro-Encapsulated Islets. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 OBM Transplantation | 6. 最初と最後の頁 16 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2019.01.135 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Sin-Yu Yang, Kai-ChiangYang, Shoichiro Sumi. | 4. 巻 51 |
| 2. 論文標題 Effect of Basic Fibroblast Growth Factor on Xenogeneic Islets in Subcutaneous Transplantation - A Murine Model. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Transplantation Proceedings | 6. 最初と最後の頁 1458-1462 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2019.01.135 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Sin-Yu Yang, Kai-ChiangYang, Shoichiro Sumi. | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Prevascularization-free primary subcutaneous transplantation of xenogeneic islets coencapsulated with hepatocyte growth factor. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Transplant Direct | 6. 最初と最後の頁 E620 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TXD.0000000000001078. | 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 該当する |
| 1. 著者名 Yang KC, Yanai G, Yang SY, Canning P, Satou Y, Kawagoe M, Sumi S. | 4. 巻 115 |
| 2. 論文標題 Low-adhesive ethylene vinyl alcohol-based packaging to xenogeneic islet encapsulation for type 1 diabetes treatment. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Biotechnology & Bioengineering | 6. 最初と最後の頁 2341-2355 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bit.26730 | 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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yang SY, Yang KC, Sumi S. |
| 2. 発表標題 Hepatocyte growth factor improves macro-encapsulated islet engraftment in subcutaneous transplantation. |
| 3. 学会等名 Asian Pancreas and Islet Transplant Association, (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yang SY, Yang KC, Sumi S. |
| 2. 発表標題 Co-encapsulating hepatocyte growth factor enhances engraftment and function to xenogeneic islet in subcutaneous transplantation. |
| 3. 学会等名 International Xenotransplantation Association 15th Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yang SY, Yang KC, Sumi S. |
| 2. 発表標題 The effect of hepatocyte growth factor supplement to type 1 diabetes treatment. |
| 3. 学会等名 American Pancreatic Association 50th Anniversary Meeting, (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yang SY, Yang KC, Sumi S. |
| 2. 発表標題 Hepatocyte growth factor enhance islet engraftment in subcutaneous transplantation. |
| 3. 学会等名 第46回日本膵・膵島移植研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yang SY, Yang KC, Sumi S. |
| 2. 発表標題 Hepatocyte growth factor improves islet engraftment in subcutaneous transplantation. |
| 3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Sin-Yu Yang, Kai-Chiang Yang, Shoichiro Sumi |
| 2. 発表標題 Hepatocyte growth factor improves macroencapsulated islet engraftment in subcutaneous transplantation |
| 3. 学会等名 1st meeting of Asia Pancreas and Islet Transplantation Association (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 楊 心好、楊 凱強、角 昭一郎 |
| 2. 発表標題 Hepatocyte growth factor enhance islet engraftment in subcutaneous transplantation |
| 3. 学会等名 第46回日本膵・膵島移植研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 楊 心好、楊 凱強、角 昭一郎 |
| 2. 発表標題 Hepatocyte growth factor improves islet engraftment in subcutaneous transplantation |
| 3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yang SY, Yang KC, Sumi S |
| 2. 発表標題 Novel pre-vascularization free HGF containing macro-encapsulated device for xenogeneic islet subcutaneous transplantation. |
| 3. 学会等名 第23回日本異種移植研究会 京都 (on line) |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院医学研究科・医学部 臓器・器官形成応用
https://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral_course/r-091/
 京都大学 ウイルス・再生医学研究所 臓器・器官形成応用分野
<https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/research/lab16/>

| 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 |
| | | |

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 |
|---------|---------|
| | |