

平成21年5月12日現在

研究種目：基盤研究(A)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18200034
 研究課題名（和文） 両親媒性高分子からなる極薄マイクロカプセルによる膵島の免疫隔離
 研究課題名（英文） Encapsulation of Islets with Amphiphilic Polymers for Immuno-isolation
 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： バイオ人工膵臓は免疫抑制剤を用いない膵島移植として有力な方法であるが、未だ解決しなければならない問題が残されている。本研究では、ポリエチレングリコール(PEG)-リン脂質複合体(lipid)を用いて膵島をカプセル化することを試みた。PEG-lipid 複合体は親水部の PEG 鎖と疎水部のリン脂質から構成される両親媒性分子であるため、細胞と接触すると疎水部脂質は自発的に細胞膜へ取り込まれ、PEG 鎖による膵島表面修飾が可能となる。さらに、この PEG 鎖の端に線溶系酵素ウロキナーゼを固定化することで、門脈ない移植後の血栓の形成をも制御することも可能になった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	14,800,000	4,440,000	19,240,000
2007年度	15,300,000	4,590,000	19,890,000
2008年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
年度			
年度			
総計	37,600,000	11,280,000	48,880,000

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： 糖尿病、ランゲルハンス氏島、移植、両親媒性分子、マイクロカプセル、血液凝固、凍結保存、ポリエチレングリコール

1. 研究開始当初の背景

再生医療の来る十年ターゲットは、インスリンやドーパミン等生理活性物質を分泌する細胞の移植による病気の治療であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、マウス由来のフィーダー細胞を用いない未分化ES細胞（ヒトES細胞含）の維持環境と分化誘導環境の作製を行う。ES細胞から分化誘導された細胞は患者にとつ

ては他人の細胞であるため、移植時の拒絶反応のコントロールが重要である。これには、われわれが従来から研究してきた免疫隔離膜法を用いて行う。

3. 研究の方法

ポリエチレングリコール-リン脂質複合体を合成した。ポリエチレングリコール-リン脂質複合体を細胞または膵島の懸濁液に添加することで表面修飾を行った。

マウスとカニクイザルのES細胞を用いた。

ヒト間葉系幹細胞の馴化培地を用いて ES 細胞の未分化維持を試みた。未分化維持は 2 1 代継代後 SCID マウスに移植して 3 胚葉に分化した細胞を含むテラトーマの形成を指標にした。

ES 細胞からのインスリン分泌細胞の分化誘導は Lumelsky らの報告を参考に行った。ドーパミン分泌細胞への分化誘導は ES 細胞を半透膜に封入後、PA6 細胞の馴化培地を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 免疫隔離膜

免疫抑制剤の服用を必要としない膵島移植法が望まれる。その一つの有効な方法が図 1 にその原理を示したバイオ人工膵臓である。バイオ人工膵臓では、高分子製の半透膜で膵島をカプセル化した後移植する。半透膜によりレシピエントの免疫系と移植膵島とが隔離されているため、膵島は拒絶反応から保護され長期間生存すると期待できる。一方では、膵島を覆う膜は半透膜であるので膵島から分泌されたインスリンは半透膜を通過してレシピエント体内にもどり血糖値のコントロールが行えるであろう。

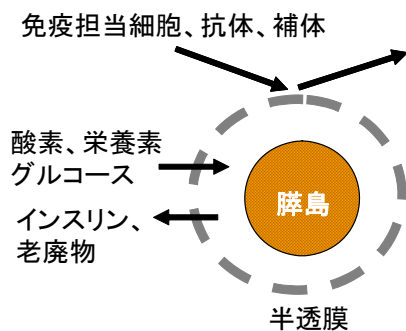


図1. バイオ人工膵臓の原理

バイオ人工膵臓は免疫抑制剤を用いない膵島移植として有効な方法であるが、未だ解決しなければならない問題が残されている。問題の一つは、バイオ人工膵臓の体積である。膵島の平均的な直径は 150 μm 程度である。通常の膵島移植のように門脈から肝臓に移植するのは不可能である。本研究ではいかに薄い膜で膵島をカプセル化するかに注力した。膵島を包む(カプセル化)という概念を越え、高分子鎖で細胞膜表面を修飾するのに近い。本研究では、ポリエチレングリコール (PEG)-リン脂質複合体を用いて膵島の表面修飾に取り組んだ。図 2 (a) に PEG-リン脂質複合体の分子構造を示す。PEG-リン脂質複合体は親水部の PEG 鎖と疎水部のリン脂質から構成される両親媒性分子であるため、細胞と接触すると疎水部脂質は自発的に細胞膜へ取り込まれ、PEG 鎖による表面修飾が可能となる (図 2 (b) イメージ図)。用いる PEG

の分子量にもよるが、細胞膜表面に数ナノメートルの厚さの PEG 層が形成される。さらに、この PEG 鎖の端に線溶系酵素ウロキナーゼを固定化することで、門脈ない移植後の血栓の形成を制御することも可能になる。

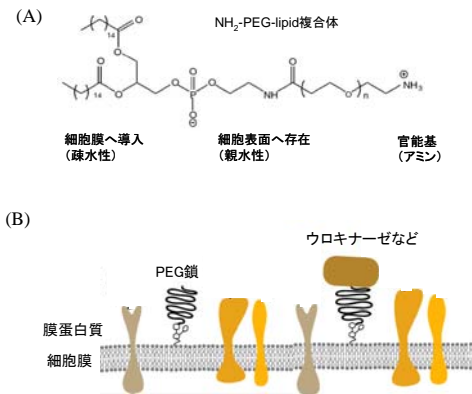


図2. ポリエチレングリコール-リン脂質複合体の分子構造とそれを用いた膵島細胞の表面修飾のイメージ図

図 3 に末端に蛍光色素 FITC をつけた PEG-リン脂質複合体で処理した膵島の共焦点レーザー顕微鏡写真を示す。膵島は数千個の内分泌細胞からなる細胞凝集体であり、その最外層の細胞だけが PEG-リン脂質複合体により表面修飾されていることが分かる。つまり、膵島の表面がおおよそ厚さ数十 nm の PEG 薄膜層で覆われていることを示している。この極薄の PEG 層が血液凝固の防止また拒絶反応をどの程度制御できるかは今後慎重に検討していく必要がある。

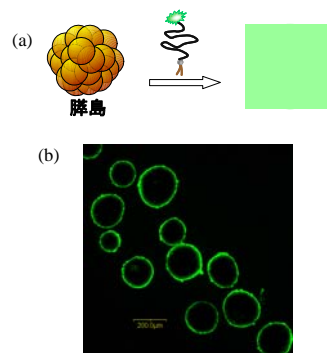


図3. 蛍光色素でラベルしたポリエチレングリコール-リン脂質複合体を用いた膵島の表面修飾。(a): 模式図、(b): 表面修飾膵島の共焦点蛍光顕微鏡写真

(2) 新たな細胞源

膵島移植には決定的な問題がある。圧倒的なドナー不足である。もし、胚性幹細胞 (ES 細胞) からインスリン分泌細胞さらに膵島を分化誘導することができれば、無尽蔵に移植用の細胞が確保でき、移植を望む全ての糖尿病患者に移植できるようになる。さらに、組織適合性抗原の多様な ES 細胞を樹立してお

けば、拒絶反応の起こりにくい組み合わせで移植出来る。さらにもう一步進んで患者自身のES細胞、また、シリーズでも紹介された山中らの患者自身のiPS細胞を用いれば、拒絶反応が起きない膵島移植ができる。まさに、夢のような糖尿病の治療方である。

本研究では、報告された方法を参考にカニクイザルのES細胞から分化誘導を行ったところ、図4示したように免疫染色でインスリンとC-ペプチドが陽性に染まる細胞が再現性よく現れる。未だ糖尿病モデル動物に移植して血糖値のコントロールが行えるほどには成熟したインスリン分泌細胞ではない。今後更なる改良が必要である。膵島のように発生の比較的遅い時期に出現する組織・細胞の誘導を人為的に成すことは多くの困難がある。これからもかなり紆余曲折のある研究分野であろう。

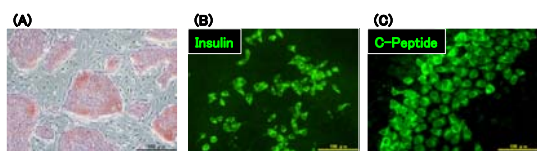


図4. カニクイザルES細胞から分化させた細胞の免疫染色像。(A): 未分化ES細胞(Alkaline Phosphate染色)。(B): 分化誘導操作終了後の分化細胞のインスリン免疫染色。(C): C-ペプチドの免疫染色、Scale bars: (A): 500 μm (A), (B) and (C): 100 μm。

(3) ES細胞の未分化維持

ES細胞からのドーパミン分泌細胞の分化誘導に関しては、笹井らの方法を改良して、PA6細胞の馴化培地を用い、さらに、ES細胞を半透膜内に封入した状態で分化誘導を行うことを試みた。ドーパミン分泌量は少ないものの我々の条件下でもドーパミン分泌細胞への分化誘導が可能であることを示した。

ES細胞は通常マウスの胎児繊維芽細胞をフィーダー細胞として用いて継代培養が行われている。異種細胞との接触状態で維持するのは、臨床使用されるES細胞としては好ましくない。また、ES細胞の分化誘導時もフィーダー細胞の混入は結果の解釈を若干複雑にする。本研究ではヒト由来間葉系幹細胞(戸口田らにより樹立)の馴化培地を用いてカニクイザルのES細胞の長期未分化維持を試みた。21継代培養後においてもSCIDマウスに移植したES細胞は3つの胚葉の細胞を含むテラトーマを形成し、未分化状態を維持していることを示した。

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 Teramura Y, Iwata H., Islet encapsulation with

living cells for improvement of biocompatibility. *Biomaterials*. 2009 30(12):2270-5.

② Agudelo C, Teramura Y, Iwata H., Feasibility of cryopreserved agarose-encapsulated islets as a bioartificial pancreas, *Transplantation*, 2009 Jan 15;87(1):29-34.

③ Teramura Y, Iwata H., Islets surface modification prevents blood-mediated inflammatory responses. *Bioconjug Chem*. 2008 Jul;19(7):1389-95.

④ Totani T, Teramura Y, Iwata H., Immobilization of urokinase on the islet surface by amphiphilic poly(vinyl alcohol) that carries alkyl side chains. *Biomaterials*. 2008 Jul;29(19):2878-83.

⑤ Teramura Y, Kaneda Y, Totani T, Iwata H., Behavior of synthetic polymers immobilized on a cell membrane. *Biomaterials*. 2008 Apr;29(10):1345-55.

⑥ Agudelo CA, Iwata H., The development of alternative vitrification solutions for microencapsulated islets. *Biomaterials*. 2008 Mar;29(9):1167-76.

⑦ Teramura Y, Kaneda Y, Iwata H., Islet-encapsulation in ultra-thin layer-by-layer membranes of poly(vinyl alcohol) anchored to poly(ethylene glycol)-lipids in the cell membrane. *Biomaterials*. 2007 28(32):4818-25.

⑧ Ando T, Yamazoe H, Moriyasu K, Ueda Y, Iwata H., Induction of dopamine-releasing cells from primate embryonic stem cells enclosed in agarose microcapsules. *Tissue Eng*. 2007 Oct;13(10):2539-47.

⑨ Sato H, Suemori H, Toguchida J, Iwata H., Recombinant matrix protein for maintenance of undifferentiated primate embryonic stem cells. *Tissue Eng*. 2007 13(7):1539-47.

⑩ Chen H, Sato H, Totani T, Iwata H., Detection of insulin-releasing cells using in situ immunoblotting. *Anal Biochem*. 2007 Jul 15;366(2):137-43.

⑪ Ibii T, Shimada H, Miura S, Fukuma E, Sato H, Iwata H., Possibility of insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells for diabetes treatment. *J Biosci Bioeng*. 2007 103(2):140-6.

⑫ Miura S, Teramura Y, Iwata H., Encapsulation of islets with ultra-thin polyion complex membrane through poly(ethylene glycol)-phospholipids anchored to cell membrane. *Biomaterials*. 2006 27(34):5828-35.

⑬ Yamazoe H, Iwata H., Efficient generation of dopaminergic neurons from mouse embryonic stem cells enclosed in hollow

fibers. Biomaterials. 2006 Oct;27(28):4871-80.

- ⑭ Yamazoe H, Kobori M, Murakami Y, Yano K, Satoh M, Mizuseki K, Sasai Y, Iwata H., One-step induction of neurons from mouse embryonic stem cells in serum-free media containing vitamin B12 and heparin. Cell Transplant. 2006;15(2):135-45.
- ⑮ Moriyasu K, Yamazoe H, Iwata H., Induction dopamine releasing cells from mouse embryonic stem cells and their long-term culture. J Biomed Mater Res A. 2006 77(1):136-47.

[学会発表] (計 36 件)

1. 寺村裕治, 乾 靖, 金田成弘, 岩田博夫: 両親媒性高分子を用いた移植用細胞の表面修飾剤の開発. 第 57 回高分子討論会 (2008. 9. 24 大阪)
2. 寺村裕治, 岩田博夫: ポリエチレングリコール結合脂質による膵島の表面修飾と生着率の評価. 第 46 回日本人工臓器学会 (2008. 11. 29 東京)
3. Agudelo C.A., Teramura Y., Iwata H.: *In vivo* study on the long-term function of agarose-encapsulated islets after cryopreservation. 8th World Biomaterials Congress (2008.5.29, 2008 Amsterdam)
4. 乾 靖, 寺村裕治, 岩田博夫: 高分子材料と生体との相互作用 — 両親媒性高分子と生細胞 —. 第 37 回医用高分子シンポジウム (2008. 7. 28, 東京)
5. Arima Y., Iwata H.: Effect of adsorbed fibronectin and albumin on cell adhesion to well-defined surface, 8th World Biomaterials Congress (2008.5.29, 2008, Amsterdam)
6. Toda M, Iwata H.: Activation of the complement system on NH₂/CH₃ and NH₂/COOH mixed self-assembled monolayers. 8th World Biomaterials Congress (2008.5.31, 2008, Amsterdam)
7. 戸田 満秋, 有馬 祐介, 岩田 博夫: 末端メトキシ化 PEG 担持表面の劣化による血清補体の活性化, 第 57 回高分子討論会 (2008. 9. 24 大阪)
8. 川越雅子, 有馬祐介, 戸田満秋, 岩田博夫: デキストランによる補体活性化. 第 3 回関西若手発表会 (バイオマテリアル学会) (2008. 8. 7 大阪)
9. 川越雅子, 有馬祐介, 戸田満秋, 岩田博夫: 水酸基をもつ高分子による補体活性化. 第 57 回高分子討論会 (2008. 9. 24 大阪)
10. 上田祐介, 藤田 聡, 岩田博夫: 霊長類 ES 細胞の未分化維持のための各種培養液の検討. 第 3 回関西若手発表会 (バイオマテリアル学会) (2008. 8. 7 大阪)
11. 上田祐介, 藤田 聡, 岩田博夫: Feeder 細胞を排除した培養基材表面上での霊長類 ES 細胞の培養. 第 57 回高分子討論会 (2008. 9. 25 大阪)
12. Iwata H.: Tissue Engineering Approach To Treat Type I Diabetes. 1st Asian Biomaterials Congress (2007.12.6-8, Tsukuba)
13. Teramura, Y., Kaneda, Y., and Iwata, H.: Enclosure of Islets with Poly(vinyl alcohol) Membranes with Nanometer in Thickness, Nanomedicine International Symposium (2007.4.21 Okazaki)
14. 寺村裕治, 金田成弘, 岩田博夫: ポリビニルアルコールを用いた膵島の薄膜カプセル化. 第 56 回高分子学会年次大会 (2007. 5. 29 京都)
15. 寺村裕治, 岩田博夫: 高い生着能が期待できる移植用膵島修飾法. 第 36 回医用高分子シンポジウム (2007. 7. 30 東京)
16. Teramura, Y., Kaneda, Y., and Iwata, H.: Microencapsulation of Islets with Thin-layer Membrane of Poly(vinyl alcohol). 2007 CTS-IPITA-IXA Joint Conference (2007.9.18 Minneapolis)
17. Teramura, Y., and Iwata, H.: Enclosure of islet in ultra-thin layer-by-layer membrane with anti-thrombogenic property. JSAO and IFAO 2007 Joint Congress (2007. 10. 29 大阪)
18. 寺村裕治, 岩田博夫: 高い生着能が期待できる移植用膵島の修飾法. 第 29 回日本バイオマテリアル学会 (2007. 11. 27 大阪)
19. Arima, Y., Iwata, H.: Tracking of Cell Adhesion Process to Self-Assembled Monolayer of Alkanethiols with Various Functional Groups, 2007 International Conference on Solid State Devices and Materials (2007.9.19-21 Tsukuba)
20. Arima, Y., Toda, M., Iwata, H.: Complement activation on poly(ethylene glycol)-modified surfaces, 1st Asian Biomaterials Congress (2007.12.6-8 Tsukuba)
21. 戸田満秋, 有馬祐介, 岩田博夫, 高分子材料と生体との相互作用—III. 各種官能基を有するモデル表面による補体系の活性化—, 第 36 回医用高分子シンポジウム (2007. 7.30 東京)
22. 戸谷貴彦, 寺村裕治, 岩田博夫: ポリビニルアルコール誘導体を用いた細胞表面の修飾法, 第 36 回医用高分子シンポジウム (2007.7.30 東京)
23. 戸谷貴彦, 寺村裕治, 岩田博夫: PVA 誘導体を用いた膵島表面への血栓溶解酵素の固定化, 日本バイオマテリアル学会第 2 回関西若手研究発表会 (2007.8.3 大阪)
24. Totani, T., Teramura, Y., Iwata H.: Cell

- surface modification using poly(vinyl alcohol) derivative, CTS-IPITA-IXA 2007 Joint Conference (2007.9.15-20 USA)
25. Totani, T., Teramura, Y., Iwata H.: Surface modification of Islets using poly(vinyl alcohol) derivative, JSAO and IFAO 2007 Joint Congress (2007.10.28-31 Osaka)
 26. 戸谷貴彦、寺村裕治、岩田博夫：高分子薄膜を介した膵島表面への Urokinase の固定化とその機能評価，第 29 回日本バイオマテリアル学会大会（2007.11.27 大阪）
 27. 上田祐介、山添泰宗、岩田博夫：中空糸内に封入したカニクイザル ES 細胞のドーパミン神経細胞への分化誘導，第 53 回高分子研究発表会(2007.7.20 神戸)
 28. 金田成弘、寺村裕治、岩田博夫：高分子材料と生体との相互作用－I. 溶解分子鎖と細胞－. 第 36 回医用高分子シンポジウム (2007. 7. 30 東京)
 29. 佐藤 秀樹、末盛 博文、岩田 博夫：ヒト間葉系幹細胞の順化培養液を用いたカニクイザル ES 細胞の未分化維持培養. 第 5 回日本再生医療学会総会 (2006. 3. 8-9, 岡山)
 30. 佐藤 秀樹、Chen Hao、岩田 博夫：in situ ブロッキング法によるインスリン分泌細胞のスクリーニング. 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会 (2006. 11. 27-28, 東京)
 31. 寺村裕治、金田成弘、岩田博夫：ポリビニルアルコールを用いた膵島の薄膜カプセル化の検討. 第 44 回 日本人工臓器学会大会 (2006. 11. 1 横浜)
 32. 三浦 傑、寺村裕治、岩田博夫：PEG-脂質複合体を用いた生細胞のカプセル化. 第 55 回高分子学会年次大会 (2006. 5. 25 名古屋)
 33. 戸谷貴彦、寺村裕治、金田成弘、岩田博夫：ポリビニルアルコール誘導体による細胞のカプセル化. 第 52 回高分子研究発表会(2006. 7. 21 神戸)
 34. 戸谷貴彦、寺村裕治、金田成弘、岩田博夫：ポリビニルアルコール誘導体による生細胞の薄膜カプセル化. 第 28 回日本バイオマテリアル学会大会(2006. 11. 27-28 東京)
 35. Chen Hao、佐藤秀樹、岩田博夫：ニトロセルロース膜を用いたインスリン分泌細胞の免疫スクリーニング. 第 52 回高分子研究発表会(2006. 7. 21 神戸)
 36. 山口歌奈子、佐藤秀樹、岩田博夫：各種細胞外マトリクス上でのサル ES 細胞からのインスリン分泌細胞への分化誘導. 第 15 回ポリマー材料フォーラム (2006. 11. 17 豊中)

〔図書〕 (計 3 件)

- ①岩田博夫、星和書店、第8章再生医学 in 基礎医学(赤川公郎)星和書店、253-278、2008
- ②岩田博夫、日本セラミックス協会、生体材料の基礎 in 生体材料、(社)日本セラミックス協会編、15-18、2008年10月25日
- ③岩田博夫 共立出版、第2章細胞の構造と機能：細胞外 in ナノテクのためのバイオ入門、日本表面科学会 編集
担当編集委員：荻野俊郎・宇理須恒雄
25-42、2008

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

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

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

佐藤 英樹(SATO HIDEKI)
京都大学・再生医科学研究所・研究員
研究者番号：20378897
辞退：平成 19 年 1 月 20 日

松本 慎一(MATSUMOTO SHINICHI)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：70359834
辞退：平成 18 年 12 月 20 日

(3) 連携研究者

興津 輝(OKITSU TERU)
京都大学・医学部・助教
研究者番号：10378672