

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17613

研究課題名（和文）細胞積層法を用いたiPS細胞由来高機能三次元組織グラフトの実現

研究課題名（英文）Construction of Functional Three-Dimensional Tissue Grafts Derived from iPS Cells Using a Layer-by-layer Cell-coating Technique

研究代表者

美濃地 貴之（Minoji, Takayuki）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30850325

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、安全性の観点より、膵細胞の皮下移植が望ましいものの、血流の乏しい皮下組織において生着を可能とするには、組織の血管化が課題である。今回、交互積層法を使用し、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に対する血管化組織の皮下移植では、移植後に血糖値の有意な低下を認めた。免疫組織化学による評価では、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

本研究では、iPSC由来膵細胞を用いて、交互積層法により三次元膵組織を作成し、生体内における機能性について検討を行い、次世代の移植・再生医療への臨床応用を目指すことを本研究の目的とした。本研究では、交互積層法を用いて構築した血管構造を伴う3次元ヒトiPSC由来細胞スフェロイド組織を、糖尿病化免疫不全マウスに皮下移植を行った。血管構造を伴わない組織の皮下移植との比較により、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。本結果は、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 with stem cell-derived β -cells 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 β -cell (hiPS β -cell) spheroid tissue constructed three-dimensionally using a layer-by-layer cell-coating technique. The vascularized hiPS β -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 β -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：膵島移植 皮下移植 再生医療 交互積層法 iPSC細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫による膵細胞の選択的な破壊によって発症する1型糖尿病(インスリン依存型糖尿病)は、内因性インスリン分泌能が枯渇した状態にある。根本的治療として、膵臓移植と経門脈経路による膵島細胞移植が行われているが、その生着率は低く、また慢性的なドナー不足が課題となっている。経門脈経路に代わる移植部位として皮下膵島移植に期待が寄せられているが、皮下は組織生着に必要な血流が乏しいことが問題となっている。またドナー不足問題の解消として、human induced pluripotent stem cell (hiPS)由来のインスリン産生細胞であるβ細胞(hiPS β-cell)を用いた再生医療が注目されている。これまでに、皮下移植部の血管化による生着率の向上を目的とした研究が報告されているが、新たな膵島移植法の確立までには至っていない。これらの問題解決には、生体外操作による血管構造を伴うhiPS β-cellを用いた三次元組織構築を目的とする組織工学が必要である。本研究で使用する交互積層(Layer-by-layer: LbL)細胞コーティング技術は、細胞膜表面に細胞外マトリックスから成るナノ薄膜を形成することができ、LbL処理した支持細胞と血管内皮細胞を共培養することで、血管網を有する三次元組織を短期間で構築できる。

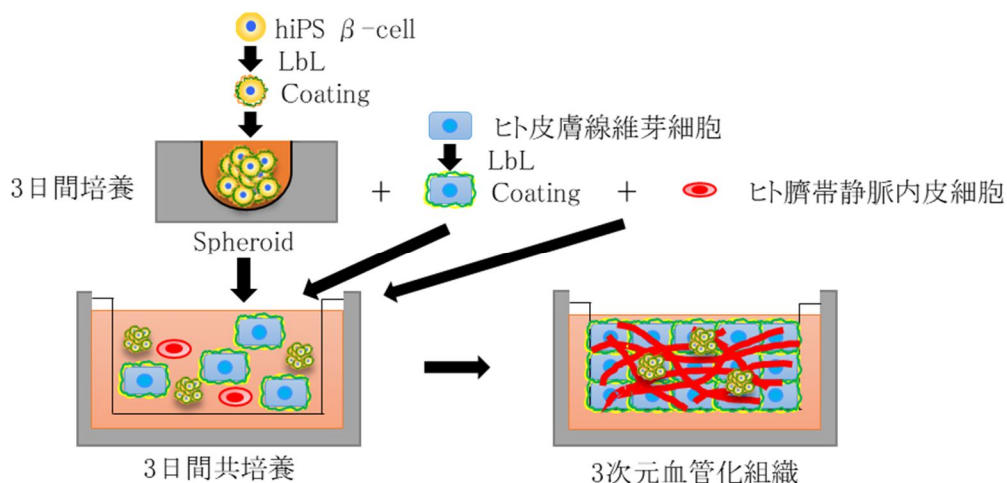
2. 研究の目的

LbL法の技術を活用し、LbL細胞コーティングを施したhiPS β-cellからスフェロイドを作製し、得られたスフェロイドをヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト皮膚線維芽細胞と共培養することで三次元血管化hiPS β-cellスフェロイド組織を構築する。

次に、同組織の免疫不全マウスに対する皮下移植を行い、生着率の向上を達成することで、新たな膵島移植モデルの構築を目指す。これまでに、幹細胞由来のβ-cellを用いた血管化組織の有効性を示した報告は殆どなく、本提案には、新規性が十分に備わっていると考えられる。本研究は、LbL法を用いて細胞の積層化を可能にする技術を利用して、血管化組織を構築し、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

交互積層(Layer-by-layer: LbL)細胞コーティング技術を活用し、human induced pluripotent stem cell (hiPS)由来のインスリン産生細胞であるβ細胞(hiPS β-cell)のスフェロイドを作成し、ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト皮膚線維芽細胞と共培養することで三次元血管化hiPS β-cellスフェロイド組織(血管化組織)を構築する。糖尿病化免疫不全マウスに血管化組織の皮下移植を行い、その有効性を評価する。



4. 研究成果

in vitro 実験では、血管化組織において、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。

in vivo 実験では、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。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。以上より、LbL 法を用いて開発した血管化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。

今後の課題として、以下を検討する。

in vivo 実験において、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今後の課題である。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、

1. hiPS β -cell 細胞数の違いによる治療効果の評価
2. 間質細胞として共培養に用いる細胞種の検討
3. 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。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よる検討が必要であると考え。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------