

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09839

研究課題名(和文) 糖尿病に対する膵島封入羊膜移植の治療効果

研究課題名(英文) Therapeutic effects of islets-including amnion transplantation for diabetes

研究代表者

坂田 直昭 (Sakata, Naoaki)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：50431565

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)：糖尿病に対する細胞移植治療である膵島移植の治療成績には向上の余地がある。羊膜は優れた医療用生体材料として注目されている。本研究では、羊膜の内腔に膵島を封入した、“膵島封入羊膜”を作成し、糖尿病動物に移植することでその治療効果を検証した。その結果、一部の糖尿病動物に血糖値の正常化が認められたものの、膵島単独の移植と比べて著明な有効性を示すには至らなかった。膵島移植における羊膜の応用にはさらなる工夫が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

羊膜移植は再発翼状片や角膜上皮欠損、角膜穿孔といった難治性の眼疾患に対して施行されているが、本研究は特に再生医療における羊膜利用のさらなる有効性を証明するために企図したものであった。本研究における膵島移植への羊膜利用の成果は十分なものではなかったが、羊膜の幅広い医療応用への可能性を示したという点において、本研究には意義があったと考える。

研究成果の概要(英文)：As a promising cellular therapy for diabetes, islet transplantation needs further improvement in the therapeutic outcomes. Amnion is shed light on as a preferable biomaterial for regenerative medicine. We attempted to develop "islet-including amnion", characterized as an amnion containing islets in the inner cavity, and assessed the therapeutic effects by transplanting to diabetic animal models in this study. As a result, we saw some animals with normoglycemia by the transplantation. On the other hand, we also certified the therapeutic effect was not superior to simple islet transplantation. Therefore, further modification might be required for the application of amnion to islet transplantation.

研究分野：膵島移植

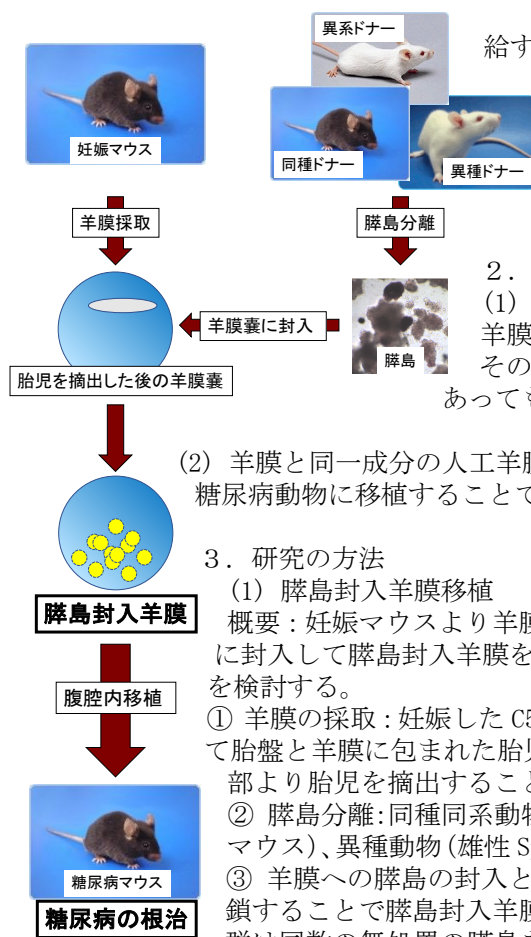
キーワード：膵島移植

1. 研究開始当初の背景

膵島移植は、ドナー膵臓から膵島を採取し、移植することで血糖値の変化に応じたインスリン供給を担保する糖尿病の根治療法であるが、その治療成績にはまだまだ向上の余地がある。膵島移植の治療成績向上のためには移植した膵島の多くを生着に導くことが重要であるが、そのためには拒絶反応、炎症反応、虚血などの様々な障壁から膵島を保護することが必須である。加えて膵島移植に関しては慢性的なドナー不足の問題は未解決である。将来的には大型動物の異種膵島や、幹細胞から分化誘導した膵島を新たなドナー源として利用する可能性があるが、現状臨床応用には至っていない。

羊膜は胎児に対する免疫寛容の成立に有効な特性があり、加えて抗炎症作用、創傷修復作用、血管新生促進作用に関与する上皮細胞・間葉系幹細胞を多く含み、かつ細胞が生育する場としての働きを持つコラーゲンなどの細胞外基質によって構成されていることから、近年、優れた医療用の生体材料として注目されている。本邦においては、1997年に難治性角結膜疾患患者に対する羊膜移植の有効性が初めて報告されている(Shimazaki J, et al. Ophthalmol 1997)。羊膜移植は現在、眼疾患に対してのみ行われているが、羊膜が持つ移植の場としての優れた特性を鑑みるに、膵島移植を含む様々な臨床応用が将来的に期待できる。

図1. 膵島封入羊膜の作成と移植実験のシエマ



また、現状ドナー羊膜は充足しているが、今後、眼科領域以外からの需要が高まった場合に常時供給することが難しくなる可能性がある。加えて羊膜はドナーの個体差により、その品質にはばらつきがあると想定される。よって、品質の安定した羊膜を常時供給できるようにするためには、羊膜と同一の細胞/基質成分からなる人工羊膜の開発が必要である。

2. 研究の目的

(1) 羊膜の内腔に膵島を封入した、いわゆる“膵島封入羊膜”を作成する。これを糖尿病動物に移植することでその有効性を明らかにする。異系・異種動物由来の膵島であっても羊膜の介在により移植が成立するか検討する(図1)。

(2) 羊膜と同一成分の人工羊膜を開発する。さらに“膵島封入人工羊膜”を作成し、糖尿病動物に移植することで人工羊膜の性能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 膵島封入羊膜移植

概要：妊娠マウスより羊膜を採取し、同種同系、異系、異種動物の膵島を羊膜に封入して膵島封入羊膜を作成する。これを糖尿病マウスに移植し、治療効果を検討する。

① 羊膜の採取：妊娠した C57BL/6J マウスより子宮を摘出する。子宮壁を切開して胎盤と羊膜に包まれた胎児を摘出し、さらに胎盤を羊膜より外し、羊膜の開口部より胎児を摘出することで嚢状の羊膜を採取する。

② 膵島分離：同種同系動物(雄性 C57BL/6J マウス)、同種異系動物(雄性 BALB/c マウス)、異種動物(雄性 Sprague-Dawley ラット)の膵臓より膵島を単離する。

③ 羊膜への膵島の封入と膵島移植：羊膜の内部に膵島を封入し、開口部を閉鎖することで膵島封入羊膜を作成し、糖尿病マウスの腹腔内に移植する。対照群は同数の無処置の膵島を移植する群、および羊膜のみを移植する群とする。

移植の効果は血糖値測定、血中インスリン濃度測定、糖負荷試験で評価する。また、一部のマウスより移植片を摘出し、生着膵島の有無、免疫担当細胞の存在と膵島の障害、血管新生の多寡を組織学的に検討する。加えて組織標本より移植膵島をマイクロダイセクションで採取し、次世代シーケンサーによる発現遺伝子の網羅的解析を行い、その発現パターンを評価する。

(2) 人工羊膜の作成と膵島移植におけるその機能評価

概要：羊膜由来の上皮・間葉系幹細胞と羊膜に含まれる細胞外基質で人工羊膜を作成する。人工羊膜による膵島封入羊膜を作成し、糖尿病動物に移植することでその有効性を示す。

①人工羊膜の作成：妊娠 C57BL/6J マウスより羊膜を採取したのち、酵素処理によって羊膜上皮細胞、羊膜間葉系細胞を採取する。その後、細胞外基質を添加して温度感応性培養皿上に細胞を培養し、シート化させる。作成した人工羊膜を嚢状にする。

②膵島封入人工羊膜の移植実験：各種ドナー動物から膵島を単離して膵島封入人工羊膜を作成する。人工羊膜の有効性を膵島封入人工羊膜の移植実験にて評価する。

4. 研究成果

(1) 移植部位としての脂肪組織の有効性の検証：従来、膵島移植は門脈を介した肝臓への移植により行われる。しかし、膵島封入羊膜は血管内への移植が不可能であるため、その移植のためには肝臓に代わる移植部位が求められる。本研究では脂肪組織、そして皮下を膵島封入羊膜の移植部位として実験を進めたが、同時に移植部位としての脂肪組織の有効性についても検証を行った。糖尿病マウスの精巣上体周囲脂肪組織にマウス膵島 200 を同種同系移植し、腎被膜下移植を行ったマウス、腹腔内移植を行ったマウスと共に糖尿病の改善効果について検証したところ、精巣上体周囲脂肪組織への膵島移植の移植効率は腹腔内膵島移植に優り、腎被膜下膵島移植に匹敵することが明らかになった。また、移植片に対する血管新生の誘導効果において、脂肪組織は優れた移植部位であることが判明した (図 2)。そして、脂肪組織はアディポネクチンを介して膵島の血管新生および生着を促進することが本研究を通じて明らかになった (図 3)。

図2. 精巣上体周囲白色脂肪組織への膵島移植の移植効率は腹腔内膵島移植に優り、腎被膜下膵島移植に匹敵した。

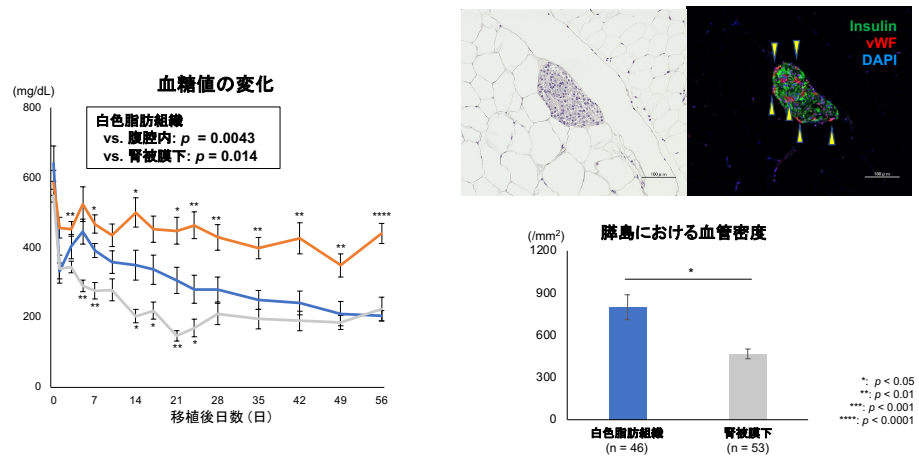
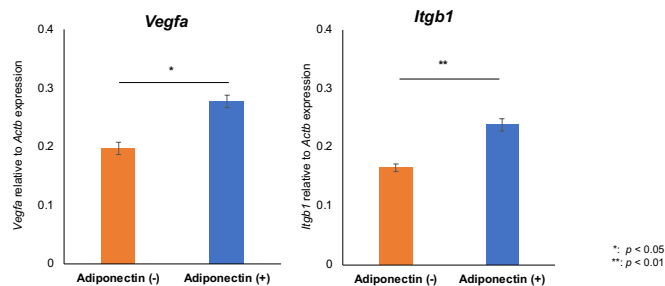
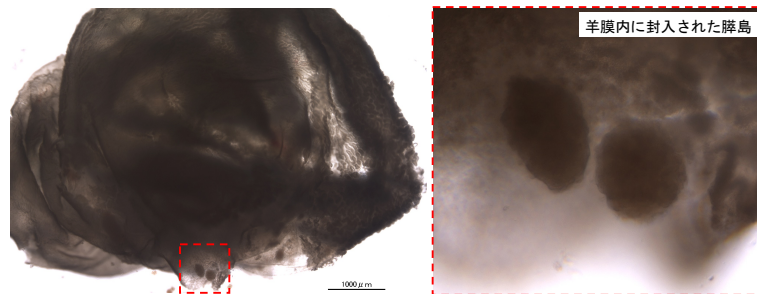


図3. アディポネクチン添加培養により膵島のVEGF、インテグリン遺伝子の発現が増強した。



(2) 膵島封入羊膜の作成：妊娠マウスより羊膜を採取し、マウス膵島をその内腔に注入し封入を試みた。当初は細径の手術糸で開口部を閉鎖する手法で試みたが、羊膜は小さく、その閉鎖は困難であった。最終的には細胞外基質 (マトリゲル) を生体接着剤として使用することによりその閉鎖を達成することができた (図 4)。

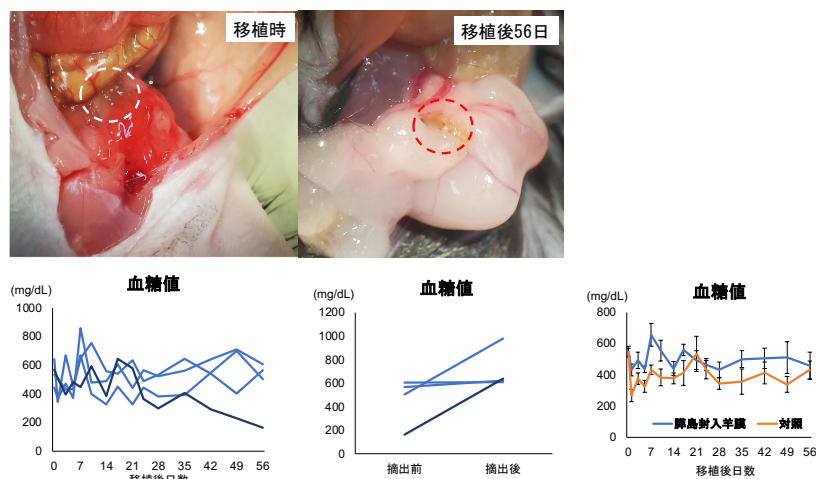
図4. 作成した膵島封入羊膜



(3) 膵島封入羊膜の脂肪組織への移植実験：作成した膵島封入羊膜を糖尿病マウスの精巣上体周囲脂肪組織へ同種同系移植し、その治療効果を膵島単独を脂肪組織へ移植した対照と比較することで検証した。移植膵島数はマージナルドナー数である 150 とした。膵島封入羊膜を脂肪組織

で被覆する要領で移植を行ったが(図5. 白色点線)、移植後56日で開腹し、移植片の状態を確認したところ脂肪組織内に癒痕化したと思しき組織が確認された(図5. 赤色点線)。血糖値の推移であるが、膵島封入羊膜の移植を受けた糖尿病マウス4匹のうち、1匹に血糖値の正常化が認められた(図5)。移植後56日に移植片を摘出したところ、4匹中2匹に血糖値の上昇が認められた(図5)。一方、対照との比較では優位な血糖改善効果は認められなかった(図5)。

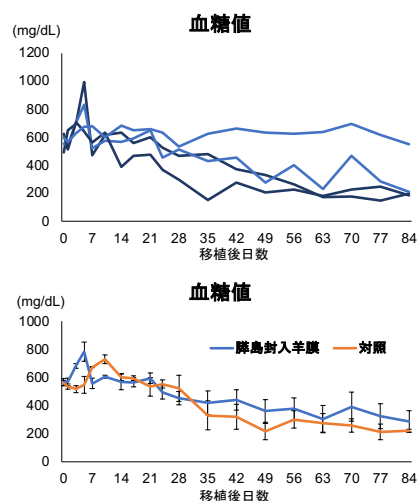
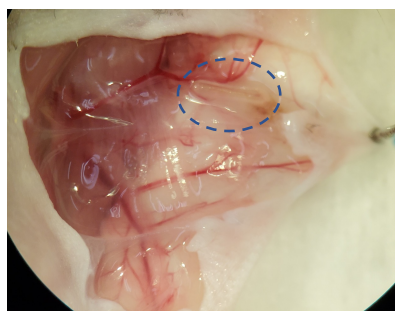
図5. 脂肪組織への膵島封入羊膜の移植



(4)膵島封入羊膜の皮下への移植実験：さらにマウス膵島封入羊膜を糖尿病マウスの腋窩皮下に移植する実験も行った。手法であるが、まず羊膜をあらかじめ糖尿病マウスの腋窩に留置し、マトリゲルの散布によりこれを固定した。

図6. 皮下への膵島封入羊膜の移植

内腔の確保のためスパーサーを留置した(図6. 青色点線)。2週間後に腋窩を解放し、羊膜を同定して内腔を開放し、その中に500膵島をマトリゲルとともに封入することで移植を行った。羊膜を利用しない膵島単独移植したマウスを対照とした。結果、4匹中2匹のマウスに血糖値の正常化を確認したものの、対照と比べ著明な血糖改善効果を確認するには至らなかった(図6)。



(5)成果のまとめ:本研究では羊膜を膵島移植に利用することの有効性を示すには至らなかった。それにより当初予定していた同種異系、異種移植の実験まで進めることができなかった。一方、羊膜由来の細胞を膵島移植に利用し、治療効果を向上させることに成功した報告も存在する(Lebreton F, et al. Nat Commun 2019) ため、羊膜の膵島移植への利用には更なる工夫が必要と考えられた。一方、膵島移植の移植部位としての脂肪組織の有効性と、膵島が生着するメカニズムを本研究を通じて明らかにすることができた。

<引用文献>

- ① Shimazaki J, Yang HY, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology*. 1997;104(12):2068-76.
- ② Lebreton F, Lavallard V, Bellofatto K, Bonnet R, Wassmer CH, Perez L, Kalandadze V, Follenzi A, Boulvain M, Kerr-Conte J, Goodman DJ, Bosco D, Berney T, Berishvili E. Insulin-producing organoids engineered from islet and amniotic epithelial cells to treat diabetes. *Nat Commun*. 2019;10(1):4491.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yamada Hideaki, Naito Reiko, Nishimura Masuhiro, Kawakami Ryo, Morinaga Eri, Morita Yuichi, Shimizu Masayuki, Yoshimatsu Gumpei, Sawamoto Osamu, Matsumoto Shinichi, Imafuku Shinichi, Sakata Naoaki, Kodama Shohta	4. 巻 29
2. 論文標題 Xenotransplantation of neonatal porcine bone marrow -derived mesenchymal stem cells improves diabetic wound healing by promoting angiogenesis and lymphangiogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Xenotransplantation	6. 最初と最後の頁 e12739
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/xen.12739	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 Sakata Naoaki, Yoshimatsu Gumpei, Chinen Kiyoshi, Kawakami Ryo, Kodama Shohta	4. 巻 12
2. 論文標題 Possibility of adiponectin use to improve islet transplantation outcomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-04245-0	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 Chinen Kiyoshi, Sakata Naoaki, Yoshimatsu Gumpei, Nakamura Masafumi, Kodama Shohta	4. 巻 11
2. 論文標題 Therapeutic effects of acylated ghrelin-specific receptor GHS-R1a antagonist in islet transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00740-6	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 Fukase Masahiko, Sakata Naoaki, Kushida Yoshihiro, Wakao Shohei, Unno Michiaki, Dezawa Mari	4. 巻 52
2. 論文標題 Intravenous injection of human multilineage-differentiating stress-enduring cells alleviates mouse severe acute pancreatitis without immunosuppressants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 603 ~ 615
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-021-02382-7	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 Sakata Naoaki, Yoshimatsu Gumpei, Kawakami Ryo, Kodama Shohta	4. 巻 -
2. 論文標題 Fat-Covered Islet Transplantation using Epididymal White Adipose Tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/62096	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 Yamada Hideaki, Sakata Naoaki, Tanaka Tomoko, Tagashira Hideaki, Yoshimatsu Gumpei, Kawakami Ryo, Wada Hideichi, Iwamoto Takahiro, Kodama Shohta	4. 巻 146
2. 論文標題 Lymphangiogenesis and angiogenesis rescue murine ischemic hindlimb via transient receptor potential vanilloid 4	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 244 ~ 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.04.009	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 Yamada Hideaki, Sakata Naoaki, Nishimura Masuhiro, Tanaka Tomoko, Shimizu Masayuki, Yoshimatsu Gumpei, Kawakami Ryo, Wada Hideichi, Sawamoto Osamu, Matsumoto Shinichi, Kodama Shohta	4. 巻 28
2. 論文標題 Xenotransplantation of neonatal porcine bone marrow derived mesenchymal stem cells improves murine hind limb ischemia through lymphangiogenesis and angiogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Xenotransplantation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/xen.12693	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 Sakata Naoaki, Yoshimatsu Gumpei, Tanaka Tomoko, Yamada Teppei, Kawakami Ryo, Kodama Shohta	4. 巻 104
2. 論文標題 Mechanism of Transplanted Islet Engraftment in Visceral White Adipose Tissue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 2516 ~ 2527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TP.0000000000003400	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 Matsuoka Taisuke, Yoshimatsu Gumpei, Sakata Naoaki, Kawakami Ryo, Tanaka Tomoko, Yamada Teppei, Yoshida Yoichiro, Hasegawa Suguru, Kodama Shohta	4. 巻 10
2. 論文標題 Inhibition of NLRP3 inflammasome by MCC950 improves the metabolic outcome of islet transplantation by suppressing IL-1 and islet cellular death	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74786-3	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 YAMADA TEPPEI, YOSHIDA YOICHIRO, MAEDA TOSHIKI, YOSHIMATSU GUMPEI, AISU NAOYA, YAMASHITA KANEFUMI, KOMONO AKIRA, KAJITANI RYUJI, MATSUMOTO YOSHIKO, NAGANO HIDEKI, NAITO KEIKO, YASUMOTO KOSEI, TAKIMOTO RISHU, KAMIGAKI TAKASHI, GOTO SHIGENORI, YOSHIMURA FUMIHIRO, SAKATA NAOAKI, KODAMA SHOHTA, HASEGAWA SUGURU	4. 巻 40
2. 論文標題 Changes in Immunological Status in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Treated With First-line Chemoimmunotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4763 ~ 4771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.14478	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 Sakata Naoaki, Yoshimatsu Gumpei, Kodama Shohta	4. 巻 1
2. 論文標題 White Adipose Tissue as a Site for Islet Transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transplantology	6. 最初と最後の頁 55 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/transplantology1020006	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 Sakata Naoaki, Yoshimatsu Gumpei, Kodama Shohta	4. 巻 4
2. 論文標題 The Roles of Collagen in Islet Transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 OBM Transplantation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21926/obm.transplant	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14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 坂田直昭、吉松軍平、小玉正太
2. 発表標題 1型糖尿病治療における膵島移植の位置づけと重要性
3. 学会等名 第57回日本移植学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂田直昭、吉松軍平、知念澄志、川上 亮、小玉正太
2. 発表標題 膵島移植の治療効果向上におけるアディポネクチン利用の意義
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂田直昭、吉松軍平、小玉正太
2. 発表標題 細胞組織移植における移植部位としての白色脂肪組織の有効性
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂田直昭、吉松軍平、小玉正太
2. 発表標題 脂肪被覆膵島移植とその手法
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakata Naoaki、Yoshimatsu Gumpei、Kodama Shohta
2. 発表標題 The protocol of fat-covered islet transplantation using epididymal white adipose tissue
3. 学会等名 The 2nd Congress of Asian Pancreas and Islet Transplant Association (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂田直昭、吉松軍平、知念澄志、川上 亮、小玉正太
2. 発表標題 臨床異種膵島移植実現のためのマイクロミニプタを使用した膵島単離と回収膵島の機能評価
3. 学会等名 第23回日本異種移植研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂田直昭、吉松軍平、小玉正太
2. 発表標題 脂肪内膵島移植におけるアディポネクチンの役割
3. 学会等名 第56回日本移植学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoaki Sakata, Gumpei Yoshimatsu, Tomoko Tanaka, Teppei Yamada, Ryo Kawakami, Shohta Kodama
2. 発表標題 The advanced mechanisms of islet-engraftment onto white adipose tissue.
3. 学会等名 TTS2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂田直昭、吉松軍平、小玉正太
2. 発表標題 消化器病医における大学院教育の重要性
3. 学会等名 第115回日本消化器病学会九州支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoaki Sakata, Gumpei Yoshimatsu, Tomoko Tanaka, Ryo Kawakami, Shohta Kodama
2. 発表標題 The Mechanism How the Transplanted Islets Engraft Into White Adipose Tissue
3. 学会等名 ATC 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoaki Sakata, Gumpei Yoshimatsu, Shohta Kodama
2. 発表標題 A novel type of intraperitoneal islet transplantation named "rolling-up method using epididymal adipose tissue".
3. 学会等名 17th World Congress of the INTERNATIONAL PANCREAS & ISLET TRANSPLANT ASSOCIATION (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田直昭、吉松軍平、田中智子、小玉正太
2. 発表標題 膵島移植における移植環境としての脂肪組織の特性
3. 学会等名 第18回日本組織移植学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田直昭、吉松軍平、田中智子、川上 亮、小玉正太
2. 発表標題 組織移植における移植部位としての白色脂肪組織の意義
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田直昭、吉松軍平、小玉正太
2. 発表標題 臍島異種移植における移植部位としての脂肪組織の可能性を考察する
3. 学会等名 第22回日本異種移植研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap https://researchmap.jp/read0154889 福岡大学研究者情報 https://resweb2.jhk.adm.fukuoka-u.ac.jp/FukuokaUnivHtml/info/7263/R108J.html
--

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	吉松 軍平 (Yoshimatsu Gumpei) (50569275)	福岡大学・医学部・准教授 (37111)	

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	小玉 正太 (Kodama Shohta) (90549338)	福岡大学・医学部・教授 (37111)	

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