

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659623

研究課題名(和文)キメラブタ由来膵原基を用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the novel therapeutic methods for diabetes using pig's tissue-derived cells.

研究代表者

寺谷 工 (TERATANI, TAKUMI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70373404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：国内外で罹患率が増加している重度1型糖尿病患者に対する療法としては、脳死ドナーからの膵島移植が効果的である。しかしドナー不足や安定したドナー膵島の供給手段が整っていないことから移植治療を受けられない深刻な事態が生じている。本研究成果は、我が国において治療用細胞製剤として確固たる分野を確立し、世界へと情報を発信するリーダー的な位置付けを目指すために必要不可欠なテーマである。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic islet transplantation as a promising treatment for type 1 diabetes has received widespread attention. However, condition of isolated-islet, yield and quality, are collected and considered to determine whether the organ can be used for clinical islet transplantation. In this study, may be able to restore the condition of isolated islets after transportation or preservation, and may help to improve the long-term outcome of islet transplantation.

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：再生医療 間葉系幹細胞 糖尿病 細胞移植

1. 研究開始当初の背景

- (1) 国内外で罹患率が増加している重度Ⅰ型糖尿病患者に対する療法としては、脳死ドナーからの膵島移植が効果的である。しかしドナー不足や安定したドナー膵島の供給手段が整っていない事から移植治療を受けられない深刻な事態が生じている。
- (2) 我が国において 2006 年にマウス繊維芽細胞から、また翌年にはヒト繊維芽細胞より胚性幹細胞と同レベルの分化能を有する人工多能性細胞 (iPS 細胞) が山中らにより作製された事により、再生医療の実現化が大きく前進した。近年、先天性膵臓欠損マウスの受精卵にラット由来 iPS 細胞を移植した結果、マウス体内にラット iPS 細胞由来の膵細胞が形成されていたとの報告が中内らによって報告された。しかし、生命倫理の問題でヒト iPS 細胞をブタの受精卵に移植し、膵臓移植可能なサイズになるまでキメラブタを飼育する事は国内外において禁止されている。

2. 研究の目的

- (1) 胎児期に形成される『膵原基』を間葉系幹細胞と共培養する事により成熟β細胞へと分化誘導する事を目的としている。
- (2) 既に臨床の現場で使用されている骨髄や脂肪組織中に含まれている幹細胞と臓器保存液を有効的に組み合わせ全く新しい供給手段の考案を目的としている。

3. 研究の方法

- (1) pPDX1 遺伝子ベクターを購入し、増幅後に EGFP 遺伝子を連結したベクター (pPDX1-EGFP) を作製した。iPS 細胞樹立に必要である山中 4 因子を購入し、マウス繊維芽細胞にリポフェクション法を用いて iPS 細胞を作製した。そのマウス iPS 細胞に pPDX1-EGFP 遺伝子をエレクトロポレーション法にて遺伝子導入した。
- (2) 樹立した iPS 細胞はアルカリフォスファターゼ染色、RT-PCR 法による遺伝子発現 (Oct3/4, Nanog) および胚様体形成能の確認を行った。
- (3) 市販されている「ヒト間葉系幹細胞」に pPDX1-EGFP 遺伝子をマウス iPS 細胞と同

様の方法にて遺伝子導入し、薬剤選別法にてクローン細胞株を樹立した。

- (4) 妊娠 8 週齢のブタから胎児を摘出し、顕微鏡下にて膵原基を物理的に分離した。60mm-非コート培養皿に播種し、5%CO₂ インキュベーターにて培養を行った。培養開始 28 日目にブドウの房状に形成されたコロニーから mRNA を抽出し、RT-PCR 法にて PDX1 と INS の遺伝子発現を電気泳動法にて確認した。
- (5) チャンバー式培養皿の上皿に膵島、下皿に間葉系幹細胞を播種し、無血清培地を用いて共培養実験を行った。培養期間中は培地交換をせず、経時的観察を行った。
- (6) 野生型 LEW ラットに連日 5 日間、ストレプトゾシンを投与し、糖尿病モデル LEW ラットを作製した。細胞移植 3 日目から連日、免疫抑制剤 (タクロリムス) を鼠蹊部筋注し、移植細胞の拒絶排除を回避した。
- (7) 蛍光を全身で発するルシフェラーゼトランスジェニック LEW ラット (Luc-Tg LEW ラット) およびブタ膵臓からコラーゲンゼ法を用いて膵島を分離し、ブタ脂肪組織から分離培養した間葉系幹細胞と共培養を行った。基質を加えて膵島から発せられる発光輝度を IVIS100 または ATP 活性測定キットにて経時的に測定し、膵島の viability および病理検査を行った。
- (8) 間葉系幹細胞の分泌因子を、分子カラムを用いて濃縮し、既存の臓器保存液に添加し、分離膵島 (ブタおよびラット) の viability を評価した。

4. 研究成果

- (1) 糖尿病モデル LEW ラットに pPDX1-EGFP ヒト間葉系幹細胞を尾静脈より移植し、POD28 に膵臓の病理標本を調べた結果、EGFP 陽性細胞が確認された (1.02±0.25%)。本実験結果より、障害膵臓から間葉系幹細胞を PDX1 陽性細胞へと分化誘導する因子を分泌している事が判明した。
- (2) 妊娠 8 週齢の胎児ブタから摘出・分離した膵原基と pPDX1-EGFP マウス iPS 細胞株を共培養した結果、培養開始 28 日目に EGFP 陽性細胞の存在が確認された (3.26±1.09%)。以上の実験結果より、

膵原基細胞から PDX1 陽性細胞へと分化誘導する因子が分泌されている事が示唆された。

- (3) 同様の実験を pPDX1-EGFP ヒト間葉系幹細胞で行った結果、EGFP 陽性細胞は確認されなかった。糖尿病モデル LEW ラットに移植した実験系においては PDX1 陽性細胞への分化誘導が確認されたことから、in vitro の系では 間葉系幹細胞をアクチビンやレチノイン酸などで前処置を施す、膵原基から分泌される因子以外の別のサイトカイン類を添加する、以上 2 点の必要性が示唆された。
- (4) 既存の臓器保存液に浸し冷保存した膵島では ATP 含有量が低下した。一方、間葉系幹細胞分泌因子を保存液に添加した膵島では ATP 含有量の低下が抑制され、糖尿病モデル動物に移植したグループにおいては血糖値の改善効果が確認された。
- (5) 間葉系幹細胞から分泌される因子が膵原基細胞の成熟化亢進に寄与している事が示唆された。
- (6) ヒト間葉系幹細胞から invitro の系で膵細胞を作製する際には成熟化に寄与する因子の拮抗剤を添加する必要がある事が示唆された。

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 2 件)

- (1) Teratani T, Matsunari H, Kasahara N, Nagashima H, Kawarasaki T, Kobayashi E. Islets From Rats and Pigs Transgenic for Photogenic Proteins. *Curr Diabetes Rev.* 査読有 8(5): 382-389 (2012)
DOI: 10.2174/157339912802083504
- (2) Kasahara N, Teratani T, Doi J, Iijima Y, Maeda M, Uemoto S, Fujimoto Y, Sata N, Yasuda Y, Kobayashi E. Use of mesenchymal stem cell-conditioned medium to activate islets in preservation solution. *Cell Med.* 査読有 5: 75-81 (2013)
DOI:http://dx.doi.org/10.3727/215517913X666477

[学会発表](計 10 件)

- (1) 寺谷 工・笠原尚哉・上本伸二・藤本康弘・小林英司、膵島移植における新しい治療戦略、第 47 回日本移植学会、2011 年 10 月、仙台
- (2) 笠原尚哉・寺谷 工・根岸幸司・岩崎純治・金澤寛之・佐田尚宏・上本伸二・藤本康弘・小林英司、凍結保存膵島の臨床応用化を目指した新しい移植法、第 111 回日本外科学会、2011 年、紙面開催
- (3) Takumi Teratani・Naoya Kasahara・Shinji Uemoto・Yasuhiro Fujimoto・Eiji Kobayashi、Cell-transplantation therapy of the aggregation-free infusion solution with mesenchymal stem cells. CTS-IXA 2011, 2011 年 10 月、マイアミ
- (4) 寺谷 工・笠原尚哉・藤本康弘・上本伸二・小林英司、分離膵島の新規輸送液の開発、第 38 回日本臓器保存生物医学会、2011 年 11 月、仙台
- (5) 寺谷 工・笠原尚哉・土井淳司・藤本康弘・上本伸二・後藤昌史・小林英司、MSC を用いた劣化膵島の機能回復システムの開発、第 39 回日本膵・膵島移植研究会、2012 年 3 月、旭川
- (6) 笠原尚哉・寺谷 工・土井淳司・藤本康弘・上本伸二・佐田尚宏・安田是和・小林英司、脂肪由来間葉系幹細胞を用いた凍結傷害膵島の賦活効果、第 39 回日本膵・膵島移植研究会、2012 年 3 月、旭川
- (7) 寺谷 工・笠原尚哉・土井淳司・藤本康弘・上本伸二・後藤昌史・小林英司、劣化膵島の再生 - MSC を用いた克服に向けて、第 40 回日本膵・膵島移植研究会、2013 年 3 月、高松
- (8) 寺谷 工・笠原尚哉・土井淳司・藤本康弘・上本伸二・小林英司、膵島の賦活化因子の探索、第 40 回日本膵・膵島移植研究会、2013 年 3 月、高松
- (9) 寺谷 工・藤本康弘・上本伸二・後藤昌史・小林英司、劣化膵島の蘇生法に対する革新的技術、第 39 回日本移植学会、2013、9 月、京都
- (10) 寺谷 工・笠原尚哉・藤本康弘・上本伸二・後藤昌史・小林英司、間葉系幹細胞

分泌因子を用いた臓器保存の新しい試
み、第 40 回日本臓器保存生物医学会、
2013 年 11 月、東京

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/cdamt/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

寺谷 工 (TERATANI TAKUMI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70373404

(2)研究分担者

小林 英司 (KOBAYASHI EIJI)

自治医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：00245044

藤本 康弘 (FUJIMOTO YASHUHIRO)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・

助教

研究者番号：80335281