

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10505

研究課題名（和文）新規リコンビナントペプチドを用いた移植前血管床構築による皮下膵島移植の生着促進

研究課題名（英文）The optimization of the prevascularization procedures for improving subcutaneous islet engraftment introducing novel recombinant peptide

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：皮下は低侵襲で必要に応じて摘出や再移植が容易なため、膵島の新たな移植部位として注目されているが、移植膵島の生着に重要な血流に乏しいという問題がある。本研究では、新生血管誘導効果を持つRGD基を豊富に含有するリコンビナントペプチド（RCP）に着目し、マウスモデルを用いて検証を行い、現在の標準法である経門脈膵島移植を大きく上回る移植効果を発揮し得ることが判明した。さらに、脂肪由来前駆細胞をRCPに付加することでより効果的に移植前血管床構築を促進させ、移植膵島機能の改善をもたらすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮下は低侵襲で必要に応じて摘出や再移植が容易なため、膵島の新たな移植部位として注目されているが、移植膵島の生着に重要な血流に乏しいという問題がある。本研究では、新生血管誘導効果を持つRGD基を豊富に含有するリコンビナントペプチド（RCP）に着目し検証を行い、現在の標準法である経門脈膵島移植を大きく上回る移植効果を発揮し得ることが判明した。さらに、ADSCsを付加することでより効果的に移植前血管床構築を促進させ、移植膵島機能の改善をもたらすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Subcutaneous islet transplantation is associated with minimal invasiveness, replicability, and ready removability or re-transplantation thus attracted attention as a new site for islet transplantation. However, subcutaneous tissue involves an issue of lack of vascularization, which is important for engraftment of a transplanted islet graft. Thus, we focused on a recombinant peptide (RCP) device containing a lot of angiogenic RGD and placed the device in a subcutaneous space at a planned site for transplantation, and found that the efficiency of islet engraftment with subcutaneous transplantation was improved to a level comparable to that with intraportal transplantation.

研究分野：細胞移植、移植外科

キーワード：膵島移植 移植・再生医療 血管新生

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

膵島移植はドナー膵臓から膵島を分離・回収し、経皮経門脈的に肝臓内に移植する重症1型糖尿病に対する根治療法である。肝臓内は原始免疫反応が亢進しており、移植膵島が門脈血と接触すると激しい炎症反応により移植膵島の40-50%が移植後数時間で破壊され、経門脈移植では血糖の正常化には2-3回の移植を必要とする。そこで、門脈よりもアプローチが容易で低侵襲であり、新鮮血に触れずに移植出来る皮下膵島移植の実現が強く望まれている。しかし皮下は膵島の生着に必要な血管に乏しいため、未だ経門脈移植が主流となっている。

皮下の膵島生着が不良である最大の原因は、生着に必要な血管が乏しいことである。皮下の乏血管を克服するために、塩基性繊維芽増殖因子(bFGF: Basic Fibroblast Growth Factor)徐放デバイスを用い、移植予定箇所の下にあらかじめ血管床を構築し、次いで膵島の生着を促す移植法の有効性が示されている(Luan NM, et al., Am J Transplant.2014;14(7):1533-42)。しかし、bFGFは至適量では生着促進効果を示すが、高用量ではデバイス留置部への滲出液貯留と出血によりグラフト生着が阻害される。さらに臨床応用を想定した場合に問題となるのが、至適量が個体によって大きく異なる点である。そこで、新生血管誘導に自己由来の脂肪由来幹細胞の適用を試みたが、細胞調製や細胞の管理、レギュレーションの観点から臨床応用への展開にはハードルが高いとの考えに至った。そこで、bFGF等の増殖因子や細胞に頼らない、新たな血管床構築プロトコルの創出が必要であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、新規素材であるリコンビナントペプチド(RCP)を用いて安全で効果的な皮下血管床構築法を確立することにより、皮下膵島移植の生着率向上を実現し、さらに膵島生着促進の作用機序を明らかにすることを目的として検証を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 糖尿病マウスを用いた皮下膵島生着促進効果の検証

C57BL/6マウスを用いた同種同系移植モデルで検証を行った。レシピエントマウスの背部皮下にRCPデバイス、または血管新生の上乗せ効果を期待してC57BL/6マウス脂肪由来前駆細胞(adipose tissue-derived stem cell:ADSC)を表面に播種したRCPデバイスを10または28日間留置した。移植7日前にStreptozotocin(STZ)により糖尿病を誘導した。その後デバイスを除去した皮下に経門脈移植におけるマージナル量である300 islet equivalents(IEQs)の同種同系膵島を移植した。RCP単独で4週間または10日間留置した群、ADSCsを播種したRCPを4週間または10日間留置した群の4群に分けて、比較検証を行った。移植後は、血糖と体重の推移を観察し、移植後4週後に糖負荷試験を行った。

### (2) 免疫組織学的検証

皮下膵島移植後7日目に膵島を移植した皮下組織を摘出し、免疫組織化学染色を施行した。採取した組織は、4%パラホルムアルデヒドで一晩固定後、パラフィンで包埋し薄切切片を作製し、vWF、インスリン、フィブロネクチン染色、ラミニン、コラーゲンIII、コラーゲンIV染色を行った。

膵島内部と膵島周囲の間質部の血管新生と評価するために、vWF 陽性細胞をカウントした。また、膵島周囲の間質部のフィブロネクチン、あるいは膵島周囲の繊維性被膜におけるラミニン、コラーゲンIII、コラーゲンIVの発現を比較するために、顕著に免疫陽性細胞を認める場合を陽性と定義し、各実験群の陽性切片数をカウントし陽性率を算出した。1 実験群あたり最低 18 枚の切片を盲検法で評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 糖尿病マウスを用いた皮下膵島生着促進効果の検証

移植後 30 日までの治癒率において、RCP+ADSCs 4w 群と RCP 4w 群は両群とも経門脈移植群を有意に上回ったが ( $p<0.01$ )、RCP+ADSCs d10 群と RCP d10 群は経門脈移植群を下回る傾向であった(図 1)。また RCP+ADSCs 4w 群と RCP 4w 群の間には血糖推移と治癒率では有意な差は認めなかったが、グラフト機能を示す腹腔内ブドウ糖負荷試験においては、RCP+ADSCs 4w 群が有意に RCP 4w 群を上回った ( $p<0.05$ ) (図 2)。

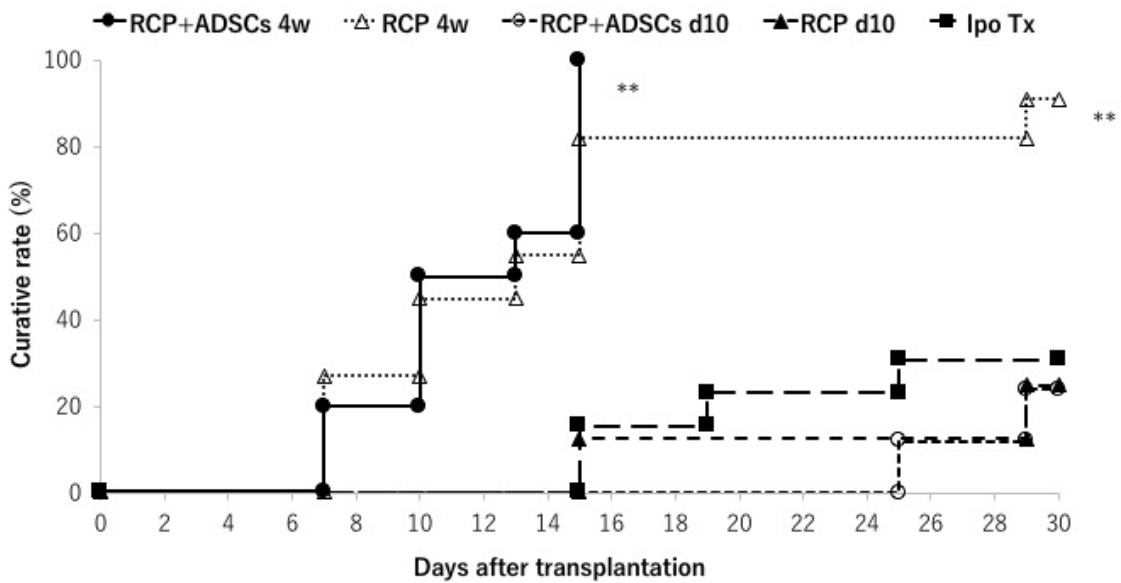


図 1 各群におけるマージナル量の膵島 (300 IEQs) 移植後の治癒率

\*\* $p<0.01$  : RCP+ADSCs 4w 群 vs. RCP+ADSCs d10 群、RCP d10 群、Ipo Tx 群

RCP 4w 群 vs. RCP+ADSCs d10 群、RCP d10 群、Ipo Tx 群

● : RCP+ADSCs 4w 群、△ : RCP 4w 群、○ : RCP+ADSCs d10 群、▲ : RCP d10 群、■ : Ipo Tx 群。

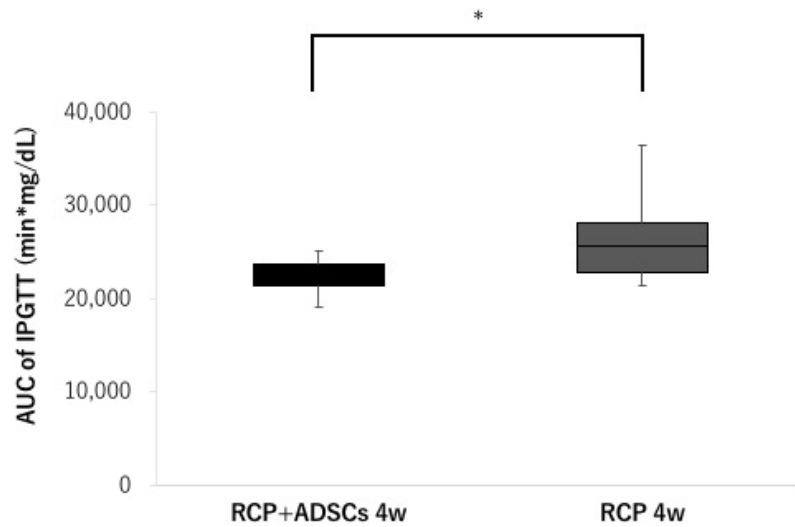


図2 RCP+ADSCs 4w 群と RCP 4w 群における IPGTT の Area under the curve (AUC)  
 \* $p < 0.05$  : RCP+ADSCs 4w 群 vs. RCP 4w 群

(2) 免疫組織学的検証

免疫組織化学染色においては、新生血管を評価する von Willebrand factor (vWF) の陽性細胞を計測したところ、RCP デバイスに ADSCs を播種した群は RCP 単独群と比較し、腓島内の vWF 陽性細胞数が多い傾向にあった (図 3、4)。また腓島周囲の間質を評価するフィブロネクチン染色においては RCP 4w 群は RCP d10 群と比較して有意に陽性率が高く、腓島周囲の繊維性の被膜を評価する collagenIII 染色においては RCP+ADSCs 4w 群は RCP+ADSCs d10 群と比較して有意に陽性率が高かった (図 5、6)。

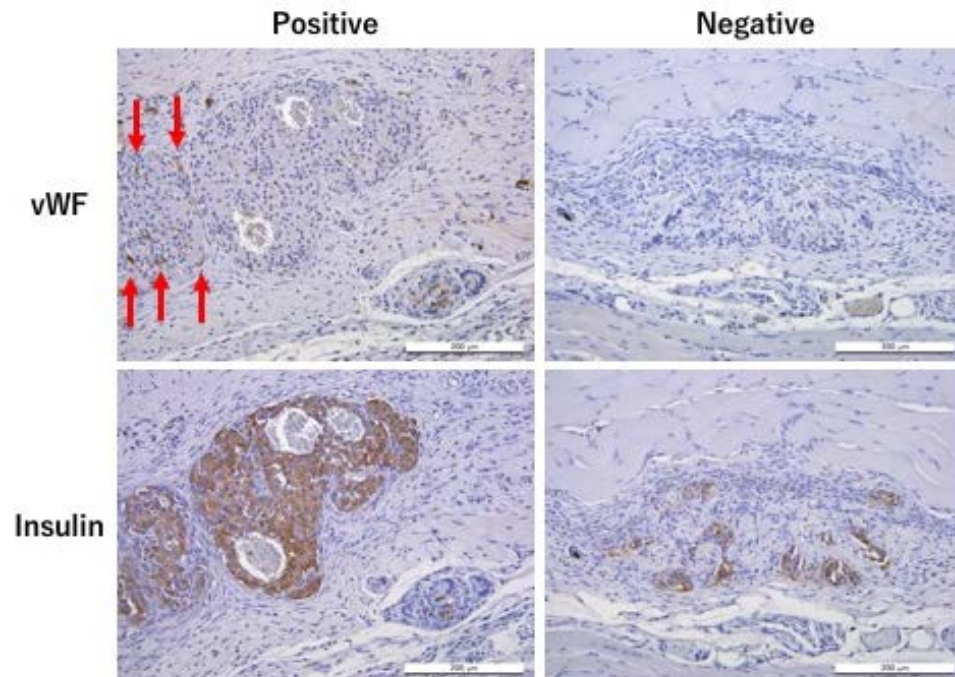


図3 von Willebrand factor (vWF)、インスリン染色における代表例  
 上段：vWF 染色における陽性例 (矢印) と陰性例。  
 下段：vWF 染色部に対応するインスリン染色例

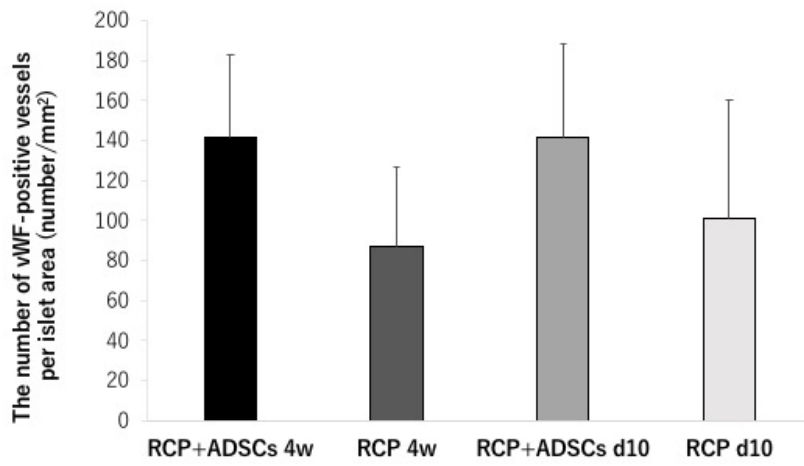


図4 移植膵島内のvWF陽性細胞数

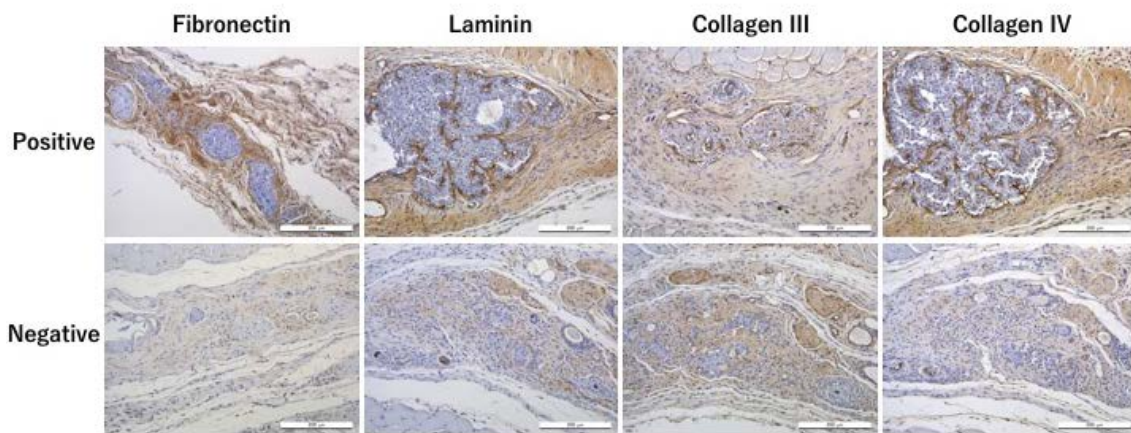


図5 細胞外マトリックス（フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンⅢ、コラーゲンⅣ）の免疫組織化学染色における代表例

上段：陽性例、下段：陰性例。

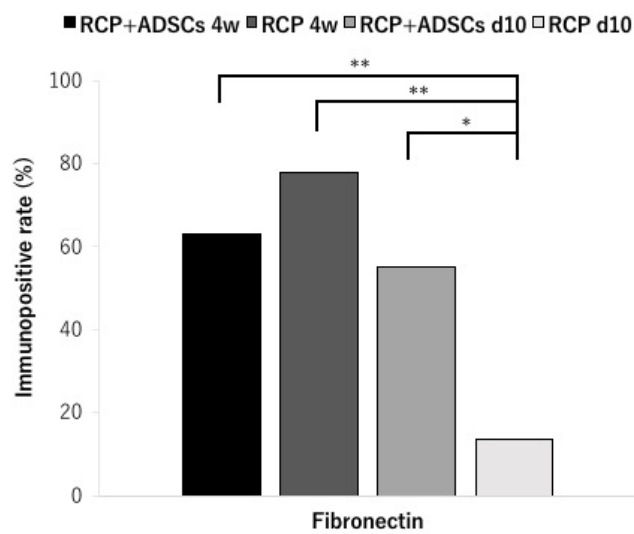


図6 膵島周囲間質部のフィブロネクチン陽性率

\*\*p<0.01 : RCP d10 群 vs. RCP+ADSCs 4w 群、RCP 4w 群

\*p<0.05 : RCP d10 群 vs. RCP+ADSCs d10 群

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uematsu Satomi Suzuki, Inagaki Akiko, Nakamura Yasuhiro, Imura Takehiro, Igarashi Yasuhiro, Fathi Ibrahim, Miyagi Shigehito, Ohuchi Noriaki, Satomi Susumu, Goto Masafumi	4. 巻 102(3)
2. 論文標題 The Optimization of the Prevascularization Procedures for Improving Subcutaneous Islet Engraftment	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 385-394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TP.0000000000001970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukuoka Kengo, Inagaki Akiko, Nakamura Yasuhiro, Matsumura Muneyuki, Yoshida Satoru, Imura Takehiro, Igarashi Yasuhiro, Miyagi Shigehito, Ohashi Kazuo, Enosawa Shin, Kamei Takashi, Unno Michiaki, Ohuchi Noriaki, Satomi Susumu, Goto Masafumi	4. 巻 3
2. 論文標題 The Optimization of Short-Term Hepatocyte Preservation Before Transplantation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Transplantation Direct	6. 最初と最後の頁 e176 ~ e176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TXD.0000000000000687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水井崇浩、稲垣明子、中村保宏、Fathi Ibrahim、猪村武弘、植松智海、宮城重人、亀井尚
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞を付加したリコンビナントペプチドの導入による新規皮下膵島移植方法の開発
3. 学会等名 第46回日本膵・膵島移植研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤昌史、稲垣明子、猪村武弘、Fathi Ibrahim、水井崇浩、金井哲史、戸子台一哲、、宮城 重人、村山和隆、亀井尚、海野倫明
2. 発表標題 免疫抑制剤不要の次世代膵島移植に向けた取り組み
3. 学会等名 第46回日本膵・膵島移植研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲垣明子、猪村 梢、後藤めぐみ、猪村武弘、五十嵐康宏、Ibrahim Fathi、後藤昌史
2. 発表標題 免疫抑制剤を不要とする革新的膵島デバイスの開発
3. 学会等名 第45回日本移植学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 植松智海、稲垣明子、中村保宏、後藤めぐみ、猪村武弘、猪村 梢、五十嵐康宏、Ibrahim Fathi、宮城重人、亀井 剛、海野倫明、里見進、後藤昌史
2. 発表標題 出血が少なく使いやすい皮下デバイスを目指して：糖尿病マウスにおける RGD基含有ヒト 型コラーゲン素材による皮下膵島移植についての報告
3. 学会等名 第45回日本膵・膵島移植研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲垣明子、猪村梢、猪村武弘、Ibrahim Fathi、五十嵐康宏、後藤昌史
2. 発表標題 免疫抑制剤を不要とする革新的膵島デバイスの開発
3. 学会等名 第45回日本膵・膵島移植研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	後藤 昌史  (Goto Masafumi)  (50400453)	東北大学・医学系研究科・教授    (11301)	