

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2023

課題番号：19K23608

研究課題名（和文）膵島脂肪由来幹細胞シートにおける皮下と肝表面移植成果及び免疫応答能の差異の検討

研究課題名（英文）Investigation of Differences in Subcutaneous and Liver Surface Transplantation Outcomes and Immune Responses in Islet Adipose-Derived Stem Cell Sheets

研究代表者

池田 貴裕（Ikeda, Takahiro）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・研究協力員

研究者番号：60849511

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：膵島移植に関して、細胞シート工学を用いた膵島単体シートでは、皮下より肝表面移植の有用性が報告された。我々は膵島/ADSCシートであれば、血管新生誘導/膵島細胞保護効果により侵襲の少ない皮下移植でも肝表面移植と同等な耐糖能改善が期待できると考えた。糖尿病モデルマウスの作製、共培養シート作製手技、ラット膵島の分離手技の安定化を図った後、膵島/ADSCシート作製にとりかかった。膵島分離の5日前にADSCを播種して増殖させた上で、膵島分離を行い、ラット膵島を播種して膵島/ADSCシートの作製を行った。膵島/ADSCシートを糖尿病マウスに移植し続けたが、うまく生着せず、血糖降下作用は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の1型糖尿病に対する移植治療には膵臓移植と膵島移植があるが、克服すべき課題も多い。膵臓移植にはドナー不足、高い侵襲性の問題があり、膵島移植には経門脈移植による塞栓の危険、移植量の制限、生着に至るまでの膵島消失、低いインスリン離脱率などの問題がある。そのため低侵襲で治療効果の高い移植方法の確立が望まれる。膵島/脂肪由来幹細胞複合シートには血管新生誘導、膵島保護効果により高い生着率・移植成績を認めつつ、低侵襲な治療法となる可能性を秘めている。今回、非免疫抑制マウスを用いることでADSCのもつ免疫回避能にも期待したが生着しなかった。免疫抑制マウスを用いれば、耐糖能改善に寄与できた可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The usefulness of liver surface transplantation was reported in the case of a single islet sheet using cell sheet engineering, rather than subcutaneous transplantation. We expected that islet/ADSC sheets would improve glucose tolerance as much as liver surface transplantation even with less invasive subcutaneous transplantation due to their angiogenesis-inducing/islet cell-protecting effects.

After preparing diabetic model mice and stabilizing the techniques for co-culture sheet preparation and isolation of rat islets, we started islet/ADSC sheet preparation. Five days prior to islet isolation, ADSCs were seeded and grown, islets were isolated, and rat islets were seeded for islet/ADSC sheet preparation. The islet/ADSC sheets were continuously transplanted into diabetic mice, but they did not grow well and showed no hypoglycemic effect.

研究分野：移植外科学

キーワード：膵島/脂肪由来幹細胞複合シート 膵島 脂肪由来幹細胞 1型糖尿病 移植

1. 研究開始当初の背景

既存の 1 型糖尿病に対する移植治療には膵臓移植と膵島移植があるが、克服すべき課題も多い。膵臓移植にはドナー不足、高い侵襲性の問題があり、膵島移植には経門脈移植による塞栓の危険、移植量の制限、生着に至るまでの膵島消失、低いインスリン離脱率などの問題がある。そのため、低侵襲で治療効果の高い移植方法の確立が望まれる。膵島保護的に作用し、血管新生に寄与することで移植成績の向上を図る目的で、細胞シート工学を利用した皮下膵島移植が研究されてきた。我々は、糖尿病ラットに対して膵島細胞/間葉系幹細胞複合シートを作製し皮下移植することで、良好な血糖コントロールが得られたことを報告した (Hirabaru et al. *Tissue Eng Part C Methods*, 2015)。また、ヒト膵島細胞でも線維芽細胞シートにて膵島機能保持すること (Matsushima et al. *Cell Transplant*, 2016)、足場となるシート作製には脂肪由来幹細胞がより望ましいことが示された (Imamura et al, *Islets*, 2018)。一方で膵島単体シート移植において、マウスでは皮下移植より肝表面移植の成績が良好なことが示された (Fujita et al. *Regenerative Therapy*, 2018)。ただし、肝表面移植は移植の際や生着不全で摘出が必要となった場合の侵襲が大きい。膵島/脂肪由来幹細胞複合シートには血管新生誘導、膵島保護効果により高い生着率・移植成績を認めつつ、低侵襲な治療法となる可能性を秘めている。

「膵島/脂肪由来幹細胞複合シートであれば皮下移植でも肝表面移植と同等の移植成果が得られるのではないか？」と考えた。免疫応答能の差異の有無も解明することにより、安全かつ低侵襲な 1 型糖尿病の移植治療が期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は膵島/脂肪由来幹細胞複合シート移植において、皮下と肝表面での移植効果および免疫応答能の差異の有無を明らかとし、今後の安全かつ低侵襲な 1 型糖尿病治療に寄与することである。

これまで膵島/脂肪由来幹細胞複合シートの肝表面移植は行われておらず、皮下移植との移植成績を比較する。また、皮下移植と肝表面における免疫応答能の差異、脂肪由来幹細胞がどのように免疫応答回避に関与しているのかを明らかにする。今後、iPS 細胞から膵β細胞が誘導される可能性があり、皮下移植は低侵襲な移植方法であると考えられ、継続追及する必要があると考える。しかしながら、誘導β細胞の作製はなかなか進んでおらず、異種移植および免疫回避も重要なテーマとなり得る。皮下移植をどのように行うか追求し、免疫応答回避について解析を進める。

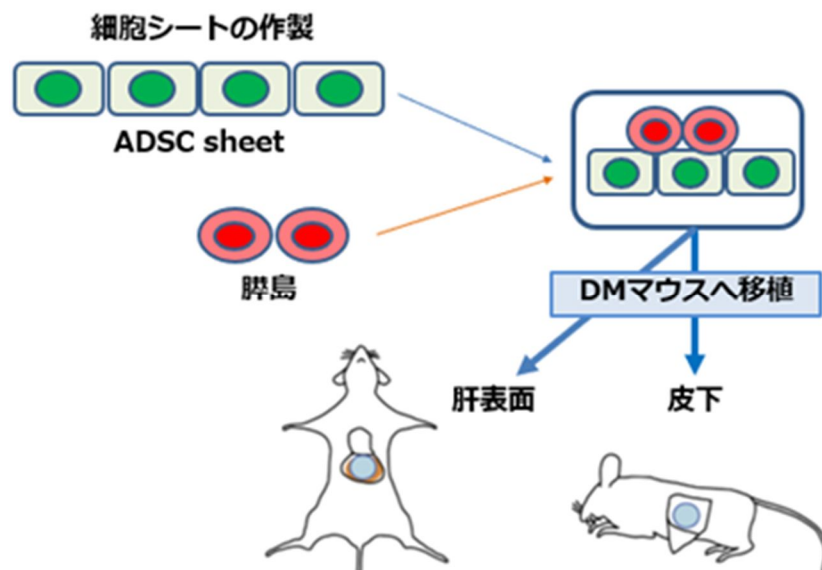
3. 研究の方法

(1) ラット膵島から膵島/脂肪由来幹細胞複合シートを作製

ラットより皮下脂肪を採取し脂肪由来幹細胞 (ADSC) を分離し、ADSC シートを作製。膵臓を摘出し、膵島を分離し、ADSC シートへ播種する。

(2) STZ 処理した糖尿病マウスモデルの皮下・肝臓表面へ移植

C57BL6 マウス (n=28) を購入し、未処理マウス (n=7)、STZ 処理した糖尿病マウス (n=7) をコントロールとし、皮下移植した糖尿病マウス (n=7)、肝表面移植した糖尿病マウス (n=7) を準備する。これまでの検討と違うところは、非免疫抑制マウスを用いることで、ADSC のもつ免疫回避能を検討する。



(3) 血清グルコース、インスリン、C ペプチド測定

移植 0 日目、7 日目、14 日目、28 日目に採血を行い、血清グルコース、血清インスリン、ラット特異的 C ペプチド、マウス特異的 C ペプチドを測定する。ELISA キットで測定でき、移植膵島由来のインスリンかどうか判別できる。

(4) 血糖正常化を得たマウスから移植片摘除

移植 28 日目に移植片摘除を行い、免疫染色を行う。CD3,11b,45 等で免疫応答を観察する。

4. 研究成果

(1) まず、糖尿病モデルマウスの作製を行った。論文より引用し、C57BL/6J マウスにストレプトゾシン(220mg/kg BW)を腹腔内投与して、血糖 350mg/dL 以上を糖尿病発症と判定した。この手法での糖尿病マウスモデルの糖尿病発症率は 60-70%程度とされていた。

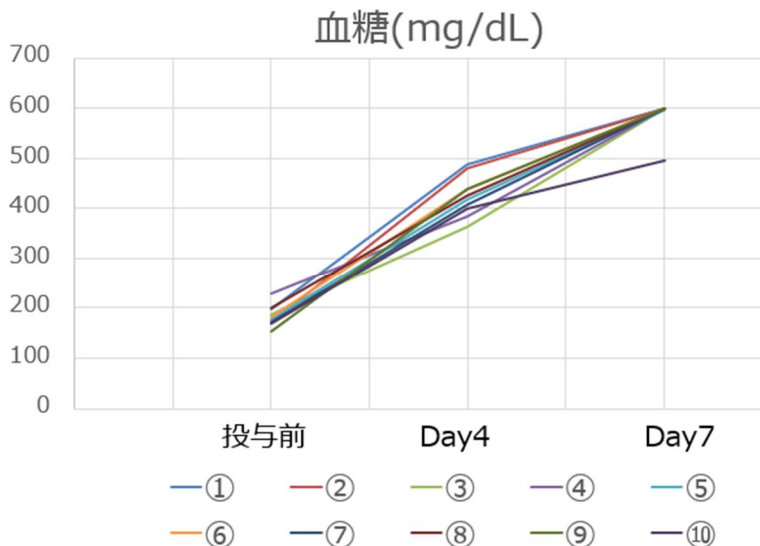


図1 ストレプトゾシン投与後の血糖

(2) 次に、本実験に入る前に線維芽細胞、膵癌細胞株などを up cell に播種することで単培養シートや共培養シート作りの手技を安定させた。

(3) 次にラット膵島の分離に着手した。膵臓の消化に用いるコラゲナーゼを注入するため、ラットの胆管へカニューレーションする技術が必要であり、手技獲得に時間を要した。手技が安定したところで膵島分離を行った。動物実験施設でラット膵臓へのコラゲナーゼ注入、膵全摘などを行い、当科実験室で振盪、ろ過、濃度勾配液を加えての遠心処理等を行って膵島の分離を行った。

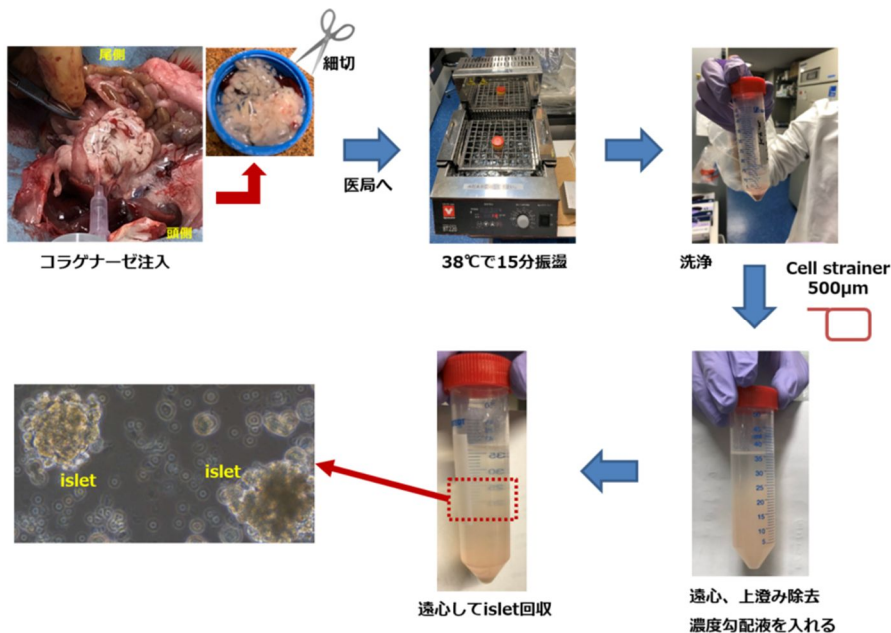


図2 ラット膵島分離

(4) 続いて、ラット **ADSC** については専門業者から購入したものをを使用した。**ADSC** が推奨培地で増殖しない問題があり難渋したため、シート作製に移行するまでに時間を要した。培地の変更により、**ADSC** の増殖を確認でき、シート作製にとりかかった。膵島分離の 5 日前に **ADSC** を播種して増殖させコンフルにさせた上で、膵島分離を行い、ラット膵島を播種して膵島/**ADSC** シートの作製を行った。

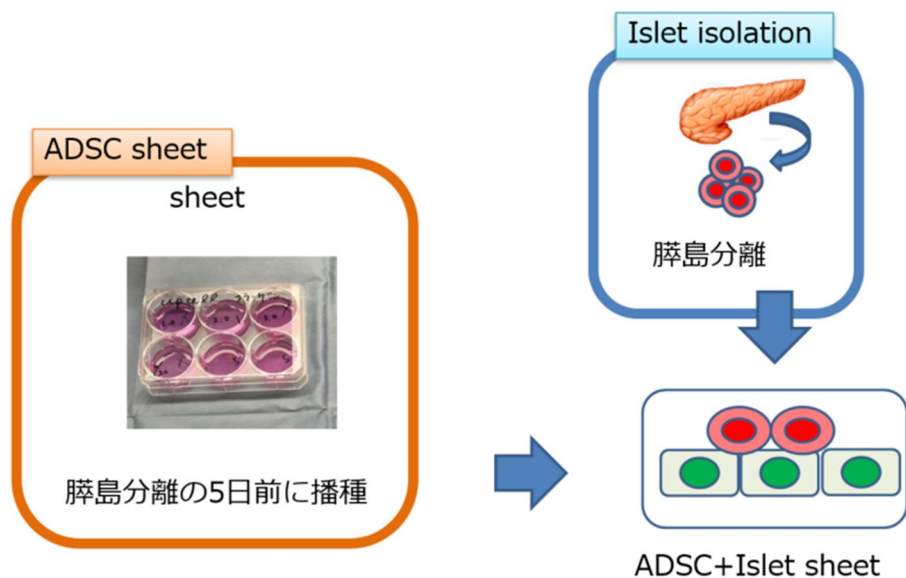


図 3 膵島/**ADSC** シート作製

(5) 膵島/**ADSC** シートを糖尿病マウスに移植し続けたが、うまく生着せず、血糖降下作用は認めなかった。

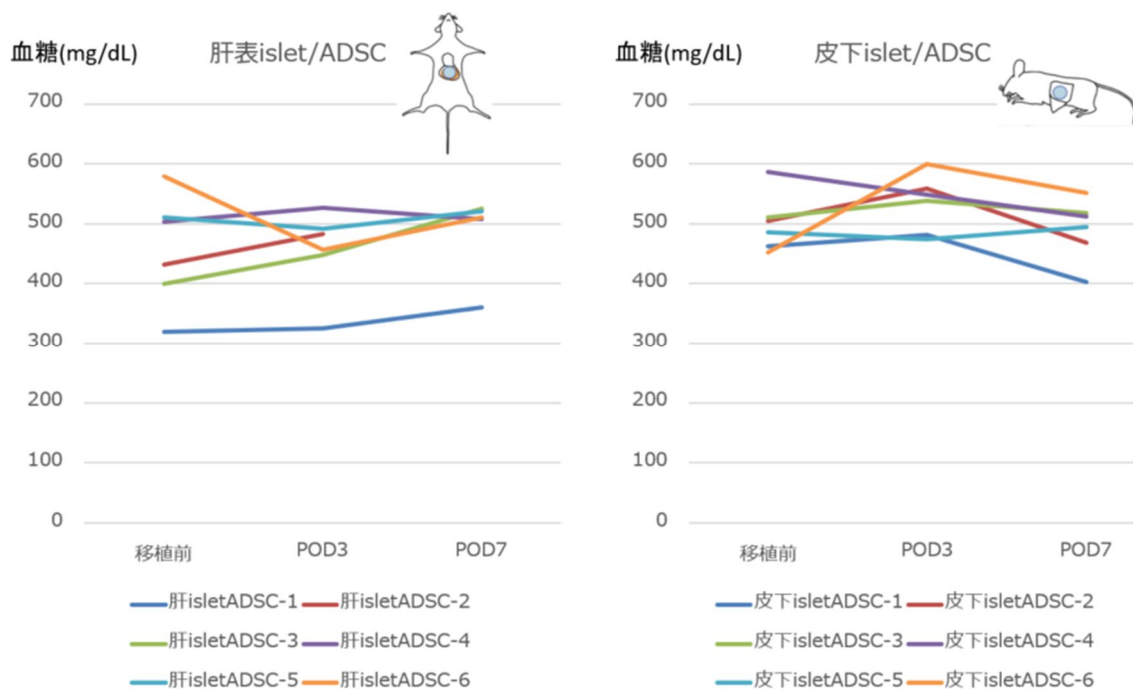


図 4 膵島/**ADSC** シートの肝表面移植と皮下移植後の血糖推移

今回、非免疫抑制マウスを用いることで **ADSC** のもつ免疫回避能にも期待したが生着しなかった。免疫抑制マウスを用いれば、耐糖能改善に寄与できた可能性がある。

< 引用文献 >

Masataka Hirabaru, Tamotsu Kuroki, Tomohiko Adachi, Amane Kitasato, Shinichiro Ono, Takayuki Tanaka, Hajime Matsushima, Yusuke Sakai, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Kosho Yamanouchi, Mitsuhsa Takatsuki, Teruo Okano, Susumu Eguchi. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015 Dec;21(12):1205-15.

Hajime Matsushima, Tamotsu Kuroki, Tomohiko Adachi, Amane Kitasato, Shinichiro Ono, Takayuki Tanaka, Masataka Hirabaru, Naoki Kuroshima, Takanori Hirayama, Yusuke Sakai, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhiisa Takatsuki, Tatsuya Kin, James Shapiro, Susumu Eguchi. Cell Transplant. 2016;25(8):1525-37.

Hajime Imamura, Tomohiko Adachi, Tatsuya Kin, Shinichiro Ono, Yusuke Sakai, Toshiyuki Adachi, Akihiko Soyama, Masaaki Hidaka, Mitsuhiisa Takatsuki, A M James Shapiro, Susumu Eguchi. Islets. 2018 May 4;10(3):e1445948.

Izumi Fujita, Rie Utoh, Masakazu Yamamoto, Teruo Okano, Masayuki Yamato. Regen Ther. 2018 May 10;8:65-72.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田貴裕、足立智彦、宮本大輔、永川寛徳、松島肇、田中貴之、原 貴信、曾山明彦、日高匡章、伊藤信一郎、金高賢悟、江口 晋
2. 発表標題 再生医療アプローチを用いた膵島移植研究
3. 学会等名 第48回日本膵・膵島移植研究会
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
---------	---------