

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15469

研究課題名(和文)新規血管新生ペプチドの導入による糖尿病への革新的細胞療法の構築

研究課題名(英文) Establishment of novel cell therapy for diabetes by introducing angiogenic peptide

研究代表者

後藤 昌史 (Goto, Masafumi)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50400453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：皮下への膵島移植は低侵襲かつ複数回の移植が可能であり、必要時に容易に取り出せるという利点を有しているが、乏血管性という課題を抱えている。したがって、皮下膵島移植の生着を促進するためには、移植部位への有効な血管床構築法を構築する必要がある。本研究ではまず血管新生ペプチドに着目したが、皮下膵島移植の成績を向上させるには大量を要し、浸出液を伴う事が判明した。そこで新生血管誘導効果を有するRGD基を豊富に含有するリコンビナントペプチドに着目し検証したところ、リコンビナントペプチドは皮下に新生血管を効果的に誘導し、現行の標準法である門脈内膵島移植と同等の移植効果を皮下にて発揮し得る事が判明した。

研究成果の概要(英文)：Subcutaneous islet transplantation is associated with minimal invasiveness, replicability, and ready removability, but poor vascularization. Thus, the optimization of the prevascularization procedures is crucial for improving the outcomes. Therefore, in the present study, we first evaluated the effectiveness of angiogenic peptide. Although rather small amount of angiogenic peptide was effective for constructing vascular network under the skin, high dose of angiogenic peptide was required in order to improve the engraftment of subcutaneous islet transplantation. Then, we focused on recombinant peptide, which includes a lot of RGD constructions. It was proved that recombinant peptide was effective for inducing vascular network under the skin, and that the outcome of subcutaneous islet transplantation using recombinant peptide was almost comparable with that of current standard intraportal islet transplantation.

研究分野：移植外科、細胞移植

キーワード：移植・再生医療 血管新生 膵島移植 ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病に対する先端細胞療法である膵島移植は、現在のところ経皮経門脈経路で肝臓内に移植する方法が世界標準であるが、いくつかの問題点が存在する。まず、肝内は原始免疫反応が亢進しているため、移植膵島が門脈血に接触すると IBMIR (Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction) と呼称される激しい炎症反応を引き起こし、移植膵島の 40-50% が移植後数時間で破壊される。肝内特有である IBMIR により、1 回の移植では安定した血糖改善効果を発揮する量の膵島が生着出来ないと考えられている。また、門脈塞栓といった致命的な合併症の危険性も指摘されており、さらに iPS 細胞由来の膵島や異種膵島の移植が実施された後に移植膵島を起因とする合併症が起きた場合、経門脈移植では肝臓内に移植された膵島を摘出することは不可能である。このような理由から、経門脈移植は膵島移植にとって最適な移植部位とは言い難い。そこで、門脈移植に代わる新たな移植部位の探求が、膵島移植における重要な研究テーマの一つとなっている。これまでに、腎被膜下、後腹膜下、筋肉内、胸腺内、胃粘膜下、大網内、そして皮下が経門脈移植に代わる移植移植部位として注目されてきた。その中でも、皮下への膵島移植は最も低侵襲であること、複数回の移植を安全に行えること、必要時に移植膵島の摘出を簡易に行えることなど様々な利点があることが知られている。しかし、皮下は膵島移植において、膵島生着に必要とされる血管に乏しく、膵島の生着には不利な部位である。このため、皮下膵島移植は門脈移植と比べて多量の膵島が必要であり、未だ門脈移植が主流となっている。皮下への膵島移植を確立するには、移植予定箇所の皮下に新生血管床をいかに効果的に構築し、膵島の生着を向上させるかが重要な鍵となる。

## 2. 研究の目的

そこで本研究においては、皮下における新生血管床構築の学理を究明し、高付加価値を有する新規血管新生ペプチドの導入により、臨床応用可能な皮下への膵島移植法を確立する事を目的とし、検証を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規血管新生ペプチドによる皮下血管床構築方法の至適化

膵島移植部位となる皮下に、新規血管新生ペプチド (AGP) を含有するアガロースを留置する事により理想的な新生血管床を構築するための条件の至適化を行う。これまでの予備検討に基づき、AGP (2ug、20ug、200ug) を含有する 5.65%アガロース溶液 (アガロース LT600) を作製し、膵島移植部位となる皮下に 1 週間留置し、その後アガロースを抜居した上で、マクロ画像の半定量化および新生血管マーカーの免疫組織化学染色により新生血管の構築程度を評価する。次に、予め作製した新生血管床が実際に皮下に移植した膵島グラフトへの血管新生に要する期間を短縮するかどうかを二光子顕微鏡システムで検証する。いずれも対照群は AGP の代わりに生理食塩水を使用する。免疫組織化学染色および新生血管の半定量化によって評価を行う。

### (2) 新生血管誘導効果を有する RGD 基を豊富に含有するリコンビナントペプチド (RCP) による皮下血管床構築方法の至適化および移植膵島生着効果に関する検証

Streptozotocin により誘導した糖尿病マウス (C57BL/6 マウス) の皮下へ、RGD 基を豊富に含有するリコンビナントペプチド (RCP) を二週間あるいは四週間留置し、その

後デバイスを除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、糖負荷試験にてグラフト機能を評価した。さらに、現在の標準法である経門脈移植との移植効率についても比較検証した。

#### 4. 研究成果

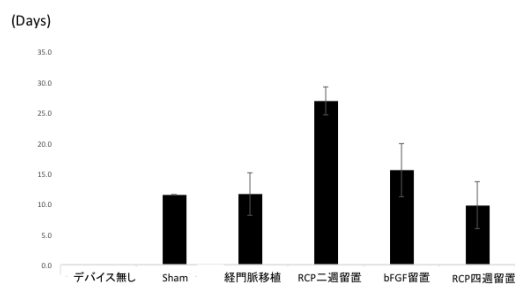
##### (1)新規血管新生ペプチドによる皮下血管床構築方法の最適化

H27年度の検証により、血管新生ペプチドは200ugにて皮下に十分な新生血管床を構築することが判明した(下図)。しかし、H28年度当初の検証により、血管新生ペプチドへのラミニン5あるいはヘパラン硫酸の付加を持続的に実施することは困難であることが明らかとなり、また *in vivo* の膵島移植実験においてグラフト生着を促進するには大量の血管新生ペプチドが必要であり、それに伴い軽度の浸出液も散見されることが判明した。そこでH28年度後半は、新生血管誘導効果を有する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、新生血管誘導効果の検証および移植前皮下留置による糖尿病動物の治癒促進効果について検証を実施した。



##### (2)新生血管誘導効果を有するRGD基を豊富に含有するリコンビナントペプチド(RCP)による皮下血管床構築方法の最適化および移植膵島生着効果に関する検証

現行の世界標準である経門脈移植においては、660 IEQsの膵島量が、マウス同種同系移植におけるマージナル dose であることが判明した。RCPを移植前に二週間留置した群では、糖尿病レシピエントマウスの治癒率は37.5% (3/8)に留まったが、RCPを移植前に四週間留置した群では100% (8/8)治癒することが判明し、治癒までに要する期間(下図)を比較しても経門脈移植(100% (8/8))に全く劣らず、bFGFを用いた新生血管誘導群(75% (6/8))の結果を凌駕することが判明した。



移植された糖尿病レシピエントマウスが治癒までに要する期間(日)

#### 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 3 件)

(1) Fukuoka K, Inagaki A, Nakamura Y, Matsumura M, Yoshida S, 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、2017、in press

(2) Eguchi H, Kawamura T, Kashiyama N, Matsuura R, Sakai R, Nakahata K, Lo PC, Asada M, Maeda A, Goto M, Toyoda M, Okuyama H, Miyagawa S  
Supplemental Analysis for N-linked Sugars in Adult Pig Islets.  
Transplantation Proc 査読有、Vol 48、No.4、2016、pp. 1302-1303  
doi: 10.1016/j.transproceed.2015.10.071.

(3) ShimaH, Inagaki A, Imura T, Yamagata Y, Watanabe K, Igarashi K, Goto M, Murayama K  
Collagen V is a potential substrate for clostridial collagenase G in pancreatic islet isolation.  
*Journal of Diabetes Research* 査読有、2016、pp. 4396756 (電子ジャーナル)  
doi:10.1155/2016/4396756.

〔学会発表〕(計 9 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 RGD 基 (Arg-Gly-Asp) 含有コラ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) 山田慎二、永井展裕、西條早絢、梶弘和、後藤昌史、阿部俊明  
bFGF 除放カプセルデバイスによる皮下組織における血管新生誘導能の評価、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、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  
皮下膵島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)

(4) 後藤昌史  
安全で高性能な細胞分離酵素剤の開発による膵島移植の技術革新、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)

(5) 植松智海、稲垣明子、後藤めぐみ、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新高輪(東京)

(6) 植松智海、稲垣明子、猪村 梢、五十嵐康宏、大内憲明、里見進、後藤昌史  
Optimization of pre-vascularization procedures for improving islet engraftment under the skin、26<sup>th</sup> International Congress of The Transplantation Society、2016 年 8 月 20 日、Hong Kong (中国)

(7) 宮崎勇希、猪村武弘、山形洋平、前田浩村山和隆、渡邊君子、稲垣明子、五十嵐康宏、大内憲明、里見進、後藤昌史  
The influence of dissociation enzymes on isolated islets during pancreatic islet isolation procedures、26<sup>th</sup> International Congress of The Transplantation Society、2016 年 8 月 21 日、Hong Kong (中国)

(8) 後藤昌史  
膵島移植の現状と今後の展望、Diabetes Front Meeting in Morioka、2016 年 4 月 22 日、盛岡グランドホテル(盛岡)

(9) 後藤昌史、山形洋平、村山和隆、渡邊君子、前田浩、猪村武弘、稲垣明子、五十嵐康宏、宮城重人、Olle Korsgren、大内憲明、里見進  
新規リコンビナントコラゲナーゼの膵島移植への臨床応用、第 116 回日本外科学会、2016 年 4 月 16 日、大阪国際会議場(大阪)

〔図書〕(計 1 件)

(1) 後藤昌史、中山書店、胆道・膵疾患診療の最前線、2017、in press

〔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

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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

軒原 清史 (NOKIHARA Kiyoshi)