

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06364

研究課題名(和文)細胞塊をなす卵丘卵子複合体や膵ランゲルハンス島に適した新規ガラス化デバイスの開発

研究課題名(英文) Novel cryodevices for vitrification of cumulus-oocyte complexes and pancreatic islets

研究代表者

保地 眞一 (Hochi, Shinichi)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：10283243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：加工性・吸水性・生体適合性に優れた多孔質のシルクフィブロインスポンジディスク上において大量かつ一括でガラス化保存したラット膵島が正常な形態を保って回収できること、体外でグルコースに反応して正常にインスリンを分泌する能力を維持していること、ストレプトゾトシン投与によって誘発した1型糖尿病モデルラットへの腎被膜下膵島移植によって同ラットの血糖値を正常化させられることを報告した。ウシ卵丘卵子複合体に対しては多層シルクフィブロインシートが高吸水性ガラス化素材になるという報告も合わせ、複雑な細胞塊を対象にした新規ガラス化デバイスを開発するという本基盤研究(C)の目的は達成できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガラス化保存の新規デバイス開発を目指す対象材料はウシの卵丘卵子複合体とラットの膵島であり、いずれも主役の細胞(卵子、細胞)以外にも多種多様な機能をもつ細胞群から構成され、それらが協同して働くことを特徴とする細胞塊である。これらのガラス化保存に適したデバイスを加工性・吸水性・生体適合性に優れた多孔質のシルクフィブロイン(SF)から作製できた。ウシ卵丘卵子複合体には市販クライオトップにSFシートを多層に巻き付け、ラット膵島にはSFスポンジをディスク上に切り抜き、それらの有用性を実証した。これらの成果は、ヒトの不妊治療や糖尿病の移植医療に関わる研究者・技術者に貢献する、と期待される。

研究成果の概要(英文)：The high biocompatibility and easy processing capability of silk fibroin (SF) can facilitate successful scaffold design in biomedical research and practical applications, including cell transplantation therapy. The porous SF sponge with high hydrophilicity also serves as a transporter in drug delivery system because the SF sponge is suitable for absorption, retention, and gradual release of pharmaceutical aqueous solutions. Furthermore, the cryodevice derived from the SF sponge can be optimized for minimum volume cooling vitrification of large cell complexes or tissues composed of different cell types (e.g., rat pancreatic islets or bovine cumulus-oocyte complexes). This system requires prompt minimization of exposure to the highly toxic vitrification solution around the cell masses immediately before cooling in liquid nitrogen to guarantee the extremely rapid cooling rate and high post-warm cell viability.

研究分野：動物生産科学

キーワード：ガラス化保存 ウシ卵丘卵子複合体 ラット膵島 シルクフィブロイン

1. 研究開始当初の背景

哺乳類において、単一の細胞集団や比較的単純な細胞構造物の場合にはそれらを超低温保存した後に蘇生させ、個体再生や移植に利用することができる。生殖細胞等のバイオリソース保存や人工授精、胚移植、体外受精 (IVF) のような先進家畜繁殖技術の普及を目的として精力的に開発されてきた配偶子 (精子・卵子) や胚の超低温保存に関する研究は、不妊治療や移植医療のために細胞の長期保存を目指す研究者を大いに刺激した。細胞を -196°C 下で保存する超低温保存法には、緩慢冷却工程で細胞を完全に脱水させる「凍結保存法」と、高溶質濃度下で細胞を脱水させた後に急速冷却によりガラス化状態にする「ガラス化保存法」があり、細胞の構造が複雑なものにはガラス化保存法の方が適している。本研究において、生体適合性の高い素材を用いてガラス化保存の新規デバイス開発を目指す対象材料は、ウシの卵丘卵子複合体 (以下 COC) とラットの膵ランゲルハンス島 (以下、膵島) で、いずれも主役の細胞 (卵子、 β 細胞) 以外にも多種多様な機能をもつ細胞群から構成され、それらが協同して働くことを特徴とする細胞塊である。

2. 研究の目的

卵丘細胞層で周囲を包まれているウシの未受精卵子は哺乳類の中でも細胞質内脂肪顆粒が多く、凍結保存することが困難だった。改良ガラス化法の適用によって超低温保存できるようになったが、その技術水準はヒトやマウスの卵子ほど普遍化していない。一方、インスリンやグルカゴンを分泌する複数の細胞種から構成されている膵ランゲルハンス島もナイロンメッシュをデバイスとしたガラス化法の適用によって大量一括に保存できるようになったが、糖尿病モデルに移植して血糖値を正常化させるときにはデバイスから取り出して洗浄するなどの煩雑な操作が残されている。本研究では、冷却前後の諸操作を簡便化できる新規ガラス化デバイスを生体適合性の高いシルクフィブロイン (SF) から作製し、ウシ未受精卵子を高い蘇生率を維持した状態で特別なスキルがなくてもガラス化保存できるようにするとともに、ラット膵島に対しては凍害保護物質の除去後にデバイスごと糖尿病誘発ラット腎皮膜下に移植して、血糖値の正常化に導く生着を果たすことを目的とする。

3. 研究の方法

これまでにガラス化デバイスとしてとくにヒト不妊治療の現場で汎用されてきたのはクライオトップだが、我々はそれと同等の蘇生率を保ちつつ搭載サンプル数を増加させられる三角錐展開図様に加工したナイロンメッシュ製デバイスを開発・報告した (Yamanaka et al., Biopreserv Biobank, 2017)。今回、生体適合性や加工性に着目して新たにデバイス開発に利用する素材は SF をシートあるいはスポンジに加工したもので、蚕繭から煮沸・乾燥・LiBr 溶解・透析・低温エタノール処理を経て調製した。ウシ COC に対しては、保存液組成 (15% DMSO、15% EG、0.5 M シュクロース、20% FBS) を含むガラス化保存諸工程や胚盤胞発生率を最重要指標としたウシ IVF 工程は、これまでに確立してきたものを踏襲した。とくに SF シートは吸水性が高い多孔質なので、超急速冷却工程に入る前に必要な余剰ガラス化保存液の除去という高度なキャピラリー・シリンジ操作を省略しうる。M-II 期 COC は卵丘細胞層 3~4 層にし、新規デバイスのホルダー部分はクライオトップ先端に SF シートを巻きつけて使用した。加えて、ガラス化・加温 COC の救済に抗酸化性ポリフェノールのレスベラトロール処理が有効かを検討した。なお、比較対照のガラス化デバイスにはクライオトップとナイロンメッシュを用いた。ラット膵島に対しても、上述のガラス化諸条件を応用した。In vitro 蘇生評価法として FDA/PI 二重蛍光染色による生存率と ELISA キットで定量する GSIS を用い、In vivo 評価法としてはストレプトゾトシン誘発 1 型糖尿病モデルラット (血糖値 $> 350 \text{ mg/dL}$) の腎皮膜下に 550 または 800 個の膵島 (外径 $100\sim 200 \mu\text{m}$) を移植し、血糖値正常化 ($< 200 \text{ mg/dL}$) の成否を調べた。正常化個体は糖負荷試験により生着膵島のインスリン分泌応答性を評価し、移植 60 日目に移植片を摘出して再高血糖化 (糖尿病の再発) を確認した。また摘出移植片については、インスリン産生、血管浸潤、炎症、増殖の各パラメーターを免疫組織化学的に解析した。加えて、再生医療用細胞足場材料として近年注目されている脱細胞化組織 (aECM)、とくに肝臓由来 aECM が膵島の生着を促進する血管内皮増殖因子 (VEGF) の作用を持つ可能性がある。高静水圧処理によって調製したラット膵または肝由来 aECM パウダー (脱細胞化レベルは HE 染色と DNA 定量で確認) をまず単離膵島培養液に添加して GSIS を調べた。また、膵島をトリプシン処理して単細胞懸濁液にしてからスフェロイド培養して、移植適正サイズの偽膵島として再構築することも試みた。なお、SF スポンジディスクをガラス化デバイスとする場合、サンプルは液体窒素 (-196°C) に直接投入せず、冷却金属を利用する Solid Surface Vitrification (SSV) 法を採用した。

4 . 研究成果

(1) ラット膵島に対する大容量ガラス化デバイスのナイロンメッシュデバイス、および加工性・吸水性に優れた多孔質のシルクフィブリンスポンジディスク上において大量かつ一括でガラス化保存したラット膵島が、正常な形態を保って回収できること (FDA/PI)、そしてIn vitroでグルコースに反応して正常にインスリンを分泌する能力を維持していること (GSIS) を確認した。さらに、ストレプトゾトシン投与によって誘発した1型糖尿病モデルラットへの腎被膜下膵島移植によって同ラットの血糖値を正常化させられることも明らかにし、In vivoでもガラス化・加温膵島が糖尿病治療に対して正常機能を発揮できることを実証した (Nakayama-Iwatsuki et al., Islets, 2020)。また、加温後のラット膵島をSFスポンジディスクから回収することなく腎被膜下へ膵島のスキャフォールドとしてVEGFとともに直接移植できることもわかった (Yamanaka et al., Transplant Proc, 2021)。

(2) 酵素消化による膵島単離過程やガラス化工程で損傷を受ける膵島周囲の微小環境の修復を目指した実験では、高静水圧処理により調製した肝臓由来aECMとの共培養が新鮮膵島ならびに加温膵島のインスリン分泌機能 (GSIS) を亢進すると明らかにした (Nakayama-Iwatsuki et al., Cryobiology, 2021)。さらに全単離膵島の移植への効率利用ならびに加温膵島の高品質化を目的に膵島をトリプシン処理して単一細胞懸濁液にしてからスフェロイド培養することにより偽膵島を再構築する技術を利用したところ、加温膵島由来の偽膵島は新鮮膵島と同等の生存性 (FDA/PI) ならびに機能性 (GSIS) を持つことに加え、グルカゴン分泌 α 細胞とインスリン分泌 β 細胞が本来あるべき場所に正しく再配置されてくるとわかった (Nakayama-Iwatsuki et al., J Tissue Eng Regen Med, 2021)。

(3) ウシCOCのガラス化保存においては、シート化したSFを市販クライオトップの先端に重ねて巻き付けたデバイスを作製することで、超急速冷却の演出のためにガラス化保存液量の最小化をはかるといった技術者の習熟度に依存するところの工程をSFの高吸水性に委ねることができた。すなわち、比較対照デバイスのクライオトップやナイロンメッシュとSFシートデバイスは、COC回収率、生存率、IVF後の胚盤胞発生率のいずれにおいても同等の成績を生み出した (Nakayama-Iwatsuki et al., Theriogenology, 2020)。また、ガラス化・加温COCの救済に抗酸化性ポリフェノールのレスベラトロール処理が有効かを調べた実験では、デバイスがクライオトップやナイロンメッシュのいずれであってもIVF後の胚盤胞発生率が約10%改善され (Chinen et al., Cryobiology, 2020)、胚作製技術をIVFから顕微授精 (ICSI) に置換すれば新鮮対照と遜色ない胚盤胞発生率が得られることもわかった (Hochi et al., J Reprod Dev, 2022)。

これらの発表論文に加え、総説記事「Cryodevices developed for minimum volume cooling vitrification of bovine oocytes (Hochi, Anim Sci J, 2022)」ならびに著書構成章「Silk fibroin sponge as a cryodevice combined with transporter and scaffold functions in cellular transplantation (Hochi and Tamada, Silk Fibroin: Advances in Applications and Research, 2023)」を著した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 HOCHI Shinichi, IDE Misuzu, UENO Sayaka, HIRABAYASHI Masumi	4. 巻 68
2. 論文標題 High survival of bovine mature oocytes after nylon mesh vitrification, as assessed by intracytoplasmic sperm injection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 335 ~ 339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2022-053	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 NAKAYAMA-IWATSUKI Kenyu, YANAGISAWA Kotaro, TANAKA Dan, HIRABAYASHI Masumi, NEGISHI Jun, HOCHI Shinichi	4. 巻 100
2. 論文標題 Acellular matrix derived from rat liver improves the functionality of rat pancreatic islets before or after vitrification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cryobiology	6. 最初と最後の頁 90 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cryobiol.2021.03.005	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 YAMANAKA Takahiro, NAKAYAMA-IWATSUKI Kenyu, FUJIMOTO Sora, HIRONO Naoki, NEGISHI Jun, TAMADA Yasushi, HIRABAYASHI Masumi, HOCHI Shinichi	4. 巻 53
2. 論文標題 All-in-One Silk Fibroin Sponge as the Vitrification Cryodevice of Rat Pancreatic Islets and the VEGF-Embedded Scaffold for Subrenal Transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 1744 ~ 1750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2021.04.012	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 NAKAYAMA-IWATSUKI Kenyu, HIRABAYASHI Masumi, HOCHI Shinichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Fabrication of functional rat pseudo islets after cryopreservation of pancreatic islets or dispersed islet cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 686 ~ 696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/term.3219	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 HOCHI Shinichi	4. 巻 93
2. 論文標題 Cryodevices developed for minimum volume cooling vitrification of bovine oocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13683	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 NAKAYAMA-IWATSUKI Kenyu, YAMANAKA Takahiro, NEGISHI Jun, TESHIMA Junki, TAMADA Yasushi, HIRABAYASHI Masumi, HOCHI Shinichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Transplantation of rat pancreatic islets vitrified-warmed on the nylon mesh device and the silk fibroin sponge disc	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Islets	6. 最初と最後の頁 145-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19382014.2020.1849928	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 NAKAYAMA Kenyu, CHINEN Shoichiro, TESHIMA Junki, TAMADA Yasushi, HIRABAYASHI Masumi, HOCHI Shinichi	4. 巻 145
2. 論文標題 Silk fibroin sheet multilayer suitable for vitrification of in?vitro-matured bovine oocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 109 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.theriogenology.2020.01.052	査読の有無 無
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 CHINEN Shoichiro, YAMANAKA Takahiro, HIRABAYASHI Masumi, HOCHI Shinichi	4. 巻 97
2. 論文標題 Rescue of vitrified-warmed bovine mature oocytes by short-term recovery culture with resveratrol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cryobiology	6. 最初と最後の頁 185 ~ 190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cryobiol.2020.03.004	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井出 美涼、上野 清、平林 真澄、保地 眞一
2. 発表標題 ガラス化・加温ウシ成熟未受精卵へICSIしたときの胚盤胞発生率はIVFの場合と異なり新鮮対照に劣らない
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤本 空、玉田 靖、保地 眞一
2. 発表標題 ガラス化ラット臍島の腎被膜下移植におけるシルクフィブロインスポンジの多目的連続使用
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山(岩月) 研祐、山中 貴寛、根岸 淳、手島 淳輝、玉田 靖、平林 真澄、保地 眞一
2. 発表標題 シルクフィブロインディスクをデバイスとしてSSV法によってガラス化保存したラット臍島の腎被膜下移植
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 HOCHI Shinichi、TAMADA Yasushi	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Nova Science Publishers	5. 総ページ数 13
3. 書名 Silk fibroin sponge as a cryodevice combined with transporter and scaffold functions in cellular transplantation (Chapter-4); In "Silk Fibroin: Advances in Applications and Research (Ed. PAWAR Shivaji H.)"	

〔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
---------	---------