

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 21 日現在

機関番号：32682

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15480

研究課題名（和文）ガラス化凍結技術を応用した膵ランゲルハンス島シート超低温保存法と機能評価法の開発

研究課題名（英文）Establishing a new cryopreservation method for pig pancreatic islet sheet by vitrification and an evaluation method by a high-throughput sequencing.

研究代表者

長屋 昌樹（Masaki, Nagaya）

明治大学・研究・知財戦略機構・特任教授

研究者番号：90329300

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）：膵島を長期にわたり安定して保存できる技術があれば、膵島を無駄にすることなく免疫拒絶の可能性が低い患者に移植できる。本申請では、ブタ膵島シートの作製、さらにガラス化凍結保存法を応用したブタ膵島シートの超低温保存技術の確立、および、次世代シーケンサーを用いた膵島シート機能の評価法の開発、シートの至適移植部位の探索を目的とした。

研究成果の概要（英文）：Islet transplantation is considered as an option for the treatment of type 1 diabetes. However, transplanted islets face several challenges, including Blood type and Human leukocyte antigen mismatches. In addition, islet isolation is still complicated and technically difficult in some cases. Therefore, the cases of mismatches and islets with a low yield at isolation are not transplanted and distributed for basic research. To allow the unlimited collection of islets, islet cryopreservation methods need to be optimized. In this regards, the pancreatic islet sheet may provide a promising option for cryopreserving islets. A library of cryopreserved islets allows for selection based on HLA tissue type and creates more flexibility regarding the total amount of transplantable mass. The present study aimed at establishing a new cryopreservation method for pig pancreatic islet sheet by vitrification and an evaluation method by a high-throughput sequencing

研究分野：一般外科学

キーワード：膵ランゲルハンス島 膵島移植 膵頭シート

1. 研究開始当初の背景

1 型糖尿病患者への治療の手段として、膵ランゲルハンス島（以下、膵島）移植療法が行われている。臓器不足は世界共通の恒常的問題であるが、膵島移植においては必ずしもそうではない。アルバータ大学は、1年間で約100例の膵島単離、約60例の膵島移植を行うが、2012年では、血液型適合の患者、またはパーチャル・クロスマッチ陰性患者が待機リストになく、膵臓摘出に至らなかった例が、それぞれ14例/10例あった。24例もの移植の可能性をなくしたこととなる。臓器不足の問題は膵島移植においては例外で、北米全体では相当数のドナー膵臓が無駄になっている。

2. 研究の目的

膵島を長期にわたり安定して保存できる技術があれば、膵島を無駄にすることなく免疫拒絶の可能性が低い患者に移植できる。本申請では、ブタ膵島シートの作製、さらにガラス化凍結保存法を応用したブタ膵島シートの超低温保存技術の確立、および、次世代シーケンサーを用いた膵島シート機能の評価法の開発、シートの至適移植部位の探索を目的とした。

3. 研究の方法

(A) ブタ膵島シートの作製、ガラス化凍結法を応用したブタ膵島シートの超低温保存技術の開発。(B) 次世代シーケンサーを用いた膵島シート機能の評価法の開発。(C) シートの至適移植部位の探索を目的とし、Swine Leukocyte Antigen(SLA)-DNA タイピング技術の確立と SLA マッチングブタの作出、を行った。

(A) ガラス化凍結法を応用したブタ膵島シートの超低温保存技術の開発: まず膵島をシート化することが可能か、凍結することは可能か、をマウスを用いて検証した。マウスの膵島の分離は申請者が報告した方法にて行った(Nagaya et al. Horm Metab Res. 2016;48: 540-9)。膵島シートの作製はこれまで申請者が報告した技術に若干の改良を加えて行った(BMC Biotechnol. 2013;13:58.)。膵島を分離1-3日後、膵島に対しトリプシン処理を行い、膵島を分散した。細胞を温度感受性プレート(UpCell®、株式会社セルシード、東京)にコンフルエントになるように播種し、膵島シートを作製した。また、膵島はガラス化法による超低温保存が可能か否かを検証した。膵島自身がガラス化法による超低温保存が可能である場合、膵島シートガラス化法による超低温保存を試みることにした。膵島の凍結では、凍害保護剤の種類や使用濃度を選択・調整し、膵島の超低温保存を試みた。膵島の生存率は、死細胞に対する核酸染色

色素 Propidium Iodide (PI)を用い、細胞あたりのPI陽性率にて評価した。

またこの技術を、申請者が作出した *Mouse pancreatic and duodenal homeobox 1(mpx-1)* 遺伝子 promoter 下に *Venus* 蛍光発色遺伝子を連続させ、膵島が恒常的に緑色発光するトランスジェニック (tg) ブタ(Pdx-1- Venus tg ブタ, J Reprod Dev. 2014;60:230-7.)の膵島への応用を試みた。ブタ膵島の分離は申請者が報告した方法にて行った(Nagaya et al. Pancreas. 2015;44:778-85.)。

(B) 次世代シーケンサーを用いた膵島シート機能の評価法の開発: 申請者はこれまでに、エピジェネティック遺伝子解析を応用し、環境の変化が膵島にもたらす影響を的確に評価できるシステムを開発している((挑戦的萌芽研究;研究課題番号: 24659596、Nagaya et al. Pancreas. 2015;44:778-85.)。エピジェネティックな遺伝子変化の検証を行う理由として、いくつかの遺伝子を組み合わせた解析により、細胞の形態変化がわからないようなシート内の細胞の機能の変化を、凍結などの環境の変化による影響も捕らえられる可能性がある。まずは、マウスの膵島、膵島から分散した細胞、膵島シートの機能評価に際し、評価において適切となる遺伝子群の選定を行った。膵細胞の転写因子である、NeuroD、paired-box-containing gene (*Pax*)-4、6、*Pdx-1* 等いくつかの遺伝子を選択した。realtime polymerase chain reaction (PCR)でそれぞれの膵島の細胞に対する遺伝子変化の有無を確認後、これらの遺伝子のエピゲノムの変化が本仮説を裏付けるかを、エピジェネティック解析に *Bisulfite genomic sequencing* 法を用いて検証した。これが機能する場合には、次世代シーケンサー (MiSeq, illumine, CA, USA) を用いて膵島機能の変化を解析できるシステムの構築を試みることにした。

(C) シートの至適移植部位の探索を目的とした、SLA-DNA タイピング技術の確立と SLA マッチングブタの作出: 拒絶の回避ができるモデルがあれば膵島シートが生着する最適な場所を検証できる。ブタの SLA は、ブタの主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC: Major Histocompatibility Complex)であり、外来抗原や移植片に対する拒絶反応、免疫応答に関与する重要な遺伝子群である。SLA-DNA タイピング技術の確立と SLA マッチングブタの作出を試みた。ブタの SLA は Sequencing Based Typing (STB)法による決定を試みた。解析座位は、class II 領域 3 座位 (SLA-I,2,3)と class II 領域 2 座位 (DRB1, DQB)の 5 座位を解析した。

4. 研究成果

(A) マウス膵島のシートの作製が可能であった(投稿準備中)。一方で、膵島シートの作製における問題点は以下が抽出された。膵島シートの作製では、single ~ small aggregate(3-5cells) に分散させた膵島を温度感応性培養皿に播種し、平面培養にてシート化する。現行では分散から細胞の播種までの工程で約>30%の細胞の損失が生じているが、既報でも同様の報告が確認できる(Cell Transplant. 2007;16:527-37.)。また組織から細胞を分散させると、細胞は細胞死の方向に向かう傾向があり、膵島でも同様である (Apoptosis. 2002;7:247-60., J Endocrinol. 1999;163:181-90., Surgery. 2001;130:333-8.)。工程の見直しを行っているが、細胞の損失に対する良策は見つかってはいない。

Neuro D、*pdx-1* など、細胞の特徴的な遺伝子の発現に着目し膵島シートの検証を行ったが、膵島と比し、分散した細胞、あるいはシートでは顕著に遺伝子発現が低下することが判明した。これまでに、細胞をシート化することにより、様々な蛋白の産生の上昇が見られる報告もあるが(Nat Med. 2007;13:880-5.)、細胞に特徴的な遺伝子の発現においては、膵島シートは分散した細胞と比し、発現の上昇はするものの膵島に追いつくことは出来ない。膵島シートにはまだいくつかの課題があるといえる。また、膵島シートの保存を目的とし、まずはマウス膵島に対する超低温保存を試みた結果、機能を維持したまま膵島を凍結させる技術の確立に至った (Horm Metab Res. 2016;48: 540-9)。膵島シートに対する超低温保存の準備を進めている。

引き続き、ブタ膵島のシート化を行った。ブタの膵島シートの作製は可能であり(図.1)膵島シートに対する組織学的評価では *NeuroD*、*Pdx-1*、インシュリン、C-peptide、グルカゴンの発現は確認できている(図.2)。また、このシートの SCID マウスへの移植では、膵島シートは生体内で安定的に生着し、緑色発現をしていることも確認できている(未発表データ)。しかしながら、ブタの膵島は分散後細胞間の接着が極めて弱く、シートの作製は安定してはいない。今後は細胞間の接着を強めるいくつかの薬剤を使用、また、申請者らが新たに開発した凍結技術を用い、長期保存が可能な膵島シートの作製の検証を行う。

膵島の機能、移植の影響を短期間で評価するには、膵島に関連する遺伝子を用い、移植した膵島に対するエピゲノム解析が有用な可能性がある (Nagaya et al. pancreas

2015)。しかしながら、ブタの遺伝子の多くは既存のゲノム情報が不完全であり、ゲノムワイドな解析が困難である事に直面した。一方で、エピジェネティック制御は種を超えて保存された遺伝子の発現調節機構で、動物間においても相同性を確認出来る場合が多いことを見出した。現在、ゲノム情報が豊富なマウス、ヒトの情報を用いて、ブタの膵島に関連する遺伝子のエピジェネティック制御を検証する手法に切り替えシステム構築を行い始めた。

本申請をもとに、移植用ブタの選定のための SLA-DNA タイピング技術の確立とブタの作出を試みた。STB 法によりブタの SLA は安定して解析が可能であった。これにより SLA マッチングブタでの膵島シートの至適な移植部位の探索ができる評価系を確立するに至った。SLA をヘテロでもつ雄と雄とは異なった SLA をホモでもつ雌の掛け合わせを行った場合、2 種の異なったタイプのブタができることとなるが(仮 A, B)、A をもつブタが 4 頭(雄;3、雌;1)、B をもつブタ 3 頭(いずれも雌) 確保でき、SLA マッチングブタの作出に成功した(未発表データ)。A 間、B 間、それぞれの兄弟間の移植では拒絶は最小限であることが想定されるのに加え、A 間の雄雌での交配により、今後は SLA がフルマッチのブタが生まれることとなり、移植実験で結果を求めるには理想的なブタの作出ができた。本申請期間内で、膵島シートの理想的な移植場所の検証には間に合わなかったが、ブタを確保できたことから来年度以降の新たなテーマとなった。



図 1.冷却前 (Dish に接着)、冷却開始、Dish から浮遊した膵島細胞シート

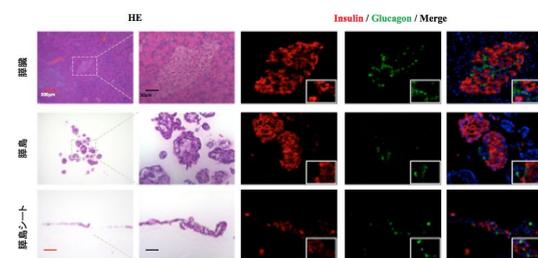


図 2.膵島シートに対するインシュリン、グルカゴン蛋白の発現解析

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 6 件)〔学会発表〕(計 3 件)

1. Umeyama K, Nakajima M, Yokoo T,

- Nagaya M, Nagashima H. Diabetic phenotype of transgenic pigs introduced by dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1 α . *J Diabetes Complications*. 2017 Feb 13. pii: S1056-8727(16)30529-3. 査読有。
2. Nagaya M, Matsunari H, Kanai T, Maehara M, Nakano K, Umeki I, Katsumata Y, Kasai Y, Sakai R, Kobayashi M, Honda M, Abe N, Watanabe M, Umeyama K, Nagashima H. An Effective New Cryopreservation Procedure for Pancreatic Islets Using Hollow Fiber Vitrification. *Horm Metab Res*. 2016;48:540-9. 査読有。
 3. Nagaya M, Watanabe M, Kobayashi M, Nakano K, Arai Y, Asano Y, Takeishi T, Umeki I, Fukuda T, Yashima S, Takayanagi S, Watanabe N, Onodera M, Matsunari H, Umeyama K, Nagashima H. A transgenic-cloned pig model expressing non-fluorescent modified Plum. *J Reprod Dev*. 2016;62:511-520. 査読有。
 4. Miyagawa S, Matsunari H, Watanabe M, Nakano K, Umeyama K, Sakai R, Takayanagi S, Takeishi T, Fukuda T, Yashima S, Maeda A, Eguchi H, Okuyama H, Nagaya M, Nagashima H. Generation of α 1,3-galactosyltransferase and cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene double-knockout pigs. *J Reprod Dev*. 2015;61:449-57. 査読有。
 5. Nagaya M, Arai Y, Matsunari H, Honda M, Nakano K, Maehara M, Sugimoto N, Kobayashi M, Sakai R, Asano Y, Watanabe M, Umeyama K, Nagashima H. A new system to evaluate the influence of immunosuppressive drugs on pancreatic islets using epigenetic analysis in a 3-dimensional culture. *Pancreas*. 2015;44:778-85. 査読有。
 6. Watanabe M, Kobayashi M, Nagaya M, Matsunari H, Nakano K, Maehara M, Hayashida G, Takayanagi S, Sakai R, Umeyama K, Watanabe N, Onodera M, Nagashima H. Production of transgenic cloned pigs expressing the far-red fluorescent protein monomeric Plum. *J Reprod Dev*. 2015;61:169-77. 査読有。

〔学会発表〕(国際学会 1 件、国内学会 2 件、計 5 件)

(国際学会)

1. Matsunari H, Watanabe M, Nakano K, Uchikura A, Asano Y, Umeyama K, Yamaguchi T, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: Blastocyst complementation restore apancreatic phenotype of pdx1 pigs. In: International Society for Stem Cell Research 2015 Annual Meeting: 24-27 Jun 2015; Stockholm, Sweden.

(国内学会)

2. 渡邊將人、松成ひとみ、中野和明、梅山一大、高柳就子、長屋昌樹、宮川周士、花園豊、中内啓光、長嶋比呂志: ブタにおけるゲノム編集技術を用いた遺伝子ノックアウト. In: 日本ゲノム編集学会 第 1 回大会: 6-7 Sep 2016; 広島.
3. 渡邊將人、松成ひとみ、中野和明、梅山一大、長屋昌樹、宮川周士、花園豊、中内啓光、長嶋比呂志: 人工ヌクレアーゼを用いた遺伝子ノックアウト細胞の樹立およびブタの作出効率. In: 大 38 回日本分子生物学会年会: 1-4 Dec 2015; 神戸. [産業財産権] 出願状況(計 0 件) [その他] ホームページ等
明治大学バイオリソース研究国際インスティテュート
<http://muiibr.com/institute/institute.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長屋昌樹 (MASAKI NAGAYA). 明治大学・研究・知財戦略機構・特任教授 研究者番号: 90329300

(2) 研究分担者

長嶋比呂志 (HIROSHI NAGASHIMA). 明治大学・農学部教授 研究者番号: 50318664

梅山一大 (KAZUHIRO UMEYAMA). 明治大学・研究・知財戦略機構・特任准教授 研究者番号: 70342699

渡邊將人 (MASATO WATANABE). 明治大学・研究・知財戦略機構・特任講師 研究者番号: 00321688

松成ひとみ (HITOMI MATSUNARI). 明治大学・研究・知財戦略機構・特任講師 研究者番号: 70639517

新井良和 (YOSHIKAZU ARAI). 明治大学・研究・知財戦略機構・研究推進員: 70639517