

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18025

研究課題名(和文) 交互積層法を用いた血管化膵組織の構築

研究課題名(英文) Construction of three-dimensional vascularized pancreatic tissue using layer-by-layer method

研究代表者

高市 翔平 (Takaichi, Shohei)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30804877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病患者に対する膵臓移植や膵島移植に代わる再生医療の確立には、皮下移植が望ましいものの、生着を可能とする組織の血管化が課題である。今回、交互積層法を利用した、ヒト人工多能性幹細胞由来細胞(以下細胞)を用いた血管化細胞スフェロイド組織(血管化組織)を開発し、その機能を評価した。糖尿病化免疫不全マウスへの血管化組織の皮下移植では、血糖値の有意な低下を認めた。摘出した血管化組織内において、レシピエント由来の血管の経時的な増加が認められ、血糖値改善の要因と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、交互積層法を用いて、細胞の積層化を可能にする技術を利用して、血管構造を伴う3次元ヒト人工多能性幹細胞由来細胞スフェロイド組織を構築し、糖尿病化免疫不全マウスに同組織の皮下移植を行い、血管構造を伴わない組織の皮下移植マウスと比較し、随時血糖値およびグルコース負荷試験での血糖値が有意に低下したことを報告している。本研究は、同移植法が、安全な移植部位である皮下への新規移植法の開発に有用であり、1型糖尿病患者に対する再生医療の確立に向け、大きな意義を持つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Subcutaneous transplantation is desirable for establishing regenerative medicine as an alternative to pancreas and islet transplantation for patients with type 1 diabetes. However, poor vascularity in the subcutaneous site is burden for success in the transplantation. We investigated the effect of vascularized human induced pluripotent stem cell-derived cell (hiPS-cell) spheroid tissue constructed three-dimensionally using a layer-by-layer cell-coating technique. The vascularized hiPS-cell spheroid tissue significantly decreased blood glucose levels in diabetic immunodeficient mice when transplanted subcutaneously. Furthermore, host mouse vessels were observed in the explanted vascularized hiPS-cell spheroid tissue. This therapeutic effect was suggested due to host angiogenesis in the graft.

研究分野：肝胆膵疾患領域における基礎研究

キーワード：1型糖尿病 膵島移植 皮下移植 iPS細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

重症1型糖尿病患者に対する膵島移植は、膵臓移植に比して低侵襲にQOLの改善だけでなく、生命予後も改善する治療として、年々期待が高まっているが、単回移植でのインスリン離脱が困難であることや本邦での絶対的ドナー不足などが問題となっている。また、異種移植によるドナー不足の解消は人畜共通感染症の面から安全性が懸念されており、今後は再生医療を含めた膵島移植の長期生着に向けた技術改善と同時に、安全で安定した供給が行える新たな組織移植に期待が寄せられている。これまでに我々は、細胞外マトリックスであるフィブロネクチンとゼラチンによるナノ被膜を細胞表面へ形成し、積層化する技術 Layer by Layer method (LbL法)を用いた膵細胞の3次元構造体であるスフェロイドの作成技術を開発し報告してきた (Fukuda et al. Biomaterials. 2018)。臨床応用に向けて残された課題として、1) 安全な細胞ソースの確保、2) 生体内での至適移植部位の同定があげられる。これらについて、インスリン産生細胞の再生医療が新たな糖尿病治療の1つとして期待されると同時に、皮下への膵島移植は、低侵襲であること、複数回の移植が可能であること、グラフトのモニターが比較的容易であり、必要時にはその摘出が可能であるなど様々な利点がある (Alexander et al. PNAS. 2017)。しかし、皮下は膵島生着に必要な血管新生に乏しく、膵島皮下移植に対する大きな障壁となっている。

### 2. 研究の目的

上記課題に対し、本研究は、細胞ソースとして human induced pluripotent stem cell-derived cell (hiPS細胞)を使用し、LbL法を用いて、血管構造を伴う3次元細胞スフェロイド組織を構築し、血流が乏しいという問題点を克服し得る1型糖尿病に対する新規皮下移植法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

LbL法を用い、hiPS細胞からなる細胞スフェロイドを作成し、human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)、normal human dermal fibroblast (NHDF)との共培養により、血管化細胞スフェロイド組織(血管化組織)を構築した。構築した血管化組織の1型糖尿病に対する治療効果を細胞実験、マウスを用いた動物実験にて検討した。細胞実験では、HUVECを使用せずに構築した非血管化組織との比較により、その有効性を検討した。組織構築における至適細胞数の設定には、マウスのインスリノーマ細胞株であるMIN6を細胞ソースとして使用した。動物実験では、雌のNOD/SCIDマウスを使用し、ストレプトゾシン(160mg/kg)の静脈内投与を行い、1型糖尿病モデルマウスを作成した。血管化組織移植群、非血管化組織移植群、偽手術を行ったコントロール群の比較により、随時血糖値の測定および移植後14日目に腹腔内グルコース負荷試験を行い、血管化組織の有効性を検討した。次に移植後1日目および28日目に移植組織片を摘出し、免疫組織化学染色にて評価を行い、血管化組織のインスリン分泌能を単位スフェロイド当たりのインスリン陽性面積、総血管数をhmCD31陽性細胞数で評価した。さらに、血管化組織内の血管の由来を、グラフト由来血管をhmCD31陽性/hCD34陽性細胞、レシピエント由来血管をhmCD31陽性/hCD34陰性細胞と定義し、検討を行った。

### 4. 研究成果

#### 1) 血管化組織作成における至適条件の設定

組織構築における細胞数の設定において、血管網の構築およびスフェロイドの形態安定性の観点から、0.33cm<sup>2</sup>の基盤上で、HUVEC数 $1 \times 10^5$ 、NHDF数 $1 \times 10^6$ を至適条件とした。MIN6スフェロイドを用いた検討では、組織内においてスフェロイドの崩れを認めたため、フィブリンゲル内で共培養を行い、スフェロイドの形態維持および血管網の形成を認めた。hiPS細胞スフェロイドを用いた検討では、フィブリンゲルを使用せずに、組織内でのスフェロイドの形態維持が可能であり、血管網の形成を認めた。

#### 2) 細胞実験における血管化組織の機能検証

次に、作成した血管化細胞スフェロイド組織の機能の検証を行い、細胞実験では、MIN6およびhiPS細胞を用いた血管化組織において、非血管化組織と比較し、インスリン遺伝子発現およびインスリン分泌量の有意な上昇を認めた。

#### 3) 動物実験における血管化組織の機能検証

動物実験では、hiPS細胞を使用し、非血管化組織群およびコントロール群と比較し、血管化組織移植群において、随時血糖値およびグルコース負荷試験での血糖値の有意な低下を認めた。非血管化組織群とコントロール群の両群間ではその有意差を認めなかった。また、血管化組織群

では、移植組織片の摘出後に随時血糖値の再上昇を認めた。摘出した組織の免疫組織化学染色では、血管化組織移植群で、移植後1日目および28日目において、単位スフェロイド当たりのインスリン陽性細胞の占める面積が有意に広く、加えてグラフト内血管数を多く認めた。また由来血管の評価を行い、血管化組織内でレシピエント由来血管が経時的に増加することを確認し、さらにはグラフト由来血管と吻合する所見を認めた。

#### 4) 結論

以上、LbL法を用いて開発した血管化細胞スフェロイド組織の皮下移植により、糖尿病化マウスの血糖値の改善を認め、1型糖尿病に対する治療効果を認めた。その機序としてレシピエント由来の血管新生が考えられた。本手法は、1型糖尿病患者に対する新規皮下移植法の開発に有用である可能性が示唆された。

今後について、LbL法により作成した血管化組織の1型糖尿病に対する一定の治療効果を認めたが、その効果を更に上げることが残された課題である。その課題に対し、血管化組織の有効性の更なる検証について、hiPS $\beta$ -cell細胞数の違いによる治療効果の評価、間質細胞として共培養に用いる細胞種の検討、血管化組織のインスリン分泌能における分子メカニズムの解明が必要であると考ええる。また、膵島皮下移植のヒト臨床応用へ向けた大動物を用いた実験系について検討する。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takaichi Shohei, Tomimaru Yoshito, Akagi Takami, Kobayashi Shogo, Fukuda Yasunari, Toya Keisuke, Asaoka Tadafumi, Iwagami Yoshifumi, Yamada Daisaku, Akita Hirofumi, Noda Takehiro, Gotoh Kunihito, Doki Yuichiro, Akashi Mitsuru, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 Three-dimensional Vascularized $\beta$ -cell Spheroid Tissue Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells for Subcutaneous Islet Transplantation in a Mouse Model of Type 1 Diabetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/TP.00000000000003745	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 高市翔平, 浅岡忠史, 岩上佳史, 秋田裕史, 野田剛大, 後藤邦仁, 小林省吾, 赤木隆美, 明石満, 江口英利, 森正樹, 土岐祐一郎
2. 発表標題 細胞外マトリックスを用いた交互積層細胞コート法による血管化三次元膵島組織の構築
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富丸慶人, 江口英利, 高市翔平, 岩上佳史, 秋田裕史, 野田剛広, 後藤邦仁, 小林省吾, 赤木隆美, 明石満, 土岐祐一郎
2. 発表標題 細胞外マトリックスを用いた交互積層細胞コート法を用いた血管化三次元膵島組織の構築の試み
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shohei Takaichi, Takami Akagi, Yoshito Tomimaru, Shogo Kobayashi, Yoshifumi Iwagami, Hirofumi Akita, Takehiro Noda, Kunihito Gotoh, Yuichiro Doki, Mitsuru Akashi, Hidetoshi Eguchi
2. 発表標題 Construction of three-dimensional vascularized functional $\beta$ -cells tissues using a layer-by-layer cell coating technique
3. 学会等名 American Transplant Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高市翔平, 富丸慶人, 赤木隆美, 小林省吾, 遠矢圭介, 岩上佳史, 山田大作, 秋田裕史, 野田剛広, 後藤邦仁, 土岐祐一郎, 明石満, 江口英利
2. 発表標題 糖尿病化マウスへの三次元血管化iPS細胞由来 細胞スフェロイド組織による皮下移植治療法に関する研究
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shohei Takaichi, Yoshito Tomimaru, Takami Akagi, Shogo Kobayashi, Yoshifumi Iwagami, Daisaku Yamada, Hirofumi Akita, Takehiro Noda, Kunihito Gotoh, Yuichiro Doki, Mitsuru Akashi, Hidetoshi Eguchi
2. 発表標題 Three-dimensional vascularized -cell spheroid tissue derived from human induced pluripotent stem cells for subcutaneous islet transplantation in a mouse model of type 1 diabetes
3. 学会等名 Asian Pancreas and Islet Transplant Association 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富丸慶人, 土岐祐一郎, 江口英利
2. 発表標題 iPS細胞由来 細胞を用いた3次元血管化スフェロイド組織による1型糖尿病に対する新規皮下移植法の開発
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------