

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25年5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791479

研究課題名（和文） 細胞シートを用いた皮下への新規膵島移植方法の開発

研究課題名（英文）

Development of a Subcutaneous Site Islet Transplantation Method Using Cell Sheet.

研究代表者

稲垣 明子（AKIKO INAGAKI）

東北大学・未来科学技術共同研究センター・助教

研究者番号：20360224

研究成果の概要（和文）：

予め血管床を構築した皮下に、細胞シートを用いて膵島移植を行う方法の確立を目指した。皮下への移植前血管床の構築には血性の滲出液を伴う bFGF よりも、脂肪由来幹細胞が適することが分かった。さらに、膵島シートと線維芽細胞から成る膵島シートを作製することが出来、in vitro 糖負荷試験でグルコース濃度上昇に伴いインスリンを分泌することを確認した。しかし糖尿病動物の治癒を可能とする量の膵島を含む島シート作製には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

We aimed to establish a method to transplant islets of islets to subcutaneous sites with pre-constructed vascular beds by using cell sheets. We found fat-derived stem cells are more appropriate for vascular bed construction prior to subcutaneous transplantation than basic fibroblast growth factors (bFGF) entailing bloody effusions. In addition, we succeeded in preparing islet cell sheets consisting of islet cell sheets and fibroblasts and in an in vitro sugar tolerance test we confirmed insulin secretion accompanying increase in glucose concentration. However, we could not produce islet cell sheets containing an enough amount of islets to cure diabetic animals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：膵島、糖尿病、移植

1. 研究開始当初の背景

膵島移植は血糖調整に重要な働きをする膵島を、局所麻酔下で門脈カテーテルから点滴の要領で肝臓内に移植する。糖尿病の低侵襲な移植療法である。しかし、1人の患者の治癒に2、3人のドナーを要するためドナー不足が深刻な日本においてはいまだ1型糖尿病治療のスタンダードには至っていない。こ

の原因のひとつが、移植膵島と新鮮血の接触をすることで起こる炎症反応 IBMIR (Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction) である。IBMIR によって移植膵島のおよそ半数が移植後数時間以内に破壊される。そこで、IBMIR を回避するために、新鮮血に直接触れない場所に膵島を移植することが有効なのではないかと考えた。

さらに、膵島移植は低侵襲で安全な移植療法であるが、よりアプローチがし易い皮下に膵島を移植出来れば、そのメリットは計り知れない。しかし、皮下は血管網が肝臓と比べて少ないため、酸素不足等により移植膵島が壊死を起し易いという欠点がある。そこで、皮下の血流不足を改善するために、移植予定部位にあらかじめ血管網を構築した後、膵島を移植する方法が有効なのではないかと考えた。

一方、膵島の皮下被覆移植では、平坦でない場所に膵島を移植するために技術を要する。また、100~200 μm の大きさの膵島は細胞塊であるため、移植部位へ膵島を留置する際に膵島が凝集すると膵島が壊死を起し移植効率が低下する可能性が十分に考えられるため、膵島が単層に並ぶ膵島シートを移植することで、移植膵島が効率的に生着するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

新鮮血に直接接しない場所であり、門脈よりもアプローチし易い皮下を移植場所として、予め血管床を構築した皮下に、細胞シートを用いた膵島の移植方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 皮下への血管床構築方法の検討

皮下への移植前血管床構築に、Basic fibroblast growth factors (bFGF) と脂肪由来幹細胞 (Adipose-Derived Stem Cell : ADSC) のどちらが適するかを検討した。ラット皮下に bFGF を含有するデバイスを留置、またはマウス腹腔内脂肪から分離した ADSC を充填したデバイスをマウス皮下に移植して、7日後に血管新生の有無を確認した。

(2) 膵島シート作製方法の検討

線維芽細胞を支持細胞とする膵島シートの作製を試みた (図1)。プレート上で作製した線維芽細胞シートの上に膵島を播種 (方法1)、または膵島の後に線維芽細胞を播種し、膵島シートを形成 (方法2) のどちらの方法が膵島を高密度に含み、高いインスリン分泌機能を有する膵島シートが作製可能かを検討した。

① 膵島の接着培養に適した細胞外マトリックスの選定

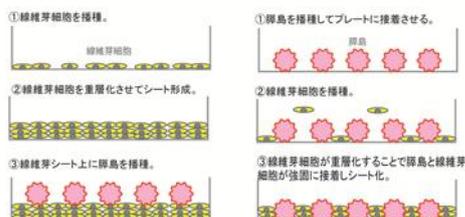


図1. 膵島シート作製方法の検討

膵島をあらかじめ播種する方法 (方法2) を行うにあたり、膵島をプレートに接着させるために適する細胞外マトリックスを検討した。I型コラーゲン、IV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンVを細胞培養用12wellプレート表面にコーティングし、ラット膵島を20個/well播種し、培養1日後の膵島の付着率を求めた。

② 膵島シート作製

ラット皮膚由来線維芽細胞と膵島を用いて膵島作製を行った。線維芽細胞シートに膵島を接着させる方法 (方法1) では、12wellプレートに線維芽細胞を播種し、アスコルビン酸を含む培地で培養して線維芽細胞シート作製した。その後、膵島を播種し2日間培養して膵島シートを作製した。

膵島を播種後、線維芽細胞シートを形成する方法 (方法2) では、①の結果を基に選定した細胞外マトリックスをコートしたプレートにラット膵島を播種1日後に線維芽細胞を播種し、アスコルビン酸を含む培地で4日間培養して膵島シートを作製した。

評価は膵島シートとして回収できるかどうか、さらに回収した膵島シートの膵島のパラフィン切片を作製してヘマトキシリン・エオジン染色とインスリン染色により組織学的評価を行った。

(3) 膵島シートの機能評価

作製した膵島シートがグルコース濃度に応じたインスリン分泌能を有するかどうかを *in vitro* 糖負荷試験により評価した。(1)の方法で作製した膵島シートを、低グルコース (1.67mM) 溶液30分間、高グルコース (16.7mM) 溶液30分間反応させ、各溶液のインスリン濃度から S_{tim} Index (S. I. = 高グルコースのインスリン分泌量 / 低グルコースのインスリン分泌量) を求めた。

(4) 高密度に膵島を含有する膵島シートの作製方法の検討

膵島シートを用いて糖尿病動物の治癒を目指すには、ラットの場合4,000-8,000IEQs (islet equivalents)、2,000-4,000個の膵島が必要であると考えられる。ラット糖尿病モデルでの移植実験においては、背部皮下への移植を考えているため、20 cm² に必要量の膵島が含まれる必要がある。そこで、(2)の結果を基に、6ウェルプレート (9.6cm²) で膵島を1000個以上含有する膵島シートが作製出来るかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) 皮下への血管床構築方法の検討

bFGF 含有デバイス留置したラット皮下で

は、コントロールよりも密な血管網が認められたが、血性の浸出液が伴うことが明らかになった。ADSC 含有デバイス移植したマウス皮下では、コントロールよりも密な血管網を認め、血性の滲出液の貯留は認められなかった。膵島移植では、移植膵島が血液と触れると炎症反応により膵島が破壊されることが明らかになっているため、皮下への移植前血管床構築には ADSC が適することが分かった。

(2) 膵島シート作製方法の検討

①膵島の接着培養に適した細胞外マトリックスの選定

各細胞外マトリックスの膵島接着率を図2に示した。ラミニンVでコーティングしたプレートには20個全ての膵島が接着した。I型、IV型コラーゲン、フィブロネクチンの付着率は25%以下だった。

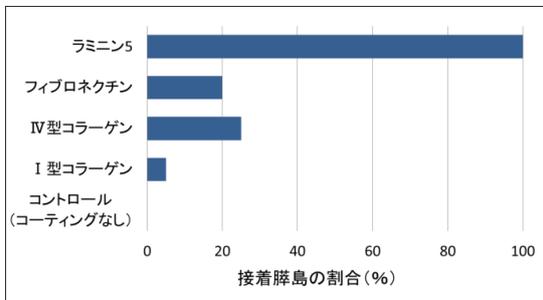


図2. 膵島の接着率

② 膵島シートの作製

予め膵島を播種して作製した膵島シートの方が(方法2)、線維芽細胞シート上に膵島を播種する方法(方法1)よりも膵島を高密度に含有していた(図3)。シート内の膵島の形態は、(方法2)では膵島の被膜構造が保たれていたが、(方法1)では膵島の被膜は消失した(図4)。

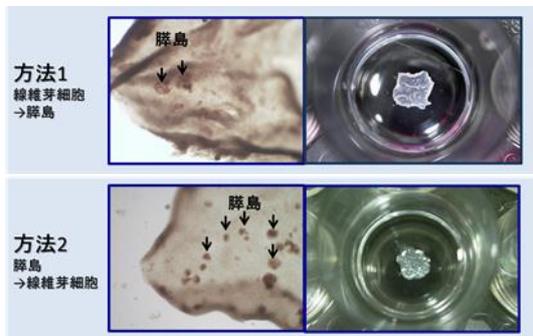


図3. 膵島シート

(3) 膵島シートの機能評価

膵島シートのグルコース刺激試験の結果を図4、5に示した。方法1で作製した膵

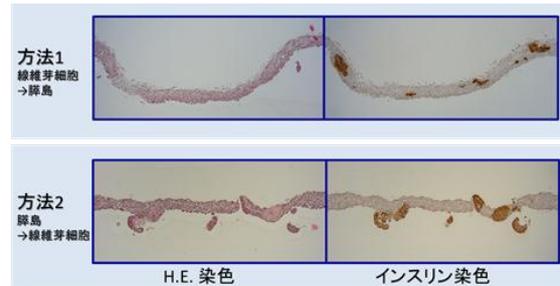


図4. 膵島シートのH.E.,インスリン染色

島は低グルコース、高グルコースでインスリン分泌量がほぼ同じで、S.I.が1.1であった。方法2で作製した膵島シートは低グルコースよりも高グルコースのインスリン分泌量が多く、S.I.は1.8であった。以上の結果から、方法2で作製した膵島シートがグルコース濃度に応答したインスリン分泌能を有することが確認出来た。

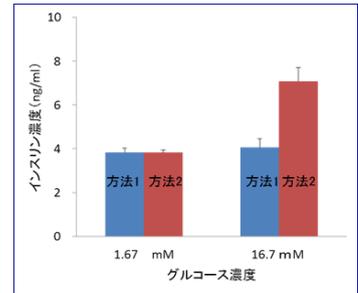


図5. 膵島シートのグルコース刺激試験における反応液中のインスリン濃度

(4) 高密度に膵島を含有する膵島シートの作製方法の検討

(2)(3)の結果から、膵島を効率的にシート化出来、高いグルコース分泌機能を有した方法2の膵島を予め播種する方法で、高密度に膵島を含む膵島シートの作製を試みた。しかし、培養の過程で膵島が壊死を起こし、1000個/9.6cm²以上の膵島を含有する膵島シートは作製出来なかった。

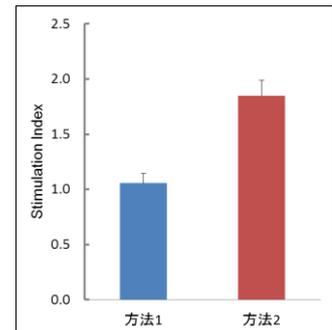


図6. 膵島シートの Stimulation Index

本研究により、皮下への膵島移植を実現するために必須である移植前血管床の構築に、ADSC 含有デバイスの導入が有効であることが明らかになった。

さらに本研究では、従来の膵島細胞シート (Transplantation, 2011, 92(11):1231-6) よりも高いインスリン分泌機能を有する膵島シートの作製方法を確立することが出来た。膵島は、膵島を構成する α 、 β 、 δ 細胞が相互に調整し合って血糖を調節していることから、膵島の形態を保持している本研究

の膵島シートは、より生理的条件に近い血糖調節機能を有する可能性が高いと考えられる。

しかし、本研究期間中に糖尿病動物の治療を可能とする量の膵島を含有する膵島シート作製には至らなかった。今後は、本研究の成果を基に膵島シートに特化した培地の選定や、シート形成に使用する支持細胞の再検討を行うことで高密度に膵島を含有する膵島シート作製方法を確立したいと考えている。そして、細胞シートを用いた膵島の皮下移植によって糖尿病治療が可能になるよう研究を進展させていきたいと考えている。

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) Nakanishi W, Imura T, Inagaki A et al. Ductal injection does not increase the islet yield or function after cold storage in a vascular perfusion model. 2012. PLOS One 7(8): e42319
DOI: 10.1371/journal.pone.0042319 (査読有)
- (2) Tokodai K, Goto M, Inagaki A, et al. Expression of receptors for anaphylatoxins C3a and C5a on rat islet preparations. 2011. Transplant Proc 43: 3179-3180.
DOI:10.1016/j.transproceed.2011.10.006 (査読有)
- (3) Nakanishi W, Masafumi G, Inagaki A et al. A precise analysis of C5a inhibitory peptide on inflammatory mediators induced after islet transplantation. 2011. Transplant Proc. 43: 3235-3238.
DOI:10.1016/j.transproceed.2011.10.026 (査読有)

[学会発表] (計11件)

- (1) Masafumi Goto. The lessons learned from three cases of islet autotransplantation with a severe inflammatory status due to a rupture of a pancreatic arteriovenous malformation. 24th International Congress of Transplantation Society 2012年07月15日-20日. Berlin, Germany.
- (2) 神保琢也. インスリンおよび中心静脈栄養を伴う短期絶食が膵島移植後のグラフト生着へ及ぼす影響. 第39回日本膵臓膵島移植研究会. 2012年3月10日. 旭川市.
- (3) Masafumi Goto. Satomi Development of a highly efficient collagenase for

isolating pancreatic islets. 13th world Congress of IPITA. 1-3 June 2011, Praha, Czech. Republic.

[図書] (計0件)

[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

稲垣 明子 (AKIKO INGAGAKI)

東北大学・未来科学技術共同研究センター・助教

研究者番号：20360224

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：