

令和元年6月7日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01362

研究課題名（和文）免疫隔離膜を用いた革新的細胞移植デバイスの研究

研究課題名（英文）Research on innovative cell transplantation device using immunisolation membrane

研究代表者

安藤 由典（Ando, Yusuke）

県立広島大学・公立大学の部局等（広島キャンパス）・准教授

研究者番号：80712942

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：細胞移植デバイスに使用するエチレン-ビニルアルコール共重合体製の半透膜の製膜検討を行い、ポアサイズの異なる膜を安定的に作成することが可能となった。ポアサイズの異なる膜を用い、グルコース及び各種タンパクの透過性評価を行い、ポアサイズによりタンパク質の分離が可能なることを明らかにした。IgGが透過しない膜を見出し、抗体の透過を防げる可能性が示された。更に、いずれの膜でも細胞は透過しないことを確認した。一方、細胞評価のために、ヒトiPS細胞から膵細胞の作成、評価を行い、作成した膵細胞が糖の高濃度に依存してインスリンを分泌することを確認した。同細胞をデバイス中に封入し、動物への投与も試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞にとって生体内は最も優れた培養環境である。この環境を活かすことができれば移植デバイスは単なるコンテナとしての役割のみならず、in vivo でのCell Processing Centerとして活用でき、細胞の分化誘導・維持・培養・機能評価・安全性評価が可能となる。本研究で開発するアクセスポート付き細胞移植デバイスは、免疫隔離膜から構成されており、細胞を免疫から隔離することができるため、免疫不全動物を使用しなくても他家細胞の評価や使用が可能となる上、アクセスポートから安全かつ容易に細胞や薬剤を出し入れ可能である。更に、移植細胞は生体と隔離されており、癌化等のリスクへの対応策ともなり得る。

研究成果の概要（英文）：The formation of a semipermeable membrane made of ethylene-vinyl alcohol copolymer to be used for a cell transplantation device was investigated, and it became possible to stably produce membranes with different pore sizes. The permeability of glucose and various proteins was examined using membranes with different pore sizes, and it was clarified that separation of proteins is possible by pore size. We found a membrane impermeable to IgG, indicating the possibility of protecting antibody permeation. Furthermore, it was confirmed that cells did not permeate through any of the membranes. On the other hand, for the evaluation of cells, preparation of pancreatic cells from human iPS cells was performed, and evaluation was performed to confirm that the prepared pancreatic cells secrete insulin depending on high concentration of glucose. The cells were enclosed in a device and transplantation to animals was also attempted.

研究分野：バイオ人工臓器

キーワード：細胞移植デバイス 免疫隔離膜 バイオ人工臓器 バイオ人工膵臓 糖尿病 細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞にとって生体内は最も優れた培養環境である。この環境を活かすことができれば移植デバイスは単なるコンテナとしての役割ばかりでなく、in vivo での Cell Prosecing Center(以下 CPC と略す)として活用でき、細胞の分化誘導・維持培養・機能評価・安全性評価が可能となる。本研究で開発するアクセスポート付き埋め込み型細胞移植デバイス(Access port attached implantable Cell Transplantation Device 以下 AiCTD と略す)は免疫隔離膜(栄養分や低分子化合物、低分子量タンパク質等は透過可能)から構成されており、細胞を免疫から隔離することができるため、従来の in vivo 評価の様に自家細胞や免疫不全マウス等を用いざるを得ないという制限がなく、他家細胞の評価や使用も可能となる。また、AiCTD はアクセスポートから安全かつ容易に細胞や薬剤を何度でも出し入れ可能な上、長期に亘り導入した細胞が機能を維持可能となる革新的なバッグ型デバイスである。更に、他家細胞や iPS 細胞由来細胞の移植に AiCTD を使用すれば、移植細胞を生体と隔離可能であり、癌化等のリスクに対する対応策にもなるため、バイオ人工膵臓等、細胞を利用した人工臓器(例えば、血友病や酵素補充療法、バイオ人工肝臓等に対する細胞治療)の臨床応用に向けた極めて有効な技術になり得る。

従来、バイオ人工膵臓等で細胞や組織を免疫隔離して移植する技術としては、カプセルやゲルに細胞等を包埋して移植する方法も研究されているが、一度移植した細胞を取り出すのは困難であり、細胞や組織、薬剤等を容易に何度でも出し入れ可能な技術はこれまでに無い画期的な技術である。

研究代表者らは、これまで人工膵臓や人工腎臓等の開発を目指し、バッグ型デバイスの予備的な研究を行ってきた。その中で、生体適合性に優れ免疫細胞からも隔離可能なエチレン-ビニルアルコール共重合体製の半透膜で作成した埋め込み型デバイス中にラット膵島細胞を導入し、糖尿病モデル犬に移植することで短期間血糖値をコントロール可能なことを明らかにした。しかし、これまで使用したプロトタイプでは、機能を保ったまま細胞を長期間維持することが困難であり、また強度的にも生体内で長期間維持するには不十分であったため、更なる検討が必要であった。

2. 研究の目的

本研究の AiCTD を開発することにより、例えばレシピエントの免疫を考慮する必要なく in vivo において他家細胞の評価や利用が可能となる。また、細胞のサンプリングも容易になるため、これまで実験自体が困難であった移植細胞の経時的モニタリングによる機能評価・安全性評価も可能となり、AiCTD を in vivo における CPC として利用するという全く新しい考え方を提案できる。

更に、AiCTD をバイオ人工膵臓として使用することにより、例えば、他家や iPS 細胞由来の膵細胞を直接移植する場合に比べて、安全性が飛躍的に高まるため臨床応用し易くなるものと考えている。即ち、免疫隔離膜を介して生体と移植細胞が隔離されているため、免疫が働いて細胞が排除される可能性は低く、免疫抑制剤の使用は不要となる。一方で、万が一癌化等の問題が発生した場合でも、転移等の可能性も低く、容易に取り出すことが可能となる。更に、AiCTD は膵臓以外の用途(例えば、血友病や酵素補充療法、バイオ人工肝臓等に対する細胞治療)にも応用できる可能性が高く、細胞を利用したバイオ人工臓器のコア技術になるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1)埋込み型の細胞移植デバイスの開発を行うため、評価に用いるエチレン-ビニルアルコール共重合体製の半透膜の製膜方法の検討を行った。

(2)ポアサイズの異なる(10~100nm)計4種類の膜を作成し、グルコース、牛血清アルブミン(BSA)、インスリン及び IgG の各膜拡散透過実験を行った。即ち、in vitro において二つのチャンパーの間に評価する膜を挟み、片方のチャンパーに BSA 50mg/ml に評価物質を加えた水溶液を入れ、もう片方のチャンパー中には BSA 50mg/ml のみの水溶液を入れて、経時的に両チャンパー中の評価物質の濃度について ELISA 等を用いて計測することで(BSA については、片方のチャンパーには BSA 0.8mg/ml、もう片方のチャンパーは水のみを入れて計測)総括物質移動係数を算出した。

(3)モデル細胞(ヒト慢性骨髄性白血病 K562 細胞(リンパ球様・浮遊系細胞))を使用し、3種類の膜を用いて膜拡散透過実験を行った。即ち、in vitro において二つのチャンパーの間に評価する膜を挟み、片方のチャンパーに培地中に細胞 2×10^5 細胞/ml を入れ、もう片方のチャンパー中には培地のみを入れ、両チャンパー中の細胞数を計測することで、各膜の細胞隔離性を評価した。更に、膜を用いて作成したバッグ中に細胞を封入し、培地中に浸して振盪培養し、バッグ外の細胞数を計測することで細胞隔離性を評価した。

(4)3種類の膜を用いて作成したバッグ内にゲル(アルギン酸ゲル 1.0wt%)を導入した場合とバッグのみの場合について、インスリン及び IgG の透過実験を行った。即ち、バッグ中に培地に希釈したインスリンもしくは IgG を入れ、バッグを培地中に浸して振盪し、経時的にバ

バッグ外のインスリンもしくは IgG の濃度について ELISA を用いて計測することで、バッグの透過実験を行った。

(5) ヒト iPS 細胞からの膵 細胞の分化誘導条件の検討を行い、得られた膵 細胞の評価を行った。

(6) 得られた膵 細胞を作成したデバイス中に封入し、動物への投与を検討した。

4 . 研究成果

(1) エチレン-ビニルアルコール共重合体製の半透膜の製膜方法について条件検討を行った結果、ポアサイズの異なる膜を安定的に作成することが可能となった (図 1)。

(2) ポアサイズの異なる (10 ~ 100nm) 計 4 種類の膜を用い、グルコース、アルブミン、インスリン及び IgG の各膜における拡散透過実験を行った。その結果、細胞の栄養分であるグルコースは全膜で速やかに透過した一方、分子量の異なる各タンパク質はポアサイズによって透過性が異なることが判明し、ポアサイズによりタンパク質の分離が可能となった。特に分子量の大きい IgG は、24 時間後の評価においても、1 種類の膜は全く透過せず、残りの 3 種類の膜も微量しか透過しておらず、抗体の透過を防ぐことができる可能性が示された (図 2)。

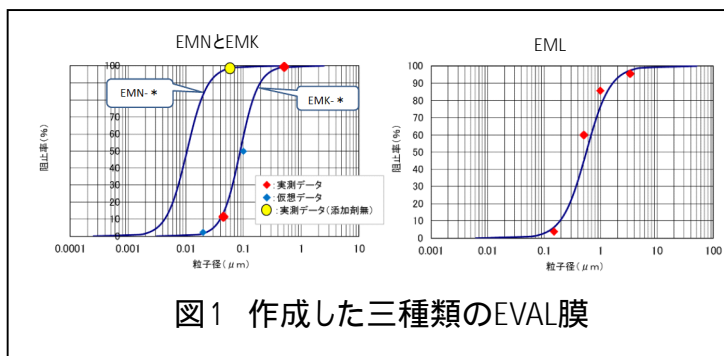


図 1 作成した三種類のEVAL膜

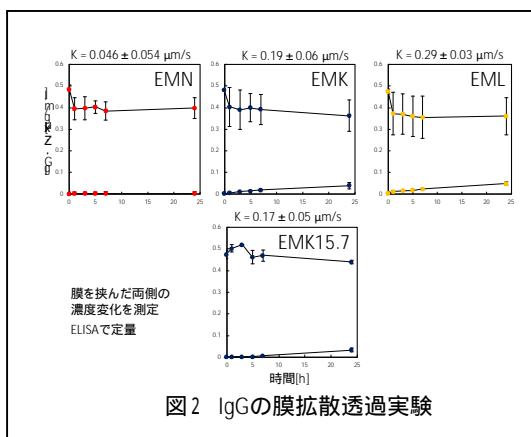


図 2 IgGの膜拡散透過実験

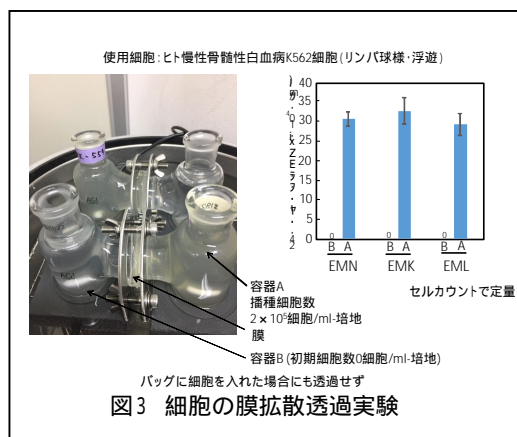


図 3 細胞の膜拡散透過実験

(3) 細胞 (ヒト慢性骨髄性白血病 K562 細胞) を用いて、3 種類の膜の細胞隔離性を評価した結果、24 時間経過後もいずれの膜でも細胞は全く透過しないことが確認できた。更に作成したバッグ中に同細胞を封入した場合でも細胞が全く透過しないことを確認できており、本膜を用いたデバイス中に封入した細胞のみならずデバイス外からの免疫系細胞の透過も無いものと考えられる (図 3)。

(4) 3 種類の膜を用いて作成したバッグ内にゲル (アルギン酸ゲル) を導入した場合とバッグのみの場合について、インスリン及び IgG の透過実験を行ったところ、ゲルの影響はほとんどなく、3 種類の膜ともインスリンは透過して 1.5 ~ 2 時間でフラットに達するのに対し、IgG はいずれの膜でもほぼ透過しないことが明らかとなった。以上の結果に基づき、最適なポアサイズの膜を選択し、評価用の新規バッグ型デバイスを作成した。

(5) ヒト iPS 細胞から膵 細胞への分化誘導条件を検討し、得られた膵 細胞の評価を行った。その結果、作成された膵 細胞が、糖の高い濃度に依存してインスリンを分泌することが確認され、大規模で安定にゼノフリーで作成可能な方法を確立することができた。

(6) 得られた膵 細胞を作成したデバイス中に封入し、動物への投与を試みているものの、未だ評価結果は得られていない。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

Matsuura K, Ito K, Shiraki N, Kume S, Hariwara N, Shimizu T, iPS cell elimination in

a cell sheet by methionine-free and 42 condition for tumor., *Tissue Eng Part C Methods.*, 査読有, Vol.24, 2018, 605-615
DOI:10.1089/ten.TEC.2018.0228.

Tsukamoto K, Cnop M, Mori D, Kume S, Anazawa T, Doi M, Chikazawa K, Matsumaru N, Future perspectives for the treatment of diabetes: importance of a regulatory framework., *Ther Innov Regul Sci.*, 査読有, Vol. Sep 3, 2018, in press
DOI:10.1177/2168479018795854.

Liu KC, Leuckx G, Sakano D, Seymour PA, Mattssona CL, Rautioa L, Verdonck Yannick, Serup P, Kume S, Heimberg H, Andersson O, Inhibition of Cdk5 Promotes -cell differentiation from ductal progenitors., *Diabetes.*, 査読有, Vol.67, 2018, 58-70
DOI:10.2337/db16-1587

Kaitsuka T, Kobayashi K, Otsuka W, Kubo T, Hakim F, Wei FY, Shiraki N, Kume S, Tomizawa K, Erythropoietin facilitates definitive endodermal differentiation of mouse embryonic stem cells via activation of ERK signaling., *Am J of Physiology-Cell Physiology.*, 査読有, Vol.312, 2017, C573-C582
DOI:10.1152/ajpcell.00071.2016

安藤 由典, バイオ人工膵臓の臨床試験の現状., *Organ Biology.*, 査読有, Vol.24(1), 2017, 7-12
DOI:10.11378/organbio.24.7

Koga T, Shiraki N, Yano S, Suico MA, Morino-Koga S, Sato T, Shuto T, Kume S, Kai H, Mild electrical stimulation with heat shock guides differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing cells within the definitive endoderm., *BMC Biotechnology.*, 査読有, Vol.17(1), 2017,14
DOI:10.1186/s12896-017-0331-z

Sakano D, Choi S, Kataoka M, Shiraki N, Uesugi M, Kume K, Kume S, Dopamin D2 receptor-mediated regulation of betacell mass., *Stem Cell Report.*, 査読有, Vol.7, 2016, 95-109
DOI:10.1016/j.stemcr.2016.05.015.

[学会発表](計18件)

川越 雅子、佐藤 芳雄、小林 悟朗、北野 裕之、井藤 彰、安藤 由典、角 昭一郎、柴 祐司、有馬 祐介、エチレン-ビニルアルコール共重合体製免疫隔離デバイスの開発、第18回日本再生医療学会総会、2019

桑 昭苑、多能性幹細胞を用いた膵臓 細胞の再生研究、臨床医が知っておくべき糖尿病の基礎第53回糖尿病学の進歩、2019

桑 昭苑、多能性幹細胞から膵臓 細胞への分化誘導研究、糖尿病と再生医療フォーラム in Nagoya、2019

Masako Kawagoe, Yoshio Satou, Goro Kobayashi, Hiroyuki Kitano, Akira Ito, Yusuke Ando, Yuji Shiba, Shoichiro Sumi, Development for the macro-encapsulating device for isolation of immune response which is made of Ethylene Vinyl alcohol., 5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress-2018 Kyoto, 2018

安藤 由典、Development of Immunoisulatory Bioartificial Pancreas、第3回国際産学連携交流会・県立広島大学、2018

Shoen Kume, Generation of pancreatic beta cells from human iPS cells., The 16th Asia-Oceania Congress of Endocrinology 2018, 2018

Erinn Sim Zixuan, Nobuaki Shiraki, Shoen Kume, Insulin supplement is essential in differentiation human induced pluripotent stem cells into pancreatic beta cells., The 16th Asia-Oceania Congress of Endocrinology 2018, 2018

日比 滉大、秋山 智彦、洪実、白木 伸明、桑 昭苑、メチオニン除去培養によるヒト iPS 細胞分化促進の機序解明、第41回日本分子生物学会、2018

Airi Inoue, Daisuke Sakano, Takayuki Enomoto, Mai Imasaka, Seiji Okada, Kimi Araki, Shoen Kume, Insulin2 タンパクへの Q104del 変異導入による自然発症 1 型糖尿病モデルマウスの作製、第41回日本分子生物学会、2018

桑 昭苑、多能性幹細胞の未分化性維持と分化制御の分子基盤、第41回日本分子生物学会、2018

川越 雅子、佐藤 芳雄、北野 裕之、井藤 彰、安藤 由典、角 昭一郎、柴 祐司、小林 悟朗、エチレン-ビニルアルコール共重合体製移植デバイスの開発・機能性評価、第17回日本再生医療学会総会、2018

桑 昭苑、多能性幹細胞から膵 細胞への分化誘導と再生医療への展望、第7回日本マーマセット研究会、2018

豊田 悠暉、荒木 菜、坂野 大介、桑 昭苑、モノアミンによるヒト膵 細胞分化および成熟化の調節機能を解明、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 Consortium of

Biological Sciences 2017, 2017

条 昭苑、多能性幹細胞から膵 細胞への分化誘導シグナル、第 3 回生体調節研究所内分泌代謝シンポジウム-ゲノムとエピゲノムの交差点 (課題) シンポジウム、2017

Shoen Kume, Chemical and metabolic control of pluripotent stem cell differentiation into pancreatic cells, GRE External seminar, Dundee University, Department of Life Sciences and Technology, 2017

古田 奈央、白木 伸明、荒川 哲大、条 昭苑、未分化 iPS 細胞および分化課程における亜鉛の役割、分子生物学会、2016

条 昭苑、多能性幹細胞から膵臓 細胞を創る、「細胞を創る」研究会 9.0、2016

Shoen Kume, Generation of insulin-producing -like cells from human iPS cells, 2016

[図書] (計 2 件)

安藤 由典 他、日本人工臓器学会、人工臓器 2018 (人工肝臓の現況)、2018、137(31-36)

条 昭苑、南江堂、新膵臓病学 第 2 章膵の発生、2017、528(11-20)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：条 昭苑

ローマ字氏名：Kume Shoen

所属研究機関名：東京工業大学

部局名：生命理工学院

職名：教授

研究者番号 (8 桁) : 70347011

(2)研究分担者

研究分担者氏名：白木 伸明

ローマ字氏名：Shiraki Nobuaki

所属研究機関名：東京工業大学

部局名：生命理工学院

職名：准教授

研究者番号 (8 桁) : 70448520

(3)研究分担者

研究分担者氏名：井藤 彰

ローマ字氏名：Ito Akira

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学院工学研究院

職名：准教授

研究者番号 (8 桁) : 60345915

(4)研究協力者

研究協力者氏名：中路 修平

ローマ字氏名：Nakaji Shuhei

(5)研究協力者

研究協力者氏名：小林 悟朗

ローマ字氏名：Kobayashi Goro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。