

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08591

研究課題名（和文）不織布構造ゼラチン基材による皮下膵島生着促進プロトコルの確立

研究課題名（英文）The improvement in islet engraftment using a gelatin hydrogel nonwoven fabric on subcutaneous islet transplantation

研究代表者

稲垣 明子（Inagaki, Akiko）

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20360224

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）：皮下は低侵襲で必要に応じて摘出や再移植が容易なため、膵島の新たな移植部位として注目されているが、移植膵島の生着に重要な血流に乏しいという問題がある。本研究では、不織布構造ゼラチン基材（GHNF）に着目し、マウスとラットモデルを用いて検証を行った。その結果、マウスモデルではGHNFと脂肪由来幹細胞を組み合わせることで、効果的に移植前血管床構築を促進させ、現在の標準法である経門脈膵島移植を大きく上回る移植効果が得られることが判明した。ラットモデルでもGHNFの皮下前留置によって、移植成績が向上することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮下は低侵襲で必要に応じて摘出や再移植が容易なため、膵島の新たな移植部位として注目されているが、移植膵島の生着に重要な血流に乏しいという問題がある。本研究では、GHNFとADSCを組み合わせることで、現在の標準法である経門脈膵島移植を大きく上回る移植効果を発揮し得ることが判明した。本研究の成果は、低侵襲で移植膵島のモニタリングや摘出が容易な皮下膵島移植の実現につながり、また人工多能性幹細胞（iPS細胞）等から作製されるインスリン産生細胞等を用いた安全な細胞移植療法の実現を可能にする点から社会的意義のあるものである。

研究成果の概要（英文）：The subcutaneous region is attracting attention as a new transplant site for islets because it is minimally invasive and can be easily removed and reimplanted as needed. However, there is a problem of poor blood flow, which is important for the successful implantation of transplanted islets. In this study, we focused on nonwoven structured gelatin base material (GHNF) and verified it using mouse and rat models. The results showed that in the mouse model, the combination of GHNF and adipose-derived stem cells effectively promoted pre-transplant vascular bed construction and significantly exceeded the current standard method of trans-portal islet transplantation. In a rat model, the transplantation outcome was also found to be improved by the subcutaneous preimplantation of GHNF.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：膵島移植

キーワード：膵島移植 皮下移植 血管新生 スキャホールド ADSC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵島移植は重症糖尿病に対する細胞移植療法であり、経皮門脈的に肝臓内に移植する門脈移植が世界標準となっている。しかし門脈移植は、出血や塞栓等の合併症が発生する可能性があり、また今後の再生医療技術の導入により幹細胞由来膵島を使用した際の万一の腫瘍発生時に摘出することが不可能である。このような理由から、門脈移植に代わる移植部位の創出が強く求められており、低侵襲で移植膵島のモニタリングや摘出が容易な皮下がその第一候補となっている。しかし皮下は血管に乏しく膵島の生着率が低いため、皮下の血管網構築プロトコルの確立が重要である。皮下への膵島移植を確立するためには、移植予定箇所の皮下に血管や細胞外マトリックスから成る膵島生着床を効果的に構築し、膵島の生着効率を上げることが重要であると考えた。そこで本研究では、不織布構造のゼラチン基材 GHNF に着目した。ゼラチンは元来細胞接着性が高く生分解性があるため、GHNF のゼラチン繊維に沿って細胞が生着、増殖、進展することで、自己細胞由来の足場として機能するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究ではマウスおよびラットモデルで皮下への GHNF 前留置による膵島生着促進プロトコルを至適化し、さらに皮下における膵島生着促進に関与する因子を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスモデルにおける GHNF の至適留置期間の検証

レシピエントマウス (C57BL/6 マウス) の膵島移植予定部位の皮下に、2 枚の GHNF の間にスペーサーとしてシリコンを挟んで留置した。前留置の期間を、2 週間 (2W 群)、4 週間 (4W 群)、6 週間 (6W 群)、8 週間 (8W 群) の 4 群を設定し、270 IEQs (islet equivalents; 膵島量) の同種同系膵島移植を行った。移植 7 日前に Streptozotocin (STZ) を投与し糖尿病を誘導した。膵島移植は、シリコンを除去した皮下のスペースに行った。移植後は、血糖と体重の推移を観察し、腹腔内ブドウ糖負荷試験にてグラフトの耐糖能を評価した。また、皮下組織の免疫組織化学染色、炎症性および抗炎症性サイトカインの測定、リアルタイム PCR (polymerase chain reaction) による遺伝子発現解析を施行し、皮下移植部位での血管新生や ECM を評価した。

(2) GHNF ラットモデルにおける

Lewis rat の皮下に、2 枚の GHNF の間にスペーサーとしてシリコンを挟んで留置した (GHNF 群、n=8)。比較群としてシリコンを皮下に留置したシリコン群 (n=8) を設定した。前留置期間は 3 週間とし、各群において移植 7 日前にストレプトゾトシンにて糖尿病を誘導後、5400 IEQs の同種同系膵島移植を行った。移植後、血糖値、経静脈的糖負荷試験、膵島グラフト及および皮下組織の免疫組織化学染色、血管造影検査にて評価を行った。

(3) GHNF と脂肪由来幹細胞の併用による皮下膵島移植成績の検討

マウスの皮下に GHNF を留置する前日に、GHNF 上に 1×10^6 個 ADSC を播種し一晩培養した。ADSC の有無により、ADSC+GHNF 群 (AG 群)、GHNF 単独群 (G 群)、対照群としてシリコンスペーサーのみを留置する群 (S 群)、門脈移植群の 4 群を設定した。各群における移植前処置期間を 6 週間とし、移植 7 日前に糖尿病を誘導後、180 IEQs の同種同系膵島移植を行った。移植後、血糖値測定、糖負荷試験、皮下組織の免疫染色、遺伝子発現解析を実施した。さらに、ADSC に皮下移植後の動態を確認するために、GFP マウスの ADSC を用いて、移植後 1、2、6 週後で組織学的に評価した。

4. 研究成果

(1) マウスモデルにおける GHNF の至適留置期間の検証

膵島移植後の血糖値と治癒率は、6W 群が他の群と比べ有意に良好な値を示した ($p < 0.01$)。また、腹腔内ブドウ糖負荷試験でも同様に、6W 群が他の群と比べ有意に良好な値を示した ($p < 0.01$)。膵島移植前の GHNF 周囲被膜および膵島移植後の膵島周囲間質での von Willebrand factor (vow) 陽性血管数は、6W 群で他群よりも有意に増加していた ($p < 0.01$)。膵島周囲線維被膜部の ECM 陽性切片の割合は、留置期間が長くなるにつれて増加し、8W 群のラミニン、コラーゲン、コラーゲン で他群よりも有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。CD206 陽性細胞は、GHNF 内および周囲の被膜内で 2W 群が最も多く、経時的な減少がみられた ($p < 0.01$)。interleukin-1b (IL-1b)、interferon- (INF-)

granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) 等の炎症性メディエーターは GHNF の前留置期間に応じて徐々に減少し、8W 群で再び上昇した。リアルタイム PCR では 2W 群に比べて 6W 群では 22 遺伝子の増幅が有意にみられた。

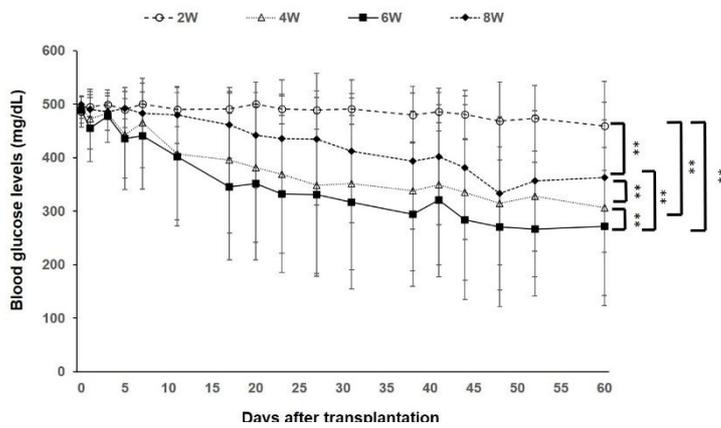


図 1 各群における膵島移植後の血糖値の推移

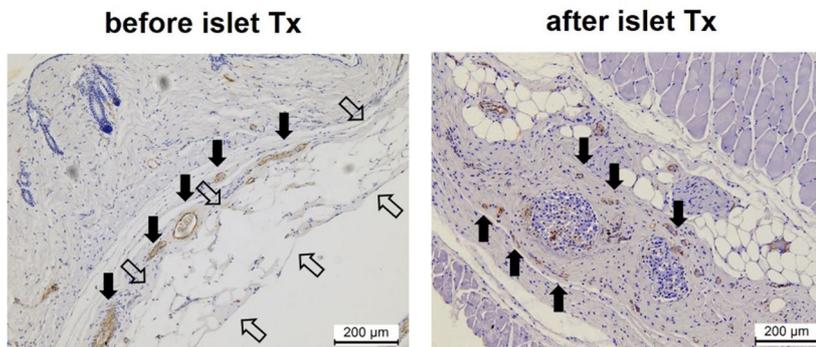


図 2 vWF 染色による膵島の周囲間質の新生血管の評価

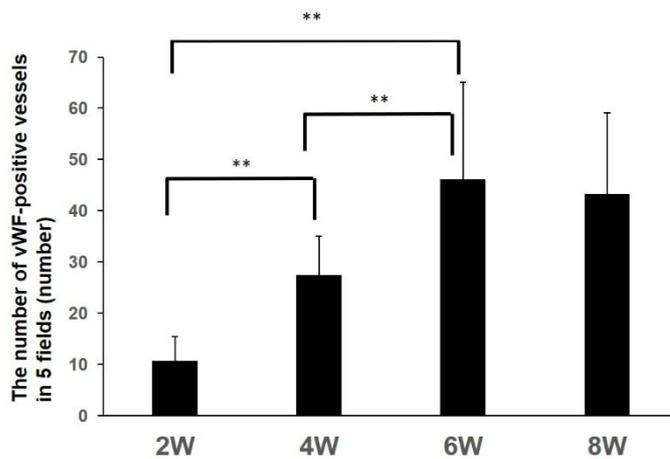


図 3 膵島移植前の GHNF 周囲被膜における vWF 陽性血管数の比較

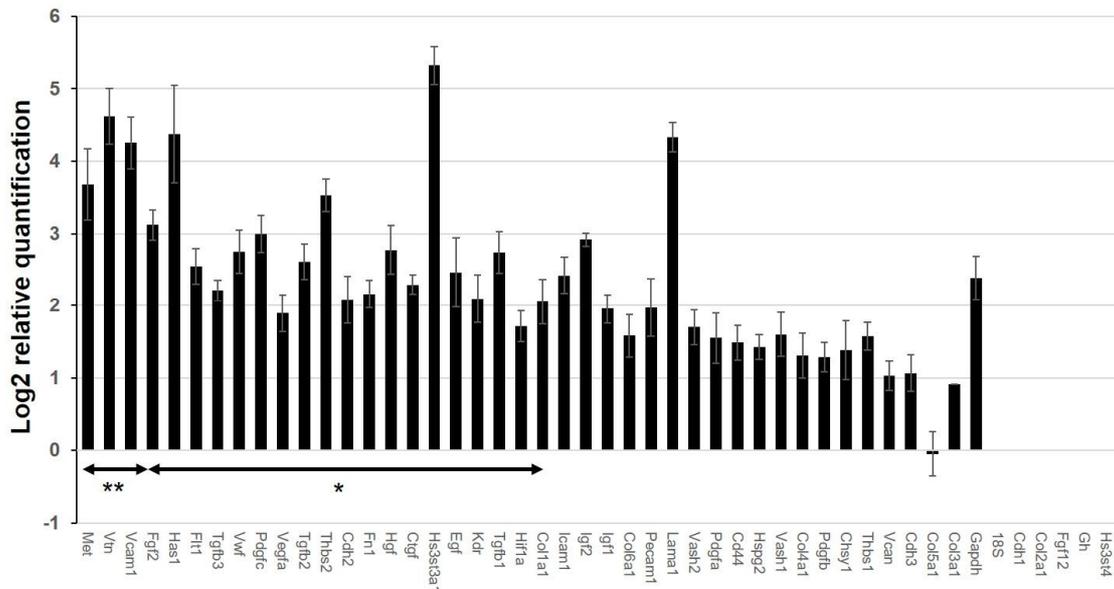


図4 2W群と6W群の相対的遺伝子発現

2W群 (n=5) に対する6W群 (n=5) の相対遺伝子発現量 (RQ: relative quantification) の平均 ± 標準誤差をlog2対数スケールにて表記している。

** p<0.01: MET, VTN, VCAM1

* p<0.05: FGF2, HAS1, FLT1, TGF 3, vWF, PDGFC, VEGFA, TGF- 2, THBS2, CDH2, FN1, HGF, CTGF, HS3ST3A1, EGF, KDR, TGF- 1, HIF1a

2W群 (n=5) に対する6W群 (n=5) の相対遺伝子発現量 (RQ: relative quantification) の平均 ± 標準誤差をlog2対数スケールにて表記している。

(2) ラット皮下膵島移植におけるGHNFの前留置が移植結果へ及ぼす影響

各群の膵島移植後60日における糖尿病治癒率は、それぞれGHNF群 62.5%、Siliconシリコン群 12.5%であった(p=0.045)。移植後の血糖値の推移および血糖負荷試験においても、GHNF群が有意に良好な経過を示した(p<0.01)。

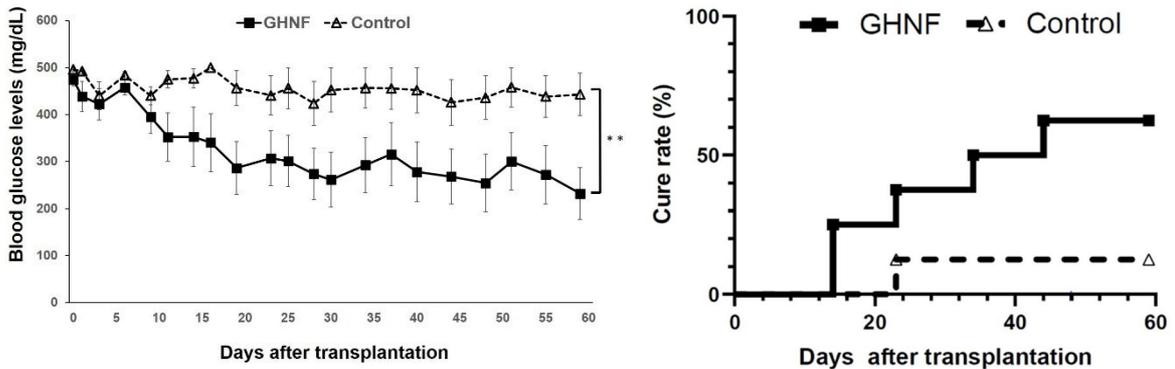


図5 各群における膵島移植後の血糖値の推移と治癒率

(3) GHNFと脂肪由来幹細胞の併用による皮下膵島移植成績の検討

AG群は、シリコン群およびIPO群と比較して有意に良好な血糖変化を示した。AG群の治癒率(72.7%)は、GHNF群40.0%、IPO群40.0%、Silicone群0%の中で最も高かった。移植前の皮下腔のvWF陽性血管数は、AG群が他の群より有意に多かった(P<0.01)。レクチン血管造影でも同様の結果が得られた(P<0.05)。ADSCsトレースの結果によると、移植部位(移植後6週)にはADSCsは存在しなかった。移植膵島周囲に構築されたラミニンおよびコラーゲンIIIの陽性率は各群で差がなかった。炎症性メディエーターはシリコン群で高く、次いでAG群、GHNF群であった。生体吸収性スキャフォールドとADSC組み合わせによる前処置は、皮下の新生血

管形成を促進し、皮下膵島移植において門脈内膵島移植を凌駕する移植成績を示すことが明らかになった。

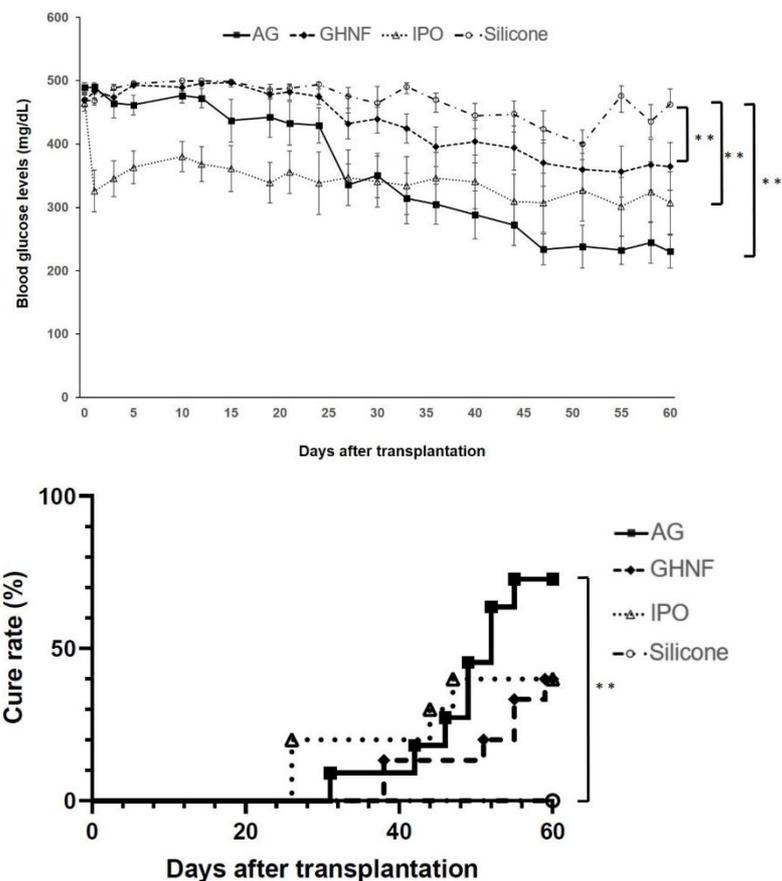


図 6 各群における膵島移植後の血糖値の推移と治癒率

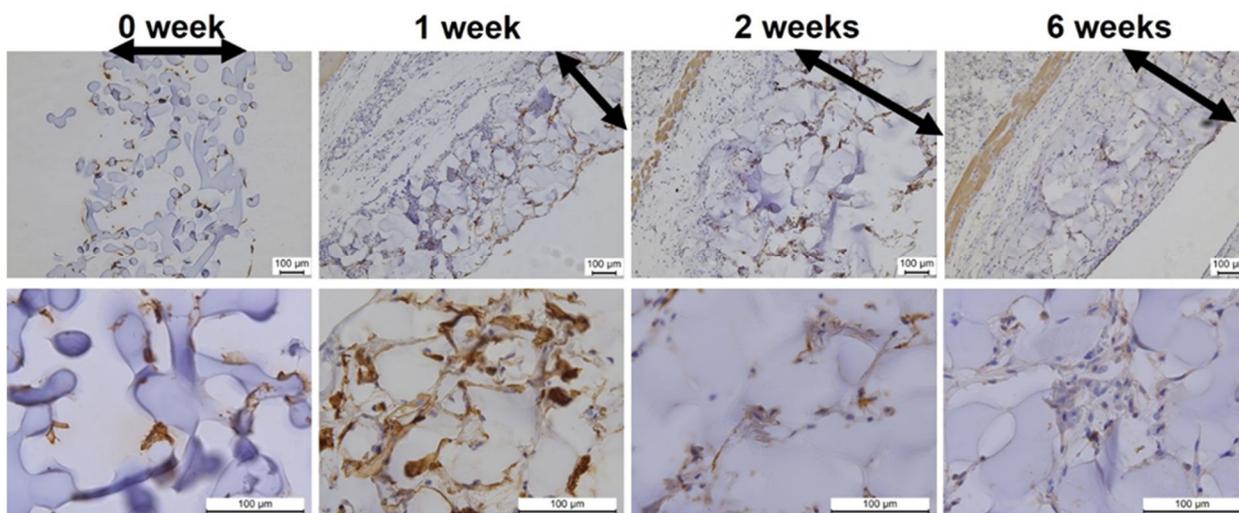


図 7 皮下移植後の ADCS の動態 (GFP マウス ADSC)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito Ryusuke, Inagaki Akiko, Nakamura Yasuhiro, Imura Takehiro, Kanai Norifumi, Mitsugashira Hiroaki, Endo Yukiko, Katano Takumi, Suzuki Shoki, Tokodai Kazuaki, Kamei Takashi, Unno Michiaki, Watanabe Kimiko, Tabata Yasuhiko, Goto Masafumi	4. 巻 32
2. 論文標題 Ideal Duration of Pretreatment Using a Gelatin Hydrogel Nonwoven Fabric Prior to Subcutaneous Islet Transplantation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 51-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/09636897231186063	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 Saito Ryusuke, Inagaki Akiko, Nakamura Yasuhiro, Imura Takehiro, Kanai Norifumi, Mitsugashira Hiroaki, Endo Kumata Yukiko, Katano Takumi, Suzuki Shoki, Tokodai Kazuaki, Kamei Takashi, Unno Michiaki, Watanabe Kimiko, Tabata Yasuhiko, Goto Masafumi	4. 巻 13
2. 論文標題 A Gelatin Hydrogel Nonwoven Fabric Enhances Subcutaneous Islet Engraftment in Rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 51～51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells13010051	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 Mitsugashira Hiroaki, Imura Takehiro, Inagaki Akiko, Endo Yukiko, Katano Takumi, Saito Ryusuke, Miyagi Shigehito, Watanabe Kimiko, Kamei Takashi, Unno Michiaki, Goto Masafumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of a novel method for measuring tissue oxygen pressure to improve the hypoxic condition in subcutaneous islet transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14731
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-19189-2	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yukiko Endo, Akiko Inagaki, Takehiro Imura, Hiroaki Mitsugashira, Ryusuke Saito, Takumi Katano, Shigehito Miyagi, Takashi Kamei, Michiaki Unno, Yasuhiko Tabata, Masafumi Goto.
2. 発表標題 Liver surface can be a promising transplant site for pancreatic islets using a gelatin hydrogel nonwoven fabric
3. 学会等名 29th International Congress of The Transplantation Society (TTS 2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Norifumi Kanai, Akiko Inagaki, Yasuhiro Nakamura, Takehiro Imura, Hiroaki Mitsugashira, Ryusuke Saito, Shigehito Miyagi, Takashi Kamei, Michiaki Unno, Yasuhiko Tabata, Masafumi Goto.
2. 発表標題 A gelatin hydrogel nonwoven fabric improves outcomes of subcutaneous islet transplantation
3. 学会等名 29th International Congress of The Transplantation Society (TTS 2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齊藤 竜助、 稲垣明子、中村保宏、宮城重人、亀井尚、海野倫明、田畑泰彦、 後藤昌史
2. 発表標題 皮下膵島移植における不織布構造ゼラチン基材の前留置期間が移植結果へ及ぼす影響
3. 学会等名 第58回日本移植学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齊藤竜助、 稲垣明子、中村保宏、猪村武弘、片野匠、戸子台和哲、 亀井尚、海野倫明、田畑泰彦、後藤昌史
2. 発表標題 ラット皮下膵島移植における不織布構造ゼラチン基材の前留置が移植結果へ及ぼす影響
3. 学会等名 第48回 日本臓器保存生物医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲垣明子、齊藤竜助、金井哲史、植松智海、中村保宏、猪村武弘、三頭啓明、遠藤有希子、片野 匠、鈴木翔輝、渡邊君子、田畑泰彦、後藤昌史
2. 発表標題 不織布構造ゼラチン基材の前留置期間が皮下膵島移植の生着に及ぼす影響に関する検討
3. 学会等名 第50回日本膵・膵島移植学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 皮下における臍島生着環境の創出
2. 発表標題 稲垣明子、斎藤竜助、金井哲史、植松智海、中村保宏、猪村武弘、三頭啓明、遠藤有希子、片野匠、鈴木翔輝、遠藤有希子、田畑泰彦、後藤昌史
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齋藤竜助、稲垣明子、中村保宏、猪村武弘、遠藤有希子、三頭啓明、金井哲史、宮城重人、亀井尚、海野倫明、田畑泰彦、後藤昌史
2. 発表標題 皮下臍島移植における不織布構造ゼラチン基材の前留置 期間に関する検討
3. 学会等名 第49回日本臍・臍島移植学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後藤昌史、稲垣明子、猪村武弘、金井哲史、三頭啓明、齋藤竜助、遠藤有希子、片野匠、戸子台和哲、宮城重人、亀井尚、海野倫明、田畑泰彦、村山和隆、渡邊君子
2. 発表標題 幹細胞移植や異種移植などの臍島移植代替治療を促進する細胞デバイスの開発
3. 学会等名 第49回日本臍・臍島移植学会
4. 発表年 2022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
研究分担者	後藤 昌史 (Goto Masafumi) (50400453)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	

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
---------	---------