

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461940

研究課題名(和文) 脂肪組織由来幹細胞による移植前血管床構築に基づく次世代細胞治療方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of next generation cell therapy for diabetes on the prevascularization procedures with Adipose-Derived Stem Cell

研究代表者

稲垣 明子 (Inagaki, Akiko)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20360224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：皮下細胞移植は低侵襲で安全な移植が可能であるという利点があるが、乏血管性という課題を克服する必要がある。この課題の解決には、移植予定箇所の予め有効な血管床を構築することが必要である。本研究では、脂肪組織由来幹細胞(Adipose-Derived Stem Cells: ADSC) を移植予定箇所の皮下に導入で移植前血管床構築し、膵島の生着効率を向上させることを目的に研究を行った。その結果、比較検証のため実施したbFGF導入では移植成績の向上を確認したが、ADCSによる皮下新生血管構築は肉眼レベルでは確認できたが移植効率の向上までには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Subcutaneous islet transplantation is associated with minimal invasiveness, but poor vascularization. Thus, the optimization of the prevascularization procedures is crucial for improving the outcome. Therefore, in presence study, we evaluated the effectiveness of (Adipose-Derived Stem Cells: ADSC). Although the cure rates in the bFGF group were considerably higher than in the non-device and control group, but there was no significant difference among ADSC group and non-device group on the cure rate.

研究分野：細胞移植

キーワード：膵島移植 血管新生 移植・再生医療

1. 研究開始当初の背景

重症糖尿病に対する細胞移植療法である膵島移植は、門脈から肝臓内に移植するのが世界標準法であるが、解決すべき問題点がいくつかある。

細胞移植は今後の移植医療の中心を担うと期待されている先端医療の一つである。今後の先端医療の重要なキーワードの一つとして低侵襲があげられており、皮下への細胞移植はアプローチが容易で複数回の移植にも適しており、まさに理想的な次世代技術である。しかし、皮下は血管網の再構築が困難であり、他の部位と比べて細胞の生着が著しく不良である。

皮下での乏血管性を克服するために、細胞移植予定箇所にあらかじめ血管床を構築し、次いで細胞を移植する方法の有効性が示されている (Smith MK, et al., Tissue Eng 12:235-244, 2007)。肝細胞移植においては、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 徐放デバイスを皮下に挿入して新生血管を誘導、構築された血管床に肝細胞を移植することで、長期間安定して肝細胞が生着することが明らかになっている (Ohashi K, et al. Nature Med. 2007)。

一方で、bFGF 等の細胞増殖因子はガン化の可能性等が指摘されており、医療応用は難しいのが現状である。そこで、本研究で着目したのが、ヒトの皮下脂肪組織からも容易に分離が可能であり、強い新生血管誘導能を持つ脂肪組織由来幹細胞 (ADSC: Adipose Tissue-derived stem cell) である。

そこで本研究では膵島移植を雛型として、脂肪組織由来幹細胞 (ADSC, Adipose-Derived Stem Cell) により移植局所に血管床をあらかじめ構築し、次いで細胞を移植する二段階移植によって、皮下への細胞移植の成績向上を目的とし検証を行った。

2. 研究の目的

そこで本研究では膵島移植を雛型として、脂肪組織由来幹細胞 (ADSC: Adipose-Derived Stem Cell) により移植局所に血管床をあらかじめ構築し、次いで細胞を移植する二段階移植によって、皮下への細胞移植の成績向上を目的とし検証を行った。

3. 研究の方法

(1) ADSC による皮下血管床構築方法の確立

ADSC を充填したデバイスをラット皮下に留置し、移植後 10 日の新生血管網の新生血管網の構築を検証した。評価は、ADSC デバイス留置部における血管新生の程度を肉眼所見と、新生血管マーカーである CD31 と vWF による免疫染色で行った。

(2) 移植前血管床構築による膵島生着促進効果の検証

ADSC による新生血管床構築には時間を要するため、血管新生の程度と移植成績の関

係を明らかにするため、ADSC の対照群となり新生血管誘導効果が明らかになっている bFGF を用いて実験を行った。ストレプトゾトシンにより糖尿病を誘導した C57BL/6 マウスの皮下に、各種濃度 (0-15 μ g/デバイス) bFGF を含有するアガロースデバイスを留置し、9-10 日間後に、デバイスを抜去した皮下に同種同系膵島を移植した。移植後は、各糖尿病マウスの血糖と体重の推移を観察した。さらに、糖負荷試験を行い移植グラフトの機能を評価した。

(3) ADSC による移植前血管床構築と膵島生着促進作用の検証

マウス腹腔内脂肪から ADSC を調製し、ADSC をハイドロゲルデバイスに封入し、STZ 誘発糖尿病 B6 マウスの皮下に 10-12 日間留置後、B6 マウスの皮下に膵島を移植し、血糖と体重の推移を観察した。対照として、血管誘導効果が確認されている bFG 徐放デバイス (bFGF 群)、bFGF を含まないデバイス (コントロール群)、さらにデバイス導入しないコントロール (Non 群) を置いて糖尿病の治癒を比較した。

4. 研究成果

(1) ADSC による皮下血管床構築方法の確立

その結果、コントロールと比べ、ADSC を充填したデバイスを留置することで、マクロ観察においては皮下の新生血管が若干増加することが明らかになった。しかし、新生血管マーカーである CD31 と vWF の発現に 2 群間の差は無かった。



コントロール ADSC
図1. ADSCによる皮下血管床構築

(2) 移植前血管床構築による膵島生着促進効果の検証

1300 IEQs の皮下膵島移植において、bFGF 群では優位に治癒率が向上した。

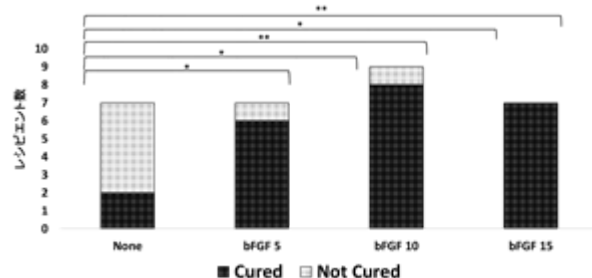


図2. 皮下膵島移植前のbFGFデバイス導入による治癒率向上

(3) ADSCによる移植前血管床構築と膵島生着促進作用の検証

ADSC 導入群は Non 群より治癒効率は良好であったが、コントロール群と同等の治癒成績となり、ADSC による治癒成績向上はなかった。一方、bFG 群は治癒成績が他の。3 群と比べて有意に良好であった。

ADSC は bFGF と比べて出血や浸出液貯留のリスクが低いという利点があるため、臨床応用を視野に入れた場合には非常に有用なツールであると考えられるため、今後は ADSC 調製方法のさらなる至適化や、移植前血管床構築に要する日数、ADSC の皮下への導入方法の再検証を行い、ADSC による移植前血管床構築方法の確立を目指し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5件)

1. Fukuoka K, Inagaki A, Nakamura Y, Matsumura M, Imura T, Igarashi Y, Miyagi S, Ohashi K, Enosawa S, Kamei T, Unno M, Ohuchi N, Satomi S, Goto M
The optimization of short-term hepatocyte preservation prior to transplantation. *Transplantation Direct*, 査読有, in press, 2017
2. Shima H, Inagaki A, Imura T, Yamagata Y, Watanabe K, Igarashi K, Goto M, Murayama
Collagen V is a potential substrate for clostridial collagenase G in pancreatic islet isolation. *Journal of Diabetes Research*, 査読有, 2016, Vol 48 (4), pp, 4396756(電子ジャーナル)
3. Dendo M, Maeda H, Yamagata Y, Murayama K, Watanabe K, Imura T, Inagaki A, Igarashi Y, Katoh Y, Ebina M, Fujimori K, Igarashi K, Ohuchi N, Satomi S, Goto M. Synergistic Effect of Neutral Protease and Clostripain on Rat Pancreatic Islet Isolation. *Transplantation*. 査読有 . 2015;99(7):1349-55. doi: 10.1097/TP.0000000000000662.
4. Jimbo T, Inagaki A, Imura, Imura T, Sekiguchi S, Namura Y, Fujimori K, Miyagawa J, Ohuchi N, Satomi S, Goto M
A Novel Resting Strategy for Improving Islet Engraftment in the Liver *Transplantation*, 査読有, 2014;97(3):280-286 doi:10.1097/01.tp.0000437557.50261.b9
5. Thioredoxin-1 Attenuates Early Graft Loss after Intraportal Islet Transplantation in Mice

Asami K, Inagaki A, Imura T, Sekiguchi, Fujimori K, Masutani H, Yodoi J, Satomi S, Ohuchi N, Goto M
PLOS ONE, 査読有, 2015:Vol 8 (8), pp. e70259 (電子ジャーナル)
doi:10.1371/journal.pone.0070259

[学会発表](計6件)

1. 植松智海、稲垣明子、中村保宏、後藤めぐみ、猪村武弘、五十嵐康宏、大内憲明、里見進、後藤昌史
血管誘導効果を有する RDG 基含有コーゲン素材の導入による皮下膵島移植の生着促進の試み、第 44 回日本膵・膵島移植研究会、2017 年 3 月 11 日、芝蘭会館(京都)
2. 植松智海、稲垣明子、中村保宏、後藤めぐみ、猪村武弘、五十嵐康宏、大内憲明、里見進、後藤昌史
皮下移植における移植前血管床構築法の至適化、第 16 回日本再生医療学会、2017 年 3 月 8 日、仙台国際会議場(宮城)
3. 植松智海、稲垣明子、後藤めぐみ、猪村武弘、五十嵐康宏、大内憲明、里見進、後藤昌史
膵島皮下移植を実現するための移植前血管床構築方法の至適化、第 52 回日本移植学会、2016 年 9 月 30 日、グランドプリンスホテル高輪(東京)
4. 植松智海、稲垣明子、後藤めぐみ、猪村武弘、五十嵐康宏、大内憲明、里見進、後藤昌史
The influence of dissociation enzymes on islet isolation procedures、26th International Congress of the Transplantation Society、2016 年 8 月 20 日、Hong Kong(中国)
5. 稲垣明子、五十嵐康宏、猪村梢、柏山浩、猪村武弘、末田輝子、笹井宏雪、小野文子、後藤昌史
移植前血管床構築のための bFGF 新生血管誘導効果の霊長類と小動物モデルにおける比較検証、42 回日本膵・膵島移植研究会、2015 年 3 月 6 日、京王プラザホテル(東京)
6. 植松智海、稲垣明子、五十嵐康宏、猪村梢、大内憲明、里見進、後藤昌史
膵島皮下移植モデルにおける CT を用いた移植前血管床の試み、42 回日本膵・膵島移植研究会、2015 年 3 月 6 日、京王プラザホテル(東京)

〔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 (INAGAKI, Akiko)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：20360224

(2) 研究分担者

後藤 昌史 (GOTO, Masafumi)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：50400453

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()