

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591227

研究課題名(和文) 若年発症 型糖尿病に対する再生膵島移植  
ティッシュエンジニアリングの利用研究課題名(英文) Reproduction islet transplantation for youth onset type diabetes  
The use of the tissue engineering

研究代表者

山下 方俊(YAMASHITA MICHITOSHI)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20381387

研究成果の概要(和文): ラットの膵島から単離した膵島細胞を、温度応答性培養皿で播種培養し、低温処理を行い培養皿からシート状に回収し得た。温度応答性培養皿上の膵島細胞は細胞間接着により2次元構造へと再構築された。免疫組織学染色によりインスリン及びグルカゴン陽性細胞を確認した。組織学的評価にてマウスの皮下に移植した膵島細胞シートの生着が確認された。糖尿病モデルマウスへ皮下移植すると、血糖値の正常化が得られた。

研究成果の概要(英文): After reaching confluency on temperature-responsive culture dishes, cultured rat islet cells were harvested as a uniformly connected tissue sheet by lowering culture temperature. Histological examination showed that harvested cell sheet had a monolayered 2-D structure, which established and retained its structural cell-to-cell connections. Immunohistological staining revealed that islet cell sheet comprised of insulin- and glucagon- staining positive cells. By transplanting islet cell sheets into the subcutaneous space of mice, islet tissues were successfully engineered and sustained. Therapeutic effectiveness of this islet bioengineering procedure was also confirmed in the transplantation study to induced diabetic mice.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科

キーワード：型糖尿病、膵島移植、膵島再生、細胞シート、ティッシュエンジニアリング

## 1. 研究開始当初の背景

型糖尿病は、幼年期または青年期にもっとも好発し、30歳以前に診断される糖尿病の主な病型である。また糖尿病全体の10~15%を占める。大津らは15歳未満の型糖尿病発症率を2.46人/10万人(型糖尿病発症率:1.12人/10万人)と発表している。全国で1800人を超えらると思われる患児らは小児期から1日に数回の血糖測定とインスリン注射を行い続けることとなり、常に低血糖や糖尿病性ケトアシドーシスを発症する危険性、腎障害の末生涯透析を受けるなどのリスクを負うことになる。日本における膵島移植は、膵・膵島移植研究会の膵島移植班(当講座事務局)を中心に臨床実施体制が整備され、2007年3月30日現在、64回の膵島分離後、移植条件を満たした33回(52%)の膵島移植が17人の患者に行われている。しかし、国内ではもとより、発症率が日本の5倍を超えらるといわれている国外でも小児に対する膵島移植はまだ行われていない。その理由として、移植後の免疫抑制剤による悪影響が不明である点が挙げられる。実際、成人の場合、平均2~3回の移植が門脈内注入として行われる。しかし、5年後にインスリンフリーになっている症例は10%程度と報告されており、バラバラになった膵島細胞が、他の臓器移植と同様に生着するためには、免疫寛容の獲得や移植部位、移植膵島の修飾等が課題であると考えられる。我々は以前より、成人型糖尿病に対する治療を目指し、ヒト膵島分離とともに移植膵島に対する免疫寛容誘導の研究を行ってきた。これまでの実験で膵島をマイトマイシンCで処置することによって、レシピエントの免疫抑制なく、長期に生着させることが可能であることを見出している。また、腎被膜下に移植した場合に、細胞塊を形成し存在する膵島細胞がさらに移植部位の被膜を裏打ちするがごとくシート上に再構築され、炎症細胞浸潤の抑制が起きている事を確認した。主任研究者は、日常診療で小児外科を専門とし、小児糖尿病の悲惨さは痛感しており、小児膵島移植の可能性を明らかにしたいと考えている。

最近、肝細胞をシート化し、皮下に移植し長期に構造と機能が維持されたとの報告がある(Nature Medicine,13,800-5,2007)。肝細胞はsingle cellの状態では非常に弱く、培養液中に浮遊させていると、どんどん死んでしまう。体内でsingle cellを生着させる事は難しいが、シート化する事により、線維芽細胞や、細胞外マトリックスなどで微小環境を構築することが形態・機能を維持していると考えられる。肝臓の代用を目的とした場合、シート上に出来る肝細胞の数には限界があり、臨床応用には難しいとされている。

## 2. 研究の目的

本研究は、膵島移植生着例で腎被膜下に観察された膵島細胞シートと、肝細胞のシート化とをヒントに、培養中に膵島細胞シートを作成し、免疫寛容を獲得するべく再構築膵島移植モデルの完成を目指し、小児膵島移植の臨床応用への展開を図るものである。細胞シート工学を用いた膵島細胞シートの作成と、移植条件の設定を目的とし、小児における膵島移植の臨床応用への道を探る。

## 3. 研究の方法

(1)膵島を温度応答性培養皿上で培養した。次に細胞の接着を目指しlaminin-5を温度応答性培養皿上にcoatingし、その上で培養し観察した。

(2)培養膵島細胞の機能について免疫染色およびインスリン分泌能測定を行った。膵島細胞シートとして回収し、形態学的評価を行い、同系ラットの皮下および大網への移植を行い、組織学的評価を行った。

(3)ラットの分離膵島をトリプシン処理にて単離し、Laminin-5薄層コートした温度応答性培養皿にて接着培養を行った。培養2日目に培養温度を20℃に変化させることにより、膵島細胞をシートとして回収した。ストレプトゾトシンで糖尿病を誘発(血糖値400mg/dl以上)した型糖尿病モデルSCIDマウスへ、作成した細胞シートを皮下に移植した。血糖値200mg/dl以下を正常(生着)とし、移植後定期的に血糖測定を行い、生着期間について検討した。移植部を摘出し、免疫染色にて組織学的評価を行った。

## 4. 研究成果

(1)初期の段階では膵島はdishに接着せず、重力により、dish上に接しているだけであった。細胞外マトリックスの一つであるLaminin-5をcoatingした培養では、殆どすべての細胞がdish上に接着し、広がり、培養2日後にはほぼconfluentの状態となった。さらに低温処理することで、トリプシン処理することなく、自然に剥離できた。

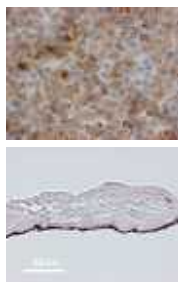
Laminin-5をcoatingしたdishに接着



(2)培養細胞密度を至適化する事により、培養2日目に単層の培養が可能となった。培養膵島細胞におけるインスリンおよびグルカゴンの存在を免疫染色にて確認した。また、グルコース濃度変化応答性のインスリン分

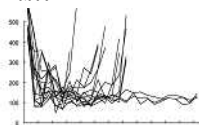
泌を確認した。温度応答性培養皿上の膵島細胞は、低温処理によるシート状組織回収が可能だった。

#### 細胞シートのインスリン染色



(3) 膵島細胞シートの皮下移植により糖尿病マウスの血糖値は正常化した。また、ブドウ糖負荷試験において、正常マウスと同等の血糖値の経時的変化を示した。組織学的解析において、皮下に機能的膵島組織が形成されていることを確認した。

#### 血糖値グラフ



#### 皮下移植部のインスリン染色



### 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4件)

Saito T, Anazawa T, Gotoh M, Uemoto S, Kenmochi T, Kuroda Y, Satomi S, Itoh T, Yasunami Y, Kitamoto T, Mohri S, Teraoka S, Actions of the Japanese Pancreas and Islet Transplantation Association Regarding Transplanted Human Islets Isolated Using Liberase HL., Transplantation Proceedings, 査読有、42巻、2010、4213-4216ページ  
Saito T, Gotoh M, Satomi S, Uemoto S, Kenmochi T, Itoh T, Kuroda Y, Yasunami Y, Matsumoto S, Teraoka S, Islet transplantation using donors after cardiac death: report of the Japan Islet Transplantation Registry.、

Transplantation, 査読有、90巻、2010、740-747ページ

Shimizu H, Ohashi K, Utoh R, Ise K, Gotoh M, Yamato M, Okano M, Bioengineering of functional sheet of islet cells for the treatment of diabetes mellitus., Biomaterials, 査読有、30巻、2009、5943-5949ページ

Gunji T, Saito T, Sato Y, Matsuyama S, Ise K, Kimura T, Anazawa T, Gotoh M, Mitomycin-C treatment followed by culture produces long-term survival of islet xenografts in a rat-to mouse model., Cell Transplantation, 査読有、17巻、2008、619-629ページ

#### [学会発表](計8件)

伊勢一哉、大橋一夫、齋藤敬弘、清水裕史、鶴頭理恵、岡野光男、後藤満二、膵島細胞移植の開発 膵島細胞シートによる皮下での膵島組織作製、第38回日本膵・膵島移植研究会、平成23年3月5日、奈良

齋藤敬弘、大橋一夫、清水裕史、鶴頭理恵、伊勢一哉、岡野光夫、後藤満二、膵島細胞による単層細胞シート作製と膵島組織工学への展開、第9回日本再生医療学会総会、平成23年3月28日、広島

清水裕史、大橋一夫、鶴頭理恵、伊勢一哉、大和雅之、岡野光夫、後藤満二、温度応答性培養皿を用いた機能的膵島細胞シートの構築、第8回日本再生医療学会総会、平成23年3月5日、東京

Shimizu H, Ohashi K, Utoh R, Ise K, Gotoh M, Yamato M, Okano M, Bioengineering of functional sheet of islet cells for the treatment of diabetes mellitus., The 12<sup>th</sup> Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association, 平成21年10月13日、ベニス、イタリア

Tsukada M, Gotoh M, Saito T, Ise K, Kenjo A, Kimura T, Sato Y, Anazawa T, Highly toxic environment to isolated islets during collagenase overdigestion., The 22<sup>th</sup> International Congress of the Transplantation Society, 平成20年8月13日、シドニー、オーストラリア

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

山下 方俊 (YAMASHITA MICHITOSHI)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20381387

### (2)研究分担者

伊勢 一哉 (ISE KAZUYA)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：9036746

佐藤 佳宏 (SATO YOSHIHIRO)  
福島県立医科大学・医学部・博士研究員  
研究者番号：60347218

石井 証 (ISHII SHOU)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40468129

松山 真一 (MATSUYAMA SHINICHI)  
福島県立医科大学・医学部・博士研究員  
研究者番号：90381384

後藤 満一 (GOTOH MITSUKAZU)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50162160

### (3)連携研究者

なし