

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08944

研究課題名(和文) 異種膵島移植用のブタの作出と異種膵島移植の実現への標準作業手順書の作成

研究課題名(英文) Generation of designated pathogen-free pig and challenge of Pig-to-Primate Islet Xenotransplantation

研究代表者

長屋 昌樹 (Nagaya, Masaki)

明治大学・研究・知財戦略機構(生田)・研究推進員

研究者番号：90329300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病(本症)患者に対する膵ランゲルハンス島(膵島)移植療法の実施例は増え続けている一方、臓器不足によりレシピエント候補の患者は移植の待機中に様々な合併症を発症し亡くなっている。臓器不足を解消する一つとして異種移植がある。2016年、我が国でも厚生労働省が移植用動物の作成法、異種の細胞や臓器のヒトへの移植等を定めた指針を改定し、異種移植はいよいよ準備段階にきた。ヒトへの異種膵島移植を目指すには、感染症法に基づく特定病原体が存在しないDesignated Pathogen-Freeブタの作出と飼育が必須である。本ブタから安定的に機能する膵島が確保され、適正に移植されなくてはならない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同種間ではもはや絶対的ドナー不足を改善させる方法はない。2016年、厚生労働省が改定した異種移植に関する指針により、我が国においても異種動物間移植が実施できる可能性が生まれた。ブタの膵島を用いたヒトへの移植の安全性に関するデータは蓄積され始めている。我が国で本症に対するブタの膵島移植を想定した場合、現在、国内においてはDPFブタを安定的に作出している施設はなく、またDPFブタのどの年齢の膵島を使用するかは、まだ世界中でも議論の中にあり結論に至っていない。本研究は全てを完遂してはいないが、現行までの成果も、我が国におけるブタを用いた異種移植治療の実現に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although the number of islet transplants for type 1 diabetes has increased, potential recipients have developed various complications and died while waiting for a transplant due to the shortage of organs. One way to alleviate the organ shortage is through xenotransplantation. However, the establishment of pig-to-human xenotransplantation requires Designated Pathogen-Free (DPF) pigs, which are free of specific pathogens; safe, stably functioning islets from DPF pigs must be secured and properly transplanted.

研究分野：一般外科

キーワード：糖尿病 膵島移植 ブタ 免疫不全 異種移植 DPF 膵ランゲルハンス島

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病 (以下、本症)患者に対する膵ランゲルハンス島 (以下、膵島)移植療法の実施例は増え続けているものの、ドナー数は移植を待ちわびる患者数においつかない、いわゆる臓器不足によりレシピエント候補の患者は移植の待機中に様々な合併症を発症し亡くなっている。臓器不足を解消する可能性の一つとして「異種移植」がある。2016年、異種移植を禁じていた我が国でも、厚生労働省が移植用動物の作成法、異種の細胞や臓器のヒトへの移植等を定めた指針を改定し、異種移植はいよいよ準備段階にきた。ヒトへの異種膵島移植の実現を目指すには、感染症法に基づく特定病原体が存在しない Designated Pathogen- Free (DPF)ブタの作出と飼育が必須である。そして、本ブタから安全に、安定的に機能する膵島が確保され、適正に移植されなくてはならない。

### 2. 研究の目的

(A) DPF ブタの作出と飼育、(B) DPF ブタからの適切な膵島分離時期の同定、膵島の分離法の確立、(C) DPF ブタからの膵島分離における標準業務手順書 (standard operating procedure: SOP)の作成、(D) 分離した膵島はバイオ人工膵臓 (Bioartificial pancreas (BAP)とし、ヒト型糖尿病ミニブタに鏡視下手術にて移植、(E) 移植後の膵島の追跡から移植に最適な部位の探索と移植後の膵島の機能評価、を目的とした。

### 3. 研究の方法

(A) DPF ブタの作出と飼育: DPF ブタは Uterectomy- isolated Rearing (U- iR)法により作出した。U- iR 法は、妊娠末期のブタに対し、a. 子宮全摘出術、b. 無菌アイソレーター内による胎児の蘇生、c. 幼若ブタの人工哺育、と3つの行程により確立されている。実際に、全身麻酔下、妊娠ブタ(胎齢110日前後)に対し、開腹手術にて子宮を摘出した。摘出した子宮は、消毒槽を介し無菌アイソレーター(回収ユニット)に移した。回収ユニット内にて子宮から直ちに産仔を取り出し蘇生処置を行った。産仔の蘇生後は、回収ユニットに連結する別のアイソレーター(飼育ユニット)に産仔を移動し、 $\gamma$ 線を照射したブタ用人工乳による人工哺育を開始した。人工哺育を行う飼育アイソレーターは、クラス1000のクリーンブース内に設置、蘇生と飼育ユニット間は、無菌を保持出来る方法で接続した。産仔は実験終了まで、飼育ユニット内で飼育管理を行った。

U- iR 法で獲得した産仔の無菌性を確認するために、毎週、ブタの体表面、口腔粘膜および糞便を採取し微生物学的検査を実施した。サンプルは、日本実験動物学会の規定に則った標準プロトコルによりチオグリコレートおよびポテトデキストロース寒天培地で培養し、厚生労働省が指定する病原体を含んだ一般細菌/真菌に対する無菌試験を実施した。

(B) DPF ブタからの適切な膵島分離時期の同定、膵島の分離法の確立: 本症の患者へのブタの膵島を用いた異種移植を想定した場合、DPF ブタは、無菌環境の必要性、無菌環境でのブタの哺育、を必要とし、高コストとなる。それゆえ、異種膵島移植には幼若の DPF ブタの使用が現実的である。一方で、幼若ブタは成長に伴い膵島の分布、数、さらに形態はインシュリン細胞塊から膵島へと刻々と変化するため、膵島の分離時期は移植の結果に大きく影響を与える。膵島分離を行うブタの週数の決定はこれまでの著者らの検討 (Nagaya M, et al: PLoS One. 2019;14:e0216254.)を参考にし、本試験では、基礎検討として日齢、14日、30日のブタを選定した。膵島分離は著者らの手法 (Nagaya M, et al. Pancreas. 2015;44:778-85.)に準じ、若干の修正を加えて行なった。簡単に、生体内をヘパリン化、脱血、ET-Kyoto 液を大動脈から灌流した後膵臓を摘出した。膵全体にコラゲナーゼを注入し、膵臓を細切、Ricordi®チャンバーで機械的に組織を破壊した後、これらを回収、培養を行った。膵島は一般的なフラスコおよび、スピナーフラスコによる培養の2群を設定し行った。分離した膵島、あるいは移植後の膵島に対する評価は分子生物学的な手法にて解析を行なった。

(C) DPF ブタからの膵島分離における SOP の作成: 膵島の品質保持、業務の均質化には、ブタの選定、施設管理の方法、作業工程等、作業や進行上の手順についての検討が必要となる。検証結果を順序だてて詳細に文書化する。原案ができ次第、農学、再生、移植の専門家等、著者が頻りに交流を重ねている国内外の有識者にレビューを依頼して精度を追求することとした。

(D) BAP のヒト型糖尿病ミニブタに鏡視下手術にて移植: 現在、ブタの膵島を本症の患者に異種移植する臨床試験では BAP として腹腔内に移植されている。BAP は高分子ゲルや半透膜等で分離した膵島を被覆してカプセル化したものである。それゆえ BAP となったドナー膵島はレシピエント内での免疫担当細胞の攻撃を回避できるため、レシピエントは免疫抑制剤を使用しなくてよい。BAP の作成は、著者が在籍した Joslin 糖尿病センターで行なった手法を取り入れた。簡潔に、BAP は 0.9% (wt/vol.)塩化ナトリウムに 1.5% (wt/vol.)のアルジネートを準備し electrostatic droplet generator を用いて作成する。ポンプに接続したチューブにアルギン酸と膵島を混ぜ合わせて注入し、陽イオン性樹脂水溶液に滴下、アルジネートと架橋を形成させてマイクロカプセルを作成することとした。

また、著者らはこれまでに糖尿病モデルブタである変異型ヒト Hepatocyte Nuclear Factor 1(HNF-1) $\alpha$  transgenic (tg)ブタを作出し、ここからヒトと同じくらいの体重となるヒト型糖尿病ミニブタの作出法を樹立した(Nagaya M, et al. World J Diabetes. 2021;12:306-330. )。一方、本ブタは多数を本試験に使用できないため、Eの目的を達するために、さまざまな外科的免疫不全ブタの作成も行なった。Itohらの報告(Itoh Met al., Nat Commun. 2019;10:2244.)に若干の変更を加えて、いずれも野生ブタから3種(i-iii)の免疫不全ブタを作出した。(i)全身麻酔下、頸部を正中切開して胸腺を切除、さらに腹部を正中切開して脾臓を切除した。同時に、胃瘻を造設した。(ii)脾臓摘出術を行わず、胸腺摘出と胃瘻の造設を施行した。(iii)胃瘻造設術のみ、を施行した。3種のブタに対して、タクロリムス水和物(Pfizer, New York, NY, USA; 0.5 mg/kg/日)、ミコフェノール酸モフェチル(MMF; Pfizer; 60mg/kg /日)、の免疫抑制剤、さらにプレドニゾロン(Teva Takeda Yakuhin, Tokyo, Japan; 20mg/日)、をi-iii、3種全てのブタにおいて、上記手術の6日後より胃瘻から投薬した。免疫抑制剤の投与6日目、10日目、24日目に、各個体の耳静脈から採血し、血中タクロリムスおよび血中MMF濃度の測定と白血球分画測定を実施した。タクロリムスおよびMMFの投与量は、トラフレベルの結果に合わせて薬剤の投与量を調整した。

(E) 移植後の膵島の追跡から移植に最適な部位の探索と移植後の膵島の機能評価:

腹腔鏡でブタの体内に細胞を移植する手技は問題なく行えるので、まずは開腹手術にてこれまで一般的に行われてきている腎皮膜下、大網、膵臓内ヘトレーサー付きの細胞の移植を行い、さらには移植法についても検証した。移植に用いた細胞は、確実に追跡できるようヒト子宮頸癌細胞株 HeLa S3 に赤色蛍光タンパク tdTomato を発現するように改変した細胞を用いた(Hasegawa K and Nagaya M et al., Regen Ther. 2022;21:62-72. )。移植細胞は  $3 \times 10^6$  cells/0.2mL または  $1 \times 10^5$  cells/0.05mL となるように調整し移植した。

#### 4. 研究成果

(A) DPF ブタの作出と飼育: 前述の a-c の行程は滞りなく実施できること、プロトタイプのアイスレーター内での飼育では、1週間ごとの検査でもブタは無菌状態が保たれていること、アイスレーター内でのブタの組織の採材も可能であった。

(B) DPF ブタからの適切な膵島分離時期の同定、膵島の分離法の確立、(C) DPF ブタからの膵島分離における SOP の作成: 日齢 14、30 日のブタからの膵臓の摘出は問題なく施行できた。膵島の採取においても、期待しうる組織の収量の確保が可能であった。30 日齢の膵島で検証を行った。培養中の膵島の生存率の算出は 2 種類の核染色試薬、アクリジンオレンジ (Acridine Orange: AO)とヨウ化プロピジウム(Propidium Iodide: PI)を用いて行った。膵臓の生存率は培養 7 日目において、フラスコ、スピナーフラスコ群共に 80%を超える生存率であった(図.1)。ジチゾン染色にて回収した細胞塊が膵島であるか否かの判別をした。分離した細胞塊はジチゾン染色に反応し、両培養法群ともにジチゾン染色陽性である  $\beta$  細胞を含んだ細胞塊が 80%以上であった。ジチゾン染色に加え、免疫染色を行った結果、細胞はインスリン陽性かつグルカゴン陽性細胞であることが確認できた(図.2)。培養中は膵島から培養液に分泌されるインスリン量で評価を行い、フラスコ>スピナーフラスコの結果を得た。培養 11 日目は 7 日目と比し、細胞のインシュリン含有量が約 8 倍まで増加することが判明した。(C) 機能的な膵島を安定的に確保するための SOP の作成では上述の通り、本試験は現在も継続中であるため、SOP は順次作成していくこととなる。

(D)分離した膵島は BAP とし、ヒト型糖尿病ミニブタに鏡視下手術にて移植: 培養 7 日目以降、膵島の大きさは  $\phi 100-300\mu\text{m}$  であったため、BAP のためのカプセルの大きさは  $\phi$  約  $500\mu\text{m}$  とすることとした。上述した、i-iii の 3 種の外科的に免疫不全を誘発するための手術および細胞移植は術後の合併症もなく施行しえた。

(E) 移植後の膵島の追跡から移植に最適な部位の探索と移植後の膵島の機能評価: i、iii では、いずれの移植部位においても移植 2 週間後まで、赤色蛍光で移植細胞由来の腫瘍が確認できた。一方、ii では、移植 1 週間後の時点で腫瘍は観察できなかった。このブタは 1 頭の準備であったが、移植 2 週間後まで MMF が有効血中濃度に達しなかった。

まとめ: 同種間ではもはや絶対的ドナー不足を改善させる方法はない。2016 年、厚生労働省が改定した異種移植に関する指針により、我が国においても異種動物間移植が実施できる可能性が生まれた。ブタの膵島を用いたヒトへの移植の安全性に関するデータは蓄積され始め、ブタの膵島は本症の患者に対する臓器不足を解消できる可能性をもつ。我が国でブタの膵島を用いた本症の治療を想定した場合、現在、国内においては DPF ブタを安定的に作出している施設はなく、また DPF ブタのどの週齢の膵島を使用するかは、まだ世界中でも議論の中にあり結論に至っていない。本研究は全てを完遂してはいないが、現行までの成果も、我が国におけるブタを用いた異種移植治療の実現に寄与すると考えられる。

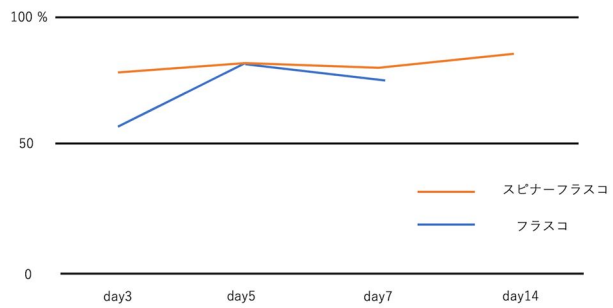


図.1. フラスコとスピナーフラスコにおける膵島の生存率

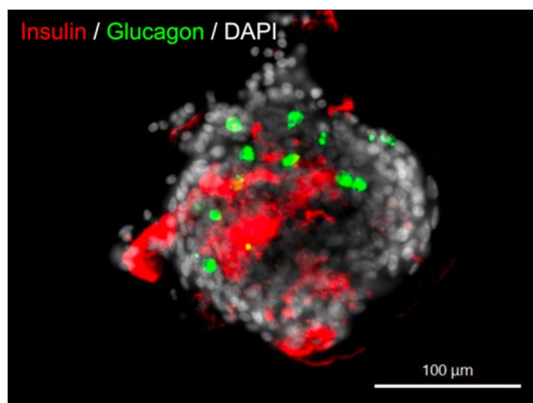


図.2. 膵島におけるインスリンおよびグルカゴン染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagaya Masaki, Hasegawa Koki, Uchikura Ayuko, Nakano Kazuaki, Watanabe Masahito, Umeiyama Kazuhiro, Matsunari Hitomi, Osafune Kenji, Kobayashi Eiji, Nakauchi Hiromitsu, Nagashima Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Feasibility of large experimental animal models in testing novel therapeutic strategies for diabetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Journal of Diabetes	6. 最初と最後の頁 306 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4239/wjd.v12.i4.306	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 Nagaya Masaki, Hasegawa Koki, Uchikura Ayuko, Nakano Kazuaki, Watanabe Masahito, Umeiyama Kazuhiro, Matsunari Hitomi, Osafune Kenji, Kobayashi Eiji, Nakauchi Hiromitsu, Nagashima Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Feasibility of large experimental animal models in testing novel therapeutic strategies for diabetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Journal of Diabetes	6. 最初と最後の頁 306 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4239/wjd.v12.i4.306	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 Nagaya Masaki, Hasegawa Koki, Watanabe Masahito, Nakano Kazuaki, Okamoto Kazutoshi, Yamada Takeshi, Uchikura Ayuko, Osafune Kenji, Yokota Harumasa, Nagaoka Taiji, Matsunari Hitomi, Umeiyama Kazuhiro, Kobayashi Eiji, Nakauchi Hiromitsu, Nagashima Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Genetically engineered pigs manifesting pancreatic agenesis with severe diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Research & Care	6. 最初と最後の頁 e001792 ~ e001792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjdr-2020-001792	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 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 渡邊将人, 梅山一大, 小林俊寛, 中野和明, 内倉鮎子, 長屋昌樹	4. 巻 19
2. 論文標題 再生医療におけるモデルブタの開発と利用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 再生医療	6. 最初と最後の頁 22-31
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 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 Hasegawa K, Nakano K, Nagaya M, Watanabe M, Uchikura A, Matsunari H, Umeyama K, Kobayashi E, Nagashima H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Transplantation of human cells into Interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs under several conditions.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regen Ther.	6. 最初と最後の頁 62-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2022.05.010.	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2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 長谷川航希, 中野和明, 岡本一駿, 山田孟, 内倉鮎子, 長船健二, 横田陽匡, 長岡泰司, 松成ひとみ, 渡邊将人, 梅山一大, 小林英司, 中内啓光, 長屋昌樹, 長嶋比呂志
2. 発表標題 Pdx1-Hes1 トランスジェニックブタにおけるインスリン分泌細胞を欠失する膵組織の発達
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 長屋昌樹, 中野和明, 松成ひとみ, 渡邊将人, 梅山一大, 長嶋比呂志
2. 発表標題 異種再生膵島移植の構想
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021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

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