

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01579

研究課題名(和文)免疫抑制剤の投与を必要としない細胞移植療法

研究課題名(英文)Cell therapy without immuno-suppressive medication

研究代表者

岩田 博夫 (Iwata, Hiroo)

国立研究開発法人理化学研究所・科技ハブ産連本部・グループディレクター

研究者番号：30160120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,800,000円

研究成果の概要(和文)：皮下に免疫抑制剤の投与を必要としない同種膵島移植の実現を目指した。糖尿病のラットとマウスの皮下に塩基性線維芽細胞増殖因子を徐放することで血管が豊富な膵島移植部位を作成し、この部位に同種膵島移植を行った。両モデルで免疫抑制剤を投与することなく移植膵島が長期生着し、血糖値を正常化できることを示した。その拒絶回避機構に関しては、制御性T細胞の局所への集積と間葉系幹細胞の関与が明らかになった。大量の膵島の確保を目指してiPS細胞から膵島への分化誘導法の確立を目指した。細胞株依存性はあるものの、ヒトiPS細胞ではほぼ分化誘導法を確立できた。一方、hK1ZAL iPS細胞では分化誘導効率は低かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現実的で有望な再生医療は、インスリン分泌細胞(膵島)の移植によるインスリン依存性糖尿病の治療である。脳死ドナーから提供された膵島の移植治療は世界で年間200例程度が行われているものの、高侵襲な肝内への移植、副作用の強い免疫抑制剤の使用、膵島の確保が困難、の3つの課題が残されている。iPS/ES細胞から膵島を分化誘導できれば、大量の膵島が確保できる。その膵島を皮下に低侵襲で移植でき、さらに免疫抑制剤の投与が必要でなくなれば、患者の負担は皆無になる。インスリン依存性糖尿病の根治治療が可能なり、その社会的意義は極めて高い。

研究成果の概要(英文)：Although transplantation of islets of Langerhans has been accepted as a fundamental treatment for insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), several problems are still remaining in order that it becomes the standard medical treatment of IDDM patients. In this study, using diabetic rat and mouse models, a subcutaneous space surrounded with highly vascularized granulomatous tissue was formed by sponge-bFGF complex implantation. Allogeneic islets transplanted into the space could survive and release insulin for a long period under no immunosuppressive medication. In conjunction with sufficient supply of islets from iPS/ES cells, our method can make islet transplantation the standard medical treatment of IDDM patients.

研究分野：組織工学

キーワード：細胞移植 糖尿病 膵島 免疫寛容部位 皮下 免疫抑制剤 拒絶反応

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医療の分野では、当初は iPS/ES 細胞から各種臓器を作成し、それを患者に移植するような夢が語られていた。研究が進むにつれて再生医療の目標自体が、機能発揮に構造が必要な臓器移植から、より現実的なマクロ構造がなくても機能が発揮できる内分泌系細胞や肝実質細胞などの細胞移植へシフトしていた。細胞ソースについても当初は拒絶反応を考慮する必要のない細胞源として、患者自身の細胞から作成した iPS 細胞を用いることが考えられたが、iPS 細胞の作成に高額な経費が必要であることなどから、現在では組織適合性抗原がホモの数種類の iPS 細胞を樹立し、これを拒絶反応が起こりにくい iPS 細胞として用いようとしている。米国をはじめ世界の多くの国では、移植後の癌化の可能性がより小さい細胞として、また、よく Characterized された細胞として ES 細胞が好まれて細胞源として用いられるようになっていく。研究開始当初の我々の問題意識を箇条書きにして整理すると、

イ 現実的な再生医療は、内分泌系細胞移植であろう。

ロ 移植後の拒絶反応の制御はやはり必要であろう。

の2点である。

細胞移植で治療できる可能性のある疾患は多くあるが、細胞移植療法が臨床上有効であった症例が多数報告されている疾患は意外と少ない。例えば、ドナーから提供された膵臓からの膵島移植による膵臓癌の発生は、世界でも数例行われた過ぎず、また、移植後の臨床経過もよく解析されたとは言い難い。細胞移植療法で最も多数行われその臨床上の有効性が多数報告されているのは、ドナーから提供された膵島分泌細胞 (膵島) の移植による膵島依存性糖尿病の治療である。膵島の移植治療法は世界で毎年 200 例程度行われている。また、膵島依存性糖尿病患者数は、わが国で 5~10 万人、また、米国では 100~200 万人と多い。欧米圏で患者数が多いこともあり、欧米で膵島移植の研究また臨床応用は多数行われ、膵島依存性糖尿病の根本治療として期待されている。また、そのこともあり iPS/ES 細胞から膵島分泌細胞 (β -細胞) または膵臓ランゲルハンス島 (膵島) への分化誘導の研究は多数行われている。すなわち膵島移植は、

イ 細胞移植による治療効果が明確に示されている。

ロ 患者数が多く臨床上のニーズが明確である。

ハ 細胞移植後の効果判定として、血糖値、血中膵島濃度 (C-peptide 濃度) などの明確な指標がある。

である。これらの理由から、研究ターゲットとして細胞療法による膵島依存性糖尿病の治療を選んだ。

膵島移植では、ドナーから提供された膵臓を酵素処理し、直径 150 μm 程度の細胞の塊である膵島を分離し、この膵島の懸濁液を肝門脈に挿入したカテーテルを通じて膵臓内へ注入することで膵臓内に膵島を移植する。移植後、免疫抑制剤を投与することで拒絶反応をコントロールしている。膵島移植を行っている医師、また、研究者が解決すべき課題として考えていたものは、

イ 重要臓器である膵臓を移植場所としている。トラブルが起きた時の対応が難しい。

ロ 副作用の強い免疫抑制剤の使用。また、免疫抑制剤が高額である。

ハ ドナーが少なく、膵島の確保が困難。

の3つである。

膵島移植モデルに上記の3つの問題を解決する試みを行うが、その解決方法は他の細胞移植への適用可能であると考えた。

2. 研究の目的

膵島移植モデルに上記3つの問題、すなわち、

イ 重要臓器である膵臓以外の膵島移植場所を探す。

ロ 副作用の強い免疫抑制剤の使用の軽減、または不使用。

ハ ドナー由来膵島の確保が困難であるため、iPS/ES 細胞からの膵島の分化誘導を行う。

の解決を試みる。

3. 研究の方法

膵島移植モデル: ラット間またはマウス間の同種膵島移植である。正常のラットまたはマウスを膵島のドナーとして用いた。レピントは、ラットまたはマウスにストレプトゾチン (STZ) を投与することで膵島を破壊し膵島依存性糖尿病することで作成した。

膵島移植部位の作成: 塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF)、または、(株) 積水化学から提供された環状ペプチド SEK 含有するアロースまたはゼラチン製ハイドロゲルを皮下に埋め込むことで、皮下に血管が豊富な膵島移植部位を作成した。

移植膵島の評価: 膵島移植後レピントから採血し、血糖値また膵島濃度の測定を行った。また、膵島移植後 100 日以上経過後に移植部位の組織を回収し、その組織切片の H&E 染色また膵島の免疫染色を行った。

膵島移植部の免疫細胞: 膵島移植部位の組織、近傍リンパ節、脾臓からリンパ球を回収し、FACS により半定量的な解析を行った。

iPS 細胞から膵島細胞への分化誘導: ヒト iPS 細胞 (253G株) またはキウイ iPS 細胞から 4 Stage 法で膵前駆細胞の分化誘導を行い、その膵前駆細胞を増殖させた。増殖させた膵前駆細胞の凍結ストックを作成した。この前駆細胞から後半 3 Stage で膵島細胞へと分化誘導を行った。

4. 研究成果

(1) 膵島移植部位の作成

現在、インスリン依存性糖尿病の治療として、インスリンの皮下注射が行われている。このこともあり、低侵襲な膵島の移植部位として、皮下への膵島移植が古くから試みられてきた。しかし、皮下は血管が疎であるため、移植した膵島への酸素の供給が十分でないため、移植された膵島は早期に壊死してしまう。このため皮下膵島移植は臨床応用へつながる優れた成績が得られなかった。皮下に血管が豊富な膵島移植部位の作成を試みた。図1にその方法を模式的に示した。bFGF または SEK を含浸させたアガロースハイドロゲルを埋め込む。ハイドロゲルから bFGF/SEK が徐放され、bFGF/SEK の作用によりハイドロゲル周囲の組織に血管が誘導される。ハイドロゲル埋め込み後1週間目にハイドロゲルと共に周囲の組織を取り出した。取り出した組織の組織切片の H&E 染色像を観察すると微小血管が多数散在していた。また、血管量を半定量的に評価するために組織中のヘモグロビン量を測定した結果を図2に示した。bFGF を10~50 μg を含浸させたハイドロゲルを埋め込んだ時には未処置皮下組織と比較してヘモグロビン含量が優位に増加していた。また、ハイドロゲルを除去した部位が空洞になり、その周囲に血管が豊富な組織が存在するという膵島移植に好都合な部位が形成された。

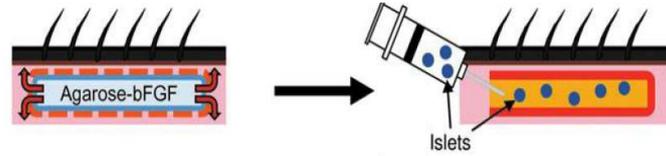


図1. 皮下に膵島移植部位の作成。bFGF を含浸させたアガロースハイドロゲルを背部皮下に埋め込む。

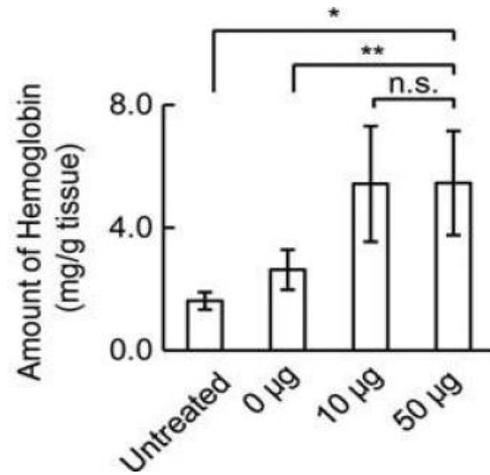


図2. 所定量の bFGF を含浸させたアガロースハイドロゲルの移植部位周辺のヘモグロビン含量

(2) 移植膵島の評価

STZ 投与によりインスリン依存性糖尿病にしたレビエントラットに正常ラットから分離した膵島を移植した。ドナーとレビエントの組み合わせは、F344ラット膵島→stz-ACIラット、Wistarラット膵島→stz-Lewisラット、B6マウス膵島→stz-Balb/cマウス、Balb/cマウス膵島→stz-B6マウスなどである。いずれの組み合わせにおいても、移植前また後においても一切の免疫抑制剤の投与は行っていない。一例としてWistarラット膵島→stz-Lewisラットの系の膵島移植前後のレビエントラットの血糖値の変動を示した。5組の移植実験を行ったが、いずれも膵島移植後血糖値は正常化し、移植後100日後においても正常血糖を維持していた。他のドナーとレビエントの組み合わせでも、同様の結果が得られた。

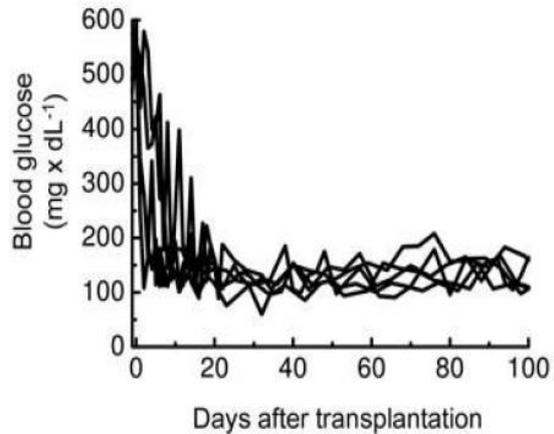


図3. Wistar ラットの膵島2000個を糖尿病Lewisラットに移植。5匹のレビエントの血糖値の

(3) 移植膵島の組織学的観察

膵島移植後100日程度経過後に、移植膵島を周辺組織と共に組織を回収し、その組織切片を観察した。図4にWistarラットの膵島をLewisラットの皮下に移植し100日後に膵島移植部位から回収した組織の切片の組織像を示した。(A)はH&E染色像、(B)は同部位のインスリン免疫染色像(緑)である。インスリンの免疫染色で明瞭に多数のインスリン+の細胞が存在し、移植膵島が移植後100日を経過しても多数存在していることを示していた。bFGFの代わりにSEKを用いた場合にもほぼ同様の結果を得ることができた。

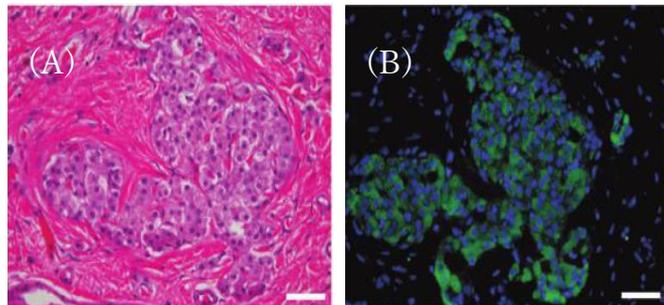


図4. Wistar ラットの膵島を Lewis ラットの皮下に移植し100日後に膵島移植部位の組織を取り出した。(A):H&E染色像、(B):同部位のインスリン免疫染色像(緑)

免疫抑制剤を一切投与しない条件下で、移植同種膵島が長期間生着し、血糖値を正常化できる驚くべき結果を得ることができた。

(4) 移植膵島の生着機構

移植された同種膵島が拒絶されずに長期間生着する結果が得られた。その生着機構に関して知見を得るため、bFGF-ハイドロゲル埋め込み時と膵島移植後の近傍組織中、近傍リンパ節、脾臓中のリンパ球の解析を行った。図5に膵島移植部位近傍の(制御性T細胞/CD4+T細胞)の測定結果を示した。(A)にbFGFを含浸させたアガロースハイドロゲルを埋め込んだ後の(制御性T細胞/CD4+T細胞)推移を示した。○はbFGFを含浸させたアガロースハイドロゲルを埋め込んだ組織、●は未処置の組織である。bFGFを含浸させたアガロースハイドロゲルを埋め込んだ場合には(制御性T細胞/CD4+T細胞)の比率が明らかに上昇していた。また、(B)に示した同種膵島の移植後もその(制御性T細胞/CD4+T細胞)の上昇は維持されていた。制御性T細胞により膵島移植部位が抑制性の環境になっていると思われる。また、移植部位近傍のリンパ節また脾臓においては(制御性T細胞/CD4+T細胞)の上昇は見られないことから、局所的に抑制環境が形成されていることが示唆された。

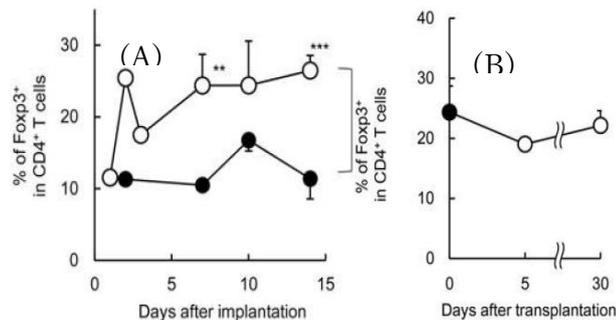


図5. 膵島移植部位周辺組織の(制御性T細胞/CD4+T細胞)の変動。(A): bFGFを含浸させたアガロースハイドロゲルを埋め込んだ後の(制御性T細胞/CD4+T細胞)推移。(B):(A)部位に同種膵島を移植した後の(制御性T細胞/CD4+T細胞)推移。

(5) iPS細胞から膵島細胞への分化誘導

世界で多くのグループがES/iPS細胞から膵島への分化誘導法の開発を行っている。多くのグループの方法では、培養液の組成を変えながら多段階のStageを経て、通常一月余りかけて膵島への分化誘導を行っている。我々は膵前駆細胞のStageで一度分化誘導を止めて、この段階で細胞を増殖させることを試みた。分化誘導途中に増殖培養を入れるメリットは、①多量の細胞を長期間ハンドリング行い必要を軽減できる、②増殖継代培養を行うことで細胞の純化できる。例えば、未分化iPS細胞を除去できる。③細胞が純化されるため、その後の分化誘導の再現性を上げることができる。④細胞前駆細胞の凍結ストックを作ることができる。など多くのメリットがある。

ヒトiPS細胞から膵前駆細胞への分化誘導は、Kiefferらの方法に従って行った。その後、膵前駆細胞の増殖は独自に開発した上皮増殖因子(EGF)とR-Spondin 1(RSPO1)を含む培地を用いて行った。図6にiPS細胞(253G1)から分化誘導した膵前駆細胞の継代培養における細胞増殖結果を示した。(A)に示したように計4回の前駆細胞への分化誘導を行ったが、いずれも得られた膵前駆細胞は、EGF-RSPO1含培養液中で順調に増殖し、また、(B)に示したように多数回継代培養を行った後においても膵前駆細胞特異マーカータンパクを発現していた。また、増殖後に凍結ストックを作成した。この凍結ストックから解凍して得られた膵前駆細胞を出発細胞として膵島細胞への分化誘導を行った結果を図7に示した。(A)に分化誘導後の細胞集塊の免疫染色を示した。インスリン(C-ペプチド)、グルカゴン含有する多数の細胞が見られた。また、糖負荷試験をおこなったところ、媒体中のグルコース濃度上昇に応じてインスリン分泌量が増加した。また、膵前駆細胞の継代培養の回数の影響は見られなかった。膵前駆細胞の継代培養は、膵島の大量確保にとって有効な一つの手段になると考える。

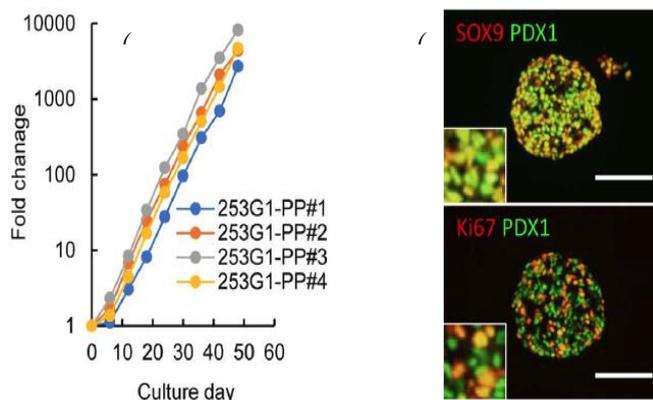


図6. EGFとRSPO1を含有する培養液中での膵前駆細胞の塊状培養。(A): EGFとRSPO1を含有する培養液中での膵前駆細胞の継代培養。(B): 継代培養を行った後の細胞集塊の組織切片の免疫染色。Scale bars = 100 μm

霊長類でのiPS/ES細胞から分化誘導した膵島の同種移植モデルを作成することも並行して行ってきた。カキイザルの糖尿病モデルは確立できた。一方、カキイザルiPS細胞からの膵島への分化誘導は難渋し、膵島は分化誘導できなかった。代わりに同種細胞移植モデルとして皮下に作成した血

管が豊富な部位に同種 iPS 細胞を移植したところ、1 か月後においても移植下細胞が残存している様子が見られた。研究期間また経費的にも十分な研究ができず、今後に宿題として残された。

以上をまとめると、糖尿病のラットとマウスの皮下に塩基性線維芽細胞増殖因子を徐放することで血管が豊富な膵島移植部位を作成し、この部位に同種膵島移植を行った。両モデルで免疫抑制剤を投与することなく移植膵島が長期生着し、血糖値を正常化できることを示した。その拒絶回避機構に関しては、制御性 T 細胞の局所への集積による免疫抑制環境が形成されたことによると考える。大量の膵島の確保を目指して iPS 細胞から膵島への分化誘導法の確立を目指した。細胞株依存性はあるものの、ヒト iPS 細胞ではほぼ分化誘導法を確立できた。

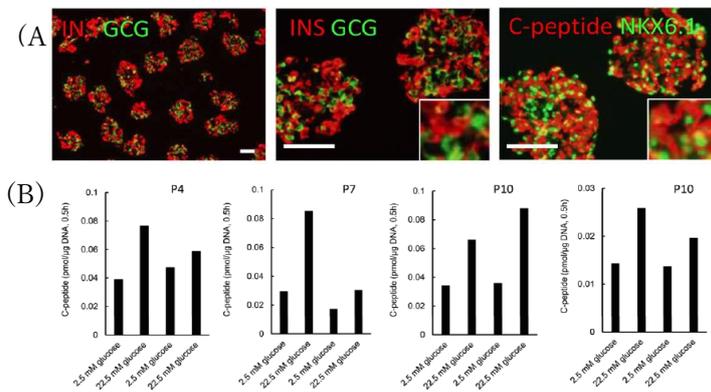


図7. 膵前駆細胞の凍結ストックを用いて分化誘導した膵島。(A): INS:インスリン、GCG:グルカゴン、C-peptide, NKX6.1の免疫染色、(B): 種々の回数継代培養した膵前駆細胞から分化誘導した膵島細胞の糖負荷試験。

図7. 膵前駆細胞の凍結ストックを用いて分化誘導した膵島。(A): INS:インスリン、GCG:グルカゴン、C-peptide, NKX6.1の免疫染色、(B): 種々の回数継代培養した膵前駆細胞から分化誘導した膵島細胞の糖負荷試験。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuwabara Rei, Hamaguchi Masahide, Fukuda Takuya, Sakaguchi Shimon, Iwata Hiroo	4. 巻 25
2. 論文標題 Preparation of Immunotolerant Space Under the Skin and Transplantation of Islets in the Space	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 183 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.tea.2018.0109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuwabara Rei, Iwata Hiroo	4. 巻 107
2. 論文標題 Bioabsorbable device to prepare subcutaneous pockets for islet transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 1107 ~ 1112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.34203	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Konagaya Shuhei, Iwata Hiroo	4. 巻 9
2. 論文標題 Chemically defined conditions for long-term maintenance of pancreatic progenitors derived from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36606-7	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 Kuwabara R, Hamaguchi M, Fukuda T, Sakai H, Inui M, Sakaguchi S, Iwata H.	4. 巻 102(3)
2. 論文標題 Long-term Functioning of Allogeneic Islets in Subcutaneous Tissue Pretreated with a Novel Cyclic Peptide Without Immunosuppressive Medication.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 417-425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TP.0000000000001923.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	安波 洋一 (Yasunami Youichi) (00166521)	福岡大学・医学部・教授 (37111)	
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)	
研究分担者	有馬 祐介 (Arima Yusuke) (90402792)	九州大学・先導物質化学研究所・准教授 (17102)	
研究分担者	小長谷 周平 (Konagaya Shuhei) (60770295)	京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員 (14301)	削除：平成29年8月10日