

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08643

研究課題名（和文）3次元血管化膵組織による1型糖尿病に対する新規膵島移植治療の開発

研究課題名（英文）Development of Novel Islet Transplantation Therapy for Type 1 Diabetes Mellitus Using 3D Vascularized Pancreatic Tissue

研究代表者

高市 翔平（Takaichi, Shohei）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：30804877

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）：本研究は、これまでにLbL法によりhiPS細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞からなる血管化組織を構築し、その皮下移植により、1型糖尿病化モデルマウスにおける治療効果を報告してきた。また教室からは肝再生における筋芽細胞の有効性を報告しており、実臨床の観点から使用する細胞種の低減を目的とし、同細胞を間質細胞として使用し、膵島移植における有効性を検討した。マウス膵島細胞および筋芽細胞の共培養を行い、インスリン分泌能の増強を認め、その機序としてグラフトの血管新生および網羅的解析により膵島細胞内のJAK-STAT経路の関与が考えられた。またモデルマウスへの腎被膜下への共移植により治療効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで報告を行ったLbL法による血管化膵組織の開発を、使用する細胞種の低減を研究目的の一つとし、膵島移植における筋芽細胞の有効性を検討した。in vitro実験では、膵島細胞と筋芽細胞の共培養によりグルコース刺激に応答し、インスリン分泌能の増強を認め、その機序としてグラフト内への血管新生および膵島細胞内のJAK-STAT経路の関与が考えられた。in vivo実験では、膵島細胞と筋芽細胞の1型糖尿病モデルマウスへの腎被膜下への共移植による治療効果を認めた。得られた結果は、筋芽細胞のpotentialのみならず、膵島移植における新たな治療標的開発に応用可能な知見となり得る。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have constructed vascularized pancreatic tissues consisting of hiPS beta cells, vascular endothelial cells, and fibroblasts by the LbL method, and have reported the therapeutic efficacy of subcutaneous transplantation of the tissue in a mouse model of type 1 diabetes mellitus. We have also reported the efficacy of myoblast in liver regeneration. To reduce the number of cell types used from a practical clinical perspective, we used myoblast as a stromal cell and examined the efficacy in islet cell transplantation. As a result, co-culture of mouse islet cells and myoblasts enhanced insulin secretion, which might be due to the graft angiogenesis and the involvement of the JAK-STAT pathway in islet cells as a molecular mechanism by comprehensive analysis. Co-transplantation of islet cells and myoblasts under the renal capsule of model mice showed therapeutic effects.

研究分野：肝胆膵疾患領域における基礎研究

キーワード：膵島移植 再生医療 1型糖尿病 筋芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病患者に対する根治療法として、膵 細胞補充療法である膵島移植が施行されているものの、ドナー不足が膵島移植治療の制限の 1 つとなっている。これに対し、細胞ソースとして多能性幹細胞由来 細胞 (hiPS 細胞) を使用し、その安全な移植部位である皮下への移植により、この問題を克服できる可能性があるが、皮下は組織生着に必要な血流に乏しいことが課題として残されている。我々はこれまでに、LbL 法を用いて細胞の積層化を可能にする技術を利用して、hiPS 細胞、血管内皮細胞、ヒト皮膚線維芽細胞を用いて、血管化膵組織を構築し、血流が乏しいという問題点を克服し得る 1 型糖尿病に対する新規皮下移植法の開発を行ってきた (Takaichi, Transplantation 2022)。

2. 研究の目的

上記を背景とし、実臨床への応用を目的に、hiPS cell 細胞数の違いによる治療効果の評価 間質細胞として共培養に用いる細胞種の検討 血管化組織のインスリン分泌能における分子メカニズムの解明が課題であると考えられた。 について、現在使用可能である iPS 細胞の純度は 50%程度であること、また多額の費用を要することから、細胞ソースとし、当教室で分離手技を確立しているマウス膵島を使用する方針とした。 について、特に実臨床の観点から、血管化組織の構築および共移植する細胞種の低減が必要であると考えられた。教室からは、筋芽細胞をシート化し、その肝硬変モデルマウスへの移植により、肝再生が促進されることを報告している (Toya, Transplantation 2023)。その機序として、血管内皮細胞を共移植することなく、筋芽細胞からの VEGF の分泌によるレシピエント肝からの血管新生が考えられた。そこで、同報告を根拠とし、血管化内皮細胞を用いず、筋芽細胞を使用した膵 細胞共移植による有効性を検討した。 については、膵島移植における筋芽細胞の有効性の検討のみならず、膵島移植における膵島機能のポテンシャルを解明する一助になり、新規治療標的開発に応用可能な知見となりうると考え、上記を本研究の目的と設定した。

3. 研究の方法

in vivo、in vitro 実験で使用するマウス膵島の単離に Jcl:ICR マウスを使用した。筋芽細胞はコスモバイオ社の ICR マウス由来筋芽細胞を使用した。in vitro 実験での共培養系では、カルチャーインサートを使用し、膵島細胞と筋芽細胞の共培養を行い、ELISA 法による培養上清中のサイトカイン測定、グルコース刺激によるインスリン分泌試験を行った。Western blotting 法、RT-PCR 法でタンパク質および遺伝子の発現量を評価した。単独培養を行った膵島細胞および筋芽細胞と共培養を行った膵島細胞をそれぞれで RNA sequencing による網羅的解析を行った。in vivo 実験では、ストレプトゾシン誘導による 1 型糖尿病モデルマウスを使用し、膵島細胞単独移植および膵島細胞と筋芽細胞の共移植による同種同系移植を行った。

4. 研究成果

1) 細胞実験における共培養系での血管新生に関するサイトカイン分泌能の検証

in vitro 実験では、膵島単独培養群と比較し、共培養群において血管新生に関するサイトカインである VEGF、HGF、SDF-1 の経時的な分泌量の有意な増加を認めた (図 1)。

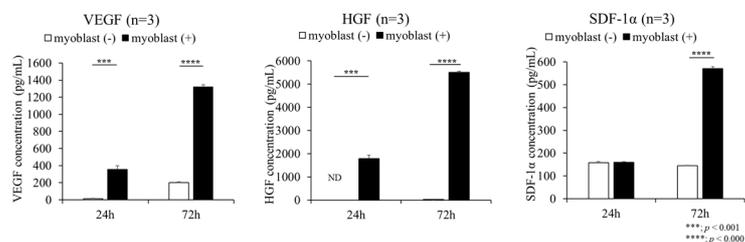


図 1 血管新生に関するサイトカイン分泌量の比較

2) 細胞実験における共培養系でのインスリン分泌能の検証

膵島単独培養群と比較し、共培養群で有意にインスリン遺伝子発現量が高かった (図 2)。グルコース刺激試験では、膵島単独培養群と比較し、共培養群で有意にインスリン分泌量が高く (図 3 左) GSIS index も有意に高値であった (図 3 右)。

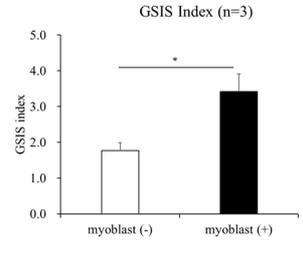
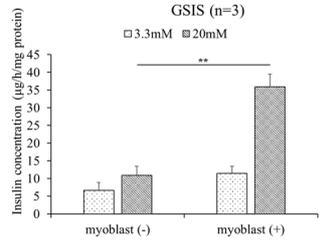
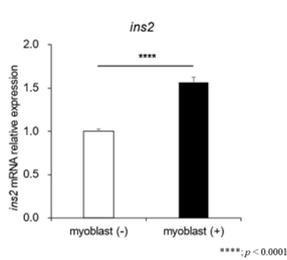


図2 インスリン遺伝子発現量の比較

図3 グルコース刺激試験でのインスリン分泌量（左）、GSIS（右）の比較

3) 動物実験における共移植の機能検証

in vivo 実験では、膵島単独移植群に比較し、共移植群で有意に糖尿病モデルマウスの血糖値の低下（図4左）および体重増加（図4右）を認めた。

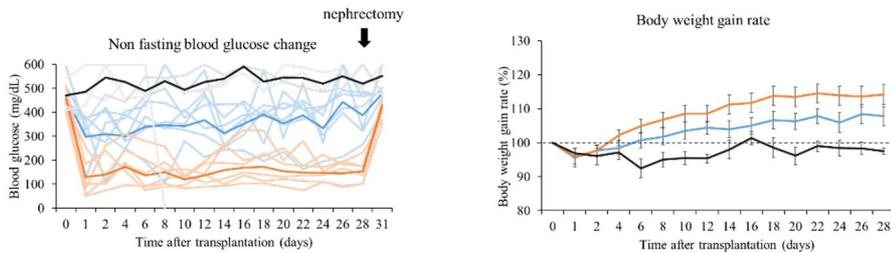


図4 移植後の糖尿病モデルマウスの血糖値（左）および体重の推移（右）の比較

グルコース負荷試験では、膵島単独移植群に比較し、共移植群で有意に血糖上昇が抑制された（図5）。

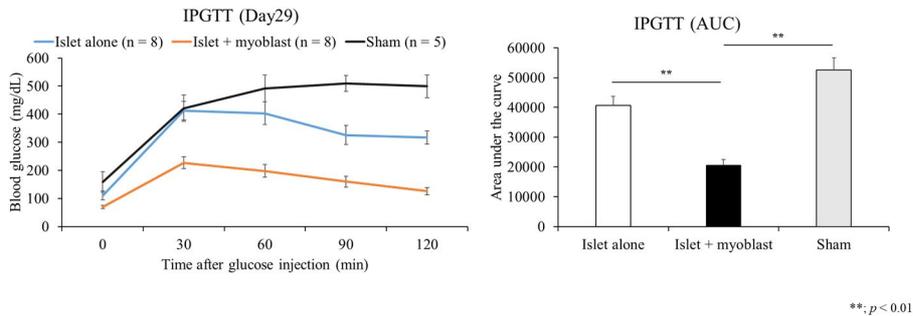


図5 移植後の糖尿病モデルマウスでのグルコース負荷試験での血糖値（左）およびAUC（右）の比較

膵島単独移植群に比較し、共移植群で有意にグラフト内のインスリン陽性面積が大きかった（図6左）。血管新生の評価として、膵島単独移植群に比較し、共移植群で有意にグラフト内のCD31陽性面積（図6中）および SMA陽性面積（図6右）が大きかった。

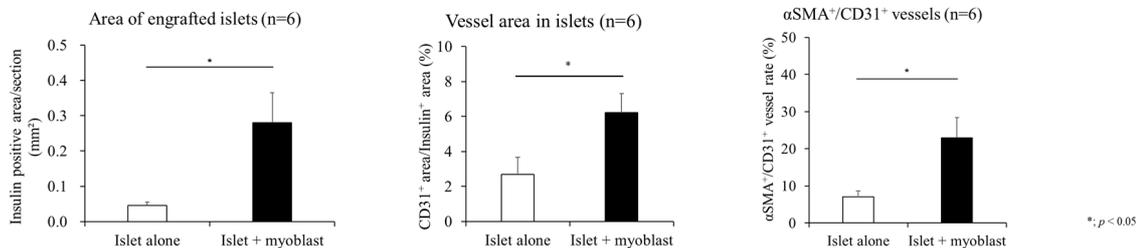


図6 グラフト内のインスリン陽性面積（左）、CD31陽性面積（中）、SMA陽性面積（右）の比較

4) 共培養および共移植におけるグラフト機能増強における分子メカニズムの解明

膵島単独培養群および共培養群の膵島細胞より抽出し行った RNA sequencing より取得したデータリストより、Gene ontology enrichment analysis を行い、JAK-STAT 経路の亢進が示唆された（図7）。また JAK 阻害剤である P6 を使用し、筋芽細胞による膵島細胞インスリン分泌の上乗せ

効果の阻害を認めた (図 8)

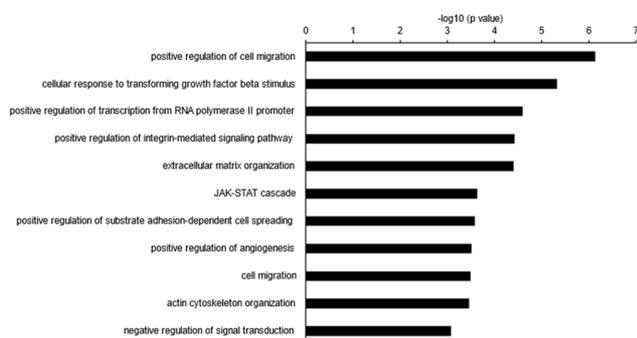


図 7 共培養での膵島細胞における発現遺伝子の網羅的解析

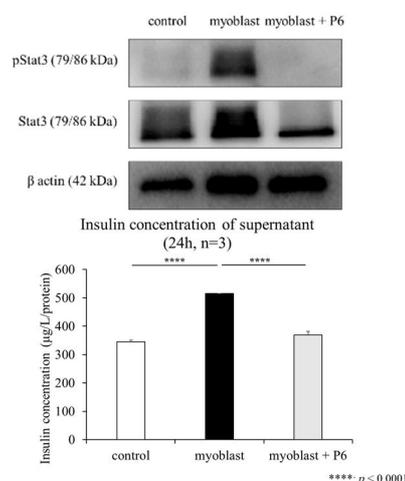


図 8 共培養および JAK 阻害剤投与下でのリン酸化 STAT3 (上)
およびインスリン分泌量 (下) の比較

in vivo 実験で摘出したグラフトの免疫組織化学染色で、共移植群で有意にグラフト内の pSTAT3 陽性率が高かった (図 9)

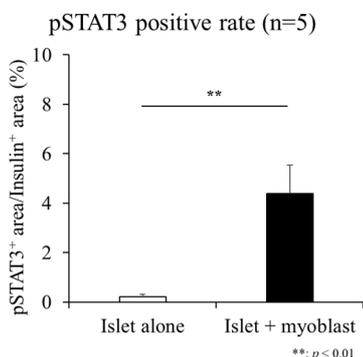


図 9 グラフト内のリン酸化 STAT3 陽性面積の比較

5) 結論

以上、我々は、本研究の成果として、筋芽細胞が糖尿病モデルマウスに移植した膵島移植片の機能が増強することを示した。in vitro および in vivo 実験で得られた知見に基づき、この効果のメカニズムとして、血管新生と JAK-STAT シグナル活性化による膵島移植片の機能向上という 2 つの可能性が考えられた。今回の結果は、膵島移植に筋芽細胞を含めることの臨床的有用性の可能性を示唆するばかりでなく、膵島移植における新たな治療標的開発に応用可能な知見となり得る。

6) 考察・展望

本研究のコンセプトは、膵 細胞補充療法である膵島移植の細胞ソースとして hiPS 細胞を使用し、その安全な移植部位である皮下への移植により、本邦における移植治療の問題の一つであるドナー不足の解消を可能にする移植方法の開発であった。我々は、LbL 法により、hiPS 細胞、血管内皮細胞、およびヒト皮膚線維芽細胞を使用することにより、3 次元血管化膵組織を構築し、その 1 型糖尿病モデルマウスへの皮下移植により一定の治療効果を認めた。上記に記載した通り、実臨床への応用を念頭に、hiPS cell 細胞数の違いによる治療効果の評価 間質細胞として共培養に用いる細胞種の検討 血管化組織のインスリン分泌能における分子メカニズムの解明を新たな研究目的に設定した。 については、研究費用の観点から、十分に検討することは難しかったが、当教室で分離手技を確立しているマウス膵島を使用することによって、 を目的とする実験継続を可能とした。 については、仮説通り、間質細胞として筋芽細胞を用いることにより、使用する細胞種を低減し、グラフトの血管化を機序の一つとしながら、腎被膜下への移植によってモデルマウスへの治療効果を認めた。今後、同手法を血流の乏しい皮下組織への移植を可能とする、さらなる研究開発が課題の一つであると考えられる。 については、インスリン分泌能増強における、筋芽細胞が膵島細胞におよぼす影響について、発現遺伝子の網羅的解析により新たな知見を得ることができた。本結果をもとに、新たな治療標的の同定およびその移植方法への応用が、今後の研究課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takaichi Shohei, Tomimaru Yoshito, Akagi Takami, Kobayashi Shogo, Fukuda Yasunari, Toya Keisuke, Asaoka Tadafumi, Iwagami Yoshifumi, Yamada Daisaku, Akita Hirofumi, Noda Takehiro, Gotoh Kunihito, Doki Yuichiro, Akashi Mitsuru, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 106
2. 論文標題 Three-dimensional Vascularized β -cell Spheroid Tissue Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells for Subcutaneous Islet Transplantation in a Mouse Model of Type 1 Diabetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 48 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TP.00000000000003745	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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富丸慶人, 小林 省吾, 佐々木 一樹, 岩上 佳史, 山田 大作, 野田 剛広, 高橋 秀典, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 教室におけるこれまでの1型糖尿病に対する再生医療と今後の展開
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 門威志, 富丸慶人, 小林省吾, 佐々木一樹, 岩上佳史, 山田大作, 野田剛広, 高橋秀典, 土岐祐一郎, 江口英利
2. 発表標題 骨格筋由来筋芽細胞を用いた1型糖尿病に対する新規膵島移植法の開発
3. 学会等名 第51回日本膵・膵島移植学会学術集会
4. 発表年 2024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
研究 分担者	小林 省吾 (Kobayashi Shogo) (30452436)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授 (14401)	
研究 分担者	富丸 慶人 (Tomimaru Yoshito) (70528570)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	

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