

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21240051

研究課題名（和文） 移植後膵島の生存率向上のための膵島表面修飾

研究課題名（英文） Surface modification of islets for increasing graft survival rate

研究代表者

岩田 博夫 (IWATA HIROO)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：30160120

研究成果の概要（和文）：組織工学や再生医療は新しい治療法を開いた。最も成功した例として膵ランゲルハンス島（膵島）移植による I 型糖尿病の治療がある。ただ、未だ各種の問題を抱えている。例えば移植膵島が、血液凝固や補体の活性化を引き起こす、また、それに伴って炎症反応や拒絶反応を引き起こし、これにより膵島の多くを失ってしまうと報告されている。われわれは、この問題を解決するために、新たに合成した ssDNA-PEG-lipid を用いた膵島表面の修飾法を開発した。まず膵島を ssDNA-PEG-lipid で処理する。一方、ssDNA の相補の配列を有する ssDNA' を膵島表面に固定したいタンパクや細胞に固定する。この両者を混合することで、相補対形成で膵島表面にタンパクや細胞を固定することができた。その効果をマウス間の同種移植で調べたところ、良好な結果を得た。

研究成果の概要（英文）：Regenerative medicine and tissue engineering have opened new therapeutic domains. One of the more successful endeavors has been the transplantation of islets of Langerhans (islets), which produce and release insulin, as a treatment for patients with type 1 diabetes. However, when implanted into living tissue, islets can induce various undesirable biological responses, including blood coagulation, complement activation, inflammatory reactions, and immune reactions. We developed a new method in which proteins and cells are immobilized on the islet surface to increase their compatibility with a host environment. Islet surface is modified with the ssDNA-PEG-lipid. Proteins or cells are modified with a ssDNA' that is complementary to the ssDNA. The proteins or the cells can be immobilized on the cell through hybridization between the ssDNA and ssDNA'.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	16,700,000	5,010,000	21,710,000
2010年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2011年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
年度			
年度			
総計	36,500,000	10,950,000	47,450,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：細胞・組織工学、バイオ人工膵臓

## 1. 研究開始当初の背景

膵島移植の臨床が行われていた。免疫抑制剤の副作用を避けるため、免疫抑制剤の投与を必要としない膵島移植法の開発。また、移植直後に多くの細胞が死滅すると報告され (IBMIR)、その対策方法の確立が望まれていた。さらに、近年幹細胞研究の進展により、各種体性幹細胞またヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) からのインスリン分泌細胞の分化誘導、また、擬似膵島の作成が報告され、糖尿病治療に用いる新たなインスリン分泌細胞源として注目されている。拒絶反応また自己免疫反応から防御を目的に、膵島また細胞の半透膜によるカプセル化が必要であると考えた。これらの分化誘導されたインスリン分泌細胞を用いるときに適したカプセル化素材と方法の開発が必要である。

## 2. 研究の目的

細胞膜上に形成されるカプセル層の厚さがミクロン以下と極めて薄いこと、カプセル化時に細胞に障害を与えないこと、・移植後も安定に膜として存在すること、免疫隔離膜として長期間安定に働くこと、出来ればカプセル表面に生理活性物質が担持出来、移植直後の生体の非特異的また特異的生体防御反応をコントロールできること、等の要求性能を満たすマイクロカプセルを開発する。

## 3. 研究の方法

先ず一層は疎水結合を利用してポリエチレングリコール修飾脂質などの両親高分子で修飾を行い、この第1層にさらにイオン結合による修飾、さらに、化学結合を通じた修飾を加えることで、上記要求を満たす膜を作成する。さらに、*in vitro* での免疫評価と糖尿病モデルマウスを用いて *in vivo* での免疫隔離能の評価、さらに、糖尿病治療効果の評価を行う。

## 4. 研究成果

インスリン依存型糖尿病の糖尿病を治療するために、ドナー膵臓から単離した膵ランゲルハンス氏島 (膵島) を経門脈的に肝臓に移植することが行われている。移植直後に起こる膵島表面での血液凝固、それに引き続き起こる炎症反応により多くの膵島が失われる。また、この時期を生き延びた膵島もレシピエントの免疫系に異物として認められ、拒絶されてしまう。本研究では膵島細胞表面で起こる種々の反応をコントロールするために、膵島細胞の表面修飾法を開発している。

IBMIR 対策: リン脂質-ポリエチレングリコール-オリゴ DNA (Lipid-PEG-DNA) を用いて膵島表面に線溶系酵素であるウロキナーゼや補体制御因子 sCR1 を固定化することを試

みた。Lipid-PEG-oligo(dT) の溶液を膵島のサスペンションに添加すると Lipid 部分が疎水性相互作用により細胞膜の脂質二重膜に突き刺さり、細胞表面に oligo(dT) が提示される。これに oligo(dA) で修飾したウロキナーゼや sCR1 を加えると oligo(dT) と oligo(dA) の相互作用で膵島表面にウロキナーゼや sCR1 を固定化できた。移植実験で移植後初期の反応で失われる膵島数を劇的に少なく出来ることを示した。

同種移植: 免疫抑制能を有するセルトリ細胞 (精上皮の基底側から管腔側に向かって伸びる柱状の細胞) で膵島表面を覆うことを計画した。膵島を Lipid-PEG-oligo(dT) で処理し、一方、セルトリ細胞を Lipid-PEG-oligo(dA) で処理し、膵島表面にセルトリ細胞を固定化した。1, 2 日の培養を行うとセルトリ細胞の多くが膵島表面から脱落してしまった。次にハンギングドロップ法で複合細胞凝集体は作成した。これを移植することでマウス間の同種移植 (Balb/c と Black-6 間) で免疫抑制剤の投与を必要としない膵島移植を実現することを試みた。400 個膵島分の細胞を含む凝集体を経門脈的に肝臓内に移植した。移植後血糖値の変動を計測したところ、8 匹のレシピエントのうち 7 匹までが 100 日以上血糖値が正常化し、セルトリ細胞の免疫抑制効果は著明であった。また、移植膵島の組織学的検討を行ったところ、移植膵島の周囲に若干の炎症性細胞の集積が見られるものの、移植後 100 日以上経過後にも肝臓内にインスリン陽性の細胞が存在していた。

異種移植: 精製補体制御因子 sCR-1 を固定化したアガロースマイクロカプセルに封入したラット膵島を糖尿病マウスに異種移植したところ、血糖値が 30-60 日と顕著に延長した。これを受けて、遺伝子組換えの技術を用いて sCR-1 を分泌するレシピエントマウス由来の繊維芽細胞の作成を行っている。本研究費の交付は終了したが、幸いなことに 24-26 年度に新たに科学研究費の交付が決定されたので、継続して sCR-1 分泌細胞と膵島との細胞凝集体を作り、異種移植での拒絶反応の有効性を評価する予定である。

## 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 15 件)

① Luan NM, Teramura Y., Iwata H., Immobilization of soluble complement receptor 1 on islets. *Biomaterials*, 査読有, 2011, 32(22), 4539-4545.

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.017

- ② Luan NM, Teramura Y., Iwata H., Layer-by-layer co-immobilization of soluble complement receptor 1 and heparin on islets. *Biomaterials*, 査読有, 2011, 32(27), 6487-6492.  
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.048
- ③ Chen H, Teramura Y., Iwata H., Immobilization of anticoagulant-loaded liposomes on cell surfaces by DNA hybridization. *Biomaterials*, 査読有, 2011, 32(31), 7971-7977.  
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.002
- ④ Chen H, Teramura Y., Iwata H., Co-immobilization of urokinase and thrombomodulin on islet surfaces by 6 poly(ethyleneglycol)-conjugated phospholipid. *Journal of Controlled Release*, 査読有, 2011, 150(2), 229-234.  
DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.11.011
- ⑤ Inui O., Teramura T., Iwata H., Retention Dynamics of Amphiphilic Polymers PEG-lipids and PVA-alkyl on the Cell Surface. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 査読有, 2010, 2, 1514-1520.  
DOI: 10.1021/am100134v
- ⑥ Teramura Y., Minh LN, Kawamoto T., Iwata H., Microencapsulation of Islets with Living Cells Using PolyDNA-PEG-Lipid Conjugate. 査読有, 2010, 21, 792-796.  
DOI: 10.1021/bc900494x
- ⑦ Teramura Y., Iwata H., Bioartificial pancreas Microencapsulation and conformal coating of islet of Langerhans. *Adv Drug Deliv Rev.*, 査読有, 2010, 15, 62(7-8), 827-40.  
DOI: 10.1016/j.addr.2010.01.005
- ⑧ Teramura Y., Iwata H., Cell surface modification with polymers for biomedical studies. *Soft Matter.*, 査読有, 2010, 6, 1081-1091.  
DOI: 10.1039/B913621E
- ⑨ Teramura Y., Chen H., Kawamoto T., Iwata H., Control of cell attachment through polyDNA hybridization. *Biomaterials*, 査読有, 2010, 31, 2229-2235.  
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.098
- ⑩ Nishigaki T., Teramura Y., Suemori H., Iwata H., Cryopreservation of primate embryonic stem cells with chemically-defined solution without Me2SO. 査読有, 2010, 60, 159-164.  
DOI: 10.1016/j.cryobiol.2009.10.007
- ⑪ 寺村裕治, 岩田博夫, バイオ人工膵臓、膵β細胞の機能発揮に適した環境。月間糖尿病, 査読無, 2009, 1巻, 77-86.
- ⑫ Agudelo C A, Teramura Y., Iwata H., Cryo preserved agarose-encapsulated islets as bio artificial pancreas: a feasibility study. *Transplantation*, 査読有, 2009, 87, 29-34.  
DOI: 10.1097/TP.0b013e318191b24b
- ⑬ Teramura Y., Iwata H., Surface modification of islets with PEG-lipid for improvement of graft survival in intraportal transplantation. *Transplantation*, 査読有, 2009, 88, 624-630.  
DOI: 10.1097/TP.0b013e3181b230ac
- ⑭ Teramura Y., Iwata H., Islet encapsulation with living cells for improvement of biocompatibility. *Biomaterials*, 査読有, 2009, 30, 2270-2275.  
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.036
- ⑮ Arima Y., Kawagoe M., Toda M., Iwata H., Complement activation by polymers carrying hydroxyl groups. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 査読有, 2009, 1, 2400-2407.  
DOI: 10.1021/am9005463

[学会発表] (計 25 件)

- ① 竹本直紘, 寺村裕治, 岩田博夫, 免疫拒絶反応の抑制を目指した膵島表面へのセルトリ細胞固定化. 第32回日本バイオマテリアル学会大会 2010年11月30日, グランドプリンスホテル広島 (広島市)
- ② 竹本直紘, 寺村裕治, 岩田博夫, オリゴDNAの相補対形成による膵島表面へのウロキナーゼ固定化. 第5回日本バイオマテリアル学会関西若手研究発表会, 2010年8月6日, 芝蘭会館 山内ホール (京都市)
- ③ Luan, M. Nguyen, Teramura Y., Iwata H., Islet microencapsulation within sCR1-immobilized agarose gel. 第59回高分子学会年次大会, 2010年5月27日, パシフィコ横浜 (横浜市)
- ④ 陳顥, 寺村裕治, 岩田博夫, PEG脂質を用いた生理活性物質の膵島表面への固定. 第59回高分子学会年次大会, 2010年5月26日, パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑤ 岩田博夫, 寺村裕治, ポリエチレングリコール結合脂質を用いた膵島の表面修飾と生着率の向上. 第13回日本異種移植研究会, 2010年3月14日, 東京医科歯科大学(東京都)
- ⑥ 寺村裕治, 岩田博夫, 細胞表面修飾における膵島の生着率の向上, 第37回日本膵・膵島移植研究会, 2010年3月13日, 栃木県総合文化センター (宇都宮市)
- ⑦ 寺村裕治, 山本英樹, 川本卓男, 岩田博夫, 細胞間相互作用の解析を可能とする細胞の表面修飾. 第31回日本バイオマテリアル学会大会, 2009年11月17日, 京都テルサ (京都市)
- ⑧ 寺村裕治, 川本卓男, 岩田博夫, 細胞間相互作用を利用した膵ランゲルハンス島のカプセル化. 第31回日本バイオマテリアル学会, 2009年11月17日, 京都テルサ (京都)

市)

- ⑨陳 顯, 寺村裕治, 岩田博夫, PEG脂質を用いた生理活性物質の膜表面への固定. 第31回日本バイオマテリアル学会, 2009年11月17日, 京都テルサ (京都市)
- ⑩山本英樹, 寺村裕治, 岩田博夫, 異種細胞間相互作用によるES細胞の三次元培養と分化制御. 第31回日本バイオマテリアル学会大会, 2009年11月17日, 京都テルサ (京都市)
- ⑪西垣達矢, 寺村裕治, 岩田博夫, 人工多能性幹細胞の凍結保存液の検討. 第31回日本バイオマテリアル学会大会, 2009年11月17日, 京都テルサ (京都)
- ⑫山本寿弘, 寺村裕治, 岩田博夫, 平面脂質膜と両親媒性高分子の相互作用解析. 第31回日本バイオマテリアル学会大会, 2009年11月16日, 京都テルサ (京都)
- ⑬寺村裕治, 岩田博夫, 細胞による膜ランゲルハンス島のカプセル化. 47回日本人工臓器学会, 2009年11月13日, 新潟大学 (新潟市)
- ⑭Iwata H., Cell adhesion behavior on well defined surfaces. 3rd International Symposium on Nanomedicine -Molecular Imaging for System Biology-, 2009年11月4日, 岡崎コンファレンスセンター (岡崎市)
- ⑮Teramura Y., Takemoto N., Iwata H., Islets-encapsulation with living cells for improvement of biocompatibility. IPITA-IXA 2009 Joint meeting, 2009年10月15日, Venice Lido Congress Center (ベニス)
- ⑯Teramura Y., Iwata H., Surface modification of islets with PEG-lipid for improvement of graft survival in intraportal transplantation. IPITA-IX A 2009 Joint meeting, 2009年10月14日, Venice Lido Congress Center (ベニス)
- ⑰寺村裕治, 岩田博夫, 両親媒性高分子を用いた細胞による膜ランゲルハンス島のカプセル化. 第58回高分子討論会, 2009年9月17日, 熊本大学 (熊本市)
- ⑱岩田博夫, バイオインターフェイス-解析+設計+応用-. 化学工学会 第41回秋季大会, 2009年9月16日, 広島大学 (広島市)
- ⑲Iwata, H., Cells surface modification with a ultra thin membrane. 2009 International Workshop on Nano Biomedicine, 2009年8月21日, National Cheng Kung University (Taiwan)
- ⑳山本英樹, 中路 正, 藤田 聡, 加藤功一, 岩田博夫, サルES細胞の神経細胞への分化誘導とEGF固定化基板における選択. 日本バイオマテリアル学会 第4回関西若手研究発表会, 2009年8月7日, 銀杏

会館 (大阪市)

- ㉑西垣達矢, 寺村裕治, 岩田博夫, 人工多能性幹細胞の凍結保存液の検討. 日本バイオマテリアル学会 第4回関西若手研究発表会, 2009年8月7日, 銀杏会館 (大阪市)
- ㉒山本寿弘, 寺村裕治, 岩田博夫, 平面脂質膜と両親媒性高分子の相互作用解析. 日本バイオマテリアル学会 第4回関西若手研究発表会, 2009年8月7日, 銀杏会館 (大阪市)
- ㉓Iwata, H., Cell surface modification for regenerative medicine. NIMSWEEK09, Nanobio-materials and technologies for breakthrough in future medicine, 2009年7月22日, つくば国際会議場 (つくば市)
- ㉔村上隆史, 岩田博夫, 有馬祐介, 戸田満秋, 高分子薄膜による表面プラズモン場励起蛍光法におけるエネルギー移動の抑制. 第55回高分子研究発表会, 2009年7月17日, 兵庫県民会館 (神戸市)
- ㉕Iwata H., Biointerface-analysis+design+application. Biomaterials Asia 2009, 2009年4月8日, Regal Airport Hotel (Hong Kong)

[図書] (計 1 件)

- ① Teramura Y., Chen H., Takemoto N., Sakurai K., Iwata H., "Polymeric materials for surface modification of living cells", Dumitriu, S. and Popa V. ed., CRC Press, *Polymeric Biomaterials: Volume II, Medicinal and Pharmaceutical Applications of Polymers: Third Edition*, in press (2012/6/15)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/te03/index-j.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩田 博夫 (IWATA HIROO)  
京都大学・再生医科学研究所・教授  
研究者番号: 30160120

### (2) 研究分担者

稲垣 暢也 (INAGAKI NOBUYA)  
京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30241954

研究分担者

上本 伸二 (UEMOTO SHINJI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：40252449

研究分担者

川本 卓夫 (KAWAMOTO TAKUO)

京都大学・放射性同位元素総合センター・教授

研究者番号：10231276

研究分担者

興津 輝 (OKITSU TERU)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10378672

辞退：平成 23 年 4 月 11 日

研究分担者

寺村 裕治 (TERAMURA YUJI)

京都大学・放射性同位元素総合センター・助教

研究者番号：10365421

辞退：平成 22 年 4 月 15 日

研究分担者

外波 弘之 (TONAMI HIROYUKI)

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：90420405

辞退：平成 22 年 4 月 15 日