

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461943

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を活用した糖尿病に対する皮下細胞移植治療法の研究

研究課題名(英文) Studies on subcutaneous transplantation therapy for diabetes using mesenchymal stem cells

研究代表者

角 昭一郎 (SUMI, Shoichiro)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：80252906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞保護効果や炎症制御作用が知られている間葉系幹細胞と膵島細胞の電気的融合細胞を作成したところ、増殖能や抗アポトーシスを有し、ブドウ糖反応性インスリン分泌機能も有する強靱な膵島様細胞が得られた。この様な融合細胞を含む各種の膵島様細胞・組織を、免疫抑制を行う事無く皮下移植するため、独自に開発したマクロカプセル化技術をさらに改良し、皮下に血管新生を誘導する前処置と組み合わせて、細胞・組織移植用のシステムを開発した。これにより、マクロカプセル化膵島皮下移植を実現する基礎を固めることができた。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cell (MSC) is known for cell-protective and inflammation-regulating effects. Electro-fusion of MSCs and islet cells resulted in new cells possessing growth ability and anti-apoptotic function in addition to islet like cell function of glucose-responsive insulin release. In order to utilize various islet-like cells/tissues including these fusion cells, innovative macro-encapsulation system for immuno-isolation was developed together with neovascularization-inducing method to realize subcutaneous transplantation. These results formed the basis for clinical subcutaneous transplantation of islets or islet-like cells/tissues.

研究分野：代謝内分泌疾患に対する再生医療

キーワード：膵島移植 間葉系幹細胞 細胞融合 バイオ人工膵島 マクロカプセル化 皮下移植

## 1. 研究開始当初の背景

血糖管理に困難を伴う重症の糖尿病は移植医療の対象疾患であるが、ドナー不足が著しく、長期にわたる免疫抑制の副作用も無視できない問題である。ただし、必用とされるインスリン補充は免疫隔離された細胞・組織の移植で達成可能で、これによって免疫抑制は不要となる。また、移植部位も、血流さえ確保できれば体内のどこでも良い。我々はラットにおいて、膵島細胞を間葉系幹細胞 (MSC) と細胞融合させることで細胞の脆弱性が克服され、*in vitro* での長期機能維持や不十分な膵島量の移植による血糖コントロールが達成できることを示唆する実験結果を得ている。今回、この知見を発展させ、従来から研究しているマクロカプセル化膵島技術と組み合わせ、マクロカプセル化膵島-MSC 融合細胞の応用可能性を検討するとともに、マクロカプセル化 MSC による皮下血管新生前処置と組み合わせ、マクロカプセル化膵島-MSC 融合細胞皮下移植による糖尿病治療の妥当性を検証する。

## 2. 研究の目的

糖尿病のようにホルモン不足により発症する疾患は、原理的には当該ホルモンを適切に分泌する細胞あるいは組織の移植により治療できる。このような細胞・組織の移植部位は、細胞機能を維持し、ホルモンを体循環に送り込むに足る組織血流が確保されれば、体内のどの部位でも良い。この点で、皮下組織は低侵襲の移植部位として最適であるが、血流に乏しい。我々の研究グループは、血管新生を誘導する前処置により、皮下組織が膵島あるいはマクロカプセル化膵島の移植部位として使える事を確認している 1-3。また、移植する細胞・組織は、血液や血球と直接に接触する必要はなく、ガス交換やホルモン・低分子栄養素等の透過を許容する半透膜等で免疫隔離された状態でも機能する。このような概念に基づいて、バイオ人工膵島などのバイオ人工臓器が研究されてきた。

間葉系幹細胞 (MSC) は、骨髄や脂肪組織等から比較的容易に得られ、*in vitro* で旺盛な増殖能を示すとともに、中胚葉組織のみならず神経や肝細胞等、広範な分化能を有するとされる。また、多様な増殖因子等を分泌することで血管新生を誘導し、炎症反応を制御するなど、多くの利点があり、各種虚血性疾患や骨・軟骨疾患等の再生医療に広く応用が試みられている。近年、このような MSC の機能に着目して、MSC や骨髄細胞を肝不全治療や膵島移植に応用する研究が行われている。我々は、MSC の利点を最大限に活用して疾患治療に結びつけるために、膵島細胞と MSC との融合細胞を作製し、独自に開発したマクロカプセル化技術 4 と組み合わせ、これを皮下移植することにより、糖尿病の新しい治療法の可能性を探る本研究を立案した。

臓器の再生・組織維持における骨髄由来細胞の関与については、従来から多くの研究がある。例えば肝再生は、通常残存肝細胞の分裂によって起こるが、この機転が障害された場合、骨髄由来細胞が肝再生を助長すると考えられている。その機序としては、骨髄由来造血幹細胞等の肝細胞への分化転換 (Sato Y, et al. Human mesenchymal stem cells xenotransplanted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 106: 756-763, 2005) や、骨髄由来細胞と肝細胞の細胞融合の寄与 (Willenbring H, et al. Myelomonocyte cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Natural Medicine* 10: 744-748, 2004) が示唆され、MSC が放出する HGF 等の多様な増殖因子も組織修復に寄与するものと考えられる。

膵島の再生では、既存の細胞が増殖することは確実であるが、成体の膵島が膵管等から新生するか否かについてはそれに否定的な報告 (Furuyama K, et al. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet.* 43: 34-41, 2011) もあり、なお議論の余地がある。ただ、膵島再生に骨髄由来細胞が寄与するとの報告は多く、骨髄細胞に由来する膵島細胞の生成を示唆するもの (Ianus A, et al. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without cell fusion. *J Clin Invest* 111: 843-50, 2003) や、障害膵組織に MSC が集まって膵再生機序を増強するとの報告 (Bell GI, et al. Transplanted human bone marrow progenitor subtypes stimulate endogenous islet regeneration and revascularization. *Stem Cells Dev.* 21: 97-109, 2011) があるほか、MSC の免疫調節機能により細胞障害が抑制される結果、糖尿病が軽減されるとの報告 (Urban VS, et al. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells* 26: 244-53, 2008) もある。MSC が膵島細胞保護効果や免疫・炎症反応制御効果、血管新生促進効果等により膵島細胞の維持に有利に作用することは確実で、MSC と膵島との同時移植が膵島組織の維持を促進するとの報告 (Rackham CL, et al. Co-transplantation of mesenchymal stem cells maintains islet organisation and morphology in mice. *Diabetologia.* 54: 1127-35, 2011) や、膵島細胞と MSC を混合して二次的膵島を再形成することで移植時の生着率を向上させ得るとの報告 (Duprez IR, et al. Preparatory studies of composite mesenchymal stem cell islets for application in intraportal islet transplantation. *Ups J Med Sci.* 116: 8-17, 2011) があり、MSC 様細胞が臨床膵島移植に応用されるのは時間の問題と思われる。

以上のように、作用機序の詳細はなお不明としても、糖尿病治療における骨髄由来細胞やMSCの応用は、すでに臨床研究段階あるいはその一歩手前まで至っている。

一方、細胞融合の面からは、体細胞とES細胞の細胞融合の報告(Tada M, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 11: 1553-8, 2001)以来、分化した体細胞の核が細胞融合によりリプログラミングされるとの知見が集積されつつある。ただし、これらの多くは細胞の初期化に着目しており、治療応用をめざした研究としては、移植膵島をレシピエントの皮膚細胞と融合することで抗原性を軽減したとする研究(Barrera-Escorcia E, et al. Clinical evolution of diabetic rats after transplant of electrofused pancreatic islet cells and dermic cells. *Biomed Pharmacother.* 59: 275-82, 2005)が報告されているのみである。

本研究では、in vitroで膵島細胞とMSCの融合細胞の機能を確認するとともに、膵島細胞がMSCの性質を得てその脆弱性を克服し増殖能を得る可能性と、分化能に富むMSCが膵島細胞に特有の転写因子等によって膵島細胞へと分化する可能性を、遺伝子発現等で検討する。また、融合細胞のブドウ糖反応性インスリン分泌能の詳細を検討し、移植用細胞としての妥当性を確認する。一方、in vivoでは、マクロカプセル化MSCの皮下移植により血管新生を惹起して移植部位とし、同様にマクロカプセル化した融合細胞をMSCのマクロカプセルと入れ替える形で移植して治療応用することの妥当性を、通常のマクロカプセル化膵島との比較で明らかにする。

膵島-MSC融合細胞の増殖・分化や細胞機能発現についての知見はほとんどなく、非常に独創的な研究テーマである。融合細胞の治療応用もほとんど検討されていないが、さらにマクロカプセル化してバイオ人工臓器としての応用を検討する研究は他に例を見ない。本研究により体細胞核のリプログラミングに関する知見を深め、融合細胞の生物学的特性を明らかにするとともに、その治療応用への可能性を示せば、類似の方法を肝細胞・心筋・神経など他の体細胞へと拡張してゆく大きな可能性が拓けてくるものと考えられる。

重症糖尿病に対する移植医療では、膵臓移植・膵島移植ともに副作用が危惧される嚴重な免疫抑制が必須である。膵臓移植は比較的安定した治療効果が期待できるが手術侵襲が大きく、低侵襲の膵島移植はなお効果が不安定で、特に長期成績は満足できる状況にない。我々は、マクロカプセル化膵島の移植により、免疫抑制を行うことなく、膵島移植に匹敵する高血糖の是正効果が得られることを小動物の実験で明らかにしてきたが、通常膵島に比しより頑強でカプセル内での増殖も期待される膵島-MSC融合細胞を用いる

ことで、より効果的で長期間機能するカプセル化膵島を作成できるものと考えられる。さらに、マクロカプセル化膵島-MSC融合細胞皮下移植の妥当性が本研究で証明されれば、現行の膵島移植に取って代わる重症糖尿病治療法として、実用化を目指した前臨床研究に繋がる非常に重要なステップとなる。

文献

1. Kawakami Y, Iwata H, Gu YJ, et al. Successful subcutaneous pancreatic islet transplantation using an angiogenic growth factor-releasing device. *Pancreas* 23: 375-381, 2001.
2. Wang W, Gu YJ, Tabata Y, et al.: Reversal of diabetes in mice by xenotransplantation of a bioartificial pancreas in a prevascularized subcutaneous site. *Transplantation* 73: 122-9, 2003.
3. Wang W, Gu Y, Hori H, et al. Subcutaneous transplantation of macroencapsulated porcine pancreatic endocrine cells normalizes hyperglycemia in diabetic mice. *Transplantation* 76: 290-296, 2003.
4. Qi M, Gu Y, Sakata N, Kim D, Shirouzu Y, Yamamoto C, Hiura A, Sumi S, Inoue K. PVA hydrogel sheet macroencapsulation for the bioartificial pancreas. *Biomaterials*. 25: 5885-5892, 2004.

### 3. 研究の方法

#### (1) 膵島細胞とMSCの細胞融合

膵島細胞とMSCの細胞融合: MSCはLewisラットあるいはC57BL/6マウスの大腿骨から骨髄液を採取し、これを12%FBS添加DMEM/F12培養液で培養して得た。膵島細胞は、Lewisラット総膵胆管からコラゲナーゼ液(Sigma type XI, 120U/ml添加ハンス液)を注入して膵臓を膨化させ、膵臓を摘出してコラゲナーゼ液中で消化、デキストラン不連続濃度勾配にて膵島分画を分離後、ハンドピックにて純化した。これを0.5%トリプシン-EDTA液にて単細胞に分離して細胞融合に供する。電気的細胞融合はネッパジーン社製細胞融合装置(ECM2001)を用い、特注の長円形環状細胞融合用電極槽(幅2mmの環状槽の内側と外側が電極)にて行った。槽内でMSCと膵島細胞を細胞数1:1に混合したものを独自の細胞融合液中に浮遊させ、20秒間35V交流電の後、25μ秒間350V直流電して行った。

融合細胞のインスリン分泌能の検討: 融合細胞を培養して、1日後、10日後、20日後にブドウ糖3.3mM、16.7mM、3.3mMの培養液で刺激して、ブドウ糖反応性インスリン分泌を検討した。対照として、膵島のみ、および、膵島とMSCを共培養したもの等を同様に検討した。

融合細胞の形態学的検討: 培養融合細胞

を経時的に観察して、形態学的変化および安定性を評価した。

融合細胞における核リプログラミングの検討：MSC と膵島細胞の遺伝子発現を区別する目的で、MSC はマウス骨髄から作製し、これをラット膵島細胞と融合した。膵島細胞特異的遺伝子として Pancreatic and duodenal homeobox 1(Pdx-1)、Neurogenin3 (Ngn3)、Insulin-1 の3 遺伝子を、MSC 特異的遺伝子として CD106(VCAM-1)、Sca-1(Ly6a)、oct3/4 等の3 遺伝子の発現をリアルタイム PCR で経時的に検討し、遺伝子発現の変化および安定性を評価した。プライマーは、遺伝子データベースで各遺伝子のラットとマウスの塩基配列を比較し、相互に異なる領域を対象にマウスとラットの膵島・MSC 特異的遺伝子ごとに設定した。融合細胞の遺伝子発現をマウスとラットの膵島・MSC と比較し、膵島細胞・MSC 相互のリプログラミングを検討した。

融合細胞における細胞増殖の検討：上記のラット膵島細胞とマウス MSC の融合細胞において、ラット Ki67 特異的プライマーを設定して RT-PCR を行い、融合前との比較で膵島細胞核の増殖能獲得を検討した。

融合細胞における膵島細胞アポトーシス阻害の検討：通常の培養膵島細胞ではアポトーシスが急速に進行する。上記の系でラットの caspase3 の遺伝子発現を検討し、培養膵島細胞および膵島細胞と MSC の混合培養との比較で細胞融合における膵島細胞核アポトーシス阻害効果を評価した。

#### (2) 皮下移植用デバイスの作製

PVA ゲルと新素材バッグの組織反応性の比較：凍結/解凍により作製した PVA ハイドロゲルを用いたマクロカプセル化膵島の長期(24 週間)にわたる観察結果から、PVA ゲル周囲に線維性被膜が形成され、これによって移植効果が減弱するものと考えられた。この問題を解決するため、より組織反応の軽微な素材が必要と考え、エチレン-ビニルアルコール共重合体 (EVOH) のバッグで被覆することを検討した。PVA ゲルシートとシート状に成形した EVOH バッグを作成して、ラットの皮下および腹腔内に移植し、3 ヶ月および6 ヶ月後に周囲組織とともに回収して、組織反応の程度を評価した。

皮下血管新生誘導法の検討：外科手術で使用する止血用コラーゲンシート(インテグランシート、株式会社高研)に塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を含浸させ、上記 EVOH バッグと重ねる形で皮下に埋入し、7 週間後に周囲組織とともに回収して、組織学的に血管新生の程度を検討した。対照として、バッグのみ、および、バッグと bFGF を含まないコラーゲンシートを埋入した。

#### 4. 研究成果

ラット膵島細胞とラットあるいはマウスの骨髄由来間 MSC を電氣的に融合させること

に成功した。

培養条件下では、無処置の単離膵島は早期にブドウ糖反応性インスリン分泌を喪失したが、MSC との共培養や融合細胞では 10 日後までこれが維持され、融合細胞のみが培養 20 日後までこれを維持した。

形態学的観察では、融合細胞は一部付着し、一部浮遊状態で維持され、細胞数が次第に増加する傾向を示した。

ラット膵島とマウス MSC の遺伝子発現の検討では、融合細胞でラット MSC 関連遺伝子やマウス膵島関連遺伝子の発現を確認し、相互にリプログラミングが起きていることが確認された。また融合細胞ではラット膵島細胞核由来の Ki67 が新たに発現し、膵島細胞核が細胞周期に入ることが示唆された。また、膵島細胞核由来の caspase3 発現が低下する事を確認し、融合細胞がアポトーシス抵抗性となっていることが分かった。

皮下移植デバイスの検討では、PVA ゲルシートが腹腔内では周囲組織との癒着を形成し、皮下では線維性癒着様組織に覆われていたのに比し、EVOH バッグの組織反応は著しく軽微で、腹腔内ではほとんど癒着無く原型のまま回収され、皮下組織でも僅かに薄い皮膜が形成されているのみで、容易に回収可能であった。

皮下血管新生の実験では、bFGF 含浸コラーゲンシートと EVOH バッグを重ねて埋入した群で周囲に血管新生がみられ、肉眼的には周囲組織が明らかに血液を多く含む赤い組織となっており、顕微鏡下では、埋入したバッグの周囲に von Willebrand 因子陽性の管腔構造が多数形成されていた。

#### 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 4 件)

Sumi S, Yanai G, Qi M, Sakata N, Qi Z, Yang KC, Shirouzu Y, Hiura A, Gu YJ, Inoue K. Review: Macro-encapsulation of islets in polyvinyl alcohol hydrogel. J. Med. Biol. Eng., 34: 204-210, 2014.

Ohki R, Saito K, Chen Y, Kawase T, Hiraoka N, Saigawa R, Minegishi M, Aita Y, Yanai G, Shimizu H, Yachida S, Sakata N, Doi R, Kosuge T, Shimada K, Tycko B, Tsukada T, Kanai Y, Sumi S, Namiki H, Taya Y, Shibata T, Nakagama H. PHLDA3 is a novel tumor suppressor of pancreatic neuroendocrine tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jun 10;111(23):E2404-13.

Yoshimatsu G, Sakata N, Tsuchiya H, Ishida M, Motoi F, Egawa S, Sumi S, Goto M, Unno M. Development of Polyvinyl Alcohol Bioartificial Pancreas with Rat Islets and Mesenchymal Stem Cells. Transplantation Proceedings, 45:

1875-1880, 2013.

Yanai G, Hayashi T, Qi Z, Yang KC, Shirouzu Y, Shimabukuro T, Hiura A, Inoue K, Sumi S. Electrofusion of mesenchymal stem cells and islet cells for diabetes therapy: a rat model. PLoS One. 8: e64499. doi: 10.1371, 2013.

〔学会発表〕(計 12 件)

柳井伍一、楊凱強、白水泰昌、阿部里恵、金宗潤、角昭一郎。間葉系幹細胞と膵島細胞の電気的融合細胞を用いた糖尿病治療。第14回日本再生医療学会。横浜市。2015年3月19日。

角昭一郎、楊凱強、白水泰昌、阿部里恵、川越雅子、柳井伍一。高品質細胞塊を効率的に作成する新規培養器材 全面多孔式培養面の開発。第14回日本再生医療学会。横浜市。2015年3月21日。

角昭一郎。1型糖尿病治療を目指したマクロカプセル化膵島-研究の現状と今後の課題。第58回日本糖尿病学会年次学術集会。下関市。2015年5月23日。

Sumi S, Kawagoe M, Abe R, Yang K-C, Yanai G, Shirouzu Y. Efficient and simple method to prepare high quality cell spheres -A novel culture surface with multiple open holes. TERMIS-WC. Boston, MA, USA. Sep. 10, 2015.

柳井伍一、楊凱強、白水泰昌、日裏彰人、角昭一郎。間葉系幹細胞と膵島細胞の電気的融合細胞を用いた糖尿病治療。第13回日本再生医療学会総会。2014年3月4~6日、京都市。

Yanai G, Yang K-C, Shirouzu Y, Sumi S. Electrofusion of Mesenchymal Stem Cells and Islet Cells for Diabetic Therapy: Details of Methodology. 3rd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine. Aug. 26, 2014, Tao-Yuan, Taiwan.

Sumi S, Yang K-C, Yanai G, Shirouzu Y. A Novel Device for Efficient High Quality Cell Sphere Formation. TERMIS-AP 2013 Annual Conference. Sep. 27, 2014, Daegu, Korea.

角昭一郎。血糖管理の安定化を目指すマクロカプセル化膵島の研究-糖尿病再生医療への挑戦-。第29回日本糖尿病合併症学会シンポジウム6 糖尿病合併症を克服する新戦略。2014年10月4日、東京都。

角昭一郎、川越雅子、柳井伍一、楊凱強、白水泰昌。PVAマクロカプセル化膵島-研究結果と今後の展望-。第145会ポータル会。2014年12月6日、京都市。

Sumi S, Qi Z, Yang KC, Sakata N, Qi M, Shirouzu Y, Yanai G. Macro-encapsulated Islets in Polyvinyl Alcohol Hydrogel. TERMIS-AP 2013 Annual Conference. Shanghai & Wuzhen, China, October 23-26,

2013.

Sumi S. Creation of pancreatic islets and Bio-Artificial Pancreas. Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Korean Pancreatobiliary Association 2013. Symposium V Peri-operative Care and Pancreatic Insufficiency. Seoul, Korea, September 6, 2013.

角昭一郎。重症糖尿病に対する新規治療法の研究。第29回日本糖尿病・妊娠学会年次学術集会 イブニングセミナー。岐阜市。2013年11月1日。

〔図書〕(計 3 件)

角昭一郎。バイオ人工膵臓。特集 肝胆膵分野の再生医療・人工臓器。肝胆膵 70(3): 461-466, 2015.

角昭一郎。膵島および再生膵島様細胞移植における移植技術の新構築。石井秀始編集 井村裕夫、清野進監修 再生医療シリーズ 膵島の再生医療-膵細胞の発生と再生をめぐる新展開-。B 新技術の臨床への展開(臨床編)第2章 将来展望。p142-p145 (株)診断と治療社 東京 2015。

角昭一郎。細胞移植(膵島など)。田畑泰彦編集 遺伝子 MOOK 別冊 ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線 古くて新しいドラッグデリバリーシステム(DDS)第2章 徐放技術の医療応用 3。再生治療 p187-p191 (株)メディカルドゥ 大阪 2013。

〔産業財産権〕

出願状況(計 4 件)

名称: METHOD OF CELL FUSION AND FUSION CELLS

発明者: Sumi S, Hayashi T, Yanai G.

権利者: Kuraray Co., Ltd.

種類: 特許

番号: JP2013/007164

出願年月日: 2013年12月5日

国内外の別: 国際

名称: 移植材料及びその調製方法

発明者: 角昭一郎、大木理恵子、坂田直昭。

権利者: 京都大学、東北大学、大木理恵子

種類: 特許

番号: JP2015/064792

出願年月日: 2015年5月22日

国内外の別: 国際

名称: スフェロイド作製用デバイス、スフェロイドの回収方法及び製造方法

発明者: 角昭一郎

権利者: 株式会社クラレ・京都大学

種類: 特許

番号: JP2015/000950

出願年月日: 2015年02月25日

国内外の別: 国際

名称：移植用デバイス及びバイオ人工臓器  
発明者：角 昭一郎、川越雅子、榎本清文  
権利者：株式会社クラレ、京都大学  
種類：特許  
番号：特願 2016-089367  
出願年月日：2016 年 4 月 27 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/ca03/g\\_info.html](http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/ca03/g_info.html)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

角 昭一郎 (SUMI Shoichiro)  
京都大学・再生医科学研究所・准教授  
研究者番号：80252906

### (2)研究分担者

該当無し

### (3)連携研究者

白水 泰昌 (SHIROUZU Yasumasa)  
京都大学・再生医科学研究所・講師  
研究者番号：20279186

### (4)研究協力者

柳井 伍一 (YANAI Goichi)  
京都大学・再生医科学研究所・研究員

川越 雅子 (KAWAGOI Masako)  
京都大学・再生医科学研究所・研究員