

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現

機関番号： 8 2 5 0 6

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成21年度～平成23年度

課題番号： 2 1 5 9 1 6 5 4

研究課題名（和文）

末梢血幹細胞(PBSCs)による移植膵島周囲の血管新生促進に関する研究

研究課題名（英文）

Evaluation of improvement of vascularization for transplanted islet with PBSCs

研究代表者 伊藤泰平(ITO TAIHEI)

独立行政法人国立病院機構（千葉東病院臨床研究センター）

研究者番号 5 0 3 9 9 7 5 5

研究成果の概要（和文）：大動物モデルである犬を用いてPBSCsおよび間葉系幹細胞（MSCs）を分離培養することが可能であった。犬膵島分離、移植モデルは既に確立されたが、マージナル膵島モデルを作成し、幹細胞同時移植モデルとの比較検討を行っている最中である。

研究成果の概要（英文）：In this study we established culture of both PBSCs and MSCs from canine. Now, we are trying to establish canine islet transplantation model with marginal number and compare between those control model and PBSCs or MSCs co-transplant model in terms of glucose tolerance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,300,000	390,000	1,690,000
22年度	1,400,000	420,000	1,820,000
23年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計			

研究分野：外科学一般

科研費の分科・細目：基盤研究（C）

キーワード：膵島移植 血管再生医療 末梢血幹細胞 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

(1)膵島移植は、1型糖尿病根治療法として既に臨床応用されている。しかし、現状ではインスリン離脱を可能にするためには2または3人のドナーを要し、長期の膵島機能保持は困難で、成績は不良といわざるを得ない。

(2)成績改善のために膵島への血管再構築促進（膵島の微小臓器化）に注目した。膵島機能低下の主因として、移植膵島への血管再構築の困難性があげられる。我々は、ラットを用い骨髄間葉系幹細胞(MSCs)の移入が血管新生を惹起し、膵島生着促進と機能改善が見出された。

(3)当施設では末梢血幹細胞(PBSCs)の血管新生効果を確認し、すでに末梢動脈閉塞症を有する症例に対して臨床応用し有効性を確認している。

## 2. 研究の目的

血管再生を惹起する幹細胞を膵島と同時移植し、膵島生着に不可欠な血管新生を増進させることにより、移植膵島の機能改善、維持が可能であると考えた。

(1)大動物モデル(犬)からのPBSCsおよびMSCsの分離培養方法の確立

(2)犬膵島移植モデルによる幹細胞同時移植効果の検討

### 3. 研究の方法

#### (1) PBSCsの採取

体重10kg、雌、ビーグル犬を用いて、全身麻酔下に右大腿動脈、静脈にカットダウン法にてかみゆレーションを行った。体外循環を行い、にて末梢血よりPBSCsを分離し、FACSにてCD34陽性細胞を検出した。

#### (2) MSCsの採取、培養

体重10kg、雌、ビーグル犬を用いて、全身麻酔下に上腕骨より骨髓細胞を採取した。市販のMSCs培養液で骨髓細胞を培養し、接着細胞のみを継代していった。脂肪、骨細胞への分化誘導が可能であることを確認し、さらにFACSにてCD34が陰性であることを確認した。

#### (3) 犬膵島移植モデル

体重10kg、雌、ビーグル犬を用いて、全身麻酔下に開腹、膵臓摘出を行った。膵管よりコラゲナーゼを注入し、臨床で一般に用いられているRicordi法にて膵臓を消化した。消化された膵臓をCOBEにて連続比重勾配で膵島のみを分離し、経門脈的に肝内に自家移植した。

### 4. 研究成果

(1) G-CSFの投与によって、全有核細胞数、CD34陽性細胞数 (PBSCs) は明らかに増加した。

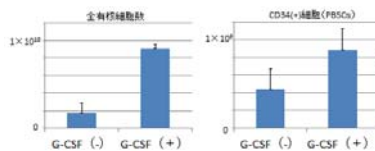


図1 PBSCsの収量

(2) 分離培養された細胞は98%がCD34陰性であり、肉眼的には紡錘形であった。分化誘導実験において脂肪細胞、骨細胞へ分化が確認されたため、MSCsであることが証明された。

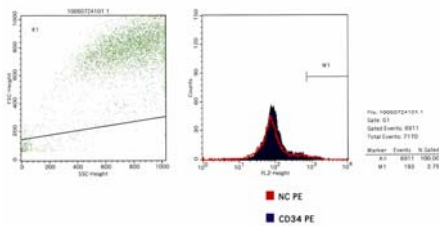


図2 FACSによる骨髓由来幹細胞の解析 (CD34)

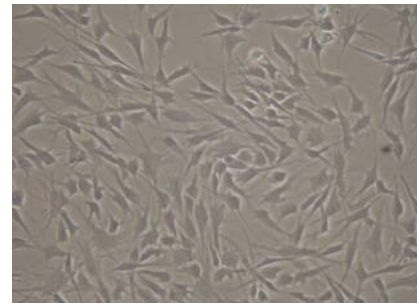


図3 犬骨髓由来間葉系幹細胞

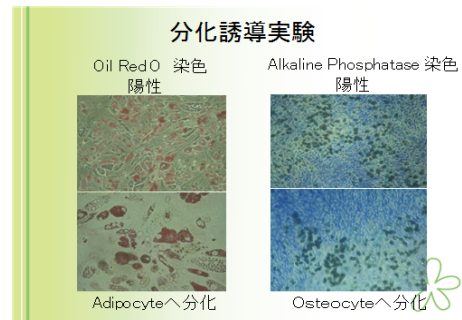


図4 犬間葉系幹細胞の分化誘

(3) 犬膵島自家移植モデルでの比較検討は今後も継続して行われるが、十分な膵島を移植された自家移植モデルでは以下のように非常に良好な耐糖能を示す。

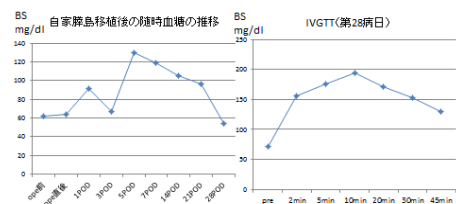


図5 犬自家膵島移植モデルにおける移植後耐糖能

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3件)

① Ito T, Itakura S, Todorov I, Rawson J, Asari S, Shintaku J, Nair I, Ferreri K, Kandeel F, Mullen Y. : Mesenchymal stem cell and islet co-transplantation promotes graft revascularization and function. *Transplantation* 89 (12) : 1438-45, 2010 査読有

② Asari S, Itakura S, Rawson J, Ito T, Todorov I, Nair I, Shintaku J, Liu CP, Kandeel F, Mullen YS. Mesenchymal stem cells facilitate mixed hematopoietic chimerism induction and prevent onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *Pancreas*. 2011 Aug;40(6):846-54. 査読有

③ Todorov I, Nair I, Avakian-Mansoorian A, Rawson J, Omori K, Ito T, Valiente L, Iglesias-Meza I, Orr C, Shiang KD, Ferreri K, Al-Abdullah IH, Mullen Y, Kandeel F. : Quantitative assessment of  $\beta$ -cell apoptosis and cell composition of isolated, undisrupted human islets by laser scanning cytometry. *Transplantation* 90 (8) : 836-42, 2010 査読有

[学会発表] (計8件)

① Taihei Ito, Takashi Kenmochi, Kennichi Saigo, Michihiro Maruyama, Naotake Akutsu, Kazunori Ohtsuki, Chikara Iwashita, Eiji Kobayashi, Takehide Asano The application of luciferase transgenic rats for experimental islet transplantation model IPITA-IXA 2009. 2009/10/12-16. Venis, Italy

② 伊藤泰平, 剣持敬, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 大月和宣, 岩下力, 齋藤友永: WST-1/DNA assay による膵島viability測定。第37回膵膵島移植学会。2010/3/12-14。宇都宮

③ Taihei Ito, Takashi Kenmochi, Michihiro Maruyama, Kenichi Saigo, Naotake Akutsu, Chikara Iwashita, Kazunori Otsuki, Saito Tomonori, Takehide Asano : A new viability assay of islet using WST-1/DNA. XXIII International Congress of The Transplantation. 2010/8/16. Vancouver, Canada

④ 齋藤友永, 剣持敬, 伊藤泰平, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 岩下力, 大月和宣, 浅野武秀, Canine Mesenchymal Stem Cell (cMSCs) の分離・培養 — 大動物膵膵島移植実験への応用にむけて — 第46回日本移植学会 2010年10月20-22日 京都

⑤ 伊藤泰平, 剣持敬, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 大月和宣, 岩下力, 齋藤友永, 浅野武秀: 膵島移植におけるMesenchymal stem cells (MSCs)を用いたGene delivery system。第46回日本移植学会 2010年10月20-22日 京都

⑥ 齋藤友永, 剣持敬, 伊藤泰平, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 岩下力, 大月和宣, 浅野武秀, イヌ膵島移植モデルへの応用に向けたイヌ間葉系幹細胞 (cMSC) の分離、培養

第37回日本臓器保存生物医学会 2010年11月19日~20日。新潟

⑦ 伊藤泰平, 剣持敬, 西郷健一, 丸山通広, 坪尚武, 大月和宣, 岩下力, 齋藤友永, 浅野武秀: 膵島分離における膵臓保存時の膵管内注入保存液の検討。第38回日本膵膵島移植学会。2011/3/4。奈良

⑧ Taihei Ito, Takashi Kenmochi, Michihiro Maruyama, Naotake Akutsu, Kazunori Ohtsuki, Chikara Iwashita, Matsumoto Ikuko, Takehide Asano. UW solution improves islet yield as a solution for pancreatic duct preservation better than ET-Kyoto solution. 12th Congress of the Asian

6. 研究組織

(1) 研究代表者 伊藤 泰平  
(ITO TAIHEI)  
独立行政法人国立病院機構（千葉東病院臨床  
研究センター）臨床研究センター 医員  
研究者番号：60509701

(2) 研究分担者 剣持 敬  
(KENMOCHI TAKASHI)  
独立行政法人国立病院機構（千葉東病院臨床  
研究センター）臨床研究センター センタ長  
研究者番号：5015133

丸山 通広  
(MARUYAMA MICHIIHIRO)  
独立行政法人国立病院機構（千葉東病院臨床  
研究センター）分子生物研究室 室長  
研究者番号：40399754

坏 尚武  
(AKUTSU NAOTAKE)  
独立行政法人国立病院機構（千葉東病院臨床  
研究センター）移植再生医療研究部 部長  
研究者番号：00344979

大月 和宣  
(OTSUKI KAZUNORI)  
独立行政法人国立病院機構（千葉東病院臨床  
研究センター）実験治療開発研究室 室長  
研究者番号：50399755

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：