

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591507

研究課題名(和文)若年発症1型糖尿病に対する再生膵島移植 膵島細胞シートの同種移植

研究課題名(英文)Regenerative pancreatic islet transplantation for the young onset Type I diabetes mellitus. It is allotransplantation of the pancreatic islet cell sheet.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：ティッシュエンジニアリングの手法を用いた膵島細胞シートを開発した。in vitroにおいてインスリン分泌機能を持つ事、in vivoにおいて同系移植モデルで血糖値の正常化を確認している。今回は、同種移植モデルの系で、BALB/cマウスの膵島を単離し、温度応答性培養皿にて接着培養を行い、培養2日後に回収した細胞シートをB6マウスの皮下に移植後、血糖値の測定と組織学的検討を行った。血糖値の正常化は移植後3日目より認め、移植部位には炎症性細胞浸潤が確認された。マイトマイシン処理により約1週間の生着延長と細胞浸潤の抑制効果を認め、インスリンおよびグルカゴン陽性細胞から構成される細胞集塊が確認された。

研究成果の概要(英文)：Our previous study has demonstrated therapeutic effect of bioengineered islet cell sheets as a novel approach of islet transplantation for diabetes mellitus. Dispersed islet cells obtained from BALB/c mice were then plated on the laminin-5-PIPAAm dishes. After 2 days of culturing, islet cells reached confluent and were harvested as uniformly spread islet cell sheets by lowering culture temperature from 37 degrees C to 20 degrees C for 20 min. Harvested islet cell sheets were transplanted into subcutaneous site of diabetic B6 mice. Normal glucose levels were observed after 3 days of transplantation. Histological examination revealed that the transplanted islet cell sheets with MMC formed clusters of islet tissues and effect to control of inflammatory cell infiltration. It was showed that pretreatment of highly immunogenic crude pancreatic islet sheet with MMC improved their survival in allografts transplantation model.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

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

## 1. 研究開始当初の背景

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歳未満の型糖尿病発症率を2.46人/10万人(型糖尿病発症率:1.12人/10万人)と発表している。全国で1800人を超えら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、日本膵・膵島移植研究会の膵島移植班(当講座が事務局)を中心に臨床実施体制が整備され、2007年3月30日現在、64回の膵島分離後、移植条件を満たした33回(52%)の膵島移植が17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倍を超えらるという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。研究代表者は、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。またin vivoにおいても同系ラット及び同系マウスに移植を行い、血糖値を正常化させている。本研究は、同種

移植での免疫寛容を獲得するべく再構築膵島移植モデルの完成を目指し、小児膵島移植の臨床応用への展開を図るものである。

## 2. 研究の目的

最近の成人膵島移植の成績から、移植膵島数の不足、免疫抑制剤の効果の限界が明らかになってきている。免疫寛容が獲得できれば、移植膵島が少なく済む小児だからこそ、膵島移植の適応となる事は必須であろう。我々は膵島細胞シートの同種移植条件を設定し、小児における膵島移植の臨床応用への道を探る。期間内に(1)(2)について研究を行う。(1)膵島細胞シートの同種移植。移植片の拒絶反応について分析。(2)膵島移植シートの修飾。MMC注入による生着延長の獲得。

肝細胞を利用した多次元化肝組織構築に成功したとの報告がある。温度により表面の親水疎水性が変化する温度応答性培養皿を用い、細胞間接着を維持した状態で肝細胞シートが回収され、さらに積層化が可能となり細胞機能が明確となっている。これまで膵島移植は、培養液中に浮遊した細胞を門脈内に注入する形で行われてきた。ラミニンなどの細胞外マトリックスを用いて、膵島細胞の接着培養や細胞の形態、機能に対する有効性についての報告があるが、我々が作成した3次元構造を持つ細胞シートを移植するという考え方は斬新で、これまで報告がない。今後ES細胞やiPS細胞が導入された場合には、細胞シート移植技術が、膵島移植の成績向上に関与すると期待される。

## 3. 研究の方法

実験1: マウス膵島細胞シートを作成するにあたり、現在作成済みであるラット膵島細胞シートを参考に、マウス膵島細胞シートを作成する。

実験2: 同種移植モデルを作成し、移植後の血糖値測定、体重測定、移植部位の組織学的評価を行う。

実験3: 膵島をマイトマイシンC処置する事で免疫寛容を誘導する系で、実験2と同様に評価する。

## 4. 研究成果

膵島細胞シートの作製を行った。BALB/cマウスの膵島細胞 $5 \times 10^6$ 個/枚を2日間培養した。

(図1)

ストレプトゾトシン誘発B6マウスの皮下に2枚移植した。

(図2)

膵島細胞シート移植後、血糖を測定した。移植後3日目には血糖が正常化し、8日目には血糖の上昇が見られた。

(図3)

膵臓分離後マイトマイシンCにより30日間処置した場合も同様に細胞シートが作製できた。BALB/cマウスの膵島細胞 $5 \times 10^6$ 個/

枚を2日間培養した。  
(図4)

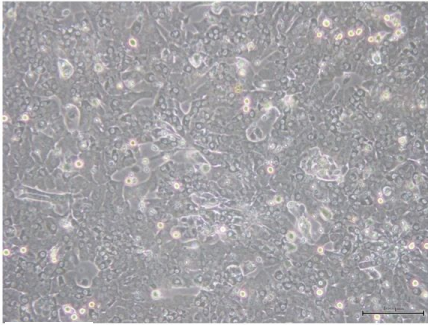


図1 Day 2 of culturing of islet cells without MMC



図2

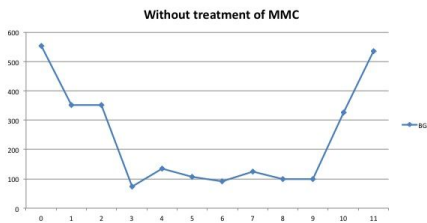


図3 Post transplantation days

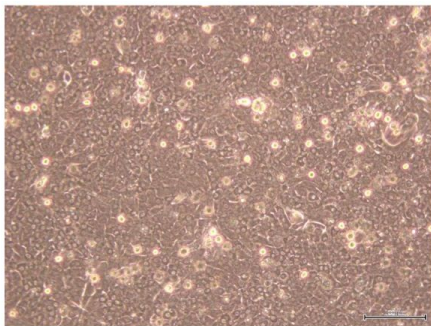


図4 Day 2 of culturing of islet cells with MMC

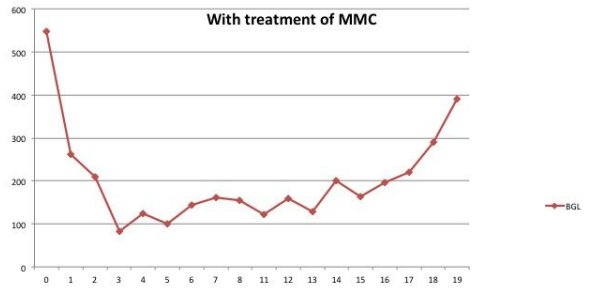


図5 Post transplantation days

組織学的解析において、皮下に膵島細胞塊として、インスリン染色陽性細胞およびグルカゴン染色陽性細胞が確認された。また未処置膵島では炎症細胞浸潤を認めたが、マイトマイシン処置膵島では炎症細胞浸潤が抑制されていた。

(図6、7、8、9)

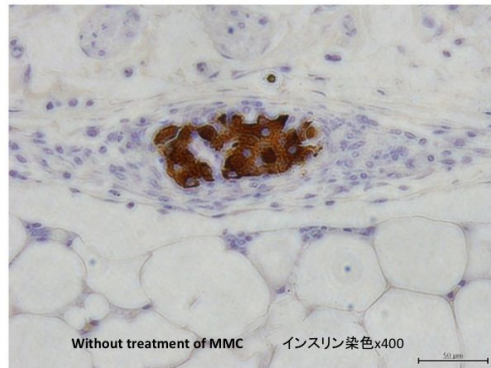


図6

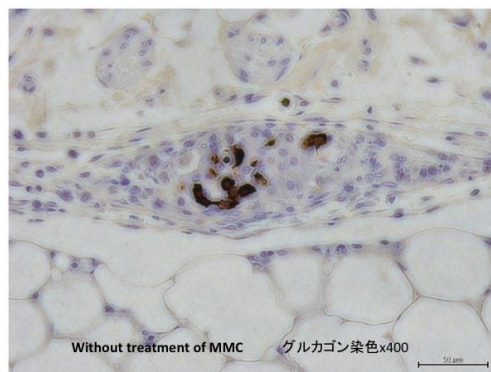


図7

ストレプトゾトシン誘発 B6 マウスの皮下に2枚移植した。膵島細胞シート移植後、血糖を測定した。移植後3日眼には血糖が正常化し、未処置膵島細胞シートと比較し1週間の生着延長効果が得られた。

(図5)

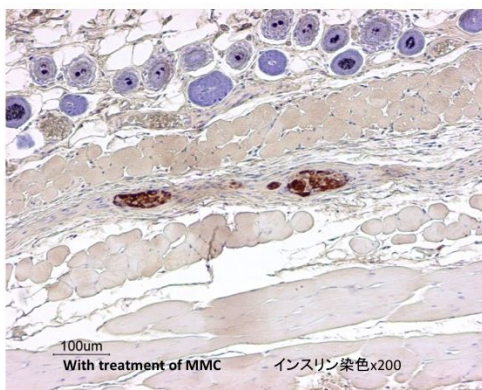


図 8

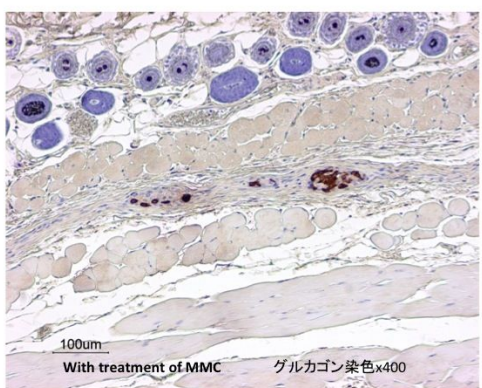


図 9

## 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3件)

- (1) Shimizu H, Ohashi K, Saito T, Utoh R, Ise K, Suzuki H, Yamato M, Okano T, Gotoh M. Topographical arrangement of  $\alpha$ - and  $\beta$ - cells tissues engineered by islet cell sheet transplantation in mice. Transplantation Proceedings. 45: 1881-4, 2013.  
doi: 10.1016/j.transproceed.2013.01.003.
- (2) Ishii S, Saito T, Ise K, Yamashita M, Saito T, Tsukada M, Oshibe I, Kenjo A, Kimura T, Anazawa T, Suzuki H, Gotoh M. Preservation of pancreatic islets in cold UW solution before transplantation. Islets. 4: 32-9, 2012.  
doi: 10.4161/isl.18607.
- (3) Saito T, Ohashi K, Utoh R, Shimizu H, Ise K, Suzuki H, Yamato M, Okano T, Gotoh M. Reversal of Diabetes by the Creation of Neo-islet Tissues into a Subcutaneous Site Using Islet Cell Sheets. Transplantation. 92(11): 1231-6, 2011.  
doi: 10.1097/TP.0b013e3182375835.

[学会発表](計8件)

- (1) Anazawa T, Kenjo A, Kimura T, Ise K, Haga J, Sato N, Tsuchiya T, Sato T, Gotoh M. Long-term outcome of clinical islet transplantation using donors after cardiac death: a multicenter experience in Japan. The 14<sup>th</sup> World congress of the international pancreas and islet transplantation association. 平成 25 年 9 月 24~27 日, Monterey, CA, US
- (2) Shimizu H, Utoh R, Hanayama H, Ise K, Yamato M, Okano T, Gotoh M. Reassembly of alpha and beta cells of neo-islet tissues engineered in the subcutaneous space by islet-cell sheet transplantation in mice. The 14<sup>th</sup> World congress of the international pancreas and islet transplantation association. 平成 25 年 9 月 24~27 日, Monterey, CA, US
- (3) Hanayama H, Ohashi K, Utoh R, Ise K, Shimizu T, Yamato M, Mizuguchi H, Sakurai F, Okano T, Gotoh M. Adenoviral vector-mediated anti-apoptotic gene transduction for engineering functional islet cell sheets. The 14<sup>th</sup> World congress of the international pancreas and islet transplantation association. 平成 25 年 9 月 24~27 日, Monterey, CA, US
- (4) Anazawa T, Kenjo A, Kimura T, Ise K, Haga J, Sato N, Tsuchiya T, Sato T, Gotoh M. Long-term follow-up of clinical islet transplantation using donors after cardiac death report of Japan islet transplantation registry. The 13<sup>th</sup> congress of the Asian society of transplantation. 平成 25 年 9 月 2~6 日、京都
- (5) 穴澤貴行、土屋貴男、見城 明、伊勢一哉、木村 隆、芳賀淳一郎、佐藤直哉、後藤満一。再生医学研究が変える膵島移植医療の近未来。第 113 回日本外科学会定期学術集会、平成 25 年 4 月 11~13 日、福岡
- (6) 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。第 36 回日本外科系連合会学術集会、平成 23 年 6 月 16 日、幕張
- (7) Shimizu H, Ohashi K, Saito T, Utoh R, Ise K, Yamato M, Okano T, Gotoh M. Functional islet tissue engineering is subcutaneous site using fabricated islet cell sheets. The 13<sup>th</sup> World congress of international pancreas and islet transplantation association. 平成 23 年 6 月 3 日, Prague, Czech Republic

(8) Haga J, Saitou T, Anazawa T, Tsuchiya T, Kenjo A, Sato S, Saito T, Ise K, Yamamoto M, Waguri S, Gotoh M. Mitomycin-C treatment protects islets from the progression of central damage during culture. 平成 23 年 6 月 3 日, Prague, Czech Republic

研究者番号：5 0 1 6 2 1 6 0

〔図書〕(計 1 件)

(1) 伊勢一哉、大橋一夫、後藤満一、朝倉書店、再生医療叢書 5 代謝系臓器、平成 24 年、p58-64

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 方俊 (YAMASHITA Michitoshi)  
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：2 0 3 8 1 3 8 7

(2) 研究分担者

伊勢 一哉 (ISE Kazuya)  
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：9 0 3 6 3 7 4 6

斎藤 敬弘 (SAITO Takahiro)  
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：0 0 5 6 6 8 1 2

(3) 連携研究者

後藤 満一 (GOTOH Mitsukazu)  
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・教授