

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591885

研究課題名(和文) 膵島細胞シートを用いた複合型新生膵島組織の開発

研究課題名(英文) Development of hybrid neo-islet tissue using cell-sheet technology

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：まずブタ膵島を用いた膵島細胞シートを開発し、さらに血管内皮細胞と膵管上皮細胞を膵島細胞シートと積層化して移植することで、移植後の血流再分布および膵島機能向上を目的とした。温度応答性培養皿を用いて、ブタ膵島を用いた膵島細胞シートを作製した。血管内皮細胞シートは膵島細胞と積層化され、容易に安全に皮下移植し得た。ラット膵管上皮細胞を膵臓から分離することは困難であった。膵島細胞を血管内皮細胞や他の細胞と組み合わせることで、膵島細胞シートの糖尿病治療効果を高める可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to fabricate of islet cell sheet using porcine islets and to laminate endothelial cells and pancreatic ductal cells with islet cells in order to develop the blood supply and the islet function in the transplantation sites. The islet cell sheets of porcine islets were fabricated by using the temperature-responsive culture dishes. The endothelial cells sheets were laminated with islet cells, and the hybrid tissue was transplanted into the subcutaneous space of the diabetic mice without any complication. It was impossible to isolate the pancreatic ductal cells from pancreas. This study indicated that the fabrication of multi-layered islet cell sheets could result in further development of the therapeutic effect for diabetic mellitus.

研究分野：医学

キーワード：1型糖尿病 膵島移植 細胞シート 血管新生 膵島再生

1. 研究開始当初の背景

膵島移植は、インスリン分泌を担う膵島そのものを移植することで、インスリン分泌能が廃絶した1型糖尿病患者において安定した血糖コントロールを目指す、組織移植治療である。現行の膵島移植では、エコーガイド下にレシピエントの門脈内へ輸注、移植される。しかし、炎症反応や拒絶反応が移植膵島に生じ耐糖能障害の再燃を惹起するため、多くの症例で複数回の膵島移植が必要となる。

我々はこれまで、温度応答性培養皿を用いてラット膵島細胞シートを作成し、皮下のスペースへ移植することに成功した(Biomaterials. 30:5943-9,2009)。単離膵島細胞の皮下注射では血糖の正常化し得ないが、膵島細胞シートとして皮下移植されることにより、長期の血糖コントロールを可能とすることが明らかになった(Transplantation 2011, in press)。

さらなる機能向上を得てヒトへの応用を進めるためには、膵島細胞シート単独ではなく、いくつかの支持細胞を組み合わせた複合型組織を開発する必要があると考えた。膵管上皮細胞は、膵島の機能維持に関わるサイトカイン分泌を担い、かつ自身が膵島細胞の増殖に関わる前駆細胞として働き、膵島細胞の生存、機能維持に深く関与しているとされる(Pediatr Diabetes 2004;5 Suppl 2:16-22.)。また、血管内皮細胞は移植後にレシピエントの血管網と連絡を取る性質があり(Circulation. 118 [14 Suppl] :S145-152, 2006)、移植後早期に膵島シートへの血流再分布が期待できる。これら膵管上皮細胞と血管内皮細胞を、シート状に再構築し支持体とすることで、ブタ膵島細胞シートの機能向上が得られると考えた。

2. 研究の目的

今回我々は、血管内皮細胞および膵管上皮細胞をそれぞれ細胞シートとして作成し、ブタ膵島細胞を積層化することで、より機能的な複合型新生膵島組織を開発することとした。

3. 研究の方法

実験1：ブタ膵島細胞シートの作成

ブタから採取した膵臓を、膵島分離用酵素を用いて分解し、純化の作業の後、膵島を回収する。その後、一晚培養し、膵島にトリプシン処理を行うことで膵島細胞を単離する。その後、予め laminin-5 をコーティングした温度応答性培養皿に膵島細胞を播種し、接着培養の過程を経て、シートとして回収する。

実験2：ブタ膵管上皮細胞シートの作成

膵管上皮細胞は、ブタから採取した膵臓の膵管周囲組織の長期培養により採取する。採取された膵管上皮細胞は良好な増殖能を有しており、継代して培養することが可能である。温度応答性培養皿へ播種した後、confluency となった状態からシート状に採取する。

実験3：ブタ血管内皮細胞シートの作成

ブタ血管内皮細胞は、ブタ大動脈から分離し、培養する。まず摘出したブタ大動脈を反転させ、内膜を外側に露出し、筋芽細胞の増殖を防ぐべく、両側はクランプした状態で温度応答性培養皿にて培養する。次第に内膜から進展した血管内皮細胞が培養皿上で増殖し、その後数回の継代を行うことで、confluency の状態からシート状に回収する。

実験4：積層化シートの作成、移植

膵島細胞シートを膵管上皮細胞シート、血管内皮細胞シートへそれぞれ支持膜を用いて培養皿上で重ね合わせ、シート同士の細胞間接着により積層化する。積層化の条件設定は、インスリン分泌能、組織学的評価によって行い、更に、電子顕微鏡により新生膵島組織の超微細構造を観察する。次いで、予め糖尿病化した免疫不全マウスの皮下に、積層化シートを移植する。移植後の血糖、インスリン、C ペプチド(インスリン代謝産物)を測定し、治療効果を評価する。

4. 研究成果

(1)ブタ膵臓からの膵島分離は、コラゲナーゼ処理により問題なく実施出来た。

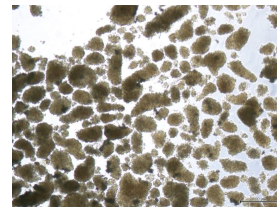


図1. 分離後培養中のブタ膵島

採取した膵島を1日培養した後、トリプシン処理にて膵島細胞へと単離し、温度応答性培養皿を用い膵島細胞シートを作成した。

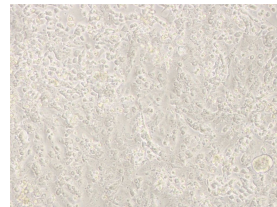


図2. 温度応答性培養皿上でシートとして再構築されたブタ膵島細胞

ブタ膵島細胞シートの培養皿からの回収は、トリプシンを用いることなく、低温条件下での自然剥離にて得られた。

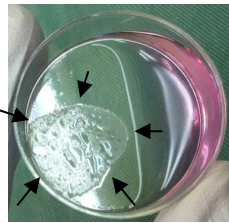


図 3 . 自然剥離した膵島細胞シート (矢印)

糖尿病マウスへの皮下移植は、移植手技が容易で、安全に施行し得た。しかし、移植後の血糖制御は得られず、移植膵島量が不足していた可能性を考えた。

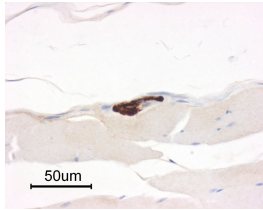


図 4 . 皮下に生着したブタ膵島組織

(2)血管内皮細胞シートはラット大動脈から分離されたものを使用した。ラット膵島細胞と共培養することで、積層化した状態で培養可能であり、かつ細胞間接着を維持した状態で積層化シートとして回収できた。

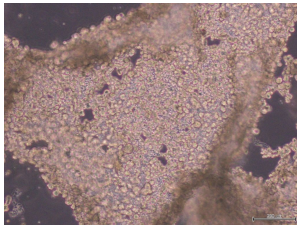


図 5 . 回収された膵島細胞 - 血管内皮細胞積層化シート

皮下移植も容易であったが、移植部位は血腫を形成しグラフトの生着は得られず、糖尿病治療効果が得られなかった。血腫形成の原因としては、血管内皮細胞と膵島細胞の移植比率が関係していると推察され、今後の調整が必要である。膵島細胞を支持する足場としての役割は十分であり、さらに他の細胞と組み合わせることで膵島細胞を効果的にサポートしうると考えられた。

(3)膵管上皮細胞の分離として、膵臓を細断して培養皿上に静置し、培養皿表面に遊走してくる細胞の回収を試みた。しかし遊走してくる細胞が非常に少なく、1週間以上経過しても遊走細胞が殆ど得られない状況であった。膵島細胞は長期間の培養は不可能であるため、膵島細胞との積層化を目指す観点では、分離・培養に煩雑さと長時間を要する膵管上皮細胞の使用は非効率的であり、他の細胞を視野に入れる必要があると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Shimizu H, Ohashi K, Saito T, et al. Topographical arrangement of α - and β -cells within neo-islet tissues engineered by islet cell sheet transplantation in mice, 査読有, Transplant Proc. 2013 Jun; 45(5):1881-4.
DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.01.003.

Yamashita M, Saito T, Ise K, et al. Mizoribine as sole immunosuppressive agent in islet xenotransplantation models: a candidate immunosuppressant causing no adverse effects on islets, 査読有, Cell Transplant. 2012; 21(2-3):535-45.
DOI: 10.3727/096368911X605457.

〔学会発表〕(計 4 件)

Shimizu H, Ping Wu, Baoyou Wu, et al. Therapeutic Effects of Islets Isolated from Genetically Modified Pig Transgenic for hCD46 and hCD39 in Immune-deficient Mice. The 25th World Transplantation Congress, San Francisco, USA, 2014.

清水裕史、花山寛之、鶴頭理恵 他、骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)を足場として用いた複合型単離膵島細胞/MSCシートの開発、第50回日本移植学会総会、東京、2014.

Shimizu H, Utoh R, Hanayama H, et al. Reassembly of α and β cells of neo-islet tissues engineered in the subcutaneous space by islet-cell sheet transplantation in mice. The 14th World Congress of the International Pancreas and Islet Transplantation Association, Monterey, CA, USA, 2013.

Shimizu H, Ohashi K, Saito T, et al. Sustained Therapeutic Effects of Neo-islet Tissue Engineering by Islet Sheet Transplantation. The 24th International Congress of The Transplantation Society, Berlin, Germany, 2012.

〔図書〕(計 2 件)

伊勢一哉 他、最新医学社、再生医療の最新の進歩(後篇) 2014、1560-1569

伊勢一哉 他、朝倉出版、代謝系臓器、2012、58-63

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

齋藤 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

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

石井 証 (ISHII, Shou)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：40468129

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