

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16272

研究課題名(和文)新規素材(RCP)を使用した皮下膵島移植法の樹立～皮下膵島移植の臨床応用に向けて

研究課題名(英文) Establishment of subcutaneous pancreatic islet transplantation method using new material (Recombinant Peptide) ; for the clinical application of subcutaneous islet transplantation.

研究代表者

植松 智海(Uematsu, Satomi)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：30811476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はFibroblast Growth Factorを使用したデバイスを作成し、皮下膵島移植の生着率向上に血管新生の重要性を示した。
また新規素材であるI型Collagen様リコンビナントペプチド(RCP)を用いて安全で効果的な皮下血管床構築法を確立し、従来の経門脈移植と同等の皮下膵島移植の生着率向上を実現した。
加えてRCPにAdipose-derived stem cells (ADSCs)を付加した群(RCP+ADSCs群)の検証を行い、新生血管増強効果と移植部位及び膵島グラフトの被膜におけるECMのup-regulationが相乗的に作用をもたらした可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、重症1型糖尿病の根治療法において、リスクが高い従来の経門脈的膵島移植に代わる低侵襲な皮下膵島移植の開発である。我々はFibroblast Growth Factorや新規素材であるI型Collagen様リコンビナントペプチド(RCP)、血管新生作用を有するAdipose-derived stem cells (ADSCs)を用いて安全で効果的な皮下血管床構築法を確立することにより、従来の経門脈移植と同等の皮下膵島移植の生着率向上を実現した。

研究成果の概要(英文)：We created a device using Fibroblast Growth Factor and demonstrated the importance of neovascularization in improving the survival rate of subcutaneous islet transplantation. We also established a safe and effective method for constructing a subcutaneous vascular development using a new material, type I Collagen-like recombinant peptide (RCP). and accomplished an improvement in the survival rate of subcutaneous islet transplantation, which is equivalent to that of conventional portal vein transplantation.
In addition, we verified the group in which Adipose-derived stem cells (ADSCs) were added to RCP (RCP + ADSCs group), and we reasonably confident that the neovascular enhancement effect and the up-regulation of ECM at the transplant site and around the islet graft capsule would promote islet engraftment synergistically.

研究分野：膵島移植

キーワード：膵島移植 Fibroblast Growth Factor リコンビナントペプチド ADSCs

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。

1. 研究開始当初の背景

現在世界の糖尿病人口は3億8670万人と言われており、日本でも年々増加傾向にある。中でもインスリン依存型糖尿病(1型糖尿病)では、内科的なインスリン注射や食事・運動療法による管理にもかかわらず重症低血糖発作や時に突然死を起こし生命予後が不良である。この重症の1型糖尿病患者に対して行われる治療法として期待されている治療の一つが膵島移植であり、近年の研究成果により移植成績も向上している。当院(東北大学病院)でも現在までに膵全摘手術の患者に対する自家膵島移植を含め7例の膵島移植が行われている。特に自家膵島移植手術は、本来廃棄される膵臓よりインスリン産生細胞のみを取り出し、患者本人に戻す事により糖尿病発症を阻止する究極の先端再生技術であり、国内では5例目の報告例となるが良好なインスリン産生能の回復が報告されたのは本症例が初めてで、社会的意義が非常に高いと思われる。現時点での膵島移植の課題として、1)一人の患者の治療に2-3回の移植が必要であるという課題、2)経皮的門脈注入で行う方法が膵島移植の標準プロトコルであるが、肝臓内は原始免疫反応が亢進しており、門脈内に移植された膵島は激しい炎症反応により40-50%が移植後数時間で破壊される(Goto, et al., Transplantation. 2004)だけでなく、移植膵島による門脈塞栓などの重篤な合併症があること等があげられる。これらの問題点を打破すべく、当研究室では膵島分離のための新規酵素カクテルの開発や、糖尿病治療のテーラーメード型膵島分離の開発、Thioredoxin-1による移植後早期膵島障害、短期間の絶食とインスリン投与を組み合わせる新しい膵島移植手術法の考案等、様々な研究を発表してきた(Dendo, et al., Transplantation. 2015, 他)。中でも本研究では1)より低侵襲な手技の開発、2)将来的な異種移植や人工多能性幹細胞(iPS細胞: induced pluripotent stem cells)由来の膵島移植の可能性も視野に膵島細胞の追加移植を簡易に行う方法の樹立のため、従来の経門脈的膵島移植に代わる新しい移植部位の開発について研究を進めている。これまでに、腎被膜下、後腹膜下、筋肉内、皮下等が、経門脈移植に代わる移植移植部位として注目されてきた。その中でも、皮下への膵島移植は、1)最も低侵襲であること、2)複数回の移植を安全に行えること、3)将来iPS細胞由来の膵島や異種膵島の移植が実施された後に、移植膵島を起因とする合併症が起きた場合、経門脈移植では肝臓内に移植された膵島を摘出することは不可能であるが、皮下膵島移植の場合は必要時に移植膵島の摘出を簡易に行えることなど、様々な利点があることから、新たな移植場所として最も注目されている。しかし、皮下は膵島移植において、膵島生着に必要とされる血管に乏しく、膵島の生着には不利な部位である。このため移植予定箇所の皮下に新生血管床をいかに効果的に構築し、膵島の生着を向上させるかが重要な鍵となる。

2. 研究の目的

これまで皮下の乏血管を克服するために、basic fibroblast growth factor (bFGF)を使用したデバイスを移植前の皮下に留置し膵島移植の生着促進が有用であるという報告が存在する(Luan, et al., Am J Transplant. 2014)。当研究室でもbFGFを使用した皮下膵島移植前の新生血管構築について研究し、このbFGFは高用量ではデバイス留置部への滲出液貯留と出血によりグラフト生着が阻害されることを報告している(Transplantation: In press)。一方、マウス皮下にナイロンカテーテルを留置することで皮下の新生血管が増加し、そこに膵島を移植することで、糖尿病の治療成績が向上することが報告されている(Pepper, et al. Nat Biotechnol. 2015)ことから、皮下新生血管の構築においては、デバイス自体の性状に焦点を当てた研究も重要であることが判明し、血管誘導効果を有する新規コラーゲン素材である型コラーゲンを基としたりコンビナントペプチド(RCP: Nakamura, et al., J Control Release. 2010)に焦点をあて、皮下膵島移植の生着を促進するための移植前血管床構築プロトコルを作成し、長期RCPデバイス群は経門脈移植に匹敵する糖尿病治療を示し、かつ出血や浸出液が少ないという報告を行った(Uematsu SS, et al. Transplantation. 2018)。

この前段階のbFGFにおける研究で、至適量のbFGFとヘパリンが血管新生に関わりこれが糖尿病治療に関与するのは予想の範囲であったが、一方予想外にbFGFを含まない空デバイス(bFGF 0)群もある程度の治癒率を示した(Uematsu SS, et al. Transplantation. 2018)。この結果は、糖尿病治療に必要な膵島生着には、血管新生以外にも何か別の重要な機序を介していることを示唆している。一つの候補として考え得るのは、コラーゲンやヘパラン硫酸、フィブロネクチンといった細胞外マトリックス(extracellular matrices: ECM)の発現増強あるいは補充である。実際、ヘパラン硫酸が膵島機能の活性化に必要不可欠であることが報告されており(Ziolkowski, et al., J Clin Invest. 2012)。型コラーゲンが膵島機能を回復させたことも報告されている(Yap WT, et al., Tissue Eng Part A. 2013)。さらに、複数のグループより、ラミニンやフィブロネクチンが膵島機能を維持させるのに極めて重要であることが報告されており(Edamura, et al., Cell transplant. 2001、他)。膵島分離作業中に、膵島周囲のECMが破壊さ

れ、それにより膵島の機能が損なわれることも知られている (Cross, et al. Am J Transplant. 2017)。これらの事実を照らし合わせると、ECM の発現増強や補充により膵島生着が促進すると思うのが合理的であり、さらに、軽度の炎症がフィブロネクチンの発現増強を介して、幹細胞の生存を延長させたという最近の報告 (Li, et al., Mol Med Rep. 2016) を鑑みると、アガロースで作製した bFGF 徐放デバイス自体がもたらすメリットも、デバイスの異物反応によって引き起こされる軽度の一時的炎症により誘導・補充される ECM によって説明可能ではないかと推定される。以上より本研究では、(1)RCP 皮下デバイスにおける皮下膵島移植時の血管新生の評価と、(2)RCP と bFGF を使用した皮下膵島移植時の血管新生以外の因子として ECM の存在を明らかにし、今後の皮下膵島移植に貢献することを目的としている。

3 . 研究の方法

(1)RCP 皮下デバイスにおける血管新生の証明： RCP 皮下デバイスを留置後摘出し、同種同系膵島を移植、血管新生の免疫染色による定量分析を行い、bFGF デバイス群と比較する。また、皮下に移植した膵島の血管新生を特殊なチャンバー (dorsal skinfold chamber) を使用し、二光子顕微鏡を用いてより詳細な血管新生機序を求める。
(2)RCP または bFGF 皮下デバイスにおける ECM の証明：(1)と同様のマウスで免疫染色で ECM (ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ヘパラン硫酸、コラーゲン、) の存在を定性で確認し、差があれば Laser microdissection (LMD 7000) を使用して定量的に解析する。
(3)RCP 単体では血管新生において有意な差を認めるには至らなかったが、移植部位の間質組織における Fibronectin の発現増強傾向が認められたことから、RCP に血管新生作用を有する脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cells: 以下 ADSCs) を付加した群 (以後 RCP + ADSCs 群) と RCP 単独群の検証を実施した。

4 . 研究成果

(1)RCP 皮下デバイスにおける血管新生の証明：以前に行った実験で、bFGF を使用したデバイス群とコントロール群での新生血管の評価では、bFGF 群では、有意に高値を示した。しかし、RCP 群について新生血管の評価を行ったところ、膵島内の新生血管の数は少数で、コントロール群と有意な差を認めなかった。今回、治癒結果の非常に良好な RCP デバイスやある程度の治癒を得た bFGF0 群 (bFGF を含まないデバイスを使用した群) において、免染にて新生血管が少ないという事実は、皮下における膵島生着には血管新生以外の何か別の重要な機序を介していることを示唆している可能性があると思われる。一つの候補として考え得るのは、コラーゲンやヘパラン硫酸、フィブロネクチンといった ECM の発現増強あるいは補充である。膵島分離作業中に、破壊された膵島周囲の ECM が失われ膵島の機能が損なわれるという報告やフィブロネクチンの発現増強を介して幹細胞の生存を延長させたという報告から、デバイスの異物反応によって引き起こされる炎症により誘導・補充される ECM によってより膵島生着が促進する可能性もあると考えた。
(2)RCP または bFGF 皮下デバイスにおける ECM の証明：(1)の結果を受け、シャム群、bFGF デバイス群、RCP 短期留置群、RCP 長期留置群において、皮下に移植した膵島周囲の ECM 発現における免疫染色 (定性) を行った。現在までに終了しているのはラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、コラーゲンの定性評価と統計解析である。ラミニンに関しては明らかな有意差を認めず、フィブロネクチンに関しては bFGF 群と RCP 長期留置群において有意に発現が高く、ビトロネクチンに関しては、は bFGF 群の発現が有意に高く RCP 長期留置群が高い傾向を示し、コラーゲンに関しては bFGF 群が有意に高い発現を示した。
(3)この結果、血糖推移と治癒率では RCP 単独群、RCP + ADSCs 群で有意な差は認めなかったが、膵島機能を示す腹腔内ブドウ糖負荷試験では RCP + ADSCs 群が有意に良好であった。また、各群での膵島内部における新生血管を免疫染色による半定量化で比較したところ、RCP + ADSCs 群における新生血管は RCP 単独群と比較し多い傾向にあった。
以上より、各群の間質組織の Fibronectin と、移植膵島グラフトの被膜における Collagen III の発現を確認したところ、RCP + ADSCs 群の有意な増強を認めた。
また移植膵島の被膜に関しては Laminin および Collagen IV に関しても発現が増強する傾向が確認された。
これらの結果から、RCP + ADSCs 群では膵島内部における新生血管増強効果と移植部位および膵島グラフトの被膜における ECM の up-regulation が相乗的に作用し移植成績向上をもたらしたと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Satomi Suzuki Uematsu
2 . 発表標題 A novel subcutaneous pancreatic islet transplantation method using the new device of Recombinant Peptide containing human type I collagen material with RGD motif.
3 . 学会等名 27th International Congress of The Transplantation Society (国際学会)
4 . 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

血管のベッドで細胞移植の効率をアップ 糖尿病治療のための簡便・安全・効果的な膵島移植（以下略） https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:cEiV2obxQZoJ:https://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press20171108_03web.pdf+&cd=3&hl=ja&ct=clnk&gl=jp
--

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
---------	---------