

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591412

研究課題名（和文） 細胞工学を用いた膵島細胞シートの多次元化によるインスリン分泌機能の構築

研究課題名（英文） Insulin secretion ability construction due to hyper dimension of pancreatic islet cell sheet using the cellular engineering

研究代表者

伊勢 一哉（ISE KAZUYA）

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90363746

研究成果の概要（和文）：Lewis ラットの分離膵島をトリプシン処理にて単離し、Laminin-5 を薄層コートした温度応答性培養皿にて接着培養を行った。培養2日目に培養温度を20℃に変化させることにより、膵島細胞をシートとして回収した。これを1型糖尿病モデル SCID マウスの皮下への移植し、機能的および組織学的評価を行った。膵島細胞シートの皮下移植により糖尿病マウスの血糖値は300日を超える長期において正常化を維持した。また、ブドウ糖負荷試験において、正常マウスと同等の血糖値の経時的変化を示した。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic islets were obtained from Lewis rats, and dissociated islet cells were obtained by incubating with trypsin-EDTA. Dissociated islet cells were then plated onto the PIPAAm dishes. After reaching confluency at day 2, islet cells were successfully harvested as a uniformly spread islet sheet by lowering the culture temperature. We then conducted islet sheet transplantation procedure to create neo-islet tissues into subcutaneous space of Streptozotocin-induced diabetic SCID mice. Histological analyses revealed that strip-shaped neo-islet tissues in the subcutaneous space. This neo-islet engineering approach successfully converted the hyperglycemia to euglycemia in all the recipients and sustained the therapeutic effects for 300 days (length of the experiments). We then conducted intra-peritoneal glucose tolerant tests to the recipients, and found that the recipient SCID mice showed glucose changes that are identical to normal mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：I型糖尿病、膵島移植、膵島再生、細胞シート、ティッシュエンジニアリング

## 1. 研究開始当初の背景

I型糖尿病は、幼年期または青年期にもっとも好発し、30歳以前に診断される糖尿病の主な病型である。また糖尿病全体の10~15%を占める。大津らは15歳未満のI型糖尿病発症率を2.46人/10万人(II型糖尿病発症率:1.12人/10万人)と発表している。全国で1800人を超えると思われる患児らは小児期から1日に数回の血糖測定とインスリン注射を行い続けることとなり、常に低血糖や糖尿病性ケトアシドーシスを発症する危険性、腎障害の末生涯透析を受けるなどのリスクを負うことになる。日本における膵島移植は、膵・膵島移植研究会(当講座事務局)の膵島移植班(当講座事務局)を中心に臨床実施体制が整備され、2007年3月までに、65回の膵島分離後、移植条件を満たした34回の膵島移植が18人の患者に行われている。しかし、国内ではもとより、発症率が日本の5倍を超えるといわれている国外でも小児に対する膵島移植はまだ行われていない。その理由として、移植後の免疫抑制剤による悪影響が不明である点が挙げられる。実際、成人の場合、平均2~3回の移植が門脈内注入として行われる。しかし、5年後にインスリンフリーになっている症例は10%程度と報告されており、バラバラになった膵島細胞が、他の臓器移植と同様に生着するためには、免疫寛容の獲得や移植部位、移植膵島の修飾等が課題であると考えられる。我々は以前より、成人I型糖尿病に対する治療を目指し、ヒト膵島分離とともに移植膵島に対する免疫寛容誘導の研究を行ってきた。これまでの実験で膵島をマイトマイシンCで処置することによって、レシピエントの免疫抑制なく、長期に生着させることが可能であることを見出している。また、腎被膜下に移植した場合に、細胞塊を形成し存在する膵島細胞がさらに移植部位の被膜を裏打ちするがごとくシート上に再構築され、炎症細胞浸潤の抑制が起きている事を確認した。主任研究者は、日常診療で小児外科を専門とし、小児糖尿病の悲惨さは痛感しており、小児膵島移植の可能性を明らかにしたいと考えている。最近、肝細胞をシート化し、皮下に移植し長期に構造と機能が維持されたとの報告がある(Nature Medicine. 13, 880-5, 2007)。肝細胞はsingle cellの状態では非常に弱く、培養液中に浮遊させていると、どんどん死んでしまう。体内でsingle cellを生着させる事は難しいが、シート化することにより、繊維芽細胞や、細胞外マトリックスなどで微小環境を構築することが形態・機能を維持していると考えられる。そこで、我々は膵島に着目し、既に細胞シートの作成が可能であることを示した(Biomaterials. 30:5943-9, 2009)。さらにin vitroにおいてインスリン分泌機能を持つ事

を明らかにしている。

## 2. 研究の目的

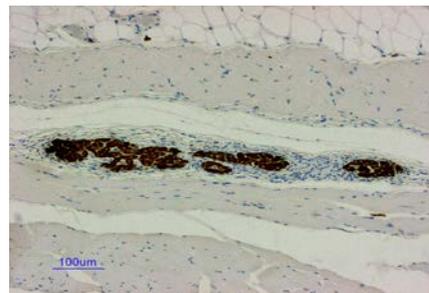
膵島移植研究において、既に、ティッシュエンジニアリングの手法を取り入れた膵島細胞シートを発明している(Biomaterials. 30:5943-9, 2009)。膵島をsingle cellとし、温度応答性培養皿と細胞間マトリックスであるラミニンを用いることにより、シート状に再構築を可能とした。さらにin vitroにおいてはインスリン分泌機能を持つ事を明らかにしており、in vivoにおいても移植まで手技的にも可能である。今後、膵島細胞シートの積層化と血管内皮細胞との接着を促し、膵島機能の増大を図る事を目的とした。

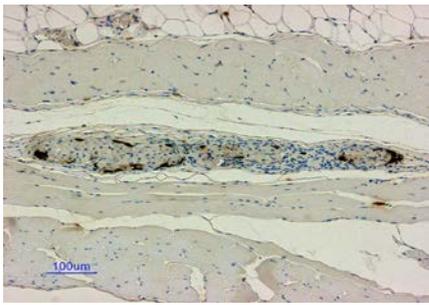
## 3. 研究の方法

Lewisラットの分離膵島をトリプシン処理にて単離し、Laminin-5薄層コートした温度応答性培養皿にて接着培養を行った。培養2日目に培養温度を20℃に変化させることにより、膵島細胞をシートとして回収した。実験1: I型糖尿病モデルSCIDマウスの皮下への移植し、機能のおよび組織学的評価を行った。実験2: 前年度の実験で、皮下移植後60日目の移植部位に新生血管内皮細胞が誘導されていた所見が得られた事から移植直後、移植100日以降など、経時の変化に関して検討した。実験3: 移植前に、移植部である皮下に血管を誘導させてからシートを移植し組織学的および機能的变化を検討した。実験4: 移植部位を、皮下、腸間膜表面、大網として同様に移植し検討した。

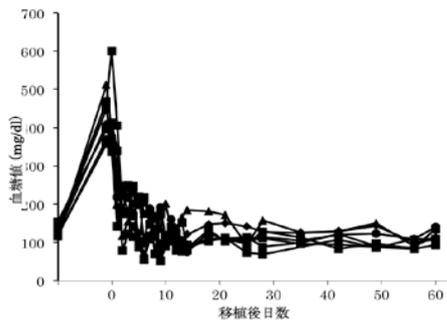
## 4. 研究成果

(1) 大網及び皮下に畳むように移植した組織において、重層された膵島細胞が確認され、InsulinおよびGlucagon陽性細胞から構成される新たな膵島組織の作製に成功した。血管を誘導したモデルでは、炎症性細胞浸潤がみられ、移植後の組織の確認はできず、血糖値の正常化は認めなかった。

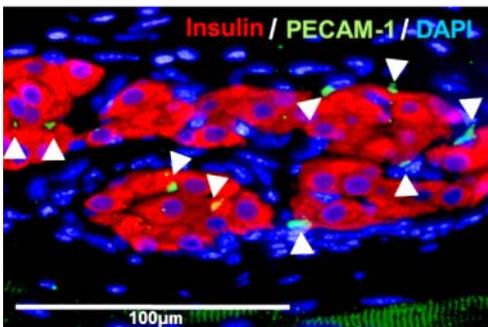




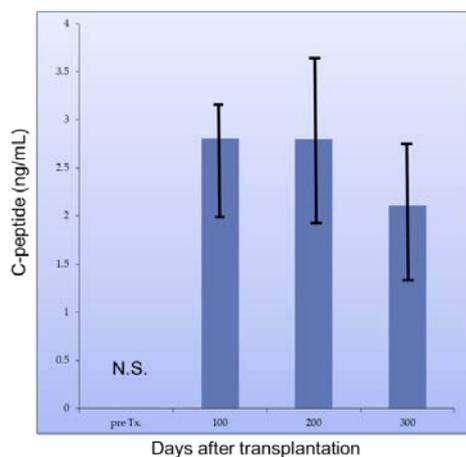
(2) 膵島細胞シートの皮下移植により糖尿病マウスの血糖値は正常化した。また、ブドウ糖負荷試験において、正常マウスと同等の血糖値の経時的変化を示した。



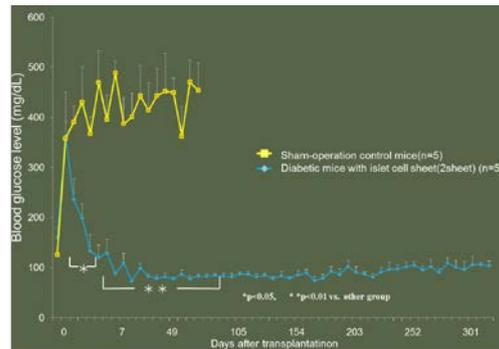
(3) 組織学的解析において、皮下に機能的膵島組織が形成されていることを確認した。



### Rat specific C-peptide



(4) 移植後300日以上、血糖の正常化が得られた。



### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Ishii S, Saito T, Ise K, Yamashita M, Sato Y, Saito T, Tsukada M, Oshibe I, Kenjo A, Kimura T, Anazawa T, Suzuki S, Gotoh M. Preservation of pancreatic islets in cold UW solution before transplantation. *Islets*. 査読有, 4(1): 32-39, 2012  
DOI: 10.4161/isl.18607
- ② Oshibe I, Saito T, Sato Y, Saito T, Tsukada M, Ise K, Kenjo A, Kimura T, Anazawa T, Suzuki S, Hashimoto Y, Gotoh M. Adenine nucleotide levels in a closed enzymatic digestion system for porcine islet isolation. *Cell Transplantation*. 査読有, 21(2-3): 483-91, 2012  
DOI: 10.3727/096368911X605394
- ③ Saito T, Saito T, Sato Y, Ise K, Anazawa T, Oshibe I, Haga J, Yamamoto M, Waguri S, Gotoh M. Mitomycin- C treatment significantly reduces central damage of islets in culture. *Pancreas*. 査読有, 41(2): 245-52, 2012  
DOI: 10.1097/MPA.0b013e31822461c7
- ④ Tsukada M, Saito T, Ise K, Kenjo A, Kimura T, Sato Y, Saito T, Anazawa T, Oshibe I, Suzuki S, Hashimoto Y, Gotoh M. A model to evaluate toxic factors influencing islets during collagenase digestion: the role of serine protease inhibitor in the protection of islets. *Cell Transplantation*. 査読有, 21(2-3): 473-82, 2012  
DOI: 10.3727/096368911X605385

- ⑤ Yamashita M, Saito T, Ise K, Ishii S, Satoh Y, Saito T, Oshibe I, Shimizu H, Kenjo A, Kimura T, Gotoh M. Mizoribine as Sole Immunosuppressive Agent in Islet Xenotransplantation Models : A Candidate Immunosuppressant Causing no Adverse Effects on Islets. Cell Transplantation. 査読有, 21(2-3) :535-545, 2012  
DOI: 10.3727/096368911X605457
- ⑥ Saito T, Ohasi K, Uto R, Shimizu H, Ise K, Suzuki H, Yamato M, Okano M, Gotoh M. Reversal of diabetes by the creation of neo-islet tissues into a subcutaneous site using islet cell sheets. Transplantation, 査読有, 92(11): 2011, 1231-1236  
DOI: 10.1097/TP.0b013e3182375835

[学会発表] (計 14 件)

- ① 花山寛之, 大橋一夫, 鶴頭理恵, 伊勢一哉, 櫻井文教, 水口裕之, 岡野光夫, 後藤満一. 膵島細胞シートへのアデノウイルスベクターによるアポトーシス遺伝子導入に関する検討. 第12回日本再生医療学会 2013.2.21-23 横浜
- ② 花山寛之, 大橋一夫, 鶴頭理恵, 伊勢一哉, 櫻井文教, 水口裕之, 岡野光夫, 後藤満一. アデノウイルスベクターを用いた抗アポトーシス遺伝子導入に関する検討—膵島細胞シートの移植効率向上を目指して—. 第12回日本再生医療学会 2013.2.21-23 横浜
- ③ Haga J, Tsuchiya T, Kenjo A, Kimura T, Anazawa T, Sato T, Sato N, Ise K, Saito T, Gotoh M. Successful management of hepatic venous outflow obstruction in pediatric liver transplantation: A case report. International Pediatric Transplant Association 2012.9.23 Nagoya, Japan
- ④ 清水裕史, 大橋一夫, 齋藤敬弘, 鶴頭理恵, 伊勢一哉, 大和雅之, 岡野光夫, 後藤満一. 膵島細胞シートの皮下移植における長期血糖制御能. 第11回日本組織移植学会総会・学術集会 2012.8.4 東京
- ⑤ Shimizu H, Ohashi K, Saito T, Uto R, Ise K, Yamato M, Okano T, Gotoh M. Sustained Therapeutic Effects of Neo-islet Tissue Engineering by Islet Sheet Transplantation. The 24th International Congress of The Transplantation Society 2012.7.15-19 Berlin, Germany
- ⑥ Anazawa T, Tsuchiya T, Kenjo A, Haga J, Sato T, Sato N, Ise K, Saito T, Tasaki K, Gotoh M. Disappeared islet graft after intraportal transplantation in the recipient suffered from recurrent sepsis. The 24th International Congress of The Transplantation Society 2012.7.15-19 Berlin, Germany
- ⑦ 花山寛之, 大橋一夫, 齋藤敬弘, 清水裕史, 鶴頭理恵, 伊勢一哉, 岡野光夫, 後藤満一. 皮下膵島組織作製による糖尿病治療—300日の観察. 第11回日本再生医療学会 2012.6.12-14 横浜
- ⑧ 清水裕史, 大橋一夫, 齋藤敬弘, 鶴頭理恵, 伊勢一哉, 大和雅之, 岡野光夫, 後藤満一. 膵島移植の新たな展開—膵島細胞シートの開発— 第36回日本外科系連合学会学術集会 2011.6.16 浦安
- ⑨ Shimizu H, Ohasi K, Saito T, Uto R, Ise K, Yamato M, Okano M, Gotoh M. Functional islet tissue engineering in subcutaneous site using fabricated islet cell sheets. The 13<sup>th</sup> World Congress of International pancreas and islet transplantation association 2011.6.3 Prague, Czech Republic
- ⑩ Haga J, Saito T, Anazawa T, Tsuchiya T, Kenjo A, Sato S, Sato N, Saito T, Ise K, Yamamoto M, Waguri S, Gotoh M. Mitomycin-C treatment protects islets from the progression of central Damage during culture. The 13<sup>th</sup> World Congress of International pancreas and islet transplantation association 2011.6.3 Prague, Czech Republic
- ⑪ 伊勢一哉, 大橋一夫, 齋藤敬弘, 清水裕史, 鶴頭理恵, 岡野光夫, 後藤満一. 膵島細胞移植の開発—膵島細胞シートによる皮下での膵島組織作製— 第38回日本膵・膵島移植研究会 2011.3.5 奈良
- ⑫ 齋藤敬弘, 大橋一夫, 清水裕史, 鶴頭理恵, 伊勢一哉, 岡野光夫, 後藤満一. 膵島移植の新たな手法—膵島細胞シートによる皮下の膵島組織作製— 第10回日本再生医療学会総会 2011.3.2 東京
- ⑬ Saito T, Saito T, Sato Y, Ise K, Oshibe I, Waguri S, Gotoh M. Mitomycin-C treatment significantly reduces central necrotic damage of islets in culture. The 23th International Congress of The Transplantation Society 2010.8.15-19 Vancouver, Canada
- ⑭ Saito T, Oohasi K, Uto R, Yamato M, Okano M, Shimizu H, Ise K, Gotoh M. Cell Sheet Engineering Toward

Bioengineering of Functional  
Neo-islets. The 23th International  
Congress of The Transplantation  
Society 2010.8.15-19 Vancouver,  
Canada

〔図書〕(計1件)

- ① 伊勢一哉, 大橋一夫, 後藤満一. 膵島組織作製による糖尿病治療への展開. 代謝系臓器. 後藤満一, 大橋一夫編. 朝倉出版. 東京, 58-63, 2012

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊勢 一哉 (ISE KAZUYA)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 90363746

(2) 研究分担者

山下 方俊 (YAMASHITA MICHITOSHI)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 20381387  
斎藤 敬弘 (SAITO TAKAHIRO)  
福島県立医科大学・医学部・博士研究員  
研究者番号: 00566812  
清水 裕史 (SHIMIZU HIROFUMI)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 70553709

(3) 連携研究者

後藤 満一 (GOTOH MITSUKAZU)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 50162160