

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26390038

研究課題名(和文)細胞配位のマイクロ制御による高機能膵島の構築

研究課題名(英文)Fabrication of hyper-islet by microcontrol of cellular position

研究代表者

小島 伸彦(Kojima, Nobuhiko)

横浜市立大学・国際総合科学部(八景キャンパス)・准教授

研究者番号：90342956

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)：本研究の実施によって、再構築膵島における細胞と細胞との自己組織化的な細胞配位獲得が糖鎖(α-ガラクトシド)によって生じていること、自己組織化を糖鎖特異的なレクチンで抑制すると、インスリン分泌活性も低下すること、さらには細胞によってインスリン分泌活性を高めた高機能化膵島(ハイパー膵島)は糖尿病モデルマウスの血糖値を効率よく低下させることなどがわかった。以上の結果は、移植のために膵島を「デザイン」することの重要性を示している。

研究成果の概要(英文)：According to the present study, self-organized cell positioning of pancreatic and cells in reconstructed pancreatic islets is caused by sugar chain (α-galactoside). Inhibition of the self-organization by a carbohydrate-specific lectin downregulate the insulin secretion activity of the islet. Highly functionalized islets (hyper-islets) which have enhanced insulin secretion activity by cells have been found to efficiently reduce the blood glucose level of diabetes model mice. These findings indicate the importance of "designing" of islets for islet transplantation.

研究分野：組織工学・細胞生物学

キーワード：膵島 インスリン 糖鎖 レクチン 糖尿病 移植 血糖値 自己組織化

1. 研究開始当初の背景

組織や臓器の機能発現には、特異的な「細胞の空間的配位」が欠かせない。したがって、組織や臓器のもつ様々な機能を *in vitro* で再現するには、細胞を特定の空間座標上に配位させる必要が生じる。例えば膵島（ランゲルハンス島）に存在する α 細胞と β 細胞は特徴的な空間配位を有しており、 β 細胞のインスリン分泌活性と細胞配位の間には、何らかの相関があると考えられてきた。しかし詳細な検討は行われておらず、従来の膵島再構築研究では、 α 細胞の存在は β 細胞のインスリン分泌活性に影響がない[1]、あるいはむしろ活性を抑制してしまう[2]ことが報告されている。

研究代表者は、高分子ポリマーを添加した培養液を利用して、迅速な細胞凝集法を開発し[3]、懸濁状態のマウス膵 α 細胞とマウス膵 β 細胞から効率よく膵島様の細胞配位を誘導する方法を確立した[4]。凝集直後は α 細胞と β 細胞は混在した状態だが、48 時間後には実際のマウス膵島組織のように、 β 細胞集団の周りを α 細胞が単層で覆うような構造となった。 α/β 細胞比を変化させたところ、特定の比率においてインスリン分泌活性が亢進することが分かった。また、これまでに報告されている文献で用いられた α/β 細胞比では、確かにインスリン分泌活性が変化しない、あるいは低下するということも確認した[4]。すなわち、 β 細胞のインスリン分泌を向上させるためには、適切な量の α 細胞が適切な空間的配位で存在することが重要であることが明らかとなった。このような凝集体内部に、インクジェット技術を使って自作した直径 20 μm 程度のハイドロゲルビーズを埋め込んで、局所的な細胞密度を下げ物質交換をよくすると、インスリン分泌活性がさらに向上することも見出した[4]。

細胞配位の制御によってインスリン分泌活性が向上し得るという全く新たな知見は、膵島再生医療の分野で非常に高いインパクトを持つ。この現象を裏付ける分子メカニズムは全く解明されていないが、*In vitro* における高機能な膵島の再構築は再生医療に直結する重要な課題であり、特許などで我が国が優位に立つためにも、早急に取り組む必要がある。

細胞配位の分子メカニズムの手がかりを探すために、研究代表者は自己組織化的なパターン形成現象の数理モデルを構築し、シミュレーションにより解析した。その結果、とくに細胞同士の親和性が重要な要素であることを見出した[5]。

細胞間の親和性にはカドヘリンなどの(1)細胞接着分子、コラーゲンなどの(2)細胞外マトリクス (ECM) が影響することは明白である。また、初期胚において特定のステージで特殊な構造の糖鎖が出現し、それが結合することで胚のコンパクション

が起こるように、糖鎖は再生や発生において細胞の組織化に重要な役割を果たしており、 α 、 β 細胞の自発的な再配位においても(3)糖鎖及びその受容体であるレクチンが関与している可能性が高い。在職の横浜市立大学には、糖鎖の結合プロファイルや多様な細胞調節能が解析された、海洋動物由来のユニークなレクチンライブラリーが存在し、オリジナリティーの高い糖鎖研究が実施可能である。

以上のように、3つの接着関連要素についてスクリーニングを行い、分子メカニズムを明らかにしていくことが、膵島構造と機能発現との相関を理解し、膵島再生において世界に先んじるために重要なアプローチである。

[1] Brereton et al. *Endocrine*. (2007)

[2] Hamaguchi et al. *Exp. Biol. Med.* (2003)

[3] Kojima et al. *Biomaterials*. (2012)

[4] Kojima et al. *Transplant. Proc.* (2014).

[5] Kojima et al. *Proceedings of MicroTAS 2013*.

2. 研究の目的

目的1：組織工学を用いて再構築した膵島について、膵 α 、 β 細胞の空間的な配位とインスリン分泌活性とを結びつける分子メカニズムを、特に糖鎖・レクチンに着目して探索する。

目的2：インスリン分泌活性が最大となる「ハイパー膵島」の構築条件を模索するとともに、作製した膵島について、糖尿病モデル動物への移植による機能評価を実施する。

3. 研究の方法

α 、 β 細胞の配位に影響を与え、インスリン分泌活性を変化させる糖鎖/レクチンおよび ECM の同定

空間的配位によるインスリン分泌活性の制御メカニズムを理解するためには、関与する分子を同定する必要がある。本研究では、特に糖鎖・レクチンといった分子について検討した。細胞は、膵 α 細胞として α TC1.6 細胞株、膵 β 細胞として MIN6-m9 細胞株を使用した。膵島様組織を作製する場合には、前述の細胞を迅速に凝集する技術を用いた。

・膵島形成に関する糖鎖・レクチンの解析

蛍光標識レクチンを用いて膵 α 、 β 細胞に発現する糖タンパク質および糖脂質の糖鎖構造プロファイルを解析した。糖鎖の特徴に応じ、各細胞、および両方の細胞に結合する植物レクチンを加えて培養し、膵島の自己組織化パターンとインスリン分泌量の変化を計測した。

・膵島形成に関与する ECM の解析

我々は迅速な細胞凝集法において、吐出する細胞懸濁液に低濃度の蛍光分子結合型コラーゲンなどを混ぜておくという手法で、細胞

胞とコラーゲンとを共に凝集できることを確認している。この手法で、細胞配位とインスリン分泌機能に対する ECM 影響を調べた。用いる ECM は一般的に入手が容易な I 型コラーゲン、マトリゲル、ヒアルロン酸を用いた。

・ハイパー膵島の機能評価

本研究ではβ細胞だけからなる膵島様組織とβ細胞だけでなくα:β=1:8となるようにα細胞を混ぜ込んだ膵島様組織の比較を、ストレプトゾシン投与によって誘導された糖尿病モデルマウスの腎被膜下への移植によって実施した。機能評価はマウスの血液中のグルコースを測定する方法で行った。

4. 研究成果

膵α、β細胞の配位に影響を与え、インスリン分泌活性を変化させる糖鎖/レクチンの同定

マウスの膵αおよびβ細胞株（それぞれα-TCl.6 および Min6）を用いて、自己組織化的な3次元膵島様構造の再構築現象に関与する糖鎖を見出すという方針で、細胞表面の糖鎖発現プロファイルを行った。具体的には各種糖鎖構造に特異的に結合する植物レクチンを蛍光標識した試薬を用いて、レクチンの特異的な結合の有無について蛍光シグナルを指標として評価を行った。その結果、α細胞とβ細胞の両方に結合するレクチン、およびβ細胞のみに結合するレクチンをいくつか見出すことができた（表1）。自己組

表1 α細胞、β細胞に結合する植物レクチン

	WGA	ConA	MAM	UEA	SSA	LCA	RCA	ECA
α細胞	++	-	-	-	-	-	-	-
β細胞	++	-	+	+	-	+	++	++

β-ガラクトシド構造に結合するレクチン

組織的な細胞構造の構築においては、自他の認識が必要になると予想される。したがって、β細胞特異的に発現する糖鎖構造に着目して解析を進めることとした。β細胞に特異的に結合したレクチンは二つともβ-ガラクトシド構造に結合するものであった。β-ガラクトシド構造をレクチンで中和すると膵島様構造の再構築が阻害され、β-ガラクトシド構造を持つラクトースを実験系に過剰に添加すると、再構築現象をレスキューできた（図1）。さらにより詳細な検討は必要であるが、レクチン添加によって3次元膵島様構造が構築されていない場合は、構造が構築されている場合よりもインスリン分泌活性が低いことが示唆された（図2）。以上の結果から、膵島様構造の再構築において糖鎖に着目することの重要性、さらには膵島様構造の構築が高いインスリン分泌活性に必要である可能性が示された。

より効率の良い評価法の提案と、インスリン分泌活性を高める可能性のあるレクチンおよび

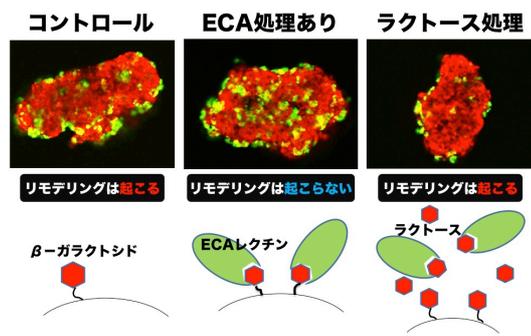


図1 植物レクチンECAによるβ-ガラクトシドを介した自己組織化の阻害

ECMのスクリーニング

これまでα細胞が一定の比率で存在するとき、β細胞のグルコース応答性の培地中へのインスリン分泌活性が向上することをELISAで評価してきた。この分泌活性の向上の原因を探るために、同条件下においてリアルタイムPCRによるインスリン遺伝子発現量を調べたところ、インスリン遺伝子の発現が増加していることを確認した。したがって、インスリン分泌活性の向上はインスリン遺伝子の発現量の増加に起因している可能性が強く示唆された。この結果から、インスリン分泌活性についてELISAだけでなくリアルタイムPCRで評価できることがわかり、以下のレクチンやECMの効果の検討を効率よく行うことができた。

膵島表面の糖鎖構造に結合することでインスリン分泌活性に影響を及ぼすレクチンが存在するかどうかについて検討を行った。一部可能性のあるレクチンが見つかったが、効果が長期間持続することがなく、おそらくレクチンを結合させ続けることに困難が生じていると判断した。以上のことから、本研究ではインスリン分泌活性を高めるようなレクチンを発見することはできなかった。またECMを膵島内部の薄膜充填する技術によって1型コラーゲンやマトリゲルなどについてインスリン分泌活性に対する影響を評価したが、本研究ではインスリン分泌活性に大きな差を見出すことはできなかった。

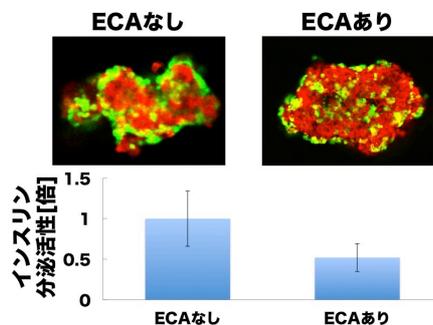


図2 自己組織化の有無とインスリン分泌活性の関係

糖尿病モデルマウスへの移植によるハイパー膵島の評価

α細胞をα:β=1:8の比率で混ぜることによるインスリン分泌活性の向上には、β-ガラクトシドを介した自己組織化が関与す

る可能性が明らかとなった。インスリン分泌活性が高い膵島をハイパー膵島と呼んできたが、これまでの機能評価は試験管内でのグルコース負荷試験による培地中へのインスリン分泌量によるものである。果たしてハイパー膵島は生体内でも、通常の膵島よりも高い治療効果を示すのだろうか。そこで実際に高機能な膵島を糖尿病モデルマウスに移植した際の効果を検討した。

ストレプトゾシンで誘導した糖尿病モデルマウスの腎被膜下に、それぞれの条件、すなわち Min6 だけからなる膵島様組織、あるいは α -TC1.6 と Min6 からなる膵島様組織を移植することで膵島様組織の機能を評価することを試みた。その結果、Min6 だけを凝集させた膵島様組織よりも α TC1.6 細胞を混入させた膵島のほうが、より少ない細胞数(膵島様組織数)で血糖値を十分に下げることが示された(図3)。 α 細胞が混ざっているほうが1/3程度で済むことが示され、ELISAやmRNA量などが2~3倍程度増えているという本年度までの結果におおよそ合致するような研究成果が得られた。一方、膵島移植の効果は一週間程度保持できたものの、その後

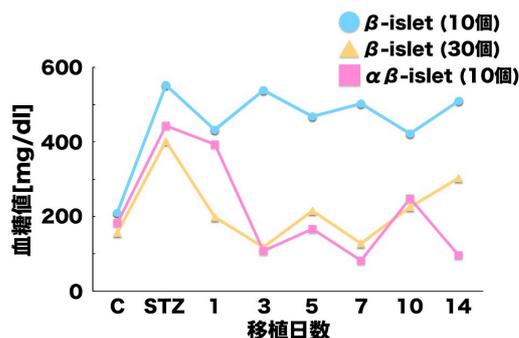


図3 糖尿病モデルマウスへの移植による高機能膵島の評価

は膵島様組織の増殖による肥大化により、移植時に膵島様組織を包埋するアルギン酸のカプセルを破ってしまい、長期の安定性などについては今後の課題となった。

細胞株を使った実験の他にもマウスの初代膵島細胞を用いた研究についても研究を行った。特に、初代膵島細胞をできるだけ細胞障害を生じさせずに再度凝集させる方法について取り組み、再構築の際に深海生物由来の細胞外マトリクスが、生存率を高める可能性があることを見出した。

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 小島伸彦 微細構造をもつ膵島様組織の作製 *Organ Biology*, 24, 掲載確定
査読無

DOI:未定

② Kamitori, S., Ozeki, Y. and Kojima, N. β -galactoside-mediated tissue organization during islet reconstitution. *Regen. Ther.*, 3, 11-14

(2016).

査読有

DOI: 10.1016/j.reth.2016.01.006

[学会発表] (計 25件)

① Kamitori, S., Sato, T. and Kojima, N. Production of engineered-islets and their transplantation to cure type 1 diabetes. TERMIS-EU 2017. The Congress Centre, Davos, Switzerland. June 27 2017 (Poster presentation)

② Toya, K., Noguchi, M. and Kojima, N. Effect of hyaluronic acids from deep-sea organisms in the reconstitution of islet-like tissues using primary islet cells. TERMIS-EU 2017. The Congress Centre, Davos, Switzerland. June 27 2017 (Poster presentation)

③ 小島伸彦 移植用膵島を“デザイン”する技術, 第2回デザイン生命工学研究会大会(兵庫県神戸市・神戸大学統合研究拠点コンベンションホール) 2017年3月21日(特別講演)

④ 戸谷慶司, 野口誠, 小島伸彦 深海生物由来細胞外マトリクスによる膵島細胞保護効果, 第16回日本再生医療学会総会(宮城県仙台市・仙台国際センター) 2017年3月9日(一般口演)

⑤ 戸谷慶司, 野口誠, 小島伸彦 マウス初代膵島細胞を用いた膵島様組織再構築における深海生物由来ヒアルロン酸の膵細胞保護効果, 細胞アッセイ研究会(東京都目黒区・東京大学生産技術研究所コンベンションホール) 2017年1月31日(ポスターセッション)

⑥ 小島伸彦 微細構造をもつ膵島様組織の作製, 第43回日本臓器保存生物医学学会学術集会(東京都八王子市・東京薬科大学3401講義室) 2016年11月27日(シンポジウム)

⑦ 小島伸彦 高付加価値なスフェロイドをつくる技術, 日本動物実験代替法学会 第29回大会(福岡県福岡市・九州大学百年講堂&同窓会館) 2016年11月16-18日(シンポジウム)

⑧ 小島伸彦 大集合!世にも珍しい新種の細胞凝集体!! , 第4回細胞凝集研究会(北海道札幌市・札幌全日空ホテル) 2016年9月9日(ショートプレゼン・ポスターセッション)

⑨ 小島伸彦 へいおまち!細胞凝集体を“握る”技術!! , 2016年度生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー(東京都府中市・ホテルコンチネンタル府中) 2016年7月16日(特別招待講演)

⑩ 小島伸彦 細胞社会の特性を利用した組織微細構造の再構築, 第19回日本内分泌病理学会学術総会(佐賀県佐賀市・アバンセ) 2015年10月25日(シンポジウム)

⑪ Kamitori, S., Ozeki, Y. and Kojima, N. Role of sugar chain in the self-organization of the pancreatic islet structure in vitro. 4th TERMIS World Congress 2015. Boston Marriott Copley

Place Hotel, Boston, Massachusetts, USA. September 8 2015 (Poster presentation)

⑫ Kamitori, S., Ozeki, Y. and Kojima, N. Control of Islet Organization in Vitro. *2015 Taiwan-Japan Forum on Additive Manufacturing and Bioengineering*. National Formosa University, Yunlin, Taiwan. September 1 2015 (Oral presentation)

⑬ Kojima, N. Sugar chain-mediated self-organization of the islet structure in vitro. *14th Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST) 2015*. Suntec Singapore Convention and Exhibition Centre, Singapore. August 25 2015 (Oral presentation)

⑭ 小島伸彦 組織設計技術によるミニチュア臓器のつくりかた, 第 34 回分子病理学研究会 (兵庫県神戸市・神戸ホテルフルーツ・フラワー) 2015 年 7 月 26 日 (特別講演)

⑮ 神取紗英, 大関泰裕, 小島伸彦 試験管内での膵島構造再構築における糖鎖の関与, 第 14 回日本再生医療学会総会 (神奈川県横浜市・パシフィコ横浜) 2015 年 3 月 20 日 (一般口演)

⑯ 小島伸彦 組織工学によるハイパー膵島の開発, 細胞アッセイ研究会 (東京都目黒区・東京大学生産技術研究所コンベンションホール) 2015 年 1 月 13 日 (ポスターセッション)

⑰ 小島伸彦 膵島を超えた膵島の開発, 第 2 回細胞凝集研究会 (福岡県福岡市・アクロス福岡) 2014 年 12 月 6 日 (シンポジウム)

⑱ 小島伸彦研究室 試験管内におけるハイパー膵島の作製 (Fabrication of the hyper-islets in vitro), イノベーション・ジャパン 2014-大学見本市 (東京都江東区・東京ビッグサイト) 2014 年 9 月 11-12 日 (ブース展示)

⑲ 小島伸彦 微小環境を再現したミニチュア臓器作製の取り組み, 若手研究者の会、病理学、肝臓・糖尿病・内分泌内科学合同特別セミナー (佐賀県佐賀市・佐賀大学医学部 2F セミナー室 2260) 2014 年 8 月 1 日 (単独講演)

⑳ 小島伸彦 人体に設計図はあるのか?, 夢ナビライブ 2014 (東京都江東区・東京ビッグサイト) 2014 年 7 月 12 日 (30 分模擬講義)

㉑ Kojima, N., Functional Enhancement of Multicellular Spheroid by Microchannel Fabrication. *TERMIS EU 2014 Chapter Meeting*. Magazzini del Cotone Conference Center, Genova, Italy. June 10-13 2014 (Oral presentation)

㉒ 小島伸彦 内部構造の制御による肝および膵島様スフェロイドの高機能化, 日本組織培養学会第 87 回大会 (東京都千代田区・星陵会館) 2014 年 5 月 29 日 (シンポジウム)

㉓ Kojima, N., Fabrication of Multicellular Spheroids with Microstructures. *JST ERATO International Symposium on 3D Tissue Fabrication*. Institute of Industrial Science, The

University of Tokyo Convention Hall, Meguro-ku, Tokyo, Japan. May 20 2014 (Poster presentation)

㉔ 小島伸彦 微小流路をもつ細胞凝集体を作製する技術とその効果, 第 21 回 HAB 研究機構学術年会 (東京都品川区・昭和大学上條講堂) 2014 年 5 月 16 日 (ポスターセッション)

㉕ 小島伸彦 微小環境を再現したミニチュア臓器作製の取り組み, 創薬・探索研究所セミナー (大阪府豊中市・塩野義製薬株式会社・社医薬研究センター) 2014 年 4 月 23 日 (単独講演)

[図書] (計 2 件)

① 小島伸彦 (分担執筆) 3.5.4 節・生体環境を模倣した高機能組織の創出技術, 細胞社会学, 大和雅之編著, コロナ社, 135-141 (2016). ISBN978-4-339-07263-1

② 小島伸彦 (分担執筆) 高粘性培地によるスフェロイド培養システム, 三次元ティッシュエンジニアリング, 大政健史・福田淳二監修, エヌ・ティー・エス, 197-204 (2015). ISBN978-86043-426-7

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<https://regenbio.sci.yokohama-cu.ac.jp> 受賞

① 会長賞, 小島伸彦, 微細構造をもつ膵島様組織の作製, 第 43 回日本臓器保存生物医学学会学術集会, 東京 東京薬科大学, 2016 年 11 月 27 日

② 最優秀賞 (グランプリ), 横浜市立大学小島伸彦研究室チーム (小島伸彦, 田尾文哉, 朝倉夕稀, 平沢雅宏, 平沢真弓), 攻殻機動隊の義体を支える臓器設計技術, 攻殻機動隊 REALIZE PROJECT the AWARD 攻殻コンテスト, 東京 渋谷ヒカリエ・ホール B, 2016 年 2 月 11 日

③ 優秀賞, 横浜市立大学小島伸彦研究室チーム (小島伸彦, 田尾文哉, 朝倉夕稀, 平沢雅宏, 平沢真弓), 臓器設計工学に基づいた高機能化マイクロ臓器の開発, 攻殻機動隊 REALIZE PROJECT 攻殻ハッカソン東京大会, 東京 DMM.make AKIBA, 2015 年 10 月 25 日

④ Best Paper Award, Kojima, N., Motoyama, W., and Aoki, S., Assembly of the Hybrid Multicellular Spheroids using Epithelial Cells and Hydrogel Beads, 25th IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science in 2014 (MHS2014), 2014 年 11 月 12 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 伸彦 (KOJIMA, Nobuhiko)
横浜市立大学・大学院生命ナノシステム科学
研究科・准教授
研究者番号：90342956