

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12654

研究課題名（和文）血管内皮網付膵島 細胞シートによる膵臓様組織構築法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a pancreas-like tissue construction method using pancreatic islet beta cell sheets with vascular endothelial network

研究代表者

本間 順（Homma, Jun）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：50507366

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）：本研究は血管内皮含有膵島 細胞シートの作製プロトコルを確立するとともに、血管内皮含有膵島 細胞シートを皮下に積層移植することで膵臓様組織を構築することを目的とし研究を行った。研究成果として次の3つを得た。血管内皮含有膵島 細胞シート作製条件の適正化を血管内皮細胞、脂肪間葉系幹細胞、膵島 細胞の3種共培養で行い、プロトコルを確立した。血管内皮含有シートの組織内血管網構築における有用性を、培養系とラット移植の2つの実験系で、血管内皮細胞なしの細胞シートと比較することで示した。血管内皮含有膵島 細胞シートを積層することで構築した膵臓様組織がラット移植後もインスリンを分泌することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、血管内皮を含む膵島 細胞シートの作製プロトコルを確立し、膵臓様組織を構築するための新しいアプローチを開発した。血管内皮細胞、脂肪間葉系幹細胞、膵島 細胞の共培養によって効率的な血管網の形成が可能となり、血管内皮細胞と膵島 細胞の相互作用など膵臓の生理的機能を模倣できるようになった。これにより、生体に近い膵島薬理試験モデルの構築に応用できると考えられる。さらに、血管内皮を含む膵島 細胞シートの移植により、膵島 細胞組織周囲に高密度な血管網が構築され、血管内皮細胞を含まない膵島 細胞シートよりも高いインスリン分泌が確認された。これらの研究成果は、膵臓再生医療実現への基盤研究となり得る。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to establish a protocol for creating pancreatic islet-cell sheets containing endothelial cells and to construct pancreas-like tissue by layering these sheets under the skin. The study achieved three significant outcomes: 1.Optimized Conditions for Producing Sheets Containing Endothelial Cells: A protocol for efficiently producing sheets containing endothelial cells was established through co-culturing endothelial cells, adipose-derived mesenchymal stem cells, and pancreatic islet -cells. 2.Demonstrated Utility in Constructing Vascular Networks: By comparing in vitro and in vivo experiment with and without endothelial cells, the usefulness of the endothelial cell-containing sheets in developing internal vascular networks was demonstrated. 3.Shown Insulin Secretion Post-Transplant: By layering pancreatic islet -cell sheets containing endothelial cells, pancreas-like tissue was constructed. This tissue continued to secrete insulin post-transplant in rats.

研究分野：組織工学

キーワード：組織工学 細胞シート 膵島 細胞 血管内皮網

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

I型糖尿病は、膵島細胞の機能不全によりインスリン分泌が低下し、血糖コントロール不能となる。治療はインスリン皮下注射療法が一般的だが、永続的に皮下注射を要し、患者の精神的負担は大きく根治療法が望まれている。

現在では、iPS細胞から膵島細胞への誘導が可能になったが、治療には大量の膵島細胞を移植する必要がある。既存の研究では、肝臓門脈域や・腎臓被膜下など血流豊富な部位へ膵臓細胞凝集塊を数回に分けて投与する手法が一般的だが、リスクの高い手技であると共に、レシピエント臓器内に散在して生着するため移植細胞の腫瘍化時の摘出は困難である。

一方、生体外で組織構造を構築する組織工学研究が進んでいる。申請者所属施設で開発した温度応答性培養皿により低温処理のみで採取できる細胞シートは、接着因子を保持しているため、細胞シート同士の接着も良好である。本技術を用いて申請者は、筋芽細胞シート(2017, J. Tissue Eng. Regen. Med)、間葉系幹細胞シート(2018 Tissue Eng. Part A)、ヒト iPS 誘導心筋細胞シート(2020, J. Tissue Eng. Regen. Med)で2次元組織を構築・小動物へ移植し成果を報告した。これらの知見から、膵島細胞シートを用いて糖尿病治療へ資することを目指している。しかし、膵島細胞などの酸素栄養需要が高い細胞は、組織中央が壊死しやすく厚い組織を構築するには血管網の導入は必須となるが、組織への血管網導入技術は組織工学分野での世界的な課題である。

2. 研究の目的

我々は、血管内皮網付心筋シートを段階積層し、血管網を構築しながら厚い心筋組織の構築に成功している (Sekine H. 2013. Nat comm)。本研究では、血管内皮含有膵島細胞シート作製の作製、血管内皮含有シートの組織内血管網構築における有用性、血管内皮含有膵島細胞シートの移植後インスリン分泌の評価を行う。この3つの実験を行うことで、皮下に厚い膵臓様組織を構築するための基盤研究とし、膵臓再生医療開発に資する。

3. 研究の方法

本研究全体をとおして細胞源として、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (hASC)、緑色タンパク発現臍帯静脈血管内皮細胞(GFP-HUVEC)、ラットインスリンノーマ由来 Gluc-insulin 分泌膵島細胞 (iGL)の3種類の細胞を用いた。

(1) 血管内皮含有膵島細胞シート作成法の検討

温度応答性培養皿で3種共培養後何日後に細胞シート化するのが最適かを検討するために、膵島細胞のインスリン分泌能を20mM D-glucose 負荷時の培地内インスリン量で、細胞の生存率を死細胞マーカーであるPIラベルで、それぞれ培養皿播種後に経時的に測定し比較を行った。尚、インスリン量はGlaseの発光強度で測定し比較を行った。

(2) 血管内皮含有シートの血管網構築能の検討

(i) In vitro の血管網構築能を評価するために、血管内皮細胞含有細胞シートを1枚フィブリンゲルへ移植し、day0(移植当日)とday3の血管内皮ネットワークを画像解析し比較した。尚、血管内皮細胞ネットワーク評価はGFP-HUVEC画像を蛍光顕微鏡で取得した画像により行った。

(ii) in vivo 移植後の血管網構築能を評価するために、ASC/iGL共培養シート(sheet)・HUVEC/ASC/iGL共培養シート(EC+ sheet)を各3枚積層後、ヌードラット皮下へ移植し、生着細胞シート内の血流をperfusion ratioで、血管管腔比較を組織切片で行った。

(3) 血管内皮含有膵島細胞シートの皮下移植後の機能検討

血管内皮細胞の有無による皮下移植後の膵島細胞の組織化、インスリン分泌能を評価するために、iGL凝集塊(spheroid)・ASC/iGL共培養シート(sheet)・HUVEC/ASC/iGL共培養シート(EC+ sheet)を各3枚積層後、ヌードラット皮下へ移植した。移植7日後に分泌インスリン量をGlaseの発光強度で、膵細胞組織構造を組織蛍光免疫染色で評価した。

4. 研究成果

(1) 血管内皮含有膵島細胞シート作成法の検討

3種共培養系では、播種後day1,2,3と培養日数が増えるごとに血管内皮細胞のネットワーク化は進んだ。一方膵島細胞のインスリン分泌を20mM D-glucose負荷で刺激し評価したところ、day1 36.1 ± 15.1 , day2 76.9 ± 24.7 , day3 55.6 ± 17.4 , day4 37.3 ± 14.7 (Luminescence intensity $\times 10^5$ AU), とday2をピークに培養日数が経過するに従い分泌能が低下していることが判明した(day1 vs day2, day2 vs day4で統計学的有意差あり)。また、細胞の生存率はday1 98.9 ± 0.3 , day2 97.1 ± 0.3 , day3 86.9 ± 5.6 (%)とday1をピークに経時的に低下することが判明した(すべての組み合わせで統計学的有意差あり)。

インスリン分泌能はday2がピークであるが、day2以降は低下するのに対して、day1はday2より低いもののday1 day2でインスリン分泌能が向上していくこと、細胞生存率は時間とともに低下することを考え、day1で細胞シート化し移植することが膵島細胞の機能を維持するために最適だと考え以降の実験では、温度応答性培養皿へ播種後1日で細胞シート化し実験を行うこととした。

(2) 血管内皮含有シートの血管網構築能の検討

(i) In vitroでの血管内皮ネットワーク構築能

3種共培養シートをフィブリンゲル上へ移植し培養を継続すると、膵島細胞が血管内皮細胞の周囲に自己臓器化し集簇すること、血管内皮細胞網が促進されることが観察された。血管網解析では、血管内皮ネットワーク長はday0 11.3 ± 1.6 , day3 14.7 ± 3.4 (mm/mm²)、ネットワーク分岐数はday0 72.4 ± 23.7 , day3 103.4 ± 39.4 (個/mm²)と2つの指標ともに統計学的に有意に増加しておりネットワーク化が進むことが示された。

(ii) In vivo移植後の血管網構築能

ラット臀部へ移植した3種共培養細胞シート(EC+ sheet)と2種共培養シート(sheet: 血管内皮なし)の血流を比較したところ、血流系を用いたPerfusion ratioで血管内皮細胞を含有している細胞シートの方が有意に血流が高かった(EC+ sheet vs sheet: 1.52 ± 0.13 vs 1.11 ± 0.08)。また、組織学切片で血管数を比較したところ血管内皮細胞含有細胞シートに含まれる血管数は血管内皮を含まない細胞シートよりも有意に多かった(EC+ sheet vs sheet: 1751 ± 295 vs 1073 ± 137 血管数/mm²)。

(i)(ii)の結果により、in vitroでもin vivoでも血管内皮細胞含有細胞シートは血管網が密に構築されることが示された。

(3) 血管内皮含有膵島細胞シートの皮下移植後の機能検討

iGL凝集塊(spheroid)・ASC/iGL共培養シート(sheet)・HUVEC/ASC/iGL共培養シート(EC+ sheet)をヌードラット皮下へ移植7日後の血中インスリン量は、spheroid 2.1 ± 1.0 , sheet 8.8 ± 3.4 , EC+ sheet 13.9 ± 1.6 (Luminescence intensity $\times 10^3$ AU)と血管内皮細胞含有細胞シートが生着後も有意にインスリン分泌能が高いことが示された。

本研究成果により、血管内皮細胞含有細胞シートは血管網構築だけでなく、インスリン分泌能向上にも寄与することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Homma Jun, Sekine Hidekazu, Shimizu Tatsuya	4. 巻 29
2. 論文標題 Tricultured Cell Sheets Develop into Functional Pancreatic Islet Tissue with a Vascular Network	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 211 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.tea.2022.0167	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 Yago Hiroki, Homma Jun, Sekine Hidekazu, Higashi Yuhei, Sakurai Hiroyuki, Shimizu Tatsuya	4. 巻 15
2. 論文標題 The bioengineering of perfusable endocrine tissue with anastomosing blood vessels	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biofabrication	6. 最初と最後の頁 045010 ~ 045010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1758-5090/ace9fc	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本間 順, 矢後博基, 関根 秀一, 清水 達也
2. 発表標題 臍島様組織構築のための血管内皮共培養膜 細胞シートにおける内皮細胞の役割
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢後博基, 本間 順, 関根 秀一, 東祐平, 清水 達也
2. 発表標題 32 環境灌流培養における栄養および機能血管を有する内分泌組織構築と移植
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本間順
2. 発表標題 再生医療概論 再生医療の基礎知識/次世代の再生医療研究紹介
3. 学会等名 第125回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本間 順, 関根 秀一, 清水 達也
2. 発表標題 血管内皮細胞共培養臍島 細胞シートによる皮下での立体的臍島 細胞組織の構築
3. 学会等名 第21回再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢後 博基, 本間 順, 関根 秀一, 清水 達也
2. 発表標題 生体外における吻合移植可能な臍島 細胞組織の構築
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022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	関根 秀一 (Sekine Hidekazu) (60541737)	東京女子医科大学・医学部・准教授 (32653)	

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